

JULIANA MORAIS DE CASTRO MONTEIRO

**TRIAGEM DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-DENGUE DO PEPTÍDEO HS-1
ANTIMICROBIANO DERIVADO DA PELE DO ANURO *HYPISIBOAS
SEMILINEATUS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M775t
2015 Monteiro, Juliana Morais de Castro, 1990-
Triagem da potencial atividade anti-dengue do peptídeo
HS-1 antimicrobiano derivado da pele do anuro *Hypsiboas
semilineatus* / Juliana Morais de Castro Monteiro. – Viçosa, MG,
2015.

ix, 41f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.37-41.

1. Dengue. 2. Agentes antivirais. 3. Peptídeo
antimicrobiano. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 614.58852

JULIANA MORAIS DE CASTRO MONTEIRO

**TRIAGEM DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-DENGUE DO PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO DERIVADO DA PELE DO ANURO *HYPISIBOAS
SEMILINEATUS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de março de 2015.

Leandro Licursi de Oliveira

Michelle Dias de Oliveira

Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais, Wagner e Eloiza,
que são toda a razão de minha vida e o
porquê desta caminhada ter valido tanto a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me permitido alcançar tamanha graça, fazendo-me forte por toda a caminhada. Sem Ele e sua vontade não teria conseguido.

Aos meus pais, Wagner e Eloiza, agradeço imensamente o apoio, carinho e ao amor incondicional de todos os dias. As palavras de incentivo foram essenciais e o entendimento de quando não era possível ir para casa, mesmo quando a saudade era grande.

A toda a minha grande família pelo apoio de sempre e pelas mensagens de incentivo, principalmente na reta final dos experimentos.

Ao Kássio, que esteve por perto nesta reta final, principalmente na parte da escrita da dissertação e teve de conviver com meus lamentos, mesmo assim seguiu ao meu lado me dando força e coragem para não desistir. O meu muito obrigada.

Agradeço ao Professor Sérgio de Paula, primeiramente pela oportunidade concedida a mim a anos atrás como estagiária, foi um grande aprendizado em minha vida, e agora agradeço novamente pela orientação e por mostrar confiança em meu trabalho e estar sempre disposto em ajudar.

Agradeço ao Professor Leandro Licursi, primeiramente por gentilmente aceitar o convite para participar da banca, e também pelos ensinamentos no laboratório, aprendi muito com você.

Agradeço à Michelle, primeiramente por gentilmente aceitar o convite para participar da banca, e também pelos ensinamentos concedidos a mim da época em que era sua estagiária até hoje, tudo que aprendi sobre cultura celular e a base da biologia molecular eu devo à você. Muito obrigada.

Aos amigos do LIVM, não vou citar nomes para não correr o risco de não esquecer ninguém, eu agradeço por fazer dos nossos dias mais divertidos e finais de semanas menos solitários. Obrigada a cada um de vocês que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, sanando dúvidas de um protocolo ou de um resultado de um experimento.

Agradeço também à CAPES, FAPEMIG e CNPq que financiaram o projeto e me concederam a bolsa, sem elas não seria possível a realização do trabalho da forma como ele foi feito.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Titulação do vírus dengue 1	16
Figura 2: Titulação do vírus dengue 2	17
Figura 3: Titulação do vírus dengue 3	17
Figura 4: Titulação do vírus dengue 4	18
Figura 5: Avaliação da citotoxicidade do peptídeo HS-1.....	19
Figura 6: Controle do ensaio de avaliação da citotoxicidade do peptídeo HS-1..	19
Figura 7: Ensaio virucida dengue 1	20
Figura 8: Ensaio virucida dengue 2	21
Figura 9: Ensaio virucida dengue 3	22
Figura 10: Ensaio virucida dengue 4	23
Figura 11: Ensaio de tratamento pré-infecção dengue 2	24
Figura 12: Ensaio de tratamento pré-infecção dengue 3	25
Figura 13: Ensaio de tratamento pós-infecção dengue 2	26
Figura 14: Ensaio de tratamento pós-infecção dengue 3	27
Figura 15: Ensaio de inibição da adsorção viral dengue 2	28
Figura 16: Ensaio de inibição da adsorção viral dengue 3	29
Figura 17: Ensaio de inibição da internalização viral dengue 2	30
Figura18: Ensaio de inibição da internalização viral dengue 3	30

BIOGRAFIA

Juliana Morais de Castro Monteiro, nascida em 3 de fevereiro de 1990, natural de Ipatinga, estado de Minas Gerais, filha de Wagner Monteiro de Souza e Eloiza Morais de Castro Monteiro. De 1994 a 2007 estudou na Escola Educação Criativa, situada na mesma cidade em que nasceu, completando os ensinamentos fundamental e médio. Formou-se em Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa no ano de 2013, durante a graduação foi estagiária do Laboratório de Imunovirologia Molecular pelo período de um ano até virar bolsista de iniciação científica (CNPq). Os resultados obtidos neste período foram apresentados em diferentes congressos de âmbito regional e nacional. No ano de 2013 também ingressou no Mestrado pelo programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela mesma instituição de ensino.

RESUMO

MONTEIRO, Juliana Morais de Castro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Triagem da potencial atividade anti-dengue de peptídeo antimicrobiano derivado da pele do anuro *Hypsiboas semilineatus***. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientador: Sílvia Almeida Cardoso.

O vírus da Dengue é um arbovírus da família *Flaviviridae* que acomete grande parte da população mundial, possuindo quatro sorotipos (1-4), os quais ocasionam respostas imunes duradouras, mas diferentes. São vírus de RNA fita simples com polaridade positiva de aproximadamente 11Kb, codificando 10 proteínas, sendo 3 delas estruturais e 7 não estruturais. Estudos revelam que peptídeos de secreção de anfíbios possuem várias funções, dentre elas estão atividades antiviral e antimicrobiana, com isso, sequências destes peptídeos vêm sendo sintetizadas e testadas *in vitro*, a fim de obter compostos ativos para a fabricação de drogas de amplo espectro e de múltipla aplicabilidade. Os peptídeos de atividade antimicrobiana (PAM) são os mais estudados e eles devem apresentar uma toxicidade seletiva e rápida ação frente aos microorganismos. Por não existir nenhuma droga antiviral eficaz contra o vírus em questão, temos por objetivo avaliar a atividade antiviral de um peptídeo sintético, denominado HS-1, onde sua sequência foi obtida previamente da secreção do anfíbio anuro *Hypsiboas semilineatus*. Após realizar um teste de citotoxicidade, foram realizados ensaios de neutralização a fim de se investigar seu mecanismo de ação contra o vírus da dengue. Com o intuito de verificar uma possível proteção dos receptores celulares, o peptídeo foi incubado previamente com as células, em um ensaio posterior o peptídeo foi incubado previamente com o vírus, para verificar se o PAM agia sobre a partícula viral e em seguida foram realizados ensaios para verificar se o peptídeo tinha ação sobre a adsorção, internalização e replicação viral. Os resultados foram promissores, pois mostraram que o peptídeo em questão age sobre a partícula viral dos 4 sorotipos da dengue de uma forma muito eficaz, sendo que nas maiores concentrações a inibição chega a 100%, além de ter efeito sobre a inibição da adsorção, o que foi observado para os sorotipos 2 e 3.

ABSTRACT

MONTEIRO, Juliana Morais de Castro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2015. **Screening of potential anti-dengue activity antimicrobial peptide derived from the skin of anuran *Hypsiboas semilineatus***. Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-adviser: Sílvia Almeida Cardoso.

Dengue virus is an arbovirus of *Flaviviridae* family, which has been the most within the world population. There are four serologic types of dengue virus (DENV 1-4), which cause long lasting, though different, immune responses. They are single positive-strand RNA viruses with of approximately 11Kb in length. This RNA is responsible for encoding 10 proteins, 3 structural and 7 non-structural. Several studies reveal that some peptides from skin of amphibians have antimicrobial and antiviral activities. Therefore, sequences of these peptides were synthesized and tested *in vitro* in order to obtain biologically active compounds to develop drugs with wide spectrum and multiple applicability. The antimicrobial peptides are the most studied and they must present a selective toxicity and quick action against microorganism. Effective drugs against dengue virus haven't been developed yet. Thereat, the present study aimed to evaluate the antiviral activity against dengue virus of the synthetic peptide HS-1, which sequence was previously obtained from the skin of the anuran *Hypsiboas semilineatus*. In the cytotoxicity assay, and afterwards neutralization assays were performed to investigate the mechanism of action of the HS-1 peptide against Dengue virus. The first neutralization assay was carried out to determine whether the HS-1 peptide could confer protection to cell receptors against viral infection. For this, the peptide was pre-incubated with VERO cells. In the second neutralization assay the peptide was pre-incubated with Dengue virus to evaluate the ability of this peptide to act directly on viral particle. The subsequent assays were performed in order to determine whether the peptide would act over adsorption, internalization and virus replication. The results were promising; they showed that the peptide in question acts on the viral particle of the four dengue serotypes in a very effective manner. With higher concentrations of peptide, the inhibition reached 100%. In addition, it was found very promising results against inhibition adsorption to serotypes 2 and 3.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Dengue	01
1.2 Peptídeos Antimicrobianos (PAM)	03
1.3 Mecanismos de Ação	04
1.4 Aplicações	05
1.4.1 Peptídeos Antimicrobianos como Antivirais	06
2. OBJETIVOS	08
2.1 Objetivo Geral	08
2.2 Objetivos Específicos	08
3. MATERIAL E MÉTODOS	09
3.1 Cultura Celular	09
3.2 Estoque Viral	09
3.3 Material Biológico	09
3.4 Determinação do Título Viral	10
3.5 Citotoxicidade Celular – Avaliação da Viabilidade Celular Através do Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazolium (MTT)	10
3.6 Teste de Redução por Neutralização em Placa (PRNT)	11
3.6.1 Ensaio Virucida	11
3.6.2 Tratamento Pré-infecção	12
3.6.3 Tratamento Pós-infecção	13
3.6.4 Inibição da Adsorção Viral	13
3.6.5 Inibição da Internalização Viral	14
3.7 Análise estatística	15
4. RESULTADOS	16
4.1 Determinação do Título Viral	16
4.1.1 DENV-1	16
4.1.2 DENV-2	16
4.1.3 DENV-3	17
4.1.4 DENV-4	18
4.2 Citotoxicidade Celular – Avaliação da Viabilidade Celular Através do Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazolium (MTT)	18
4.3 Teste de Redução por Neutralização em Placa (PRNT)	20

4.3.1 Ensaio Virucida	20
4.3.1.1 DENV-1	20
4.3.1.2 DENV-2	20
4.3.1.3 DENV-3	22
4.3.1.4 DENV-4	23
4.3.2 Tratamento Pré-infecção	23
4.3.2.1 DENV-2	23
4.3.2.2 DENV-3	25
4.3.3 Tratamento Pós-infecção	26
4.3.3.1 DENV-2	26
4.3.3.2 DENV-3	26
4.3.4 Inibição da Adsorção Viral	27
4.3.4.1 DENV-2	27
4.3.4.2 DENV-3	28
4.3.5 Inibição da Internalização Viral	29
4.3.5.1 DENV-2	29
4.3.5.2 DENV-3	30
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	35
7. PERSPECTIVAS	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

A família *Flaviviridae* compreende vírus transmitidos por artrópodes, denominado arbovírus, de grande importância médica e para o campo da Saúde Pública. Em particular, as infecções causadas pelo dengue são as que assumem maior importância no nosso país (NOBLE and SHI, 2012). O vírus da dengue possui 4 sorotipos denominados dengue-1, dengue-2, dengue-3 e dengue-4 e a imunidade adquirida após infecção com cada um dos sorotipos é duradoura (DE PAULA and FONSECA, 2004).

