KÁTIA NARDELLI GRECO

ESTUDO DE PROTEÍNAS OBTIDAS DE HEMOLINFA
DE *LONOMIA OBLIQUA* COM AÇÃO ANTIVIRAL

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2009

KÁTIA NARDELLI GRECO

ESTUDO DE PROTEÍNAS OBTIDAS DE HEMOLINFA
DE *LONOMIA OBLIQUA* COM AÇÃO ANTIVIRAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

São Paulo

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Kátia Nardelli Greco

Dissertação: Estudo de proteínas obtidas de hemolinfa de
Lonomia obliqua com ação antiviral

Orientador(a): Ronaldo Zucatelli Mendonça

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a)

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, Pedro e Eliete e à
minha irmã Lilian, pelo apoio,
presença constante e amor
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, meu orientador, pela oportunidade primorosa, pelo carinho, conversas, apoio e todos os ricos ensinamentos que me proporcionaram grande crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira, pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan e por todas as indagações construtivas.

Aos amigos do LIV: Soraia, Isabel, Renato, Coutinho, Fabiana, Marcos, Alexandra, Mariza e Luciana (L2), por todas as discussões cheias de conteúdo, pela amizade, diversão e incentivo profissional.

À todos os colegas do Projeto Temático “*Expressão de proteínas heterólogas em células de dípteros: biologia molecular e engenharia de processos*”, pela oportunidade de trabalhar ao lado de grandes professores. Minha profunda admiração.

Às queridas e doces Luciana e Fernanda, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e por todo carinho e amizade em todas as horas.

Ao Doutor e amigo Álvaro, por todos os ensinamentos e sabedoria, pela disposição em ajudar sempre, pela alegria, amizade e companheirismo.

Às inigualáveis Lucia e Margarida, pela espontaneidade, lições, torcida, chás, biscoitinhos e cafezinhos maravilhosos.

À Dulce e Dona Chiquinha, por toda colaboração.

Aos amigos engenheiros do Bloco 20: Aldo, Mari, Paula, Mariana, Zé, Thiago...pelos momentos de reflexão e descontração, churrascos, almoços...

Aos colegas do Laboratório de Virologia do ICB/USP, por todo apoio. À Claudia, pelas aulas e por toda a paciência em ensinar.

Às amigas maravilhosas do Laboratório de Biotecnologia do Butantan: Pati, Érika, Roberta, por todas as risadas, conversas, viagens.

Ao pessoal de Itatiba, minha família querida, tia Rê, tio Zeu, Pedroca (agora na Finlândia!), vó Celina, Dada, Nath, Leo, Luiz Felipe e Luiz Henrique pela torcida, conversas, e muitas risadas.

Aos amigos da Metodista, Priscila, Nadine, Flávio, Digos, Prixila, Claudiones, Juliana, Lilis, por estarem sempre tão intensamente presentes na minha vida.

Ao Lucas, por sempre estar ao meu lado, continuamente fazendo planos, sem medir esforços e nutrindo minha vida de energia.

A todos que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro.

*“Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz (...).”*

Clarice Lispector

RESUMO

Greco KN. Estudo de proteínas obtidas de hemolinfa de *Lonomia obliqua* com ação antiviral [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Diversos trabalhos têm demonstrado a presença de peptídeos bioativos em hemolinfa de insetos e seu potencial uso como agentes terapêuticos. Contudo poucos dados estão disponíveis no que se refere a moléculas extraídas de insetos com ação antiviral e/ou antitumoral. O objetivo deste trabalho foi identificar e isolar proteínas da hemolinfa de *Lonomia obliqua* com ação antiviral. Testes de citotoxicidade em células Vero, revelaram que a hemolinfa foi citotóxica apenas em concentrações superiores a 5%. Ensaio de atividade antiviral realizados sobre poliovírus (Sabin 1) e vírus do sarampo (cepa Edmonton) cultivados em células Vero, mostraram que o melhor momento de adição da hemolinfa no cultivo é antes da infecção viral, sendo que para o poliovírus (Sabin 1), houve uma redução de $1,5 \times 10^7$ TCID₅₀/mL no cultivo controle para 4×10^5 TCID₅₀/mL no cultivo em presença da hemolinfa, e para sarampo, o título viral produzido nessa condição foi aproximadamente 100 vezes menor do que o cultivo controle. Após cromatografia em coluna de gel filtração, foram obtidos 3 diferentes *pools* de proteína. O *pool* responsável pela ação antiviral foi identificado (*Pool 2*), uma vez que reduziu em 87 vezes o título de poliovírus, e de $1,6 \times 10^6$ TCID₅₀/mL para $2,7 \times 10^5$ TCID₅₀/mL o título do vírus sarampo. O *Pool 2* foi fracionado por cromatografia de troca iônica. A fração responsável pela ação antiviral da hemolinfa de *Lonomia obliqua* frente aos vírus poliovírus (Sabin 1) e do sarampo (cepa Edmonton) foi identificada - RQ 3-4, esta proteína, de aproximadamente 20 kDa, tem ação sobre vírus envelopado (sarampo) e vírus desprovido de envelope viral (poliovírus).

Palavras-chave: Atividade Antiviral; Hemolinfa; *Lonomia obliqua*.

ABSTRACT

Greco KN. Study of proteins obtained from *Lonomia obliqua* hemolymph with antiviral activity [dissertation]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Several works have demonstrated the presence of bioactive peptides in insect hemolymph and their potential use as therapeutic agents. However, few data are available on molecules from insects with antiviral and/or antitumoral activities. The objective of this work was to identify and purify proteins obtained from *Lonomia obliqua* hemolymph with antiviral activity. The cytotoxicity tests, carried out in Vero cell culture, showed that the hemolymph was cytotoxic only at concentrations above 5%. The effect of hemolymph on virus growth was measured on confluent monolayers of Vero cells infected with poliovirus (Sabin 1 strain) and measles virus (Edmonton strain). The analyses demonstrated that the best time for hemolymph addition in the cell culture is before the viral infection, under this condition, the poliovirus titer had reduced from 1.5×10^7 TCID₅₀/mL to 4×10^5 TCID₅₀/mL and for measles virus, the virus titer produced under this condition was about 100 times lower than the control culture. After gel filtration chromatography, the hemolymph was divided into 3 *pools* of protein. The *pool* responsible for the antiviral activity was identified (Pool 2), once it reduced to 87 times the poliovirus titer, and the measles virus titer from 1.6×10^6 TCID₅₀/mL to 2.7×10^5 TCID₅₀/mL. The Pool 2 was fractionated by ion-exchange chromatography. The fraction from *Lonomia obliqua* hemolymph responsible for the antiviral activity was identified - RQ 3-4, this protein of approximately 20 kDa, has antiviral effect on enveloped virus (measles) and on non enveloped virus (poliovirus).

Key Words: Antiviral activity; hemolymph; *Lonomia obliqua*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lagartas <i>Lonomia obliqua</i> . (A) Um grupo de lagartas formando uma colônia e (B) um espécime isolado. (Cedido por Roberto Henrique Pinto Moraes)	21
Figura 2. Representação esquemática de partículas virais (A) vírus não envelopados e (B) vírus circundado por envelope externo. (Mims <i>et al.</i> , 1999)26	
Figura 3. Representação esquemática das fases da infecção viral de uma célula hospedeira e da replicação viral. (Mims <i>et al.</i> , 1999).....	28
Figura 4. Microscopia eletrônica da partícula viral do vírus sarampo.....	31
Figura 5. Modelo estrutural da superfície da partícula de poliovírus.	32
Figura 6. Efeito Citopático (ECP) causado pela replicação dos vírus do sarampo e poliovírus em culturas de células Vero. (A) Cultura de células Vero não infectada; (B) Cultura de células Vero infectada com vírus do sarampo e (C) Cultura de células Vero infectada com poliovírus. Fotomicrografias obtidas em aumento de 400x.....	34
Figura 7. Células Vero tratadas ou não (Controle) com diferentes concentrações de hemolinfa. (A) Gráfico da Viabilidade celular (%) e (B) Fotografia da placa de cultivo celular corada com cristal violeta no sexto dia de cultivo na presença das diferentes concentrações de hemolinfa.	51
Figura 8. Cinética de crescimento de células Vero tratadas com 1% de hemolinfa (cél+HB) ou não (controle) conforme indicado na legenda do gráfico, amostras dos cultivos foram coletadas e coradas com azul de trypan para determinação da concentração de células. Os valores representam a média de dois experimentos independentes acompanhados de barras de desvio padrão.....	53

Figura 9. Fotomicrografia de cultivos de células Vero (48 horas), infectadas com 0,1 MOI de poliovírus e tratadas ou não com 1% de hemolinfa de *Lonomia obliqua*. Os cultivos foram corados com azul de trypan e observados em microscópio óptico invertido com aumento de 100x..... 58

Figura 10. Fotomicrografia de cultivos de células Vero (A) normais e (B, C e D) infectadas com 0,1 MOI de vírus do sarampo. Os cultivos foram mantidos por 72 horas a 37 °C e após este período as células foram coradas com cristal violeta 0,25% e observadas em microscópio óptico invertido em aumento de 400x (A e B), aumento de 200x (C) e aumento de 100x (D). 59

Figura 11. Citometria de fluxo dos cultivos infectados com 0,1 MOI de sarampo, tratados com 1% de hemolinfa 1 hora antes (HB antes), adicionada junto com o vírus (vírus+HB) ou 1 hora após a infecção (HB depois). As células foram marcadas com anticorpos específicos por imunofluorescência indireta após 72 horas de cultivo a 37 °C. O * indica os valores com $p < 0,05$ e as barras indicam o desvio padrão..... 62

Figura 12. Citometria de fluxo - Controle negativo: células Vero não infectadas; Controle positivo: células Vero infectadas com 0,1 MOI de vírus do sarampo; HB antes: cultivos tratados com 1% de hemolinfa 1 hora antes da infecção; HB depois: cultivos tratados com 1% de hemolinfa 1 hora depois da infecção. As células foram marcadas com anticorpos específicos por imunofluorescência indireta após 72 horas de cultivo a 37 °C. 65

Figura 13. Purificação da hemolinfa de *Lonomia obliqua* por cromatografia de gel filtração em coluna Sephacryl 200. A eluição foi realizada com solução Tris (20 mM) e NaCl (150 mM). O fluxo utilizado foi de 1 ml/minuto e coletadas frações de 4 mL. As frações foram separadas em 3 pools conforme indicado pelas barras..... 66

Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, da hemolinfa bruta (HB) e dos *Pools* (P1, P2 e P3) da hemolinfa de *Lonomia obliqua*. O gel foi revelado por impregnação por prata. Peso molecular de calibração PageRuler™; Prestained Protein Ladder (10-170 kDa). 67

Figura 15. Citotoxicidade dos *Pools* 1, 2 e 3 da hemolinfa: células Vero tratadas ou não (Controle) com diferentes concentrações de cada *pool* conforme indicado na legenda do gráfico. Os gráficos mostram viabilidade celular (%) e as imagens mostram as placas de cultivo celular coradas com cristal violeta no sexto dia de cultivo, na presença das diferentes concentrações dos *pools*. 69

Figura 16. Cinética de crescimento de células Vero tratadas com 1% de hemolinfa (cél+HB) ou não (controle), ou 3% de *Pool* 1, *Pool* 2 ou *Pool* 3, conforme indicado na legenda do gráfico. Os valores representam a média dos experimentos acompanhados de barras de desvio padrão e o * indica os valores com $p < 0,05$ 70

Figura 17. Cromatograma do *Pool* 2 da hemolinfa de *Lonomia obliqua* obtido por cromatografia em coluna Resource Q. Foi aplicado à coluna 0,5 mL do *Pool* 2. A coluna foi equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e a eluição foi realizada em gradiente linear de NaCl até 1M conforme indicado pela linha verde, com fluxo de 0,7 mL por minuto. Foram coletadas frações de 0,5 mL, reunidas conforme indicado pelas chaves. 74

Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% da fração RQ 3-5 do *Pool* 2. O gel foi revelado por impregnação por prata. Foi utilizado peso molecular de calibração da Amersham (14-94 kDa). A seta indica a banda de aproximadamente 20 kDa da fração RQ 3-5. 78

Figura A.1. Representação esquemática do procedimento de cultivo das amostras virais através de diluições seriadas (Carter e Saunders, 2007).90

Figura A.2. Metodologia do cálculo da titulação viral segundo *Reed e Muench* (1938), através dos dados obtidos da leitura dos poços das placas de cultivo. (Carter e Saunders, 2007)..... 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Técnicas de cromatografia líquida	24
--	----

Tabela 2. Ação da hemolinfa sobre poliovírus e sarampo. Os vírus foram mantidos em contato com 1% de hemolinfa bruta (HB) por 2 horas em temperatura ambiente e após este período titulado e o resultado expresso em TCID ₅₀ /mL.	55
--	----

Tabela 3. Efeito citopático (ECP) e produção de poliovírus em cultivos infectados com 0,1MOI e tratados com 1% de hemolinfa bruta (HB). Os cultivos foram mantidos por 72 horas a 37°C. Títulos virais expressos em TCID ₅₀ /mL.	57
---	----

Tabela 4. Efeito citopático e produção do vírus do sarampo em cultivos infectados com 0,1MOI e tratados com 1% de hemolinfa bruta (HB). Os cultivos foram mantidos por 72 horas a 37°C. Títulos virais expressos em TCID ₅₀ /mL.	61
---	----

Tabela 5. Concentração de proteínas na hemolinfa bruta e em suas frações, e volume total coletado correspondente a cada <i>pool</i> , após purificação em cromatografia de gel filtração em uma coluna Sephacryl 200.	67
---	----

Tabela 6. Produção do poliovírus em cultivos tratados com 1% de hemolinfa bruta (HB) ou 3% de cada <i>pool</i> , 1 hora antes da infecção com 0,1MOI do vírus. Os cultivos foram mantidos por 48 horas a 37°C. Títulos virais expressos em TCID ₅₀ /mL.	72
--	----

Tabela 7. Produção do vírus do sarampo em cultivos tratados com 1% de hemolinfa bruta (HB) ou 3% de cada <i>pool</i> , 1 hora antes da infecção 0,1MOI do vírus. Os cultivos foram mantidos por 72 horas a 37°C. Títulos virais expressos em TCID ₅₀ /mL.	73
--	----

Tabela 8. Poliovírus produzido em cultivos tratados com 5% de cada uma das frações do *Pool 2* uma hora antes da infecção com 0,1MOI do vírus. Os cultivos foram mantidos por 48 horas a 37°C. Títulos virais expressos em TCID₅₀/mL. 76

Tabela 9. Vírus do sarampo produzido em cultivos tratados com 5% de cada uma das frações do *Pool 2* uma hora antes da infecção com 0,1MOI do vírus. Os cultivos foram mantidos por 72 horas a 37°C. Títulos virais expressos em TCID₅₀/mL. 77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 O Lepidóptero <i>Lonomia obliqua</i>.....	20
1.2 As proteínas	23
1.2.1 Cromatografia Líquida.....	24
1.3 Os vírus	25
1.3.1 O vírus do Sarampo – Família Paramixoviridae.....	29
1.3.2 O Poliovírus – Família Picornaviridae	31
1.4 O uso de cultura de células no estudo de vírus	33
1.5 Inibidores Virais.....	35
1.5.1 Mecanismos de inibidores virais	36
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Linhagem celular	41
3.1.1 Estoque criogênico de células.....	41
3.2 Vírus e infecção	42
3.2.1 Estoque viral	42
3.3 Preparo do estoque de hemolinfa.....	43
3.3.1 Citotoxicidade	44
3.4 Fracionamento da hemolinfa por cromatografia	44
3.5 Efeito da hemolinfa na replicação viral	45
3.6 Titulação viral.....	46
3.7 Procedimentos analíticos.....	47
3.7.1 Concentração e viabilidade celular	47

3.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	47
3.7.3 Quantificação de proteínas	49
3.7.4 Determinação de células infectadas com o vírus do sarampo por citometria de fluxo (FACS).....	50
3.7.5 Análise Estatística	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Determinação da citotoxicidade da hemolinfa.....	51
4.1.1 Análise do efeito da hemolinfa na cinética de crescimento de células Vero	52
4.2 Ação virucida da hemolinfa.....	53
4.3 Ação da hemolinfa sobre a replicação de Poliovírus	55
4.3.1 Estudo do tempo de adição da hemolinfa.....	55
4.4 Ação da hemolinfa sobre a replicação de Sarampo	59
4.4.1 Estudo do tempo de adição da hemolinfa.....	60
4.5 Purificação da hemolinfa e atividade dos pools sobre os vírus.....	66
4.5.1 Análise do efeito dos <i>pools</i> na cinética de crescimento de células Vero....	70
4.5.2 Atividade dos <i>pools</i> sobre a replicação do Poliovírus.....	71
4.5.3 Atividade dos <i>pools</i> sobre a replicação do Sarampo.....	72
4.6 Purificação do <i>Pool 2</i> e atividade das frações sobre os vírus.....	73
4.6.1 Atividade das frações do <i>Pool 2</i> sobre a replicação do Poliovírus.....	75
4.6.2 Atividade das frações do <i>Pool 2</i> sobre a replicação do Sarampo	76
4.6.3 Identificação da proteína com atividade antiviral	77
5 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
APÊNDICE A - Titulação viral através do método da diluição final.....	89
ANEXO A - Artigos Publicados	92

1 INTRODUÇÃO

O controle de viroses humanas é de alto interesse na área de saúde pública e animal. No entanto, poucos agentes são disponíveis para o controle destas enfermidades. Além disto, devido ao freqüente surgimento de microorganismos resistentes a drogas, o desenvolvimento de terapias eficazes para doenças virais humanas é estritamente dependente da identificação de novos agentes terapêuticos, mostrando-se fundamental a busca de compostos que possam atuar como novas drogas a serem utilizadas no combate as doenças infecciosas (Lohner e Staudegger, 2001; Benecia e Courrèges, 2000). Por este motivo, a identificação de agentes com ação antiviral é de suma importância.

