



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

LIANA COSTA PEREIRA VILAS BOAS

Peptídeos derivados de mastoparano L como inibidores da replicação do
alfaherpesvírus humano 1

Brasília

2023

LIANA COSTA PEREIRA VILAS BOAS

**PEPTÍDEOS DERIVADOS DE MASTOPARANO L COMO INIBIDORES DA
REPLICAÇÃO DO ALFAHERPESVÍRUS HUMANO 1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco

**Brasília
2023**

LIANA COSTA PEREIRA VILAS BOAS
PEPTÍDEOS DERIVADOS DE MASTOPARANO L COMO INIBIDORES DA
REPLICAÇÃO DO ALFAHERPESVÍRUS HUMANO 1

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de doutora em Patologia Molecular.

Aprovada em ____/____/2023.

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Octavio Luiz Franco
(Universidade de Brasília – Brasília/DF)
ORIENTADOR

Professor Doutora Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola
(Universidade de Brasília – Brasília/DF)
EXAMINADOR

Professora Doutor Pedro Filho Noronha de Souza
(Universidade Federal do Ceará – UFC)
EXAMINADORA

Professor Doutor Marlon Henrique Cardoso
(Universidade Católica Dom Bosco)
EXAMINADOR

Doutor Nelson Gomes Júnior
(Universidade Católica de Brasília)
SUPLENTE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus Pai, Filho e Espírito Santo, por me guiar, iluminar e me segurar em momentos de desespero e agonia. Por não me deixar desistir!

Aos meus pais, que foram/são meus primeiros professores e que me permitiram seguir meus sonhos. Eu tenho muito orgulho da trajetória de vocês e valorizo cada sacrifício que os trouxeram até os dias de hoje. Amo vocês!

Ao meu marido Ramon, que teve (às vezes não) a paciência de ouvir minhas reclamações e sofreu junto comigo nesses anos de doutorado. Que me amparou, sorriu comigo, chorou comigo, que se importava mais com as minhas frustrações do que eu mesma. Obrigada por ainda estar aqui. Aos meus filhos, Isaac e Yuri, por me ensinarem tanto, pelos sorrisos em meio ao furacão, pelo amadurecimento, por serem tão diferentes um do outro. Vocês são a razão de toda a minha luta!

Aos meus amigos de caminhada acadêmica. Maianne e Rhayfa que compartilharam comigo a paixão pelos vírus e diversos momentos divertidos dentro e fora do laboratório da virologia. Thuanny, que revezou os momentos de choro e felicidade comigo. Belzinha, que felicidade conhece-la, já lhe disse isso e numa me cansarei, deveria ter me tornado sua amiga antes. Mari, sua tranquilidade e orientação foram indispensáveis para que eu continuasse, principalmente nos últimos dias. Aos demais colegas, Michel, Letícia, Kamila, Stephan, Vitor, Samuel, Talita, Nadyelle, Nelson, Gabriel, Camilinha, Maria Eduarda, Brisa, Raquel, Maycon, Lara, muito obrigada do fundo do meu coração, por tornarem os dias mais leves com tantas risadas. Desejo muito sucesso para todos vocês!

Por fim, minha mais profunda admiração pela profa Lídia, que em diversos momentos me animou e sempre me incentivou a buscar cada vez mais conhecimento. A senhora é luz por todo lugar que passa.

Ao prof., Octávio, por todos esses anos de confiança e dedicação à minha formação acadêmica!

RESUMO

Referência: VILAS BOAS, Liana Costa Pereira. **Peptídeos derivados de mastoparano I como inibidores da replicação do alfa herpesvírus humano 1**. 2023. 89f. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, 2023.

O alfa herpesvírus humano 1 (HHV-1) tem sido considerado como uma infecção viral sexualmente transmissível e representa um problema de saúde global. Apesar de ser um vírus conhecido e possuir protocolo de tratamento, a infecção ainda é incurável, e o surgimento de resistência viral é um fator preocupante, especialmente para pacientes imunocomprometidos. Por esta razão, vários estudos têm demonstrado o potencial dos peptídeos antimicrobianos derivados do veneno de artrópodes, como os peptídeos da família dos mastoparanos, derivado do veneno de *Vespula lewisii* que já mostraram atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral. Dessa forma, a partir de desenho racional, dois peptídeos foram criados a partir do mastoparano L, sendo o [I⁵, R⁸] mastoparano e o mastoparano-MO. O objetivo deste trabalho consistiu em determinar se o mastoparano sintético derivado do mastoparano L possuiam potencial antiviral. Inicialmente, para o peptídeo [I⁵, R⁸] mast foi realizado um estudo da sua estrutura, e as análises de CD e RMN revelaram que este peptídeo forma uma α -hélice em SDS₂₅. Por conseguinte, em ensaios *in vitro*, os mastoparanos testados apresentaram baixa citotoxicidade contra células Vero e até 90% de inibição do alfa herpesvírus 1 pelos ensaios de plaque, na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Além disso, foi possível inferir que o [I⁵, R⁸] mast inibe a replicação viral de forma dose-dependente, possui atividade virucida e interfere em etapas iniciais da infecção causando até 99% de inibição. Já o mast-MO demonstrou inibição acima de 90% apenas na concentração 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, e foi capaz de inibir a etapa de penetração viral, atingindo até 99% de inibição. Ademais, ensaios com sondas fluorescentes demonstraram que o peptídeo [I⁵, R⁸] masto não interfere na fluidez de modelos de membranas, mas foram insuficientes para determinar completamente se este peptídeo interage ou não com membranas. Para tanto, os resultados obtidos demonstram os mastoparanos testados apresentam potencial para uso como medicamentos antivirais.

Palavras chave: Peptídeos antivirais, alfa herpesvírus, mastoparano, antiviral.

ABSTRACT

The human alphaherpesvirus 1 (HHV-1) is a sexually transmitted viral infection and presents a global health concern. Despite being a well-known virus with established treatment protocols, the infection remains incurable, and the emergence of viral resistance is a worrisome factor, especially for immunocompromised patients. For this reason, several studies have demonstrated the potential of antimicrobial peptides derived from arthropod venom, such as mastoparan peptides derived from *Vespula lewisii* venom. These peptides have exhibited antibacterial, antifungal, and antiviral activities. Using bioinformatics tools, two peptides were designed based on mastoparan L, namely [I⁵, R⁸] mastoparan and mastoparan-MO. This study aimed to determine the antiviral potential of synthetic mastoparans derived from mastoparan L. Initially, a CD and NMR analysis revealed that [I⁵, R⁸] mastoparan peptide adopts an α -helix structure in SDS₂₅. Subsequently, *in vitro* assays demonstrated that the tested mastoparans exhibited low cytotoxicity against Vero cells and up to 90% inhibition of HHV-1 through plaque assays at a concentration of 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Furthermore, [I⁵, R⁸] mastoparan inhibits viral replication in a dose-dependent manner, possesses virucidal activity, and interferes with early infection stages, resulting in up to 99% inhibition. On the other hand, mastoparan-MO exhibited inhibition above 90% only at a concentration of 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Subsequent mechanism assays revealed that the peptide could inhibit the viral penetration step, achieving up to 99% inhibition. Additionally, experiments using fluorescent probes demonstrated that [I⁵, R⁸] mastoparan does not significantly impact membrane fluidity in model membranes. However, these experiments were insufficient to determine whether this peptide interacts with membranes. Overall, the obtained results indicate that the tested mastoparans may be antiviral medications.

Keywords: Antiviral peptides, alphaherpesvirus, mastoparan, antiviral

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Partícula viral do alfa herpesvírus representada com todas suas estruturas e ácido nucleico. O DNA linear fita dupla é protegido por um capsídeo icosaédrico. O tegumento é formado por muitas proteínas virais que permanecem em volta do capsídeo e o conectam com o envelope, onde pode-se encontrar as glicoproteínas virais.

Figura 2 - Esquema do ciclo replicativo do HHV-1.

Figura 3 - Possíveis alvos de peptídeos antivirais. As estruturas descritas representam os peptídeos cujo mecanismo de ação já é conhecido. A maioria dos relatos indicam que os AVPs possuem atividade virucida, já outros autores mostraram que alguns peptídeos podem inibir a replicação do genoma viral diretamente.

Figura 4 – Peptídeos derivados do mastoparano-L criados a partir de desenho racional. Os peptídeos mastopano-L e mastoparano MO já possuem a sua estrutura resolvida por RMN. Um estudo de modelagem molecular foi realizado com o [I⁵, R⁸] mastoparano para inferir a sua possível estrutura secundária

Lista de Abreviaturas

ACV – Aciclovir

AVPs – *Antiviral peptides*

CBV-2 – Coxsackievírus B2

CC₅₀ – Concentração citotóxica em que 50% das células estão viáveis

CC₂₀ – Concentração citotóxica em que 80% das células estão viáveis

CE₅₀ – Concentração de substância capaz de inibir 50% da replicação viral

CPPs – *cell penetrating peptides*

CMV – Citomegalovírus

CMNT – Concentração máxima não tóxica

CO₂ – Dióxido de Carbono

Covid-19 – *Coronavirus disease 2019*

DC – Dicroísmo circular

DENV – Vírus da Dengue

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPOC - Dioleoilfosfatidilcolina

ELISA – Ensaio imunoenzimático

FCV – Famciclovir

g – Grama

GCV – Ganciclovir

h - Horas

HBV – Vírus da Hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C

HHV-1 – Alfa herpesvírus humano 1

HHV-2 – Alfa herpesvírus humano 2

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IS – Índice de seletividade

Min - Minutos

mg – Miligrama

mL – Mililitro

MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

nm – Nanômetro
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCV – Penciclovir
PI – Percentagem de inibição
PBS – Tampão fosfato salino
pH – Potencial hidrogeniônico
RMN – Ressonância magnética nuclear
RNA – Ácido ribonucleico
SARS-Cov-2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus 2
SFB – Soro fetal bovino
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Humana
Tk – Timidina quinase
TFE - Trifluoretanol
VCV - Valaciclovir
VSR – Vírus sincicial respiratório
VEV – Vírus da estomatite vesicular
VZV - Vírus varicela zoster
WNV – Vírus do oeste do Nilo
 μg – Microgramas
 μL - Microlitros
 μM - Micromolar

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Peptídeos com propriedades antivirais contra herpesvírus descritos na literatura

Tabela 2 – Peptídeos derivados de artrópodes com propriedades antivirais

Tabela 3 - Sequências de resíduos de aminoácidos dos mastoparanos L, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] mastoparano.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 ALFAHERPESVÍRUS HUMANO 1.....	13
1.2 TERAPIAS ANTIVIRAIS CLÁSSICAS.....	17
1.3 PEPTÍDEOS ANTIVIRAIS - avps.....	19
1.3.1 Peptídeos antivirais de veneno de artrópodes	24
1.3.2 Mastoparanos.....	25
1.3.3 [I ⁵ R ⁸] Mastoparano	27
1.3.4 Mastoparano MO.....	28
1.4 OBJETIVOS	30
1.4.1 Objetivos gerais.....	30
1.4.2 Objetivos específicos	30
2. ARTIGO.....	32
1. BACKGROUND	34
2. METHODS.....	37
3. RESULTS	44
4. DISCUSSION	47
5. Conclusions	50
6. REFERENCES	51
3. DISCUSSÃO.....	66
4. CONCLUSÃO	75
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

As doenças virais têm sido relatadas desde os tempos antigos (FENNER, 1989). Nos últimos 20 anos, diversos surtos e epidemias virais renovaram a preocupação e corrida por novas terapias (GROAZ et al, 2020). Estima-se que a epidemia de vírus influenza H1N1 (2009) vitimou aproximadamente 200 mil pessoas entre 2009/2010, além de ainda o vírus circular sazonalmente (HUI; LEE; CHAN, 2017); já entre 2014/2015, o vírus Zika, antes endêmico em lugares mais isolados, foi responsável pelo surto de bebês nascidos com microcefalia no Brasil (LOWE et al., 2018; SOUZA et al., 2018). Ademais, a epidemia de vírus Ebola (2013-2016) que se iniciou no oeste africano, espalhou-se mundialmente devido a profissionais de saúde infectados, e levou a OMS a declarar uma emergência sanitária internacional (SUIJKERBUIJK et al., 2017); por fim, a recente pandemia de Covid-19 causada pelo SARS-CoV-2, que até 01 de agosto de 2023 infectou um pouco mais de 690 milhões de pessoas no mundo e matou mais de 6 milhões de vidas (*COVID Live - Coronavirus Statistics - Worldometer* (worldometers.info)). Portanto, ainda que a humanidade tenha atingido grandes avanços no controle de transmissão viral, por meio de medidas profiláticas como as vacinas; e terapêuticas, como o avanço nos medicamentos antivirais, os vírus continuam sendo uma das principais causas de doenças humanas (MAHMOUD, 2016).

Entretanto, tais medidas profiláticas e terapêuticas não atingem todas as famílias de vírus conhecidos por causarem doenças em humanos, principalmente, vírus emergentes como os arbovírus e coronavírus (CUI; LI; SHI, 2019; PRUIJSSERS; DENISON, 2019). Além disso, o crescente movimento anti-vacina e os relatos de resistência viral aos antivirais já estabelecidos, tem respectivamente, atrapalhado a meta de erradicação de certas doenças como as causadas por sarampo e poliomielite, e interferido na qualidade de vida de pacientes crônicos e imunossuprimidos (DUBÉ; VIVION; MACDONALD, 2015; ROSSETTI et al., 2018).

Por esta razão, a descrição de novos antivirais apresenta-se como fator importante, tanto para o controle de doenças virais emergentes, quanto para o combate às causadas por vírus conhecidos. Alguns microrganismos estabelecem o processo de latência, em que o genoma viral permanece

dormente no interior das células hospedeiras, podendo reativar os sintomas da doença (TRONSTEIN et al., 2011). Dentre alguns dos vírus que causam infecção latente estão o vírus da imunodeficiência humana (HIV); o vírus da hepatite B (HBV); e os herpesvírus (THELLMAN; TRIEZENBERG, 2017).

1.1 ALFAHERPESVÍRUS HUMANO 1

Considerados como infecções virais sexualmente transmissíveis, os alfaherpesvírus humanos 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2) representam um problema de saúde global. Atualmente, mais de 3,7 bilhões de pessoas abaixo dos 50 anos de idade (67% da população) são infectadas com HHV-1 (LOOKER et al., 2015a) e 500 milhões, entre 17 e 49 anos de idade sofrem com a infecção causada pelo HHV-2 (BAGCCHI, 2016; LOOKER et al., 2015b).

Os herpesvírus humanos pertencem à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus*, apresentando tropismo por neurônios do sistema nervoso periférico, onde são estabelecidas as infecções latentes, ou seja, o DNA viral permanece no núcleo celular na forma de um epissoma circular por longos períodos, e eventualmente reativam a infecção aguda, caracterizando manifestações clínicas recorrentes (GATHERER et al., 2021). Tais infecções podem envolver acometimentos orofaciais, genitais e até encefálicos, sendo que as lesões provocadas pela infecção na área genital também aumentam a susceptibilidade a outras infecções pelas vias sexuais, principalmente pelo HIV (DE OLIVEIRA et al., 2013; MELCHJORSEN, 2012).

O HHV-1 e 2 apresentam um genoma composto de DNA de fita dupla com 150 a 152 kpb, sendo o capsídeo icosaédrico (Figura 1). Entre o capsídeo e o envelope, há uma camada amorfa de proteínas chamada de tegumento que abriga importantes proteínas para a regulação da replicação viral, entre elas a VP16, que ativa os genes alfa e a VHS (*virion host shut-off*), que interrompe a síntese de macromoléculas da célula hospedeira. O envelope, que pode ser adquirido da membrana nuclear ou de alguma vesícula, possui uma bicamada lipídica com aproximadamente 11 glicoproteínas virais, além de poliaminas inseridas na superfície (KARASNEH; SHUKLA, 2011).

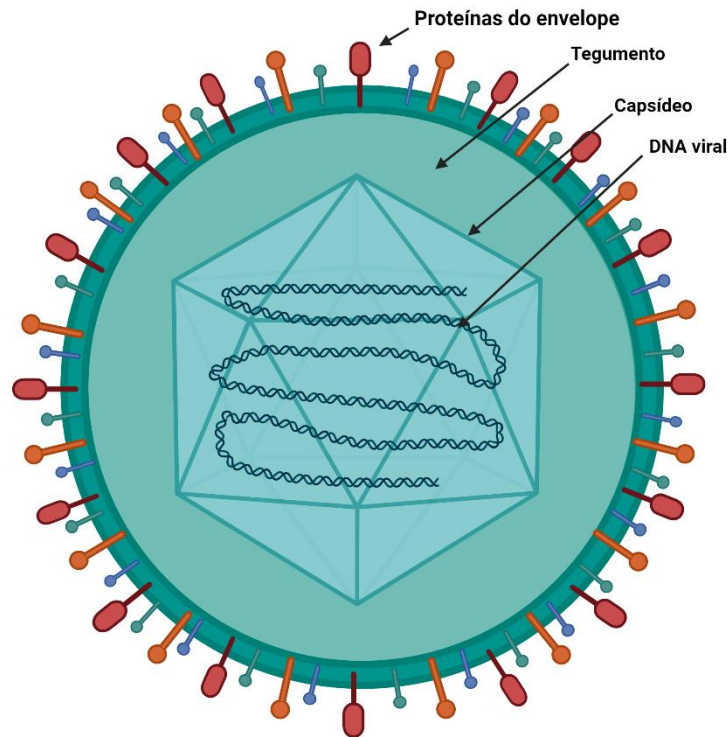


Figura 1 – Partícula viral do alfa herpesvírus representada com todas suas estruturas e ácido nucleico. O DNA linear fita dupla é protegido por um capsídeo icosaédrico. O tegumento é formado por muitas proteínas virais que permanecem em volta do capsídeo e o conectam com o envelope, onde pode-se encontrar as glicoproteínas virais. (Criado com BioRender.com)

Esses vírus, quando infectam células permissivas, promovem um ciclo replicativo que pode durar de 18 a 20 horas (Figura 2). O processo de adsorção/penetração viral é mediado por cinco glicoproteínas principais, sendo estas gB, gC, gD, gH, e gL. Inicia-se quando a gC e/ou gB se ligam ao receptor de sulfato de heparano, uma glicosaminoglicana celular. Tal ligação é lábil, sendo necessário que gD se ligue a outro receptor celular, podendo ser nectina 1 ou 2, ou sulfato de heparano 3-OS (LI et al., 2014). Por conseguinte, ocorre uma mudança de conformação deste complexo protéico que possibilita a interação com o heterodímero gH/gL. Em seguida, o domínio de fusão de gB e do heterodímero são expostos o que leva a fusão/penetração do envelope com a membrana plasmática da célula-alvo. Após esse processo, o nucleocapsídeo pode ser transportado via microtúbulos até a membrana nuclear onde o DNA viral e a VP16 são liberados dentro do núcleo. A proteína VHS permanece no

citoplasma mediando a degradação de RNAm celulares e parando a síntese de proteínas celulares (VAN LINT; KNIPE, 2009).

