



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL E
CITOTÓXICA DE PEPTÍDEOS DA PEÇONHA DE ESCORPIÕES**

ÉLIDA CLEYSE GOMES DA MATA

**Trabalho apresentado como
requisito para conclusão de
Doutorado do Programa de Pós-
graduação em Biologia Animal
da Universidade de Brasília.**

Brasília-DF
2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL E
CITOTÓXICA DE PEPTÍDEOS DA PEÇONHA DE ESCORPIÕES**

ÉLIDA CLEYSE GOMES DA MATA

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz

**Trabalho apresentado como
requisito para conclusão de
Doutorado do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal
da Universidade de Brasília.**

Brasília-DF
2016

ÉLIDA CLEYSE GOMES DA MATA

**INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL E
CITOTÓXICA DE PEPTÍDEOS DA PEÇONHA DE ESCORPIÕES**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz (Presidente / Orientadora, UnB)

*Profa. Dra. Daniela Mara de Oliveira (Membro Titular Interno Vinculado ao
Programa, UnB)*

*Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins (Membro Titular Interno não Vinculado ao
Programa, UnB)*

*Profa. Dra. Marisa Rangel (Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa,
Instituto Butantan)*

*Profa. Dra. Caroline Barbosa Farias Mourão (Membro Titular Externo não Vinculado
ao Programa, IFB)*

BRASÍLIA, 16 DE DEZEMBRO DE 2016.

Dedico este trabalho a minha mãe Lindanor (in memorian), Aimê, Yohan e Isamu, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por fazerem parte da minha vida. Amo vocês !

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me presentear com saúde e força de vontade durante essa caminhada científica.

Minha família, que me apoiou e me incentivou e que tenho gratidão, à Deus por me inserir neste mundo junto a pessoas tão especiais: Aimê, Yohan, Isamu, Josy, Alana, Débora, Sarah, Laura, Ramon, Ronaldo, Fred, Frida, Ricardo e a todos os outros membros da família Gomes da Mata!

Gratidão a minha orientadora, Professora Elisabeth Ferroni, pela oportunidade que me proporcionou, e que sempre esteve disposta a buscar recursos para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. Obrigada pelo apoio, orientação e paciência!

A todos os professores que deram contribuições importantes para a melhoria deste trabalho: Vicente de Paulo, Daniela Mara, Caroline Barbosa e Marisa Rangel.

A Professora Graziella Joanitti e a doutoranda Alicia Ombredane, por toda ajuda durante os ensaios de citometria de fluxo. Gratidão pela atenção e apoio de vocês!

Ao Laboratório de microscopia eletrônica da UnB e da EMBRAPA. Agradeço a Professora Sônia Bão e ao Professor José Raimundo Corrêa, por disponibilizarem o acesso e recursos para processar e analisar minhas amostras e pelas preciosas sugestões e ensinamentos do professor José Raimundo. Agradeço a equipe do laboratório, em especial a Ingrid, Shélida e ao Cláudio, que me auxiliaram em todos os momentos que necessitei. Serei sempre grata pela valiosa ajuda!

Ao Laboratório de Bioprospecção da UnB, que por todos estes anos, me disponibilizou espaço e recursos para realizar meus experimentos e também ao Laboratório de Microbiologia Veterinária por todo o apoio técnico.

Ao Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH) que disponibilizou as linhagens celulares e cepas virais utilizadas neste trabalho e também a Dra. Barbara Müller do Departamento de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Heidelberg, que gentilmente cedeu o plasmídeo. Essas doações foram fundamentais para minha pesquisa, obrigada!

Ao laboratório de Criogenia do Instituto de Física da UnB, agradeço pelo precioso nitrogênio e ao Departamento de Importações, em especial ao Sr. Geraldo, que fez o possível para que os reagentes chegassem a tempo para desenvolver minha pesquisa.

Ao laboratório de Ciências Fisiológicas da UnB (Toxinologia), a todos os meus queridos colegas que fizeram deste ambiente, lugar de inspiração para se fazer ciência: Harry, Andrea, Carol, Marisa, Lilibete, Talita, Sol, Beatriz, Leandro, Professora Beth e todos os outros membros que fazem parte deste grupo maravilhoso!

A CAPES, pelo auxílio da bolsa de doutorado durante esses 4 anos.

*E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.
GRATIDÃO!!!*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Primatas não humanos do velho mundo naturalmente infectados por SIV	21
Figura 2 Organização genômica dos retrovírus.....	23
Figura 3 Ciclo de replicação de retrovírus e alvos comuns para a terapia antirretroviral	29
Figura 4 Quantificação de células HUT-78 sob ação de peptídeos escorpionícos.....	60
Figura 5 Quantificação da proteína SIVp27 em células HUT-78 tratadas com peptídeos escorpionícos e infectadas com SIV _{mac251}	61
Figura 6 Número de células HUT-78 tratadas com peptídeos escorpionícos em concentrações distintas posteriormente infectadas com SIV _{mac251}	63
Figura 7 Células 174x100 tratadas com P1, infectadas e não infectadas com SIV _{bk-28} e tratadas com AZT	65
Figura 8 Células 174x100, infectadas com SIV _{BK-28} e não infectadas, tratadas com duas concentrações seriadas do P6	66
Figura 9 Quantificação de células H9 tratadas com diferentes concentrações de P1 e P6	68
Figura 10 Quantificação de células HUT-78 tratadas com P1 e P6	69
Figura 11 Produção de SIVp27 em células HUT-78, após tratamento com P1 e P6 e infecção de SIV _{mac251}	70
Figura 12 Virions de SIV _{mac251} submetidos a diferentes tratamentos com P1, P6 e AZT	71
Figura 13 Quantificação de LDH em células HUT-78 submetidas a diferentes tratamentos	72
Figura 14 Avaliação da morte celular por marcação com Anexina e Iodeto de Propídio	73
Figura 15 Produção de IFN- γ por células leucocitárias primárias sob tratamento com P6	77
Figura 16 Produção de IL-4 por células leucocitárias primárias sob tratamento com P6... ..	78
Figura 17 Produção de IL-6 por células leucocitárias primárias sob tratamento com P6	79

Figura 18 Produção de IL-10 por células leucocitárias primárias sob tratamento com P6	80
Figura 19 Células leucocitárias primárias infectadas com SIV _{mac251} e tratadas com AZT	81
Figura 20 Células leucocitárias primárias tratadas com P6 e infectadas com SIV _{mac251}	81
Figura 21 Células leucocitárias primárias infectadas com SIV _{mac251} sem tratamento ..	82
Figura 22 Células leucocitárias primárias não infectadas e sem tratamento	82
Figura 23 Células leucocitárias primárias tratadas com P6.....	83
Figura 24 Células leucocitárias primárias tratadas com AZT	83
Figura 25 Células Hela P4 transfectadas com <i>Pchiv^{efp}</i> submetidas a diferentes tratamentos	84
Figura 26 Células fagocíticas, visualizadas nos cultivos primários de linfócitos humanos	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Mecanismo e local de ação de fatores de restrição.....	27
TABELA 2. Citocinas e suas atividades biológicas.....	33
TABELA 3. Características dos peptídeos escorpiônicos.....	50
TABELA 4. Densidade celular, volume do inóculo viral, quantidade de sivp27 e volume total do meio de cultura em diferentes placas de cultivo	52
TABELA 5. Concentrações iniciais dos peptídeos escorpiônicos	55
TABELA 6. Quadro sinóptico dos experimentos finais de atividade antirretroviral com peptídeos 1 e 6.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana
AMP	Peptídeo antimicrobiano
ANTI-GP41	Anticorpo monoclonal anti-gp41 (SIV _{mac251})
AZT	Azidotimidina/ Zidovudina
CCR5	Co-receptor para SIV
cDNA	DNA complementar
CXCR4	Co-receptor para SIV
dH ₂ O	Água destilada
DMSO	Sulfóxido Dimetílico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
gp	Glicoproteína
HAART	Terapia Antirretroviral Potente
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV1/2	Cepa de HIV tipo 1 e tipo 2
HTLV	Vírus T linfotrópico humano
LTR	Região Terminal Repetitiva Longa
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
NIH	Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGAA	<i>Panel on antiretroviral guidelines for adults and adolescents</i>
PBS	Tampão fosfato salino
P	Peptídeo escorpiônico
pH	Potencial hidrogeniônico
p27	Proteína viral de SIV de 27 Kd
RNA	Ácido ribonucleico
SAIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Símia
SBF	Soro bovino fetal
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SIVcpz	Cepa de SIV de chimpanzés

SIVgor	Cepa de SIV de gorilas
SIVmac	Cepa de SIV de macaco rhesus
SIVsmm	Cepa de SIV de <i>Sooty mangabeys</i>
STLV	Vírus T linfotrópico símio
TMB	Tetrametil benzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	<i>World Health Organization</i>
x g	Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

SUMÁRIO

RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. RETROVÍRUS.....	19
1.1.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA SÍMIA (SIV).....	20
1.1.2 ORIGEM DO VÍRUS	21
1.1.3 ESTRUTURA MOLECULAR	22
1.1.4 INFECTIVIDADE, PATOGENICIDADE E MECANISMO IMUNOLÓGICO	23
1.1.5 FATORES DE RESTRIÇÃO DO HOSPEDEIRO	24
1.1.6 AGENTES ANTIRRETROVIRAIS	27
1.1.7 POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DE COMPOSTOS ANTIRRETROVIRAIS	30
1.1.8 RESISTÊNCIA VIRAL	31
1.2 CITOCINAS	32
1.3 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	34
1.3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS AMPs.....	35
1.3.2 MECANISMO DE AÇÃO DOS AMPs	35
1.4 PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIVIRAL OBTIDOS DE VENENOS ANIMAIS.....	36
1.4.1 PEÇONHAS DE OFÍDIOS.....	37
1.4.2 VENENOS DE ANFÍBIOS	39
1.4.3 PEÇONHAS DE INSETOS	39
1.4.4 PEPTÍDEOS DE ORGANISMOS MARINHOS.....	41
1.4.5 PEÇONHAS DE ESCORPIÕES	43
1.5 CITOTOXIDADE.....	45
2. JUSTIFICATIVA.....	46
3. OBJETIVOS	47
3.1 GERAL	47
3.2 ESPECÍFICOS	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.....	48
4.2 CEPAS VIRAIS	48
4.3 LINHAGENS CELULARES.....	48

4.4. PLASMÍDEO pCHIV ^{EVFP}	49
4.5. PEPTÍDEOS UTILIZADOS	50
4.6. PREPARAÇÃO DE MEIO DE CULTIVO	51
4.7. MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS	51
4.8. PREPARAÇÃO DO INÓCULO VIRAL	51
4.9. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	52
4.9.1. CONTAGEM DE CÉLULAS COM AZUL DE TRIPAN.....	52
4.9.2. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR DOSAGEM DE DESIDROGENASE LÁTICA	53
4.9.3. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETRO QUALI E QUANTITATIVO POR CITOMETRIA DE FLUXO	53
4.10. CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS TRATADAS E NÃO TRATADAS COM PEPTÍDEOS E INFECTADAS OU NÃO COM SIV E QUANTIFICAÇÃO VIRAL DE SIV _{p27}	54
4.11. SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS, LINHAGENS CELULARES E CEPAS VIRAIS	55
4.12. DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL	56
4.12.1. QUANTIFICAÇÃO DE SIV _{p27} POR ELISA	56
4.12.2. TRATAMENTO DE VIRIONS DE SIV COM PEPTÍDEOS.....	57
4.12.3. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE HIV DEFECTIVO POR TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HELA P4 E 293T	58
4.12.4. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS ESTABELECIDAS E CÉLULAS PRIMÁRIAS TRATADAS COM PEPTÍDEOS ESCORPIÔNICOS E INFECTADAS COM SIV	58
4.13. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO	59
5. RESULTADOS	59
5.1. AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ESCORPIÔNICOS SOBRE CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS ESTABELECIDAS NÃO INFECTADAS E INFECTADAS COM SIV 45.....	59
5.2. AÇÃO DOS PEPTÍDEOS P1 E P6 SOBRE VIRIONS DE SIV _{mac251}	70
5.3. CITOTOXIDADE DOS PEPTÍDEOS ESCORPIÔNICOS SOBRE CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS	71
5.3.1. QUANTIFICAÇÃO DA DESIDROGENASE LÁTICA	71
5.3.2. AVALIAÇÃO DE CITOTOXIDADE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	73

5.4. PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULASLINFOBLÁSTICAS E CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS PRIMÁRIAS QUANDO SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM P6	76
5.4.1. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM P6.....	80
5.4.2. ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE HIV DEFECTIVO.....	83
6. DISCUSSÃO.....	84
7. CONCLUSÃO	94
8. PERSPECTIVAS	95
9. REFERÊNCIAS	96
10. ANEXOS.....	110

RESUMO

O presente trabalho avaliou as atividades antirretroviral e citotóxica de 9 peptídeos sintetizados a partir da análise transcritômica parcial de bibliotecas de cDNA obtidas das glândulas de peçonhas de diferentes espécies de escorpiões. Foram utilizados o Vírus da Imunodeficiência Símia/SIV e o HIV defectivo, em linhagens celulares humanas linfoblásticas, leucocitárias primárias e estabelecidas aderentes para a detecção de atividade antirretroviral, assim como citotóxica dos peptídeos sintéticos. Incluíram-se ensaios de viabilidade celular com azul de Tripán, citotoxicidade quantificando-se LDH e citometria de fluxo com detecção de Anexina/Iodeto de propídio. Os peptídeos escorpiônicos 1, 2, 4 e 6 reduziram a produção de SIV em células HUT-78 e 174X100, dentre os quais, os peptídeos 1 e 6 reduziram em 50% a viabilidade celular, em concentrações de 50 μ M e 12,5 μ M, respectivamente, tornando-os mais adequados aos ensaios. Em análises finais, o peptídeo 6 a 3,12 μ M reduziu em 75% a produção viral em relação ao controle de células unicamente infectadas. Células HUT-78 tratadas com o peptídeo 6 e infectadas com SIV, unicamente produziram IL-8, enquanto que os leucócitos primários apresentaram níveis detectáveis de IFN- γ , IL-4, IL-6 e IL-10. Em estudos de morfologia ultra-estrutural detectou-se o brotamento de virions de SIV unicamente em leucócitos primários infectados, enquanto que os tratados com o peptídeo 6 e AZT, infectados com SIV, não se detectou o brotamento viral. Observou-se lesões citoplasmáticas, extravasamento de material nuclear e acúmulo de cromatina na membrana perinuclear em leucócitos primários tratados com o peptídeo 6, compatível com os resultados obtidos por citometria de fluxo. Exclui-se a possibilidade de lise celular por destruição de membranas, visto que virions infectivos tratados em altas concentrações do peptídeo 6 não inibiram a infecção viral. Ensaio preliminares com células HeLa P4 previamente tratadas com o peptídeo 6 e transfectadas com plasmídeo pCHIV carreando o genoma defectivo de HIV, apresentaram redução da progênie viral quando comparada à produção de células transfectadas sem tratamento, células transfectadas e tratadas posteriormente com peptídeo 6 e tratadas com AZT. De modo geral, os experimentos de cultivo celular com o peptídeo 6 e posterior infecção viral, demonstraram que, nos intervalos iniciais, ocorre forte redução do número de células nas populações em tratamento, no entanto, após 96 horas as células proliferam, ultrapassando o número de células não tratadas, exercendo forte impacto quando avalia-se a interferência nos mecanismos de replicação viral, resultando na redução de progênie viral. Propõe-se que os mecanismos de proteção celular, em resposta à

toxicidade do peptídeo 6, induz a expressão de citocinas, dosadas neste estudo e, muito provavelmente, fatores de restrição viral induzidos principalmente por IFN- γ , e modulados por IL-6, IL-10 e IL-4, ademais de outras citocinas e quimiocinas que não foram quantificadas neste estudo.

Palavras-chave: SIV, HIV, antirretroviral, peptídeos de escorpiões.