A classe dos insetos representa cerca de 55% de toda biodiversidade existente na Terra e aproximadamente 85% de todos os animais. Insetos podem ser encontrados em quase todos os ecossistemas do planeta, desde regiões polares até regiões de deserto. Esta larga distribuição na natureza tem estimulado as pesquisas de novos agentes terapêuticos nesta classe de artrópodos (Chernysh *et al.*, 2002).

Vários estudos têm sido realizados demonstrando a presença de substâncias farmacologicamente ativas em hemolinfa de insetos com efeitos enzimáticos (Shiotsuki *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 1999; Guerrero *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999; Rosenfeld e Vanderberg, 1998; Hamdaoui *et al.*, 1998), hormonais (Huberman *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1998; Kurata *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1993), com ação imune, antibacterianos e antifúngica (Zhu *et al.*, 2000; Lowenberger *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 1998; Johns *et al.*, 1998; Lans-Mendoza *et al.*, 1996) e anticongelamento (Peters *et al.*, 1993). Os primeiros trabalhos demonstrando efeitos no crescimento celular e tempo de sobrevivência celular foram realizados nas décadas de 1950 e 1960 (Wyatt, 1956; Grace, 1958; 1962, 1967). No entanto, após estes trabalhos pioneiros

muito pouco foi realizado neste sentido; inclusive o uso da hemolinfa em cultivos de células de inseto foi substituído por soro fetal bovino. Alguns trabalhos têm surgido demonstrando o efeito positivo da hemolinfa na otimização de cultivos de células de inseto (Sousa, 2006), promoção de crescimento viral (Rhee e Park, 2000; Rhee *et al.*, 1999, Kanaya e Kobayashi, 2000, Maranga *et al.*, 2003) e produção de proteínas recombinantes (Woo *et al.*, 1997, Mendonça *et al.*, 2008). Kanaya e Kobayashi (2000) isolaram e caracterizaram uma proteína presente na hemolinfa de *Bombyx mori* capaz de aumentar o título viral em aproximadamente 10.000 vezes. No entanto, poucos estudos têm sido realizados buscando isolar e caracterizar os fatores envolvidos nestes efeitos (Nussbaumer *et al.*, 2000; Shishikura *et al.*, 1997 e 1996; Moon *et al.*, 1995; Ochanda, 1992). Apesar desta variedade de atividades observadas na hemolinfa, poucos trabalhos têm sido realizados buscando identificar proteínas com ação antiviral em hemolinfa de insetos.

Algumas proteínas e peptídeos bioativos já estão sendo isolados de insetos. Particularmente, a purificação de peptídeos antimicrobianos vêm recebendo atenção especial por seu potencial uso como agentes terapêuticos (Bulet *et al.*, 1999). Nakazawa *et al.* (2004) demonstraram em seu trabalho a atividade antiviral de uma serino-protease presente no suco digestivo de larvas de *Bombyx mori* contra nucleopoliedrovírus. Também foi demonstrado que os peptídeos antivirais melitina e cecropina, isolados e purificados da hemolinfa de lagartas-da-maçã *Heliothis virescens* inibiram a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) por agirem como supressores da expressão gênica viral (Ourth, 2004). Uma outra proteína que apresentou ação antiviral contra Semiliki Forest vírus foi purificada de cultura de células de *Aedes albopictus* (Luo e Brown, 1993). Peptídeos antivirais e antitumorais denominados alloferons, extraídos e isolados da hemolinfa da mosca *Calliphora vicina*, mostraram-se também eficazes contra os vírus Influenza A e B (Chernysh *et al.*, 2002).

Contudo, relativamente poucos dados sobre moléculas com atividade antiparasitária, antiviral e antitumoral extraídas de insetos estão disponíveis. A maior parte dos agentes antivirais e antitumorais têm sido isolados de plantas, bactérias, e, menos frequentemente, metabólitos secundários animais

(Cragg *et al.*, 1997; McConnel *et al.*, 1994). Olicard *et al.* (2005) mostraram a presença de uma substância que possui atividade antiviral na hemolinfa do molusco marinho *Crassostrea gigas*, inibindo a replicação de herpes vírus tipo 1 (HSV-1) provavelmente mediado por um mecanismo intracelular, que interfere nas etapas iniciais da replicação viral.

Nesse contexto, a pesquisa, a purificação, e a caracterização química, biológica e estrutural de novas substâncias antimicrobianas provenientes da fauna e flora brasileira são valiosas, uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um vasto espectro de substâncias eficientes no combate a infecções.

1.1 O Lepidóptero *Lonomia obliqua*

Lonomia obliqua Walker, 1855 (**Figura 1B**), é uma espécie do filo *Artropoda*, classe *Insecta* e pertence ao gênero *Lonomia*. O gênero *Lonomia* pertence à ordem *Lepidoptera*, família *Saturniidae*. A maioria das espécies deste gênero se distribui em regiões da América do Sul, mas há também registros de sua ocorrência na América Central.

A literatura vigente descreve a existência de seis estágios larvais (instares) de ocorrência em um período de 50 a 80 dias, chegando a atingir cerca de 7 (sete) centímetros antes de atingirem a fase de pupa (Moraes, 1997; Lorini, 1999), e uma fase bastante variada de período de pupação, que pode oscilar de 46 a 92 dias, ocorrendo de outubro em diante, quando emergem as mariposas reiniciando o ciclo que apresentam dimorfismo sexual, sendo a mariposa fêmea maior e de coloração pardo-rosado e a mariposa macho menor e mais amarelada com tonalidades mais vivas. Ambos possuem listra transversal sobre as asas. Tem sido observado um mínimo de quatro meses e meio e máximo de oito meses e meio para a duração do ciclo de vida de *L. obliqua* (Lorini, 1999).

Lonomia obliqua é uma espécie de mariposa cujas larvas, de hábito gregário (**Figura 1A**), possuem o corpo revestido por cerdas (espículas) urticantes que liberam toxinas com propriedades inflamatórias e coagulantes. Relatos de acidentes são comuns no Sul e Sudeste do Brasil, e ocorrem quando a vítima toca as lagartas agrupadas ou não nos troncos das árvores (Duarte *et al.*, 1990). Uma vez em contato com as vítimas, as cerdas se quebram inoculando o veneno, iniciando o quadro de erucismo Lonômico. No local surge uma sensação de queimação e dor seguida por cefaléia occipital e náuseas, após 8 a 72 horas aparecem os sintomas que caracterizam a síndrome hemorrágica em humanos: hematúria, hemorragia de cicatrizes e mucosas, hemorragia intracerebral, insuficiência renal aguda (Arocha-Pinango e Guerrero, 2001).

Figura 1. Lagartas *Lonomia obliqua*. (A) Um grupo de lagartas formando uma colônia e (B) um espécime isolado. (Cedido por Roberto Henrique Pinto Moraes)

Recentemente, alguns trabalhos vêm sendo feitos no sentido de identificação e caracterização química e molecular de proteínas extraídas de lagartas *L. obliqua* envolvidas nos quadros de envenenamento, especialmente relacionadas com a síndrome hemorrágica e distúrbios na coagulação sanguínea (Chudzinski-Tavassi e Carrijo-Carvalho, 2006). Proteases e enzimas foram caracterizadas e duas bibliotecas de cDNA destas estruturas foram criadas, uma incluindo moléculas vindas, além do veneno, de partes do tegumento, tecidos e espículas e outra somente das substâncias provenientes do homogeneizado do veneno das espículas. Um número significativo de

moléculas está incluído nestas bibliotecas (Veiga *et al.*, 2005) como, por exemplo, proteínas relacionadas a um outro trabalho onde foi mostrado pela primeira vez por Veiga *et al.* (2003), que uma atividade fibrinogenolítica e pró-coagulante também está presente no extrato dessas espículas.

Duas proteínas, consideradas como principais componentes do veneno da lagarta, também foram purificadas e suas principais funções estão caracterizadas: a Losac, que é um ativador do fator X da cascata de coagulação e também demonstrou ser capaz de desencadear a liberação de óxido nítrico em culturas de células endoteliais (HUVEC) (Flores *et al.*, 2006); e a Lopap, um ativador de protrombina (Reis *et al.*, 2006).

Estudos acerca do veneno presente nas espículas da lagarta são importantes na busca de novos agentes terapêuticos para distúrbios hemostáticos (coagulação, trombose); uma vez identificados, a possível utilização como princípio ativo de um anticoagulante para tratamento da trombose é promissora (Chudzinski-Tavassi e Carrijo-Carvalho, 2006).

Com relação à hemolinfa de *Lonomia obliqua*, uma proteína antiapoptótica de aproximadamente 51 kDa (kilo-Daltons) foi identificada e isolada. Esta proteína foi capaz de prolongar o tempo de cultivo de células de inseto (SF-9), conferindo proteção contra a fragmentação do DNA celular e conseqüentemente retardando a fase de declínio e morte celular das células em cultivo (Sousa *et al.*, 2005). Em trabalho realizado por Mendonça *et al.* (2008), foi identificada uma proteína de alto peso molecular capaz de estimular a produção de proteínas recombinantes; a produção da glicoproteína G do vírus da raiva, expressa em células S2 de *Drosophila melanogaster*, foi aumentada em aproximadamente 59%.

1.2 As proteínas

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 *et al.*, 2000).

As atividades biológicas de vários compostos de origem protéica têm sido avaliadas, um exemplo é lactoferrina – proteína ligante de ferro. A lactoferrina é uma proteína multifuncional que possui atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antiinflamatória e imunorreguladora comprovadas. Com relação à atividade antiviral, foi demonstrado que a lactoferrina age impedindo a penetração do vírus HSV (*herpes simplex virus*) em células Vero e não tem efeito sobre o HSV após sua entrada nas células (Vogel *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2004).

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 vírus, pode ocorrer a interação de proteínas e/ou peptídeos com a membrana glicoprotéica, impedindo a adsorção viral (Marchetti *et al.*, 1996; Andersen, 2004).

As proteínas exercem um grande número de propriedades biológicas, por isso o interesse em estudá-las. O isolamento, purificação e caracterização fazem parte do processo de estudo de proteínas (Silva, 2004). Os principais métodos utilizados neste trabalho para a purificação protéica, utilizando sistemas de purificação em cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) estão apresentados a seguir.

1.2.1 Cromatografia Líquida

A cromatografia envolve uma série de processos de separação de misturas. A cromatografia líquida acontece pela passagem de uma mistura através de duas fases: uma estacionária (fixa) e outra móvel. A grande variabilidade de combinações entre a fase móvel e estacionária faz com que a cromatografia tenha uma série de técnicas diferenciadas (Silva, 2004).

A escolha dos métodos de purificação através de cromatografia líquida e a estratégia a ser utilizada, baseia-se nas propriedades das proteínas. As principais características a serem exploradas são: tamanho (massa molecular), carga (troca iônica), polaridade (hidrofobicidade), afinidade química (especificidade).

Além das características da proteína de interesse, a escolha do esquema de purificação também depende das características dos outros compostos presentes no extrato bruto (Almeida e Kurtenbach, 2002). Na **Tabela 1** apresentada a seguir, estão listadas técnicas de cromatografia líquida de acordo com a característica físico-química das proteínas que é explorada. A condição inicial necessária para a realização da técnica, os eluentes mais comuns e as condições em que a solução de proteína ficará após sua eluição da coluna também são citados. O custo geral do processo é classificado levando-se em conta os valores aproximados das colunas e dos acessórios geralmente empregados em cada técnica.

Tabela 1. Técnicas de cromatografia líquida

Tipo de Cromatografia	Característica da Proteína	Condição Inicial da Amostra	Eluentes	Condição Final da Amostra	Custo
Gel Filtração	Volume molecular	Volume da amostra <5% do volume da coluna	Qualquer solução aquosa	Amostra diluída em eluente	+
Troca Iônica	Carga	Baixa concentração iônica	Soluções salinas ou com pHs distintos da condição inicial	Amostra concentrada em solução salina	++
Interação Hidrofóbica	Hidrofobicidade	Alta concentração de sal	Soluções com baixa concentração salina	Amostra concentrada em solução salina	++
Fase Reversa	Hidrofobicidade	Não pode conter altas concentrações de sais	Solvente orgânico	Amostra sem sais em solventes voláteis	+++
Afinidade	Especificidade à ligantes	Condições específicas para ligação	Alta concentração de ligante ou sais	Amostra concentrada contendo ou não ligante	+++

Fonte: Almeida e Kurtenbach, 2002.

Neste trabalho, para a purificação das proteínas de hemolinfa de *Lonomia obliqua*, foram utilizadas as cromatografias líquidas em gel filtração e de troca iônica.

1.3 Os vírus

Os vírus diferem de todos os outros microrganismos infecciosos em sua estrutura e biologia, particularmente no que se refere à replicação. Os vírus podem infectar todas as formas de vida, pois embora possuam a informação genética convencional em DNA ou RNA, os vírus não possuem a maquinaria necessária para o processamento desta informação em nova partícula viral. Um vírus por si próprio é metabolicamente inerte, para se replicar necessita de uma célula hospedeira e então transcrever e/ou traduzir sua informação genética (Mims *et al.*, 1999).

Os vírus apresentam tamanhos variados, desde muito pequenos (poliovírus, com 30nm) até bastante grandes (vírus da vaccinia, com até 400nm). A organização dos vírus varia consideravelmente entre os diferentes grupos, mas existem algumas características gerais comuns a todos:

- O material genético, na forma de DNA ou RNA linear ou circular, de fita dupla ou de fita simples, está contido em um capsídeo, constituído de um número de moléculas protéicas individuais (capsômeros).
- A unidade completa do ácido nucléico e do capsídeo é denominada de “nucleocapsídeo” e freqüentemente possui uma simetria distinta dependendo do como os capsômeros individuais estão organizados. A simetria pode ser icosaédrica, helicoidal ou complexa.
- Em muitos casos, a “partícula viral” total ou o “virion” consiste apenas de um nucleocapsídeo, estes são chamados “vírus não envelopados”, como representado na **Figura 2A**, enquanto que em outros casos o virion é formado de um nucleocapsídeo circundado por um envelope externo ou membrana que

geralmente consiste de uma bicamada lipídica, na qual inserem-se as proteínas e glicoproteínas virais (**Figura 2B**) (Cann, 1997).

Figura 2. Representação esquemática de partículas virais (A) vírus não envelopados e (B) vírus circundado por envelope externo. (Mims *et al.*, 1999)

A superfície externa da partícula viral é que primeiro faz o contato com a membrana da célula hospedeira, assim sendo, a estrutura e as propriedades da superfície externa da partícula viral são, portanto, de fundamental importância para a compreensão do processo de infecção, fase denominada fixação ou adsorção. Em geral, os vírus desnudos (sem envelope) são resistentes e sobrevivem bem no mundo externo, estes vírus podem também ser resistentes à bile, permitindo a infecção via canal alimentar. Os vírus envelopados são mais suscetíveis a fatores ambientais como ressecamento, acidez gástrica e bile. Estas diferenças na suscetibilidade influenciam formas de transmissão dos vírus (Mims *et al.*, 1999).