A ocorrência global da dengue tem crescido drasticamente nas últimas décadas. A doença é considerada endêmica em mais de 100 países da África, Américas, Leste Mediterrâneo, Sudeste Asiático e do Oeste Pacífico (WHO, 2015; HUANG *et al.*, 2002). A transmissão deste vírus é feita por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*, caracterizando-se por ser predominantemente urbano na sua distribuição (HALSTEAD, 2007).

A infecção com os vírus dengue causa um espectro de manifestações clínicas, desde uma doença febril leve até um quadro hemorrágico severo e fatal que pode ser causado pela infecção com qualquer um dos sorotipos do vírus dengue (PUCCIONI-SOHLER *et al.*, 2013).

O genoma destes vírus, bem como o de todos os flavivírus, consiste de um RNA de fita simples de 11 kilobases (Kb) e de polaridade positiva, com peso molecular aproximado de $3,3 \times 10^6$ daltons, que codifica as proteínas em uma "long open reading frame" (ORF) onde as proteínas estruturais encontram-se na porção 5' do genoma e as não-estruturais na porção 3'. A organização do genoma e a ordem de expressão destas proteínas é C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5 (BOLLATI *et al.*, 2010).

Alguns indivíduos infectados com o dengue, desenvolvem uma síndrome grave e as vezes fatal, conhecido como febre da dengue hemorrágica /síndrome do choque do dengue (DHF/DSS), descrita pela primeira vez na década de 1950. A doença caracteriza-se por febre e uma variedade de sintomas que durante a fase aguda são indistinguíveis da dengue clássica, mas que após 2 a 5 dias a doença evolui com o aparecimento das manifestações hemorrágicas. A

anormalidade fisiopatológica primária observada em pacientes com DHF/DSS é o incremento da permeabilidade vascular que induz o extravasamento de plasma para o compartimento extra vascular, resultando em hemoconcentração e queda da pressão sanguínea. Como na dengue clássica, as manifestações hemorrágicas estão presentes, porém mais frequentes e graves. Quando o diagnóstico não é feito rapidamente e portanto a intervenção clínica não é a adequada, alguns pacientes com DHF desenvolvem choque, que pode ser leve e transitório ou grave com pulso e pressão sanguínea não detectável, que em alguns casos pode levar a morte (WHO, 2015; INNIS, 1995).

As manifestações da dengue podem se apresentar como infecções assintomáticas, mas são os quadros graves de doença hemorrágica que são responsáveis por altos índices de mortalidade. Clinicamente, as formas mais graves da dengue são de difícil diagnóstico, sendo confundidas com outras doenças caracterizadas por distúrbios da permeabilidade capilar (HENCHAL and PUTNAK, 1990).

A patogênese da forma hemorrágica da dengue não está bem definida e várias hipóteses existem. A de maior aceitação refere-se a um fenômeno denominado "aumento da infecção mediado por anticorpo" (antibody dependent enhancement), fenômeno comum a outras infecções virais, como por exemplo, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (TAKEDA and ENNIS, 1990). Esta hipótese defende a idéia de que anticorpos adquiridos em infecções prévias por um determinado sorotipo do vírus da dengue não seriam neutralizantes ou teriam títulos muito baixos para neutralizarem o sorotipo responsável pela infecção atual. Estes anticorpos se ligariam a epítopos do sorotipo responsável pela infecção atual, comuns aos 4 sorotipos virais, mas não os neutralizariam, formando então, complexos vírus-anticorpos que facilitariam a penetração do vírus da dengue nas células monocitárias, que são as células-alvo do nosso organismo para a replicação viral. Células mononucleares expressam na sua superfície receptores para a porção Fc das imunoglobulinas, região implicada na ligação dos complexos vírus-anticorpos a estas células, facilitando assim a ligação do vírus da dengue ao seu receptor bem como a internalização dos complexos vírus-anticorpos. Esta facilidade de penetração do vírus nestas células resulta em uma maior carga viral, maior intensidade da resposta imune a esta infecção com

liberação de aminas vasoativas e como consequência uma doença mais grave (PUCCIONI-SOHLER *et al.*, 2013).

1.2 Peptídeos antimicrobianos (PAM)

Devido a constante presença de micro-organismos patogênicos, os organismos multicelulares apresentam um aparato de resistência denominado imunidade inata (RINALDI, 2002). Como a resposta imune patógeno-específica ocorre lentamente a imunidade inata age como uma primeira linha de defesa, na qual há a produção de moléculas antimicrobianas pelas células epiteliais, atuando rapidamente e controlando o crescimento de um amplo espectro de micro-organismos (BARRA and SIMMACO, 1995; SCHRODER, 1999). Esta atividade antimicrobiana ocorre por meio da alteração da membrana citoplasmática, seja por separação de fase, afinamento da membrana, formação de poros e de estruturas não-lamelares ou da quebra da camada fosfolipídica, podendo ser estes apenas passos para a desestabilização da membrana, processo que ocorre muito rapidamente (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

A superfície dos eucariotos superiores é normalmente coberta por micro-organismos, mas geralmente não ocorre infecção por eles. Este fato decorre, além da presença de uma barreira física, devido a produção de peptídeos antimicrobianos codificados geneticamente que variam de 10 a 60 aminoácidos de comprimento (SCHRODER, 1999; RINALDI, 2002). Modificações pós-traducionais ocorrem com frequência e incluem a amidação C-terminal e, mais raramente, a isomerização de aminoácidos (RINALDI, 2002). Estudos demonstraram que a amidação C-terminal provoca o aumento da atividade antimicrobiana, o que pode estar relacionado a mudanças no momento dipolar e a redução da susceptibilidade a degradação por carboxipeptidases (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Estruturalmente os peptídeos antimicrobianos são divididos em três principais grupos: (1) peptídeos lineares com conformação em α -hélice anfipática sem cisteínas (ex: magaininas e dermaseptinas), (2) peptídeos cíclicos e cíclicos com resíduos de cisteína externos ao ciclo (ex: defensinas e protectinas) e (3) peptídeos de 10-13 resíduos de aminoácidos, ricos em prolina e histidina. Todavia, a cada ano são descobertos novos peptídeos com características

estruturais únicas que acabam por constituir novas famílias, por exemplo, tigerinas, japonicanas, temporinas, distintas e pseudinas (BULET *et al.*, 2004).

1.3 Mecanismos de ação

Os diferentes PAM caracterizam-se pelo seu amplo espectro de atividade, podendo afetar o crescimento de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e algumas vezes vírus, protozoários e células tumorais (GANZ and LEHRER, 1998; BULET *et al.*, 2004). Muitos PAM exibem atividade *in vitro* contra um grande número de micro-organismos patogênicos resistentes a antibióticos convencionais. A sua grande vantagem refere-se a sua capacidade de destruir rapidamente o alvo e de exibir seletividade para padrões comuns a diversos grupos de micro-organismos, apresentando assim um amplo espectro de ação antimicrobiana.

Com relação ao modo de ação, estas moléculas possuem como alvo uma diferença sutil entre a organização das membranas dos micro-organismos e dos animais (mecanismo bem definido para bactérias). As membranas bacterianas caracterizam-se por serem organizadas de tal forma que a face externa da bicamada lipídica possui alto conteúdo de fosfolipídios carregados negativamente, enquanto a mesma face da membrana plasmática dos animais é composta majoritariamente por fosfolipídios neutros, como fosfatidilcolina e esfingomielina, estando os fosfolipídios aniônicos, como fosfatidilserina e fosfatidilglicerol, voltados para o interior da célula (HANCOCK and LEHRER, 1998; MATSUZAKI, 1998).

Dos PAM estudados até o momento, poucos apresentam toxicidade para células de mamíferos e essa seletividade dos PAM por micro-organismos, parece resultar, pelo alto conteúdo de fosfolipídios aniônicos na superfície externa da membrana plasmática e também pela ausência de colesterol nas membranas de bactérias (HANCOCK and LEHRER, 1998). A presença de colesterol na membrana normalmente reduz a atividade dos PAM, devido a uma maior estabilização da bicamada lipídica e/ou a possíveis interações entre o colesterol e os PAM (MATSUZAKI, 1998).

Alguns modelos sugerem que o mecanismo de ação destes peptídeos ocorra através da interação eletrostática com os fosfolipídios aniônicos da

membrana plasmática e lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular, no caso de bactérias Gram-negativas. Após interação, ocorre a permeabilização da membrana bacteriana através da (1) formação de pequenos poros (denominados de poros do tipo “barril”), que podem atuar como canais iônicos que permitem a entrada e saída indiscriminada de íons da célula; (2) formação de um “tapete” de PAM sobre a membrana, que se inserem perpendicularmente, formando complexos com os fosfolipídeos e causando o dobramento destes para a formação de um poro do tipo ‘toroidal’, que permite a passagem de íons e macromoléculas; (3) formação de um “tapete” de PAM, porém com uma ação “detergente”, resultando na desestruturação total da membrana plasmática e a formação de micelas à partir da membrana rompida (BROGDEN, 2005).

Esses modelos de atuação constituem os mecanismos mais comuns e melhor descritos para os PAM atualmente e, em geral, peptídeos que atuam através destes modelos de ação possuem capacidade de matar bactérias de forma rápida e em concentrações muito baixas (MATSUZAKI, 1998; DATHE *et al.*, 2001).

Estudos mostram que a perturbação em nível de parede ou membrana não seria o único modo de ação desses peptídeos. Alguns PAM podem ser translocados para o interior do micro-organismo, e agir sobre alvos intracelulares, podendo interferir em várias vias metabólicas, além de outros mecanismos que também podem levar a inibição do crescimento e morte do micro-organismo (KRAGOL *et al.*, 2001; BROGDEN, 2005).

1.4 Aplicações

O potencial terapêutico dos peptídeos antimicrobianos é atribuído a sua capacidade de lisar membranas, matando rapidamente um amplo espectro de micro-organismos, inclusive fungos, bactérias e vírus resistentes a múltiplas drogas (REDDY *et al.*, 2004). Em comparação com os antibióticos convencionais, o surgimento de resistência aos peptídeos pelos micro-organismo ocorre a uma taxa bem menor, devido ao seu mecanismo de ação relativamente não específico (CONLON *et al.*, 2004). Outro fator positivo é a ação combinada que ocorre com o uso simultâneo dos peptídeos com antibióticos clássicos ou com misturas de peptídeos, bastante útil no combate

das infecções por patógenos multi-resistente (BARRA and SIMMACO, 1995; NASCIMENTO *et al.*, 2003).

1.4.1 Peptídeos Antimicrobianos (PAM) como Antivirais

PAMs estão cada vez mais ganhando importância como alternativas para as terapias que convencionalmente utilizam-se de antibióticos, e o estudo do seu uso como virucida vem crescendo nos últimos anos. Eles podem se derivar de formas naturais ou sintéticas e cada PAM pode ter atividade antimicrobiana a uma única ou múltiplas classes de patógenos (MOHAN, 2010).

Alguns dos PAM que já foram descritos como antivirais mais eficazes foram em estudos contra os vírus da influenza A, coronavírus e HIV. Esses estudos relevam que as α -defensinas tem capacidade de atingir o vírus do HIV inativando-o e impedindo a sua replicação dentro das células, as α -defensinas humanas também tem sido utilizada para bloquear infecção por papilomavírus (ZAIYOU, 2007). Ainda comentando sobre o vírus da imunodeficiência humana, LORIN and SAIDI (2005), demonstraram que o peptídeo dermaseptina S4, extraído de pele de anfíbio, exerce uma atividade seletiva sobre a partícula viral perturbando a sua organização.