ABSTRACT

The present work evaluated the antiretroviral and cytotoxic activity of 9 synthesized peptides based on the transcriptome of the partial cDNA library of different Scorpions venom glands. The Simian Immunodeficiency Virus/SIV and the defective HIV were utilized in human cell lineages, lymphoblastic cells, primary leucocytes and adherent cells, to screen for antiretroviral activity as also the peptides cytotoxicity. There were included assays for cell viability with trypan blue, cytotoxicity quantifying LDH and flow cytometry for detection of annexin/propidium iodide. The scorpionic peptides 1, 2, 4 and 6 reduced the SIV production in HUT-78 and 174X100 cell lines, and among them, the peptides 1 and 6 reduced by 50 % the cell viability at 50 μ M and 12,5 μ M concentration, respectively, which was more suitable for the assays. In final analyses, the peptide 6 at 3,12 μ M concentration reduced at 75 % the SIV production compared to untreated cells but infected. HUT-78 cells treated with peptide 6 and SIV infected solely produced IL-8 while the primary leucocytes displayed detectable levels of IFN- γ , IL-4, IL-6 and IL-10. In morphological ultrastructural studies, it could be detected the budding of SIV virions exclusively in infected primary leucocytes, while among leucocytes treated with peptide 6, AZT and SIV infected, no virions budding were observed. Cytoplasmatic lesions, leaking of nuclear material and chromatin condensation in the perinuclear region were evident in leucocytes treated with peptide 6, which was compatible with the results obtained by flow cytometry analysis. It was excluded the possibility of cell lysis by membrane destruction, as infectious virions treated with high concentrations of peptide 6 did not inhibit viral infection. Preliminary assays with HeLa P4 cells previously treated with peptide 6 and transfected with the pCHIV plasmid carrying a defective HIV genome, showed viral progenie reduction when compared with the production of transfected cells without treatment, transfected cells subsequently treated with peptide 6 and cells treated with AZT. In a general way, the cell culture experiments with peptide 6 and subsequent viral infection showed that, in the initial intervals, a strong cell number reduction occur, but after 96 hs the cells proliferate, outnumbering the untreated cells, exerting significant effect when evaluating the interference in the mechanisms of viral replication, which culminates in the reduction of viral progenie. It is proposed that the mechanisms of cell protection, in response to the peptide 6 toxicity, induce the expression of cytokines, quantified in this work and, very probably, viral restriction factors mainly triggered by IFN- γ , and modulated by IL-6, IL-10 e IL-4, besides other cytokines and chemokines that were not

quantified here.

Key words: SIV, HIV, antiretroviral, scorpion peptide

1. INTRODUÇÃO

Dentre as enfermidades de maior prevalência, comuns ao homem e outros animais, elencam-se doenças infectocontagiosas e câncer, dentre as quais, de maior interesse neste trabalho, as retrovíroses. Doenças humanas etiologicamente vinculadas a vírus provocam imenso ônus global e desafios aos sistemas de saúde. Há no mínimo 219 espécies de vírus patogênicos ao homem, dos quais mais de 2/3 podem também infectar hospedeiros não humanos, principalmente mamíferos, e em menor escala, aves. Muitos destes agentes virais são zoonóticos, transmissíveis do homem aos animais e vice-versa (BANERJEE & MUKHOPADHYAY, 2016; WOOLHOUSE, 2012). Sabe-se que poucas drogas antivirais estão disponíveis no mercado, além do que, determinados medicamentos podem induzir efeitos adversos graves e consideráveis, especialmente para aqueles pacientes que recebem tratamento ao longo da vida, como pacientes infectados pelo HIV, ainda que muitas viroses sejam de resolução espontânea, sem maiores gravidades.

Os vírus podem ser detectados por receptores de reconhecimento padrão no citoplasma e núcleo de células infectadas, disparando a ativação transcricional de interferons de tipo I e III, como também de outros genes com produtos de expressão antivirais que em sincronia levam à limpeza e inibição da disseminação viral, dessa forma, para poder produzir novos virions e conseqüentemente desencadear o processo infeccioso, os patógenos virais eliminam a resposta imune inata e posteriormente evadem-se da resposta adquirida, muitas das vezes mutando, alterando suas proteínas de superfície, em especial, glicoproteínas virais (BEACHBOARD & HORNER, 2016). Muitas doenças virais são auto-limitantes, não necessitando de tratamento antiviral, exceto alguns exemplos entre as quais, as que são causadas por HIV (RAZONABLE, 2011).

A emergência de variantes de HIV resistentes aos antivirais demanda o desenvolvimento contínuo de novos medicamentos, particularmente a partir da prospecção de produtos naturais, ou substâncias de ocorrência natural, comumente denominadas metabólitos secundários, envolvidos em mecanismos de proteção e de ataque dos organismos que os produzem. Estima-se a existência de mais que 300.000 metabólitos secundários, incluindo-se venenos animais, com potencial para a geração de novos fármacos (GURNANI *et al.*, 2014). Destaca-se o Brasil por sua vasta e exuberante biodiversidade, com imenso potencial para a prospecção de venenos animais com atividade antirretroviral.

1.1 RETROVÍRUS

Constituem grupo de vírus que apresentam genoma diploide que durante o ciclo de replicação sintetizam DNA intermediário. Os retrovírus se distinguem dos demais vírus de RNA de fita positiva por codificarem a transcriptase reversa, enzima com atividade de polimerização de moléculas de DNA a partir de molde de RNA (HAHN, 2000). A estratégia de replicação desses vírus está baseada na transcrição reversa da molécula de RNA em fita dupla de DNA tão logo o capsídeo semi-desequilibrado esteja presente no citoplasma das células-alvo.

Os retrovírus mais simples (alfa, beta e gama retrovírus) codificam somente as fases abertas de leitura de (“*Open Reading frames*”/ORFs), *Gag* (poliproteína precursora de proteínas estruturais), *Pol* (poliproteína precursora das enzimas virais) e *Env* (glicoproteína precursora do envelope). Os demais retrovírus, ditos complexos (deltaretrovírus, lentivírus e espumavírus), codificam, além das ORFs citadas, genes acessórios envolvidos nos mecanismos de patogênese viral (SAADATMAND & KLEIMAN, 2012).

A classificação antiga dos retrovírus baseava-se na morfologia e local de montagem das partículas virais, quando então eram denominados oncornavírus, subagrupados nos tipos A, B, C e D, por descrição ultraestrutural (LEVY, 1986). Os virions tipados como A têm sido unicamente observados no citoplasma da célula, exibindo *core* elétron-lúcido envolvido por duplo envelope, com diâmetro médio de 60-90 nm, representando esse grupo os retrovírus de intracisternas do tipo A (ONO, 1990). Essas estruturas foram observadas em células que geram progênie de partículas do tipo C e D. As partículas do tipo B são pleomórficas no momento do brotamento através da membrana celular. São estruturas que dispõem de longas moléculas de glicoproteínas, mesmo quando o núcleo *core* está preso à membrana celular. Os virions maduros após o brotamento apresentam nucleóides elétron-densos, excentricamente posicionados (MELANA *et al.*, 2007). O representante clássico deste grupo é o Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (MMTV). Virions do tipo C são unicamente visualizados quando iniciam o brotamento através da membrana celular, de forma que durante este processo, os *cores* elétron-densos tornam-se elétron-lúcidos, com a presença das glicoproteínas virais recobrando o envelope viral. Tem sido observado dois tipos de virions, as formas imaturas, com *core* elétron-lúcido e, formas maduras, com *core* elétron-denso. O HTLV é membro desse grupo (FASSEL *et al.*, 1998).

Observados unicamente no interior do citoplasma, as partículas do tipo D dispõem-se como anéis adjacentes à membrana celular. As formas encontradas extracelularmente apresentam-se com *core* elétron-denso localizados excêntricamente, com glicoproteínas curtas protuberando do envelope viral. Os retrovírus de Mason-Pfiser de primatas não humanos são os representantes deste grupo (STROHALMOVÁ-BOHMOVÁ *et al.*, 2014).

Os lentivírus, como o SIV e HIV, exibem o nucleóide incompleto ao brotar da membrana celular e não apresentam membrana elétron-lúcida intermediária. Em virions maduros observa-se o nucleóide em forma cilíndrica (STRAUSS, 2015).

1.1.1 Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV)

Estudos filogenéticos apontam que o vírus da imunodeficiência símia (SIV) é o ancestral do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Este lentivírus da família Retroviridae, contém RNA como material genômico (SHARP & HAHN, 2011). Inclui-se nesta família, agentes citopáticos e não oncogênicos que necessitam, como todos os retrovírus, para replicarem-se, da enzima transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral em cópia de DNA, passível então, de integrar-se ao cromossoma da célula hospedeira (BALASUBRAMANIAM & FREED, 2011).

Estes retrovírus circulam de forma enzoótica entre primatas não humanos do Velho Mundo, apatogênicos nestes animais em vida livre, mas considerados patogênicos em animais em cativeiro sob estresse, e entre chimpanzés (símios antropóides). A infecção de antropóides em cativeiro por SIV, como macacos rhesus (*Macaca mulata*), progride à síndrome da imunodeficiência símia/SAIDS (ZHOU *et al.*, 2013).

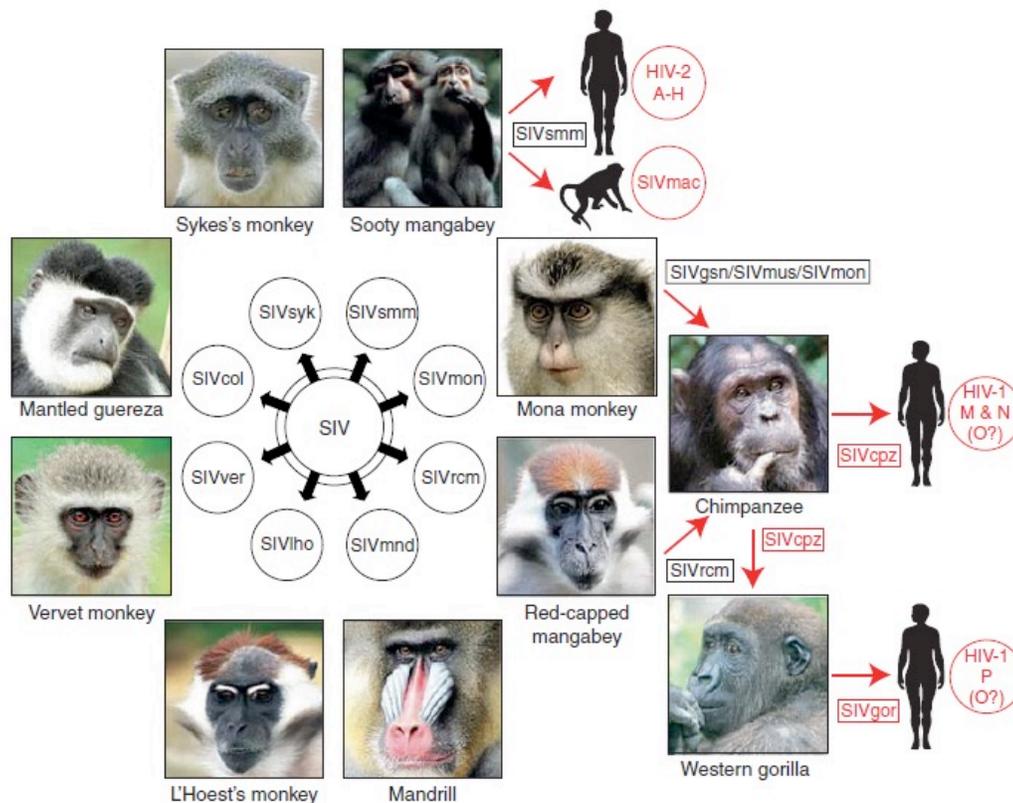
Assim como os deltaretrovírus (HTLVs, STLVs e BLV), não há relatos na literatura de que o SIV infecte naturalmente primatas não humanos do Novo Mundo (KANZAKI & CASSEB, 2008; KIRCHHOFF, 2009).

Em 1985, os primeiros isolados de SIV foram reportados entre espécies de *Cercopithecus aethiops* selvagens (*african green monkeys*) (KANKI *et al.*, 1985), em cativeiro. Estudos filogenéticos demonstraram a organização genômica do SIV similar a do HIV-1 e HIV-2. Desta forma, o reservatório primário do ancestral do HIV-2, SIVsm, é o primata não humano, *sooty mangabey*, *Cercocebus atys*, habitante da África Ocidental (APETREI *et al.*, 2005), enquanto que o SIVcpz, que infecta subespécies de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes*, é o ancestral do HIV-1 (**Figura 1**), e devido a

essa estreita relação genética, o SIV de chimpanzês tem sido de particular interesse como modelo de estudo da AIDS (SHARP & HAHN, 2011).

1.1.2 Origem do Vírus

O SIV se originou na África subsaariana, reportando-se na literatura mais de 40 espécies diferentes de primatas não humanos infectados naturalmente com este lentivírus (**Figura 1**). Estas espécies podem abrigar linhagens geneticamente distintas de SIV, contudo evidências filogenéticas indicam que os SIVs teriam atravessado barreiras interespecíficas em várias ocasiões no passado (SHARP & HAHN, 2011).



Fonte: SHARP & HAHN, 2011.

Figura 1. Primatas não humanos do Velho Mundo, com mais de 40 diferentes espécies, são naturalmente infectados por lentivírus, denominado vírus da imunodeficiência símia (SIV). Esses lentivírus teriam cruzado a barreira entre as espécies de primatas não humanos e humanos, gerando patógenos adaptados aos novos hospedeiros. Exemplos conhecidos de transmissão interespecíficas, bem como os vírus resultantes, são destacados em vermelho.

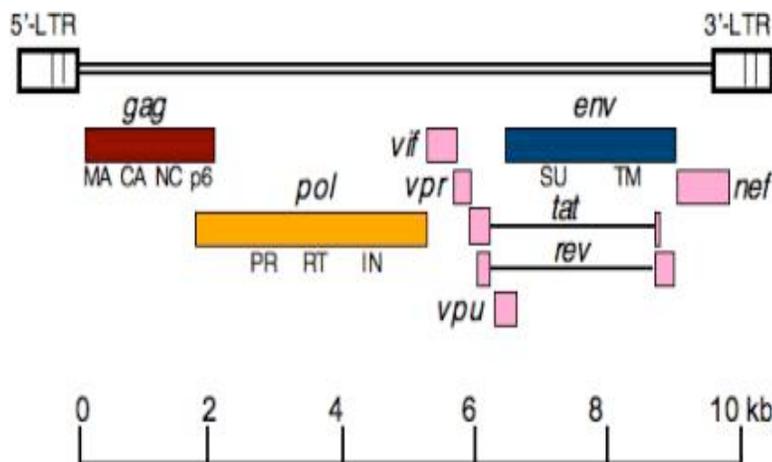
Estudos demonstraram que o SIV pode migrar para outros hospedeiros filogeneticamente relacionados, e que duas diferentes linhagens virais infectantes de chimpanzés, gorilas e “mangabeys” (PEETERS & DELAPORTE, 2012) teriam sido introduzidas em populações humanas pelo menos 11 vezes, gerando o HIV-1 e HIV-2 (MARX *et al.*, 1991). Evidências científicas mostraram que a introdução dos retrovírus exógenos (lentivírus e deltaretrovírus) aos primatas não humanos ocorreu posteriormente à ramificação da árvore filogenética e o isolamento geográfico que compartimentalizou os dois grupos de símios, no Novo e Velho Mundo (LERCHE, 2010).

1.1.3 Estrutura Molecular

A estrutura morfogenética da partícula viral (virion) é comum aos demais retrovírus, possuindo genoma constituído de RNA interligado por molécula de RNAt (SAADATMAND & KLEIMAN, 2012). O genoma está associado às enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (KALYANARAMAN *et al.*, 1982). O SIV possui envelope lipoproteico adquirido da célula hospedeira, ligeiramente esférico, capsídeo cônico, e genoma composto por dois filamentos idênticos de RNA (diploide). Assim como o HIV do tipo 1 e 2, o SIV também apresenta organização genômica contendo pequenas fases abertas de leitura (ORFs) localizadas entre as sequências nucleotídicas de *pol* e *env*, os quais são seis ORFs codificando para as proteínas *Vif*, *Vpx*, *Vpr*, *Tat*, *Rev* e *Nef* em SIV e HIV-2, distintamente do HIV-1 em que *Vpx* está substituída por *Vpu* (**figura 2**) como também exons na região entre o terminal 3' e o gene *env* (BOSINGER *et al.*, 2012).

A sequência nucleotídica de *gag* é responsável pela codificação de proteínas estruturais do capsídeo: Matriz (MA), Capsídeo (CA) e Nucleocapsídeo (NC); *env* que codifica as proteínas do envelope viral, que sequencialmente são glicosiladas, a gp120 ou de superfície (SU) e a gp32 ou transmembrana (TM), e *pol*, que codifica as enzimas transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e protease (PR), conforme demonstrado na **figura 2** (CULLEN, 1992).