Replicação Viral

Os vírus aproveitam todo o arsenal metabólico da célula infectada para sua replicação. A multiplicação viral, que ocorre no interior de uma célula suscetível, no geral, pode ser sinteticamente descrita conforme a evolução das seguintes etapas:

- **Adsorção:** Nesta fase, as partículas virais colidem, casualmente com a superfície celular. A ligação do vírus com a célula é feita por intermédio de determinadas estruturas existentes na partícula viral. Nos

vírus com envoltório, essas estruturas apresentam-se, em geral, sob a forma de espículas, e nos vírus sem envoltório, correspondem a pontos da superfície viral, que podem estar relacionados a um polipeptídeo ou grupos de polipeptídeos estruturais.

- *Penetração:* Os mecanismos de penetração que atendem às necessidades do processo de multiplicação viral são, em geral, a invaginação da membrana celular em volta da partícula, a fusão do envólucro viral com a própria membrana celular, ou a simples penetração viral através da membrana celular.

- *Desnudação:* O envoltório protéico da partícula viral é removido pela ação de enzimas celulares existentes nos lisossomos, com liberação do ácido nucléico viral. Ocorrem alterações na célula infectada correspondentes à chamada *fase de eclipse*, em que não há aumento do número de partículas infecciosas, por célula, durante um certo período de tempo.

- *Transcrição – síntese de mRNA:* Os mecanismos celulares biossintéticos são utilizados pela partícula viral, processando-se a síntese viral no núcleo da célula infectada, no citoplasma ou em ambos, sempre empregando a energia celular, moléculas precursoras dos constituintes virais e algumas das enzimas presentes na célula.

- *Tradução:* Uma vez sintetizado, o mRNA liga-se aos ribossomos celulares codificando a síntese das proteínas virais, que podem ser de dois tipos: estruturais, que formam a partícula viral e não estruturais, enzimas que participam do processo de multiplicação viral, na síntese do ácido nucléico e não são incorporadas à partícula viral. As proteínas estruturais tanto podem fazer parte da cápside como do envoltório viral, sendo estas últimas, glicosiladas.

- *Replicação:* O termo replicação aplica-se ao processo no qual o genoma viral dá origem a novos genomas que são acoplados à proteína viral. Em geral, a replicação tem início algum tempo após a transcrição, prolongando-se por todo ciclo de multiplicação viral.

▪ **Maturação e Liberação: Processo de montagem.** No caso dos vírus não envelopados, as partículas se acumulam no citoplasma até serem liberadas por lise celular. Em vírus envelopados, após formação do nucleocapsídeo, as partículas adquirem o envelope ao brotarem através de membranas celulares (Candeias, 1989).

As fases da infecção de uma célula e da replicação viral estão representadas a seguir, na **Figura 3**.

Figura 3. Representação esquemática das fases da infecção viral de uma célula hospedeira e da replicação viral. (Mims et al., 1999)

Na busca de um modelo para os estudos de identificação de uma proteína antiviral na hemolinfa de *Lonomia obliqua*, dois vírus, sarampo e poliovírus, foram utilizados, uma vez que ambos possuem um genoma RNA, mecanismos de replicação e estrutura bem conhecidos, porém importantes diferenças na estrutura da partícula viral, implicando em diferentes mecanismos de infecção, que serão melhor abordadas nos subitens que se seguem.

1.3.1 O vírus do Sarampo – Família *Paramixoviridae*

O vírus do sarampo pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Paramixoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Morbillivirus*. Os vírions destes vírus possuem morfologias e componentes protéicos semelhantes; além disso, compartilham a capacidade de induzir fusão entre as células (formação de sincícios e células gigantes multinucleadas) (Fields *et al.*, 2007).

Estrutura e Replicação

Os Paramixovírus consistem em RNA de fita única de sentido negativo (5 a 8×10^6 daltons) num nucleocapsídeo helicoidal, circundado por um envoltório pleomórfico de cerca de 156 a 300nm. Assemelham-se, em muitos aspectos, aos ortomixovírus, porém são maiores e não possuem o genoma segmentado, peculiar dos vírus da influenza. Apesar da existência de uma homologia significativa entre os genomas dos paramixovírus, a sequência das regiões de codificação de proteínas difere em cada.

O nucleocapsídeo consiste no RNA de filamento único, de sentido negativo, associado à nucleoproteína (NP), fosfoproteína polimerase (P) e a proteína grande (L). A proteína L é a RNA-polimerase. A proteína P facilita a síntese do RNA, enquanto a proteína NP ajuda a manter a estrutura genômica. O nucleocapsídeo é envolto por um envelope composto por uma bicamada lipídica (Murray *et al.*, 2000).

O nucleocapsídio associa-se à proteína da matriz (M) na base do envoltório lipídico. O envoltório do vírion contém duas glicoproteínas, uma proteína de fusão (F), que promove a fusão das membranas celulares do vírus e hospedeiro, e uma proteína de fixação viral (hemaglutinina-neuraminidase (HN), hemaglutinina (H) ou proteína G). A proteína F deve ser ativada por clivagem proteolítica, produzindo os glicopeptídeos e F1 F2 unidos por uma ligação dissulfeto, para expressar a atividade de fusão das membranas (Fields *et al.*,2007).

A replicação é iniciada pela ligação da hemaglutinina do envelope viral aos receptores de ácido siálico presente nos glicolipídios da superfície celular (adsorção). A proteína F promove a fusão do vírus com a membrana plasmática e a penetração do vírus no citoplasma. Os paramixovírus também são capazes de induzir fusão entre células, criando assim células gigantes multinucleadas (sincícios) (Murray *et al.*, 2000).

A replicação do genoma ocorre de modo semelhante à de outros vírus de RNA de filamento negativo (rabdovírus). A transcrição, a síntese de proteínas e a replicação do genoma ocorrem todas no citoplasma da célula hospedeira. O genoma é transcrito em RNA-mensageiros individuais (mRNA) e num modelo de RNA total e sentido positivo. Novos genomas associam-se às proteínas L, N e NP para formar nucleocapsídios, que se associam às proteínas M sobre as membranas plasmáticas modificadas pelas glicoproteínas virais. As proteínas virais são sintetizadas com a utilização de toda maquinaria celular, e a seguir, os virions maduros brotam a partir da membrana plasmática da célula hospedeira e abandonam a célula (Galinski, 1991).

O vírus do sarampo (**Figura 4**) possui apenas um sorotipo, o que permitiu o desenvolvimento de vacinas vivas eficazes, apesar de apresentar diferentes genótipos (Fields *et al.*,2007).

Figura 4. Microscopia eletrônica da partícula viral do vírus sarampo.

Retirado de: <http://www.tau.ac.il/lifesci/departments/biotech/members/rozenblatt/figures.html>

O vírus do sarampo é rapidamente inativado por calor, luz, pH ácido, éter e tripsina. Ele resiste apenas por um pequeno período de duas horas no ar ou em superfícies e objetos. Hosoya *et al.* (1989) demonstrou que existem alguns compostos antivirais com efeito inibitório sobre a adsorção do vírus do sarampo e conseqüentemente sobre a formação de placas e sincícios em células Vero. Esses compostos inibiram a replicação do sarampo em concentrações significativamente menores do que sua concentração mínima citotóxica.

1.3.2 O Poliovírus – Família *Picornaviridae*

O poliovírus pertence à ordem *Picornavirales*, família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*. A família *Picornaviridae* é uma das maiores famílias de vírus e inclui alguns dos mais importantes vírus humanos e animais. Como seu nome indica, esses vírus são vírus RNA pequenos (*pico*), de sentido positivo, que possuem estrutura de capsídeo sem envoltório. A família inclui mais de 230 membros divididos em oito gêneros (Fields *et al.*, 2007).

Os capsídios destes vírus são muito resistentes a condições ambientais adversas (sistemas de esgoto) e às condições existentes no trato gastrointestinal, o que facilita sua transmissão por via orofecal. Todavia, embora possam iniciar a infecção no trato gastrointestinal, os enterovírus raramente causam doença entérica (McKinlay *et al.*, 1992).

O mais conhecido dos picornavírus e o mais extensamente estudado é o poliovírus, representado na **Figura 5**, o que contribui para o êxito no que se refere ao desenvolvimento das vacinas contra pólio (de vírus vivo ou trivalente inativada) (Murray *et al.*, 2000).

Figura 5. Modelo estrutural da superfície da partícula de poliovírus.

Retirado de: <http://www.ifremer.fr/microbio/labo-microbiologie/5-pcrd.htm>

Estrutura e Replicação

O genoma dos picornavírus assemelha-se a um RNA-mensageiro (mRNA). Trata-se de um único filamento de RNA de sentido positivo, de aproximadamente 7.400 bases, com um poli A na extremidade 3' e uma pequena proteína, a VPg (22 a 24 aminoácidos) fixada à extremidade 5'. A sequência do poli A aumenta a infectividade do RNA, e a VPg pode ser importante no acondicionamento do genoma dentro do capsídeo e na iniciação da síntese do RNA viral.

O genoma modifica uma poliproteína, que é proteoliticamente clivada para produzir as proteínas enzimáticas e estruturais do vírus. Além das proteínas do capsídeo e da VPg, os picornavírus codificam pelo menos uma protease e uma RNA-polimerase RNA-dependente. O poliovírus também produz uma protease que degrada a proteína de 200.000 daltons (Da) que envolve os ribossomos eucarióticos, bloqueando assim a tradução do mRNA celular (Fields *et al.*, 2007).

O RNA de filamento positivo dos picornavírus é circundado por um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 30 nm de diâmetro. Os capsídeos são estáveis na presença de calor e detergente e à exceção dos rinovírus, são também estáveis em ácido (Ansardi *et al.*, 1996).

1.4 O uso de cultura de células no estudo de vírus

O cultivo de células é essencial em pesquisa básica no campo da virologia e de doenças virais. Cultivo de células também é de grande valia e necessário na produção de antígenos para diagnósticos sorológicos e na produção de vacinas desde que foi estabelecido como ferramenta neste campo (Ohara, 1988).

Para determinar se uma amostra contém vírus infectivo, uma parcela desta amostra pode ser inoculada em uma cultura de células, escolhida intencionalmente por dar suporte à replicação do vírus que é suspeito de estar presente na amostra. Após a incubação a uma temperatura apropriada para a replicação viral, a cultura de células é examinada através de microscópio óptico, buscando-se identificar as mudanças características que aparecem no tapete celular, resultantes de danos induzidos pela replicação viral. Essas mudanças características são denominadas efeito citopático (ECP) (Payment, 2002).

Exemplos de ECP induzidos pelo vírus do sarampo e poliovírus podem ser observados na **Figura 6**. Na **Figura 6B**, pode-se observar a presença de células gigantes multinucleadas, conhecidas como sincícios, decorrentes da fusão das células infectadas pelo vírus do sarampo. Na **Figura 6C**, pode-se observar células desprendidas do tapete celular, arredondadas e contraídas, característica decorrente da replicação do poliovírus (Ye e Day, 2003).

Figura 6. Efeito Citopático (ECP) causado pela replicação dos vírus do sarampo e poliovírus em culturas de células Vero. (A) Cultura de células Vero não infectada; (B) Cultura de células Vero infectada com vírus do sarampo e (C) Cultura de células Vero infectada com poliovírus. Fotomicrografias obtidas em aumento de 400x.

Assim, a confirmação do ECP é um primeiro passo importante, tanto para diagnóstico, como para a pesquisa em virologia, e permite que a infectividade dos vírus possa ser determinada, e seu título calculado, sendo então possível que seja mensurando o número de partículas virais infecciosas por unidade de volume de acordo com a metodologia clássica de Reed e Munch (1938).

Neste método quantitativo, são feitas diluições seriadas do vírus a ser titulado (10^{-1} a 10^{-12}). As diferentes diluições do vírus são inoculadas em culturas celulares, cada diluição feita em pelo menos quatro repetições, e, após a incubação a uma temperatura apropriada para a replicação viral, cada diluição será avaliada sob o aspecto de produzir ECP (considerado como ECP positivo) ou não produzir ECP (considerado como ECP negativo). O objetivo desta metodologia é definir a dose de vírus que produz uma resposta positiva (ECP) em cinquenta por cento das culturas celulares inoculadas com a mesma diluição do vírus, sendo esta dose conhecida como $TCID_{50}$ (*tissue culture infectious dose 50%*) (Freshney, 2005). O **Apêndice A** mostra um exemplo de determinação do $TCID_{50}$ através do método de Reed e Munch (1938).

1.5 Inibidores Virais

As moléculas antivirais conhecidas atuam por diversos mecanismos, seja atuando diretamente sobre o vírus, dificultando a entrada do vírus na célula, seja atuando diretamente na replicação viral ou ativando mecanismos de defesa das células (Jerome, 2005).

Segundo De Clercq (2004), por um longo período apenas poucas moléculas antivirais estavam disponíveis para uso clínico quando comparadas ao número de drogas antifúngicas e antibacterianas. Este fato é resultado da dificuldade de se encontrar compostos que interfiram específica e diretamente nos processos relacionados às atividades dos vírus, sem causar dano significativo às atividades celulares do hospedeiro. Contudo, existem diversas atividades virais específicas, como o processo de fixação à célula hospedeira, a replicação do material genético viral, a maturação e liberação dos novos vírus, e que, portanto, são vistos como alvos potenciais e promissores para as moléculas antivirais.

As drogas antivirais, disponíveis hoje em dia para uso clínico, resultam da prospecção feita com um extenso número de compostos. Os procedimentos adotados nestes ensaios envolvem testes com diversas diluições do composto de potencial atividade antiviral em um painel de diferentes vírus, normalmente cultivados em culturas de células. Evidências de que um composto interfere na replicação viral incluem que seja observada a inibição do aparecimento de efeito citopático na cultura celular (Jerome, 2005).

1.5.1 Mecanismos de inibidores virais

1.5.1.1 Síntese de Interferon

Através dos mecanismos da resposta imune, as células do sistema imune inato nos mamíferos são capazes de reconhecer a presença de vírus e responder às infecções virais produzindo e secretando intérferons tipo I (IFNs) (Bowie e Haga, 2005). Os IFNs tem ação autócrina e parácrina e uma vez ligados aos receptores de intérferon, induzem a expressão de inúmeras proteínas criando um ambiente celular altamente resistente a infecções virais. Sendo assim, intérferons tipo I são considerados componentes críticos e extremamente potentes da resposta imune inata contra patógenos virais (Theofilopoulos *et al.*, 2005).

1.5.1.2 Inibição da replicação viral por composto análogos a nucleosídeos

Alguns dos inibidores virais são compostos sintéticos estruturalmente similares a nucleosídeos como guanosina e 2'-deoxitimidina, eles agem interferindo na síntese dos ácidos nucléicos virais. Após a entrada na célula, os análogos de nucleosídeo são fosforilados no carbono 5' para se tornar um análogo de nucleotídeo. O 5' trifosfato derivado do análogo de nucleosídeo é a forma ativa do composto e atua como um inibidor competitivo da polimerase viral, bem como da transcriptase reversa. Se um desses nucleotídeos é incorporado durante a síntese dos ácidos nucléicos, a síntese será interrompida, como no método de Sanger, ou dideoxi de terminação de cadeia, utilizado no sequenciamento de DNA. A estrutura dos análogos de nucleotídeos impede a ligação do próximo nucleotídeo à cadeia. No caso de alguns análogos de nucleotídeos, o motivo pode ser a falta do grupo hidroxila no carbono 3', essencial para a adição do próximo nucleotídeo (Carter e Saunders, 2007).

1.5.1.2.1 Exemplos de inibidores virais análogos de nucleosídeos

Ribavirina

A ribavirina é um análogo da guanosina, é usado como tratamento para diversos vírus RNA, especificamente em infecções persistentes por vírus da hepatite C (HCV). O tratamento combinado ribavirina com interferon alfa tem erradicado a infecção por HCV em diversos pacientes. Ribavirina também tem sido recomendado para o tratamento de crianças infectadas por vírus sincicial respiratório, uma das mais importantes causa de doença no trato respiratório em crianças. A droga é administrada em forma de aerosol, por de 12 a 18 horas diariamente. Este tratamento reduz a severidade da infecção, porém o modo de administração é caro e inconveniente, assim, não é usado com frequência (Feld e Hoofnagle, 2005).