No núcleo, o DNA viral pode ser rapidamente transformado em um genoma circular que servirá tanto de molde para novas fitas quanto para transcrição de RNAm virais. Essa transcrição acontece de forma sequencial e ordenada, dividida em três categorias: fase imediatamente inicial (IE – *immediate early*; α), fase inicial (E - *early*; β), e fase tardia (L- *late*; γ). Primeiramente, a transcrição dos genes imediatamente iniciais vai garantir a ordem correta da expressão dos genes subsequentes e também a evasão de mecanismos celulares contra infecção. Já os genes da fase inicial são, basicamente, aqueles envolvidos na replicação do DNA viral, e por último, os genes de fase tardia codificam, em sua maioria, proteínas estruturais. Estas vão possibilitar a formação de novos capsídeos ainda dentro do núcleo, que posteriormente vão receber novas fitas de DNA viral (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Por fim, a fase de envelopamento ainda não é bem conhecida, mas a hipótese mais aceita considera que os núcleocapsídeos formados sofrem um primeiro envelopamento na membrana interna nuclear e saem do núcleo por meio de vesículas formadas pela membrana externa nuclear. Dessa forma, tais vesículas interagem com outras membranas, principalmente do complexo de Golgi, o que resulta na maturação das glicoproteínas virais. O vírus maduro seria então liberado no espaço extracelular depois da fusão da vesícula nuclear com a membrana plasmática (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

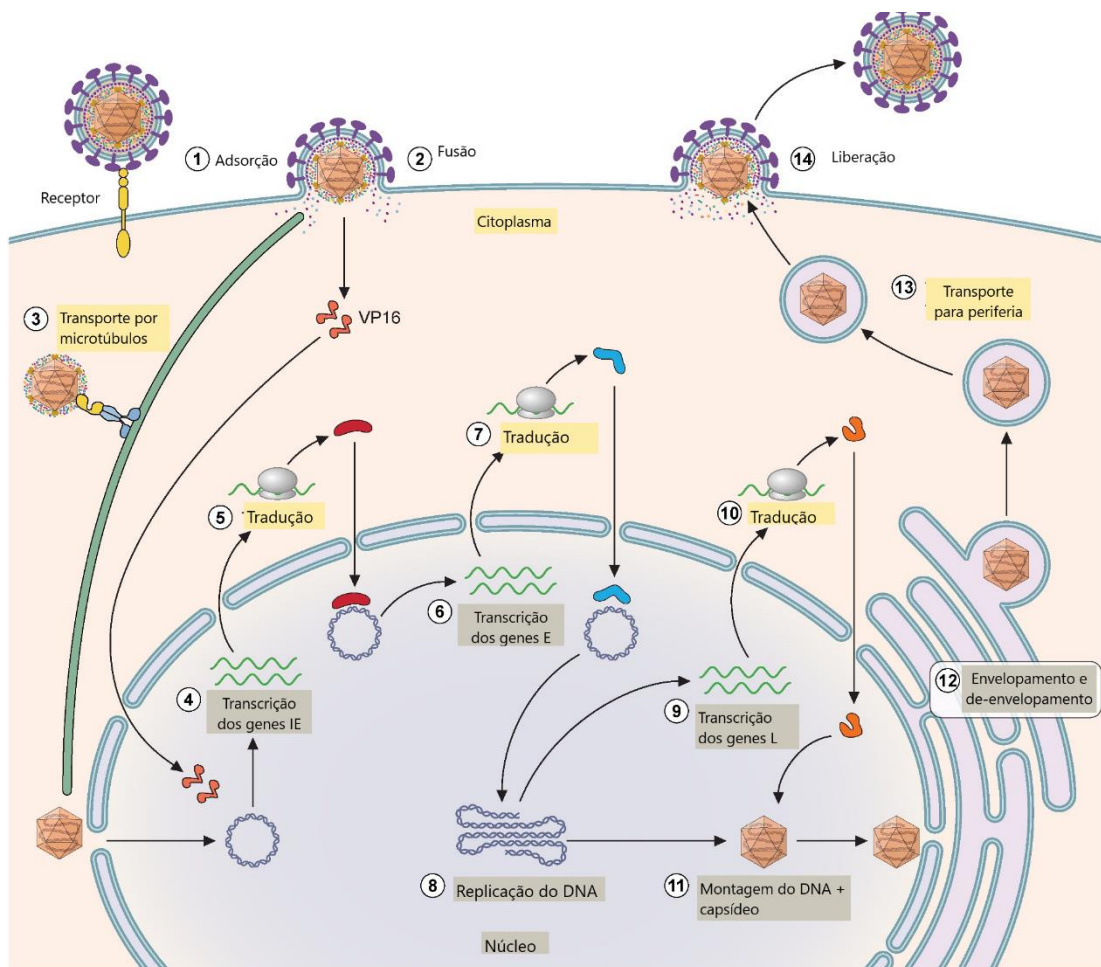
No tratamento padrão para infecções causadas pelo HHV-1 e 2 utiliza-se os antivirais aciclovir (ACV) e penciclovir (PCV), bem como as suas pró-drogas, valaciclovir (VCV) e famciclovir (FCV) que apresentam uma melhor biodisponibilidade. Estes medicamentos podem ser administrados topicamente em lesões muco cutâneas, sendo comum a comercialização em forma de pomadas; de forma intravenosa, para casos de infecções genitais e infecções disseminadas como encefalites em adultos e neonatos; e como terapia supressora por tempo prolongado para pacientes com recorrências comuns (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Apesar de não apresentar muitos efeitos colaterais, por agir quase que exclusivamente em células infectadas, a biodisponibilidade do ACV pode ser

baixa. Dessa forma, quando por viral oral, o medicamento deve ser administrado 2 a 5 vezes/dia, durante 5 a 10 dias. Além disso, na formulação de pomada, deve ser aplicado 4 vezes/dia durante 5 a 7 dias, e em terapias supressoras, quando há recorrência do herpes genital, o antiviral deve ser administrado 400 mg duas vezes ao dia, durante 12 meses (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Ainda que a terapia medicamentosa seja bem sucedida na maioria dos casos, estudos mostram que a prevalência de estirpes de HHV-1 não susceptíveis ao ACV em imunocomprometidos é estimada entre 3,5 a 14%, podendo chegar a 36% em transplantados, especialmente aqueles que fizeram transplantes de células hematopoiéticas (PIRET; BOIVIN, 2011). Entretanto, tal número tem aumentado com relatos recentes como descrito pro Zinser e colaboradores (ZINSER et al., 2018). Outrossim, em pacientes imunocompetentes a prevalência da resistência viral varia de 0,1 a 0,7%, sendo maior em pacientes acometidos com ceratite herpética (6,4%) (PIRET; BOIVIN, 2011, 2016). Dessa forma, há a necessidade de descrição de novas moléculas com mecanismo de ação diferente dos já conhecidos, que possam ser usados contra este vírus.

Figura 2 – Esquema do ciclo replicativo do HHV-1. (1) A glicoproteína D ou B do HHV-1 interage com os receptores celulares específicos, levando à fusão na membrana plasmática (2). Após a fusão, o capsídeo pode ser liberado no citoplasma com algumas proteínas de tegumento anexadas, enquanto outras proteínas, como a VP16, se separam do capsídeo. (3) O capsídeo viaja para o núcleo celular usando microtúbulos devido à interação entre UL36 e proteínas motoras. O DNA linear entra no núcleo. (4) A proteína de tegumento VP16 entra no núcleo junto com HCF-1 e Oct-1 e inicia a transcrição dos genes IE. (5) Os genes IE são traduzidos e participam da transcrição dos genes E (6), que participam na replicação do genoma viral (8). Uma vez que existem cópias suficientes dos genomas virais, os produtos dos genes L facilitam a encapsulação do DNA (11). Os Capsídeos maduros contendo DNA saem do núcleo levando consigo um pedaço da membrana nuclear como envelope, que é trocada por outras membranas (12) até atingir a membrana citoplasmática e por fim, ser liberado para o espaço extracelular (14).



Fonte: Adaptado de Zhu e Viejo-Borbolla, 2021

1.2 TERAPIAS ANTIVIRAIS CLÁSSICAS

Diferente de organismos procaríotos e eucaríotos, os vírus apresentam características diversas que são utilizadas para dividi-los em famílias. A começar

pelo material genético que pode ser DNA ou RNA (fita dupla ou simples, antisenso ou senso), a presença ou ausência de envelope (ou envoltório), um cápsídeo proteico (helicoidal, icosaédrico ou complexo), ciclo viral, até o tropismo celular. As características, quase únicas, das famílias virais torna a ação de antivirais praticamente exclusiva para cada vírus (OLDSTONE, 2010; ROUZINEID; ROZHNOVA, 2018).

Sendo assim, na década de 60, os cientistas buscavam uma molécula que fosse capaz de inibir a replicação do vírus da varíola. Descobriu-se as tiossemicarbazonas e, logo após, análogos de nucleosídeos que apresentavam como mecanismo de ação interromper a síntese de uma nova cadeia de DNA viral. Porém, os análogos de nucleosídeos de primeira geração também interferiam com a síntese de DNA celular. De fato, os primeiros medicamentos antivirais apresentavam toxicidade para os pacientes pois pouco se sabia sobre a biologia molecular viral (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

A partir desse momento, durante a década de 70, a medida que mais se aprendia sobre os doenças virais e seus agentes etiológicos, a indústria farmacêutica lançou programas de monitorização para encontrar moléculas com propriedades antivirais (FLINT et al., 2009). Dessa forma, o primeiro antiviral desenvolvido e considerado eficaz foi o composto denominado aciclovir (ACV). O mesmo foi desenvolvido no final dos anos 70, e consiste em um análogo de nucleosídeo de segunda geração (DE CLERCQ; FIELD, 2006), que age na inibição do herpesvírus humano 1 e 2 e também contra o vírus varicela-zoster, bloqueando a replicação viral. A partir do ACV, outros foram sintetizados, como o penciclovir (PCV), o ganciclovir (GCV), o valaciclovir (VCV) e o famciclovir (FCV), que diferem da molécula original apenas em alguns pontos de suas estruturas moleculares e eficiência de absorção, mas são eficazes na inibição de vírus da família *Herpesviridae* (FIELD; BISWAS, 2010).

De forma geral, os mecanismos de ação mais comuns de inibição viral em medicamentos antivirais podem ser divididos em duas categorias: antivirais que focam em alvos do hospedeiro e antivirais que inibem o vírus diretamente. Dos mecanismos de ação do hospedeiro, os medicamentos focam em: inibição de ciclofilinas, que são fatores celulares importantes e que alguns vírus utilizam

durante a sua replicação; o uso de imunomoduladores como interferons (EL RAZIKY et al., 2013) e gamaglobulinas (HANSEN; FELDMANN; JARVIS, 2021).

Já os mecanismos de ação dos antivirais que inibem vírus diretamente podem ser das seguintes formas: inibição de enzimas importantes tanto para replicação quanto transcrição de ácidos nucleicos, como polimerases e proteases (SELEY-RADTKE; YATES, 2018); inativação direta das partículas virais; inibição de glicoproteínas de superfície (LIN et al., 2017; YU et al., 2013a).

Dessa forma, pode-se observar que a estratégia consiste em impedir mecanismos virais de entrada e/ou de utilização da maquinaria bioquímica celular para sua replicação. Idealmente, espera-se que o antiviral não interfira nas respostas inatas de defesa da célula, mas que haja uma complementação da resposta imunológica. Alguns dos compostos antivirais têm demonstrado efeito em relação a muitos vírus, permitindo o tratamento da infecção viral, diminuindo a morbidade, mortalidade e a transmissão (DE CLERCQ, LI, 2016).

Entretanto, embora o conhecimento adquirido sobre vírus tenha crescido nos últimos 50 anos, a quantidade de novos fármacos antivirais continua consideravelmente abaixo do que deveria em termos de quantidade. A maioria dos antivirais disponíveis são em grande parte usados para o HIV e herpesvírus (DE CLERCQ; LI, 2016). Assim, existe uma demanda para a produção de novos fármacos antivirais, com uma preferência por moléculas que apresentem uma atividade antiviral de amplo espectro.

1.3 PEPTÍDEOS ANTIVIRAIS - AVPS

Dentre as diversas moléculas com atividade antimicrobianas existentes na natureza, os peptídeos antimicrobianos têm se mostrado promissores no controle de agentes patogênicos (GOMES et al., 2018; MUSTAFA; BALKHY; GABERE, 2018). A saber, tem sido crescente o número de estudos sobre peptídeos com atividade antiviral (*antiviral peptides* - AVPs), derivados tanto de secreções ou até mesmo de venenos de alguns seres vivos, como também de trabalhos com desenho racional por bioinformática (VILAS BOAS et al., 2017, 2019; ZENG et al., 2018) .

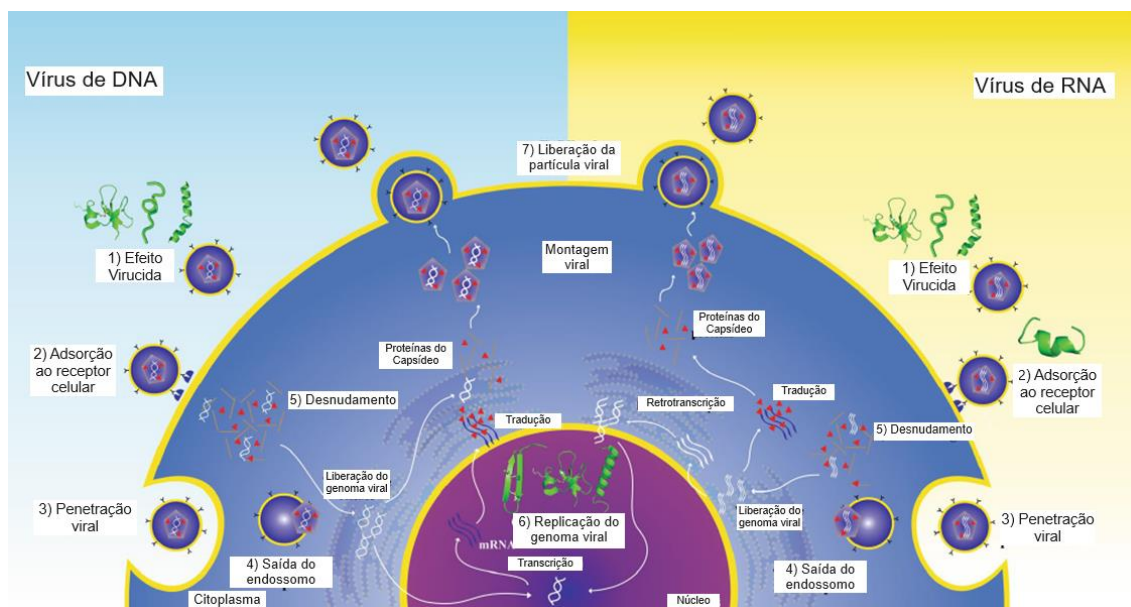
Ademais, compartilham das principais características dos demais peptídeos antimicrobianos como: sequências que variam de 10 a 50 aminoácidos; carga

líquida positiva devido a presença de resíduos básicos de lisina, arginina e histidina (quando protonada); baixa massa molecular (são menores que 10 kDa); anfipáticos; e apresentam grande variedade de dobramentos, incluindo α -hélices, folhas- β , hélices estendidas e *loops* (KINDRACHUK; NIJNIK; HANCOCK, 2010).

O estudo das estruturas e mecanismo de ação de AVPs levou a criação de um banco de dados *on line*, como o banco de dados de peptídeos antivirais (AVPdb- [http://crdd.osdd.net/serve rs/avpdb /](http://crdd.osdd.net/serve_rs/avpdb/)), que contém 2683 entradas de peptídeos testados experimentalmente (QURESHI et al 2014). Há ainda um banco mais específico para peptídeos com atividade contra o HIV (HIPdb - <http://crdd.osdd.net/servers/hipdb/>), que contém informações sobre estruturas e propriedades físico-químicas de 981 peptídeos (QURESHI et al 2013).

Quanto ao mecanismo de ação do AVPs (figura 3), esses compostos são principalmente chamados de virucidas quando atuam diretamente, ao inibir a partícula viral; ou ao competir pelo sítio de ligação de um receptor específico na membrana da célula hospedeira, interferindo na interação glicoproteína viral/receptor celular, e consequente adsorção (GALDIERO et al 2013). No entanto, tais peptídeos também podem agir em outras etapas do ciclo viral, como por exemplo, na supressão da expressão gênica viral (ZAPATA et al 2016).

Figura 3 - Possíveis alvos de peptídeos antivirais. As estruturas descritas representam os peptídeos cujo mecanismo de ação já é conhecido. A maioria dos relatos indicam que os AVPs possuem atividade virucida, já outros autores mostraram que alguns peptídeos podem inibir a replicação do genoma viral diretamente.



Fonte: Vilas Boas et al., 2019

Vários estudos descrevem propriedades antivirais de peptídeos frente a vírus que infectam diversos seres vivos (ALTMANN et al., 2012; BADANI; GARRY; WIMLEY, 2014). Dessa forma, mais especificamente contra os herpesvirus, é possível encontrar peptídeos que inibem sua replicação como os descritos na tabela 1.

Um grupo bem conhecido são as magaininas 1 e 2, derivadas de um sapo, *Xenopus laevis*, com 23 resíduos de aminoácidos cada uma. Em experimentos prévios, foi constatado que variantes das mangaininas apresentaram maior eficácia na inibição do HHV-1 no ensaio de pré-tratamento, o que sugere uma atividade virucida. (EGAL et al., 1999). A seguir, a temporina B, derivada de outra espécie de sapos chamada *Rana temporaria*, impediu a replicação viral de maneira dose-dependente, além de interferir na disseminação célula-célula do vírus. Isso sugere que o peptídeo pode atingir outros mecanismos celulares utilizados pelo HHV-1. Além disso, em ensaio de microscopia eletrônica, os autores constataram que a temporina B também interfere com a integridade do envelope viral (MARCOCCI et al, 2018). Já as dermaseptinas, derivadas de

anfíbios do gênero *Phyllomedusa*, são uma família grande de peptídeos que também apresentaram atividade anti-herpes (BERGAOUI et al., 2013).

Ademais, a LL-37, uma catelicidina humana, possui 37 aminoácidos e já foi encontrada em diversos fluidos corporais como suor, saliva, leite e em vérnix caseoso de recém-nascidos, por ser liberado por células epiteliais, e também na epiderme quando há algum tipo ferimento (BARLOW et al., 2014). A LL-37 apresenta propriedades imunomodulatórias, bem como atividades antibacterianas, antifúngicas, e antivirais (VILAS BOAS et al., 2017). Pode-se citar também a lactoferrina e a lactoferricina, derivada da parte N-terminal da lactoferrina (VAN DER STRATE et al., 2001), que já apresentaram atividade antiviral contra HHV-1 e 2, inclusive em modelo animal (SHESTAKOV et al., 2012).

Tabela 1 – Exemplos de peptídeos com propriedades antivirais contra herpesvírus descritos na literatura

Peptídeo	Resíduos de aminoácidos	Fonte de coleta do peptídeo	Mecanismo de ação antiviral	Referências
Lactoferricinina	25	<i>Bos taurus</i> (Derivada da lactoferrinina)	Interferência da adsorção/ Intracelular	SHESTAKOV et al. (2012)
Indolicidina	13	<i>Bos taurus</i> (Neutrófilos)	Efeito virucida na progênie dos vírions	YASIN et al. 2000
CYVIP	71	<i>Homo sapiens sapiens</i> (Hemofiltrado)	Interferência da adsorção	BORST et al. (2013)
LL37	37	<i>Homo sapiens</i>	Efeito virucida	BARLOW et al. (2014)
KP	10	Proteínas séricas humanas	Efeito virucida	CASOLI et al. (2006); CONTI et al. (2008); SALA et al. (2018)
Temporina B	13	<i>Rana temporaria</i>	Interfere com mecanismos celulares. Virucida	MARCOCCI et al. (2018)
Mangaininas 1 e 2	23	<i>Xenopus laevis</i>	Virucida	EGAL et al. (1999)
Dermaseptinas	-	<i>Phyllomedusa</i>	Virucida	BERGAOUI et al. (2013)

Por conseguinte, no hemofiltrado humano, foi encontrado o CYVIP com 71 aminoácidos, que demonstrou-se eficiente na inibição do citomegalovírus (CMV) e do HHV-1, sendo que o seu mecanismo de ação consiste na sua ligação com

os receptores de sulfato de heparano na superfície das células alvo desses vírus (MARR et al., 2009).

Finalmente, Sala e colaboradores, avaliaram vários peptídeos sintéticos derivados de diferentes proteínas séricas humanas contra quatro vírus. Entre eles, o peptídeo chamado KP mostrou uma notável atividade antiviral contra o HHV-1 (atingindo 99% de inibição). Os autores sugeriram que o KP possui aminoácidos hidrofóbicos em sua sequência que podem interagir com os lipídeos e/ou glicoproteínas da membrana viral (SALA et al 2018).

Além disso, uma estratégia amplamente utilizada na busca por novas moléculas tem sido a bioinformática. Dessa forma, a utilização de métodos *in silico* podem criar novas sequências de peptídeos para inibir estruturas específicas do vírus. Ademais, sequências conhecidas podem ser usadas como *template* para se melhorar a atividade do peptídeo e diminuir efeitos indesejados como citotoxicidade (IRAZAZABAL et al., 2016; KUCZER et al., 2011; KUCZER; MAJEWSKA; ZAHORSKA, 2013; ZANNELLA et al., 2022).