A proteína *Vif* está associada à infectividade viral e ao controle da produção de progênie viral infecciosa; a *Vpr* contribui para o transporte do DNA proviral ao núcleo da célula infectada, e *Nef* auxilia na redução dos níveis celulares de moléculas CD4 e MHC classes I e II. As proteínas *Tat* e *Rev* estão envolvidas na regulação da expressão gênica (GOULDER & WATKINS 2008).



Fonte : Adaptado de BOSINGER *et al.*, 2012.

Figura 2. Organização genômica dos retrovírus. Apresenta tamanho de aproximadamente 10 kb e contém pequenas fases abertas de leitura (ORFs) e sua regiões apresentam as sequências gênicas de *gag* (que codifica a matriz, capsídeo e nucleocapsídeo), *pol* (que codifica a protease, transcriptase reversa e integrase) e *env* (que codifica a glicoproteína de superfície e a transmembranal). Adicionalmente estruturam-se também genes acessórios e regulatórios, tais como *vif*, *vpr*, *nef*, *tat* e *rev* presentes em HIV-2 e SIV, enquanto que HIV-1, o genes *vpr* é substituído pelo gene *vpu*.

1.1.4 Infectividade, Patogenicidade e Mecanismo Imunológico

O SIV infecta células T auxiliares CD4⁺, nas quais se replica, produzindo grande quantidade de progênie viral, que eventualmente desabilitam estas células de suas funções, infectando outras células, armando redes de sincício via glicoproteínas virais (GARBER, 2004).

Consolida-se com dados laboratoriais que a proteína *Nef*, codificada por lentivírus de primatas incluindo o homem, modula a expressão de moléculas do MHC de classe I da superfície celular, protegendo desta forma células infectadas da lise por linfócitos T CD8⁺ citolíticos. Corroborando esta ação, *Nef* ainda modula o receptor CD8 $\alpha\beta$ das células T citolíticas, promovendo a evasão da infecção viral do sistema imunológico (HEIGELE *et al.*, 2012). No entanto, peculiar característica da patogenicidade do HIV-1, que o distingue das infecções por SIV apatogênica, é o alto nível de ativação crônica do sistema imune e indução de apoptose de células T, indicando forte preditor de progressão da doença, AIDS. Na infecção por HIV-1, a ativação imune é alimentada, pelo menos em parte, pela incapacidade da proteína *Nef*

em modular negativamente TCR-CD3 e CD28 em células T, cuja função é conservada na maioria das infecções do SIV apatogênica e HIV-2, o que leva ao bloqueio de sua ativação (SCHINDLER *et al.*, 2006).

O mais elevado estado de ativação das células T está associado ao aumento dos níveis de transcrição e replicação viral, mas também com o aumento da expressão de fatores de restrição do hospedeiro. Assim, foi proposto que para superar as barreiras de transmissão entre espécies, os lentivírus de primatas devem induzir reação inflamatória para aumentar a sua capacidade para replicar e acumular mutações necessárias para mais adaptação (KIRCHHOFF, 2009). Se este for realmente o caso, a AIDS seria consequência inevitável de transmissão e adaptação do SIV entre diferentes espécies de primatas, incluindo o homem.

1.1.5 Fatores de Restrição do Hospedeiro

Os fatores de restrição (**Tabela 1**) são moléculas sintetizadas por células do hospedeiro com função de bloqueio da infecção viral, nos mecanismos intrínsecos de defesa. Atuam interagindo diretamente com proteínas virais ou tornando o microambiente celular inóspito à replicação viral. Os fatores de restrição são primariamente induzidos por interferon, expressos constitutivamente, dentre os quais cita-se SAMHD1, BST-2/tetherin, APOBEC3G e TRIM5 α . Mais recentemente foram identificados os fatores incorporadores de serina, denominados SERINC, até então classificadas em SERINC3 e SERINC5 (USAMI *et al.*, 2015; GOUJON *et al.*, 2014).

O fator de restrição SAMHD1 (*Sterile Alpha Motif and Histidine-Aspartate Domain 1 protein*) atua fundamentalmente nos mecanismos de imunidade inata restringindo a infecção de lentivírus em células alvo em repouso do sistema imunológico do hospedeiro, por intervenção na eficiente síntese do DNA proviral catalisada por transcriptase reversa viral. Funcional e estruturalmente, a SAMHD1 é uma enzima homotetramérica dependente de íons Mg⁺⁺ ativada por nucleotídeos de guanina que indiscriminadamente hidroliza todos os dNTPs a resíduos de deoxinucleosídeos e trifosfato (SEAMON *et al.*, 2015). Os sítios ativos dessa enzima residem no motivo α e nos domínios HD da proteína. Dessa forma, a SAMHD1 é uma deoxinucleotídeo trifosfohidrolase ativada por guanosina trifosfato/deoxiguanosina trifosfato (dNTP hidrolase) ou dNTPase e RNase, que fisiologicamente está envolvida na regulação do nível celular de deoxinucleotídeos trifosfatos (POWELL *et al.*, 2011). Durante o ciclo celular, em células mielóides de homínídeos, SAMHD1 é fosforilada

por quinases 1 e 2 dependente de ciclina (CDK1 e CDK2), ativando-a em sua função catalítica. Para contrarrestar a atividade de SAMHD1, em células mieloides e CD4⁺ em repouso, a proteína acessória *Vpx*, produzida por HIV-2 e SIV dentre outros lentivírus, direciona SAMHD1 ao proteossoma para degradação, garantindo desta forma a transcrição reversa do RNA retroviral (HOLLENBAUGH *et al.*, 2016).

A BST-2/teterina constitui-se de proteína transmembranal do tipo II contendo 180 resíduos de aminoácidos, estruturalmente disposta em cauda citoplasmática em sua região amino terminal, prolongando em região transmembranal hidrofóbica, exteriorizando-se em ectodomínio disposta em circunvoluções e região carboxi-terminal com um gancho de glicosilfosfatidilinositol (GPI). As moléculas de BST-2 dispõem-se em homotetrâmeros, mediados por resíduos de leucina 70 e 123 envolvidos no deslocamento da própria molécula. A glicosilação do ectodomínio de BST-2 permite o tráfego da molécula através do retículo endoplasmático e golgi, e postula-se sua ação na retenção de virions através de interação com o envelope viral. A região de ancoragem da molécula a prende às balsas lipídicas ou “*lipid rafts*” da membrana celular. Por sua vez, a cauda citoplasmática apresenta motivos altamente conservados de tirosina implicados na endocitose da própria molécula mediada por clatrina e ativação do fator de transcrição NF- κ B. Nos mecanismos de ação antirretroviral, a BST-2/teterina após captação dos virions em processo de liberação da membrana da célula hospedeira, os internaliza via clatrina, que por sua vez ativa o fator de transcrição NF- κ B, resultando na transcrição de citocinas pró-inflamatórias tais como CXCL10 e IL-6, e ainda, induz a resposta de citotoxicidade celular mediada por anticorpos, resultando na desgranulação de células assassinas naturais (NK) e células T citotóxicas, CD8⁺, em células infectadas por vírus, com consequente destruição dessas células. Para infectar células alvo, HIV e SIV expressam a proteína acessória *Vpu*, que pode tanto recrutar o complexo SCF ^{β -TrCP2} à ubiquitinação de BST-2, direcionando à degradação lisossomal ou a rede trans de Golgi (KUPZIG *et al.*, 2003; ANDREW *et al.*, 2009; MAHAUAD-FERNANDEZ *et al.*, 2015).

A APOBEC3G ou A3G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*) é membro da família de citidina deaminases ubíquas em diferentes variações em vertebrados, e que em primatas e felinos atua como fator de restrição aos lentivírus (ETIENNE *et al.*, 2015; YOSHIKAWA *et al.*, 2015). O mecanismo de ação da APOBEC3G e similares ocorre através da deaminação de resíduos de citidina à uridina durante a síntese de DNA proviral via transcrição reversa, culminando em

mudanças letais de G→A no genoma retroviral (WANG *et al.*, 2016). Para poder cumprir o ciclo de replicação retroviral, proteínas acessórias codificadas por lentivírus como HIV-1, SIV e FIV, tal como *Vif*, interatuam com APOBEC3G intermediando sua degradação no proteassoma após recrutamento do complexo Ubiquitina E3 ligase (LAND *et al.*, 2015). A transcrição do gene A3G é induzida por uma gama de citocinas, tais como IFN- γ , IL-2, IL-15 e IL-7 (ZENG *et al.*, 2016).

As proteínas TRIM5 (TRIMCyp e TRIM5 α) identificam e interagem com estruturas específicas na superfície dos recém-formados capsídeos retrovirais e induzem sua desmontagem e consequente inibição da transcrição reversa (LI *et al.*, 2016). Recentemente surgiram evidências que o HIV, em seu mecanismo de entrada na célula, mantém íntegro o seu capsídeo, e possui poros com mecanismos dinâmicos que suportam a entrada de nucleotídeos ao capsídeo, promovendo a transcrição reversa no interior do capsídeo (CHEN *et al.*, 2016). Como outros fatores de restrição à replicação retroviral, as proteínas TRIM5 são induzidas por expressão de interferon pela célula hospedeira, assim sendo, a evasão de retrovírus à produção de interferon, assume-se como mecanismo de contra-ação de TRIM5 (MISRA *et al.*, 2013).

Os fatores de restrição incorporadores de serina 3 e 5, SERINC3 e SERINC5, são membros de família de proteínas altamente conservadas filogeneticamente, de fungos a mamíferos, desempenhando ação bloqueadora na infecção retroviral, impedindo a fusão do envelope viral à membrana da células hospedeira. A ação restritiva de SERINC3 e SERINC5 é abolida em presença da proteína acessória *Nef*, codificada por HIV e SIV (FACKLER *et al.*, 2015).

Tabela 1. Mecanismo e local de ação de fatores de restrição.

Fator de Restrição	Local de ação	Mecanismo de ação	Resistência Viral	Referência
SAMHD1	Citoplasma	Inibe a atividade de transcrição reversa	<i>Vpx</i>	SEAMON <i>et al.</i> , 2015; POWELL <i>et al.</i> , 2011; HOLLENBAUGH <i>et al.</i> , 2016
BST-2/teterina	Membrana citoplasmática	Retenção de virions, impedindo o brotamento; ativação de citocinas pró-inflamatórias	<i>Vpx</i>	KUPZIG <i>et al.</i> , 2003; ANDREW <i>et al.</i> , 2009; MAHAUAD-FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2015
APOBEC3G ou A3G	Citoplasma	Deaminação de resíduos de citidina à uridina durante a síntese de DNA proviral via transcrição reversa	<i>Vif</i>	ETIENNE <i>et al.</i> , 2015; YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 2015; WANG <i>et al.</i> , 2016
TRIM5 (TRIMCyp e TRIM5α)	Citoplasma	Identificam e interagem com estruturas específicas na superfície dos recém-formados capsídeos retrovirais e induzem sua desmontagem; ativa resposta imune inata	-	LI <i>et al.</i> , 2016; MISRA <i>et al.</i> , 2013
SERINC3 e SERINC5	Membrana citoplasmática	Bloqueia a fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira	<i>Nef</i>	FACKLER <i>et al.</i> , 2015; COLOMER-LLUCH <i>et al.</i> , 2016

1.1.6 Agentes Antirretrovirais

Atualmente, são 35 fármacos antirretrovirais aprovados pelo controle de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration/FDA), além de 5 combinações de fármacos em diferentes mecanismos de ação, utilizados no

tratamento da AIDS (FDA, 2016). Os antirretrovirais estão agrupados em 6 classes mecânicas, em regimes combinados de uso. Estas incluem inibidores nucleosídicos/nucleotídicos da transcriptase reversa (NRTIs), inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTIs), inibidores de protease (PIs), inibidores de fusão (FIs), antagonistas de CCR5 e inibidores de transferência de cadeia nucleotídica via integrase (INSTIs) (PAGAA, 2014).

Os inibidores nucleosídicos/nucleotídicos da transcriptase reversa (NRTIs) são análogos nativos de substratos nucleosídicos da transcriptase reversa, classicamente representado pela zidovudina ou AZT, enquanto que, os inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTIs) acoplam-se aos sítios alostéricos não catalíticos da transcriptase reversa (**Figura 3**). Os NRTIs foram a primeira classe de antirretrovirais a serem aprovadas pelo FDA. Estes compostos são administrados como pró-fármacos requerendo prévia fosforilação no interior da célula para serem utilizadas pela transcriptase reversa (RT). Em ambos os casos, a transcrição do RNA viral a moléculas de DNA não ocorre, abortando o restante do ciclo de replicação viral (ARTS *et al.*, 2012).

Os inibidores da protease (PIs) constituem a segunda classe de antirretrovirais, das quais o saquinavir (ROCHE, SUIÇA) foi o primeiro inibidor de protease aprovado pelo FDA em 1995. Estes compostos são substratos análogos da enzima aspartil protease do HIV, envolvida no processamento de proteínas virais ao serem clivadas em pequenos fragmentos para a maturação e liberação de virions das células infectadas (**Figura 3**). Acopladas aos sítios ativos, os inibidores de protease bloqueiam a enzima de sua ação, inibindo portanto, a produção de partículas maduras de HIV (CHOUGRANI *et al.*, 2013).

Os inibidores de fusão (FIs) mimetizam a gp41 do HIV, de forma que, a glicoproteína viral não interage com seu co-receptor celular, não ocorrendo a fusão das glicoproteínas virais e celulares (**Figura 3**), portanto não havendo a entrada do virion na célula (infecção). O primeiro inibidor de fusão aprovado pelo FDA para uso clínico foi o enfuvirtida, peptídeo homólogo à região preditiva em hélice C-HR da gp41 (NAIDER *et al.*, 2009). Similarmente aos inibidores de fusão, os antagonistas de CCR5 bloqueiam a ligação da gp41 viral ao co-receptor viral, CCR5, expresso na membrana da célula hospedeira, bloqueando a fusão do envelope viral à membrana celular. A Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (*European Medicines Evaluation*

Agency/EMEA) aprovou o Maraviroc como o primeiro antagonista de CCR5 para uso clínico na terapia antirretroviral (PEYTAVIN *et al.*, 2009).

O raltegravir foi o primeiro representante dos inibidores de transferência de cadeia nucleotídica via integrase (INSTIs). Estas moléculas se acoplam ao *core* do domínio catalítico da enzima integrase (**Figura 3**), competindo por união ao DNA da célula hospedeira, interrompendo a integração do DNA retroviral ao DNA celular (MESSIAEN *et al.*, 2013).

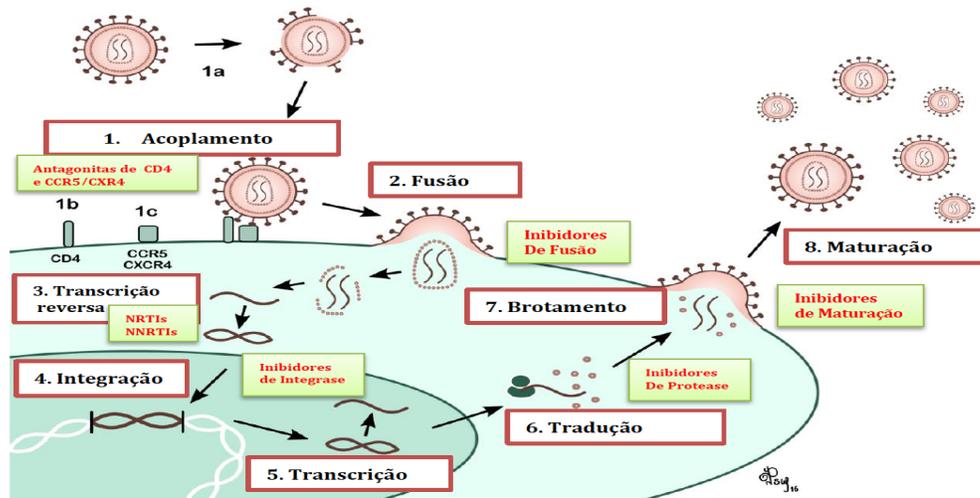


Figura 3. Ciclo de replicação de retrovírus e alvos comuns para a terapia antirretroviral. O virion (1a) se acopla à membrana celular via CD4 (1b) e ligação aos co-receptores CCR5/CXCR4 (1c), iniciando a fusão das bicamadas fosfolipídicas celular e viral (2). Nessa fase inicial, os antagonistas de acoplamento e inibidores de fusão atuam interferindo na infecção viral. Após a entrada, ocorre a descapsidização e transcrição reversa (3), a qual pode ser impedida pelos inibidores nucleotídicos e não nucleotídicos (NRTIs e NNRTIs). O recém-formado complexo de pré-integração é transportado ao núcleo celular, onde ocorre a integração do genoma viral ao DNA celular (4), bloqueada por inibidores de integrase. A transcrição do DNA proviral resulta na tradução de RNAm viral multi-processado. As proteínas iniciais, *Tat* e *Vpr*, otimizam a exportação de RNAm viral e multiprocessado, resultando na tradução de proteínas virais (posterior glicosilação de proteínas do envelope viral) incluindo precursores de *gag-pol*, processados pela protease viral, alvo de bloqueio por inibidores da protease (5). Após a transferência das proteínas virais e do genoma viral (6) à membrana da célula, os precursores de *gag-pol* norteadores da matriz, se ancoram à membrana formando partículas esféricas (7), brotando da membrana celular. As partículas virais recém-liberadas são imaturas. A protease viral processa as proteínas *gag* e *gag-pol* gerando o capsídeo, nucleocapsídeo e enzimas virais, produzindo virions maduros capazes de infectar novas células, podendo sofrer esta fase ação por inibidores de maturação. Os principais passos no ciclo de replicação viral são indicados em preto, drogas antirretrovirais aprovadas para uso em verde (Adaptado de DA MATA *et al.*, 2017).