O modo de ação da ribavirina ainda não é completamente compreendido, e, pelo menos cinco hipóteses têm sido propostas para explicar a sua atividade antiviral. A droga tem mostrado ser capaz de inibir diversas atividades virais, incluindo a síntese de RNA viral e o capeamento do RNA mensageiro (Feld e Hoofnagle, 2005).

Aciclovir

Aciclovir é um análogo da guanosina que inibe a síntese de DNA de herpesvirus. É uma droga muito segura, quase sem efeitos colaterais, amplamente utilizada para tratamento e prevenção de doenças causadas por três herpesvirus (HSV-1, HSV-2 e varicela-zoster vírus). O aciclovir é muito eficiente na inibição da síntese do DNA viral, porém tem muito pouco efeito na síntese de DNA celular. Em uma célula infectada, o aciclovir é fosforilado inicialmente pela timidina quinase viral. Na célula, a timidina quinase é produzida somente em certos estágios do ciclo celular, e tem muito menos afinidade pelo aciclovir do que a enzima viral, portanto, há muito pouca fosforilação de aciclovir nas células não infectadas. Durante a síntese do DNA, o aciclovir trifosfato compete com a deoxiguanosina trifosfato para ser

incorporado a cadeia, e, quando o aciclovir é incorporado, a síntese do DNA é interrompida devido a falta do grupo 3'-OH (De Clercq, 2004).

Azidotimidina

A Azidotimidina (AZT) é um análogo da timidina que inibe a transcrição reversa pela inibição da transcriptase reversa do HIV. Como outros análogos de nucleosídeos, é fosforilado a 5'trifosfato após sua entrada na célula. O AZT trifosfato se liga mais fortemente à transcriptase reversa do que à DNA polimerase celular, e a transcriptase reversa liga-se ao AZT trifosfato em preferência a dioxitimina trifosfato. O AZT, portanto, inibe a transcrição reversa do HIV, porém pode interferir na síntese de DNA celular. Nos primeiros dias de uso, quando doses altas são administradas, muitos pacientes sofrem de severos efeitos colaterais. Outros análogos de nucleosídeos que inibem a transcrição reversa também são usados no tratamento de infecção por HIV, por exemplo, lamivudina, dideoxicitidina e dideoxiinosina (Richman, 2003).

1.5.1.3 Inibidores de enzimas

Existem também peptídeos sintéticos utilizados como inibidores virais. Esses peptídeos sintéticos agem por mecanismos de ação específicos, os mais bem conhecidos agem como inibidores de enzimas relacionadas a diversas etapas da replicação viral ou competidores das estruturas virais, ou ainda, bloqueando a fusão dos vírus à célula hospedeira (Carter e Saunders, 2007).

1.5.1.3.1 Exemplos de peptídeos sintéticos inibidores de enzimas

Inibidores de protease do HIV

Nos retrovirus, a maturação das novas partículas virais depende da clivagem de proteínas virais Gag e Gag-Pol por uma protease viral, resultando nas proteínas estruturais do vírus. Se este processo não acontecer, o vírus não

adquire infectividade. Foram desenvolvidos peptídeos sintéticos baseados nas seqüências de aminoácidos dos locais de clivagem dessas proteínas virais, esses peptídeos se acoplam aos locais ativos da protease viral e, como resultado, menos vírus são gerados, e os poucos vírus resultantes são infecciosos. Um exemplo de inibidor de protease é o ritonavir (Richman, 2003).

Inibidores da neuraminidase do vírus influenza

Uma das proteínas de superfície dos vírus influenza A e B é a neuraminidase. Esta enzima tem um papel essencial durante os estágios finais da saída dos novos vírus da célula hospedeira, se a enzima for inibida, os vírus não são liberados. Sequências de aminoácidos foram desenhados para se ligar ao sítio ativo da neuraminidase, inibindo sua atividade. Um exemplo é o oseltamivir, amplamente utilizado como droga anti-influenza (De Clercq, 2005).

1.5.1.4 Inibidores da fixação viral

Existem drogas capazes de inibir a fusão entre as membranas do vírus e sua potencial célula hospedeira. Um exemplo é o efuvirtide, um peptídeo formado por 36 aminoácidos, que previne a infecção da célula hospedeira pelo HIV uma vez que interage com a gp41 inibindo sua atividade.

Após uma partícula viral do HIV se ligar a célula hospedeira, a glicoproteína transmembrana gp41 é responsável por fazer a fusão do envelope viral à membrana celular, permitindo a entrada do material genético viral ao interior da célula (Richman, 2003)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi identificar e isolar proteínas da hemolinfa de *Lonomia obliqua* com provável ação antiviral sobre vírus do sarampo e poliovírus.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a atividade antiviral da hemolinfa de *Lonomia obliqua* sobre os vírus do sarampo e poliovírus cultivados em cultura de células da linhagem Vero.
- Selecionar e estabelecer metodologias cromatográficas que possibilitem a purificação da proteína da hemolinfa da *Lonomia obliqua* que apresentar atividade antiviral.
- Analisar a citotoxicidade da hemolinfa e de suas frações cromatográficas em cultura de células da linhagem Vero.
- Avaliar a ação da hemolinfa e de suas proteínas purificadas, sobre a replicação de vírus do sarampo e poliovírus, a partir da infecção de células de mamífero da linhagem Vero.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular

Células da linhagem Vero (*Cercophitecus aethiops*) foram cultivadas a 37°C em meio Leibovitz (L-15) da Cultilab[®], suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab[®]). Os cultivos de células foram realizados em frascos T de 25 cm², microplacas de 6,12 ou 96 escavações.

3.1.1 Estoque criogênico de células

Um banco de células padronizado foi produzido para a realização dos estudos. As células foram cultivadas em frascos T-75 até atingir a confluência. As células na fase exponencial foram centrifugadas a 750g por 5 minutos a 28 °C e ressuspensas em meio de congelamento contendo 20% de Soro Fetal Bovino (SFB), 70% de meio L-15 e 10% de glicerina estéril em concentração de 10⁷ células/mL. Esta suspensão foi aliquoteada em criotubos (Nunc) com volume de 1,5 mL. Os tubos foram mantidos em freezer -20 °C por duas horas e posteriormente em freezer -80 °C por 24 horas. Após este período, os tubos foram transferidos e mantidos em nitrogênio líquido (-121 °C).

3.2 Vírus e infecção

Foram utilizados: vírus do sarampo – amostra Edmonton – e poliovírus – amostra Sabin 1, adaptados ao cultivo em células Vero, previamente titulados através da metodologia da diluição final, conforme descrito por Reed e Muench (1938) e detalhado a seguir no item 3.6.

A infecção, tanto para obtenção do estoque viral, quanto para os ensaios de atividade antiviral, foi realizada de acordo com a seguinte metodologia: Células Vero, em fase exponencial de crescimento, foram infectadas com poliovírus (cepa Sabin 1) ou vírus do sarampo (cepa Edmonton) em multiplicidade de infecção (MOI) 0,1.

Para que as culturas fossem infectadas com o MOI acima definido, o volume de inóculo viral a ser utilizado nas culturas foi calculado através da Equação 1, na qual a MOI é definida como multiplicidade de infecção (razão entre as partículas virais e o número de células presentes na cultura) (Freshney, 2005).

$$\text{(Equação 1)} \quad \text{inóculo viral} = \frac{\text{moi} * \text{n}^{\circ} \text{ de células totais}}{\text{título viral}}$$

Amostras dos cultivos infectados foram coletadas para a determinação do título viral como descrito por Reed e Muench (1938). Todos os cultivos infectados foram mantidos a 37 °C.

3.2.1 Estoque viral

Foi criado um lote-estoque armazenado em freezer -80 °C para cada vírus utilizado nos diferentes experimentos, obtido através da infecção de cultura de células Vero em frasco T-75. Para isso, uma alíquota de cada um dos vírus foi colocada sobre o tapete celular e deixada em contato por 1 hora. Após esse período, os frascos foram completados com 15 mL de meio L-15 e

deixados em cultura por 5 dias. Após este período o sobrenadante foi colhido e centrifugado para a retirada de células residuais, aliquotado em tubos e congelado em freezer -80 °C. Os estoques virais foram titulados como descrito por Reed e Muench (1938) conforme detalhado no item 3.6 a seguir, e o título viral expresso em TCID₅₀/mL (50% *Tissue culture infectious dose*), sendo que uma alíquota foi descongelada imediatamente antes da realização do experimento.

3.3 Preparo do estoque de hemolinfa

Hemolinfa foi obtida de lagartas de *Lonomia obliqua*, do 6º instar de desenvolvimento, estocadas a -20 °C. A hemolinfa foi coletada do extravasamento obtido após a retirada das espículas (cerdas urticantes), com o cuidado para não haver mistura da hemolinfa com quaisquer outros fluidos da lagarta. Neste procedimento, foram utilizadas aproximadamente 50 lagartas e, com o material obtido, foi feito um único *pool* de hemolinfa que resultou em um volume final de aproximadamente 35 mL de hemolinfa.

O *pool* de hemolinfa foi centrifugado a 750 *g* por 10 minutos, tratado a 60 °C por 30 minutos, filtrado em membrana esterilizante de nitrocelulose de porosidade 0.22 µm e denominado HB (hemolinfa bruta de *Lonomia obliqua*). Alíquotas deste mesmo *pool* foram utilizadas em todas as etapas do trabalho.

A HB, após o tratamento descrito acima, foi mantida a -4 °C. Alíquotas foram descongeladas para serem utilizadas como suplemento nos ensaios de atividade antiviral e nas cromatografias. As frações obtidas por cromatografia em gel filtração (como descrito abaixo) também foram reunidas em *pools* de proteínas, denominados *Pool 1*, *Pool 2* e *Pool 3* e adicionadas aos cultivos, assim como as subfrações obtidas após cromatografia em troca iônica, denominadas RQ 3-5, RQ 13-18 e RQ 19-25 (como descrito abaixo).

3.3.1 Citotoxicidade

A HB inativada e os *pools* de proteínas obtidos por cromatografia em gel filtração, foram testados quanto sua toxicidade. Para isto, foram adicionados a cultivos de células Vero 0.5, 1, 2, 5 ou 10% de HB ou dos *pools* com relação ao volume final de cultivo. Células Vero, em densidade aproximada de 10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 6 poços em meio L-15 suplementado com 10% de SFB até atingirem confluência (24 horas). As diferentes concentrações de HB e dos *pools* foram adicionadas aos cultivos. Amostras dos cultivos foram obtidas diariamente para determinação da concentração e viabilidade celular. A morfologia dos cultivos foi acompanhada através de observação diária em microscópio óptico invertido em aumento de 100x e 200x. No final do cultivo, os poços foram corados com cristal de violeta (0,25%) e fotografados.

3.4 Fracionamento da hemolinfa por cromatografia

Para o fracionamento da hemolinfa foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta resolução AKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech) composto por duas bombas, leitor de luz ultravioleta, programador – software Unicorn 4.0 e coletor de frações Frac 900 (Amersham Pharmacia Biotech) acoplado.

Uma amostra de 5 mL da HB, correspondente à 100 mg de proteínas totais, foi submetida à cromatografia em coluna de gel filtração Sephacryl™ *High Resolution* (HR) S-200 (GE LifeSciences), de 200 mL de volume. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM NaCl 150 mM pH 8,0. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, com fluxo de 1 mL por minuto, sendo coletadas frações de 4 mL por tubo coletor. O perfil de eluição protéica foi monitorado por leitura de absorbância em 280 nm. As frações obtidas foram reunidas em *pools* de proteínas, denominados *Pool 1*, *Pool 2* e *Pool 3* e

utilizadas para determinação das bandas protéicas através de eletroforese em géis de poliacrilamida, dosagem da concentração protéica e como suplemento dos cultivos celulares infectados com os vírus, conforme descrito a seguir.

Para melhor purificação das proteínas, o *pool* de proteínas que apresentou atividade antiviral, foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna Resource™Q (GE LifeSciences), de 1 mL de volume e capacidade para até 25 mg de proteínas por mL. Antes de ser aplicado à coluna, o *pool* foi dialisado em sacos de diálise com tamanho nominal de corte de 12 a 16 kDa, de celulose regenerada (Interlab Brasil), por 10 horas, sob agitação, contra 2 litros de tampão Tris 10 mM, trocados 3 vezes.

A coluna Resource™Q foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, onde foi aplicado 0,5 mL de amostra, correspondendo a aproximadamente 1 mg de proteína. A cromatografia foi realizada com um fluxo de 0,7 mL por minuto e coletadas frações de 0,5 mL por tubo coletor. A eluição das proteínas foi realizada por gradiente de NaCl até a concentração final de 1M. As soluções utilizadas neste processo foram Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e Tris-HCl 20 mM NaCl 1M pH 8,0. A eluição das proteínas foi monitorada por leitura de absorbância em 280 nm. As frações protéicas obtidas foram denominadas RQ 3-5, RQ 13-18 e RQ 19-25. Estas frações foram utilizadas nos testes de atividade antiviral em cultivos e aplicadas à eletroforese em gel de poliacrilamida para determinação das bandas protéicas.

3.5 Efeito da hemolinfa na replicação viral

A HB, suas frações cromatográficas (*Pool 1*, *Pool 2* ou *Pool 3*) e as subfrações obtidas após cromatografia em troca iônica (RQ 3-5, RQ 13-18 ou RQ 19-25) foram testadas quanto seu efeito antiviral em cultivos de células Vero infectadas com 0,1 MOI do vírus do sarampo ou poliovírus, em placas de 6 ou 12 poços. Os cultivos foram mantidos a 37 °C, sendo observado diariamente o aparecimento de efeito citopático (ECP), buscando verificar, com isso, a presença de algum fator presente nesta hemolinfa que promova ou iniba

a replicação do vírus. Os cultivos infectados foram tratados com HB ou suas frações em diferentes tempos (1 hora antes, durante ou 1 hora após a infecção). Foram realizados dois experimentos independentes. Cada tratamento foi feito em duplicata em ambos os experimentos.

O número de células infectadas e a produção viral foram determinados de acordo com os protocolos descritos abaixo.

3.6 Titulação viral

Amostras do sobrenadante dos cultivos foram obtidas 1 hora após a infecção para a determinação da adsorção viral. Amostras dos cultivos infectados foram obtidas diariamente e a quantidade de vírus produzido pelas células foi determinada, para poliovírus, após 48 horas de cultivo e para o vírus do sarampo, após 72 horas de cultivo. Os títulos foram calculados através de titulação pela metodologia da diluição final, como descrito a seguir:

As amostras dos cultivos infectados foram tituladas em microplacas de 96 poços, contendo células Vero (2×10^5 células/mL), em diluições seriadas de 10. As placas foram incubadas a 37 °C e o efeito citopático viral foi observado diariamente. Ao final do período de cultivo, sendo 48 horas para poliovírus e 72 horas para sarampo, as placas foram lidas, observando-se em cada poço se a diluição correspondente foi capaz de promover efeito citopático em pelo menos 50% do tapete celular (positivo), ou não foi capaz de promover efeito citopático em pelo menos 50% do tapete celular (negativo). O título das partículas virais infecciosas foi calculado como descrito por Reed e Muench (1938) determinando-se a maior diluição viral capaz de causar efeito citopático em 50% do tapete celular (TCID₅₀), conforme metodologia mostrada no Apêndice A.

Segundo esta metodologia a titulação do vírus extracelular, *budded virus*, no sobrenadante da cultura, é definida pelo inverso da diluição da amostra que causa alteração (presença de efeito citopático), em pelo menos

50% das células do poço das microplacas (TCID₅₀ por mililitro), sendo o título viral expresso em TCID₅₀/mL. (Reed e Muench 1938).

3.7 Procedimentos analíticos

3.7.1 Concentração e viabilidade celular

O crescimento e morfologia celular foram monitorados através de microscópio óptico *Olympus CK2* em aumento de 200x. A concentração celular foi determinada utilizando um hematocítômetro e a viabilidade celular foi determinada segundo o método de exclusão celular por azul de trypan que tem como fundamento o fato de que células mortas absorvem o corante devido a falhas na membrana celular, ficando azuis, enquanto células vivas impedem sua entrada, permanecendo translúcidas (Freshney, 1994).

3.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Eletroforeses em géis de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) foram realizadas conforme descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados 10 microlitros (µL) das amostras da HB, suas frações cromatográficas (*Pool 1*, *Pool 2* ou *Pool 3*) e da subfração que apresentou atividade antiviral, obtida após cromatografia em troca iônica. Foram preparados géis de 0,75 mm de espessura, contendo 15% de poliacrilamida no gel de separação e 4% de poliacrilamida no gel de empilhamento, montados em cuba vertical de eletroforese modelo Mini-protean (Bio-Rad).