Recentemente, um novo algoritmo foi criado especificamente para prever peptídeos antivirais, chamado AntiVPP 1.0 (<https://github.com/bio-coding/AntiVPP>). Os autores sugerem que esse algoritmo é uma ferramenta rápida, precisa e intuitiva, e afirmam que o número de doadores de ligações de hidrogênio pode ser uma característica importante a ser considerada no desenvolvimento de algoritmos de previsão de peptídeos antivirais (BELTRÁN LISSABET; BELÉN; FARIAS, 2019).

Quando esses métodos são aplicados para o *design* de AVPs, os pesquisadores geralmente baseiam suas novas moléculas em estrutura virais específicas, como glicoproteínas de superfície (OKAZAKI; KIDA, 2004), proteases virais e outras enzimas importantes presentes nas partículas virais. Portanto, o conhecimento do genoma viral, estrutura de proteínas, ciclo replicativo e alvos celulares do hospedeiro pode ser de grande importância para a descrição de inibidores eficientes (JESUS et al., 2012). Curiosamente, em alguns casos, um peptídeo projetado para atingir um vírus específico pode ser usado como um modelo para o design de um novo peptídeo contra um vírus diferente (JOSE et al., 2013).

1.3.1 Peptídeos antivirais de veneno de artrópodes

Por muitos séculos, algumas culturas tem explorado o uso de venenos de animais como remédios para tratar uma gama de enfermidades como, dermatite atópica, artrite, dores crônicas, esclerose múltipla, tumores, doenças cardiovasculares e problemas intestinais (PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018). Geralmente, o veneno presente em certos animais, entre eles alguns artrópodes, está comumente envolvido com a proteção contra predadores e na imobilização e assassinato de presas. A composição do veneno de artrópodes varia de animal para animal e abarca uma grande variedade de moléculas de baixo peso molecular, além de enzimas, sais inorgânicos e peptídeos (MEMARIANI et al., 2019).

Em veneno de artrópodes pode-se encontrar peptídeos antivirais. (KUCZER et al., 2010). Na verdade, diversas moléculas com atividade antiviral têm sido isoladas a partir desses organismos, como por exemplo, a melitina, derivada de veneno de abelha (*Apis mellifera*). Esse peptídeo é composto por 26 aminoácidos sendo que pH fisiológico possui carga +6 devido a presença de resíduos de arginina e lisina. Ademais, a melitina apresenta um região N-terminal mais hidrofóbica e uma região C-terminal mais hidrofílica (RADY et al., 2017), demonstra uma característica anfipática quando adota uma conformação estrutural em alfa-hélice e por isso acredita-se que possa interagir com membranas (TERWILLIGERT; EISENBERGG, 1982).

Tabela 2 – Exemplos de peptídeos derivados de artrópodes com propriedades antivirais

Peptídeo	Resíduos de aminoácidos	Fonte de coleta do peptídeo	Mecanismo de ação antiviral	Vírus Alvo	Referências
Melitina	26	<i>Apis mellifera</i>	Lise do envelope	HHV-1 e 2; HIV; Influenza	ALBIOL MATANIC, CASTILLA, (2004); BASHIR UDDIN et al., (2016)
Hp1239 e Hp1036	13	<i>Heterometrus petersii</i>	Virucida	HHV-1	HONG et al., (2014)
Smp76	76	<i>Scorpio maurus palmatus</i>	Virucida	HCV; DENV	EL- BITAR et al (2020)
Eva1418	13	<i>Euscorpisps validus</i>	Virucida	HHV-1	ZENG et al (2018)

HHV-1 – Alpha herpesvírus humano; HHV-2 – Alpha herpesvírus humano 2/ HIV – Vírus da imunodeficiência humana; HCV – Vírus da hepatite C.

Além de diversos estudos que constataam atividade antibacterianas, antifúngicas e antitumorais (MEMARIANI et al., 2019), a melitina demonstrou inibição da replicação dos herpesvírus 1 e 2, e do HIV, por meio da lise do envelope desses vírus (ALBIOL MATANIC; CASTILLA, 2004; GALDIERO et al., 2013). Em estudo recente, Uddin e colaboradores conseguiram demonstrar a inibição de uma cepa do vírus influenza A marcado com GFP. Em ensaio *in vitro*, a melitina foi capaz de reduzir em 50% as PFU (*plaque-forming units*) com apenas 1,15 µg.mL⁻¹ (BASHIR UDDIN et al., 2016^a).

Venenos de escorpião são outra fonte rica de AVPs. Hong e colaboradores (2014), observaram que os peptídeos Hp1239 e Hp1036, derivados de veneno de escorpião (*Heterometrus petersii*), foram capazes de inibir a adsorção do HHV-1 em células alvo, e também de inativar a partícula viral (HONG et al., 2014^a). Em estudo mais recente, El Bitar (2020) demonstrou que um peptídeo chamado Smp76, purificado a partir do veneno do escorpião *Scorpio maurus palmatus*, apresentou atividade antiviral. Nos ensaios *in vitro* ficou comprovado que esse peptídeo inibe partículas virais do vírus da hepatite C (HCV) e dengue (DENV), vírus pertencentes à família *Flaviviridae* (EL- BITAR et al 2020). Já em outro estudo, uma triagem de peptídeos do veneno do escorpião *Euscorpiosps validus* foi realizada sendo identificado o peptídeo Eva1418 com atividade antiviral contra o HHV-1. Neste estudo os autores buscaram melhorar a captação celular e distribuição intracelular desse peptídeo, por meio da introdução de resíduos de histidina que aumentariam capacidade de formação de hélice e anfifilicidade. Os resultados mostraram que o peptídeo modificado Eva1418-FH5 apresentou menos citotoxicidade, mais atividade antiviral contra o HHV-1, bem como maior captação celular e distribuição intracelular (ZENG et al 2018).

1.3.2 Mastoparanos

A partir do veneno de vespas, cientistas encontraram uma família de peptídeos catiônicos que receberam o nome de mastoparanos. Esses peptídeos foram primeiramente descritos do veneno da espécie *Vespula lewisii* (HIRAI et al., 1979), e desde então outros peptídeos com características relacionadas

foram encontrados em diversas espécies de vespas, tanto sociais quanto solitárias (KONNO et al., 2019).

De forma geral, os mastoparanos possuem de 10 a 14 resíduos de aminoácidos e são capazes de formar estruturas anfipáticas em hélice que podem se inserir em membranas lipídicas de bactérias e eritrócitos, formando poros (DOS SANTOS CABRERA et al., 2011; LEITE et al., 2011b). Os mastoparanos também são conhecidos por desencadarem a degranulação de mastócitos e consequente liberação de histamina; por apresentarem atividade antimicrobiana e hemolítica (HIRAI et al., 1979); por ativarem fosfolipases A2 e C, que aumentam lesão tecidual e edema; por serem capazes de aumentar a atividade de guanosina trifosfato – GTP; e por induzirem a quimiotaxia de neutrófilos e recrutamento de outros leucócitos para o local da injúria.

Outrossim, mastoparanos podem ser utilizados como modelo para o desenvolvimento de novas variantes potencialmente antivirais frente a vírus envelopados (SAMPLE et al., 2013). Dessa forma surgiu o mastoparano 7 (MP7-NH2), que demonstrou ampla atividade antiviral contra vírus envelopados. Em ensaios *in vitro* o MP7-NH2 atingiu até 99% de inibição da replicação de dos seguintes vírus: vírus da estomatite vesicular (VEV), vaccinia, varíola bovina, vírus do Oeste do Nilo (WNV), WNV-DENV4 quimera, febre amarela, vírus sincicial respiratório (RSV), e HHV-1. No ensaio de pré-incubação *in vivo* contra o VEV, o MP7-NH2 tornou o vírus não infeccioso e incapaz de replicar *in vivo*. Na análise por microscopia eletrônica de transmissão, foi observado que os vírus de VEV tratados com MP7-NH2 apresentaram seu envelope danificado, com seu capsídeo separado do envelope (SAMPLE et al., 2013).

Já, o mastoparano L derivado da espécie mencionada acima (*Vespula lewisii*) também possui atividade antimicrobiana, hemolítica, e capacidade de interagir com proteínas citoplasmáticas (HORI et al., 2001). Além de estimular exocitose de células de mamíferos, também são capazes de induzir a secreção de histamina, serotonina, catecolaminas e prolactina (KATSU et al., 1990; KOMATSU et al., 1993).

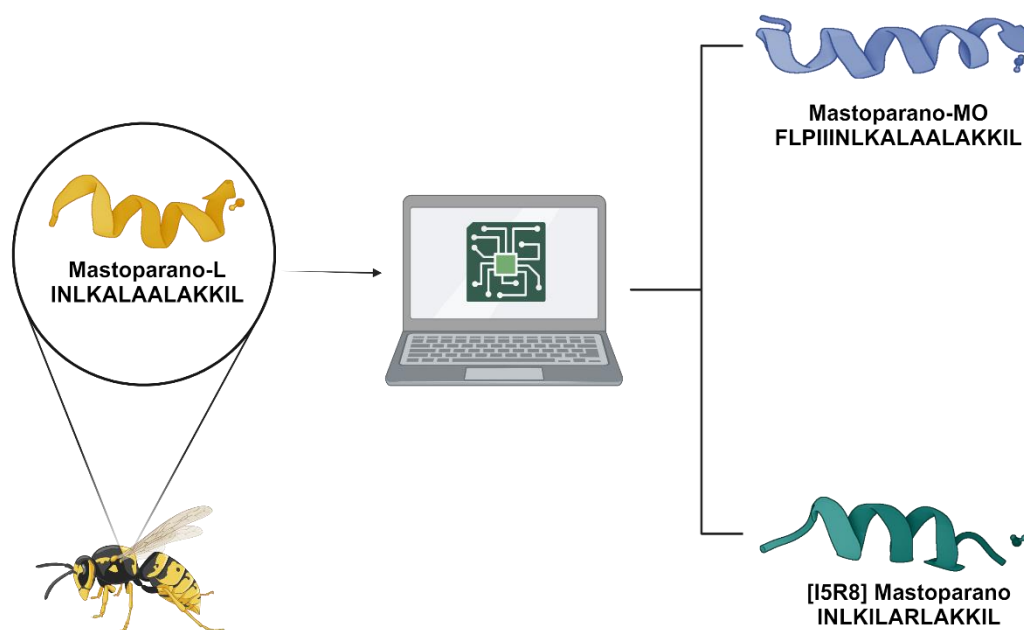
Em trabalhos recentes desenvolvidos por Irazazabal (2016) e Silva (2020), o mastoparano L foi usado como modelo (Figura 4) para a criação de novos peptídeos com potencial antimicrobiano. Diferentes abordagens deram origem

ao mastoparano MO e ao [I⁵, R⁸] mastoparano que serão descritos a seguir (tabela 3).

Tabela 3 – Estrutura primaria dos mastoparanos L, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] mastoparano.

Peptídeo	Sequência
Mastoparano L	INLKALAALAKKIL-NH ₂
Mastoparano MO	FLPIIINLKALAALAKKIL-NH ₂
[I ⁵ , R ⁸] mastoparano	INLKILARLAKKIL-NH ₂

Figura 4 – Peptídeos derivados do mastoparano-L criados a partir de desenho racional. Os peptídeos mastoparano-L e mastoparano MO já possuem a sua estrutura resolvida por RMN. Um estudo de modelagem molecular foi realizado com o [I⁵, R⁸] mastoparano para inferir a sua possível estrutura secundária. (Criado com BioRender.com)



1.3.3 [I⁵R⁸] Mastoparano

Devido as promissoras características físico-químicas e antimicrobianas dos mastoparanos supracitadas, pesquisadores desenvolveram um peptídeo

baseado no mastoparano L, dando-lhe o nome de [I⁵, R⁸] mastoparano. Esse peptídeo recebeu mínimas substituições do aminoácido alanina nas posições 5 e 8 (Ala⁵ → Ile, Ala⁸ → Arg), para otimizar sua atividade antimicrobiana, frente a bactérias e fungos, e diminuir citotoxicidade frente células de mamíferos (IRAZAZABAL et al., 2016). A mudança de um resíduo de arginina na posição 8 do peptídeo aumentou a sua carga de +3 para +4, porém não modificou o ângulo determinado pela face carregada da hélice. Ademais, a troca de um resíduo de alanina na posição 5 por uma isoleucina, permitiu contrabalancear a hidrofobicidade do [I⁵, R⁸] mastoparano (IRAZAZABAL et al., 2016), já que a isoleucina e arginina possuem valores opostos na escala de hidrofobicidade proposta por Kyte e Doolittle (KYTE; DOOLITTLE, 1982).

Os resultados mostraram uma potente atividade antibacteriana, tanto contra bactérias Gram-positivas (MIC = 6,25 µM contra *Staphylococcus aureus*,) como Gram-negativas (MIC = 3 µM contra *Klebsiella pneumoniae*, e 3 µM contra *Acinetobacter baumannii*); atividade antifúngica (MIC = 12,5 µM contra *Candida albicans*); e não apresentou atividade hemolítica contra eritrócitos humanos nem citotóxica contra células de mamífero (IRAZAZABAL et al., 2016).

Além disso, ensaios com sondas fluorescentes inseridas em duas cepas bacterianas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) revelaram que este peptídeo é capaz de permeabilizar membranas. Essa informação foi corroborada por microscopia eletrônica de varredura em que as imagens mostraram que as membranas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria ivanovii*, e do fungo *C. Albicans* são severamente danificadas na presença do [I⁵, R⁸] mastoparano (IRAZAZABAL et al., 2016).

Por fim, uma simulação de dinâmica molecular indicou que o [I⁵, R⁸] mastoparano pode ser capaz de adotar uma conformação em α -hélice, mas que perde sua estrutura em um ambiente com água. Ademais, os dados indicaram que a região N-terminal do [I⁵, R⁸] mastoparano quando amidada, pode ser mais estável que a região C-terminal (IRAZAZABAL et al., 2016).

1.3.4 Mastoparano MO

Sequências de peptídeos com atividades imunomodulatórias depositadas no banco de dados de peptídeos antimicrobianos (*Antimicrobial Peptides*

Database – APD)(WANG; LI; WANG, 2016) foram analisadas, sendo identificada uma sequência conservada de 5 resíduos de aminoácidos (FLPII) na porção N-terminal de vários peptídeos com alta atividade antimicrobiana e imunomodulatória, incluindo breveninas e temporinas (SILVA et al., 2020).

Dessa forma, na extremidade N-terminal do peptídeo mastoparano L, o peptapetídeo (FLPII) foi adicionado, com a finalidade de melhorar a atividade antimicrobiana e imunomodulatória do mesmo, surgindo então o mastoparano-MO (mast-MO). Após a pesquisa *in silico*, análises de dicroísmo circular (DC) e ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas para elucidar se a adição do peptapetídeo interferiu na estrutura do mast-MO. No DC, tanto o mast-L quanto o mast-MO foram testados e apresentaram uma estrutura em α -hélice (figura 4) bem definida na presença de trifluoetanol (TFE)/água, micelas de SDS e vesículas de fosfolipídeos (SILVA et al, 2020).

A seguir, constatou-se que o mast-MO apresenta uma menor toxicidade e atividade antimicrobiana e imunomodulatória aumentada em comparação com o mast-L. Ensaio *in vitro* de inibição de crescimento bacteriano foram realizados contra 15 patógenos, incluindo membros da lista *ESKAPE* da OMS e cepas resistentes. Dois antibióticos de uso clínico (gentamicina e imipenem) foram utilizados para fins de comparação e observou-se que o mast-MO inibiu melhor; bactérias gram-positivas em relação a gram-negativas, sendo um pouco mais eficiente que o mast-L contra a maioria das cepas testadas, exceto *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), *Escherichia coli* (2101123), *E.coli* 0157 e *Klebsiella pneumoniae* 1825971 KPC971)(SILVA et al., 2020).

Além disso, três espécies de bactérias diferentes (*E. coli* resistentes à colistina, *Pseudomonas aeruginosa* e *A. baumannii*) foram selecionadas para um ensaio de sinergismo entre peptídeo mast-MO e antibióticos conhecidos. Dessa forma. para cada cepa, quatro antibióticos foram escolhidos, diluídos serialmente e associados a diferentes concentrações do mast-MO.

O mast-MO apresentou interações sinérgicas com índice de concentração inibitória fracionada = 0,1 quando combinado com antibióticos que bloqueiam a síntese de proteínas, como a kanamicina, clorafenicol e gentamicina, contra *E. coli* resistentes à colistina e *A. baumannii* (SILVA et al., 2020).

Em relação a possível hemólise e citotoxicidade, os peptídeos foram testados frente a diferentes linhagens celulares. Assim, contra uma linhagem de células embrionárias (HEK293) o mast-MO foi tóxico na concentração de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, porém não hemolítico contra hemácias humanas. Enquanto o mast-L, em concentrações de 7 a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, foi hemolítico e tóxico frente às diferentes linhagens celulares tanto humanas quanto murinas (SILVA et al., 2020).

Os peptídeos também foram testados em camundongos C57BL/6 sendo que amostras de fluido peritoneal foram coletadas, e analisadas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas. Dessa forma, constatou-se que o tratamento com mast-L e mast-MO diminuiu significativamente a resposta inflamatória resultante da infecção bacteriana, mais especificamente diminuição das seguintes citocinas pró-inflamatórias: IL-12, TNF- α , e IL-6. Observou-se também um aumento na migração de leucócitos na região da infecção, fator crucial para a resolução do processo infeccioso (SILVA et al., 2020).

Dessa forma, supõe-se que estes peptídeos, assim como outros mastoparanos já testados e relatados na literatura, também possuiam uma atividade antiviral frente a vírus envelopados. Portanto, neste trabalho o peptídeo [I⁵, R⁸] mastoparano, assim como o mastoparano L e o mastoparano MO, foram testados frente ao alfa herpesvírus humano 1.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivos gerais

- Avaliar a atividade antiviral dos mastoparanos sintéticos contra o alfa herpesvírus humano 1 em cultura celular, bem como elucidar o seu possível mecanismo de ação e a sua estrutura tridimensional.

1.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dos peptídeos mastoparano L, mastoparano MO e [I⁵, R⁸] mastoparano sobre a viabilidade das células Vero.

- Determinar a atividade antiviral contra o Alphaherpesvírus humano 1 dos peptídeos mastoparano L, mastoparano MO e [I⁵, R⁸] mastoparano submetidos ao teste de viabilidade celular.
- Elucidar a estrutura do peptídeo [I⁵, R⁸] mastoparano
- Esclarecer o mecanismo de ação da inibição viral do peptídeo mastoparano MO e [I⁵, R⁸] mastoparano.
- Determinar a atividade do peptídeo [I⁵, R⁸] mastoparano em membranas lipídicas.

2. ARTIGO

Antiviral activities of mastoparan-derived peptides against human alphaherpesvirus 1

Liana Costa Pereira Vilas Boas^{1,2}, Danieli Fernanda Buccini³, Rhayfa Lorraine Araújo Berlanda^{1,2}, Bruno de Paula Oliveira Santos⁴, Luciano Morais Lião⁴, Sónia Gonçalves⁵, Nuno C Santos⁵, Octávio Luiz Franco^{1,2,3}

¹ *Universidade de Brasília, Pós-Graduação em Patologia Molecular, Campus Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brazil, 70910-900.*

² *Centro de Análises Bioquímicas e Proteômicas, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília/DF, Brazil, 70790-160.*

³ *S-Inova Biotech, Pós-graduação em Biotecnologia Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande/MS, Brazil, 79117-900.*

⁴ *Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74001-970 Goiânia-GO, Brazil.*

⁵ *Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisbon, Portugal*

*Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Campus Taguatinga, Email address: ocfranco@gmail.com

ABSTRACT

Background: Human alphaherpesvirus 1 is a sexually transmitted viral infection and a global health issue. Despite having a treatment protocol in place, it is an incurable infection with debilitating recurrences, and the emergence of viral

resistance has proven to be a worrying factor, particularly for immunocompromised patients. For this reason, studies have shown the potential of antimicrobial peptides derived from the venom of *Vespula lewisii*, the mastoparan family. The main purpose of the present study was to show the antiviral properties of mastoparan L-derived peptides, [I⁵, R⁸] mastoparan and mastoparan-MO, against the HSV-1.