Em se tratando do vírus da dengue, um estudo sobre peptídeos cíclicos, realizou um screening para detectar inibidores da proteína E do envelope viral e da proteína não estrutural 5 (NS5), com o objetivo de inibir o processo de fusão do vírus e a sua replicação, respectivamente, demonstrando potenciais candidatos a agentes antivirais contra o vírus da dengue (PARIKESIT *et al.*, 2013; TAMBUNAN *et al.*, 2014). Outro peptídeo cíclico testado como anti-dengue, foi o Retrociclina 1 (RC1), um dos análogos das θ -defensinas, reduzindo significativamente a replicação viral de DENV-2 em células VERO infectadas (ROTHAN *et al.*, 2012). Um terceiro trabalho, também com o vírus dengue 2, apresentou um PAM que mostrou atividade antiviral. A Latarcina 1, peptídeo natural produzida pela glândula de veneno do aracnídeo *Lachesana tarabaeve*, atuou sobre a protease do vírus inibindo a replicação viral em células HepG2 (ROTHAN *et al.*, 2014).

Como não há tratamento específico para o vírus da dengue, e que as medidas se baseiam na manutenção do estado geral e conforto do paciente,

temos por objetivo neste trabalho triar a potencial atividade anti-dengue de peptídeo antimicrobiano derivado da pele do anuro *Hypsiboas semilineatus*. (NACIF-MARÇAL *et al.*, 2015)

Este peptídeo será candidato promissor para o desenvolvimento de fármacos a serem usados no combate a esta enfermidade, levando a uma diminuição da carga viral desses pacientes reduzindo dessa forma a chance de desenvolvimento da forma grave da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Testar a atividade anti-dengue de um peptídeo antimicrobiano derivado da pele do anuro *Hypsiboas semilineatus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a citotoxicidade do peptídeo *in vitro*;
- Determinar a atividade antiviral do peptídeo antimicrobiano contra os quatro sorotipos da dengue;
- Determinar o mecanismo de ação deste peptídeo antimicrobiano frente aos sorotipos do vírus.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

Células VERO, derivadas do rim do macaco verde (vervet) Africano (*Cercopithecus aethiops*) foram utilizadas neste experimento. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ com Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM – Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino, para promoção do crescimento e 2% para manutenção da linhagem celular, além das soluções de antibiótico: penicilina (500 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml).

3.2 Estoque viral

Os sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, das cepas Nauru Island, New Guinea C, H-87 e H-241 respectivamente, foram obtidas do estoque viral do Laboratório de Immunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, e propagados em cérebros de camundongos Swiss neonatos. Após o início da viremia, os cérebros foram removidos e macerados com PBS 1X e submetidos a centrifugação a 700 g por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi suplementado com soro fetal bovino para uma concentração final de 5%, dividido em alíquotas e mantidos em ultrafreezer a -80°C.

3.3 Material Biológico

O peptídeo antimicrobiano derivado da pele do anuro *Hypsiboas semilineatus*, foi gentilmente cedido pelo professor Leandro Licursi de Oliveira, do Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, e utilizado para verificar seu potencial anti-dengue. Por ter sido o primeiro com a sequência determinada pelo grupo de pesquisa, denominou-o como HS-1 (NACIF-MARÇAL *et al.*, 2015).

O peptídeo por caráter hidrofóbico foi diluído em uma solução com 50% de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo esta realizada de forma estéril. A sequência do peptídeo é: H-FLPLILPSIVTALSSFLKQG-OH.

3.4 Determinação do Título Viral

Células VERO confluentes, cultivadas em placas de 24 poços (4×10^4 células por poço) foram infectadas em triplicata com 100 μ L de diluições crescentes de 10^{-1} a 10^{-7} dos vírus dengue. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante. Após este período de adsorção foi adicionado à cultura 1,5mL de meio semi-sólido (Meio MEM, suplementado com 2% de soro fetal bovino, e Carboximetilcelulose 3% Sigma Chemistry Company USA) na proporção de 2:1). As placas foram estocadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 a 6 dias. Posteriormente adicionou-se formaldeído numa concentração final de 10% para que houvesse a fixação das células. Após fixação o meio foi removido, as células lavadas e coradas com Cristal Violeta 5% por 30 minutos. As placas de lise presentes foram contadas e expressas em Unidade Formadora de Placa por Unidade de Volume (PFU/mL).

Foi possível determinar o número de unidades formadoras de placas por unidade de volume (PFU/mL) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{PFU/mL} = \frac{\text{Número de placas de lise}}{\text{Volume do inóculo (mL) X Diluição}}$$

Para tanto é necessário observar a última diluição onde ocorrem placas de lise e a quantidade dessas placas para que assim possa ser calculado o título.

3.5 Citotoxicidade - Avaliação da Viabilidade Celular Através do Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazolium (MTT)

Com o objetivo de avaliar se o peptídeo era tóxico ou não para as células e a partir daí dar continuidade ao nosso estudo, fizemos o ensaio de citotoxicidade celular. Para tanto, células VERO foram cultivadas em placas de 96 poços (10^4 células por poço) até confluência usando meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 80% de confluência, retiramos o meio e adicionamos 100 μ L de diluições seriadas do peptídeo (diluído previamente em meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino). Os controles deste ensaio foram só

meio MEM e diluições seriadas de DMSO (solvente orgânico usado para solubilizar o peptídeo). Posteriormente, as placas foram incubadas por 24 horas. Logo após, retiramos o meio, adicionamos, em todos os poços, 100 µL de MTT (Sigma Chemistry Company USA) diluído em meio MEM, para uma concentração final de 0,5 mg/mL, e as placas foram incubadas por mais 4 h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, retiramos o meio contendo MTT de cada poço e adicionamos 100 µL de uma solução isopropanol-HCl (0,1 mol/L) nos poços para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram agitadas levemente a temperatura ambiente, por 20 minutos, para solubilização dos cristais, e lidas a 590 nm. Analisando esta leitura foi possível verificar a citotoxicidade do peptídeo.

O peptídeo, inicialmente em uma solução estoque de 5mg/mL, foi diluído para uma primeira concentração teste de 1mg/mL e a partir daí foi feita uma diluição seriada até a concentração de 3,9 µg/mL para que analisássemos uma faixa de concentração bem ampla.

3.6 Teste de Redução por Neutralização em Placa (PRNT)

3.6.1 Ensaio Virucida

Este foi o primeiro ensaio a ser realizado frente aos quatro sorotipos, como uma espécie de screening antiviral, assim seria possível verificar se o peptídeo em estudo era promissor na área dos antivirais e julgar se os demais ensaios seriam necessários.

Para verificar se o peptídeo age diretamente sobre o vírus, diferentes diluições do peptídeo foram incubados com os vírus Dengue. Para tanto, 150µL de cada diluição do peptídeo foi adicionado à 150µL do vírus titulado previamente, de modo que cada poço da placa de ensaio tivesse uma quantidade de 100 PFU do vírus, e mantidos a 37°C por 1 hora. Posteriormente, monocamadas de Células VERO, cultivadas em placas de 24 poços (4 x 10⁴ células por poço), foram infectadas em triplicata com 100µL de cada uma das soluções (vírus + peptídeo), o controle positivo recebeu 100 PFU do vírus e o controle negativo 100µL de meio MEM incompleto, e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante. Após este período de adsorção foi

adicionado à cultura o meio semi-sólido (1,5mL por poço), já descrito anteriormente. As placas foram estocadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 a 6 dias. Posteriormente adicionou-se formaldeído numa concentração final de 10% para que houvesse a fixação das células. Após fixação o meio foi removido, as células lavadas e coradas com Cristal Violeta 5% por 30 minutos. As placas de lise presentes foram contadas e comparadas com o controle positivo para verificar se houve ou não redução da lise.

3.6.2 Tratamento Pré-infecção

Para analisar se o peptídeo confere proteção às células foi necessário realizar um ensaio em que o peptídeo fosse pré-incubado com as células antes da infecção viral. Para tanto células VERO cultivadas em placas de 24 poços (4 x 10⁴ células por poço) foram incubadas com 100µL de cada uma das diluições do peptídeo em triplicata por 3 horas a 37°C sob agitações periódicas, neste momento tanto os poços do controle positivo quanto os do negativo continham 100µL de meio MEM incompleto. Passado o tempo de incubação, o peptídeo foi retirado, os poços lavados com PBS 1X e foram adicionados às células 100 PFU do vírus (no controle positivo e onde foi incubado as diferentes diluições do peptídeo), e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante. Após este período de adsorção foi adicionado à cultura o meio semi-sólido (1,5mL por poço), já descrito anteriormente. As placas foram estocadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 a 6 dias. Posteriormente adicionou-se formaldeído numa concentração final de 10% para que houvesse a fixação das células. Após fixação o meio foi removido, as células lavadas e coradas com Cristal Violeta 5% por 30 minutos. As placas de lise presentes foram contadas e comparadas com o controle positivo para verificar se houve ou não redução da lise.

3.6.3 Tratamento Pós-infecção

Como já foi descrito, alguns PAMs têm a capacidade de se translocar para o interior da célula, podendo interferir em vias metabólicas, dessa forma julgou-se necessário realizar o ensaio de pós-tratamento para averiguar se o peptídeo tem ação após a infecção viral, no caso, se ele interfere diretamente na replicação do mesmo, agindo sobre as proteínas virais, mais especificamente as não estruturais 3 e 5 (NS3 e NS5).

Para averiguar se o peptídeo age sobre a replicação viral, foi necessário realizar um ensaio onde o peptídeo é incubado após a infecção viral. Desta forma células VERO cultivadas em placas de 24 poços (4×10^4 células por poço) foram incubadas com 100 PFU do vírus, nos poços destinados a cada uma das diluições dos peptídeos e ao controle positivo, enquanto que o meio MEM incompleto foi adicionado ao controle negativo. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante. Após este período de adsorção, foi retirado o meio dos poços e adicionada 100 μ L das diluições do peptídeo em triplicata, e posteriormente adicionou-se à cultura o meio semi-sólido (1,5mL por poço), já descrito anteriormente. As placas foram estocadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 a 6 dias. Posteriormente adicionou-se formaldeído numa concentração final de 10% para que houvesse a fixação das células. Após fixação o meio foi removido, as células lavadas e coradas com Cristal Violeta 5% por 30 minutos. As placas de lise presentes foram contadas e comparadas com o controle positivo para verificar se houve ou não redução da lise.

3.6.4 Inibição da Adsorção Viral

O ensaio de inibição da adsorção viral é de grande importância, pois é um dos ensaios a serem realizados quando se quer descobrir o mecanismo de ação do peptídeo. Para tanto foi necessário incubar o vírus junto a célula a baixas temperaturas (4°C), pois assim o vírus tem capacidade de adsorver mas não de internalizar. Dessa forma colocamos tanto as células quanto o vírus a uma

temperatura de 4°C por 30 minutos para entrarem em equilíbrio térmico. Após esse tempo, foi adicionado nos poços 100 PFU do vírus e ao mesmo instante 100µL das diluições do peptídeo, lembrando que no controle positivo somente 100 PFU do vírus foi adicionado e no controle negativo somente 100µL do meio MEM incompleto. As células foram mantidas na temperatura de 4°C por 2 horas sob agitações periódicas. Passado o tempo de incubação, o vírus e peptídeo foram retirados, os poços lavados com PBS 1X e foi adicionado à cultura o meio semi-sólido (1,5mL por poço), já descrito anteriormente. As placas foram estocadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 a 6 dias. Posteriormente adicionou-se formaldeído numa concentração final de 10% para que houvesse a fixação das células. Após fixação o meio foi removido, as células lavadas e coradas com Cristal Violeta 5% por 30 minutos. As placas de lise presentes foram contadas e comparadas com o controle positivo para verificar se houve ou não redução da lise.