3.7.2.1 Preparo dos géis

Gel de Separação (15%)

Foram utilizadas para a preparação do gel de separação: 5,04 mL de solução de poliacrilamida (acrilamida 30% bis-acrilamida 0,8%), 3,12 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8, 0,1 mL de SDS (Sigma) 10%, 0,1 mL de perfulfato de amônio (Serva) 10%, 0,04 mL de Temed (Merk) (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) e 4,13 mL de água destilada. Após agitação suave, a mistura foi distribuída nas placas de vidro.

Gel de empilhamento (4%)

Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel de empalhamento, contendo 5,0 mL de solução de poliacrilamida (acrilamida 30% bis-acrilamida 0,8%), 2,5 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 6,8 (8 mL), 0,1 mL de SDS (Sigma) 10%, 0,04 mL de TEMED (Merck), 0,1 mL de persulfato de amônio (Serva) 10% e 2,3 mL de água destilada. Essa mistura foi colocada sobre o gel de separação e, posteriormente foi colocado um pente para formação de poços para aplicação das amostras após a polimerização do gel.

Preparo das amostras

As amostras foram diluídas em 10 μ L de uma solução com mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 2%, e glicerol 10%. A seguir, foram aquecidas a 95 °C por 15 minutos, aplicadas em alíquotas de 20 μ L nos géis de eletroforese, e submetidas a uma corrente na voltagem de 100 Volts à temperatura ambiente por aproximadamente 90 minutos em cuba vertical contendo tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3,5 mM).

Coloração dos géis por prata

Após a migração das proteínas, a coloração dos géis foi feita com nitrato de prata. Os géis foram pré-fixados por 2 horas, sob agitação, em solução

fixadora (50% metanol, 12% ácido acético e 0,05 mL de formaldeído para 100 mL de água destilada). Posteriormente, foram lavados em etanol 30% por 5 minutos. Em seguida, os géis foram colocados em solução de tiosulfato de sódio (40 mg de tiosulfato de sódio em 200 mL de água destilada) por 5 minutos e lavados duas vezes com água destilada. Os géis foram, então, incubados em solução de nitrato de prata (200 mg de nitrato de prata em 100 mL de água destilada e 0,075 mL de formaldeído 37%) por 10 minutos, lavados com água destilada por 1 minuto, e logo após, colocados em solução reveladora (6 g de carbonato de sódio; 0,05 mL de formaldeído 37%, 250 mL de água destilada q.s.p.) mantendo sob agitação até a visualização das bandas de proteínas no gel. Para finalizar a reação, adicionou-se uma solução 50% metanol, 12% ácido acético.

Em todas as eletroforeses foram utilizados padrões de peso molecular PageRuler™; Prestained Protein Ladder (10-170 kDa) ou Amersham (14-94 kDa). As imagens dos géis foram capturadas em um scanner Epson Perfection 610 e trabalhadas no programa Microsoft® Paint 2007.

3.7.3 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas presente na hemolinfa e em suas frações cromatográficas foi determinada através do método de Lowry *et al.* (1951).

Para determinação da concentração de proteínas, foi adicionado a 0,1 mL da amostra ou padrões, 1,0 mL da solução de trabalho (carbonato de sódio 2%, tartarato de sódio 4% em NaOH 0,1 M). Agitou-se e os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada a mistura 0,2 mL do reagente de Folin diluído na proporção de 1:3 em água destilada (preparado no momento do uso). Agitou-se cuidadosamente o tubo e a mistura foi deixada em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura das absorbâncias foi realizada em 690 nm. As concentrações foram determinadas utilizando uma curva padrão de albumina obtida nas mesmas condições do ensaio.

3.7.4 Determinação de células infectadas com o vírus do sarampo por citometria de fluxo (FACS)

Amostras das culturas de células Vero (10^6 células/mL) infectadas com o vírus do sarampo, cultivadas em placas de 12 poços e tratadas nos diferentes momentos da infecção (1 hora antes, durante ou após a infecção, como descrito acima) com 1% (v/v) de HB foram coletadas após 48 horas de cultivo. A estas células foi adicionado anticorpo anti-sarampo provenientes de *kit* de imunofluorescência indireta (Measles Indirect Immunofluorescence Assay – Light DiagnosticsTM – Chemicon International) conforme a metodologia a seguir:

Amostras de 10^6 células foram centrifugadas a 750 g por 5 minutos, incubadas com anticorpo primário monoclonal por 5 minutos a 37 °C e lavadas com 0,5 mL de PBS/Tween20. O anticorpo secundário (IgG conjugado com FITC) diluído em 0,02% de corante Azul de Evans foi adicionado às células e incubado a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, a suspensão celular foi novamente lavada em 0,5 mL de PBS/Tween20, ressuspensa em 1 mL de paraformaldeído 2% e analisada no FACS. Na análise em citometria de fluxo (FACS) foram adquiridos 10.000 eventos para cada amostra analisada, sendo que os eventos considerados foram aqueles que compõem a população homogênea da amostra (R1). As análises foram realizadas em um aparelho FACSCALIBUR da Becton Dickinson.

3.7.5 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e os valores $p \leq 0,05$, comparados pelo teste de Tukey para completar a análise.

O desvio padrão dos valores de cada experimento foi calculado. O desvio padrão é uma medida do grau de dispersão dos valores das replicatas experimentais, em relação ao valor médio obtido (média dos valores das duplicatas de dois experimentos independentes). As análises foram realizadas no programa Microsoft[®] Office Excel 2003.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da citotoxicidade da hemolinfa

No início do trabalho, a citotoxicidade da hemolinfa foi determinada. Como pode ser observado na **Figura 7**, a hemolinfa foi citotóxica apenas em concentrações superiores a 5% do volume final de cultivo, demonstrando que sua aplicação em menores quantidades nos cultivos é viável. Em concentrações inferiores não foi observada morte celular significativa.

Figura 7. Células Vero tratadas ou não (Controle) com diferentes concentrações de hemolinfa. (A) Gráfico da Viabilidade celular (%) e (B) Fotografia da placa de cultivo celular corada com cristal violeta no sexto dia de cultivo na presença das diferentes concentrações de hemolinfa.

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 e Hsiung, 1989).

Os trabalhos de Petrieceovich e Mendonça, 2003; Karagoz *et al.*, 2003; Ourth, 2004; Olicard *et al.*, 2005, que buscam identificar substâncias com ação antiviral, discutem a importância da identificação de agentes que não demonstrem toxicidade para as células para que sua aplicação seja viável. Desta forma, a presença de quantidades de hemolinfa menores do que 5% do volume final de cultivo é fundamental na busca de caracterizar sua atividade antiviral.

4.1.1 Análise do efeito da hemolinfa na cinética de crescimento de células Vero

A **Figura 8** mostra as curvas de crescimento referentes ao ensaio feito para verificar o efeito da hemolinfa na cinética de crescimento de células Vero. Foram realizados cultivos em monocamada de células Vero em meio L-15 com 10% de SFB, onde a hemolinfa de *L. obliqua* foi inoculada na proporção de 1% com relação ao volume final do cultivo (aproximadamente 300 µg de proteína).

Como pode ser observado, até aproximadamente o 5º dia de cultivo, as curvas de crescimento celular do cultivo controle (células Vero em meio L-15 com 10% de SFB) e do cultivo em presença de 1% de hemolinfa apresentaram perfil similar. A partir do 7º dia de cultivo, são atingidas concentrações celulares de $2,9 \times 10^5$ células por mL no cultivo em presença de hemolinfa, e o cultivo controle atinge $2,4 \times 10^5$ células por mL. Ao observar a **Figura 8**, pode-se verificar que, na fase final de cultivo, ocorre uma queda mais acentuada na

viabilidade celular no cultivo controle, quando comparado ao cultivo tratado com 1% de hemolinfa.

Já foi identificada na hemolinfa de *Lonomia obliqua* uma proteína com atividade antiapoptótica capaz de prolongar a longevidade de cultivo de células de inseto SF-9 (Sousa *et al.*, 2005). Também foi relatado que a hemolinfa do bicho da seda inibe a apoptose nos momentos avançados dos cultivos, tanto em células de inseto quanto em células humanas (Choi *et al.*, 2002). Porém os dados obtidos através do acompanhamento do crescimento celular do cultivo controle com relação à cinética de crescimento das células Vero inoculadas com 1% de HB não foram estatisticamente diferentes, quando os valores foram submetidos às análises estatísticas.

Figura 8. Cinética de crescimento de células Vero tratadas com 1% de hemolinfa (cél+HB) ou não (controle) conforme indicado na legenda do gráfico, amostras dos cultivos foram coletadas e coradas com azul de trypan para determinação da concentração de células. Os valores representam a média de dois experimentos independentes acompanhados de barras de desvio padrão.

4.2 Ação virucida da hemolinfa

A ação antiviral da hemolinfa de *Lonomia obliqua* foi testada em 2 famílias distintas de vírus, Sarampo (cepa Edmonton), da família

Paramyxoviridae e Poliovírus (cepa Sabin 1), da família *Picornaviridae*, ambas com genoma RNA, porém com diferentes mecanismos de replicação e diferenças estruturais. Os dois vírus são largamente utilizados como modelos de estudo.

O sarampo é um vírus RNA de fita simples negativo e **envelopado**, enquanto que poliovírus é um vírus de RNA de fita simples positivo e **não envelopado**. Estas diferenças permitiram que estudos iniciais fossem realizados buscando se determinar e caracterizar um possível efeito das proteínas da hemolinfa diretamente sobre o vírus, mais especificamente sobre a estrutura da partícula viral. O agente antiviral poderia ser uma enzima proteolítica que degradasse o vírus, como no caso da hemolinfa de lagartas-da-maçã *Heliothis virescens* que por uma ação virucida reduz significativamente o título do baculovírus HzSNPV (Popham *et al.*, 2004), ou, por outros compostos presentes no extrato, como já foi demonstrado por Nakayama *et al.* (1993) com relação à atividade de polifenóis e por Song *et al.* (2005) com relação às catequinas do chá verde, que agem diretamente sobre o vírus Influenza e seu envelope viral.

Os estudos iniciais foram realizados buscando determinar um possível efeito das proteínas da hemolinfa diretamente sobre o vírus. O agente antiviral poderia ser uma enzima proteolítica que degradasse o vírus. Para este fim, os 2 vírus foram colocados em contato com a hemolinfa por 2 horas, e o título infeccioso determinado após este período por titulação em cultivo de células, em comparação com um controle.

Já é descrita a fragilidade do vírus do sarampo devido à facilidade de degradação das proteínas do seu envelope, essenciais para a penetração do vírus na célula hospedeira, como demonstrado por Hosoya *et al.* (1989), enquanto que o poliovírus é conhecido por ser um vírus muito resistente a degradação, mesmo a condições ambientais não ideais (McKinlay *et al.*, 1992).

Como mostra a **Tabela 2**, não foi observada queda no título dos 2 vírus após o contato prévio com a hemolinfa. Ao contrário, aparentemente houve um efeito protetor da hemolinfa contra a degradação do vírus do sarampo, que permaneceu com o título de $6,4 \times 10^7$ TCID₅₀/mL quando ficou em contato com HB por 2 horas. O vírus mantido por 2 horas somente na presença do meio L -

15 suplementado com 10% de SFB, apresentou título de $5,12 \times 10^7$ TCID₅₀/mL. Para o poliovírus, que é conhecido por ser um vírus resistente em diferentes situações no ambiente, também não foi observado efeito deletério sobre a partícula viral, em presença ou não de HB por 2 horas, mantendo o título de $2,0 \times 10^9$ TCID₅₀/mL.

Tabela 2. Ação da hemolinfa sobre poliovírus e sarampo. Os vírus foram mantidos em contato com 1% de hemolinfa bruta (HB) por 2 horas em temperatura ambiente e após este período titulado e o resultado expresso em TCID₅₀/mL.

Vírus	Título do vírus Inicial	Vírus após 2 horas (Sem HB)	Vírus em contato com HB por 2 hora
Polio	$2,0 \times 10^9$ TCID ₅₀ /mL	$2,0 \times 10^9$ TCID ₅₀ /mL	$2,0 \times 10^9$ TCID ₅₀ /mL
Sarampo	$6,4 \times 10^7$ TCID ₅₀ /mL	$5,12 \times 10^7$ TCID ₅₀ /mL	$6,4 \times 10^7$ TCID ₅₀ /mL

TCID₅₀: do inglês *Tissue culture infectious dose 50%*
Os valores representam a média dos experimentos.

Já foi demonstrado que a pré-incubação do vírus de mamífero HSV-1 e do vírus de peixes IPNV (Vírus da Necrose Pancreática Infecciosa), de genoma RNA e não envelopado, na presença de hemolinfa de *Crassostrea gigas* não neutralizou as partículas virais (Olicard *et al.*, 2005) e em outro trabalho, o sarampo mantido em contato com veneno de cascavel também não resultou em inativação do vírus (Petricevich e Mendonça, 2003), corroborando com os dados obtidos no presente estudo.

4.3 Ação da hemolinfa sobre a replicação de Poliovírus

4.3.1 Estudo do tempo de adição da hemolinfa

Para verificar se a hemolinfa age inibindo a penetração do vírus nas células, os cultivos foram infectados com 0,1 MOI do poliovírus (Sabin 1),

tratados ou não com 1% de hemolinfa, com relação ao volume final do cultivo, contendo aproximadamente 300 µg de proteínas totais. Uma hora após a infecção, uma amostra do sobrenadante foi colhida e titulada em placa de 96 poços contendo células Vero para comparar a quantidade de vírus remanescente no sobrenadante dos cultivos, e que, portanto, não penetrou nas células. Uma amostra também foi colhida dos cultivos infectados após 48 horas para se determinar o título do vírus produzido.

Para determinar qual o melhor momento de adição da hemolinfa, esta foi adicionada ao cultivo 1 hora antes, 1 hora após a infecção com 0,1 MOI do vírus ou adicionada junto com o vírus nos cultivos.

Conforme observado na **Tabela 2**, a hemolinfa não age diretamente sobre o vírus. Da mesma forma, não foi observado para o vírus Sabin 1 diferença de vírus remanescente no sobrenadante entre o cultivo controle e o tratado com 1% de HB, o que pode sugerir que a hemolinfa não está dificultando a adsorção ou a penetração do vírus por ação sobre os receptores da membrana celular (**Tabela 3**).

Conforme mostrado na **Tabela 3**, menor quantidade de vírus foi produzida no cultivo tratado com 1% de hemolinfa 1 hora antes da infecção (4×10^7 TCID₅₀/mL) em comparação com o controle ($1,5 \times 10^9$ TCID₅₀/mL), uma vez que a hemolinfa não está agindo sobre os receptores da membrana celular, dificultando a adsorção ou a penetração do vírus, este efeito pode ser devido a uma ação intracelular, similar ao demonstrado pela hemolinfa da mosca *Calliphora vicina*, de onde foram isolados dois peptídeos - alloferon 1 e 2 - que receberam este nome pois apresentam função similar aos interferons de vertebrados, ou seja, agem no controle das infecções virais desencadeando respostas intracelulares quando adicionados antes da infecção (Chernysh *et al.*, 2002).

Também é mostrado na **Tabela 3** que a adição da hemolinfa após a infecção também reduziu a produção viral, mas não intensamente quanto ao cultivo tratado previamente com a hemolinfa. Contrastando com o observado por Olicard *et al.* (2005), onde a adição de hemolinfa de *Crassostrea gigas* antes da infecção viral não reduziu a infecção de células Vero por HSV-1.

Assim, o maior efeito inibidor da replicação viral observado quando a HB foi adicionada ao cultivo antes da infecção pode sugerir que a hemolinfa possa inibir algum mecanismo importante para a replicação viral, ou estimular algum mecanismo inespecífico de defesa, como por exemplo, interferon alfa.

Tabela 3. Efeito citopático (ECP) e produção de poliovírus em cultivos infectados com 0,1MOI e tratados com 1% de hemolinfa bruta (HB). Os cultivos foram mantidos por 72 horas a 37 °C. Títulos virais expressos em TCID₅₀/mL.