Methods: Initially, for the *in vitro* assays, the viability of Vero cells in the presence of mastoparan-L, mastoparan-MO, and [I⁵, R⁸] mastoparan was assessed by MTT reduction. The antiviral activity against HSV-1, the mechanism of action and the dose/response curve were determined by plaque assay. In further assays, circular dichroism and nuclear magnetic resonance analyses were performed to resolve [I⁵, R⁸] mastoparan structure. In addition, [I⁵, R⁸] mastoparan was incubated with lipid vesicles labeled with fluorescence probes to evaluate changes in membrane fluidity induced by the peptide.

Results: Cytotoxic assays of the peptides mast-L, mast-MO, and [I⁵, R⁸] mast showed over 80% cellular viability at 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. In the antiviral assays, mast-L demonstrated the lowest inhibition at only 75%. However, mast-MO and [I⁵, R⁸] mast exhibited over 80% of HSV-1 inhibition in the co-treatment step. Moreover, it was observed that viral replication was inhibited by up to 99%, particularly during the initial stages of infection. Both peptides achieved this by directly inactivating HSV-1 particles, including the stages of adsorption and penetration. Lastly, [I⁵, R⁸] mast structures analysis shows an α -helix in the presence of SDS₂₅ micelles and does not interfere with mimetics membranes fluidity, even in the higher concentration tested (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Conclusions: The α -helix structure is a common mastoparan feature that seems very important for its antiviral activity. This structure enables the effective disruption of viral particles prior to their attachment. In this scenario, mastoparans are promising molecules for HSV-1 infection control.

1. BACKGROUND

Human alphaherpesvirus 1 also referred to as herpes simplex virus type 1 (HSV-1), is a member of the *Herpesviridae* family and it is considered, along with HSV-2, a sexually transmitted infection (STIs) (RECHENCHOSKI et al., 2017). HSV-1 is known to cause cold sores, and orofacial painful lesions in primary infections, and persists in the host by posterior sensory neurons and ganglia infection (ROIZMAN; WHITLEY, 2013). In the worst cases, the disease can spread to central nervous system, leading to meningitis and encephalitis, especially in newborn babies (MATTHIAS et al., 2021). Latest data suggests that 3,7 billion people below 50 y.o carry HSV-1 (JAMES et al., 2020; LOOKER et al., 2015a) and approximately 500 million between the ages of 17 and 49 are infected by HSV-2 (BAGCCHI, 2016; LOOKER et al., 2015b). Although they have been known for several years, with a well-established treatment protocol with the use of nucleoside analogs, such as acyclovir and derived prodrugs there is no record of a cure for the disease (VAN LINT; KNIPE, 2009). Moreover, the emergence of viral resistance is a worrying factor (ANDREI et al., 2013), especially for immunocompromised patients (PIPERI et al., 2023). For this reason, new molecules derived or inspired by natural occurring products are promising tools for infection control. Several studies have demonstrated the potential of antiviral

peptides (AVPs) derived from different sources, from invertebrates to vertebrates (GALEANE et al., 2019; LEHRER et al., 2003; VILAS BOAS et al., 2017)

Antiviral peptides share common characteristics with other antimicrobial peptides, such as non-specific activity, small size, between 10 to 50 amino acid residues length, positive charge, low molecular mass, amphipathicity, and diverse structures, including α -helix, β -sheets, extended helix and loops (KINDRACHUK; NIJNIK; HANCOCK, 2010). AVPs are primarily known as virucidal agents, exerting their action through direct viral particle inhibition or competition for binding sites on the host cell membrane proteins. This disruption in interactions ultimately leads to viral adsorption and penetration prevention. Additionally, AVPs may exert antiviral effects at other viral cycle stages, such as suppressing viral gene expression, thus offering potential therapeutic benefits across various phases of viral infection (VILAS BOAS et al., 2019).

A rich source of AVPs are arthropods' venoms including melittin, from bees (BASHIR UDDIN et al., 2016b); Hp1239 and Hp1036, from scorpions (HONG et al., 2014b); alloferon 1 and 2 from blowflies along with its analogs (KUCZER; MAJEWSKA; ZAHORSKA, 2013); and lactarcin 1, from spider (ROTHAN et al., 2014). Amongst them peptides from mastoparan (MP) family, derived from the wasp venom have already shown antibacterial, antifungal, and antiviral activity (CHAHDI et al., 2003; GALEANE et al., 2019). MP adopts an amphipathic α -helical structure, has 14 amino acid residues, and is known to mediate mast cell degranulation and histamine release (DOS SANTOS CABRERA et al., 2011). Thus, using bioinformatics tools, in previous works, modifications were made in the mastoparan L peptide molecule, which gave rise to the [I⁵, R⁸] mastoparan

(IRAZAZABAL et al., 2016) and mastoparan-MO (mast-MO) (SILVA et al., 2020) as described below.

Minor adjustments were made to the primary sequence to decrease the mast-L hemolytic and cytotoxicity activity, while enhancing the antimicrobial activity. Thus, two alanine residues were replaced by an isoleucine in the fifth position and an arginine in the eighth, hence the name [I⁵, R⁸] mastoparan (IRAZAZABAL et al., 2016). The study showed a broad-spectrum antimicrobial activity against bacteria and fungi, along with low cytotoxicity and no hemolytic towards human erythrocytes. Furthermore, it has been discovered through experiments using fluorescent probes in two different bacterial strains that this peptide is able to permeabilize membranes. This conclusion was further supported by scanning electron microscopy images, which clearly show significant bacterial membrane damage when exposed to [I⁵, R⁸] mastoparan (IRAZAZABAL et al., 2016).

Otherwise, the mast-MO was developed by studying immunomodulatory peptide sequences. To enhance its immune-modulating properties, a five-amino acid residue motif (FLPII) found in other peptides was added to the N-terminal mast-L sequence (SILVA et al., 2020). Therefore, the results showed that mast-MO has less cytotoxicity, and higher antimicrobial activity when compared with its parental peptide, mast-L. Moreover, mast-MO showed an anti-inflammatory profile in *in vivo* assays with mice, by reducing the release of pro-inflammatory cytokines and at the same time, improving leukocyte migration to the infection site (SILVA et al., 2020). Here, we show the previously designed peptides tested against HSV-1 exert a virucidal effect. Furthermore, we present additional

information about the structure of mastoparan-derived peptide [I⁵, R⁸] mastoparan.

2. METHODS

2.1 Cell culture and viruses

Vero cells (monkey kidney cells, *Cercopithecus aethiops*) were obtained from the Núcleo de Virologia from Central Laboratory (LACEN/DF). The cells were grown in Dulbecco's eagle minimum essential medium (DMEM) supplemented with L-glutamine, streptomycin/penicillin antibiotics and 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and maintained at 37 °C in 5 % of CO₂ in humid atmosphere (VILAS BOAS et al., 2017). The HSV-1 strain was obtained from the Federal University of Rio de Janeiro collection.

2.2 Synthetics peptides

Mastoparan MO (FLPIIINLKALAALAKKIL-NH₂), mastoparan L (INLKALAALAKKIL-NH₂) and [I⁵, R⁸] mastoparan (INLKILARLAKKIL-NH₂) were synthesized and purchased from Aminotech. All peptides were used after verifying the purity and molecular masses by mass spectrometry (MALDI-*ToF/ToF* Ultraflex III, Bruker Daltonics). The purity for all peptides was defined as higher than 95 %; and the quantification was carried out according to Murphy and Kies (1960) (MURPHY; KIES, 1960).

2.3 Lipids

POPC (1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPS (1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero- 3-phospho-L-serine) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Cholesterol (Chol), DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-

hexatriene), TMA-DPH (4'-(trimethylammonio)diphenyl-hexatriene p-toluenesulfonate) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The working buffer used throughout the studies was HEPES 10mM pH 7.4 in NaCl 150mM.

2.4 Cytotoxicity assays

In order to determine the maximum non-toxic peptide concentration (MNTC), Vero cell monolayers were cultivated in 96-well microplates and incubated with two-fold serial solutions of each peptide (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), in triplicate, for 48 h at 37°C. After incubation, cells were examined using an inverted optical microscope aiming to evaluate the morphological alterations. Cell viability was further evaluated by 3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT; Sigma) at 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Absorbance was read at 490 nm using a microplate reader (Biotek Powerwave HT microplate spectrophotometer) (VILAS BOAS et al., 2017)

2.5 Viral titration

To determine the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) of the HSV-1 sample, tenfold serial dilutions were prepared and added on Vero cell monolayers previously incubated in 96-well microplates. Each serial dilution was inoculated six times in the microplate and incubated at 37 °C in 5 % CO₂, for 48 h. After this period, each well was analyzed for viral cytopathic effect. Subsequently, the calculation proposed by Reed and Muench (REED; MUENCH, 1938) was performed.

2.6 Antiviral activity by plaque assay

Antiviral activity was quantified by plaque assay as follows. Vero cell monolayers previously incubated in 24-well microplates were treated with the MNTC of each peptide and inoculated with 100 μ L of HSV-1 suspension at 100 TCID₅₀, and thereafter incubated at 37 °C in 5 % CO₂, for 48 h. After a freeze/thaw cycle, tenfold serial dilutions of each well were prepared. Then, 500 μ L of each dilution were added (in triplicate) on Vero cell monolayers previously incubated in 6-well microplates, incubated at 37 °C in 5 % CO₂, for 1 h. After the incubation period, the inoculum was removed and a carboxymethylcellulose overlay media (DMEM, 2% FBS, 1% CMC) were added in each well, followed by another incubation for 48 h. Subsequently, 3mL of 10% formaldehyde fixation solution were added to each well, and afterwards left at room temperature for at least 90 min. Then, the CMC/fixation solution was removed, and the microplate was washed with water. Finally, to be able to count the plaque formation units (PFUs), 600 μ L of crystal violet 1% stain were added to each well for 15 min, then removed and washed with water (MAXIMIANO et al., 2022). To perform plaque counting of each well, the average plaques were registered, and applied to the following equation 1:

$$\text{PFU/mL} = \frac{\text{Avg. of plaques}}{D \times V}$$

where D is the dilution and V the volume of diluted virus added to the plate (BAER; KEHN-HALL, 2014).

2.7 Inhibition of replication steps

To infer if the peptide was capable of inactivating the viral particle prior to infection, microtubes were prepared with the peptides at the MNTC and 100 μ L

of HSV-1 suspension at 100 TCID₅₀. Immediately after, the microtubes (peptide + virus, and positive control with just the viral suspension) were incubated for 90 min at 37 °C, the antiviral activity was determined by plaque assay. To assess whether the peptides were able to bind with the cellular receptors used by the virus, Vero cell monolayers previously incubated in 24-well microplates were first treated with peptide solutions at the MNTC for 1 h at 37 °C. Immediately after that, they were washed with DMEM without serum, to remove the free peptide, and 100 mL of HSV-1 suspension at 100 TCID₅₀ were added to both treated and untreated cultures, and again incubated at 37°C for 48 h. Later, the microplate was frozen for cell lysis, followed by plaque assay (iten 2.6). Moreover, to evaluate if the peptide was able to interfere with viral penetration, Vero cell monolayers previously incubated in 24-well microplates were first inoculated with 100 mL of HSV-1 suspension at 100 TCID₅₀ mL and incubated for 1 h at 37 °C. After the adsorption, the monolayers were washed with DMEM without serum, to remove the viral particles that were not adsorbed, then treated with 1 mL of the peptide solutions at the MNTC and incubated for 1 h at 37 °C. Later, the monolayers were washed again with DMEM without serum, which was added to the cells and incubated for another 48 h at 37 °C, and then frozen for cell lysis, followed by plaque assay (iten 2.6).

Lastly, assays were performed to determine if the peptides were capable of interfering with viral intracellular mechanisms. Therefore, Vero cell monolayers were inoculated with 100 mL of HSV-1 suspension at 100 TCID₅₀ and incubated for 1 h at 37 °C. After this period, the monolayers were washed with DMEM without FBS and incubated for 1 h at 37 °C. Then, cells were treated with solutions of the peptides at the MNTC, and incubated for 18 h at 37 °C, to

complete the viral replication process. After this period cells were washed again with DMEM without FBS and incubated for 24 h at 37°C. Lastly, the microplate was frozen for cell lysis, followed by plaque assay (item 2.6). Afterward, the results were expressed in percentage of inhibition (PI). All assays were performed in triplicate.

2.8 Circular dichroism

Circular dichroism (CD) experiments were carried out using a Jasco 815 spectropolarimeter (JASCO International Co. Ltd.), coupled to a Peltier Jasco PTC-423L system for temperature control. In the experiments carried out in the presence of SDS micelles, 1 mM of peptide was added to 500 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) in water. pH variations were also assessed, and samples were prepared to a final peptide concentration of 1 mM and 500 mM of SDS in acetate buffer (2 mM) at pH 4, Tris-HCl buffer (2 mM) at pH 7, and glycine-NaOH buffer (2 mM) at pH 10. Peptides were also analyzed in the presence of trifluoroethanol (TFE)/water and in pure water. Spectra were collected and averaged over five scans in the spectral range of 190–260 nm, with 1 nm path length quartz cells, at 25 °C. A 0.2 nm step resolution, 10 nm.min⁻¹ speed, 1 s response time and 1 nm bandwidth were used (CHEN, 1974).

2.9 Nuclear magnetic resonance

Initially, 300 µL of a suspension containing [¹⁵, R⁸] mastoparan 2 mM, H₂O/D₂O 9:1 and 100 mM SDS-d₂₅ was prepared for nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. All NMR data were acquired at 25 °C, using a Bruker Avance III 500 NMR spectrometer operated at 11.75 T (1H resonance frequency 500.13 MHz), equipped with a maximum Z gradient of 55 Gauss/cm. The 2D 1H–1H

TOCSY and NOESY experiments were recorded with presaturation as appropriate and using time proportional phase increment (States TPPI/States) for quadrature detection in F1. The mixing times were set to 200 ms both for TOCSY and NOESY experiments. TOCSY and NOESY data were processed using Topspin [13] and converted to the format NMRView [14]. Lastly, Pymol (DELANO, 2002) and CcpNmr Analysis (SKINNER et al., 2016) were used to evaluate structure quality.

2.10 Preparation of large unilamellar vesicles

Large unilamellar vesicles (LUVs, ~100 nm diameter) were obtained by the extrusion of multilamellar vesicles (MLVs), as previously described (MAYER; HOPE; CULLIS, 1986). The LUVs studied were made of pure POPC, POPC:POPS 2:1, POPC:Chol 2:1, POPC:POPS:Chol 70:5:25 or POPC:POPS:Chol 70:20:10 . HEPES buffer 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7.4 was used in all measurements.

2.11 Fluorescence anisotropy

The fluorescence probes DPH and TMA-DPH were dissolved in HEPES buffer 10 mM, 150 mM NaCl, pH7.4. LUVs 3 mM were incubated for 30 min with each probe at a final concentration of 10 μ M. After the incubation period, different concentrations of [⁵, R⁸] mastoparan (5, 10, 15, 20, 25, 35, 50 μ g.mL⁻¹) were added to the labeled LUVs, and incubated for 40 min. The steady-state fluorescence anisotropy, $\langle r \rangle$, was calculated as follow eq 2:

$$\langle r \rangle = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} - 2GI_{vh}}$$

where I_{VV} and I_{VH} are the parallel and perpendicular polarized fluorescence intensities measured with the vertically polarized excitation light, and $G = I_{HV}/I_{HH}$ is an instrumental correction factor accounting for the polarization bias in the detection system. Excitation/emission wavelengths were 350/432 nm for DPH and 355/430 nm for TMA-DPH. Fluorescence measurements were carried out in a Varian Carry Eclipse fluorescence spectrophotometer (Mulgrave, Victoria, Australia) equipped with a Xe pulsed lamp. Excitation and emission bandwidths were 5 and 10 nm, respectively. Fluorescence spectra were recorded with 0.5 cm path length quartz cuvettes. All measurements were performed at least three times, with independent measurements, at 37 °C (GOMES et al., 2018).

2.12 Statistical analysis

Data are represented as the means \pm DS of at least three experiments. A non-linear regression was made for the dose/response curve, and a two-way ANOVA for the mechanism of action assays. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism v. 8 and deemed significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Mastoparan-derived peptides keep cellular viability.

The initial assays with the peptides were performed to determine cellular viability and the MNTC (CC20 or 80% of cellular viability). The peptides mast-MO and mast-L showed over 90% cellular viability at 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure 1A), therefore unable to determine the IC50. However, [I⁵, R⁸] mast allowed 80% of viability at 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Thus, the concentration of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ was determined to standardize and compare the activities of the molecules in subsequent trials.

3.2 Synthetic mastoparan analogs have antiviral activity in infected cell culture

Regarding the *in vitro* antiviral assays mast-L, mast-MO, and [I⁵, R⁸] mast at 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inhibited HSV-1 replication at 72%, 86%, and 86%, respectively (Figure 1B). The antiviral acyclovir (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) was used as a positive inhibition control. In further assays, [I⁵, R⁸] mast caused 99% of viral inhibition in the virus pre-treatment assay, inhibition of adsorption, and penetrations assays, whereas mast-MO showed 99% of inhibition in the penetration step (Figure 1C). Afterward, serial dilutions of both peptides were tested against the virus. Following the dose/response curve, the [I⁵, R⁸] mast showed viral inhibition in a dose-dependent manner. Thus, at the highest concentrations, 50 and 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, [I⁵, R⁸] mast inhibited viral replication by up to 99% (standard deviation = 1) and 96% (SD = 3), respectively (Figure 1D). However, at a concentration of 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the PI reached up to 75% (SD = 7). At the lowest concentrations of 6.25 and 3.12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the PI was 51% (SD = 14) and 21% (SD = 15), respectively. Furthermore, the defined EC50 and selectivity index (SI) of the peptide were

approximately $6.22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and 8, respectively (Figure 1D). The CC50 value used for the calculation was $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. At a concentration of $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mastoparan MO exhibited the greatest inhibition. However, at concentrations of $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and below, the percentage of inhibition decreased to less than 20% and eventually reached 0%. Whereas the defined EC50 and SI of the peptide were approximately $6.68 \mu\text{g.mL}^{-1}$

3.3 Mastoparan-derived peptides can assume an alpha helix structure

Since the molecule structures of mastoparan L (ID: 6DUL) and mastoparan MO (ID:6DUU) are already available and were well described previously (SILVA et al., 2020), both CD and NMR analyses were carried out to determine $[I^5, R^8]$ mastoparan possible structure.

According to the CD analyses, $[I^5, R^8]$ mastoparan assumes an α -helix conformation in the presence of TFE and SDS- d_{25} in the absence of buffer (Figure 2A). In contrast, the peptide forms a random coil in water and in non-buffered DPC micelles. The observed positive band values close to 190 nm and minima near 208 and 222 nm are expected from α -helical structures. The highest α -helical content recorded was in the TFE/water mixture (1:1), indicating a stable secondary structure. The same behavior was observed when peptides were added to other hydrophobic/hydrophilic interfaces, such as SDS-acetate, SDS-Tris, SDS-glycine, and non-buffered SDS (Figure 2C).

The α -helical structure of $[I^5, R^8]$ mastoparan was confirmed by 2D-NMR spectroscopy in deuterated SDS- d_{25} micelles. Therefore, the structure determination by NMR analyses was realized by assembling 159 distance restrictions, but only the ten with less energy were considered. The TOCSY and NOESY analyses were performed simultaneously, and the peptide's secondary

structure was predicted by chemical-shift index (CSI) (figure 2D) using CcpNmr Analysis software.

The CSI showed [I⁵, R⁸] mast assuming an α -helix (figure 1A) structure between residues Asn-2 and Lys-12. The peptide presents four positively charged residues, located on the same face and on the opposite face, the apolar residues (Leu-3, Leu-6, Leu-7, Ala-10, and Leu-14), which seem essential in the interaction with the membrane. The overall [I⁵, R⁸] mast biophysical characteristics are significant indicators of antiviral activity.

3.4 [I⁵, R⁸] mastoparan keeps lipids fluidity of mimetics membranes

Peptides from the mastoparan family and their analogs can interact with membranes, leading to potential disruption of bacterial membranes and viral envelopes (RUCZYŃSKI et al., 2022; SAMPLE et al., 2013). Based on the structural data of [I⁵, R⁸] masto, it is inferred that this peptide can also affect lipid vesicles, mimicking envelope structures. Therefore, lipid vesicles (LUVs) labeled with fluorescent probes were set to interact with different concentrations of [I⁵, R⁸] masto. Such vesicles contained different compositions of lipids mimicking biological membranes. According to the readings obtained from the LUVs marked with the TMA-DPH (Figure 3A) and DPH probes (Figure 3b), it was possible to observe that, even at higher peptide concentrations, there was no membrane fluidity interference, regardless of their lipid composition.