A terapia antirretroviral trouxe muitos benefícios para pacientes portadores do HIV/AIDS, no entanto, são limitados pela toxicidade que apresentam, com efeitos colaterais persistentes, tais como toxicidade hepática, reações de hipersensibilidade e acidose láctica, que podem evoluir potencialmente para casos fatais, e ainda outras síndromes ainda não bem caracterizadas (NUÑEZ, 2010). Desta forma, o “*background*” genético dos indivíduos HIV positivos a serem submetidos à terapia por antirretrovirais, determina a eficácia terapêutica, incluindo efeitos colaterais (KAUR *et al.*, 2013).

Convém ressaltar que a terapia antirretroviral de alta atividade (HAART) tem levado a melhorias graduais no manejo clínico de indivíduos infectados pelo HIV, porém, apesar da elevada potencialidade terapêutica que os medicamentos antirretrovirais apresentem na atualidade, e o crescente interesse científico na busca de fármacos que combatam enfermidades de etiologia retroviral, em especial o HIV, ainda não obteve resultado satisfatório, devido à alta mutagenicidade destes lentivírus.

Os processos de montagem e liberação de virions de HIV, assim como a maturação morfológica em partículas infecciosas são controladas pela poliproteína *gag*. Compostos que interferem com a infectividade do HIV em cultivos de célula por interação com a poliproteína *gag* ou seu domínio capsídico tem sido reportados, como exemplo o bevirimat e CAP-1, que não bloqueiam a liberação de partículas virais de HIV imaturas, mas afetam a maturação em partículas infecciosas por acoplamento ao sítio de processamento proteolítico no precursor da poliproteína *gag* ou no domínio N-terminal da proteína Ca, respectivamente (CORIC *et al.*, 2013; KELLY *et al.*, 2007).

1.1.7 Possíveis Mecanismos de Ação de Compostos Antivirais

Alguns peptídeos apresentam atividade virucida direta, outros perturbam a ligação de virions à superfície da membrana celular ou interferem com a replicação do vírus (**Figura 3**). Devido à restrita eficiência de fármacos comumente utilizados e resistência emergente de vírus, os peptídeos antivirais são potenciais candidatos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos (KOŁODZIEJ *et al.*, 2011). A toxicidade e os efeitos colaterais das medicamentos sintéticos antivirais somada à sua reduzida disponibilidade no mercado, demandam urgente prospecção de compostos naturais que exibam atividades antivirais (TORRES *et al.*, 2014; STHOEGER & MAHLAB-GURI, 2015). Qualquer composto a ser utilizado como antiviral deve atuar em determinada fase do ciclo de replicação viral, interferindo em alguma etapa desse metabolismo.

Inicialmente, qualquer agente viral, envelopado ou não, expressa glicoproteínas, que são responsáveis pela interação com moléculas de superfície, receptores, proteínas normalmente glicosiladas, integradas na membrana da célula hospedeira. Neste passo, qualquer potencial candidato antiviral, deve competir com o receptor celular, inibindo a ligação do vírus à membrana celular, por conseguinte, de abortar a infecção viral. Outros candidatos, podem atuar intracelularmente, interagindo com o capsídeo do vírion para evitar a sua decapsidização, portanto, o ácido nucleico viral não seria liberado e transcrito. No que diz respeito a retrovírus, os candidatos antivirais podem inibir a transcriptase reversa viral, o complexo de pré-integração, evitando o transporte de DNA viral circular para o núcleo, como também a inibição da ação da integrase viral, o que não permitiria a integração do DNA viral ao cromossomo celular. O DNA proviral, após a transcrição, é traduzido a uma poliproteína que necessita da protease viral, a fim de gerar pequenas proteínas para a montagem do capsídeo viral. Deste modo, um composto antiviral poderia inibir a protease viral, o bloqueio da morfogênese retroviral (GOODSELL, 2015). Algumas proteínas retrovirais desempenham papel importante na patogênese, por regulação negativa das moléculas CD4 e MHC (Complexo Maior de Histocompatibilidade) da célula hospedeira, levando-os a degradação pela via proteossômica. Se estas proteínas virais, como o HIV-1 *Nef*, *Tat* e *Vpr*, são alvos de supostos candidatos antivirais, suas ações poderiam ser contidas (MEULENDYKE *et al.*, 2014). Os mecanismos envolvidos na ação do sistema imune inato, tais como a indução de expressão dos receptores tipo *Toll*, que interagem com o ácido nucleico viral intracelularmente, ou produção de citocinas que estimulem a ação de células T citotóxicas, células NK ou mesmo, que ativem a expressão de MHC da célula hospedeira, de modo a apresentar peptídeos virais às outras células do sistema imune (ALTFELD & GALE, 2015), ou ainda, os fatores de restrição codificados pela célula hospedeira, podem ter sua expressão ou ativação desencadeada por compostos antivirais, quer sejam peptídeos ou biomoléculas de natureza distinta (MEIJE *et al.*, 2010).

1.1.8 Resistência Viral

A integração do DNA viral ao cromossoma da célula hospedeira constitui o principal problema a ser superado no processo de infecção retroviral. Até o momento, não há nenhum fármaco disponível capaz de eliminar completamente o vírus do hospedeiro (MOUSSEAU *et al.*, 2015). Além disso, a infecção retroviral silenciosa

internaliza o vírus em sítios anatômicos difíceis de ser alcançado por antivirais, como os tecidos linfoides associados ao intestino, linfonodos e sistema nervoso central. As células infectadas, incluindo macrófagos, nestes tecidos estão quiescentes, e não se sabe quando vão estar ativadas e lançar novas progênies virais. Outro desafio para um candidato antiviral é a taxa de mutação de ácidos nucleicos virais, principalmente entre os vírus RNA, devido ao erro de síntese da polimerase, que é muito mais crítico entre os lentivírus. Como o genoma do virion da infecção inicial, mantido em células quiescentes em "santuário" é diferente, mutado de cada ciclo de infecção celular, a célula sequestrada produz um número crescente de novos virions recombinantes (CORY *et al.*, 2013).

1.2 Citocinas

As citocinas são proteínas secretadas por células atuantes tanto na imunidade inata quanto adaptativa responsáveis por muitas das funções dessas células, produzidas em resposta a microorganismos e seus antígenos, em que diferentes citocinas estimulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação (ABBAS *et al.*, 2008). Consideradas como modificadoras da resposta biológica, são sintetizadas em resposta a estímulos inflamatórios ou antigênicos e geralmente atuam localmente, de modo autócrino ou parácrino, por ligação a receptores de alta afinidade nas células-alvo (MURPHY, 2014). As citocinas que atuam na imunidade inata são produzidas principalmente por macrófagos ativados e incluem o TNF e a IL-1, que são mediadoras de reações inflamatórias agudas a microorganismos. As quimiocinas recrutam leucócitos para locais de inflamação; a IL-12 estimula a produção de citocina ativadora de macrófago, o interferon gama (IFN- γ); os IFNs tipo 1 são citocinas antivirais; e a IL-10 é um inibidor de atividade macrofágica. Enquanto que as citocinas que atuam e regulam as respostas imunes adaptativas são produzidas principalmente por linfócitos T estimulados por antígenos, como exemplo temos a IL-2, que é o principal fator de crescimento da célula T, a IL-4, a qual estimula a produção de IgE; a IL-5 que ativa eosinófilos; o IFN- γ , que é um ativador de macrófagos, dentre outras citocinas (MURPHY, 2014). Como já bastante descrito na literatura, as citocinas desempenham funções críticas para a defesa do hospedeiro contra patógenos, contribuindo para a especialização das respostas imunes mediante a ativação de diferentes tipos de células efetoras (ABBAS *et al.*, 2008). Abaixo (**Tabela 2**), as citocinas utilizadas nesta pesquisa e suas principais características e funções:

Tabela 2. Citocinas e suas atividades biológicas

Citocinas	Expressão	Receptores	Atividades
Interferon Gama (IFN-γ)	Linfócitos T, células NK e ILC-1.	IFN- γ R CD119	Atua na eliminação de patógenos intracelulares (vírus); ativa macrófagos; induz a troca de classe de imunoglobulina; incrementa as funções do MHC II e suprime células Th2.
Interleucina 4 (IL-4)	Ativada por células T (principalmente Th2 e Th1) e mastócitos.	IL-4R, CD124 CD132	Suprime a resposta para eliminação de patógenos intracelulares; otimiza a proliferação de linfócitos B, a expressão de antígenos do MHC II, mudança de classe de IgM para IgE, a proliferação de timócitos e progenitores hematopoiéticos; bloqueia a secreção de citocinas por macrófagos e IL-2 induzida por ativação das células NK; induz a diferenciação de linfócitos T CD4 ⁺ para células Th2.
Interleucina 6 (IL-6)	Monócitos, células dendríticas, células endoteliais, linfócitos T e B.	IL-6R CD126	Desenvolvimento e progressão de neoplasias; ligada ao desenvolvimento de resistência à drogas antineoplásicas; Mediador para a reação de fase aguda hepática, diferenciação de linfócitos B e a produção de antígeno, proliferação de células T; regula o metabolismo ósseo, importante mediador da febre, atividades pró-inflamatórias e anti- inflamatórias.
Interleucina 8 (IL-8)	Monócitos, macrófagos, condrócitos, células endoteliais e epiteliais, fibroblastos, neutrófilos, hepatócitos e diversas células neoplásicas.	IL-8R, CD181 CD182	Envolvida na progressão de neoplasia; quimicamente atrai e ativa neutrófilos; induz a liberação de histamina a partir de basófilos humanos; inibe a adesão de leucócitos a células endoteliais; apresenta efeitos em linfócitos B, é promotor da angiogênese.
Interleucina 10 (IL-10)	Monócitos/macrófagos, linfócitos T CD8 ⁺ , linfócitos T regulatórios, linfócitos B, mastócitos, queratinócitos.	IL-10R α , IL-10R β c, CD210a CD210b	Imunomoduladora; inibe a secreção de IFN- γ , IL-2, IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α ; propriedades imunossupressoras e anti-angiogênica; imunidade antiviral; induz apoptose em células dendríticas humanas em amadurecimento; citocinas anti-inflamatórias, aumenta a resposta imune humoral; inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos; regula negativamente citocinas Th1, moléculas MHC II linfócitos B; inibe a apresentação de antígeno tumoral.

1.3 Peptídeos Antimicrobianos

É comumente reportado na literatura que venenos e peçonhas de animais são potenciais fontes de substâncias antimicrobianas, pois contêm grande número de componentes biologicamente ativos, de diferentes estruturas químicas. Assim destacam-se os peptídeos antimicrobianos (AMPs), grupo diversificado de pequenas proteínas que desempenham função essencial para a resposta imunológica inata dos organismos hospedeiros, quando estes são invadidos por organismos patogênicos como bactérias, fungos e vírus (HMED *et al.*, 2013). São considerados como a primeira linha de defesa dos organismos multicelulares e eucariotas superiores. AMPs também podem atuar como "peptídeos de defesa do hospedeiro", desempenhando atividades imunomoduladoras específicas como indução da produção de citocinas e em alguns casos, podem desencadear doenças auto-imunes (ZHANG & GALLO, 2016).

Historicamente, em 1939, foi realizado o primeiro isolamento de AMPs por Renè Dubos, que reportou o primeiro agente antimicrobiano clinicamente testado, denominado gramicidina, isolado do sobrenadante de cultivo de *Bacillus brevis*, que apresentou atividade inibitória sobre bactérias *in vitro* e *in vivo* (DUBOS & HOTCHKISS, 1941; DUBOS & CATTANEO, 1939; VAN EPPS, 2006). Referente aos animais vertebrados, foi relatado em 1956 o primeiro AMP na literatura, quando as primeiras defensinas foram isoladas de leucócitos de coelho (HIRSCH, 1956). As defensinas, incluindo as produzidas por neutrófilos humanos, compõem a principal classe de peptídeos antimicrobianos produzidos por vertebrados, as quais revelaram-se bioativas frente a diferentes patógenos (GANZ *et al.*, 1985). Representam dessa forma, a primeira linha de um sistema sofisticado de defesa, agindo diretamente sobre estes microorganismos.

No início da década de 1980, mais de 800 peptídeos antimicrobianos diferentes foram isolados a partir de mamíferos, anfíbios, peixes, insetos, plantas e espécies bacterianas (KAMYSZ, 2005). Zasloff (1987) isolou AMPs a partir da pele da rã africana, *Xenopus laevis*, os quais, em baixas concentrações, inibiram o crescimento de diferentes espécies de bactérias e fungos, além de induzirem a lise osmótica de protozoários (ZASLOFF, 1987). Nos anos seguintes, diversos novos AMPs foram isolados, e além da função antimicrobiana, revelaram outras propriedades como atividades antineoplásicas, ativação do sistema imunitário e participação na sinalização, regulação e proliferação celular (KAMYSZ, 2005).

Em 2013, Zhao e cols. evidenciaram que mais de 5000 AMPs já haviam sido

descritos na literatura, dos quais, 4000 dessas moléculas, são de origem natural, comprovadas sua existência a nível proteômico (ZHAO *et al.*, 2013), de onde surge o crescente interesse nesse grupo de moléculas, e a alta taxa de isolamento e produção de novos peptídeos (sintéticos e naturais), ao longo dos anos. Conforme registrado em banco de dados atuais, DBAASP versão 2 (PIRTSKHALAVA *et al.*, 2016), há mais de 8000 biomoléculas pesquisadas, fornecendo informações sobre a estrutura química detalhada e atividades específicas dos AMPs contra mais de 4200 diferentes organismos (bactérias, fungos, alguns parasitas e vírus) e células neoplásicas, além de fornecerem dados sobre suas atividades hemolítica e citotóxica, facilitando o desenho de compostos antimicrobianos com alto índice terapêutico (PIRTSKHALAVA *et al.*, 2016).

1.3.1 Características Estruturais dos AMPs

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são pequenas moléculas multifuncionais que consistem de diversos aminoácidos, geralmente caracterizadas por seu tamanho, sequência, carga líquida, estrutura, hidrofobicidade e anfipaticidade, apresentando aproximadamente entre 6 a 100 resíduos de aminoácidos. De acordo com a estrutura secundária, os AMPs são classificados em 4 tipos: α hélice, folha β , estruturas em laço (*loop*) e estruturas estendidas (LEE *et al.*, 2015; GENTILUCCI, 2006), ou ainda, em cinco sub-categorias com base na composição de aminoácidos e estruturas que são: (1) peptídeos aniônicos, (2) peptídeos anfipáticos lineares α -helicoidais, (3) peptídeos catiônicos enriquecidos por aminoácidos específicos, (4) peptídeos fragmentados e (5) peptídeos com cisteínas que formam ligações intramoleculares (LEE *et al.*, 2015; DIAMOND *et al.*, 2009). Dessa forma, os AMPs exibem estruturas extremamente diferentes, bem como os perfis de atividade biológica com múltiplos alvos (LOHNER, 2016). Embora os AMPs formem grupos diversificados de peptídeos, a julgar por seus variados tamanhos e suas estruturas primárias, geralmente, são catiônicos e anfipáticos, o que lhes permite interagir com membranas microbianas (PESCHEL & SAHL, 2006).