3.6.5 Inibição da Internalização Viral

O ensaio de inibição da internalização viral também nos auxilia para analisar e descobrir o modo de ação do peptídeo sob o vírus, no caso o vírus já se encontra aderido na superfície celular, mas devido as baixas temperaturas não consegue internalizar, neste momento conseguimos fazer nosso ensaio e verificar a atuação do peptídeo sob a inibição ou não da internalização viral.

Para analisar se o peptídeo tem capacidade de agir sobre a internalização viral é necessário incubar o vírus junto as células a baixas temperaturas (4°C), pois assim o vírus tem capacidade de adsorver mas não de internalizar e logo depois elevar a temperatura a 37°C para acompanhar a internalização da partícula viral. Para tanto realizamos o início do ensaio como o anterior, colocando as células VERO e o vírus a uma temperatura de 4°C por 30 minutos para entrarem em equilíbrio térmico. Após esse tempo adicionou-se 100 PFU do vírus nos poços destinados às diluições do peptídeo e controle positivo, no controle negativo adicionou-se 100µL de meio MEM incompleto e manteve-se a monocamada na temperatura de 4°C por 2 horas sob agitações periódicas. Após

esse tempo, lavou-se com PBS 1X gelado os poços e elevou-se a temperatura para 37°C por 5 minutos para que a temperatura voltasse a se reestabelecer. Foi adicionado 100µL das diluições do peptídeo nos poços e nos controles 100µL de meio MEM incompleto, a placa foi mantida a temperatura de 37°C por 2 horas. Passado o tempo de incubação, o peptídeo foi retirado, os poços lavados com PBS 1X, depois com tampão citrato pH=3 por 1 minuto (100µL por poço, inclusive nos controles positivos), e lavados mais duas vezes com PBS 1X para reestabelecer o pH normal da célula. Após o processo de lavagem foi adicionado à cultura o meio semi-sólido (1,5mL por poço), já descrito anteriormente. As placas foram estocadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 a 6 dias. Posteriormente adicionou-se formaldeído numa concentração final de 10% para que houvesse a fixação das células. Após fixação o meio foi removido, as células lavadas e coradas com Cristal Violeta 5% por 30 minutos. As placas de lise presentes foram contadas e comparadas com o controle positivo para verificar se houve ou não redução da lise.

Foi realizado em triplicata todas as variações dos ensaios de neutralização (PRNT), e os ensaios como um todo, foram repetidos 3 (três) vezes. Foi feito também um controle com DMSO, uma vez que o peptídeo em questão foi solubilizado em uma solução utilizando essa substância.

3.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados para significância estatística usando o programa GraphPad Prism (versão 5.0). A comparação estatística entre as colunas nos diferentes ensaios foram analisadas por ANOVA. O pós-teste utilizado foi o de Bonferroni com 95% de confiança.

4. RESULTADOS

4.1 Determinação do Título Viral

4.1.1 DENV-1

A última diluição na qual se observou placas de lise foi na 10^{-4} , como pode ser verificado na figura 1. Dessa forma foi possível, calculando o título, encontrar para este sorotipo 3×10^5 PFU/mL.

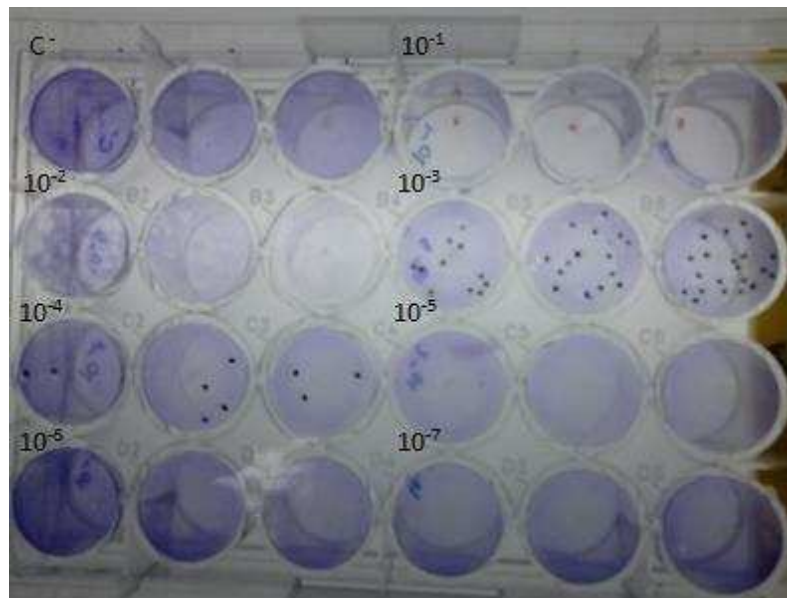


Figura 1 - Titulação do Vírus Dengue 1. Nos poços de C⁻ só foram incubadas célula e nos demais poços há as diluições seriadas do vírus dengue 1 em triplicata.

4.1.2 DENV-2

A última diluição na qual se observou placas de lise foi na 10^{-5} , como pode ser verificado na figura 2. Dessa forma foi possível, calculando o título, encontrar para este sorotipo 1×10^6 PF/mL.

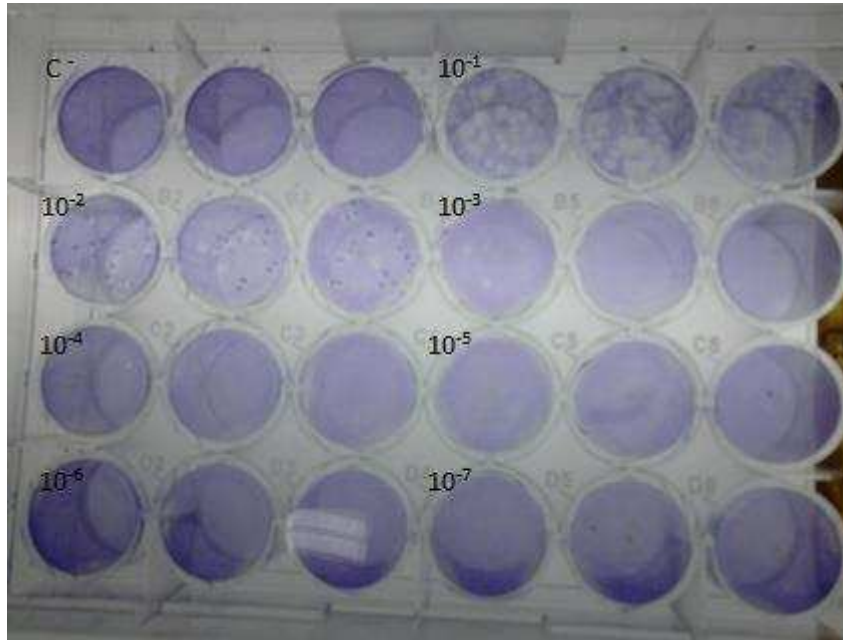


Figura 2 - Titulação do Vírus Dengue 2. Nos poços de C⁻ só foram incubadas células e nos demais poços há as diluições seriadas do vírus dengue 2 em triplicata.

4.1.3 DENV-3

A última diluição na qual se observou placas de lise foi na 10^{-5} , como pode ser verificado na figura 3. Dessa forma foi possível, calculando o título, encontrar para este sorotipo 2×10^6 PFU/mL.

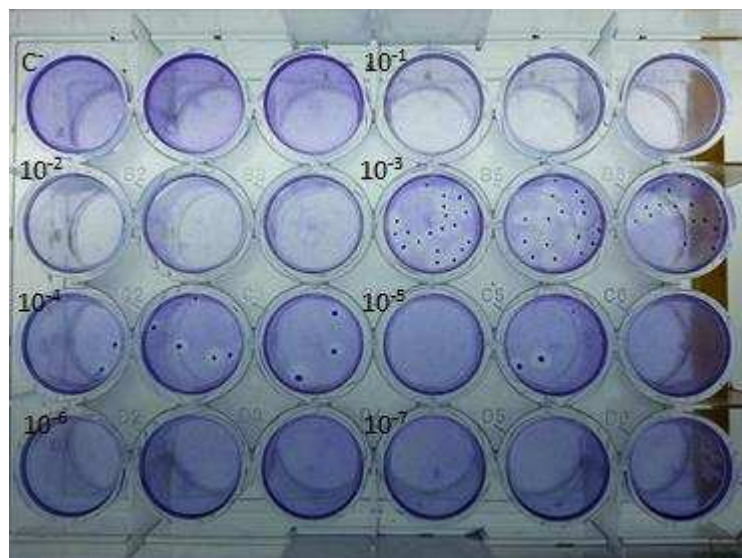


Figura 3 - Titulação do Vírus Dengue 3. Nos poços de C⁻ só foram incubadas células e nos demais poços há as diluições seriadas do vírus dengue 3 em triplicata.

4.1.4 DENV-4

A última diluição na qual se observou placas de lise foi na 10^{-4} , como pode ser verificado na figura 4. Dessa forma foi possível, calculando o título, encontrar para este sorotipo 1×10^5 PFU/mL.

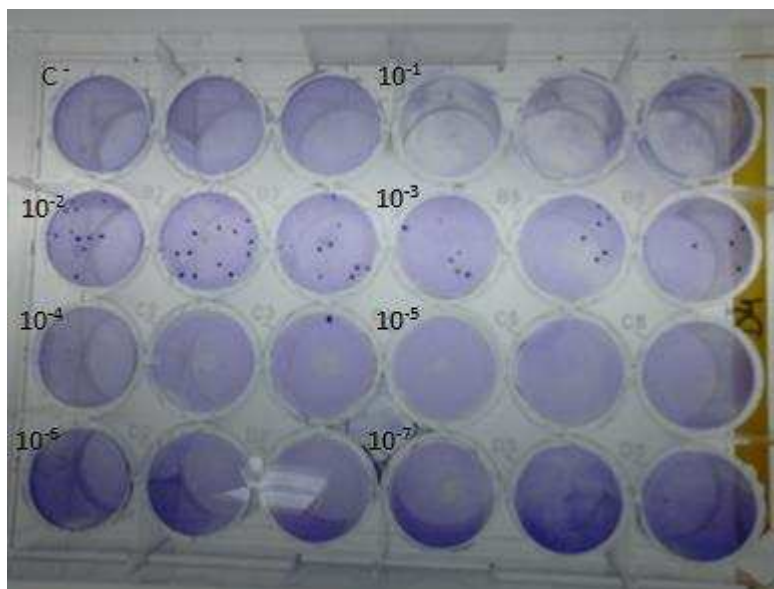


Figura 4 - Titulação do Vírus Dengue 4. Nos poços de C- só foram incubadas células e nos demais poços há as diluições seriadas do vírus dengue 4 em triplicata.

4.2 Citotoxicidade - Avaliação da Viabilidade Celular Através do Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazolium (MTT)

Conforme observado na figura 5, foi possível perceber que nas três maiores concentrações do peptídeo, este encontra-se tóxico para as células, uma vez que reduziu a viabilidade celular para menos de 50% quando comparado com a viabilidade celular do controle positivo do ensaio. As demais concentrações testadas não apresentam redução da viabilidade celular e podem ser utilizadas nos ensaios subsequentes de neutralização.