4. DISCUSSION

Developing new antiviral therapies is an elaborate task, as viruses have unique replication mechanisms and often rapidly mutate, making them difficult to target (GROAZ; DE CLERCQ; HERDEWIJN, 2021). Moreover, many viruses are poorly understood, so no effective treatments exist. Therefore, research efforts are imperative to identify new targets and develop novel antiviral strategies (ASHAOLU et al., 2021).

The discovery of peptide-based drugs has gained the interest of the scientific community. This class of compounds could be used as a therapy complement or, in some cases, an alternative to small molecules (HOLLMANN et al., 2021). A rich source of antiviral peptides is the venom of certain animals, such as arthropods. Recently, a peptide called Smp76, purified from the venom of the scorpion *Scorpio maurus palmatus*, exhibited antiviral activity against Hepatitis C and dengue viruses. The authors state that this peptide prevented viral infection in cell cultures by neutralizing HCV and dengue virions (38). In another study, a screening of peptides from *Euscorpis Validus*' venom identified the antiviral peptide Eva1418 against HSV-1. The authors successfully enhanced this peptide's cellular uptake and intracellular distribution by introducing histidine residues, which increased its helix-forming capability and amphiphilicity(39). In addition, spider venom-derived peptides have shown antiviral activity against different enveloped viruses, such as dengue, zika (19,40), measles, and influenza (RICILUCA et al., 2021) .

The peptide mast-L, derived from wasp venom, has proven to be a promising template for designing new peptides, as shown in recent publications from our group (IRAZAZABAL et al., 2016; SILVA et al., 2020). In the present

study, the peptides derived from mast-L, namely [I⁵, R⁸] mastoparan and mast-MO, also exhibited antiviral activity against HHV-1. It was observed that viral replication was inhibited by up to 99%, particularly during the initial stages of infection. Both peptides achieved this by directly inactivating HSV-1 particles, including the stages of adsorption and penetration. Indeed, virucidal activity is a common trait among antiviral peptides. For this reason, [I⁵, R⁸] masto and mast-MO can be classified as entry inhibitors, for which characteristics such as cationic and hydrophobicity play a significant role, primarily against enveloped viruses (BADANI; GARRY; WIMLEY, 2014; WANG; SHIH; CHANG, 2017). Another mastoparan-derived peptide has already shown activity against enveloped viruses. The mastoparan 7 (MP7-NH₂) presented broad antiviral activity against enveloped viruses such as vesicular stomatitis virus (VSV), vaccinia, cowpox, yellow fever virus, respiratory human syncytial virus, and HSV-1. Moreover, transmission electron microscopy analysis showed that the VSV viruses treated with MP7-NH₂ had envelope damage, with their capsid separated from the envelope (SAMPLE et al., 2013).

Indeed, most medically relevant viral diseases are caused by membrane/envelope viruses. Viral envelopes are complex structures taken from the host cell membranes with critical viral glycoproteins attached (PATTNAIK; CHAKRABORTY, 2020). Therefore, entry inhibitors antiviral peptides may exert their activity by envelope disruption (LEE et al., 2021; MONTEIRO et al., 2018), driving aggregation and/or intervention envelope fusion (HOFFMANN et al., 2020). AVPs may also interact with the surface viral protein during critical conformational changes (FUNG; GUO, 2004; LIN et al., 2017; YU et al., 2013b). The secondary structure is an important feature to achieve this. Numerous

reports state that mastoparans depend on the alpha helix structure to exert their antimicrobial activity. Both CD and NMR analysis confirmed such structure for [I⁵, R⁸] mastoparan since mast-L and mast-MO structures were well described previously (23,51). The results showed that [I⁵, R⁸] mastoparan has cationic properties due to its +4 charge attributed to the presence of lysines and arginine residues in its structure.

Upon contact with the membrane lipid bilayer, mastoparans adopt an amphipathic helical structure with distinct hydrophobic and hydrophilic faces, causing membrane destabilization. On the other hand, when mastoparans encounter hydrophobic/hydrophilic interfaces, like the one between bacterial membranes and the surrounding environment, they typically form an α -helix (TORRES et al., 2018). The same might happen in the presence of viral envelopes.

However, this can be challenging as the lipid compositions of both host cell and viral envelope membranes are often quite similar. Therefore, the selectivity relies on these differences, such as charge, rigidity, or fluidity (PARK; TAE; CHO, 2021). Hence, an assay with lipid bilayer micelles marked with fluorescence probes was carried out to infer possible envelope/peptide interactions. The lipid bilayers containing different lipid compositions were tested against increasing concentrations of [I⁵, R⁸] mast. The LUVs marked with TMA-DPH and DPH showed no difference in fluidity and polarity even in the higher concentrations of [I⁵, R⁸] mast. The peptide may induce subtle changes for TMA-DPH and DPH probe detection, or other interactions may occur that require further investigation with additional techniques.

Furthermore, it is essential to consider the possibility that [I⁵, R⁸] mastoparan and mast-MO may have their impact on the host cell receptor or could be interacting with viral surface proteins. While we cannot dismiss this possibility, further assays are needed to comprehend the mechanisms involved in viral inhibition fully.

5. Conclusions

In summary, we gathered evidence of the antiviral activity of three synthetic peptides derived from mastoparan. The mast-MO and [I⁵, R⁸] mastoparan have proven promising molecules for HSV-1 infection control and may also inhibit other viruses. Due to their multifunctional properties, the mastoparan-derived peptides are valuable assets in the ongoing fight against viral infections. Indeed, emerging viral infections pose a significant challenge to public health, given the potential risk of epidemics and pandemics such as Covid-19. Therefore, advances in antiviral research are a critical aspect in this field.

KEYWORDS

Antiviral peptides, mastoparan, envelope interaction, HSV-1

FUNDINGS

Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), supported this work.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

The authors declare no conflict of interest. All authors contributed to the study design, data analysis or interpretation, and manuscript revision. Liana

Costa Pereira Vilas Boas performed material preparation and data collection. All authors approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

6. REFERENCES

ALBIOL MATANIC, V. C.; CASTILLA, V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 4, p. 382–389, 2004.

ALTMANN, S. E. et al. Antiviral activity of the EB peptide against zoonotic poxviruses. **Virology Journal**, v. 6, n. 9, p. 1–6, 2012.

ANDREI, G. et al. Heterogeneity and evolution of thymidine kinase and DNA polymerase mutants of herpes simplex virus type 1: Implications for antiviral therapy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 8, p. 1295–1305, 15 abr. 2013.

ASHAOLU, T. J. et al. Potential “biopeptidal” therapeutics for severe respiratory syndrome coronaviruses: a review of antiviral peptides, viral mechanisms, and prospective needs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 3457–3470, 2021.

BADANI, H.; GARRY, R. F.; WIMLEY, W. C. Peptide entry inhibitors of enveloped viruses: The importance of interfacial hydrophobicity. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 9, p. 2180–2197, 2014.

BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. **Journal of Visualized Experiments**, 2014.

BAGCCHI, S. WHO estimates suggest large herpes simplex virus burden. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 155, fev. 2016.

BARLOW, P. G. et al. Antiviral potential of cathelicidins. **Future Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 55–73, 2014.

BASHIR UDDIN, M. et al. Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 853–866, 2016a.

BASHIR UDDIN, M. et al. Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 853–866, 2016b.

BELTRÁN LISSABET, J. F.; BELÉN, L. H.; FARIAS, J. G. AntiVPP 1.0: A portable tool for prediction of antiviral peptides. **Computers in Biology and Medicine**, v. 107, p. 127–130, abr. 2019.

BERGAOUI, I. et al. In vitro antiviral activity of dermaseptin S4 and derivatives from amphibian skin against herpes simplex virus type 2. **Journal of Medical Virology**, v. 85, n. 2, p. 272–281, 2013.

CAIRNS, T. M. et al. Surface plasmon resonance (SPR) reveals direct binding of HSV glycoproteins gH/gL to gD and locates a gH/gL binding site on gD. **Journal of Virology**, n. May, 2019.

CHAHDI, A. et al. Mastoparan selectively activates phospholipase D2 in cell membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 14, p. 12039–12045, 4 abr. 2003.

CHEN, Y. et al. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–9, 2012.

CHEN, Y. H. Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. **Biochemistry**, v. 13, n. 16, p. 3350–3359, 1 jul. 1974.

COHEN, F. S. How Viruses Invade Cells. **Biophysical Journal**, v. 110, n. 5, p. 1028–1032, 2016.

CONNOLLY, S. A.; JARDETZKY, T. S.; LONGNECKER, R. The structural basis of herpesvirus entry. **Nature reviews. Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 110–121, 1 fev. 2021.

COOPER, R. S. et al. Structural basis for membrane anchoring and fusion regulation of the herpes simplex virus fusogen gB. 2018.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 181–192, 2019.

DE CLERCQ, E.; LI, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 695-, 2016.

DE OLIVEIRA, A. et al. Inhibition of Herpes Simplex Virus type 1 with the modified green tea polyphenol palmitoyl-epigallocatechin gallate. **Food Chem Toxicol**, v. 52, p. 207–215, 2013.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos, CA, USA, 2002.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: Lytic activity and clustering observed with giant vesicles. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 10805–10813, 6 set. 2011.

DUBÉ, E.; VIVION, M.; MACDONALD, N. E. Vaccine hesitancy, vaccine refusal and the anti-vaccine movement: influence, impact and implications. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 1, p. 99–117, 2 jan. 2015.

EL RAZIKY, M. et al. The effect of peginterferon alpha-2a vs. peginterferon alpha-2b in treatment of naive chronic HCV genotype-4 patients: A single centre egyptian study. **Hepatitis Monthly**, v. 13, n. 5, p. 1–8, 2013.

EL-BITAR, A. M. H. et al. Smp76, a Scorpine-Like Peptide Isolated from the Venom of the Scorpion *Scorpio maurus palmatus*, with a Potent Antiviral Activity Against Hepatitis C Virus and Dengue Virus. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 811–821, 2020.

FENNER. Smallpox and its eradication. **Journal of epidemiology and community health**, v. 43, n. 1, p. 92, 1989.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Guidance for industry Antiviral Product Development – Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency**. Disponível em: <www.fda.gov/dockets/ecomments>.

FUNG, H. B.; GUO, Y. Enfuvirtide: A fusion inhibitor for the treatment of HIV infection. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 352–378, 2004.

GALDIERO, S. et al. Peptide inhibitors against herpes simplex virus infections. **Journal of Peptide Science**, v. 19, n. 3, p. 148–158, 2013.

GALEANE, M. C. et al. Study of mastoparan analog peptides against *Candida albicans* and safety in zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Future Microbiology**, v. 14, n. 13, p. 1087–1097, set. 2019.

GATHERER, D. et al. ICTV virus taxonomy profile: Herpesviridae 2021. **Journal of General Virology**, v. 102, n. 10, 2021.

GOMES, B. et al. Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 415–429, 2018.

GROAZ, E.; DE CLERCQ, E.; HERDEWIJN, P. Anno 2021: Which antivirals for the coming decade? Em: **Annual Reports in Medicinal Chemistry**. [s.l.] Academic Press Inc., 2021. v. 57p. 49–107.

HANSEN, F.; FELDMANN, H.; JARVIS, M. A. Targeting Ebola virus replication through pharmaceutical intervention. <https://doi.org/10.1080/13543784.2021.1881061>, v. 30, n. 3, p. 201–226, 2021.

HARRISON, S. C. Viral membrane fusion. **Virology**, 2015.

HIRAI, Y. et al. A new mast cell degranulating peptide “mastoparan” in the venom of *Vespula lewisii*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1942–1944, 1979.

HOFFMANN, A. R. et al. Broad-Spectrum Antiviral Entry Inhibition by Interfacially Active Peptides. **Journal of Virology**, v. 94, n. 23, 9 nov. 2020.

HOLLMANN, A. et al. Review of antiviral peptides for use against zoonotic and selected non-zoonotic viruses. **Peptides**, 1 ago. 2021.

HONG, W. et al. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 102, p. 1–10, 2014a.

HONG, W. et al. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 102, p. 1–10, 2014b.

HUI, D. S. C.; LEE, N.; CHAN, P. K. S. A clinical approach to the threat of emerging influenza viruses in the Asia-Pacific region. **Respirology**, v. 22, n. 7, p. 1300–1312, 1 out. 2017.

IRAZAZABAL, L. N. et al. Selective amino acid substitution reduces cytotoxicity of the antimicrobial peptide mastoparan. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 11, p. 2699–2708, 1 nov. 2016.

JACKMAN, J. A.; SHI, P. Y.; CHO, N. J. Targeting the Achilles Heel of Mosquito-Borne Viruses for Antiviral Therapy. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 4–8, 1 nov. 2019.

JAMES, C. et al. Herpes simplex virus: Global infection prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 98, n. 5, p. 315–329, 1 maio 2020.

JESUS, T. et al. Prediction of antiviral peptides derived from viral fusion proteins potentially active against herpes simplex and influenza A viruses. **Bioinformatics**, v. 8, n. 18, p. 870–874, 2012.

JI, M. et al. An Antiviral Peptide from *Alopecosa nagpag* Spider Targets NS2B-NS3 Protease of Flaviviruses. **Toxins**, v. 11, p. 584, 2019.

JOSE, G. G. et al. A cationic peptide, TAT-Cd0, inhibits herpes simplex virus type 1 ocular infection in vivo. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 54, n. 2, p. 1070–1079, 2013.

KARASNEH, G. A.; SHUKLA, D. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: Clues to its success. **Virology Journal**, 2011.

KINDRACHUK, J.; NIJNIK, A.; HANCOCK, R. E. W. Host Defense Peptides: Bridging Antimicrobial and Immunomodulatory Activities*. Em: **Comprehensive Natural Products II**. [s.l.: s.n.].

KONNO, K. et al. New Mastoparan Peptides in the Venom of the Solitary Eumenine Wasp *Eumenes micado*. **Toxins**, v. 11, p. 155, 2019.

KUCZER, M. et al. Studies of insect peptides alloferon, Any -GS and their analogues. Synthesis and antiherpes activity. **Journal of Peptide Science**, v. 16, n. 4, p. 186–189, 2010.

KUCZER, M. et al. Further studies on the antiviral activity of alloferon and its analogues. **Journal of Peptide Science**, v. 17, n. 11, p. 715–719, nov. 2011.


KUCZER, M.; MAJEWSKA, A.; ZAHORSKA, R. New alloferon analogues: synthesis and antiviral properties. **Chemical biology & drug design**, v. 81, n. 2, p. 302–309, 2013.

LEE, S. H. et al. The amphibian peptide Yodha is virucidal for Zika and dengue viruses. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

LEHRER, R. I. et al. Natural Peptide antibiotics from tunicates: structures, functions and potential uses. **Integrative and comparative biology**, v. 43, n. 2, p. 313–322, 2003.

LEITE, N. B. et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 91–100, jan. 2011a.

LEITE, N. B. et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 91–100, 1 jan. 2011b.

LI, L. et al. Herpes B virus gD interaction with its human receptor  an in silico analysis approach. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.tbiomed.com/content/11/1/27>>.

LI, Q. et al. Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1518–1525, 2011.

LIMA, W. G. et al. Animal venoms as a source of antiviral peptides active against arboviroses: a systematic review. **Archives of Virology**, v. 167, n. 9, p. 1763–1772, 2022.

LIN, D. et al. Potent influenza A virus entry inhibitors targeting a conserved region of hemagglutinin. **Biochemical Pharmacology**, v. 144, p. 35–51, nov. 2017.

LOOKER, K. J. et al. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015a.

LOOKER, K. J. et al. Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2015b.

LOWE, R. et al. The zika virus epidemic in brazil: From discovery to future implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 96, p. 1–18, 2018.

LU, C.-C.; CHEN, M.-Y.; CHANG, Y.-L. Potential therapeutic agents against COVID-19. **Journal of the Chinese Medical Association**, p. 1, 2020.

LU, N. et al. Vesicle deposition and subsequent membrane-melittin interactions on different substrates a QCM-D experiment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, n. 8, p. 1918–1925, 20 abr. 2013.

MAHMOUD, A. New vaccines: challenges of discovery. **Microbial biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 549–52, 2016.

MARCOCCI, M. E. et al. The amphibian antimicrobial peptide temporin b inhibits in vitro herpes simplex virus 1 infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 1–13, 2018.

MARR, A. K. et al. Bovine lactoferrin and lactoferricin interfere with intracellular trafficking of Herpes simplex virus-1. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 160–164, 2009.

MATTHIAS, J. et al. Estimating Neonatal Herpes Simplex Virus Incidence and Mortality Using Capture-recapture, Florida. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 3, p. 506–512, 1 ago. 2021.

MAXIMIANO, M. R. et al. Screening for cysteine-stabilized scaffolds for developing proteolytic-resistant AMPs. **Methods in Enzymology**, v. 663, p. 67–98, 1 jan. 2022.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. **Biochimica et biophysica acta**, v. 858, n. 1, p. 161–168, 13 jun. 1986.

MELCHJORSEN, J. Sensing herpes: more than toll. **Reviews in Medical Virology**, v. 22, n. 2, p. 106–121, 1 mar. 2012.

MEMARIANI, H. et al. Melittin: from honeybees to superbugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 3265–3276, 2019.

MENÉNDEZ-ARIAS, L.; ÁLVAREZ, M. Antiretroviral therapy and drug resistance in human immunodeficiency virus type 2 infection. **Antiviral Research**, v. 102, p. 70–86, 1 fev. 2014.

MONTEIRO, J. M. C. et al. The antimicrobial peptide HS-1 inhibits dengue virus infection. **Virology**, v. 514, p. 79–87, 2018.

MORENO, M.; GIRALT, E. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. **Toxins**, 1 abr. 2015.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 45, n. 382, 1960.

MUSTAFA, S.; BALKHY, H.; GABERE, M. N. Current treatment options and the role of peptides as potential therapeutic components for Middle East Respiratory Syndrome (MERS): A review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 1, p. 9–17, 2018.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, set. 2011.

NIGRO, E. et al. Host defense peptide-derived privileged scaffolds for anti-infective drug discovery. **Journal of Peptide Science**, v. 23, n. 4, p. 303–310, abr. 2017.

OKAZAKI, K.; KIDA, H. A synthetic peptide from a heptad repeat region of herpesvirus glycoprotein B inhibits virus replication. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2131–2137, 2004.

OLDSTONE, M. **Viruses, Plagues and History - Past, Present and Future**. [s.l: s.n.].

OSHIRO, K. G. N. et al. Computer-Aided Design of Mastoparan-like Peptides Enables the Generation of Nontoxic Variants with Extended Antibacterial Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 17, p. 8140–8151, 12 set. 2019.

PARK, S.; TAE, H.; CHO, N. J. Biophysical Measurement Strategies for Antiviral Drug Development: Recent Progress in Virus-Mimetic Platforms down to the Single Particle Level. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 16, p. 3204–3214, 17 ago. 2021.

PATTNAIK, G. P.; CHAKRABORTY, H. Entry Inhibitors: Efficient Means to Block Viral Infection. *Journal of Membrane Biology*. **Springer**, 1 out. 2020.

PENNINGTON, M. W.; CZERWINSKI, A.; NORTON, R. S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2738–2758, jun. 2018.

PIPERI, E. et al. Management of oral herpes simplex virus infections: The problem of resistance. A narrative review. *Oral Diseases*. **John Wiley and Sons Inc**, 2023.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: Mechanisms, prevalence, and management. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2011. Acesso em: 31 jul. 2019

PIRET, J.; BOIVIN, G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 6, p. 654–662, dez. 2016.

PORTO, W. F.; SILVA, O. N.; FRANCO, O. L. Prediction and Rational Design of Antimicrobial Peptides. Em: FARAGGI, E. (Ed.). **Protein Structure**. InTech, 2012. p. 377–396.

PRUIJSSERS, A. J.; DENISON, M. R. Nucleoside analogues for the treatment of coronavirus infections. **Current Opinion in Virology**, v. 35, p. 57–62, 1 abr. 2019.

RADY, I. et al. Mini-review Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. 2017.

RECHENCHOSKI, D. Z. et al. Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 2, p. 151–156, 2017.

REED, L. J.; MUENCH, H. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493–497, 1938.