	ECP (48hs)	Título remanescente no sobrenadante	Título do vírus produzido 48 horas após infecção
Só vírus	++++	5x10 ³	1,5x10 ⁹ ± 0,9 x10 ⁹
HB 1 hora após a infecção	++	5x10 ³	1,6 x10 ⁸ ± 1,02 x10 ⁸
HB 1h antes da infecção	++	5x10 ³	4,0 x10 ⁷ ± 0,7 x10 ⁷ *
HB e vírus adicionados juntos ao cultivo	++	5x10 ³	1,0 x10 ⁸ ± 2,0 x10 ⁸

TCID₅₀: do inglês *Tissue culture infectious dose 50%*

Os valores representam a média dos experimentos ± o Desvio Padrão.

O * indica os valores com p < 0,05.

Na **Figura 9** estão apresentadas as fotos dos cultivos referentes a este ensaio (aumento de 100 vezes). As placas foram observadas diariamente para visualização do efeito citopático (ECP). Como pode ser observado na **Figura 9**, os cultivos infectados e tratados com hemolinfa (**Figura 9 D, E, F**) apresentaram menos dano no tapete celular do que nos cultivos somente infectados e não tratados (**Figura 9C**).

9A

*Controle celular
(não infectado e sem hemolinfa)*

9B

*Controle celular + 1% HB
(não infectado e com hemolinfa)*

9C

Cultivo infectado (só vírus)

9D

HB 1 h após a infecção

9E

1% HB 1 h antes de infectar

9F

HB e vírus adicionados juntos

Figura 9. Fotomicrografia de cultivos de células Vero (48 horas), infectadas com 0,1 MOI de poliovírus e tratadas ou não com 1% de hemolinfa de *Lonomia obliqua*. Os cultivos foram corados com azul de trypan e observados em microscópio óptico invertido com aumento de 100x.

4.4 Ação da hemolinfa sobre a replicação de Sarampo

Os mesmos procedimentos utilizados para estudar o poliovírus foram usados para o vírus do sarampo.

O vírus do sarampo é um vírus envelopado, que tem por característica a formação de sincícios nas células infectadas e células multinucleadas, como pode ser observado abaixo na **Figura 10**.

Figura 10. Fotomicrografia de cultivos de células Vero (A) normais e (B, C e D) infectadas com 0,1 MOI de vírus do sarampo. Os cultivos foram mantidos por 72 horas a 37 °C e após este período as células foram coradas com cristal violeta 0,25% e observadas em microscópio óptico invertido em aumento de 400x (A e B), aumento de 200x (C) e aumento de 100x (D).

4.4.1 Estudo do tempo de adição da hemolinfa

Para verificar se a hemolinfa impede a penetração do vírus nas células, os cultivos de células Vero foram infectados com 0,1 MOI de vírus do sarampo (Cepa Edmonton) e tratados ou não com 1% de hemolinfa, com relação ao volume final do cultivo, contendo aproximadamente 300 µg de proteínas totais. Uma hora após a infecção, uma amostra do sobrenadante foi colhida e titulada em placa de 96 poços contendo células Vero.

Os dados estão apresentados na **Tabela 4** a seguir. Não foram verificadas diferenças significativas nas quantidades de vírus presente no sobrenadante, indicando, assim como o observado para o poliovírus, que a hemolinfa não está dificultando a adsorção ou a penetração do vírus por ação sobre os receptores da membrana celular, ao contrário do que foi observado por Petricevich e Mendonça (2003), que em seu estudo mostram que o veneno de *Crotalus durissus* age impedindo a ligação do vírus do sarampo às células simplesmente porque o veneno se liga aos receptores aos quais o vírus se ligaria e, portanto, bloqueia a adsorção.

A adsorção viral poderia ser impedida devido à ligação de algumas proteínas e peptídeos que possuem atividade antiviral por sua capacidade de ligar-se 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 o processo de adsorção viral (Marchetti *et al.*, 1996; Andersen, 2004), porém o fato de não haver diferenças na titulação de vírus remanescente no sobrenadante entre os cultivos tratados e o controle, tanto para poliovírus quanto para o vírus do sarampo, mostra que a adsorção ou a penetração do vírus não estão sendo dificultadas por este mecanismo de ação da hemolinfa de *Lonomia obliqua*.

Assim, para se determinar qual o melhor momento de adição da hemolinfa, esta foi adicionada ao cultivo 1 hora antes, no momento e 1 hora após a infecção no cultivo. As placas foram observadas diariamente para visualização do efeito citopático e 72 horas após a infecção, quando foi observado um intenso efeito citopático, com formação de sincícios total (**Figura**

10 B, C e D), uma amostra de sobrenadante de cada um dos cultivos foi colhida para se determinar o título do vírus produzido.

Como pode ser observado na **Tabela 4**, o título viral produzido foi menor nos cultivos tratados com 1% de hemolinfa. Neste ensaio também foi verificado que o melhor momento de adição da hemolinfa é 1 hora antes da infecção, uma vez que o título viral produzido foi aproximadamente 65 vezes menor ($1,5 \times 10^6$ TCID₅₀/mL) quando comparado ao cultivo infectado controle ($9,75 \times 10^7$ TCID₅₀/mL). Portanto, a menor quantidade de vírus produzida no cultivo tratado com 1% de hemolinfa 1 hora antes da infecção em comparação com o controle seria, assim como para o poliovírus (Sabin 1), uma ação intracelular, que possivelmente seria iniciada antes do momento de contato do vírus com a célula. Na análise estatística, a diferença entre o controle e o cultivo tratado 1 hora antes da infecção com hemolinfa foi de $p=0,0007$ sendo portanto uma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 4. Efeito citopático e produção do vírus do sarampo em cultivos infectados com 0,1 MOI e tratados com 1% de hemolinfa bruta (HB). Os cultivos foram mantidos por 72 horas a 37 °C. Títulos virais expressos em TCID₅₀/mL.

	ECP (48hs)	Título remanescente no sobrenadante	Título do vírus produzido 72 horas após infecção
Só vírus	++++	$1,25 \times 10^2$	$9,75 \times 10^7 \pm 1,25 \times 10^6$
Infecção 1 h antes da HB	++	$0,625 \times 10^2$	$5,7 \times 10^7 \pm 1,47 \times 10^6$
HB 1 h antes da infecção	+	$1,25 \times 10^2$	$1,5 \times 10^6 \pm 8,31 \times 10^5$ *
HB e vírus adicionados juntos no cultivo	++	$2,50 \times 10^2$	$1,9 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^6$

TCID₅₀: do inglês *Tissue culture infectious dose 50%*

Os valores representam a média dos experimentos $\pm$ o Desvio Padrão.

O * indica os valores com $p < 0,05$.

A **Figura 11** resume os dados obtidos através da análise de citometria de fluxo das células infectadas, marcadas com anticorpo conjugado com FITC através de imunofluorescência indireta (conforme item 3.7.4), dos cultivos infectados com 0,1 MOI tratados com 1% de hemolinfa 1 hora antes, 1 hora após a infecção ou adicionada junto com o vírus no cultivo. Como pode ser observado, os dados acima expressos são confirmados por esta metodologia, uma vez que, na análise estatística dos dados obtidos por citometria de fluxo a diferença entre o controle e o cultivo tratado com hemolinfa 1 hora antes da infecção foi de $p=0,001$ sendo portanto uma diferença estatisticamente significativa.

Figura 11. Citometria de fluxo dos cultivos infectados com 0,1 MOI de sarampo, tratados com 1% de hemolinfa 1 hora antes (HB antes), adicionada junto com o vírus (vírus+HB) ou 1 hora após a infecção (HB depois). As células foram marcadas com anticorpos específicos por imunofluorescência indireta após 72 horas de cultivo a 37 °C. O * indica os valores com $p<0,05$ e as barras indicam o desvio padrão.

A **Figura 12**, a seguir, mostra a representação gráfica dos dados obtidos pela análise em citometria de fluxo de células Vero infectadas com o vírus do sarampo após 72 horas de cultivo. Estão representados os gráficos de morfologia celular, obtidos pela análise da relação de tamanho (no eixo FSC-volume) e granulosidade (no eixo SSC-complexity/granulosity), e histogramas, nos quais são determinadas a porcentagem de células fluorescentes e a intensidade de fluorescência, indicadas pelas barras nas figuras (M1 –

porcentagem de células que emitem baixa intensidade de fluorescência; M2 e M3 – porcentagem de células que emitem alta intensidade de fluorescência).

O controle negativo mostra o perfil de intensidade de fluorescência das células Vero não infectadas, o controle positivo mostra o perfil referente a cultivos infectados com o vírus do sarampo. Também estão representados os perfis gráficos das células infectadas com o vírus do sarampo, tratadas com 1% de hemolinfa, com relação ao volume final do cultivo, 1 hora antes (HB antes) ou 1 hora após a infecção (HB depois).

Na **Figura 12**, os gráficos de morfologia celular mostram que os tratamentos com hemolinfa não alteram a morfologia das células Vero infectadas com o vírus do sarampo, uma vez que os cultivos referentes ao controle positivo, HB antes e HB depois, apresentam perfis similares quanto a análise da relação de tamanho (no eixo FSC-volume) e granulosidade (no eixo SSC-complexity/granulosity).

Quando comparamos os gráficos de morfologia celular dos cultivos não infectados (controle negativo), com os gráficos de morfologia celular dos cultivos infectados (controle positivo, HB antes e HB depois), é possível notar perfis de distribuição diferentes. A representação gráfica da análise de morfologia do controle negativo mostra homogeneidade da população celular, sendo que os cultivos infectados, independentemente do tratamento com HB, são compostos por uma população celular menos homogênea, caracterizada por um perfil que apresenta células maiores e mais granulosas. Este perfil é decorrente das alterações sofridas por células infectadas, características que, quando em cultivo, permitem que seja evidenciado o efeito citopático (Carter e Saunders, 2007).

Pela análise dos histogramas, é possível verificar que, no controle positivo, 96,24% das células apresentam fluorescência, sendo que somente menos de 4% das células não apresentaram fluorescência. Ainda com relação ao controle positivo, 81,95% apresentam alta intensidade de fluorescência enquanto que, como é esperado, nos cultivos que representam o controle negativo, a porcentagem de células fluorescentes, mesmo apresentando baixa fluorescência, não é significativa. Nos cultivos infectados e tratados com hemolinfa 1 hora antes da infecção, 77,35% de células apresentam

fluorescência, portanto, o percentual de células que não emitiram fluorescência atinge 22,65%, também há uma queda significativa com relação ao controle positivo, de 81,95% de células que apresentam alta intensidade de fluorescência, para 34,63% de células com alta fluorescência no cultivo tratado com HB antes da infecção. Nos cultivos infectados e tratados com Hb 1 hora após a infecção (HB depois), são obtidos 88,57% de células fluorescentes, dessas, 44,38% células com alta fluorescência e 44,19% das células apresentaram baixa fluorescência, e o percentual de células que não emitiram fluorescência é de 11,43%.

O tratamento com hemolinfa foi capaz de reduzir, em cerca de 50%, o número de células com alta fluorescência. Portanto, a hemolinfa é capaz de reduzir a infecção de células Vero pelo vírus do sarampo, e este efeito é mais evidente no cultivo tratado com 1% de hemolinfa 1 hora antes da infecção, uma vez que, a menor quantidade de vírus produzido com relação ao cultivo controle, foi obtida nos cultivos tratados com HB antes.

Figura 12. Citometria de fluxo - Controle negativo: células Vero não infectadas; Controle positivo: células Vero infectadas com 0,1 MOI de vírus do sarampo; HB antes: cultivos tratados com 1% de hemolinfa 1 hora antes da infecção; HB depois: cultivos tratados com 1% de hemolinfa 1 hora depois da infecção. As células foram marcadas com anticorpos específicos por imunofluorescência indireta após 72 horas de cultivo a 37 °C.

4.5 Purificação da hemolinfa e atividade dos *pools* sobre os vírus

Buscando uma melhor identificação da proteína responsável pelo efeito antiviral, 5 ml da hemolinfa foram aplicados a uma coluna de gel filtração (Sephacryl 200). Cento e vinte frações de 4 mL foram recolhidas. Estas frações foram reunidas em 3 *pools* de proteínas: *Pool 1* (da fração 23 a 46), *Pool 2* (da fração 47 a 92) e *Pool 3* (da fração 93 a 120), conforme apresentado na **Figura 13**. Um primeiro passo de purificação em colunas de gel filtração é relevante e interessante para que, como um estudo inicial, seja revelado o perfil de pesos moleculares das diferentes proteínas que compõem a hemolinfa (Ourth, 2004).

O perfil cromatográfico está apresentado na **Figura 13** e o gel de poli-acrilamida dos *pools* 1, 2 e 3, na **Figura 14**.

Figura 13. Purificação da hemolinfa de *Lonomia obliqua* por cromatografia de gel filtração em coluna Sephacryl 200. A eluição foi realizada com solução Tris (20 mM) e NaCl (150 mM). O fluxo utilizado foi de 1 ml/minuto e coletadas frações de 4 mL. As frações foram separadas em 3 *pools* conforme indicado pelas barras.

Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, da hemolinfa bruta (HB) e dos *Pools* (P1, P2 e P3) da hemolinfa de *Lonomia obliqua*. O gel foi revelado por impregnação por prata. Peso molecular de calibração PageRuler™, Prestained Protein Ladder (10-170 kDa).

Conforme mostrado no gel de poliacrilamida, o *Pool 1* compreende proteínas de aproximadamente 100 kDa a 35 kDa, o *Pool 2* compreende proteínas de aproximadamente 30 kDa a 10 kDa e o *Pool 3* compreende apenas proteínas de aproximadamente 17 kDa.

Na **Tabela 5** está apresentado o valor das concentrações protéicas da hemolinfa bruta e de suas frações e o volume total coletado correspondente a cada *pool*.

Tabela 5. Concentração de proteínas na hemolinfa bruta e em suas frações, e volume total coletado correspondente a cada *pool*, após purificação em cromatografia de gel filtração em uma coluna Sephacryl 200.

	Concentração de Proteínas <i>mg/mL</i>	Volume Total Coletado <i>mL</i>
Hemolinfa Bruta	27,8	—
<i>Pool 1</i>	0,593	92
<i>Pool 2</i>	0,234	180
<i>Pool 3</i>	0,181	108

Os *pools* foram testados, assim como a HB, com relação à citotoxicidade em cultivo de células Vero. Para isso, foi adicionado em cultivos confluentes de células Vero, 1, 2, 3, 5 ou 10% de cada *pool*, com relação ao volume final de cultivo. A viabilidade celular foi acompanhada através de observação diária em microscópio óptico. Como pode ser observado na **Figura 15**, os *pools* de proteínas não se revelaram citotóxicos, nas concentrações testadas, não foi observada morte celular significativa, aparentemente uma citotoxicidade mais pronunciada seria observada apenas em quantidades superiores a 10% do volume de cultivo. No 6º dia de cultivo, o cultivo foi lavado com PBS, corado com cristal violeta (0,25%) e fotografado, conforme **Figura 15**.

Figura 15. Citotoxicidade dos *Pools* 1, 2 e 3 da hemolinfa: células Vero tratadas ou não (Controle) com diferentes concentrações de cada *pool* conforme indicado na legenda do gráfico. Os gráficos mostram viabilidade celular (%) e as imagens mostram as placas de cultivo celular coradas com cristal violeta no sexto dia de cultivo, na presença das diferentes concentrações dos *pools*.

4.5.1 Análise do efeito dos *pools* na cinética de crescimento de células Vero

Também foram realizados ensaios para verificar o efeito dos *pools* de proteínas na cinética de crescimento de células Vero. Foram realizados cultivos de células Vero em meio L-15 com 10% de SFB, em monocamada. Neste ensaio, cada um dos *Pools* foi inoculado na proporção de 3% com relação ao volume final do cultivo, contendo aproximadamente 70 µg de proteínas totais.

Como apresentado na **Figura 16**, foi observada diferença significativa no 11º dia no cultivo tratado com 3% de *Pool 1* quando comparado aos outros cultivos, mostrando que o efeito antiapoptótico de uma proteína de 51 kDa da hemolinfa, observado por Sousa *et al.* (2006) para os cultivos de células de inseto SF-9 também aplica-se aos cultivos de células Vero. Além deste fato, não foi verificada alteração significativa nas cinéticas dos cultivos inoculados com 3% de cada um dos outros *pools* quando comparados ao controle.

Figura 16. Cinética de crescimento de células Vero tratadas com 1% de hemolinfa (cél+HB) ou não (controle), ou 3% de *Pool 1*, *Pool 2* ou *Pool 3*, conforme indicado na legenda do gráfico. Os valores representam a média dos experimentos acompanhados de barras de desvio padrão e o * indica os valores com p < 0,05.