1.3.2 Mecanismo de Ação dos AMPs

Melhor compreensão das propriedades biológicas dos AMPs ainda está em curso. De modo geral, grande parte dos AMPs atuam frente aos microorganismos em suas membranas, em mecanismos de formação de poros nos modelos de barril em paliçada (*barrel-stave*), poros toroidais e carpete de recobrimento da superfície da

membrana celular. Pesquisas mais recentes apontam para mecanismos de indução de apoptose, além de ruptura de membranas (LEE & LEE, 2015). Citam-se ainda outras estratégias de ação, tendo como alvo processos celulares tais como, inibição da síntese de proteína, de ligação de ácido nucleico ou inativação de toxinas que permitem a infecção microbiana, enovelamento de proteínas, atividade enzimática e síntese da parede celular (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

Em células bacterianas, por exemplo, considerável fração de AMPs desequilibram fisicamente membranas bacterianas, mas atuam também no citoplasma, interagindo com ácidos nucleicos, ribossomas e proteínas (LOHNER, 2016), explicando dessa forma a inibição da síntese proteica e conseqüentemente da parede celular, como também atividade enzimática, não restringindo-se unicamente no incremento da permeabilidade da membrana celular bacteriana (GUILHELMELLI *et al.*, 2013). Como já anteriormente proposto por Brogden em 2005, reforçando o anteriormente explicitado, que as formações de poros transmembranais não são os únicos mecanismos de morte microbiana, mas a translocação dos AMPs podem alterar a formação de septos na membrana citoplasmática e inibir a síntese da parede bacteriana, de ácidos nucleicos, de proteínas e de atividade enzimática (BROGDEN, 2005).

Sabe-se que os AMPs têm mecanismo de ação não específico, rápido e letal contra os microorganismos, por mecanismos já discutidos. A toxicidade celular no hospedeiro é uma das principais dificuldades enfrentadas para o desenvolvimento de produtos terapêuticos com base em esqueletos moleculares de AMPs (KLEANDROVA *et al.*, 2016). Dessa forma, a calmodulina tem sido investigada como carreador universal para a expressão de muitos tipos de AMPs, ao se observar que a arquitetura deste carreador expõe dois alvos independentes de ligação, com superfícies maleáveis de interação ricas em metionina, capazes de acomodar sequências de aminoácidos contendo resíduos básicos e hidrofóbicos, em muito reduzindo a atividade tóxica de muitos AMPs anfipáticos e protegendo-os da degradação durante os processos de expressão e purificação (ISHIDA *et al.*, 2016).

1.4 Peptídeos com Atividade Antiviral Obtidos de Venenos Animais

Na atualidade, diversos trabalhos evidenciam a atividade antirretroviral de peptídeos oriundos de animais. Descrevemos alguns trabalhos de pesquisa realizados com moléculas isoladas de ofídios, insetos, anuros, escorpiões e animais marinhos.

1.4.1 Peçonhas de Ofídios

As peçonhas de ofídios constituem-se de complexa mistura de componentes inorgânicos e orgânicos, principalmente proteínas e peptídeos. Toxinas de natureza proteica exercem importante papel na captura, morte e digestão de suas presas. Significativa variação na quantidade e qualidade dessas peçonhas tem sido observada entre espécies, dependendo principalmente da distribuição geográfica e hábitos alimentares (MENALDO *et al.*, 2015; BRAHMA *et al.*, 2015). A composição de peçonhas entre membros da família Colubridae, estão amplamente distribuídas entre proteínas secretórias ricas em cisteína, lecitinas do tipo C, proteínas tipo lecitinas do tipo C, metaloproteinases e toxinas de três dedos, variando essa composição em decorrência de dieta especializada (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2016). A análise da peçonha da víbora malaia, *Calloselasma rhodostoma*, revelou pelo menos 96 distintas proteínas (29 básicas, 67 acídicas) distribuídas em 11 famílias, consistindo principalmente de metaloproteinases das classes kistomina e rhodostoxina, lecitinas do tipo C, serino-proteases, L-aminoácido oxidase, fosfolipase A2, proteína secretória rica em cisteína e 5 toxinas menores (fator de crescimento neuronal, neurotrofina, fosfolipase B, 5' nucleotidase e fosfodiesterase) (TANG *et al.*, 2016). Assim como a análise proteômica da peçonha da víbora paquistanesa *Daboia russelii russelii* resultou na identificação de 75 proteínas/peptídeos classificadas em 14 distintas famílias, tais quais fosfolipases A2, inibidores de serino-proteases do tipo Kunitz e metaloproteinases, representando a maioria das proteínas encontradas, e adicionalmente 11 outras famílias. Relatos novos incluem a ocorrência de aminotransferase, endo- β -glicosidade e desintegrinas nesta espécie de víbora (MUKHERJEE *et al.*, 2016). Da cobra coral *Micrurus dumerilii* da Colômbia, as proteínas caracterizadas da peçonha foram alocadas em 11 famílias, das quais as mais abundantes são a fosfolipase A2 e toxinas de três dedos (REY-SUÁREZ *et al.*, 2016). Melhor compreensão da composição e dos princípios que regem a evolução dos complexos sistemas de peçonha é de fundamental importância prática para a exploração biotecnológica do enorme potencial das peçonhas, mas também para melhor tratamento das trágicas consequências do envenenamento por mordidas de ofídios (CALVETE, 2013).

Entre as diferentes moléculas de peçonhas, de diferentes espécies de ofídios, há relatos na literatura de apenas duas proteínas envolvidas em ação antirretroviral, a L-aminoácido oxidase e a fosfolipase A2 (MEENAKSHISUNDARAM *et al.*, 2009).

A L-aminoácido oxidase, um dos principais componentes proteicos da peçonha de ofídios, exerce importante atividade citotóxica e biológica. Tem-se demonstrado a ação desta enzima na indução de agregação plaquetária, apoptose, citotoxicidade, antimicrobiana, anti-leishmania e antirretroviral (GUO *et al.*, 2012). Células T linfoblásticas C8166 tratadas com a L-aminoácido oxidase (TSV-LAO), flavoenzima dimérica glicosilada, purificada e clonada do ofídio *Trimeresurus stejnegeri*, em concentrações de 0,68 e 3,4 nM inibiram em 28% e 78% a formação de sincício em células C8166 por glicoproteínas do HIV-1, respectivamente. Também, em concentrações de 24 e 390 nM em ausência ou presença de catalase a 400 nM, apresentou 50% de citotoxicidade. Reduzindo-se o efeito citotóxico, em concentrações mais baixas de TSV-LAO, observou-se inibição da replicação de HIV-1 em parâmetros de medição da formação de sincício e quantificação de HIV-1 p24, atividade esta que se viu incrementada em presença de catalase de origem endógena, visto que a adição de catalase (exógena) não alterou a atividade inibitória (ZHANG *et al.*, 2003). Izidoro e cols. (2014) mencionam em sua revisão que o estudo acima é uma possibilidade, não está muito claro que TSV-LAO possa realmente inibir a replicação deste lentivírus (IZIDORO *et al.*, 2014).

Trabalhos iniciais com a lisofosfatidilcolina, produto derivado de fosfolipase A2 (FENARD *et al.*, 1999), demonstraram ação inibitória na fusão de glicoproteínas de HIV e SIV aos receptores celulares (MARTIN & RUYSSCHAERT, 1995; GÜNTHER-AUSBORN & STEGMANN, 1997), inspirando experimentos com a fosfolipase A2, obtida da peçonha de *Naja mossambica*, involucrada em vários mecanismos de ação biológica, incluindo atividade antiviral sobre HIV, tanto na fase trópica para macrófagos quanto para linfócitos T. O provável mecanismo de ação envolve o bloqueio da descapsidização viral após entrada do virion na célula, diferentemente do que ocorre com a lisofosfatidilcolina (FENARD *et al.*, 1999).

Interessante notar que ALRAJHI & ALMOHAIZEIE (2008) reportaram que a um paciente HIV positivo, multi-resistente a drogas antirretrovirais, com carga viral elevada e baixa contagem de células TCD4⁺, administrou-se concomitantemente a terapia antirretroviral um preparado de peçonha de cobra e observou-se o declínio da carga viral e elevação do número de células TCD4⁺, mantido esses parâmetros por um ano (ALRAJHI & ALMOHAIZEIE, 2008). Os possíveis mecanismos discutidos seriam a homologia de sequência de aminoácidos de componentes proteicos da peçonha com a

glicoproteína de HIV-1, gp120 e protease lentiviral (MEENAKSHISUNDARAM *et al.*, 2009).

1.4.2 Venenos de Anfíbios

Secreções da pele de anfíbios possuem peptídeos bioativos de amplo espectro, muitos dos quais com atividade antirretroviral. A quantidade de peptídeos isolados e caracterizados de diferentes espécies de anfíbios é imensa. Como exemplo, da rã *Odorrana graham*, encontrada principalmente na China e Vietnã, obteve-se da pele de um único exemplar, 372 sequências de cDNA codificando para AMPs, os quais foram agrupados em 54 grupos de peptídeos (LI *et al.*, 2007). Três AMPs sintéticos de rãs arbóreas da Austrália e arquipélagos do pacífico sul, caerin 1.1 de *Litoria caerulea*, caerin 1.9 de *Litoria chloris* e maculatin 1.1 de *Litoria genimaculata*, inibiram a infecção de linfócitos T e células dendríticas primárias, assim como linhagens estabelecidas linfoblásticas, HUT-78, sem no entanto serem citotóxicos, contrariamente ao que ocorreu com dermaseptin, AMP sintético de *Phyllomedusa sauvagii*, rã arborícola da América Central e do Sul, que inibiu de forma parcial a infecção das mesmas células já citadas, mas exercendo forte efeito tóxico sobre as células. O mecanismo que explicaria a ação antirretroviral dos AMPs do gênero *Litoria* seria por ruptura do envelope viral (VANCOMPERNOLLE *et al.*, 2005).

BANDYOPADHYAY e cols. (2014) relataram mais recentemente o efeito citoprotetor do peptídeo relacionado a Brevin-2 (BR-II) à infecção do HIV. Este AMP, constituído de 21 resíduos de aminoácidos, foi isolado da pele de rã da espécie, *Rana septentrionalis*, de comum ocorrência na América do Norte (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2014).

1.4.3 Peçonhas de Insetos

Os insetos, uma classe de artrópodes, agrupam o maior número de organismos no planeta, representando 55% de toda a biodiversidade existente e cerca de 85% dos animais. Como forma de defesa inata, os insetos também produzem AMPs, com amplo leque de atividades biológicas e baixa citotoxicidade. Postula-se que o mecanismo de ação desses peptídeos ocorre por interação peptídeo-lipídeo e por processo de reconhecimento mediado por receptor (BULET *et al.*, 1999). Os AMPs de insetos são classificados em 4 famílias em base a estrutura química e sequência de aminoácidos: peptídeos de α -hélice (cecropinas e moricinas), peptídeos ricos em cisteína (defensinas e

drosomicina), peptídeos ricos em prolina (apidaecina, drosocina e lebecina) e peptídeos ricos em glicina (attacina e gloverina). A maioria dos AMPs ativos são pequenas moléculas de 20-50 resíduos, geradas a partir de precursores proteicos maiores inativos ou pró-proteínas, embora as gloverinas (~14 kDa) e attacinas (~20 kDa) sejam AMPs grandes (YI *et al.*, 2014).

Dentre os AMPs de insetos com atividade anti-HIV, HARISH e cols. (1997) reportaram que células linfoblásticas estabelecidas CEM, tratadas com própolis brasileiro, em concentrações atóxicas, inibiu a formação de sincício induzida por glicoproteínas do HIV, em concentração de 4,5 µg/mL, assim como reduziu a produção do antígeno viral HIV p24 até 90 a 100% e ainda, modulou a expressão de células T (HARISH *et al.*, 1997). A partir de própolis, obteve-se a melliferone, triterpenóides (ácido morônico, ácido anwuweizônico e ácido betulônico) e 4 compostos aromáticos, os quais ao serem testados como antirretroviral, o ácido morônico reduziu significativamente a ação anti-HIV em células linfoblásticas H9 (ITO *et al.*, 2001). Outros compostos, isolado de própolis caribenho, 7-epi-nemorosone e plukenetione A, inibiram a produção de partículas lentivirais em células HEK293T, transfectadas com o vetor VLDBH produtoras de SIV, quando tratadas com 1 µM/ 2 µM dos compostos respectivamente. Em células CEMx174-SEAP tratadas com 7-epi-nemorosone e infectadas com a cepa selvagem pNL4.3wt de HIV-1, a transcrição reversa não foi bloqueada quando quantificada por RT-PCR utilizando a transcriptase reversa do Vírus da Leucemia Murina Moloney (DÍAZ-CARBALLO *et al.*, 2010). Outros trabalhos confirmaram esses achados da ação anti-HIV por compostos presentes no própolis, incluindo ação sinérgica com a zidovudina (AZT), propondo-se que haja inibição da entrada do vírus à célula, em conjunto à ação sobre a transcrição reversa exercida por AZT (GEKKER *et al.*, 2005).

Como citado anteriormente, a fosfolipase de ofídios exibe atividade antirretroviral, assim como a secretada por abelhas, tendo em vista que essa enzima é ubíqua entre os organismos vivos, embora seja interessante notar que a fosfolipase produzida por células humanas não possui atividade antirretroviral. Foi proposto que a fosfolipase de peçonhas tenha a capacidade de desestabilizar a ancoragem via heparans, e fusão via colesterol em receptores (CXCR4) de células alvo para o HIV (FENARD *et al.*, 2001; VILLARRUBIA *et al.*, 2004).

Outros compostos de ação antiviral, indutores de interferon, os alloferons, AMPs catiônicos, isolados da hemolinfa de dípteros da espécie *Calliphora vicina*,

apresentam ainda ação imunomodulatória. Compostos sintéticos derivados de alloferons tem sido avaliados quanto a diferentes atividades, incluindo antiviral. Embora não haja relato de ação de alloferon sobre HIV, a produção de interferon induzida por esses AMPs apresentam ação antirretroviral (PUJANTELL *et al.*, 2016).

A melitina e cecropina são outros exemplos de AMP catiônicos isolados de *Apis melífera*, abelha, e *Hyalophora cecropia*, mariposa, respectivamente, com múltiplas atividades biológicas, incluindo-se atividade antirretroviral (MULDER *et al.*, 2013).

Linhagens estabelecidas de células T linfoblásticas, HUT-78, cronicamente infectadas com HIV-1, tiveram a produção viral reduzida quando tratadas com melitina, reduzindo em 50 % (ID₅₀) a infecção de novas células em concentração de 0,9 µM. Observou-se ainda que a redução da produção viral foi dose dependente. Em experimentos subsequentes pelo mesmo grupo de pesquisa, células humanas fibroblastóides de pulmão de embrião, LC5, infectadas com HIV, foram tratadas tanto com cecropina quanto com melitina em experimentos independentes e após coloração das células com imunoperoxidase marcada com soro humano anti-HIV, detectou-se a redução de células infectadas nos dois tratamentos. No tratamento com cecropina, a inibição com ID₅₀ ocorreu em concentração de 2-3 µM, enquanto para a melitina, a ID₅₀ foi obtida com concentração de 0,4 µM. Constatou-se ainda que células transfectadas com os genes de pre-melitina e pre-cecropina e com construtos do HIV, tiveram redução na expressão de proteínas lentivirais, sem praticamente interferir com a expressão de genes constitutivos da célula. O mais provável mecanismo de ação antirretroviral da melitina e cecropina parece ser a supressão da transcrição dos genes do HIV por interferência do controle do LTR viral sobre genes cognatos (WACHINGER *et al.*, 1998).

1.4.4 Peptídeos de Organismos Marinhos

Espécies marinhas representam um vasto celeiro de peptídeos com inúmeras aplicações, dentre as quais como drogas antirretrovirais. Em consonância com a imensidão do habitat marinho, representando 70% do planeta, os AMPs obtidos de organismos marinhos mostram rica diversidade, classificadas suas moléculas em (1) peptídeos lineares de α -hélice; (2) peptídeos lineares ou em hélice com abundância de um dos aminoácidos: prolina, triptofano, histidina ou glicina; (3) peptídeos formando grampos com folhas beta, ou em hélice e folhas beta mixtas estabilizadas por pontes dissulfeto e (4) peptídeos cíclicos (FALANGA *et al.*, 2016).