RICILUCA, K. C. T. et al. Rondonin: antimicrobial properties and mechanism of action. **FEBS Open Bio**, v. 11, n. 9, p. 2541–2559, 1 set. 2021.

ROBINET-PERRIN, A. et al. Input of recombinant phenotyping for the characterization of a novel acyclovir-resistance mutation identified in a patient with recurrent herpetic keratitis. **Antiviral Research**, 2019.

ROIZMAN, B.; WHITLEY, R. J. An Inquiry into the Molecular Basis of HSV Latency and Reactivation. **Annual Review of Microbiology**, 2013.

ROSSETTI, B. et al. Evolution of transmitted HIV-1 drug resistance and viral subtypes circulation in Italy from 2006 to 2016. **HIV Medicine**, p. 1–10, 2018.

ROTHAN, H. A. et al. Identification of natural antimicrobial agents to treat dengue infection: In vitro analysis of Iatarcin peptide activity against dengue virus. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 140, p. 1–10, 2014.

ROUZINEID, I. M.; ROZHNOVA, G. Antigenic evolution of viruses in host populations. 2018.

RUCZYŃSKI, J. et al. Structure-Activity Relationship of New Chimeric Analogs of Mastoparan from the Wasp Venom *Paravespula lewisii*. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, 1 ago. 2022.

SAMPLE, C. J. et al. A mastoparan-derived peptide has broad-spectrum antiviral activity against enveloped viruses. **Peptides**, v. 48, p. 96–105, 2013.

SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. 3ª Ed ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda., 2015.

SELEY-RADTKE, K. L.; YATES, M. K. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. **Antiviral Research**, v. 154, n. March, p. 66–86, 2018.

SILVA, O. N. et al. Repurposing a peptide toxin from wasp venom into anti-infectives with dual antimicrobial and immunomodulatory properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 43, p. 26936–26945, 27 out. 2020.

SKALICKOVA, S. et al. **Perspective of use of antiviral peptides against influenza virus**. **Viruses** MDPI AG, 20 out. 2015.

SKINNER, S. P. et al. CcpNmr AnalysisAssign: a flexible platform for integrated NMR analysis. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 66, n. 2, p. 111–124, 2016.

SOUZA, B. M. DE et al. Structure-activity relationship of mastoparan analogs: Effects of the number and positioning of Lys residues on secondary structure, interaction with membrane-mimetic systems and biological activity. **Peptides**, v. 72, p. 164–174, 3 mar. 2015.

SOUZA, W. V. DE et al. Microcephaly epidemic related to the Zika virus and living conditions in Recife, Northeast Brazil. **BMC Public Health**, v. 18, n. 130, p. 1–7, 2018.

STRASFELD, L.; CHOU, S. **Antiviral drug resistance: Mechanisms and clinical implications**. **Infectious Disease Clinics of North America**. W.B. Saunders, set. 2010. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552010000565>>. Acesso em: 4 jun. 2020

SUIJKERBUIJK, A. W. M. et al. Ebola in the Netherlands, 2014–2015: costs of preparedness and response. **The European Journal of Health Economics**, v. 19, n. 7, p. 1–9, 17 nov. 2017.

TABAEI, S. R. et al. Single vesicle analysis reveals nanoscale membrane curvature selective pore formation in lipid membranes by an antiviral α -helical peptide. **Nano Letters**, v. 12, n. 11, p. 5719–5725, 14 nov. 2012.

TERWILLIGERT, T. C.; EISENBERGG, D. **The structure of melittin. II. Interpretation of the structure.** **Journal of Biological Chemistry**. [s.l: s.n.]. Acesso em: 2 maio. 2021.

THELLMAN, N. M.; TRIEZENBERG, S. J. Herpes Simplex Virus Establishment, Maintenance, and Reactivation: In Vitro Modeling of Latency. **Pathogens**, v. 6, n. 3, p. 28, 2017.

TOMPA, D. R. et al. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 172, p. 524–541, 1 mar. 2021.

TORRES, M. D. T. et al. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications 1 2. 2018.

TRONSTEIN, E. et al. Genital Shedding of Herpes Simplex Virus Among Symptomatic and Asymptomatic Persons With HSV-2 Infection. **JAMA**, v. 305, n. 14, p. 1441, 13 abr. 2011.

VAN LINT, A. L.; KNIPE, D. M. Herpesviruses. Em: **Encyclopedia of Microbiology**. [s.l: s.n.].

VILAS BOAS, L. C. P. et al. Linear antimicrobial peptides with activity against herpes simplex virus 1 and Aichi virus. **Biopolymers**, v. 108, n. 2, p. 1–20, 2017.

VILAS BOAS, L. C. P. et al. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 0123456789, 2019.

WANG, C.-K.; SHIH, L.-Y.; CHANG, K. Large-Scale Analysis of Antimicrobial Activities in Relation to Amphipathicity and Charge Reveals Novel Characterization of Antimicrobial Peptides. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2037, 2017.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, 2016.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections review. **Lancet**, 2001.

YACOUB, T. et al. Antimicrobials from Venomous Animals: An Overview. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 2402, 21 maio 2020.

YU, D. et al. Molecular mechanism of HIV-1 resistance to sifuvirtide, a clinical trial-approved membrane fusion inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 1, 2018.

YU, F. et al. Approaches for identification of HIV-1 entry inhibitors targeting gp41 pocket. **Viruses**, v. 5, n. 1, p. 127–149, 2013a.

ZAN, G. H.; JACKMAN, J. A.; CHO, N. J. AH peptide-mediated formation of charged planar lipid bilayers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 13, p. 3616–3621, 3 abr. 2014.

ZANNELLA, C. et al. Broad-Spectrum Antiviral Activity of the Amphibian Antimicrobial Peptide Temporin L and Its Analogs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, 1 fev. 2022.

ZENG, Z. et al. Histidine-rich modification of a scorpion-derived peptide improves bioavailability and inhibitory activity against HSV-1. **Theranostics**, v. 8, n. 1, p. 199–211, 2018.

ZINSER, E. et al. A new promising candidate to overcome drug resistant herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 149, n. July 2017, p. 202–210, 2018.

FIGURES

Figure 1 – *In vitro* assays of the peptide mastoparan MO, mastoparan L and [⁵, R⁸] mastoparan. (A) Heat map showing the cell culture viability assays with the three mastoparans by MTT (B) Antiviral triage assay with the three peptides. (B) Time-of-addition assay of the peptides mastoparan MO and [⁵, R⁸] mastoparan. (D) Dose-response curve of the peptides mastoparan MO and [⁵, R⁸] mastoparan. ACV – acyclovir was used as a positive control of inhibition. NT- Not treated

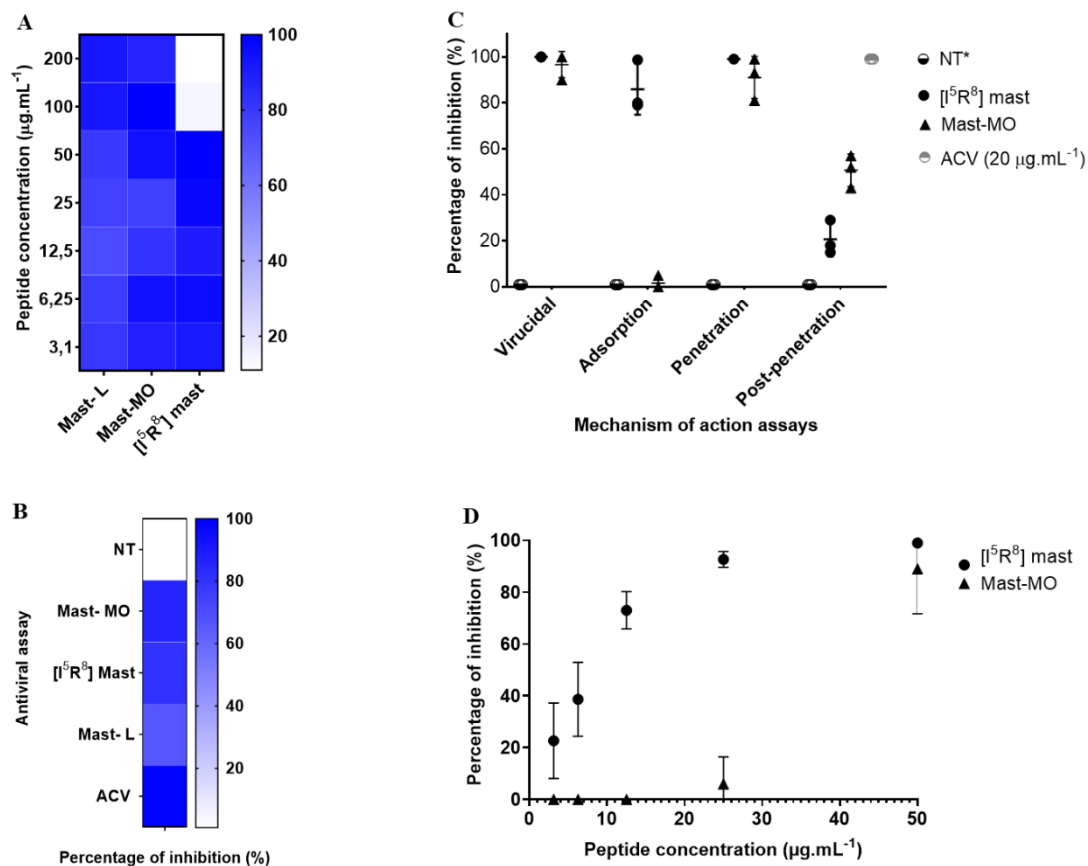


Figure 2 - Tridimensional structure of [⁵, R⁸] mastoparan obtained by nuclear magnetic resonance (NMR). (A) Overlapping of the 10 structures with less

energy. (B) Cloud model structure. (C) Circular dichroism analysis of the peptide $[I^5, R^8]$ mastoparan in sodium dodecyl sulfate (SDS) without buffer (lilac), SDS/Acetate (black), SDS/Tris (red), SDS/Glycine (blue), 50% TFE (green), dodecylphosphocoline without buffer (DPC) (pink) and water (dark blue). (D) Analysis of the connectivity pattern for the peptide $[I^5, R^8]$ mastoparan.

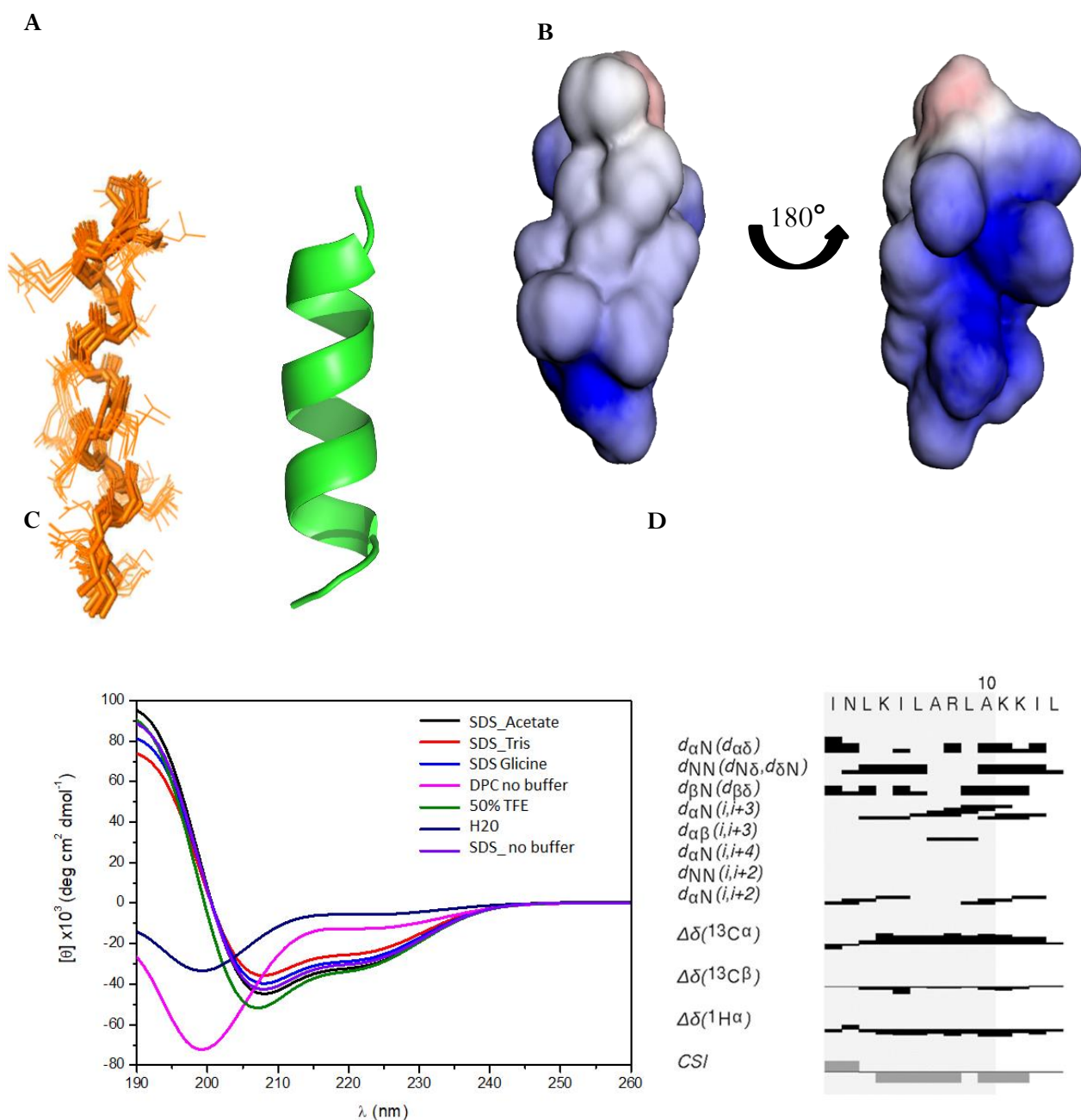
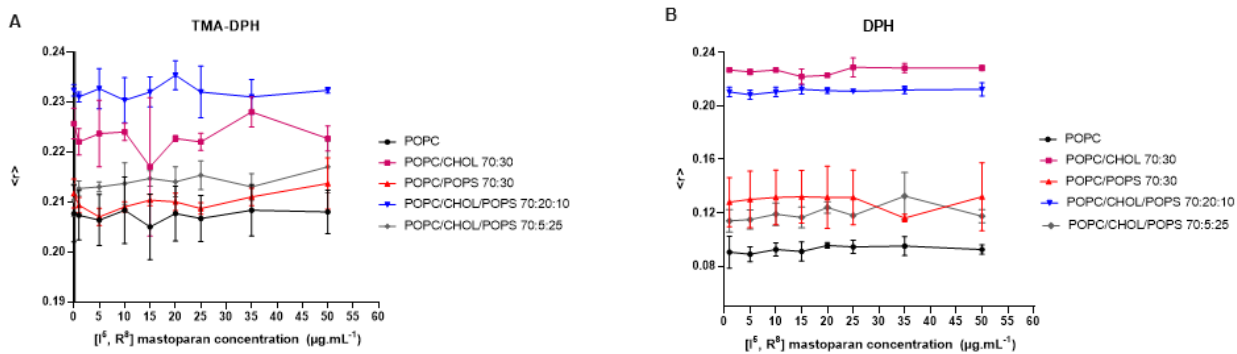


Figure 3 – Interaction of the peptide $[I^5, R^8]$ mastoparan with lipid vesicles marked with TMA-DPH(A) and DPH(B)



3. DISCUSSÃO

Usualmente, as terapias antivirais conhecidas são baseadas em análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos, moléculas pequenas que atuam na inibição da replicação do ácido nucleico viral; interferons sintéticos, que podem ser utilizados em terapias combinadas; e anticorpos monoclonais (TOMPA et al., 2021). Entretanto, esses compostos possuem atividade específica para determinados vírus, e portanto, não são utilizados como medicamentos de amplo espectro. Dessa forma, o desenvolvimento de novas terapias antivirais pode ser uma tarefa complexa, uma vez que os vírus possuem mecanismos únicos de replicação e frequentemente sofrem mutações rápidas, tornando-os difíceis de serem combatidos (GROAZ; DE CLERCQ; HERDEWIJN, 2021).

Por outro lado, algumas famílias virais ainda não são bem compreendidas, o que resulta na ausência de tratamentos eficazes, além de haver crescentes relatos de resistência às drogas utilizadas (STRASFELD; CHOU, 2010), principalmente em pacientes com doenças crônicas (MENÉNDEZ-ARIAS; ÁLVAREZ, 2014; ROBINET-PERRIN et al., 2019; YU et al., 2018). Outro desafio enfrentado pelos estudiosos reside na capacidade de antecipar o surgimento de novos vírus e prever epidemias/pandemias, sendo fundamental a identificação de novos alvos e desenvolvimento de estratégias antivirais inovadoras (ASHAOLU et al., 2021; LU; CHEN; CHANG, 2020). Neste cenário, a descoberta de medicamentos baseados em peptídeos tem atraído significativo interesse por parte da comunidade científica. Considera-se que peptídeos antivirais possam ser utilizados como terapias complementares, ou, em alguns casos, como alternativas viáveis às pequenas moléculas (HOLLMANN et al., 2021).

Dentre as vantagens dos AVPs pode-se citar a alta especificidade e eficácia, baixo limiar para surgimento de resistência, baixa toxicidade e biodegradabilidade por peptidases (o que limita o acúmulo em tecidos), e baixo peso molecular. Por outro lado, a curta meia-vida, o potencial imunogênico, o alto custo de produção e a baixa absorção oral são algumas das limitações no uso desses compostos antivirais (VILAS BOAS et al., 2019).

Pesquisas indicam que a construção de análogos de peptídeos conhecidos pode modificar tanto o alvo quanto o mecanismo de ação dessas moléculas. Ainda que algumas regiões das sequências peptídicas sejam conservadas, a

substituição de resíduos pontuais pode afetar as atividades biológicas do peptídeo em questão (PORTO; SILVA; FRANCO, 2012). Deste modo, a abordagem de melhoramento tem sido amplamente utilizada em peptídeos antimicrobianos de forma geral (NIGRO et al., 2017; ZANNELLA et al., 2022).

Peçonha de artrópodes consistem em uma fonte abundante de peptídeos com propriedades antivirais (LIMA et al., 2022; YACOUB et al., 2020) que podem servir como modelo para melhoramento. Em estudos recentes, Kuczer e seus colaboradores testaram o alloferon 1 e alguns análogos contra o HHV-1 e o coxsackievírus B2 (CBV-2) em três tipos diferentes de cultura celular (KUCZER et al., 2010, 2011). Os resultados demonstraram atividade inibitória do peptídeo original e dos análogos 1 e 2, que reduziram consideravelmente a replicação viral após 24 horas de contato no ensaio *in vitro*. Além disso, os alloferons 2, 4, 5 e 9 também apresentaram inibição do HHV-1. Os análogos 1 e 4 mostraram a melhor atividade inibitória contra o CBV-2, ambos com modificações em suas porções N-terminais. Os estudiosos apontaram que o alloferon 1 mostrou-se um candidato promissor para o desenvolvimento de novos peptídeos antivirais, devido à sua ótima atividade inibitória e ausência de toxicidade em células de mamíferos. No entanto, concluíram que o mecanismo de ação dos peptídeos dessa família, ainda precisam ser completamente elucidados (KUCZER; MAJEWSKA; ZAHORSKA, 2013).

Já o peptídeo Bmkn2, da peçonha do escorpião *Mesobuthus martensii*, passou por modificações que originaram outro peptídeo com 13 resíduos de aminoácidos, chamado Kn2-7. Os pesquisadores substituíram os resíduos de glicina, alanina e serina na sequência primária do Bmkn2, por lisinas e argininas, afim de melhorar a carga positiva no lado hidrofílico da molécula. Em ensaios *in vitro*, o Kn2-7 demonstrou baixa citotoxicidade e atividade antiviral contra 13 variantes do HIV-1 subtipo B, alcançando quase 99 % de inibição viral a 16 µg.mL⁻¹, por meio da inativação direta da partícula viral. Os autores, descrevem que o Kn2-7 apresenta-se como um candidato promissor a medicamento antiviral (CHEN et al., 2012).