Para dar continuidade ao processo de identificação da proteína com atividade antiviral, após a cromatografia em coluna de gel filtração e subdivisão

da hemolinfa em *Pool 1*, *Pool 2* e *Pool 3*, conforme **Figura 13**, foram utilizados 3% de cada um dos *pools* resultantes na tentativa de identificar qual das frações contém a proteína responsável pelo efeito antiviral observado. Os *pools* foram adicionados aos cultivos de células Vero 1 hora antes da infecção, pois como já mostrado, este foi o melhor momento de adição da hemolinfa. Para verificar a ação de cada um dos *pools* de proteínas sobre a replicação dos vírus, foi realizada a titulação viral ao final do tempo de cultivo.

4.5.2 Atividade dos *pools* sobre a replicação do Poliovírus

Foram adicionados aos cultivos celulares 3% de *Pool 1*, *Pool 2* e *Pool 3*, correspondendo a aproximadamente 70 µg de proteínas totais, uma hora antes da infecção com 0,1 MOI do poliovírus, buscando identificar qual destes *pools* age sobre a replicação viral. Após 48 horas, foi retirada uma amostra de cada cultivo e titulada em placas de 96 poços para determinar o título de vírus produzido.

Conforme os dados apresentados na **Tabela 6**, assim como a quantidade de vírus produzido é menor nos cultivos tratados com 1% de HB, há diminuição no título viral final do cultivo tratado com *Pool 2* uma hora antes da infecção. Este cultivo apresentou título viral final aproximadamente 87 vezes menor do que o controle, enquanto que nos cultivos onde foram utilizados *Pool 1* e *Pool 3*, os títulos de vírus produzidos foram similares ao do controle, uma vez que os dados analisados não apresentaram-se estatisticamente diferentes.

O título obtido no cultivo controle foi de $2,8 \times 10^9$ TCID₅₀/mL e no cultivo onde foi adicionado o *Pool 2* foi de $3,22 \times 10^7$ TCID₅₀/mL, indicando assim que a proteína responsável pela atividade antiviral da hemolinfa de *Lonomia obliqua* está presente o *Pool 2*.

Tabela 6. Produção do poliovírus em cultivos tratados com 1% de hemolinfa bruta (HB) ou 3% de cada *pool*, 1 hora antes da infecção com 0,1MOI do vírus. Os cultivos foram mantidos por 48 horas a 37 °C. Títulos virais expressos em TCID₅₀/mL.

	Título do vírus produzido 48 horas após a infecção		
Só vírus	2,8x10 ⁹	± 1,8x10 ⁹	
HB	3,77x10 ⁷	± 2,1x10 ⁷	*
Pool 1	8,9x10 ⁸	± 5,84x10 ⁶	
Pool 2	3,22x10 ⁷	± 2,66x10 ⁷	*
Pool 3	7,81x10 ⁸	± 2,19x10 ⁸	

TCID₅₀: do inglês *Tissue culture infectious dose 50%*

Os valores representam a média dos experimentos ± o Desvio Padrão.

O * indica os valores com p< 0,05.

4.5.3 Atividade dos *pools* sobre a replicação do Sarampo

Assim como nos ensaios com o poliovírus, foram adicionados aos 3% dos *pools* cultivos celulares 1 hora antes da infecção com 0,1 MOI do vírus do sarampo, buscando identificar alguma atividade destes *pools* sobre a replicação viral. Após 72 horas, foi retirada uma amostra de cada cultivo e titulada em placas de 96 poços para determinar o título de vírus produzido.

Conforme os dados apresentados na **Tabela 7**, foi verificado que no cultivo onde o *Pool 2* foi utilizado, da mesma forma que nos testes feitos com poliovírus, houve uma diminuição no título final do vírus em relação ao controle. O título obtido do cultivo controle foi de 1,63x10⁷ TCID₅₀/mL enquanto que no cultivo onde foi adicionado o *Pool 2* foi de 2,24x10⁶ TCID₅₀/mL, evidenciando mais uma vez que a proteína responsável pela atividade antiviral da hemolinfa de *Lonomia obliqua* está presente no *Pool 2*.

Tabela 7. Produção do vírus do sarampo em cultivos tratados com 1% de hemolinfa bruta (HB) ou 3% de cada *pool*, 1 hora antes da infecção 0,1MOI do vírus. Os cultivos foram mantidos por 72 horas a 37 °C. Títulos virais expressos em TCID₅₀/mL.

	Título do vírus produzido 72 horas após infecção	
Só vírus	$1,6 \times 10^7 \pm 1,25 \times 10^6$	
HB	$1,7 \times 10^6 \pm 4,15 \times 10^5$	*
<i>Pool 1</i>	$1,0 \times 10^7 \pm 8,39 \times 10^6$	
<i>Pool 2</i>	$2,24 \times 10^6 \pm 2,67 \times 10^6$	*
<i>Pool 3</i>	$1,0 \times 10^7 \pm 2,95 \times 10^7$	

TCID₅₀: do inglês *Tissue culture infectious dose 50%*

Os valores representam a média dos experimentos $\pm$ o Desvio Padrão.

O * indica os valores com $p < 0,05$.

Assim como os dados aqui obtidos para o *Pool 2* de proteínas da hemolinfa de *L. obliqua*, diversas moléculas que possuem atividade antimicrobiana encontram-se numa faixa de peso molecular de 100 Da a 25 kDa (Vogel *et al.*, 2002). Como continuidade, para identificar a proteína envolvida na atividade antiviral observada, foi realizado o fracionamento e purificação das proteínas deste *pool*.

4.6 Purificação do *Pool 2* e atividade das frações sobre os vírus

Ao identificar que o *Pool 2* foi responsável pela redução do título final tanto do poliovírus quanto do vírus do sarampo, como passo subsequente do processo de purificação por cromatografia, o *Pool 2*, previamente dialisado (conforme descrito no item 3.4), foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q para buscar isolar a proteína envolvida na atividade antiviral.

Foi aplicado à coluna 0,5 mL do *Pool 2*, contendo aproximadamente 0,1 mg de proteínas. A coluna foi equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 8,0, a eluição foi realizada com fluxo de 0,7 mL por minuto em gradiente linear de NaCl até 1M, com uma solução de Tris-HCl 20 mM NaCl 1M pH 8,0. Foram coletadas frações de 0,5 mL. Na **Figura 17**, está apresentado o cromatograma da purificação do *Pool 2* obtido da cromatografia em coluna de troca iônica Resource Q. As frações protéicas obtidas foram denominadas RQ 3-5, RQ 13-18 e RQ 19-25, reunidas tendo-se como referência a região aproximada da base dos picos cromatográficos monitorados a 280 nm, conforme indicado pelas chaves no cromatograma (**Figura 17**).

Figura 17. Cromatograma do *Pool 2* da hemolinfa de *Lonomia obliqua* obtido por cromatografia em coluna Resource Q. Foi aplicado à coluna 0,5 mL do *Pool 2*. A coluna foi equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e a eluição foi realizada em gradiente linear de NaCl até 1M conforme indicado pela linha verde, com fluxo de 0,7 mL por minuto. Foram coletadas frações de 0,5 mL, reunidas conforme indicado pelas chaves.

Como pode ser observado, o *Pool 2*, inicialmente obtido por cromatografia em coluna Sephacryl 200, foi desmembrado em novas frações cromatográficas. Dando-se continuidade aos estudos do efeito antiviral, 5% de cada uma das três frações estabelecidas, correspondendo a aproximadamente

10 µg de proteínas, foram adicionados aos cultivos uma hora antes da infecção para serem testadas quanto sua capacidade de inibir os vírus e se determinar qual delas possui a atividade antiviral observada.

4.6.1 Atividade das frações do *Pool 2* sobre a replicação do Poliovírus

As frações protéicas RQ 3-5, RQ 13-18 e RQ 19-25 foram utilizadas para suplementar os cultivos de células Vero a 5% do volume final do cultivo, correspondendo a aproximadamente 10 µg de proteínas, uma hora antes da infecção com 0,1 MOI do poliovírus, buscando identificar qual das frações age sobre a replicação viral. Após 48 horas, foi retirada uma amostra de cada cultivo e titulada em placas de 96 poços para se determinar o título de vírus produzido.

Na **Tabela 8** estão os resultados de título viral final referentes ao cultivo controle e aos cultivos tratados com 5% de cada uma das frações. Como pode ser observado, a fração RQ 3-5 foi capaz de reduzir significativamente a replicação do vírus, uma vez que o título final do cultivo controle foi 61 vezes maior, atingindo $2,8 \times 10^9$ TCID₅₀/mL enquanto que no cultivo onde foi adicionada a fração RQ 3-5, uma hora antes da infecção, foi de $4,58 \times 10^7$ TCID₅₀/mL. Nos cultivos tratados com RQ 13-18 e RQ 19-25 não houve inibição da replicação viral, sendo atingidos títulos de vírus produzidos estatisticamente similares ao do controle, $3,77 \times 10^9$ e $3,16 \times 10^9$ TCID₅₀/mL respectivamente.

Tabela 8. Poliovírus produzido em cultivos tratados com 5% de cada uma das frações do *Pool 2* uma hora antes da infecção com 0,1 MOI do vírus. Os cultivos foram mantidos por 48 horas a 37 °C. Títulos virais expressos em TCID₅₀/mL.

	Título do vírus produzido 48 horas após infecção		
Só vírus	2,8x10 ⁹	± 1,08x10 ⁹	
RQ 3-5	4,58x10 ⁷	± 1,42x10 ⁷	*
RQ 13-18	3,77x10 ⁹	± 2,18x10 ⁹	
RQ 19-25	3,16x10 ⁹	± 1,00x10 ²	

TCID₅₀: do inglês *Tissue culture infectious dose 50%*

Os valores representam a média dos experimentos ± o Desvio Padrão.

O * indica os valores com p< 0,05.

Estes dados obtidos com relação à inibição da replicação do poliovírus mostram que a proteína responsável pela atividade antiviral da hemolinfa de *Lonomia obliqua* está presente na fração RQ 3-5.

4.6.2 Atividade das frações do *Pool 2* sobre a replicação do Sarampo

Ensaio também foram realizados a fim de verificar atividade das frações provenientes da cromatografia de troca iônica do *Pool 2* sobre a replicação do vírus do sarampo. Para isto, 5% de cada uma das 3 frações (RQ 3-5, RQ 13-18 e RQ 19-25), correspondendo a aproximadamente 10 µg de proteínas, foram adicionadas aos cultivos de células Vero 1 hora antes da infecção com 0,1 MOI do vírus do sarampo e para se determinar o título de vírus produzido, foi retirada uma amostra de cada cultivo após 72 horas, e titulada em placas de 96 poços.

Conforme os dados apresentados na Tabela 9, a replicação viral no cultivo onde foi adicionada a fração RQ 3-5 foi inibida significativamente, sendo

que o título viral final foi 157 vezes menor do que o cultivo controle. Assim como para o poliovírus, as frações RQ 13-18 e RQ 19-25 não reduziram a replicação viral do sarampo, e foram atingidos títulos de vírus produzidos estatisticamente similares ao do controle ($3,3 \times 10^7$ TCID₅₀/mL), $1,8 \times 10^7$ e $3,7 \times 10^7$ TCID₅₀/mL respectivamente.

Tabela 9. Vírus do sarampo produzido em cultivos tratados com 5% de cada uma das frações do *Pool 2* uma hora antes da infecção com 0,1 MOI do vírus. Os cultivos foram mantidos por 72 horas a 37 °C. Títulos virais expressos em TCID₅₀/mL.

	Título do vírus produzido 72 horas após infecção	
Só vírus	$3,3 \times 10^7 \pm 1,25 \times 10^6$	
RQ 3-5	$2,1 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$	*
RQ 13-18	$1,8 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^6$	
RQ 19-25	$3,7 \times 10^7 \pm 2,09 \times 10^7$	

TCID₅₀: do inglês *Tissue culture infectious dose 50%*

Os valores representam a média dos experimentos $\pm$ o Desvio Padrão.

O * indica os valores com $p < 0,05$.

4.6.3 Identificação da proteína com atividade antiviral

De todas as frações testadas em sua capacidade de inibir o poliovírus (cepa Sabin 1) e o vírus do sarampo (cepa Edmonton), a fração RQ 3-5 foi aquela que apresentou a ação antiviral. Como pode ser observado na **Figura 17**, a referida fração não se ligou à coluna na cromatografia de troca iônica, saindo antes do gradiente salino.

Para verificar se a fração apresenta uma proteína pura, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. Como pode ser observado na **Figura 18**, foi identificada uma banda eletroforética de aproximadamente

20 kDa, evidenciando que foi obtida uma proteína purificada com peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% da fração RQ 3-5 do *Pool 2*. O gel foi revelado por impregnação por prata. Foi utilizado peso molecular de calibração da Amersham (14-94 kDa). A seta indica a banda de aproximadamente 20 kDa da fração RQ 3-5.

Proteínas ativas têm sido isoladas de diferentes fontes, como plantas ou animais, especialmente invertebrados. 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).

Existem ainda, outras proteínas e peptídeos que apresentam atividade antiviral em diversas faixas de peso molecular. A concanavalina A, uma lectina de alto peso molecular com atividade contra HSV-1, foi extraída da espécie de feijão *Canavalia ensiformis* (Garrity *et al.*, 1982), uma proteína de aproximadamente 24 kDa responsável por inibir nucleopoliedrovírus foi isolada da hemolinfa do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Nakazawa *et al.*, 2004), em outro trabalho, foram demonstradas algumas propriedades antimicrobianas de uma proteína de 15 kDa isolada de lagartas *Hyalophora cecropia* (Hultmark *et al.*, 1980).

O alloferon, uma proteína de peso 12,65 kDa purificada da hemolinfa da mosca *Calliphora vicina* mostra-se eficaz contra os vírus Influenza A e B devido a uma ação intracelular, apresentando função similar à interferons de vertebrados, desencadeando respostas intracelulares quando adicionados

antes da infecção (Chernysh *et al.*, 2002). Um peptídeo de 916 Da com atividade antiviral foi purificado da hemolinfa de *Heliothis virescens*. Este peptídeo conferiu proteção aos cultivos de células quando foi adicionado antes da infecção com o vírus, sugere-se que a atividade antiviral deste peptídeo seja devido à sua entrada nas células antes da infecção e, uma vez dentro da célula, quando esta é submetida à infecção, o peptídeo inativa os mecanismos de montagem e/ou brotamento e conseqüente saída das novas partículas virais da célula, provavelmente por se ligar internamente à regiões da membrana plasmática (Ourth, 2004).

A proteína de aproximadamente 20 kDa purificada da hemolinfa de *Lonomia obliqua* mostrou-se capaz de inibir a replicação viral de ambos os vírus estudados ao ser adicionada aos cultivos uma hora antes da infecção, o que sugere que ela possa atuar nas etapas do ciclo de replicação dos vírus que ocorrem intracelularmente, agindo com um mecanismo similar ao descrito para o alloferon, assim como também existe a possibilidade desta proteína atuar nas fases tardias da infecção causada por estes vírus, possivelmente agindo como o peptídeo extraído de *H. virescens*. Como foi demonstrado, a hemolinfa não apresenta ação virucida, mais uma vez sugerindo que possa atuar nas diferentes fases da replicação destes vírus, porém não é capaz de inativá-los antes de atingirem a célula-alvo ou impedir o processo de adsorção.

Para os estudos qualitativos que foram propostos como objetivos deste trabalho, as quantidades de HB, *pools* e das frações utilizadas mostraram-se suficientes para evidenciar a atividade biológica da proteína. O volume de 5% que foi utilizado da fração purificada foi suficiente para a evidenciação da sua atividade antiviral.

5 CONCLUSÕES

1) Foi identificada uma proteína de aproximadamente 20 kDa na hemolinfa de *Lonomia obliqua* que afeta a replicação viral, inibindo a produção de vírus do sarampo e poliovírus em células Vero.

2) Foram estabelecidas etapas de purificação da proteína com atividade antiviral através de cromatografia de gel filtração em coluna Sephacryl 200 seguida de cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q.

3) A hemolinfa de *L. obliqua* não possui nenhuma ação deletéria direta sobre os vírus estudados.

4) A hemolinfa bruta não se mostrou citotóxica aos cultivos de células Vero quando adicionadas em até 5% do volume final de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

Almeida MS, Kurtenbach E. Como purificar proteínas? Biotec Ciênc Desenvol. 2002;24:30-35.