Os metabólitos secundários ciclodepsipeptídicos, callipeltinas (*Callipelta* sp.), papuamidas (*Theonella mirabilis* e *Theonella swinhoei*), mirabamides (*Siliquariaspongia mirabilis*), neamphamide (*Neamphius huxleyi*) e stelletapeptinas (*Stelletta* sp.), produzidos por organismos marinhos, provavelmente por simbiose com microorganismos, constituem-se em estruturas únicas, com aminoácidos incomuns e outras moléculas não aminoácidas, com cauda alifática, ciclização depsipeptídica, um resíduo 3,4-dimetilglutamina e um grupo hidroxílico de tirosina disponível. Por exemplo, os resíduos de aminoácidos 3,4-dimetil-L-glutamina e β -metoxitirosina são comuns em todos os ciclodepsipeptídeos derivados de esponjas. Todos os ciclodepsipeptídeos obtidos de organismos marinhos apresentaram atividade antirretroviral (ANDAVAN & LEMMENS-GRUBER, 2010; ZHOU *et al.*, 2013).

Dois depsipeptídeos, stelletapeptinas A e B, quando utilizados para tratar células linfoblásticas estabelecidas CEM-SS infectadas com HIV-1, inibiram o efeito citopático decorrente do brotamento viral com valores de EC_{50} nas concentrações de 23-27 nM. As stelletapeptinas possuem características químicas estruturais da família de peptídeos com atividade antirretroviral que engloba as callipeltinas (*Callipelta* sp.), papuamidas (*Theonella mirabilis* e *Theonella swinhoei*), mirabamides (*Siliquariaspongia mirabilis*) e neamphamide (*Neamphius huxleyi*) (SHIN *et al.*, 2015). Esses compostos interagem com o colesterol e possuem uma cauda hidrofóbica que pode inserir-se também no envelope viral causando sua desestabilização e perda de infectividade. De modo geral os ciclodepsipeptídeos de organismos marinhos agem no momento da fusão de membranas, do envelope viral do HIV com a membrana da células hospedeira (ANDAVAN & LEMMENS-GRUBER, 2010). Ainda se incluem neste grupo os celebésides A e B (*Siliquariaspongia mirabilis*), homophymine A (*Homophymia* sp.), microspinosamide (*Sidonops microspinososa*) e theopapuamides (*Siliquariaspongia mirabilis*), com atividade anti-HIV (RANGEL *et al.*, 2016; ZAMPELLA *et al.*, 2008; PLAZA *et al.*, 2009; RASHID *et al.*, 2001).

Substâncias de outras espécies de organismos marinhos também apresentaram atividade anti-HIV, como por exemplo, frações lipofílicas de extratos metanólicos da medusa *Cassiopea andromeda* (cnidário), coletada no Mar Vermelho, exibiram forte ação inibitória (IC_{50} : $0.84 \mu\text{g/ml} \pm 0.05$) sobre o HIV-1, mais precisamente sobre a protease viral e, sem ser citotóxica às linhagens celulares estabelecidas, duas neoplásicas, U937 e HeLa, e Vero, de fibroblastos renais de primata não humano *Chlorocebus aethiops* (ELLITHEY *et al.*, 2014). Ou ainda, análogos sintéticos, T22,

dos AMPs tachypleusin e polyphemusin, obtidos da hemolinfa do caranguejo ferradura japonês (*Tachypleus tridentatus*) e americano (*Limulus polyphemus*) inibiram o efeito citopático (ECP) decorrente da infecção por HIV-1 em células estabelecidas linfoblásticas MT-4 (EC₅₀: 2,6 nM), enquanto que a concentração citotóxica, (CC₅₀: 17,8 nM) foi 6,85 vezes a concentração com 50% de inibição do ECP. O efeito inibitório ocorreu tanto sobre cepas laboratoriais de HIV-1 e 2, como cepas clínicas de HIV-1 e resistentes ao AZT. Outros parâmetros para avaliar a inibição da infecção viral foram utilizados, além do ECP, como contagens de células infectadas por Imunofluorescência, Citometria de Fluxo, ELISA para quantificação do HIVp24 e amplificação gênica (PCR) para detectar a transcriptase reversa, utilizando-se outras linhagens linfoblásticas como MOLT-4 e U1 (NAKASHIMA *et al.*, 1992).

1.4.5 Peçonhas de Escorpiões

A classe arachnida (subfilo chelicerata) compreende 11 ordens, das quais, os escorpiões são de interesse, particularmente neste estudo. Peçonhas de escorpiões têm sido exaustivamente estudadas, principalmente em decorrência dos efeitos clínicos da picada observados no homem, muitas das vezes levando a óbito (BRAITBERG & SEGAL, 2009; CHIPPAUX & ALAGÓN, 2008). Paradoxalmente, ao se conhecer o mecanismo de ação destas substâncias, vislumbrou-se a aplicação biotecnológica destes produtos (VORONTSOVA *et al.*, 2011), muitas das vezes como medicamentos para diferentes patologias (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008; ROGOZA *et al.*, 2006).

Utilizada para defender-se de predadores e capturar suas presas para servir como alimento, a peçonha dos aracnídeos apresenta exuberante variedade molecular, em intrincado coquetel, em que os sistemas de regulação de expressão das proteínas e peptídeos constantes em sua composição ainda não são bem compreendidos (MA *et al.*, 2010; VASSILEVSKI *et al.*, 2009).

Há escassos relatos na literatura sobre experimentos testando a ação de peçonhas de aracnídeos frente a retrovírus, como o Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Imunodeficiência Símia, Vírus da Imunodeficiência Felina, dentre outros (CHEN *et al.*, 2012; COLE & LEHRER, 2003).

Relativo à ação de peçonhas de escorpiões, ou de seus componentes, frente ao Vírus da Imunodeficiência Humana, foi reportado após experimentações, a existência de mimetismo molecular do receptor CD4 da célula hospedeira do HIV por toxinas de escorpião (HUANG *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2001). O peptídeo escorpiônico modificado

scyllatoxin inibe a ligação da gp120 do HIV à molécula CD4 de células linfocíticas, suprimindo a infecção lentiviral (VAN HERREWEGE *et al.*, 2008), da mesma forma que os peptídeos KN2-7 e mucroporin-S1 inibiram a interação dos co-receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 com as glicoproteínas virais (CHEN *et al.*, 2012).

Investigações recentes mostraram que muitos AMPs obtidos de escorpiões e seus análogos, quimicamente modificados, exibem atividade antiviral potente. Principalmente pelo fato desses peptídeos atuarem através da ruptura direta do envelope viral e, conseqüentemente, excluir a capacidade infectante destes patógenos (HMED *et al.*, 2013).

Com o rápido aumento do número de compostos de peçonha de escorpiões caracterizados, muitos candidatos a novos fármacos têm sido encontrados como potenciais medicamentos para lidar com a crescente ameaça global à saúde humana (ORTIZ *et al.*, 2015). AMPs de escorpiões dispõem de extenso inventário de polipeptídeos com gama diversificada de bioatividade e alta especificidade às estruturas celulares (HMED *et al.*, 2013). Estes AMPs biologicamente ativos são classificados como (1) Peptídeos com Ponte Dissulfeto (DBPs) e (2) Peptídeos sem Ponte Dissulfeto (NDBPs). Entre eles, os DBPs são os principais componentes das peçonhas de escorpião, sendo responsáveis pelos sintomas neurotóxicos e sinais observados durante escorpionismo, pois geralmente o alvo destes DPB são os canais iônicos de membranas celulares excitáveis (ALMAAYATAH & ALBALAS, 2014). Estas propriedades fazem com que estas moléculas sejam interessantes protótipos de fármacos para o tratamento de diversas doenças, que afetam particularmente o sistema neural (HMED *et al.*, 2013).

É relatado na literatura que alguns peptídeos escorpiônicos antivirais atuam neutralizando o vírus através da sua inserção ao envelope viral ou à membrana da célula hospedeira, fazendo com que a instabilidade gerada iniba a infecção viral de novas células (HMED *et al.*, 2013). Por outras vias, alguns compostos amplificadores da ação antiviral, podem interferir ou obstruir a entrada do virion à célula, ocupando os receptores celulares utilizados pelas glicoproteínas virais (CHEN *et al.*, 2012). Outras moléculas poderiam atravessar a membrana lipoproteica celular e internalizar-se no citoplasma e organelas, produzindo alterações no perfil das células hospedeiras, que poderia acrescentar na defesa contra o vírus ou também bloquear a expressão de genes virais na célula hospedeira, interferindo na disseminação do vírus a outras células (HMED, 2013).

1.5 Citotoxicidade

Células eucarióticas, quando submetidas a estresse por determinados agentes alteram sua morfologia, detectável por microscopia ótica, embora sem muitos detalhes. Em muitos casos, com o auxílio de corantes, como exemplo o azul de Trypan, que penetra a célula lesada, através de perturbações da membrana citoplasmática, é possível indicar a inviabilidade celular ou morte (STODDART, 2011). Detalhes da estrutura morfológica da célula podem ainda ser detectados em níveis nanométricos, revelando a ultraestrutura celular sob análise da microscopia eletrônica, em que feixes de elétrons são refletidos de estruturas celulares processadas, em que há maior depósito de sais de metais pesados, estruturas estas denominadas elétron-densas. Dessa forma, a imagem se forma decorrente das diferenças de densidade e consequente reflexão dos feixes de elétrons que criam sombras em diferentes tons (BYKOV, 2016).

A morte celular pode ocorrer por vários mecanismos, classificada tradicionalmente em 3 tipos, distintos por características morfológicas, como apoptose, morte celular autofágica e necrose. A apoptose caracteriza-se por mudanças típicas na morfologia nuclear, incluindo condensação da cromatina e fragmentação, redução geral no tamanho da célula, bolhas na membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos que contém material citoplasmático ou nuclear. Na morte celular autofágica ocorre massivo acúmulo de duplas membranas contendo vacúolos conhecidos como autofagossomas que subsequentemente se fundem com vacúolos lisossomais. A necrose não apresenta nenhuma das características descritas para a apoptose e morte celular autofágica (SHUBIN, 2016).

Geralmente em baixas doses, moléculas tóxicas podem induzir apoptose mas em altas doses, podem causar necrose.

Uma das formas para diferenciar o tipo de morte celular é o emprego do ensaio de citometria de fluxo, o qual é utilizado para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, permitindo analisar diversos parâmetros simultaneamente (OMBREDANE, 2016).

A análise do tipo de morte induzida por determinado tratamento realiza-se com a utilização de Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo. Este teste permite a identificação e quantificação de subpopulações de células em apoptose, necrose e também de células viáveis. A avaliação de fragmentação de DNA e ciclo celular das células tratadas determina-se com a adição de Iodeto de propídeo (PI), que é um dos corantes com afinidade por DNA, capaz de se intercalar entre pequenas sequências de nucleotídeos

(OMBREDANE, 2016). Em paralelo, a Anexina V é uma proteína utilizada para identificar as células em fase inicial de apoptose e possui alta afinidade à fosfatidilserina (fosfolípido presente na superfície interna da membrana plasmática, que é translocado para a camada externa durante a apoptose, funcionando como sinalizador para a fagocitose) (OMBREDANE, 2016). Nas análises por FACS, a Anexina está associada a um fluorocromo tipo FITC usada simultaneamente com o PI. Dessa forma, apenas as células mortas ou com membrana danificada são permeáveis ao PI que é um indicador de apoptose tardia e/ou morte celular por necrose.

Ademais da detecção de toxicidade celular por alterações morfológicas, tais como lesão da membrana plasmática, pode-se ainda detectar sinais químicos resultantes dessas lesões, como é o caso da enzima citoplasmática desidrogenase láctica (LDH), liberada rapidamente no sobrenadante de cultivo de células. A atividade de LDH pode ser facilmente detectada e quantificada por análise espectrofotométrica, após acoplamento a ensaio enzimático que resulta na conversão de sais de tetrazólio em produto de cor vermelha, o formazan (SMITH *et al.*, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

É crescente a demanda por novos fármacos e produtos terapêuticos naturais para fazer frente aos patógenos multirresistentes como é o caso dos retrovírus. Ainda que a quantidade de antirretrovirais pareça ser suficiente para se estabelecer a baixa carga viral e os níveis satisfatórios de células TCD4⁺, as variantes antígeno-genômicas do HIV-1 em único portador do vírus multiplicam-se rapidamente, buscando evadir-se da resposta imune do hospedeiro. Dessa forma, quanto mais novos medicamentos forem desenvolvidos, obviamente que maior será o armamentário da clínica médica para fazer frente às patologias associadas à infecção por HIV-1. Aliada a esta urgente necessidade, o país dispõe de imenso e diverso potencial biótico, em grande parte inexplorado, e muitas das vezes, espécies encontram-se em vias de extinção. Venenos e peçonhas de animais contêm inúmeras moléculas, destacando-se peptídeos com ampla variedade de atividades biológicas, portanto potencialmente passíveis de processamento para geração de produtos terapêuticos. O Brasil depende quase que exclusivamente da indústria farmacêutica e biotecnológica multinacional, não se conhece ainda no mercado um único medicamento antirretroviral desenvolvido no país e oriundo de produtos naturais autóctones. Portanto, acredita-se que avaliar a atividade antirretroviral de produtos naturais autóctones, no próprio país, seja investimento lucrativo, ainda que a

curto prazo nenhum medicamento possa ser gerado, mas os métodos utilizados e os resultados obtidos ou que se venha a obter a longo prazo, é experiência que se pode aperfeiçoar para aplicação em outros produtos naturais.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

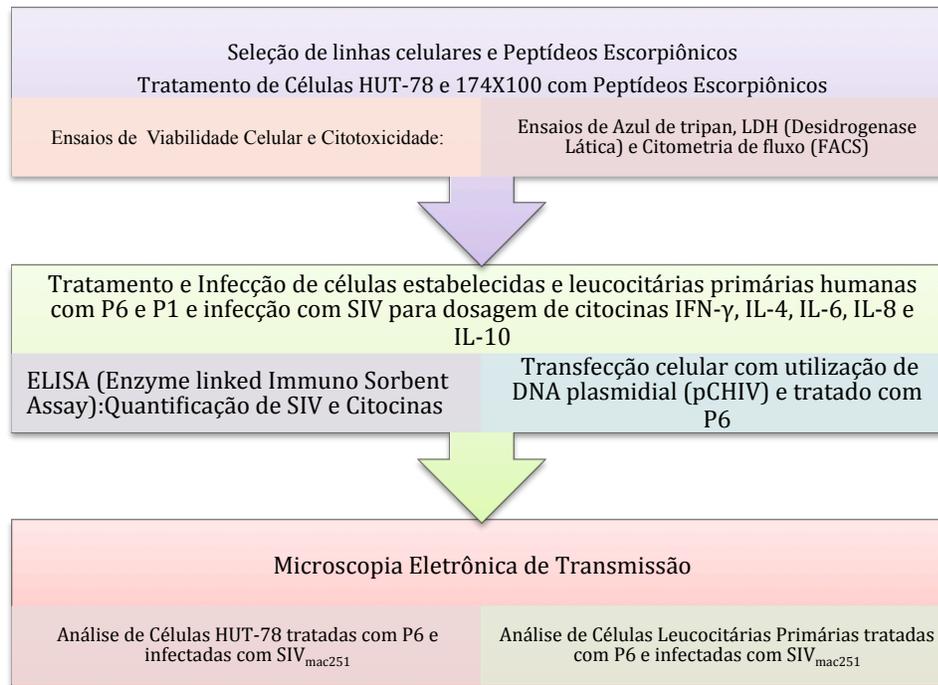
Prospectar atividade antirretroviral de peptídeos sintéticos com base em sequências obtidas de bibliotecas de cDNA de glândulas de peçonhas de escorpiões, utilizando o Vírus da Imunodeficiência Símia/SIV e o Vírus da Imunodeficiência Humana/HIV defectivo como modelos de retrovírus.

3.2 Específicos

- Investigar a toxicidade de peptídeos escorpiônicos sintéticos em linhas celulares humanas linfoblásticas estabelecidas e leucocitárias primárias;
- Quantificar a produção de proteínas virais em células infectadas com SIV, previamente tratadas com peptídeos;
- Investigar a produção de citocinas em sobrenadante de células tratadas com peptídeos escorpiônicos sintéticos e infectadas ou não com SIV;
- Discutir possíveis mecanismos de ação dos peptídeos escorpiônicos sintéticos que apresentarem atividade antirretroviral;
- Analisar a capacidade de inibição da morfogênese de HIV em células transfectadas com plasmídeo carreando genes do HIV, por peptídeos escorpiônicos sintéticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de atividades experimentais



4.2 Cepas Virais

Foram utilizadas as cepas apatogênicas do Vírus da Imunodeficiência Símia, SIV_{mac251} e SIV_{BK-28}, mantidas em células HUT-78 e 174x100, em que tanto as cepas virais como as linhagens celulares foram gentilmente cedidas pelo Programa de Reagentes para HIV/AIDS do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH AIDS REAGENT PROGRAM, 2013).