Dentre as moléculas já descritas, os mastoparanos constituem uma família de peptídeos produzidos por vespas, já são bem conhecidos na comunidade científica por suas diversas atividades antibacterianas, antifúngicas e

antitumorais (DOS SANTOS CABRERA et al., 2011; GALEANE et al., 2019; MORENO; GIRALT, 2015). Outra função relacionada aos mastoparanos consiste em sua atuação como parte dos chamados *cell-penetrating peptides* (CPPs), pois demonstram potencial farmacêutico significativo por facilitar a entrega de diversas moléculas (como plasmídeos, DNA, siRNA, proteínas, peptídeos e fármacos de baixo peso molecular) às células sem provocar danos (RUCZYŃSKI et al., 2022). Derivado do veneno de *Vespula lewisii*, o mast-L tem se mostrado um modelo promissor para o desenvolvimento de novos peptídeos, como explicitado em publicações recentes do nosso grupo (IRAZAZABAL et al., 2016; OSHIRO et al., 2019; SILVA et al., 2020). No presente estudo, tanto o mast-L quanto os peptídeos derivado dele, [I⁵, R⁸] mastoparano e mastoparano-MO, apresentaram atividade antiviral contra o HHV-1. Inicialmente, ensaios de citotoxicidade em cultura de células Vero foram realizados com os três peptídeos para determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT). O inóculo inicial feito com 200 µg.mL⁻¹ do mastoparano-MO e L permitiu a sobrevivência das células, mas não foi possível determinar a concentração citotóxica para 50 % da cultura celular (CC₅₀). Entretanto, a mesma concentração do [I⁵, R⁸] mastoparano demonstrou-se citotóxica, sendo que somente abaixo de 50 µg.mL⁻¹ foi possível observar mais de 80 % de viabilidade celular (concentração citotóxica para apenas 20 % - CC₂₀).

Já pelos ensaios antivirais *in vitro*, observou-se na concentração de 50 µg.mL⁻¹, que os peptídeos mast-MO, mast-L e [I⁵, R⁸] mast apresentaram 86 %, 72 %, e 86 % de inibição viral, respectivamente. A seguir, foram realizados ensaios por etapa de replicação (virucida, adsorção e penetração e pós-penetração). Foi possível observar até 99 % de inibição da replicação viral principalmente nos primeiros estágios da infecção, pois os peptídeos [I⁵, R⁸] mast e mast-MO inativaram diretamente a partícula do HHV-1. Já nas etapas de adsorção e penetração, o [I⁵, R⁸] mast mostrou inibição de mais de 90 %, porém o mast-MO impediu apenas a etapa de penetração viral com até 99 %, como demonstrado na figura 3C. De fato, atividade virucida tem sido comum entre peptídeos antivirais. Entretanto características como cationicidade e hidrofobicidade aparentemente são muito importantes, principalmente contra vírus envelopados (BADANI; GARRY; WIMLEY, 2014; WANG; SHIH; CHANG, 2017). Por esta

razão, [I⁵, R⁸] mast e mast-MO podem ser considerados peptídeos inibidores de entrada.

Além disso, no ensaio de curva dose/resposta, diluições seriadas dos peptídeos foram testadas contra o HHV-1. O peptídeo [I⁵, R⁸] mast apresentou um perfil de inibição dependente da sua concentração. Foi observado que nas maiores concentrações, 50 e 25 µg.mL⁻¹, o peptídeo [I⁵, R⁸] mast inibiu a replicação viral em até 99 % (Desvio padrão = 1) e 96 % (DP = 3), respectivamente. Entretanto, na concentração de 12,5 µg.mL⁻¹, ainda foi possível observar inibição, uma vez que a porcentagem de inibição encontrada foi de até 75 % (DP = 7). Nas concentrações mais baixas de 6,25 e 3,12 µg.mL⁻¹, as porcentagens de inibição encontradas foram de 51 % (DP = 14) e 21 % (DP = 15), respectivamente. Em relação ao peptídeo mastoparano MO observou-se que apenas na sua maior concentração testada houve inibição satisfatória da replicação viral, atingindo 99% a 50 µg.mL⁻¹ (DP = 17). A partir de 25 µg.mL⁻¹, a porcentagem de inibição caiu para menos de 20% (DP = 10) até chegar a 0% nas menores concentrações.

Por meio dos resultados dessa curva foi possível definir o CE₅₀ e o índice de seletividade (IS) dos peptídeos. Por ser importante estabelecer uma concentração do medicamento *in vivo* que não seja tóxica para as células do hospedeiro, o índice de seletividade foi calculado nos ensaios *in vitro*, entre a razão do CC₅₀ e da CE₅₀. O valor considerado desejável deve ser maior ou igual a 10, representando uma máxima atividade antiviral com mínima citotoxicidade (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2006). Dessa forma, para o [I⁵, R⁸] mast calculou-se o CE₅₀ de aproximadamente 6,22 µg.mL⁻¹, e IS de 8, o valor de CC₅₀ usado para o cálculo foi de 50 µg.mL⁻¹. Para o mast-MO, devido a significativa variação de porcentagem de inibição entre 50 e 25 µg.mL⁻¹, não foi possível determinar com precisão o CE₅₀ desse peptídeo, por conseguinte, o IS também não pode ser calculado.

Outro peptídeo derivado de mastoparanos já apresentou uma ampla atividade antiviral especialmente contra vírus envelopados. O mastoparano 7 (MP7-NH2) demonstrou atividade inibitória contra o VEV, vaccinia, varíola bovina, vírus da febre amarela, vírus sincicial respiratório (RSV), e contra o HHV-1. Em ensaio *in*

vivo, o pesquisadores demonstraram que o animais que foram infectados com amostras do VEV recombinante pré-tratadas com o peptídeo, não apresentavam sinais clínicos da infecção. Ademais, análises de microscopia de transmissão eletrônica em células infectadas pelo VEV e tratadas com MP7-NH2 mostraram que o envelope viral foi danificado (SAMPLE et al., 2013).

Demais peptídeos de artrópodes também têm apresentado atividade virucida. O peptídeo Smp76, por exemplo, purificado a partir do veneno do escorpião *Scorpio maurus palmatus*, inativou as partículas virais dos flavivírus HCV e dengue (EC_{50} 10ng.mL⁻¹). Ainda que o Smp76 não tenha inibido a replicação viral nas demais etapas, apresentou-se não-citotóxico, não-hemolítico, e atingiu um IS >1000 (EL-BITAR et al., 2020).

Por outro lado, o mucroporin-M1, um peptídeo sintético derivado do escorpião *Lychas mucronatus*, apresentou notável atividade inibitória contra o vírus do sarampo, influenza H5N1 e contra o SARS-CoV. A diferença entre o mucroporin-M1 e a molécula original está na substituição de todos os resíduos de glicina e prolina por arginina ou lisina, o que confere à variante uma carga líquida positiva maior no lado hidrofílico do peptídeo, melhorando a interação com envoltórios virais (LI et al., 2011), como observado no [I⁵, R⁸] mastoparano.

A bem da verdade, a maioria das doenças virais de relevância médica são causadas por vírus envelopados. O envelope é uma estrutura complexa, derivada de membranas das células hospedeiras, nas quais são inseridas glicoproteínas virais (PATTNAIK; CHAKRABORTY, 2020). A interação entre as glicoproteínas virais e os receptores da célula hospedeira leva a um remodelamento da membrana, que resulta em: ou fusão entre a membrana viral e a membrana da superfície celular, ou endocitose da partícula viral seguida de fusão desencadeada pela acidez de endossomos, a depender do tipo de vírus (COHEN, 2016). Deste modo, a fusão entre o vírus e a célula desempenha um papel importante na liberação do material genético viral para que a replicação ocorra dentro das células infectadas (HARRISON, 2015). Assim, peptídeos antivirais inibidores de entrada podem executar essa atividade danificando a estrutura do envelope (LEE et al., 2021; MONTEIRO et al., 2018), induzindo agregação das partículas virais e/ou interferindo no processo de fusão do envoltório com a membrana plasmática (HOFFMANN et al., 2020).

Para tanto, a formação da estrutura secundária parece ser uma característica importante. Inúmeros estudos mostram que mastoparanos dependem da formação de uma estrutura em α -hélice para exercerem sua atividade antimicrobiana (RUCZYŃSKI et al., 2022). Dessa forma, em ensaios prévios, a estrutura secundária dos peptídeos mast-L e mast-MO (OSHIRO et al., 2019; SILVA et al., 2020) já haviam sido resolvidas e por meio de simulações de modelagem molecular, sugeriu-se que o peptídeo [I⁵, R⁸] mastoparano poderia formar uma estrutura em α -hélice na presença de micelas de dioleoilfosfatidilcolina (DPOC) (IRAZAZABAL et al., 2016).

No presente trabalho, por meio de análises de dicroísmo circular (DC) e ressonância magnética nuclear (RMN), confirmou-se a estrutura secundária do [I⁵, R⁸] mastoparano como sendo de fato uma α -hélice. Além disso, os resultados mostraram que o [I⁵, R⁸] mastoparano é um peptídeo catiônico, pois apresenta uma carga +4 pela presença de resíduos de lisinas e arginina em sua estrutura, diferente do seu parental (mast-L) que possui carga +3 (OSHIRO et al., 2019). Estudos mostram que mastoparanos com cargas positivas nas posições 4/5 e/ou 11 a 13 demonstram alta atividade antimicrobiana. No entanto, peptídeos com cargas positivas no meio da cadeia resultaram em atividade reduzida (LEITE et al., 2011a; SOUZA et al., 2015).

Ademais, quando em contato com a bicamada lipídica da membrana, os mastoparanos adotam uma estrutura helicoidal anfipática com faces hidrofóbicas e hidrofílicas distintas, resultando na desestabilização da membrana. Por outro lado, quando os mastoparanos encontram interfaces hidrofóbicas/hidrofílicas, como as vistas entre as membranas bacterianas e o ambiente, eles normalmente formam uma α -hélice (TORRES et al., 2018).

A desestabilização de membranas bacterianas desencadeada, não só por mastoparanos, mas também por outros tipos de peptídeos, acontece pela formação de canais de íons que levam à lise celular. O modelo proposto explica que os peptídeos recobrem a membrana até atingirem um nível crítico de concentração e se inserem através dessa membrana, formando poros no modelo de barril e micelas no modelo de tapete (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011). É possível que o mesmo ocorra na presença de envoltórios virais.

No entanto, isso pode ser desafiador, tendo em vista que as composições lipídicas das membranas tanto da célula hospedeira quanto do envelope viral são bastante semelhantes (PARK; TAE; CHO, 2021). A presença de esfingolipídios, colesterol e balsas lipídicas conferem um caráter anfipático e uma carga negativa ao envelope. Dessa forma, peptídeos catiônicos com carga positiva podem interagir eletrostaticamente com essa estrutura viral, seja por produzir um efeito virucida direto, seja interferindo na ligação e/ou fusão do vírus durante o ciclo lítico viral na célula hospedeira (SKALICKOVA et al., 2015). Portanto, a seletividade dos peptídeos se baseia nas seguintes diferenças: carga, rigidez ou fluidez e curvatura das membranas (PARK; TAE; CHO, 2021).

Assim, um ensaio com micelas lipídicas marcadas com sondas de fluorescência foi realizado para inferir possíveis interações entre o envelope e o peptídeo. As bicamadas contendo diferentes composições de lipídeos foram testadas contra concentrações crescentes de [I^5 , R^8] mastoparano. As vesículas unilamelares marcadas com TMA-DPH e DPH não mostraram diferença na fluidez e polaridade, mesmo nas concentrações mais elevadas de [I^5 , R^8] mastoparano. É possível que o peptídeo induza mudanças sutis que passaram indetectáveis pelas sondas, ou outras interações podem ocorrer que requerem investigação com técnicas adicionais.

Em um estudo realizado com a melitina, pesquisadores investigaram a interação desse peptídeo com vesículas lipídicas, e os resultados indicaram que essa interação desencadeia a liberação dos lipídeos bem como rompe a curvatura natural da bicamada. Isso possibilita a destruição do envelope viral por permitir a passagem de moléculas de baixo peso molecular (LU et al., 2013).

O peptídeo AH, com 27 aminoácidos e originado do estudo da NS5A do HCV, também foi capaz de romper vesículas lipídicas zwitteriônicas. Descobriu-se que o AH interage e rompe vesículas lipídicas com diâmetro inferior a ~100nm, enquanto apenas se liga a vesículas maiores (TABAEI et al., 2012). É importante apontar a relevância prática dessa descoberta, uma vez que foi evidenciado que o peptídeo AH pôde interromper e anular a capacidade de infecção de partículas virais do HCV, com cerca de ~50nm de diâmetro, enquanto não afetou a infecção vírus *vaccinia*, com cerca de ~360 nm de diâmetro, ainda que ambos sejam envelopados. Em análises posteriores sobre o mecanismo de ação do peptídeo,

observou-se que a formação de poros ocorre em membranas com alta curvatura e não tem relação com a carga das mesmas (ZAN; JACKMAN; CHO, 2014).

Vale lembrar que peptídeos inibidores de entrada apresentam duas vantagens potenciais incluindo o direcionamento a uma ampla variedade de vírus envelopados devido à característica comum da membrana viral; e uma percepção de alta barreira ao desenvolvimento de resistência, uma vez que a membrana viral é derivada de membrana celulares infectadas e não codificada no genoma viral (JACKMAN; SHI; CHO, 2019).

AVPs também podem interagir com proteínas de superfície da partícula viral enquanto ocorre o processo de mudança conformacional durante a adsorção (FUNG; GUO, 2004; LIN et al., 2017; YU et al., 2013b). Este é o caso do inibidor T-20 (nome genérico “Efurtivide”, nome comercial Fuzeon[®]), um exemplo de peptídeo antiviral já aprovado para o uso clínico, indicado para pacientes com HIV. A sequência do T-20 foi criada a partir do estudo da região C-terminal da gp41, proteína de fusão do HIV. Por esta razão, o mecanismo de ação consiste na inibição da entrada do vírus, sendo utilizado no tratamento de pacientes que apresentam evidências de replicação viral apesar da terapia antirretroviral contínua (FUNG; GUO, 2004).

Além disso, deve-se considerar a possibilidade de que o [I⁵, R⁸] mastoparano e o mast-MO possam ter impacto no receptor da célula hospedeira ou interação com proteínas de superfície do vírus. Os resultados obtidos nos ensaios de inibição da adsorção e penetração apresentam um indicativo desse possível mecanismo. No ensaio de inibição da adsorção, inicialmente incuba-se a célula hospedeira com o peptídeo e depois inocula-se amostra viral. Neste caso, podemos inferir uma atividade protetora do [I⁵, R⁸] mastoparano frente a células Vero. Já no ensaio de inibição da penetração, adiciona-se o inóculo viral primeiro com a célula hospedeira, seguido de incubação a 4 °C, para que apenas o processo de adsorção ocorra, já que nessa temperatura a membrana celular permanece mais rígida. Após esse processo, adiciona-se o peptídeo e uma nova incubação a 37 °C é necessária para induzir a penetração viral. Tanto o [I⁵, R⁸] mastoparano quanto o mast-MO apresentaram inibição da replicação viral nesta etapa.

Desse modo, dentre as onze glicoproteínas identificadas no envelope do HHV-1, podemos destacar quatro como possíveis alvos dos mastoparanos aqui testados.. Sabe-se que a gD, o complexo gH-gL, e a gB desempenham um papel mais proeminente no processo de adsorção e penetração do vírus (CONNOLLY; JARDETZKY; LONGNECKER, 2021). A gD possui a capacidade de se ligar a receptores de Nectina-1 e 2, e sulfato de heparano, a depender do tipo celular. Ao promover esta ligação, a proteína induz a interação com o complexo gH-gL(CAIRNS et al., 2019), que por conseguinte atua como um regulador da fusão, desempenhada pela gB, classificada como uma proteína de fusão de classe I altamente conservada nos membros da família *Herpesviridae* (COOPER et al., 2018). Com 904 resíduos de aminoácidos, a gB apresenta um ectodomínio, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática. As estruturas dessas proteínas já foram resolvidas e encontram-se disponíveis para estudos e consultas; entretanto, a conformação da estrutura pré-fusão da gB ainda não foi completamente resolvida (CONNOLLY; JARDETZKY; LONGNECKER, 2021).

Embora não possamos descartar a possibilidade da interação peptídeo/glicoproteínas virais, ensaios adicionais são necessários para compreender completamente os mecanismos envolvidos na inibição do HHV-1. Ademais, os dados sobre o IS dos mastoparanos aqui testados indicam que moléculas ainda não poderiam ser utilizadas de forma satisfatória, podendo ser necessário refazer o desenho racional voltado para estruturas virais, já que o foco inicial das modificações propostas visava estruturas bacterianas. Por fim, não há muitos relatos de atividade antiviral sobre os peptídeos derivados de mastoparanos, portanto, ensaios tanto *in vitro* quanto em modelo animal podem ser estendidos para outros tipos virais.

4. CONCLUSÃO

Estudar os vírus para entender como replicam e como causam doenças é importante para o desenvolvimento de novos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento, como medicamentos antivirais. Estas aplicações técnicas constituem os principais aspectos dos estudos que envolvem novas moléculas antivirais.

Um dos maiores desafios para a saúde pública são as infecções virais emergentes, devido ao risco potencial de epidemias e pandemias como visto recentemente com a causada pelo SARS-CoV2. Além disso, infecções virais generalizadas apresentam problemas sérios devido à possibilidade de surgimento de resistência aos antivirais disponíveis.

Devido às mudanças climáticas, viagens internacionais frequentes, significativas mudanças demográficas, aumento da poluição do ar, superpopulação em algumas regiões e alterações na distribuição etária da população, as infecções virais estão em fluxo contínuo. Por fim, reunimos evidências da atividade antiviral de três peptídeos sintéticos derivados do mastoparano. Devido às suas propriedades multifuncionais, os mastoparanos representam moléculas valiosas na contínua luta contra infecções virais, podendo contribuir para o bem-estar geral da sociedade.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ALBIOL MATANIC, V. C.; CASTILLA, V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 4, p. 382–389, 2004.

ALTMANN, S. E. et al. Antiviral activity of the EB peptide against zoonotic poxviruses. **Virology Journal**, v. 6, n. 9, p. 1–6, 2012.

ANDREI, G. et al. Heterogeneity and evolution of thymidine kinase and DNA polymerase mutants of herpes simplex virus type 1: Implications for antiviral therapy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 8, p. 1295–1305, 15 abr. 2013.

ASHAOLU, T. J. et al. Potential “biopeptidal” therapeutics for severe respiratory syndrome coronaviruses: a review of antiviral peptides, viral mechanisms, and prospective needs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 3457–3470, 2021.

BADANI, H.; GARRY, R. F.; WIMLEY, W. C. Peptide entry inhibitors of enveloped viruses: The importance of interfacial hydrophobicity. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 9, p. 2180–2197, 2014.

BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. **Journal of Visualized Experiments**, 2014.

BAGCCHI, S. WHO estimates suggest large herpes simplex virus burden. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 155, fev. 2016.

BARLOW, P. G. et al. Antiviral potential of cathelicidins. **Future Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 55–73, 2014.

BASHIR UDDIN, M. et al. Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 853–866, 2016a.

BASHIR UDDIN, M. et al. Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 853–866, 2016b.

BELTRÁN LISSABET, J. F.; BELÉN, L. H.; FARIAS, J. G. AntiVPP 1.0: A portable tool for prediction of antiviral peptides. **Computers in Biology and Medicine**, v. 107, p. 127–130, abr. 2019.

BERGAOUI, I. et al. In vitro antiviral activity of dermaseptin S4 and derivatives from amphibian skin against herpes simplex virus type 2. **Journal of Medical Virology**, v. 85, n. 2, p. 272–281, 2013.

CAIRNS, T. M. et al. Surface plasmon resonance (SPR) reveals direct binding of HSV glycoproteins gH/gL to gD and locates a gH/gL binding site on gD. **Journal of Virology**, n. May, 2019.

CHAHDI, A. et al. Mastoparan selectively activates phospholipase D2 in cell membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 14, p. 12039–12045, 4 abr. 2003.

CHEN, Y. et al. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–9, 2012.

CHEN, Y. H. Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. **Biochemistry**, v. 13, n. 16, p. 3350–3359, 1 jul. 1974.

COHEN, F. S. How Viruses Invade Cells. **Biophysical Journal**, v. 110, n. 5, p. 1028–1032, 2016.

CONNOLLY, S. A.; JARDETZKY, T. S.; LONGNECKER, R. The structural basis of herpesvirus entry. **Nature reviews. Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 110–121, 1 fev. 2021.