Andersen JH, Jenssen H, Sandvik K, Gutteberg TJ. Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. J Med Virol. 2004;74:262-271.

Ansardi DC, Porter DC, Anderson MJ, Morrow CD. Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. Adv Virus Res. 1996;46:1-68.

Arocha-Pinango CL, Guerrero B. Lonomia genus caterpillar envenomation: clinical and biological aspects. Haemostasis. 2001;31:288-293.

Benecia F, Courrèges MC. In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. Phytoth Res. 2000;14: 495-500.

Bowie AG, Haga IR. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. Mol Immunol. 2005;42:859-867.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffman D. Antimicrobial peptides in insects, structure and function. Dev Comp Immunol. 1999;23: 329-344.

Candeias JAN. Multiplicação Viral. In: Trabulsi LR. Microbiologia. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1989.

Cann AJ. Principles of Molecular Virology. 2 ed. Academic Press; 1997.

Carter JB, Saunders VA. Virology: Principles and Applications. Londres: John Wiley & Sons Ltd; 2007.

Chernysh S, Kim SI, Bekker G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, Platino VG, Bulet P. Antiviral and antitumor peptides from insects. Proc Natl Acad Sci. 2002;99:12628-12632.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Choi SS, Rhee WJ, Park TH. Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. *Biotechnol Prog.* 2002;18:874-878.

Chudzinski-Tavassi AM, Carrijo-Carvalho LC. Biochemical and biological properties of *Lonomia obliqua* bristle extract. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2006;12(2):156-171.

Cragg GM, Newman DJ, Weiss RB. Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. *Semin Oncol.* 1997;24:156-163.

De Clercq E. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. *Antivir Res.* 2005;67:56-75.

De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:704-720.

Duarte AC, Caovilla J, Lorini I, Lorini D, Mantovani G, Sumida J, Manfre PC, Silveira RC, De Moura SP. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. *J Bras Nefrol.* 1990;12:184-187.

Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature.* 2005;436:967-972.

Fields BN, KnipeDM, Howley PM. *Virology.* 4. ed. New York: Lippincott-Raven; 2007.

Flores MPA, Fritzen M, Reis CV, Chudzinski-Tavassi AM. Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: Its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;343(4):1216-1223.

Freshney RI. *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique.* 5. ed. New York: Wiley-Liss; 2005

Galinski MS. Paramixoviridae: transcription and replication. *Adv Virus Res.* 1991;40:129-163.

Garrity P, Szelc C, Paquete C, McEvoy M, Millette R, Adler R. Inhibition of herpes simplex virus replication by cucinyl concanavalin A. *Antim Agent Chemother.* 1982;21(3):450-455.

Guerrero B, Perales J, Gil A, Arocha-Pinango CL. Effect on platelet FXIII and partial characterization of Lonomin V, a proteolytic enzyme from *Lonomia achelous* caterpillars. *Thromb Res.* 1999;93(5): 243-252.

Grace TDC. Effects of various substances on growth of silkworm tissue in vitro. Austr J Biol Sci. 1958;11: 407-417.

Grace TDC. Establishment of four strains of cells from insect tissues growth in vitro. Nature. 1962;195:788-789.

Grace TDC. Establishment of a line of cells from the silkworm, *Bombix mori*. Nature. 1967;216:613.

Gross J, Muller C, Vilcinskas A, Hilker M. Antimicrobial activity of exocrine glandular secretions, hemolymph, and larval regurgitate of the mustard leaf beetle *Phaedon cochleariae*. J Invertebr Pathol. 1998;72(3):296-303.

Hamdaoui A, Wataleb S, Devreese B, Chiou SJ, Vanden Broeck J, Van Beeumen J, De Loof A, Schoofs L. Purification and characterization of a group of five novel peptide serine protease inhibitors from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. FEBS Lett. 1998;422(1):74-78.

Hosoya M, Shigeta S, Nakamura K, De Clerq E. Inhibitory effect of selected antiviral cds on measles (SSPE) virus replication in vitro. Antiviral Res. 1989;12:87-97.

Hu JM, Hsiung GD. Evaluation of new antiviral agents: In vitro perspectives. Antivir Res. 1989;11(5-6):217-232.

Huberman A, Aguilar MB, Navarro-Quiroga I, Ramos L, Fernandez I, White FM, Hunt DF, Shabanowitz J. A hyperglycemic peptide hormone from the Caribbean shrimp *Penaeus (litopenaeus) schmitti*. Peptides. 2000;21(3):331-338.

Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bacterial proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem. 1980;106:7-16.

Jerome KR. The road to new antiviral therapies. Clin Appl Immunol Rev. 2005;5:65-76.

Jiang H, Wang Y, Kanost MR. Four serine proteinases expressed in *Manduca sexta* haemocytes. Insect Mol Biol. 1999;8(1):39-53.

Johns R, Sonenshine DE, Hynes WL. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. J Med Entomol. 1998;35(4):458-464.

Jones G, Manczak M, Horn M. Hormonal regulation and properties of a new group of basic hemolymph proteins expressed during insect metamorphosis. J Biol Chem. 1993;268(2):1284-1291.

Kanaya T, Kobayashi J. Purification and characterization of an insect haemolymph protein promoting in vitro replication of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. J Gen Virol. 2000;4:1135-1141.

Kurata K, Nakamura M, Okuda T, Hirano H, Shinbo H. Purification and characterization of a juvenile hormone binding protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1994;109(1):105-114.

Laemmli UR. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-685.

Lanz-Mendoza H, Bettencourt R, Fabbri M, Faye I. Regulation of the insect immune response: the effect of hemolin on cellular immune mechanisms. Cell Immunol. 1996;169(1):47-54.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Amino acids, peptides, and proteins. In: Lehninger AL, editor. Principles of Biochemistry, 3. ed. New York: Worth Publishers, 2000.

Lin CY, Chen SH, Kou GH, Kuo CM. Identification and characterization of a hyperglycemic hormone from freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 1998;21(4):315-321.

Lohner K, Staudegger E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In: Lohner K, editor. Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. England: Horizon Scientific Press; 2001.

Lorini LM. A taturana - aspectos biológicos e morfológicos da *Lonomia obliqua*. Passo Fundo: EDIUPF; 1999.

Lowenberger C, Charlet M, Vizioli J, Kamal S, Richman A, Christensen BM, Bulet P. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. J Biol Chem. 1999;274(29):2092-2097.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265.

Luo T, Brown DT. Purification and characterization of a Sindbis virus-induced peptide which stimulates its own production and blocks virus RNA synthesis. Virology. 1993;194:44-49.

Maranga L, Mendonça RZ, Bengala A, Peixoto CC, Moraes RHP, Pereira CA, Carrondo MJT. Enhancement of Sf-9 cells growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. Biotechnol Prog. 2003;19:58-63.

Marchetti M, Longhi C, Conte MP, Pisani S, Valenti P, Seganti L. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells. *Antiv Res.* 1996;29:221-231.

McConnel OJ, Longley RE, Koehn FE. The discovery of marine natural products with therapeutic potential. *Biotechnology.* 1994;26:109-174.

McKinlay MA, Pevear DC, Rossmann MG. Treatment of the picornavirus common cold by inhibitors of viral uncoating and attachment. *Ann Rev Microbiol.* 1992;46:635-654.

Mendonça RZ, Greco KN, Sousa APB, Moraes RHP, Astray RM, Pereira CA. Enhancing effect of a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production. *Cytotechnology.* 2008;57:83-91.

Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D, Williams R. *Microbiologia médica.* Tradução de Cristina Gubert. 2.ed. São Paulo: Manole; 1999.

Moon HJ, Kurata S, Natori S, Lee BL. Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. *Biol Pharm Bull.* 1995;18(8):1049-1052.

Moraes RHP. Lagartas urticantes. *Biológico.* 1997;59:21-25.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Nakayama M, Suzuki K, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antivir Res.* 1993;21:289-299.

Nakazawa H, Tsuneishi E, Ponnuvel KM, Furukawa S, Asaoka A, Tanaka H, Ishibashi J, Yamakawa M. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. *Virology.* 2004;321:154-162.

Nardone RM. Toxicity testing in vitro. In: Rotblat GH, Cristofalo VJ, editors. *Growth, nutrition and metabolism of cells in culture.* New York: Academic; 1977. p.471-495.

Nussbaumer C, Hinton AC, Schopf A, Stradner A, Hammock BD, Kanaya T, Kobayashi J. Isolation and characterization of juvenile hormone esterase from hemolymph of *Lymantria dispar* by affinity and by anion-exchange chromatography. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000;30(4):307-314.

Ochanda JO, Osir EO, Nguu EK, Olembo NK. Isolation and properties of 600 kDa and 23 kDa haemolymph proteins from the tsetse fly, *Glossina morsitans*: their possible role as biological insecticides. Scand J Immunol Suppl. 1992;11:41-47.

Ohara H. Cytogenic examination of Vero cells derived from the present stock. In: Vero cells: Origin, properties and biomedical applications. Simizu B, Terasima T, editors. Japan: Soft Science Publications; 1988.

Olicard C, Renault T, Torhy C, Benmansour A, Bourgougnon N. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Antiv Res. 2005;66:147-152.

Ourth DD. Antiviral activity against human immunodeficiency virus-1 in vitro by myristoylated-peptide from *Heliothis virescens*. Bioch Biophys Res Commun. 2004;320:190-196.

Pan J, Kurosky A, Xu B, Chopra AK, Coppenhaver DH, Singh IP, Baron S. Broad antiviral activity of crustaceans. Antiviral Res. 2000;48:39-47.

Payment P. Cultivation and assay of animal viruses. In: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MW. editors. Manual of environmental microbiology. 2. ed. Washington, DC: ASM Press; 2002.

Peters ID, Rancourt DE, Davies PL, Walker VK. Isolation and characterization of an antifreeze protein precursor from transgenic *Drosophila*: evidence for partial processing. Biochim Biophys Acta. 1993;1171(3):247-254.

Petricevich VL, Mendonça RZ. Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. Toxicon. 2003;42:143-153.

Popham HJR, Sholby KS, Brandt SL, Coudron TA. Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. J Gen Virol. 2004;85:2255-2261.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent end points. Am J Hyg. 1938;27:493-497.

Reis CV, Andrade SA, Ramos OHP, Ramos CPR, Ho PL, Batista IFC, Chudzinski-Tavassi AM. Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure-function insights. Biochem J. 2006;398(2):295-302.

Rhee WJ, Kim EJ, Park TH. Kinetic effect of silkworm hemolymph on the delayed host cell death in an insect cell-baculovirus system. Biotechnol Prog. 1999;15(6):1028-1032.

Rhee WJ, Park TH. Silkworm hemolymph inhibits baculovirus-induced insect cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;71(1):186-190.

Richman DD. Human immunodeficiency virus. London: International Medical Press; 2003.

Rosenfeld A, Vanderberg JP. Identification of electrophoretically separated proteases from midgut and hemolymph of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J Parasitol*. 1998;84(2):361-365.

Shiotsuki T, Bonning BC, Hirai M, Kikuchi K, Hammock BD. Characterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64(8):1681-1687.

Shishikura F, Abe T, Ohtake S, Tanaka K. Purification and characterization of a 58,000-Da proteinase inhibitor from the hemolymph of a solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1996;114(1):1-9.

Shishikura F, Abe T, Ohtake S, Tanaka K. Purification and characterization of a 39,000-Da serine proteinase from the hemolymph of a solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1997;118(1):131-141.

Silva JG. Cromatografia de proteínas: Guia teórico e prático. Rio de Janeiro: Interciência; 2004.

Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antivir Res*. 2005;68:66-74.

Sousa APB. Isolamento e identificação de proteínas obtidas da hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua* com efeitos na otimização de cultivos de células de inseto *Spodoptera frugiperda* da linhagem Sf-9 e na replicação de Baculovírus [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

Sousa APB, Peixoto CC, Maranga L, Carvalhal AV, Moraes RHP, Mendonça RMZ, Pereira CA, Carrondo MJT, Mendonça RZ. Purification and characterization of an antiapoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. *Biotechnol Progr*. 2005;21:99-105.

Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:307-336.

Veiga ABG, Pinto AFM, Guimarães JA. Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb Res.* 2003;111:95-101.

Veiga ABG, Ribeiro JMC, Guimarães JA, Francischetti IMB. A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. *Gene.* 2005;355:11-27.

Vogel HJ, Schibli DJ, Jing W, Lohmeier-Vogel EM, Epand RF, Epand RM. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and argininecontaining peptides. *Biochem and Cell Biol.* 2002;80:49-63.

Woo SD, Kim WJ, Kim HS, Choi JY, Jin BR, Kang SK. Effect of ailkworm hemolymph on the expression of E. coli beta-galactosidase in insect cell lines infected with recombinant baculoviruses. *Mol Cells.* 1997;7:572-574.

Wyatt SS. Culture in vitro of tissue from the silkworm *Bombix mori*. *J Gen Physiol.* 1956;39:841-852.

Yamamoto Y, Watabe S, Kageyama T, Takahashi SY. Purification and characterization of Bombyx cysteine proteinase specific inhibitors from the hemolymph of *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1999;42(2):119-129.

Ye S, Day INM. Microarrays and Microplates: Applications in biomedical sciences. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited; 2003.

Zhu S, Li W, Jiang D, Zeng X. Evidence for the existence of insect defensin-like peptide in scorpion venom. *IUBMB Life.* 2000;50(1):57-61.

APÊNDICE A - Titulação viral através do método da diluição final.

1. Fazer diluições seriadas do vírus a ser titulado (10^{-1} a 10^{-10}) utilizando 10 frascos eppendorfs de 1,5 mL de capacidade, empregando 0,9 mL do meio de cultura L-15 e 0,1 mL de suspensão viral a partir da maior diluição.
2. Marcar numa placa de 96 poços uma diluição por coluna.
3. Semear as células Vero a serem utilizadas na concentração de $3,5 \times 10^5$ células viáveis/mL em todos os poços da placa. Colocar 100 μ L de volume de cultura por poço.
4. Após a adesão das células à placa, começando com a menor diluição viral (10^{-10}), adicionar 100 μ L de amostra viral nos poços da coluna marcada para aquela diluição. Os poços que restam na coluna serão utilizados como ensaios controle (sem infecção).
5. Repetir o procedimento para as outras diluições virais, conforme ilustrado na **Figura A.1**.
6. Incubar a microplaca, em estufa a 37 °C. Verificar as células infectadas através da presença de efeito citopático característico de cada vírus estudado.
7. Calcular a titulação viral segundo *Reed e Muench* (1938), descrito no exemplo a seguir, apresentado na **Figura A.2**:

Figura A.1. Representação esquemática do procedimento de cultivo das amostras virais através de diluições seriadas (Carter e Saunders, 2007).

Figura A.2. Metodologia do cálculo da titulação viral segundo *Reed e Muench* (1938), através dos dados obtidos da leitura dos poços das placas de cultivo. (Carter e Saunders, 2007).

A **Figura A.1** ilustra um exemplo de resultados obtidos de uma titulação realizada em microplaca com 96 poços. As diluições virais foram realizadas em oito replicatas. As demais cavidades foram empregadas como controle, ou seja, sem infecção.

Para a determinação da percentagem de células infectadas as seguintes variáveis foram definidas: DP (distância proporcional), A (% com resposta acima de 50% de infecção) e B (% com resposta abaixo de 50% de infecção). Contabilizam-se os poços nos quais pelo menos 50% das células foram infectadas. A **Figura A.2** apresenta o exemplo dos resultados obtidos da leitura da placa e a metodologia do cálculo a partir do resultado da leitura da placa.

ANEXO A - Artigos Publicados.

Artigo publicado referente ao presente trabalho, apresentado na íntegra a seguir:

Greco KN, Mendonça RMZ, Moraes RHP, Mancini DAP, Mendonça RZ. Antiviral activity of the hemolymph of *Lonomia obliqua* (Lepidóptera: Saturniidae). Antiviral Research. 2009;84:84-90.

Outros artigos publicados:

Mendonça RMZ, Greco KN, Sousa APB, Moraes RHP, Astray RM, Pereira CA. Enhancing effect of a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production. 2008;57:83-91.

Artigo submetido à revista Cytotechnology, em publicação:

Mendonça RMZ, Greco KN, Moraes RHP, Astray RM, Barral M. Study of the effect of a protein obtained from *Lonomia obliqua* hemolymph in the enhancement of recombinant protein production by *Drosophila melanogaster* cells.