4.3 Linhagens Celulares

Nos ensaios preliminares foram utilizadas 3 linhagens de células linfoblásticas estabelecidas em suspensão: células HUT-78 e H9 originadas de linfoma cutâneo de linfócitos de sangue periférico de paciente com síndrome de Sezary (GAZDAR *et al.*, 1980) e células 174X100, linhagem resultante da fusão de linfócitos B humanos da linhagem 721.174 e linfócitos T humanos da linhagem 100 (SALTER *et al.*, 1985),

ênfatizando-se que estas linhagens foram selecionadas para o trabalho devido apresentarem alta suscetibilidade à infecção pelo SIV, adequadas para o estudo de infecção e replicação viral.

Também foram utilizadas células 293T, obtidas a partir da transfecção da linhagem celular do rim de embrião humano com o gene codificando a proteína T do vírus SV40, e as células HeLa P4 (HeLa-CD4-LTR-lacZ) originadas de adenocarcinoma de cérvix humano transfectadas com o gene codificando para a proteína de superfície (posteriormente glicosilada) CD4 e lacZ. Ambas linhagens aderentes de células são cultivadas a 37°C, 5% de CO₂ em Meio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 4 mM glutamina e 10 mM Hepes.

Células leucocitárias primárias humanas, de sangue periférico, foram obtidas por centrifugação de sangue heparinizado a 400 g por 30 min. em gradiente de sacarose, Histopaque-1077 (SIGMA), em proporção de 3 mL de sangue total heparinizado sobre 3 mL de gradiente de sacarose. Após 3 lavagens em solução salina estéril, centrifugadas a 250 g por 10 min., e cultivadas em Meio RPMI complementadas com soro fetal bovino e antibiótico, a 37°C e 5% de CO₂ sob umidade, em incubadora automatizada.

4.4 Plasmídeo pCHIV_{eyfp}

O plasmídeo pCHIV_{eyfp} foi gentilmente cedido por Dra. Barbara Müller do Departamento de Doenças Infecciosas, Virologia, do Hospital Universitário de Heidelberg, Alemanha.

O plasmídeo pCHIV_{eyfp} é derivado do esqueleto genômico do HIV carregando o gene *eyfp*, incrementador da expressão da proteína fluorescente amarela, inserido na fase aberta de leitura da sequência gênica de *gag*, entre os domínios da matrix (MA) e do capsídeo (CA), a montante (“*upstream*”) do sítio de processamento proteolítico entre MA e CA, após a tradução. A transfecção de células 293T com pCHIV_{eyfp} resulta na expressão de todas as proteínas virais, exceto *Nef*, sob controle do promotor do citomegalovírus (CMV), e geração e liberação de partículas virais “*like*” (*virus like particle*) competentes, capazes de infectar a célula. O genoma codificado por pCHIV_{eyfp} é incapaz de se replicar, devido a deleção completa da região terminal repetitiva longa (LTR), essencial para a transcrição reversa e integração (HERMLE *et al.*, 2010). Dessa forma, células 293 T transfectadas com pCHIV_{eyfp} foram tratadas com os peptídeos em estudo, avaliando-se se interferem na produção das proteínas

virais e consequente encapsidação do genoma viral e brotamento através da membrana celular.

4.5 Peptídeos utilizados

As sequências correspondentes aos peptídeos utilizados foram traduzidas *in silico* a partir de biblioteca de cDNA de glândulas de peçonhas de diferentes espécies de escorpiões (**Tabela 3**), sintetizados pela empresa Gen One Soluções em Biotecnologia (Rio de Janeiro). Todos os peptídeos foram solubilizados em água, na concentração de 10 mg/mL e mantidos a -20°C.

Tabela 3. Características dos Peptídeos Escorpiônicos

Peptídeos	Espécies	Massa Molecular	Sequência
Peptídeo 1	<i>Tityus obscurus</i>	1700,1 Da	FIGMIPGLIGGLISAIK-NH ₂
Peptídeo 2	<i>Tityus obscurus</i>	1733,0 Da	FLGMIPGLIGGLISAFK-NH ₂
Peptídeo 4	<i>Tityus obscurus</i>	1734,1 Da	FIGMIPGLIGGLISAFK-NH ₂
Peptídeo 5	<i>Tityus obscurus</i>	1762,1 Da	FFSLIPSLIGGLVSAIK-NH ₂
Peptídeo 6	<i>Tityus obscurus</i>	3000,7 Da	FFGTLFKLGSKLIPGVMKLFSSKKKER
Peptídeo 7	<i>Tityus obscurus</i>	2757,0 Da	EEDDLLGFSEEDLKAIKEHRAKNA-NH ₂
Peptídeo 8	<i>Opisthacanthus cayaporum</i>	1332,0 Da	IFSAIAGLLSNLL
Peptídeo 9	<i>Hadrurus gertschi</i>	1236,0 Da	FIFDLLKCLV
Peptídeo 10	<i>Opisthacanthus cayaporum</i>	1434,0 Da	ILSAIWSGIKSLF-NH ₂

4.6 Preparação de Meios de Cultivo

Utilizaram-se os meios RPMI-1640 e DMEM (SIGMA) para linhagens celulares em suspensão e aderentes respectivamente, reconstituídos em 1 L de água deionizada, acrescido de 2 g/L de bicarbonato de sódio, ajustando-se o pH em torno de 6,8. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 μm (MILLIPORE) sob pressão de bomba de vácuo (PRISMATEC, São Paulo) e mantido a 4°C. O teste de esterilidade foi realizado utilizando-se o meio Brain Heart Infusion (BHI HIMEDIA), incubando-se as amostras em estufa B.O.D (NOVA ÉTICA, São Paulo) a 37°C por 48 horas. Confirmada a esterilidade do meio, suplementou-se com 10% de soro fetal bovino estéril/SBF (GIBCO/Thermo Fisher Scientific), previamente inativado a 56°C em banho-maria por 30 minutos e solução de antibiótico a 1%, penicilina/estreptomicina (SIGMA).

4.7 Manutenção das Células

As linhagens celulares foram cultivadas em placas de 25 e 75 cm^2 (TPP) estéreis, em meio de cultivo RPMI ou DMEM suplementado com SBF e antibiótico, de acordo a necessidade experimental, foram mantidas em incubadora (SANYO), em atmosfera com 5% de CO_2 , umidade controlada e temperatura constante de 37°C. À medida que ocorria a proliferação celular/metabolização, o meio ácido foi removido após centrifugação das células a 250 x g por 5 minutos, em caso de células em suspensão, adicionando-se meio novo ao sedimento celular. Para manutenção das linhagens celulares em estoque, o sedimento celular foi ressuspendido em 90% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), congeladas em criotubos, inicialmente a -20°C, transferidas a -80°C, e finalmente em nitrogênio líquido a -196°C. Para os ensaios, as células foram rapidamente descongeladas a 37°C e cultivadas em meio adequado como já descrito. Os cultivos foram rotineiramente observados em microscópio invertido (QUIMIS).

4.8 Preparação de Inóculo Viral

Para a replicação *in vitro* do SIV, foram utilizadas as linhagens celulares citadas anteriormente, que já estavam previamente cultivadas em placas de poliestireno de 25 cm^2 com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico.

Após centrifugação por 5 minutos a 250 x g, o sedimento foi ressuspendido em meio RPMI, e inoculados 100 µL de SIV_{mac251} ou SIV_{BK-28} (200 pg de SIVp27), preferencialmente em células HUT-78, obtendo-se linhagem celular cronicamente infectada, adicionando-se periodicamente células não infectadas, incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e umidade (SANYO). Para a realização dos experimentos, o sobrenadante obtido do cultivo foi filtrado em membranas com poros de 0,22 µm e quantificado o SIVp27 por ELISA.

4.9 Ensaios de Viabilidade Celular

4.9.1 Contagem de Células com Azul de Trypan

Periodicamente as células em suspensão foram contadas, utilizando-se a coloração vital de azul de Trypan. Coletou-se alíquota de 10 µL de suspensão de células homogeneizadas e adicionou-se 10 µL de azul de trypan, preparado em concentração a 0,4 % p/v em PBS (INVITROGEN, 2012). A solução homogeneizada foi transferida a câmara de Neubauer e contadas as células em 4 quadrantes.

As células mortas captam o corante, tingindo-se em azul, o que não ocorre com as células vivas. O número de células viáveis por mililitro é calculado conforme a equação: Viabilidade Celular (VC) = total / 4 x 20000 = número de células/mL.

Após a contagem, ajustou-se o volume de meio RPMI ao número de células necessárias ao experimento, quer seja em placas de 25 cm², placas de 24 e 96 poços (**Tabela 4**).

Tabela 4. Densidade celular, volume do inóculo viral, quantidade de SIVp27 e volume total de meio de cultura em diferentes placas de cultivo.

Placa	Nº. de células	Inóculo viral (mL)	Volume (mL)	total SIVp27(pg/mL)
25 cm ²	1x10 ⁵	2,5	7,0	2.288
24 poços	5-6x10 ⁵	0,2-0,6	1,4-2,0	2.288
96 poços	1x10 ⁴ -1,6x10 ⁵	0,04-0,096	0,1-0,24	2.288

4.9.2 Ensaio de Citotoxicidade por Dosagem de Desidrogenase Láctica

Foi avaliada a viabilidade celular por quantificação da enzima citoplasmática desidrogenase láctica (LDH), liberada pela mitocôndria em meio extracelular, quando ocorre ruptura da membrana plasmática, em células sob estresse. Para tanto utilizou-se o kit Cytotoxicity Assay (LDH) (Promega, Madison, USA). Neste ensaio foram adicionados 90µL de suspensão celular (1×10^6 células viáveis/mL) por poço em uma placa de cultivo de 96 poços (TPP) e 50µL do peptídeo, em diferentes concentrações. Após incubação por 4 horas a temperatura ambiente, adicionou-se 20µL de Triton a 9% (v/v) aos poços controle, incubando-se por mais 45-60 minutos a 37°C. Após esse período, 50µL do substrato reconstituído (constituído de NADH 1,55 mol/L e azida sódica 146 mmol/L) foram adicionados, e a placa de cultivo mantida a temperatura ambiente, protegida da luz, por 30 minutos. Sequencialmente, 50µL de ácido acético a 1M (solução de parada) foram adicionados a cada poço e a absorbância foi lida em comprimento de onda de 490 nm. A coloração observada foi proporcional à quantidade de células lisadas.

O percentual de viabilidade celular foi calculado conforme a equação:

$$\% \text{ Citotoxicidade} = (\text{DOs}) / (\text{DO}_{100}) \times 100$$

Sendo “DOs” a densidade óptica da amostra e “DO₁₀₀” a densidade óptica do controle positivo para a viabilidade celular.

4.9.3 Determinação de Parâmetros Quali e Quantitativos por Citometria de Fluxo

Células HUT-78 em densidade de 1×10^5 foram cultivadas e tratadas por 24 horas com o peptídeo P6 em concentrações seriadas (3,12µM/1,56µM/0,78µM e 0,39 µM). Decorrido o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS e ressuspendidas em 100 mL de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl₂ – pH 7,4) contendo 5mL de anexina-V, por 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período, 400 µL do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados aos tubos que foram mantidos em gelo, com posterior adição de 500 mL da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídio – em concentração final de 2mg/mL). Para controle positivo da morte celular utilizou-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 2mM. As células foram incubadas por mais 5 minutos em gelo, e analisadas no citômetro FACSVerse (Becton Dickinson) com aquisição dos

dados realizado com o auxílio do *software* BD FACS *suite*. As análises foram realizadas a partir de 3 experimentos independentes realizadas em monoplicata. Durante as análises por citometria de fluxo (FACS), 10000 eventos foram adquiridos para cada amostra e experimento. Os resultados foram analisados no programa FlowJo (EUA) e os gráficos foram plotados no programa Prism[®] 5 (EUA) representando a média e desvio padrão da média.

4.10 Curva de crescimento de células tratadas e não tratadas com peptídeos escorpiônicos e infectadas ou não com SIV e quantificação viral de SIVp27

A cada experimento, ajustou-se o número de células ao recipiente de cultivo e volume de Meio RPMI (**Tabela 4**). Desta forma, obteve-se a cinética de crescimento populacional das células linfoblásticas tratadas em diferentes concentrações de peptídeos sem infecção lentiviral e pós infecção. Preliminarmente, as células estabelecidas (HUT-78 e 174X100) foram tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos escorpiônicos (**Tabela 5**). Os controles positivos consistiram de células infectadas com SIV não tratadas com os peptídeos escorpiônicos (PEs), tratadas e não tratadas com antirretrovirais, Azidotimidina e Efavirens, enquanto que os controles negativos contavam com células sem quaisquer tratamentos. Em placas de 24 e 96 cavidades, as linhagens celulares em densidades que variaram entre 5×10^5 a 6×10^5 células/1.400-2.000 μ L de meio RPMI, as quais foram tratadas com 20 μ L de cada peptídeo, em triplicata. Após 24 horas de tratamento, as células (HUT-78 ou 174X100) foram contadas e inoculou-se 200 a 600 μ L de SIV_{mac251} (2.288 pg/mL).

Tabela 5 . Concentrações iniciais dos peptídeos escorpiônicos

Peptídeo	Concentrações	Concentrações
	para HUT-78	para 174X100
Peptídeo 1	82,84 μM e 41,42 μM	29,11 μM
Peptídeo 2	81,26 μM e 40,63 μM	
Peptídeo 4	81,21 μM e 40,60 μM	
Peptídeo 5	79,92 μM e 39,96 μM	
Peptídeo 6	46,92 μM e 23,46 μM	16,49 μM 7,3525 μM e 3,6762 μM
Peptídeo 7	51,08 μM e 25,54 μM	
Peptídeo 8	105,73 μM e 52,86 μM	
Peptídeo 9	113,94 μM e 56,57 μM	
Peptídeo 10	98,21 μM e 49,10 μM	

4.11 Seleção de Peptídeos, Linhagens Celulares e Cepas Virais

Após seleção dos peptídeos 1 e 6 e a linhagem celular HUT-78 para os ensaios finais de atividade antirretroviral, em placas de 25 cm^2 , utilizou-se o protocolo otimizado, em que inicialmente 1×10^5 células foram submetidas a tratamento com o P1 e P6 em 3 diferentes concentrações (**Tabela 5**), e como controle foram utilizadas células infectadas com $\text{SIV}_{\text{mac251}}$ e tratadas com o antirretroviral azidotimidina (AZT), células somente infectadas com $\text{SIV}_{\text{mac251}}$ e células não infectadas. Após 12 horas de tratamento com esses peptídeos, as células foram contadas, transferidas a tubos cônicos de 15 mL e centrifugadas. Após remoção do sobrenadante, adicionou-se ao sedimento das células tratadas com os peptídeos, ao controle de células infectadas e a serem tratadas com AZT, 2,5 mL de inóculo viral em concentração de 2.288 pg/mL. Após 2 horas de centrifugação (espino inoculação) a 300 g, o sobrenadante das células foi removido, e

lavadas as células por 2 vezes e adicionado 7 mL de meio novo, assim como AZT às células controles não infectadas e infectadas com AZT. A cada 24 horas as células foram contadas e 2 mL do sobrenadante foi removido para quantificação de SIV_{p27} por ELISA, e repostado o mesmo volume de meio removido.

Tabela 6. Quadro sinóptico dos experimentos finais de atividade antirretroviral com os Peptídeos 1 e 6.

Descrição do tratamento
Controle negativo de células HUT-78 não infectadas
Células HUT-78 tratadas com P1 a 25 µM não infectadas e infectadas com SIV _{mac251}
Células HUT-78 tratadas com P1 a 12,5 µM não infectadas e infectadas com SIV _{mac251}
Células HUT-78 tratadas com P1 a 6,25 µM não infectadas e infectadas com SIV _{mac251}
Células HUT-78 tratadas com P6 a 1,56 µM não infectadas e infectadas com SIV _{mac251}
Células HUT-78 tratadas com P6 a 0,78 µM não infectadas e infectadas com SIV _{mac251}
Células HUT-78 tratadas com P6 a 0,39 µM não infectadas e infectadas com SIV _{mac251}
Células HUT-78 não infectadas e infectadas com SIV _{mac251} tratadas com AZT a 187,26 µM
Controle positivo de células HUT-78 infectadas com SIV _{mac251}

4.12 Detecção da atividade antirretroviral

4.12.1 Quantificação de SIV_{p27} por ELISA

Para avaliar a atividade antirretroviral, quantificou-se a proteína viral SIV_{p27} pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), em amostras de sobrenadante dos cultivos celulares, previamente tratados por 24 horas com os peptídeos e sequencialmente infectados com SIV_{mac251}. O ELISA fundamentou-se na sensibilização com anticorpo monoclonal murino 47 anti-SIV_{p27}, de cavidades da placa de poliestireno em fundo chato, conforme instruções do kit comercial em uso, “*SIV p27 Antigen Capture Assay*” (ADVANCED BIOSCIENCE LABORATORIES, INC).