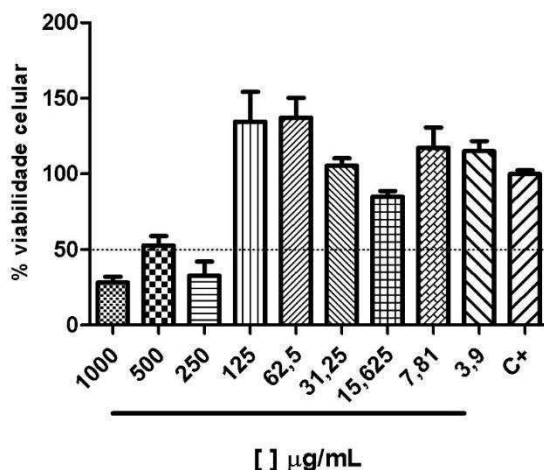


Figura 5 – Avaliação da Citotoxicidade do Peptídeo HS-1. Ensaio para avaliar se o composto é tóxico para a célula ou não. Nos poços de C⁺ só foram incubadas células. Nos demais poços há diluições seriadas do peptídeo HS-1.

Para o ensaio de citotoxicidade também foi necessário realizar um controle, um ensaio similar ao já apresentado, mas neste foram usadas diluições de uma solução estoque contendo 50% de DMSO, para mimetizar a solução usada na solubilização do peptídeo. Dessa forma foi possível verificar se de fato a alta concentração do peptídeo era tóxico para as células ou a toxicidade se dava pelo mesmo estar diluído em uma solução com DMSO.

Conforme observado na figura 6, podemos comprovar que a alta concentração de DMSO só afetou na viabilidade celular na primeira diluição e que de fato eram as altas concentrações do peptídeo que causavam a morte celular.

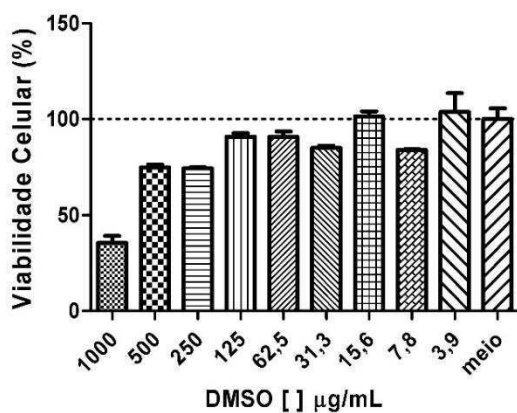


Figura 6 – Controle do Ensaio de Avaliação da Citotoxicidade do Peptídeo HS-1. Ensaio para avaliar se o DMSO usado na diluição do peptídeo é tóxico às células. Nos poços de 'meio' só há células. Nos demais poços há diluições seriadas da solução 50% DMSO, nas proporções que foram usadas para diluir o peptídeo.

4.3 Teste de Neutralização por Redução em Placa (PRNT)

4.3.1 Ensaio Virucida

4.3.1.1 DENV-1

A figura 7 nos mostra o resultado do ensaio antiviral para o sorotipo 1 do vírus da dengue. Esse resultado demonstra uma ligeira redução no número das placas de lise pelo controle do DMSO (controle encontra-se na concentração equivalente da maior concentração do peptídeo), mas essa redução se mostra de fato significativa quando observamos as diluições do peptídeo, pois a redução do número das placas de lise alcança 100% na maior concentração testada e permanece sem diferença significativa a esse resultado para as quatro diluições seguintes, reduzindo somente na última diluição, mesmo assim detectou-se uma redução considerável de 90%.

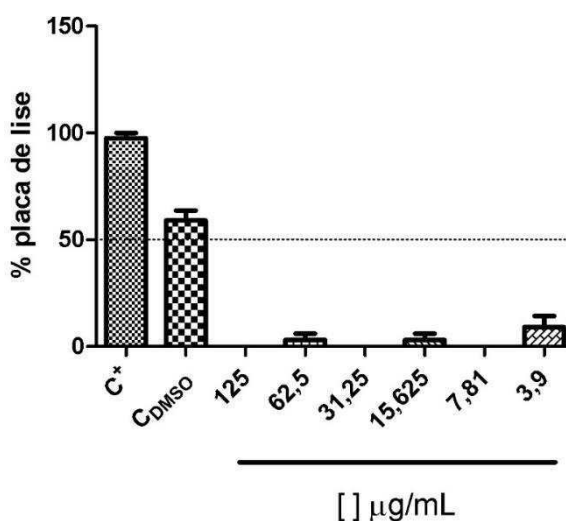


Figura 7 – Ensaio Virucida DENV-1. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 1 e a quantidade de lise foi considerada 100%, no C-DMSO o vírus foi incubado com o composto orgânico nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo incubado com o vírus DENV-1.

4.3.1.2 DENV-2

Nas figuras 8A e 8B foram demonstrados os resultados dos ensaios antivirais para o sorotipo 2 do vírus da dengue. Podemos observar na figura 8A, uma redução de aproximadamente 50% do número das placas de lise no controle com DMSO (controle encontra-se na concentração equivalente da maior

concentração do peptídeo), mas a redução torna-se maior quando observada as diluições do peptídeo, onde nas quatro maiores concentrações foram encontradas redução de 100%. Nas demais diluições do peptídeo houve pequenas oscilações na redução da lise, ficando esta redução entre 80-90%.

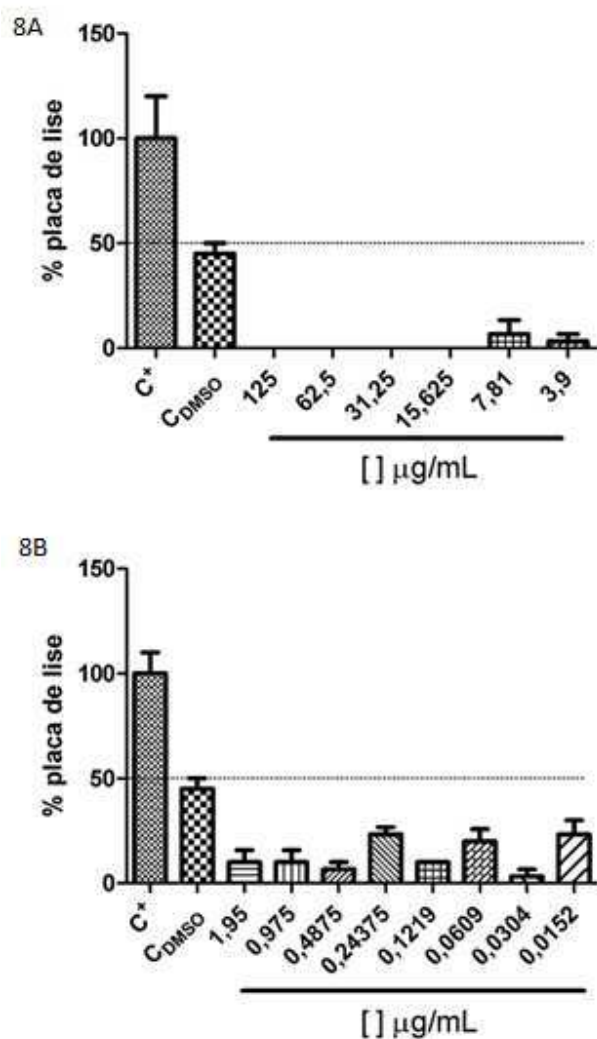


Figura 8 – Ensaio Virucida DENV-2. Nos C+ só há vírus Dengue do sorotipo 2 e a quantidade de lise foi considerada 100%, no CDMSO o vírus foi incubado com o composto orgânico nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo incubado com o vírus DENV-2.

Na figura 8B foi possível observar que mesmo aumentando ainda mais as diluições do peptídeo no ensaio virucida, ainda não foi possível encontrar uma concentração que tenha o poder de reduzir apenas 50% do número das placas de lise, pois em todas as diluições testadas essa redução foi maior que 50%. É importante observar que não há diferença significativa entre as diferentes

diluições do peptídeo e que a menor redução do número das placas de lise se dá em 75%.

4.3.1.3 DENV-3

Nas figuras 9A e 9B observamos os resultados dos ensaios antivirais para o sorotipo 3 do vírus da dengue. Na figura 9B foi possível observar que além da habitual redução do número das placas de lise ocorrido no controle com DMSO, quando analisamos as diluições do peptídeo percebe-se que de um modo geral a redução foi de 90-95% em todas as concentrações de peptídeo testadas, não havendo diferença estatística.

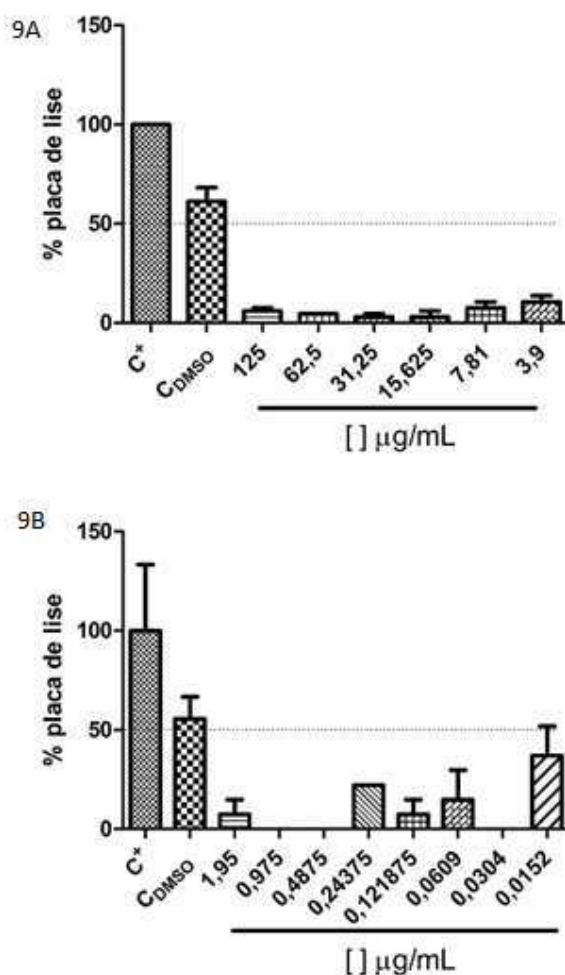


Figura 9 – Ensaio Virucida DENV-3. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 3 e a quantidade de lise foi considerada 100%, no C_{DMSO} o vírus foi incubado com o composto orgânico nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo incubado com o vírus DENV-3.

A figura 9B nos mostra as menores diluições de peptídeo testadas, que vão de 1,95 $\mu\text{g/mL}$ até 0,0152 $\mu\text{g/mL}$, e nela é possível observar uma concentração (0,0152 $\mu\text{g/mL}$) onde ocorre a redução do número de placas de lise mais próxima de 50% até agora observadas, redução essa que não difere significativamente do controle DMSO apresentado. As demais diluições do peptídeo da figura 9B também não diferem significativamente.

4.3.1.4 DENV-4

Na figura 10 observamos o resultado do ensaio antiviral para o sorotipo 4 do vírus da dengue. Foi possível perceber a redução de aproximadamente 100% do número das placas de lise nas quatro primeiras diluições do peptídeo, e nas últimas duas concentrações testadas, 7,81 e 3,9 $\mu\text{g/mL}$, a redução do número das placas de lise foi menor, 85%.

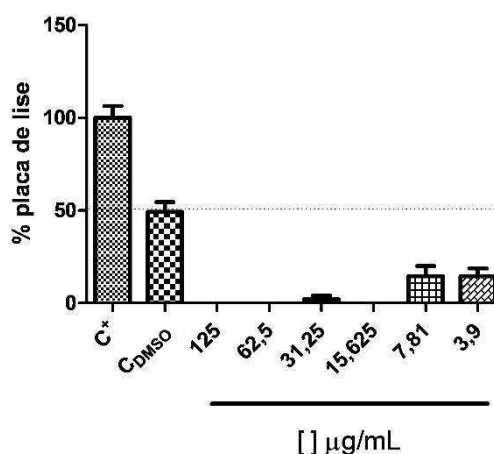


Figura 10 – Ensaio Virucida DENV-4. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 4 e a quantidade de lise foi considerada 100%, no C_{DMSO} o vírus foi incubado com o composto orgânico nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo incubado com o vírus DENV4.