COOPER, R. S. et al. Structural basis for membrane anchoring and fusion regulation of the herpes simplex virus fusogen gB. 2018.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 181–192, 2019.

DE CLERCQ, E.; LI, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 695-, 2016.

DE OLIVEIRA, A. et al. Inhibition of Herpes Simplex Virus type 1 with the modified green tea polyphenol palmitoyl-epigallocatechin gallate. **Food Chem Toxicol**, v. 52, p. 207–215, 2013.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos, CA, USA, 2002.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: Lytic activity and clustering observed with giant vesicles. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 10805–10813, 6 set. 2011.

DUBÉ, E.; VIVION, M.; MACDONALD, N. E. Vaccine hesitancy, vaccine refusal and the anti-vaccine movement: influence, impact and implications. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 1, p. 99–117, 2 jan. 2015.

EL RAZIKY, M. et al. The effect of peginterferon alpha-2a vs. peginterferon alpha-2b in treatment of naive chronic HCV genotype-4 patients: A single centre egyptian study. **Hepatitis Monthly**, v. 13, n. 5, p. 1–8, 2013.

EL-BITAR, A. M. H. et al. Smp76, a Scorpine-Like Peptide Isolated from the Venom of the Scorpion *Scorpio maurus palmatus*, with a Potent Antiviral

Activity Against Hepatitis C Virus and Dengue Virus. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 811–821, 2020.

FENNER. Smallpox and its eradication. **Journal of epidemiology and community health**, v. 43, n. 1, p. 92, 1989.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Guidance for industry Antiviral Product Development – Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.fda.gov/dockets/ecomments>.

FUNG, H. B.; GUO, Y. Enfuvirtide: A fusion inhibitor for the treatment of HIV infection. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 352–378, 2004.

GALDIERO, S. et al. Peptide inhibitors against herpes simplex virus infections. **Journal of Peptide Science**, v. 19, n. 3, p. 148–158, 2013.

GALEANE, M. C. et al. Study of mastoparan analog peptides against *Candida albicans* and safety in zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Future Microbiology**, v. 14, n. 13, p. 1087–1097, set. 2019.

GATHERER, D. et al. ICTV virus taxonomy profile: Herpesviridae 2021. **Journal of General Virology**, v. 102, n. 10, 2021.

GOMES, B. et al. Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 415–429, 2018.

GROAZ, E.; DE CLERCQ, E.; HERDEWIJN, P. Anno 2021: Which antivirals for the coming decade? Em: **Annual Reports in Medicinal Chemistry**. [s.l.] Academic Press Inc., 2021. v. 57p. 49–107.

HANSEN, F.; FELDMANN, H.; JARVIS, M. A. Targeting Ebola virus replication through pharmaceutical intervention. <https://doi.org/10.1080/13543784.2021.1881061>, v. 30, n. 3, p. 201–226, 2021.

HARRISON, S. C. Viral membrane fusion. **Virology**, 2015.

HIRAI, Y. et al. A new mast cell degranulating peptide “mastoparan” in the venom of *Vespula lewisii*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1942–1944, 1979.

HOFFMANN, A. R. et al. Broad-Spectrum Antiviral Entry Inhibition by Interfacially Active Peptides. **Journal of Virology**, v. 94, n. 23, 9 nov. 2020.

HOLLMANN, A. et al. **Review of antiviral peptides for use against zoonotic and selected non-zoonotic viruses. Peptides** Elsevier Inc., , 1 ago. 2021.

HONG, W. et al. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 102, p. 1–10, 2014a.

HONG, W. et al. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 102, p. 1–10, 2014b.

HUI, D. S. C.; LEE, N.; CHAN, P. K. S. A clinical approach to the threat of emerging influenza viruses in the Asia-Pacific region. **Respirology**, v. 22, n. 7, p. 1300–1312, 1 out. 2017.

IRAZAZABAL, L. N. et al. Selective amino acid substitution reduces cytotoxicity of the antimicrobial peptide mastoparan. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 11, p. 2699–2708, 1 nov. 2016.

JACKMAN, J. A.; SHI, P. Y.; CHO, N. J. Targeting the Achilles Heel of Mosquito-Borne Viruses for Antiviral Therapy. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 4–8, 1 nov. 2019.

JAMES, C. et al. Herpes simplex virus: Global infection prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 98, n. 5, p. 315–329, 1 maio 2020.

JESUS, T. et al. Prediction of antiviral peptides derived from viral fusion proteins potentially active against herpes simplex and influenza A viruses. **Bioinformatics**, v. 8, n. 18, p. 870–874, 2012.

JI, M. et al. An Antiviral Peptide from *Alopecosa nagpag* Spider Targets NS2B-NS3 Protease of Flaviviruses. **Toxins**, v. 11, p. 584, 2019.

JOSE, G. G. et al. A cationic peptide, TAT-Cd0, inhibits herpes simplex virus type 1 ocular infection in vivo. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 54, n. 2, p. 1070–1079, 2013.

KARASNEH, G. A.; SHUKLA, D. **Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: Clues to its success. Virology Journal**, 2011.

KINDRACHUK, J.; NIJNIK, A.; HANCOCK, R. E. W. Host Defense Peptides: Bridging Antimicrobial and Immunomodulatory Activities*. Em: **Comprehensive Natural Products II**. [s.l: s.n.].

KONNO, K. et al. New Mastoparan Peptides in the Venom of the Solitary Eumenine Wasp *Eumenes micado*. **Toxins**, v. 11, p. 155, 2019.

KUCZER, M. et al. Studies of insect peptides alloferon, Any -GS and their analogues. Synthesis and antiherpes activity. **Journal of Peptide Science**, v. 16, n. 4, p. 186–189, 2010.

KUCZER, M. et al. Further studies on the antiviral activity of alloferon and its analogues. **Journal of Peptide Science**, v. 17, n. 11, p. 715–719, nov. 2011.


KUCZER, M.; MAJEWSKA, A.; ZAHORSKA, R. New alloferon analogues: synthesis and antiviral properties. **Chemical biology & drug design**, v. 81, n. 2, p. 302–309, 2013.

LEE, S. H. et al. The amphibian peptide Yodha is virucidal for Zika and dengue viruses. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

LEHRER, R. I. et al. Natural Peptide antibiotics from tunicates: structures, functions and potential uses. **Integrative and comparative biology**, v. 43, n. 2, p. 313–322, 2003.

LEITE, N. B. et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 91–100, jan. 2011a.

LEITE, N. B. et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 91–100, 1 jan. 2011b.

LI, L. et al. **Herpes B virus gD interaction with its human receptor**  **an in silico analysis approach**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.tbiomed.com/content/11/1/27>>.

LI, Q. et al. Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1518–1525, 2011.

LIMA, W. G. et al. Animal venoms as a source of antiviral peptides active against arboviroses: a systematic review. **Archives of Virology**, v. 167, n. 9, p. 1763–1772, 2022.

LIN, D. et al. Potent influenza A virus entry inhibitors targeting a conserved region of hemagglutinin. **Biochemical Pharmacology**, v. 144, p. 35–51, nov. 2017.

LOOKER, K. J. et al. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015a.

LOOKER, K. J. et al. Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2015b.

LOWE, R. et al. The zika virus epidemic in brazil: From discovery to future implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 96, p. 1–18, 2018.

LU, C.-C.; CHEN, M.-Y.; CHANG, Y.-L. Potential therapeutic agents against COVID-19. **Journal of the Chinese Medical Association**, p. 1, 2020.

LU, N. et al. Vesicle deposition and subsequent membrane-melittin interactions on different substrates a QCM-D experiment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, n. 8, p. 1918–1925, 20 abr. 2013.

MAHMOUD, A. New vaccines: challenges of discovery. **Microbial biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 549–52, 2016.

MARCOCCI, M. E. et al. The amphibian antimicrobial peptide temporin b inhibits in vitro herpes simplex virus 1 infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 1–13, 2018.

MARR, A. K. et al. Bovine lactoferrin and lactoferricin interfere with intracellular trafficking of Herpes simplex virus-1. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 160–164, 2009.

MATTHIAS, J. et al. Estimating Neonatal Herpes Simplex Virus Incidence and Mortality Using Capture-recapture, Florida. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 3, p. 506–512, 1 ago. 2021.

MAXIMIANO, M. R. et al. Screening for cysteine-stabilized scaffolds for developing proteolytic-resistant AMPs. **Methods in Enzymology**, v. 663, p. 67–98, 1 jan. 2022.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. **Biochimica et biophysica acta**, v. 858, n. 1, p. 161–168, 13 jun. 1986.

MELCHJORSEN, J. Sensing herpes: more than toll. **Reviews in Medical Virology**, v. 22, n. 2, p. 106–121, 1 mar. 2012.

MEMARIANI, H. et al. Melittin: from honeybees to superbugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 3265–3276, 2019.

MENÉNDEZ-ARIAS, L.; ÁLVAREZ, M. Antiretroviral therapy and drug resistance in human immunodeficiency virus type 2 infection. **Antiviral Research**, v. 102, p. 70–86, 1 fev. 2014.

MONTEIRO, J. M. C. et al. The antimicrobial peptide HS-1 inhibits dengue virus infection. **Virology**, v. 514, p. 79–87, 2018.

MORENO, M.; GIRALT, E. **Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan**. **Toxins** MDPI AG, , 1 abr. 2015.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 45, n. 382, 1960.

MUSTAFA, S.; BALKHY, H.; GABERE, M. N. Current treatment options and the role of peptides as potential therapeutic components for Middle East Respiratory Syndrome (MERS): A review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 1, p. 9–17, 2018.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, set. 2011.

NIGRO, E. et al. Host defense peptide-derived privileged scaffolds for anti-infective drug discovery. **Journal of Peptide Science**, v. 23, n. 4, p. 303–310, abr. 2017.

OKAZAKI, K.; KIDA, H. A synthetic peptide from a heptad repeat region of herpesvirus glycoprotein B inhibits virus replication. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2131–2137, 2004.

OLDSTONE, M. **Viruses, Plagues and History - Past, Present and Future**. [s.l: s.n.].

OSHIRO, K. G. N. et al. Computer-Aided Design of Mastoparan-like Peptides Enables the Generation of Nontoxic Variants with Extended

Antibacterial Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 17, p. 8140–8151, 12 set. 2019.

PARK, S.; TAE, H.; CHO, N. J. Biophysical Measurement Strategies for Antiviral Drug Development: Recent Progress in Virus-Mimetic Platforms down to the Single Particle Level. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 16, p. 3204–3214, 17 ago. 2021.

PATTNAIK, G. P.; CHAKRABORTY, H. **Entry Inhibitors: Efficient Means to Block Viral Infection. Journal of Membrane Biology** Springer, , 1 out. 2020.

PENNINGTON, M. W.; CZERWINSKI, A.; NORTON, R. S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2738–2758, jun. 2018.

PIPERI, E. et al. **Management of oral herpes simplex virus infections: The problem of resistance. A narrative review. Oral Diseases** John Wiley and Sons Inc, , 2023.

PIRET, J.; BOIVIN, G. **Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: Mechanisms, prevalence, and management. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2011. . Acesso em: 31 jul. 2019

PIRET, J.; BOIVIN, G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 6, p. 654–662, dez. 2016.

PORTO, W. F.; SILVA, O. N.; FRANCO, O. L. Prediction and Rational Design of Antimicrobial Peptides. Em: FARAGGI, E. (Ed.). **Protein Structure**. [s.l.] InTech, 2012. p. 377–396.

PRUIJSSERS, A. J.; DENISON, M. R. Nucleoside analogues for the treatment of coronavirus infections. **Current Opinion in Virology**, v. 35, p. 57–62, 1 abr. 2019.

RADY, I. et al. Mini-review Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. 2017.

RECHENCHOSKI, D. Z. et al. Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 2, p. 151–156, 2017.

REED, L. J.; MUENCH, H. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493–497, 1938.

RICILUCA, K. C. T. et al. Rondonin: antimicrobial properties and mechanism of action. **FEBS Open Bio**, v. 11, n. 9, p. 2541–2559, 1 set. 2021.

ROBINET-PERRIN, A. et al. Input of recombinant phenotyping for the characterization of a novel acyclovir-resistance mutation identified in a patient with recurrent herpetic keratitis. **Antiviral Research**, 2019.

ROIZMAN, B.; WHITLEY, R. J. An Inquiry into the Molecular Basis of HSV Latency and Reactivation. **Annual Review of Microbiology**, 2013.

ROSSETTI, B. et al. Evolution of transmitted HIV-1 drug resistance and viral subtypes circulation in Italy from 2006 to 2016. **HIV Medicine**, p. 1–10, 2018.

ROTHAN, H. A. et al. Identification of natural antimicrobial agents to treat dengue infection: In vitro analysis of Iatarcin peptide activity against dengue virus. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 140, p. 1–10, 2014.

ROUZINEID, I. M.; ROZHNOVA, G. Antigenic evolution of viruses in host populations. 2018.

RUCZYŃSKI, J. et al. Structure-Activity Relationship of New Chimeric Analogs of Mastoparan from the Wasp Venom *Paravespula lewisii*. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, 1 ago. 2022.

SAMPLE, C. J. et al. A mastoparan-derived peptide has broad-spectrum antiviral activity against enveloped viruses. **Peptides**, v. 48, p. 96–105, 2013.

SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. 3ª Ed ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda., 2015.

SELEY-RADTKE, K. L.; YATES, M. K. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. **Antiviral Research**, v. 154, n. March, p. 66–86, 2018.

SILVA, O. N. et al. Repurposing a peptide toxin from wasp venom into anti-infectives with dual antimicrobial and immunomodulatory properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 43, p. 26936–26945, 27 out. 2020.

SKALICKOVA, S. et al. **Perspective of use of antiviral peptides against influenza virus**. **VirusesMDPI AG**, , 20 out. 2015.

SKINNER, S. P. et al. CcpNmr AnalysisAssign: a flexible platform for integrated NMR analysis. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 66, n. 2, p. 111–124, 2016.

SOUZA, B. M. DE et al. Structure-activity relationship of mastoparan analogs: Effects of the number and positioning of Lys residues on secondary structure, interaction with membrane-mimetic systems and biological activity. **Peptides**, v. 72, p. 164–174, 3 mar. 2015.

SOUZA, W. V. DE et al. Microcephaly epidemic related to the Zika virus and living conditions in Recife, Northeast Brazil. **BMC Public Health**, v. 18, n. 130, p. 1–7, 2018.

STRASFELD, L.; CHOU, S. **Antiviral drug resistance: Mechanisms and clinical implications. Infectious Disease Clinics of North America** W.B. Saunders, , set. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552010000565>>. Acesso em: 4 jun. 2020

SUIJKERBUIJK, A. W. M. et al. Ebola in the Netherlands, 2014–2015: costs of preparedness and response. **The European Journal of Health Economics**, v. 19, n. 7, p. 1–9, 17 nov. 2017.

TABAEI, S. R. et al. Single vesicle analysis reveals nanoscale membrane curvature selective pore formation in lipid membranes by an antiviral α -helical peptide. **Nano Letters**, v. 12, n. 11, p. 5719–5725, 14 nov. 2012.

TERWILLIGERT, T. C.; EISENBERGG, D. **The structure of melittin. II. Interpretation of the structure.** **Journal of Biological Chemistry**. [s.l.: s.n.]. . Acesso em: 2 maio. 2021.

THELLMAN, N. M.; TRIEZENBERG, S. J. Herpes Simplex Virus Establishment, Maintenance, and Reactivation: In Vitro Modeling of Latency. **Pathogens**, v. 6, n. 3, p. 28, 2017.

TOMPA, D. R. et al. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 172, p. 524–541, 1 mar. 2021.

TORRES, M. D. T. et al. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications 1 2. 2018.

TRONSTEIN, E. et al. Genital Shedding of Herpes Simplex Virus Among Symptomatic and Asymptomatic Persons With HSV-2 Infection. **JAMA**, v. 305, n. 14, p. 1441, 13 abr. 2011.

VAN LINT, A. L.; KNIPE, D. M. Herpesviruses. Em: **Encyclopedia of Microbiology**. [s.l: s.n.].

VILAS BOAS, L. C. P. et al. Linear antimicrobial peptides with activity against herpes simplex virus 1 and Aichi virus. **Biopolymers**, v. 108, n. 2, p. 1–20, 2017.

VILAS BOAS, L. C. P. et al. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 0123456789, 2019.

WANG, C.-K.; SHIH, L.-Y.; CHANG, K. Large-Scale Analysis of Antimicrobial Activities in Relation to Amphipathicity and Charge Reveals Novel Characterization of Antimicrobial Peptides. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2037, 2017.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, 2016.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections review. **Lancet**, 2001.

YACOUB, T. et al. Antimicrobials from Venomous Animals: An Overview. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 2402, 21 maio 2020.

YU, D. et al. Molecular mechanism of HIV-1 resistance to sifuvirtide, a clinical trial-approved membrane fusion inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 1, 2018.

YU, F. et al. Approaches for identification of HIV-1 entry inhibitors targeting gp41 pocket. **Viruses**, v. 5, n. 1, p. 127–149, 2013a.

YU, F. et al. **Approaches for identification of HIV-1 entry inhibitors targeting gp41 pocket. Viruses**, 2013b.

ZAN, G. H.; JACKMAN, J. A.; CHO, N. J. AH peptide-mediated formation of charged planar lipid bilayers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 13, p. 3616–3621, 3 abr. 2014.

ZANNELLA, C. et al. Broad-Spectrum Antiviral Activity of the Amphibian Antimicrobial Peptide Temporin L and Its Analogs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, 1 fev. 2022.

ZENG, Z. et al. Histidine-rich modification of a scorpion-derived peptide improves bioavailability and inhibitory activity against HSV-1. **Theranostics**, v. 8, n. 1, p. 199–211, 2018.

ZINSER, E. et al. A new promising candidate to overcome drug resistant herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 149, n. July 2017, p. 202–210, 2018.

ANEXO 1 – Artigos publicados


Cellular and Molecular Life Sciences
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03138-w>

Cellular and Molecular Life Sciences

REVIEW



Antiviral peptides as promising therapeutic drugs

Liana Costa Pereira Vilas Boas¹ · Marcelo Lattarulo Campos^{2,4} · Rhayfa Lorryne Araujo Berlanda² · Natan de Carvalho Neves² · Octávio Luiz Franco^{1,2,3} 

Received: 21 January 2019 / Revised: 4 May 2019 / Accepted: 7 May 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

While scientific advances have led to large-scale production and widespread distribution of vaccines and antiviral drugs, viruses still remain a major cause of human diseases today. The ever-increasing reports of viral resistance and the emergence and re-emergence of viral epidemics pressure the health and scientific community to constantly find novel molecules with antiviral potential. This search involves numerous different approaches, and the use of antimicrobial peptides has presented itself as an interesting alternative. Even though the number of antimicrobial peptides with antiviral activity is still low, they already show immense potential to become pharmaceutically available antiviral drugs. Such peptides can originate from natural sources, such as those isolated from mammals and from animal venoms, or from artificial sources, when bioinformatics tools are used. This review aims to shed some light on antimicrobial peptides with antiviral activities against human viruses and update the data about the already well-known peptides that are still undergoing studies, emphasizing the most promising ones that may become medicines for clinical use.

Keywords Natural peptides · Rational design · Human diseases · Human viruses · Drugs



Screening for cysteine-stabilized scaffolds for developing proteolytic-resistant AMPs

Mariana Rocha Maximiano^{a,b,†}, Samilla Beatriz Rezende^{a,†},
Thuanny Borba Rios^{a,b}, Michel Lopes Leite^c,
Liana Costa Pereira Vilas Boas^{b,d}, Nicolau Brito da Cunha^b,
Állan da Silva Pires^b, Marlon Henrique Cardoso^{a,b},
and Octávio Luiz Franco^{a,b,d,*}

^aS-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil

^bCentro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

^cDepartamento de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

^dPrograma de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

*Corresponding author: e-mail address: ocf Franco@gmail.com

Contents

1. Introduction	68
2. Materials and equipment	70
2.1 <i>In silico</i>	70
2.2 <i>In vitro</i>	70
3. Step-by-step method details	71
3.1 <i>In silico</i>	71
3.2 Peptide's synthesis	86
3.3 Activity evaluation <i>in vitro</i>	86
4. Safety consideration	96
Acknowledgment	96
References	96