4.3.2 Tratamento Pré-infecção

4.3.2.1 DENV-2

Nas figuras 11A e 11B observamos os resultados dos ensaios do tratamento pré-infecção para o sorotipo 2 do vírus da dengue. Na figura 11A, pode ser observado que para a maior concentração de peptídeo, há uma

redução próxima aos 50%, enquanto que para as demais concentrações não houve redução do número das placas de lise em quantidade considerável. Neste ensaio, o controle com DMSO não agiu sobre a redução do número das placas de lise.

Na figura 11B, foi possível observar que mesmo reduzindo as concentrações de peptídeo até 0,0152 $\mu\text{g/mL}$ para o ensaio do tratamento pré-infecção para o vírus dengue 2, manteve-se o mesmo padrão das menores concentrações da figura 11A e não houve redução do número das placas de lise. Vale destacar que todas as reduções do número das placas de lise nas concentrações de peptídeo testadas da figura 11B não diferem significativamente entre si.

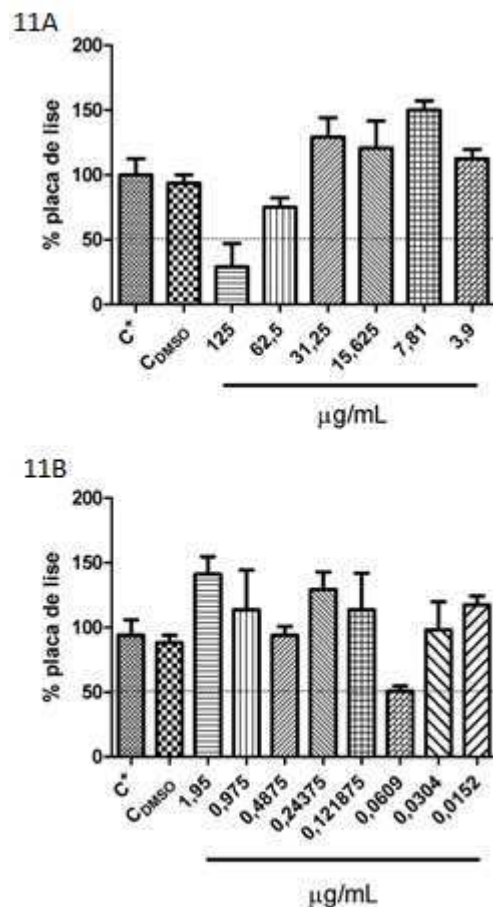


Figura 11 – Ensaio de Tratamento Pré-infecção do DENV-2. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 2 e a quantidade de lise foi considerada 100%, no C_{DMSO} o vírus foi incubado com o composto orgânico nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo incubado com a célula para verificar se confere proteção.

4.3.2.2 DENV-3

Nas figuras 12A e 12B observamos os resultados dos ensaios de pré tratamento para o sorotipo 3 do vírus da dengue. Foi possível observar, na figura 12A, que para este sorotipo não houve a redução próxima aos 50% na primeira diluição do peptídeo, como visualizado para o sorotipo anterior e que todas as reduções do número das placas de lise nas concentrações de peptídeo testadas da figura 12A não diferem significativamente entre si

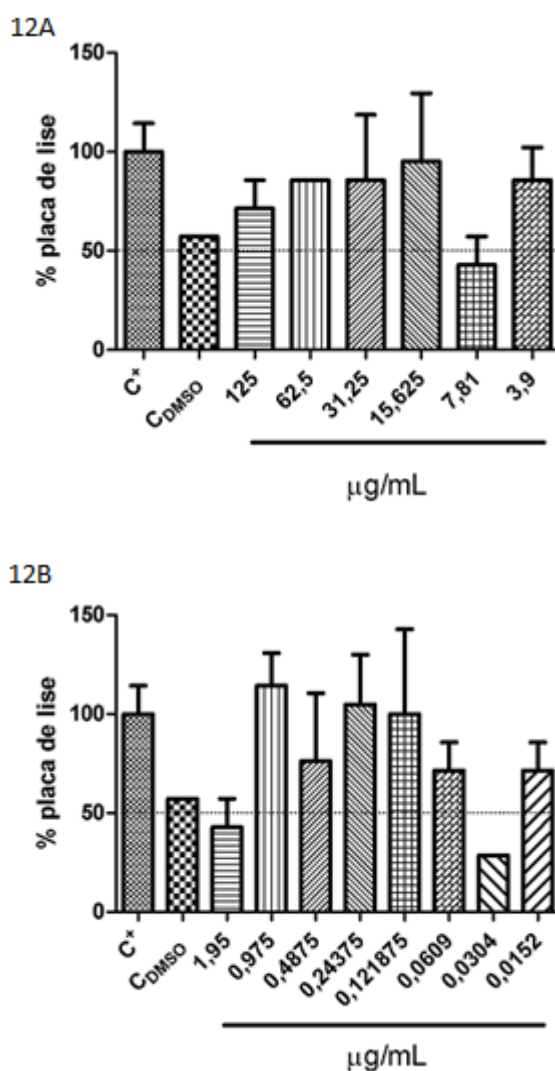


Figura 12 – Ensaio de Pré-Tratamento DENV-3, Menores Concentrações de Peptídeo. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 3 e a quantidade de lise foi considerada 100% para facilitar identificação da redução, no C_{DMSO} o vírus foi incubado com o composto orgânico nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo incubado com a célula para verificar se confere proteção.

Na figura 12B observamos o mesmo padrão de não redução das placas de lise e mais uma vez as reduções do número das placas de lise nas concentrações de peptídeo testadas da figura 12B não diferem significativamente entre si.

4.3.3 Tratamento Pós-infecção

4.3.3.1 DENV-2

Na figura 13 observamos os resultados do ensaio de tratamento pós-infecção para o sorotipo 2 do vírus da dengue. Foi possível perceber que o peptídeo em questão não possui influencia na replicação do vírus dengue 2, uma vez que não há redução considerável no número das placas de lise em nenhuma das concentrações de peptídeo mostradas. Não há diferença significativa entre nenhuma diluição estada em relação aos controles.

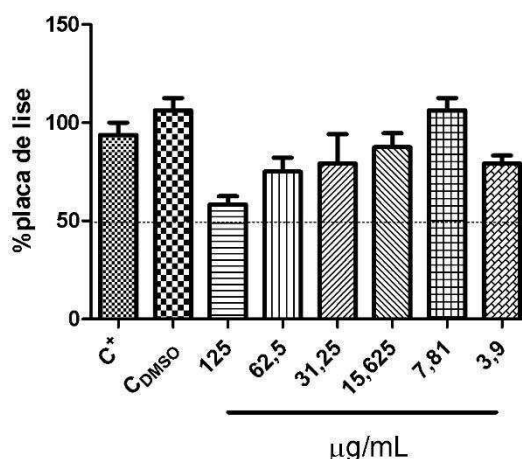


Figura 13 – Ensaio de Tratamento Pós-infecção DENV-2. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 2 e a quantidade de lise foi considerada 100%, no C_{DMSO} o composto orgânico foi adicionado ao poço após a infecção viral nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo adicionadas a célula após a infecção viral para verificar se inibe a replicação viral proteção.

4.3.3.2 DENV-3

Na figura 14 observamos os resultados do ensaio de tratamento pós-infecção para o sorotipo 3 do vírus da dengue. Foi possível obter a mesma conclusão do sorotipo 2, pois não houve redução do número das placas de lise

em nenhuma das concentrações de peptídeo testadas. Não há diferença significativa entre nenhuma diluição estada em relação aos controles.

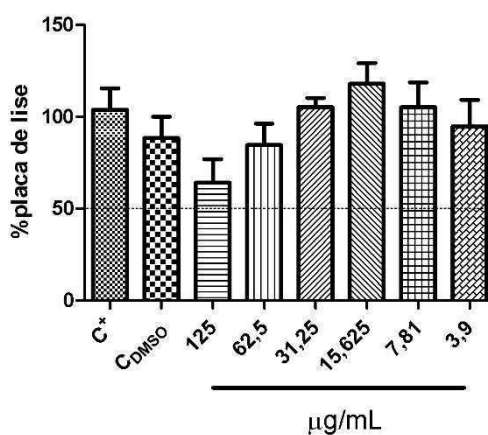


Figura 14 – Ensaio de Tratamento Pós-infecção DENV-3. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 3 e a quantidade de lise foi considerada 100%, no C-DMSO o composto orgânico foi adicionado ao poço após a infecção viral nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo adicionadas a célula após a infecção viral para verificar se inibe a replicação viral proteção.

4.3.4 Inibição da Adsorção Viral

4.3.4.1 DENV-2

Na figura 15 observamos os resultados do ensaio de inibição da adsorção viral para o sorotipo 2 do vírus da dengue. Foi possível observar que na maior concentração de peptídeo (125 µg/mL) a redução do número das placas de lise é 100%. Nas demais concentrações observa-se uma diminuição na redução do número das placas de lise, alcançando a taxa de 60% de redução na concentração de 7,81 µg/mL. Vale ressaltar que estatisticamente não há diferença entre os controles e as três maiores concentrações de peptídeo testadas também não diferem entre si.

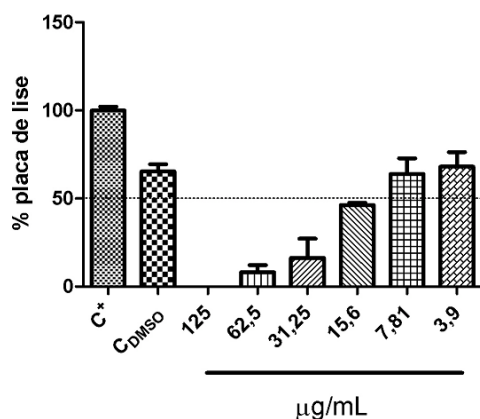


Figura 15 – Ensaio de Inibição da Adsorção Viral DENV-2. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 2 e a quantidade de lise foi considerada 100%, no C_{DMSO} o vírus foi incubado com o composto orgânico nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo incubado com o vírus Dengue 2 ao mesmo tempo com as células, a baixas temperaturas, para verificar se inibe a adsorção viral.

4.3.4.2 DENV-3

Nas figuras 16A e 16B observamos os resultados do ensaio de inibição da adsorção viral para o sorotipo 3 do vírus da dengue. Na figura 16A, foi possível observar que na maior concentração do peptídeo houve a redução de 100% do número das placas de lise e que novamente essa redução diminui à medida que as demais concentrações de peptídeo são observadas, atingindo uma redução de 50% na concentração de 7,81 µg/mL, mostrando um efeito na adsorção próximo entre os sorotipos.

Na figura 16B, observamos que quando diminuimos a concentração de peptídeo, o número de placas de lise passa a não sofrer redução, dando continuidade ao padrão encontrado nas concentrações da figura 16A, onde a medida que a concentração de peptídeo ia diminuindo, a redução das placas de lise deixava de ser tão efetiva. Não há diferença significativa entre as concentrações de peptídeo testadas e os controles.

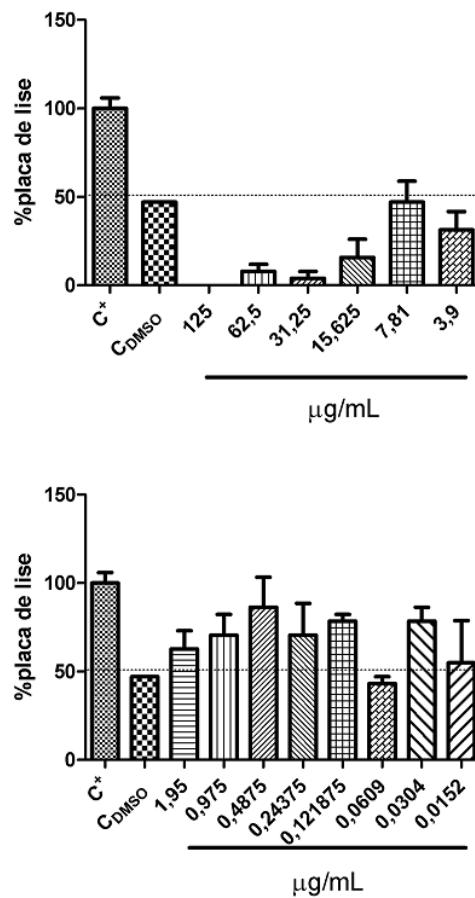


Figura 16 – Ensaio de Inibição da Adsorção Viral DENV-3. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 3 e a quantidade de lise foi considerada 100, no C-DMSO o vírus foi incubado com o composto orgânico nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo incubado com o vírus Dengue 3 ao mesmo tempo com as células, a baixas temperaturas, para verificar se inibe a adsorção viral

4.3.5 Inibição da Internalização Viral

4.3.5.1 DENV-2

Na figura 17 observamos os resultados do ensaio de inibição da internalização viral para o sorotipo 2 do vírus da dengue. Foi possível observar que na maior concentração de peptídeo testada (125 µg/mL) houve uma redução de 100% das placas de lise, redução esta que não difere estatisticamente da encontrada na concentração de 62,5 µg/mL. Na última concentração testada, a redução das placas de lise se aproxima dos 50% de redução.

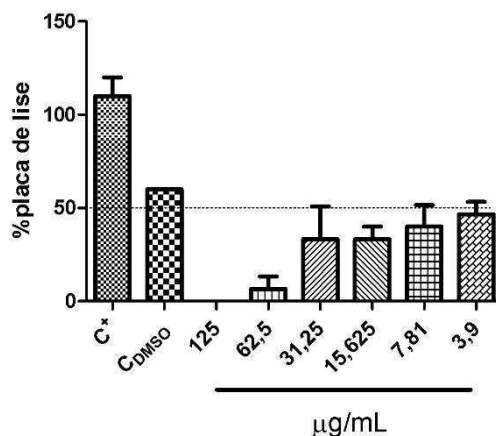


Figura 17 – Ensaio de Inibição da Internalização Viral DENV-2. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 2 e a quantidade de lise foi considerada 100%, no C-DMSO o vírus foi incubado com o composto orgânico nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo adicionadas a célula após a adsorção viral, sem internalização devido a baixas temperaturas, para analisar se inibe a internalização viral.

4.3.5.2 DENV-3

Na figura 18 observamos os resultados do ensaio de inibição da internalização viral para o sorotipo 3 do vírus da dengue. Houve uma redução do número das placas de lise considerável na maior concentração de peptídeo testada (89%), seguida pela concentração de 62,5 µg/mL (78%). Nas quatro demais concentrações de peptídeo testadas, não há diferença significativa entre os valores encontrados e ocorre a redução de aproximadamente 50% do número das placas de lise.

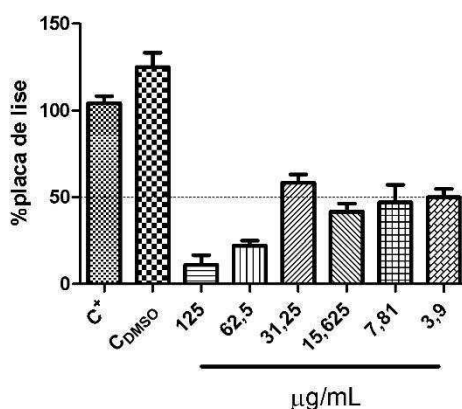


Figura 18 – Ensaio de Inibição da Internalização Viral DENV-3. Nos C⁺ só há vírus Dengue do sorotipo 3 e a quantidade de lise foi considerada 100%, no C-DMSO o vírus foi incubado com o composto orgânico nas mesmas condições do peptídeo e nas demais colunas são as diluições seriadas do peptídeo adicionadas a célula após a adsorção viral, sem internalização devido a baixas temperaturas, para analisar se inibe a internalização viral.

5. DISCUSSÃO

Muitos estudos mostram o uso de substâncias naturais e algumas sintéticas como promissores antivirais para o vírus da dengue, tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo*. (BENARROCH *et al.*, 2004; TEIXEIRA, *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2009;). Esses estudos ganham relevância cada vez maior, uma vez que não se tem nenhuma vacina clinicamente aprovada nem uma droga eficaz para o vírus da dengue, sendo esta uma doença que acomete uma porcentagem cada vez maior da população mundial subdesenvolvida a cada ano (WHO, 2015).

Os ensaios de citotoxicidade se fizeram necessários primeiramente para averiguar se o peptídeo em questão era tóxico para célula e em segundo lugar para avaliar em quais concentrações poderia realizar os ensaios subsequentes, uma vez que queríamos avaliar a lise celular devido à infecção viral e não a toxicidade peptídica. Ao concluir que o peptídeo era tóxico em concentrações maiores que 125µg/mL, usamos esta como concentração máxima nos ensaios de neutralização e a partir dela fizemos as diluições seriadas necessárias. Um análogo de nucleosídeo (2CMC), foi estudado para verificar seu potencial como inibidor da replicação do vírus DENV-2, para tanto ensaios de citotoxicidade prévios foram necessários para verificar se o composto era tóxico para as células utilizadas no experimento, Huh-7, mostrando não ser tóxico os testes subsequentes também foram realizados (LEE *et al.*, 2015).

Analisando os ensaios virucidas percebemos que o peptídeo HS-1 é um candidato promissor a antiviral contra o vírus da dengue, uma vez que reduziu 95-100% os quatro sorotipos do vírus na maior concentração do peptídeo testado (125µg/mL) e cerca de 50-75% dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 nas menores concentrações testadas (0,0152µg/mL). Isto implicaria inferir que o peptídeo em questão teria capacidade de agir diretamente sobre a partícula viral, desestruturando o envelope lipoprotéico do mesmo, e destruindo/impedindo a sua capacidade de infecção, já que um dos modos de ação dos peptídeos antimicrobianos são as formações de pequenos poros que podem atuar como canais “iônicos”, interagindo com fosfolipídios, dessa forma o envelope lipoprotéico perderia sua forma e função (BROGDEN, 2005).

Resultados similares foram descritos por MULLER *et al.* onde mostraram que tanto o veneno bruto quanto fosfolipases A₂ e crotoxinas isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* tinham ação virucida contra o sorotipo 2 da dengue e o vírus da febre amarela, com a inibição viral chegando a 100% quando usada uma concentração dos compostos igual a 100 ng/mL. Uma justificativa para esse ótimo resultado se dá pela ação direta das fosfolipases sobre o envelope viral, uma vez que este é constituído por uma bicamada lipídica (MULLER *et al.*, 2011).

Com os resultados do ensaio de pré-tratamento há uma redução menos expressiva na maior concentração do peptídeo para o vírus DENV-2 e não há redução significativa para nenhuma concentração para o vírus DENV-3, mostrando que o peptídeo não age tão intensamente sobre as células no sentido de proteção dos receptores celulares, da mesma forma que analisando os resultados do ensaio de pós-tratamento não há esta redução, mostrando não haver interferência após a infecção viral, ou seja, o peptídeo não tem poder de inibir as enzimas responsáveis pela replicação do vírus, ao contrário do citado em OLIVEIRA e colaboradores, em que drogas antivirais contra a Dengue vêm sendo desenvolvidas com a estratégia de se inibir enzimas, no caso as proteínas virais NS3 e NS5, responsáveis pela função de protease/helicase e polimerase, respectivamente, sendo altamente conservadas nos quatro sorotipos (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

PACCA em seus ensaios de pré-tratamento e pós-tratamento utilizando, como antivirais, derivados de thiosemicarbasones, para o vírus da febre amarela (YFV), também concluiu que a viabilidade celular é mantida nas células tratadas e infectadas com YFV quando comparada com as somente infectadas, demonstrando que o seu composto também não interfere nestas etapas, assim como o nosso peptídeo HS-1 (PACCA, 2013).

Nos ensaios de inibição da adsorção, percebemos que nas maiores concentrações de peptídeo há uma redução viral considerável (100-90%), tanto do vírus DENV-2 quanto do DENV-3 e essa redução vai diminuindo a medida que a concentração diminui. Já nos ensaios de inibição da internalização, para DENV-2 a redução permanece em 95-100% nas maiores concentrações de peptídeo enquanto que para DENV-3 essa redução alcança os 80-90%. MULLER encontrou para ensaios similares aos realizados neste trabalho, de inibição de adsorção do vírus DENV-2, que toxinas isoladas do veneno de

serpente *Crotallus durissus terrificus*, crotoxina e fosfolipase A₂, inibiu em 100% a lise, quando testado 100 ng/mL, no entanto quando comparada com uma fosfolipase sem atividade catalítica (BthTX-I) a inibição da adsorção cai para 79%. Já nos ensaios similares de inibição da internalização do vírus DENV-2 ela encontrou uma redução menor, 80-90%, comparada a mesma concentração de composto testado, e a inibição da fosfolipase BthTX-I cai para 64%, mostrando que a atividade catalítica da fosfolipase é importante, mas não o único responsável para a inibição da adsorção e internalização viral (MULLER, 2011).

MULLER também mostrou que o extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* teve capacidade de inibir 66-68% na adsorção do herpes vírus (HSV-1) da cepa KOS chegando a uma inibição de 97%, utilizando o extrato bruto, quando usada a cepa 29R (MULLER, 2006).

Analisando todos nossos resultados, podemos perceber então que o peptídeo HS-1 tem poder de reduzir placas de lise quando atua diretamente sobre a partícula viral, agindo como antiviral, e inibindo as fases iniciais da infecção viral, impedindo o vírus de adsorver e internalizar, mas nestas duas etapas só ocorre inibição considerável quando o peptídeo está nas maiores concentrações, ao contrário do ensaio virucida que mantém a redução das placas, em concentrações menores também.

Uma possível justificativa para a ação dos peptídeos nas maiores concentrações seria o fato que o peptídeo age desestruturando o envelope viral. Em ambos ensaios aqui citados, o peptídeo precisa estar em contato direto com o vírus para impedir sua adsorção e conseqüentemente sua internalização. Dessa forma nas maiores concentrações do peptídeo, ele consegue agir sobre a partícula viral e em concentrações baixas, como há mais vírus na superfície das células do que peptídeo suficiente para desestruturar os envelopes virais, não é possível a redução considerável. Quando o vírus já se encontra espalhado pela monocamada de células, o peptídeo não age tão facilmente do que quando está em contato direto sobre a partícula viral primeiramente e depois é adicionado à célula.

Essa teoria pode se consolidar pela presença de moléculas de heparano sulfato, carregados negativamente, na superfície celular, que auxiliam a ligação de partículas virais às células hospedeiras (BAHAR and REN, 2013). A carga +1 do peptídeo antimicrobiano HS-1 por sua vez previne a adsorção, e por

consequência a internalização, do vírus da dengue, uma vez que a carga positiva neutraliza as cargas negativas das moléculas de heparano sulfato. Quanto mais concentrado o peptídeo está, mais carga positiva líquida na superfície da célula e menos partículas virais aderidas e internalizadas.

Partindo da afirmação de que o envelope viral é constituído por membrana eucariótica e varia da célula hospedeira, os dados encontrados poderiam entrar em contradição uma vez que o peptídeo só tem poder de lise sobre a partícula viral e não ocorre o mesmo sobre a monocamada de células. Uma possível justificativa é que além da existência de mecanismos de reparo da célula eucariótica para estresse e mudança na sua estrutura de membrana, temos que as concentrações usadas de peptídeo neste experimento para avaliar a capacidade antiviral foram inferiores aquelas concentrações que causaram toxicidade e queda na viabilidade celular, ou seja, o princípio de desestruturação de membrana também pode ter ocorrido nas células VERO, mas em concentrações muito mais elevadas. Nas doses ditas eficazes para o combate da partícula viral, é seguro dizer que o peptídeo não afeta à célula e esta se mantém estável e só o vírus sofre ação antiviral.

Em todos os ensaios pode ser observado que o controle com DMSO houve uma redução na faixa de 50%, mas quando usada as diluições do peptídeo essa redução aumentava mais, alcançando, em alguns ensaios, 100%. Isso nos mostra que mesmo o DMSO agindo como intensificador, o peptídeo HS-1 tem sua função virucida, mesmo porque o composto orgânico em questão não é conhecido por influenciar na depleção de partículas virais e JAMES and CLEAVER mostraram que o uso do DMSO nos ensaios de placa aumentam o tamanho das placas de lise do vírus SV40, fazendo com que o ensaio tivesse de ser lido dias antes do habitual (JAMES and CLEAVER, 1974).

Com os resultados relevantes para os quatro sorotipos no ensaio virucida foi interessante avaliar o mecanismo pelo qual o peptídeo pode estar atuando sobre a partícula viral e perceber em qual momento ocorreu a desestruturação da mesma ou a interrupção da infecção viral, para que assim fosse possível associar todos os resultados e concluir o modo no qual o peptídeo atue sobre cada um dos vírus da dengue.

6. CONCLUSÕES

- O peptídeo HS-1 não é tóxico para as células VERO em concentrações igual ou inferior a 125 µg/mL;
- O peptídeo HS-1 mostrou-se um promissor candidato anti-dengue, devido ao excelente padrão de redução frente aos quatro sorotipos;
- Não houve redução do número de placa de lise significativa para os sorotipos 2 e 3 nos ensaios de pré e pós tratamento, mostrando que o peptídeo em questão não atua na proteção dos receptores celulares nem na replicação viral;
- O peptídeo HS-1 teve capacidade de inibir a adsorção do DENV-2 e DENV-3 em 100-90% quando testado em sua maior concentração (125µg/mL);
- A inibição da internalização manteve os padrões de redução e alcançou 100% para DENV-2 e 80% para DENV-3;
- Com os resultados obtidos foi possível concluir que o peptídeo atua diretamente sobre a partícula viral desestruturando o envelope do mesmo.

7. PERSPECTIVAS

Para conclusão do trabalho julga-se necessário fazer os ensaios de tratamento pré-infecção, tratamento pós-infecção, inibição da adsorção e inibição da internalização dos sorotipos 1 e 4, para que seja possível verificar o modo de ação do peptídeo HS-1 para os quatro sorotipos, uma vez que uma única droga eficaz para os quatro sorotipos da dengue seria de grande interesse comercial e social.

É de interesse também, para comprovar a desestruturação do envelope viral causada pelo peptídeo uma microscopia de força atômica, assim será possível visualização da estrutura viral antes, durante e depois da ação do peptídeo.

E para constatar a eficácia do antiviral será necessário um ensaio de neutralização *in vivo*, onde diferentes diluições do peptídeo serão previamente incubadas com o vírus da dengue, da mesma maneira que o ensaio virucida descrito neste trabalho, e inoculados intracerebralmente em camundongos neonatos e monitorados por 21 dias para avaliar a capacidade do antiviral de proteger *in vivo* a morbidade e mortalidade da doença causada nos animais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRA, D. and SIMMACO, M. (1995). "Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides". Trends Biotechnol, 13(6): 205-9.

BAHAR, A. A. and REN, D. (2013). "Antimicrobial peptides". Pharmaceuticals. 6: 1543-1575.

BENARROCH, D., EGLOFF, M., MULARD, L., GUERREIRO, C., ROMETTE, J. and CANARD, B. (2004) "A Structural Basis for the Inhibition of the NS5 Dengue Virus mRNA 2'-O-Methyltransferase Domain by Ribavirin 5'-Triphosphate." The Journal of Biological Chemistry, 279:35638-35643.

BOLLATI, M. *et al.* (2010) "Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design". Antiviral Research, 87: 125-148.

BROGDEN, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nat Rev Microbiol, 3(3): 238-50.

BULET, P., STOCKLIN, R. and MENIN, L. (2004). "Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates." Immunol Rev., 198: 169-84.

CONLON, J. M., KOLODZIEJEK, J. and NOWOTNY, N. (2004). "Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents." Biochim Biophys Acta, 1696(1): 1-14.

DATHE, M., NIKOLENKO, H., MEYER, J., BEYERMANN, M. and BIENERT, M. (2001). "Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge." FEBS Lett, 501(2-3): 146-50.

DE PAULA S. O. and FONSECA B. A. L. (2004). "Dengue: a review of the laboratory tests a clinican must know to achieve a correct diagnosis." The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 8(6): 390-398.

GANZ, T. and LEHRER, R. I. (1998). "Antimicrobial peptides of vertebrates." *Curr Opin Immunol*, 10(1): 41-4.

HALSTEAD, S. B. (2007) "Dengue." *The Lancet*, 370:1644-1652.

HANCOCK, R. E. and LEHRER, R. (1998). "Cationic peptides: a new source of antibiotics." *Trends Biotechnol*, 16(2): 82-8.

HENCHAL, E.A. and PUTNAK, J.R. (1990). "The dengue viruses." *Clin. Microbiol. Rev.*, 3(4):376-396.

HUANG J., et al. (2002). "Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test." *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (5): 1840-1844.

INNIS, B.L. (1995) "Dengue and dengue hemorrhagic fever." In JS Porterfield, edition: *Exotic Viral Infections*, Chapman & Hall, London, United Kingdom, 103-146.

JAMES and CLEAVER (1974). "Plaque Formation with Simian Virus 40: Enhancement by Dimethyl Sulfoxide" *Journal of Virology*, 14(6): 1607-1610.

KRAGOL, G., LOVAS, S., VARADI, G., CONDIE, B. A., HOFFMANN, R. and OTVOS, L., JR. (2001). "The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding." *Biochemistry*, 40(10): 3016-26.

LEE, J-C., TSENG, C-K., WU, Y-H., KAUSHIK-BASU, N., LIN, C-K., CHEN, W-C. and WU, H-N. (2015). "Characterization of the activity of 2'-C-methylcytidine against dengue virus replication." *Antiviral Research*, 116: 1-9.

LORIN, C. and SAIDI, H. (2005). "The antimicrobial peptide Dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro." *Virology*, 334: 264-276.

MATSUZAKI, K. (1998). "Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides." *Biochim Biophys Acta*, 1376(3): 391-400.

MOHAN, K. V. K. (2010) "Antiviral activity of selected antimicrobial peptides against vaccinia virus." *Antiviral Reserch*, 86: 306-311.

MULLER, V. D. M. Triagem antiviral de extratos vegetais: Fracionamento biomonitorado de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate). 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006

MULLER, V. D. M. Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela. 2011. 86 f. Tese (Doutorado em Biociências aplicada à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

MULLER, V. D. M., RUSSO, R. R., CINTRA, A. D. C., SARTIM, M. A., ALVES-PAIVA, R. M., FIGUEIREDO, L. T. M, SAMPAIO, S. V. and AQUINO, V. H. (2011) "Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses." *Toxicon*, 30: 1-9.

NACIF-MARÇAL, L., PEREIRA, G. R., ABRANCHES, M. V., COSTA, N. C. S., CARDOSO, S. A., HONDA, E. R., DE PAULA, S. O., FEIO, R. N. and OLIVEIRA, L. L. (2015). "Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae)." *Toxicon*, 99: 16-22.

NASCIMENTO, A. C., FONTES, W., SEBBEN, A. and CASTRO, M. S. (2003). "Antimicrobial peptides from anurans skin secretions." *Protein Pept Lett*, 10(3): 227-38.

NOBLE, G. C. and SHI, P. Y. (2012) "Structural biology of dengue virus enzymes: Towards rational design of therapeutics." *Antiviral Research*, 96(2): 115-126.

OLIVEIRA, A. S., SILVA, M. L., OLIVEIRA, A. F. C. S, SILVA, C. C., TEIXEIRA, R. R. and DE PAULA, S. O. (2014). "NS3 and NS5 Proteins: Important Targets for Anti-Dengue Drug Design." *J. Braz. Chem. Soc.*, 25: 1759-1769.

PACCA, C. C. Busca de compostos com potencial atividade antiviral contra os virus da febre amarela e encefalite de saint Louis. 2013. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina e Ciências Correlatas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto. 2013.

PARIKESIT, A. A., KINANTY, K. and TAMBUNAN, U. S. (2013) "Screening of commercial cyclic peptides as inhibitor envelope protein dengue virus (DENV) through molecular docking and molecular dynamics." *Pak. Journal Biological Sciences*, 16(24): 1836-1848.

REDDY, K. V., YEDERY, R. D. and ARANHA, C. (2004). "Antimicrobial peptides: premises and promises." *Int J Antimicrob Agents*, 24(6): 536-47.

RINALDI, A. C. (2002). "Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario." *Curr Opin Chem Biol*, 6(6): 799-804.

ROTHAN, H. A., BAHRANI, H., RAHMAN, N. A. and YUSOF, R. (2014) "Identification of natural antimicrobial agents to treat dengue infection: In vitro analysis of laticin peptide activity against dengue virus." *MBC Microbiology*, 14:140.

ROTHAN, H. A., HAN, H. C., RAMASAMY, T. S., OTHMAN, S., RAHMAN, N. A. and YOSOF, R. (2012) "Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1" *MBC Infectious Diseases*, 12:314.

PUCCIONI-SOHLER, M., ROSADAS, C. and CABRAL-CASTRO, M. J. (2013) "Neurological complications in dengue infection: a review for clinical practice." *Arq Neuropsiquiatr*, 71(9-B): 667-671.

SCHRODER, J. M. (1999). "Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements." *Cell Mol Life Sci*, 56(1-2): 32-46.

TAMBUNAN, U.S., ZAHROH, H., UTOMO, B.B., PARIKESIT, A.A. (2014) "Screening of commercial cyclic peptide as inhibitor NS5 methyltransferase of Dengue virus through Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation." *Bioinformation*, 10(1): 23-27.

TAKEDA, A. and ENNIS, F.A. (1990) "FcR-mediated enhancement of HIV-1 infection by antibody. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 6: 999-1004.

TEIXEIRA, R. R., PEREIRA, W. L., OLIVEIRA, A. F. C. S., SILVA, A. M., OLIVEIRA, A. S., SILVA, M. L., SILVA, C. C. and DE PAULA, S. O. (2014) "Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals" *Molecules*, 19: 8151-8176.

WHO (2015) "Dengue" and "Dengue and severe dengue." World Health Organization. Geneva, Switzerland.

ZAIYOU, M. (2007). "Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases." *J. Mol. Med*, 85: 317–329.

ZHANG, X. G. (2009). "Antiviral activity of geneticin against dengue virus." *Antiviral Reserch*. 83: 21-27.