Adicionou-se a todas as cavidades sensibilizadas com o anticorpo monoclonal, 25 µL de solução tampão com 2,5% de triton e, sequencialmente 100 µL de cada alíquota de sobrenadante dos cultivos de células linfoblásticas HUT-78 infectadas com SIV (e posterior tratamento com os peptídeos), e células HUT-78 e 174X100, tratadas

com os peptídeos, posteriormente infectadas com inóculo viral e centrifugadas a 250 g durante 5 minutos para remoção de debris celulares.

Para validação do teste e quantificação da produção viral dos sobrenadantes celulares, utilizou-se o antígeno SIVp27 em 6 diluições em meio RPMI, em concentrações de 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5 pg, conforme recomendações do kit. O controle negativo constitui-se de meio de cultivo RPMI. Após incubação em câmara úmida a 37°C por 1 hora, as cavidades foram lavadas por 4 vezes com tampão de salina fosfatada com “*tween*” 20 e secadas em papel toalha. Solução de anticorpo monoclonal anti-SIVp27 conjugado à peroxidase “*horseradish*” foi distribuída em volume de 100 µL a cada cavidade e incubada a placa por mais 1 hora nas mesmas condições anteriores. Ao término da reação, as cavidades foram novamente lavadas como já descrito, secadas e adicionado 100 µL do substrato, 3,3,5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)/peróxido de hidrogênio (H₂O₂), a cada cavidade. Decorridos 30 minutos, a reação foi neutralizada, por adição de 100 µL de ácido sulfúrico a 2N em cada cavidade.

A leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro/leitor de ELISA, em comprimento de onda de 450 nm. Considera-se o ensaio de ELISA validado se a concentração de 2000 pg de SIVp27 apresentar valores de densidade ótica entre 1,2 a 2,4, e para os controles negativos, apenas meio de cultivo, não maior que 0,15. Subtrai-se o valor de densidade ótica do controle negativo e aplica-se a regressão linear (*Graphpad Prism 7*), extrapolando-se os valores da diluição seriada do SIVp27 aos valores obtidos para a concentração proteica e para as contagens celulares.

4.12.2 Tratamento de Virions de SIV com Peptídeos Escorpiônicos

Sobrenadantes de células HUT-78 infectadas com SIV_{mac251} foram coletados após centrifugação a 250 x g durante 5 minutos para remoção de debris celulares e filtração em poros de 0,22 µm. Após ajuste do inóculo viral a 2.288 pg/mL, as alíquotas do inóculo viral foram separadamente tratadas com o peptídeo 1 e peptídeo 6 conforme as concentrações descritas na **tabela 5**. Sequencialmente, células HUT-78 foram inoculadas com as alíquotas virais tratadas com os peptídeos conforme descrito anteriormente.

4.12.3 Análise da produção de HIV defeutivo por transfecção de células HeLa P4 e 293T

Células 293T e HeLa P4 foram tripsinizadas, lavadas sob centrifugação a 150 x g por 5 minutos em solução salina estéril e contadas, ajustando-se o número de células a 3×10^5 células/mL/poço (microplacas de 96 poços) em DMEM sem soro fetal bovino. Para placas de 96 pocinhos prepara-se 960 μ L de DMEM sem SBF (10 μ L/poço) com 38,4 μ L do reagente transfectante, FuGene6 (Roche). Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, 19,2 μ g de DNA plasmidial foi adicionado à mistura e incubado por mais 15 min a temperatura ambiente. Subsequentemente, 9,6 mL da suspensão celular foi adicionada, e 110 μ L da mistura de transfecção foi semeada por poço. Após 14 horas da realização da transfecção, os peptídeos 1 e 6 foram individualmente adicionados, utilizando-se volume e concentração não tóxicas às células, conforme ensaios prévios de citotoxicidade. Após 36 horas da transfecção e incubação a 37°C com 5% de CO₂, as placas foram centrifugadas (100 g por 8 min) e 87,5 μ L do sobrenadante foi transferido a nova placa de 96 poços. O sobrenadante residual foi removido, e 100 μ L de detergente não iônico, Igepal CA630 a 0.1% (Sigma-Aldrich) em PBS foi adicionado a cada poço, seguido de 1 ciclo de congelamento/descongelamento para promover a lise celular. A produção das partículas virais defeitivas foi avaliada determinando-se as intensidades de fluorescência do sobrenadante e do lisado celular utilizando-se o leitor de microplacas Victor X2 (Perkin Elmer) ajustado para excitação e emissão em comprimentos de onda de 512 nm e 528 nm respectivamente. Para avaliar o ruído de fundo (*background*) da fluorescência, células não transfectadas foram utilizadas, assim como controle positivo, utilizando-se em lugar de peptídeos, AZT, e como controle negativo, células não tratadas.

4.12.4 Análise Ultraestrutural de células estabelecidas e primárias tratadas com peptídeos escorpiônicos e infectadas com SIV.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, as células foram tratadas com P6 e infectadas com SIV após 48 horas de tratamento. Às 72 horas do experimento, as células foram fixadas em glutaraldeído a 2%, paraformaldeído a 2%, CaCl a 5mM e sacarose a 3% em tampão de cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 a 4°C por aproximadamente 12 horas. Em sequência, as células foram pós-fixadas por 1 hora em tetróxido de ósmio a 2%, ferricianeto de potássio a 1,6% em tampão cacodilato de sódio

0,2M, e contrastadas *in block* em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% por 2 horas. A desidratação das amostras foi realizada em série de acetona (30-100%) e embebidas em resina *Spurr's*. As secções dos cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e posteriormente as amostras foram examinadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011 a 80 kV.

4.13 Delineamento estatístico

Para os ensaios realizados, em cultivos de célula, tratados e não tratados com os peptídeos escorpiônicos, sob infecção ou não infecção com SIV, e tratados ou não com antirretroviral conhecido para controle do teste, usualmente em intervalos de tempo múltiplos de 24 horas, os dados obtidos foram analisados com auxílio do programa estatístico Graphpad Prism versão 5, utilizando-se os testes: *One-way* ANOVA, *Two-way* ANOVA e testes auxiliares com regressão linear e não linear, assim como os testes de Tukey e Bonferroni, com intervalos de confiança de 95% e $P < 0,0001$ a $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Ação dos Peptídeos Escorpiônicos sobre Células Linfoblásticas Estabelecidas não Infectadas e Infectadas com SIV.

As análises iniciais do trabalho foram direcionadas a selecionar linhas celulares linfoblásticas estabelecidas e cepas virais de SIV melhor adequadas para a busca de atividade antirretroviral entre peptídeos escorpiônicos. Dentre as linhas celulares linfoblásticas estabelecidas utilizadas, a que melhor se acoplou às necessidades dos experimentos foi a HUT-78, visto que em condições normais rapidamente se recuperou da criomanutenção dividindo-se com robustez, com imagens nítidas e claras à microscopia ótica. Das cepas virais de SIV trabalhadas, a SIV_{mac251} mostrou-se constante quanta à replicação e produção viral.

Nos primeiros ensaios, as células HUT-78 foram previamente tratadas por 24 horas com os diferentes peptídeos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 em altas concentrações (**Figura 4**), e posteriormente infectadas com SIV_{mac251}. Observou-se que em 24 horas de tratamento essas populações celulares exibiram diferentes respostas quanto à proliferação (células tratadas com os peptídeos 8, 9 e 10, mostraram-se mitogênicas comparadas ao controle de células não tratadas, enquanto que os outros grupos de

tratamento não observou-se diferença significativa quanto à proliferação celular). Às 48 horas, as células tratadas com os peptídeos e infectadas com o SIV_{mac251} por mais 24 horas, observou-se que não houve diferença significativa entre a proliferação celular da população controle (não tratadas e não infectadas com SIV_{mac251}) e as tratadas independentemente com os peptídeos 1, 4, 5, 6, 8, 9 e 10. As populações tratadas com peptídeos 2 e 7, exibiram diferença significativa, no entanto, com menos proliferação de suas populações que a controle. Às 124 horas de cultivo, observou-se diferença significativa na ação dos peptídeos 1, 2, 5 e 6 em comparação ao controle, em que as populações tratadas com os peptídeos 1, 2 e 5 tiveram redução na proliferação celular enquanto que, as tratadas com o P6, apresentaram incremento na população de células. Os peptídeos 4, 7, 8, 9 e 10 não apresentaram diferença significativa quanto à proliferação celular quando comparadas com o controle. Às 168 horas de cultivo, apenas os peptídeos 6, 8 e 10 exibiram diferença significativa quando confrontadas com a população de células do controle, com maior proliferação de células, principalmente as tratadas com o P6.

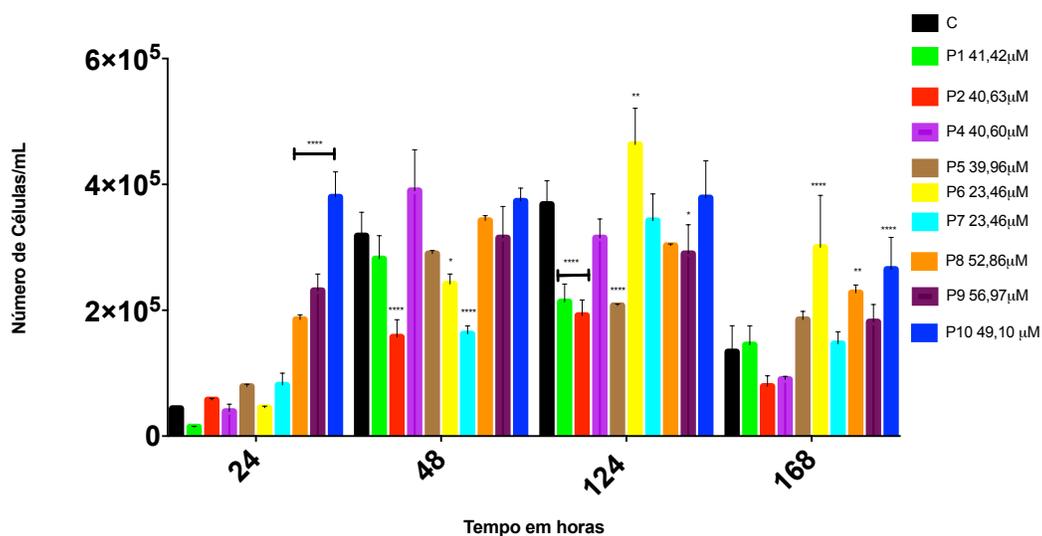


Figura 4. Quantificação de células HUT-78 tratadas previamente com peptídeos escorpiônicos em diferentes concentrações e após 24 horas de tratamento, foram infectadas com SIV_{mac251}, exibiram diferentes respostas quanto à proliferação celular ou toxicidade, utilizando-se como controle células HUT-78 não infectadas e não tratadas com peptídeos (C). (Two-way ANOVA com teste de Bonferroni com múltiplas comparações, com 95% de intervalo de confiança, ****P<0,0001; ***P=0,0002; *P=0,0251).

Sequencialmente, nos ensaios de quantificação da proteína viral SIVp27 em células HUT-78, dobrou-se as concentrações dos 9 peptídeos utilizados no ensaio anterior de densidade celular, a fim de se verificar a ação dos mesmos na replicação viral, conforme expresso nas **Figuras 5, 6A e 6B**.

Na **Figura 5**, observou-se que houve a redução significativa da produção viral quantificada por SIVp27 ocorreu com a população de células tratadas com P6 quando comparada com as células sem nenhum tratamento, mas infectadas com SIV_{mac251}, ou controle positivo/CP. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa quanto à redução da produção viral. Observe-se que, o tratamento com o antirretroviral AZT, também reduziu significativamente a produção viral quando comparada à população de células sem nenhum tratamento, mas infectadas com SIV_{mac251}. Decorridas 168 horas de cultivo, as células tratadas com os P1, P2, P4, P5, P6, P7 e P8 apresentaram redução estatisticamente significativa da produção viral quando comparadas com o controle positivo, com maior redução da produção viral em células tratadas com o P6.

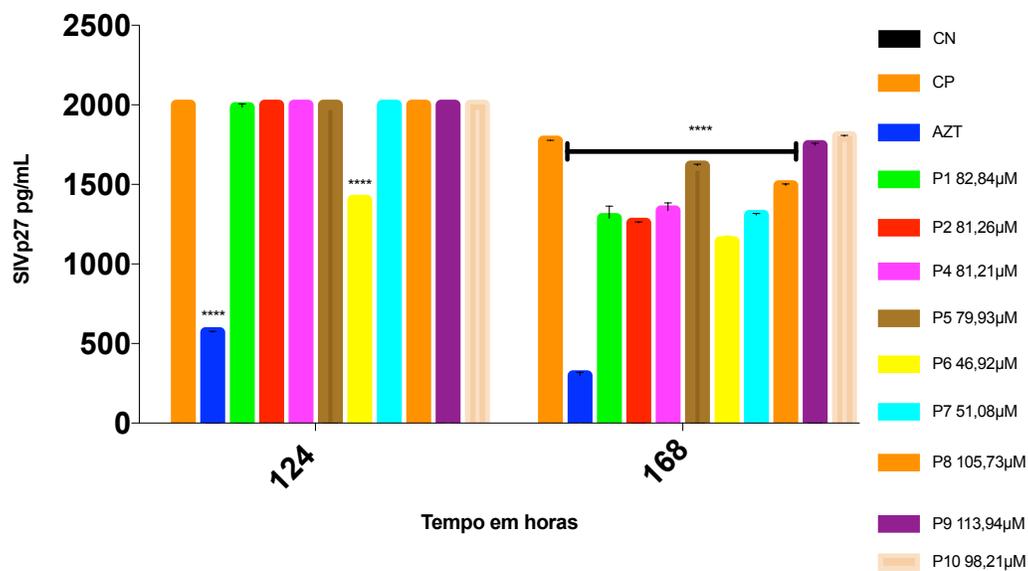


Figura 5. Quantificação da proteína viral SIVp27 em células HUT-78 tratadas com os peptídeos escorpiônicos e infectadas com SIV_{mac251}, utilizando-se como controles células não infectadas e não tratadas com os peptídeos (CN) e células unicamente infectadas com SIV_{mac251}(CP), (Two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações de Bonferroni, com 95% de intervalo de confiança, ****P<0,0001).

Utilizando células HUT-78, verificou-se com os tratamentos em alta concentração dos peptídeos, a produção viral via quantificação por ELISA da SIV_{p27} em células HUT-78 (**Figura 6A e 6B**). Observou-se que nos intervalos iniciais, às 48 horas de cultivo, nenhum tratamento com os peptídeos reduziu a produção viral em comparação à população de células controle, unicamente infectadas com SIV_{mac251}, enquanto que o tratamento com P6 reduziu abruptamente o número de células. Em menor escala, o P2, P7 e P5 também reduziram o número de células. Os outros tratamentos mantiveram a densidade celular equivalente ao CP, com maior número de células para os tratamentos com P9 e P10. No intervalo seguinte, às 96 horas de cultivo, o P6 reduziu em quase a metade a produção viral em relação ao CP, ao mesmo tempo que a densidade celular equivalia a da população do CP. Em menor ação, o P7, P4 e P2 também reduziram a produção viral, equivalente aproximadamente a 25% do CP, no entanto a densidade celular nas populações tratadas com P2 e P4 encontrava-se reduzida, quase a metade da população do CP, enquanto que a população de células tratadas com P7 apresentava a mesma densidade, aproximadamente equivalente a do CP. Os outros peptídeos pouco alteraram a produção viral em relação ao CP, com incremento significativo na densidade celular em populações tratadas com o P9 e P10. No intervalo final, às 144 horas, a redução da produção viral imposta por P6 não se manteve nas mesmas proporções do intervalo anterior, embora pouco menos que a do CP, no entanto, a densidade celular experimentou abrupto incremento, aproximadamente 25% a mais do CP. Os tratamentos com os outros peptídeos, não reduziram a produção viral, tanto que, em populações tratadas com P5, P9 e P10 quantificou-se maior produção viral que o CP, enquanto apenas o P10 manteve a densidade celular pouco acima do CP, excetuando-se o tratamento com P1, altamente mitogênico, que exibiu em torno de 40% a mais da densidade celular do CP (**Figura 6A e 6B**)

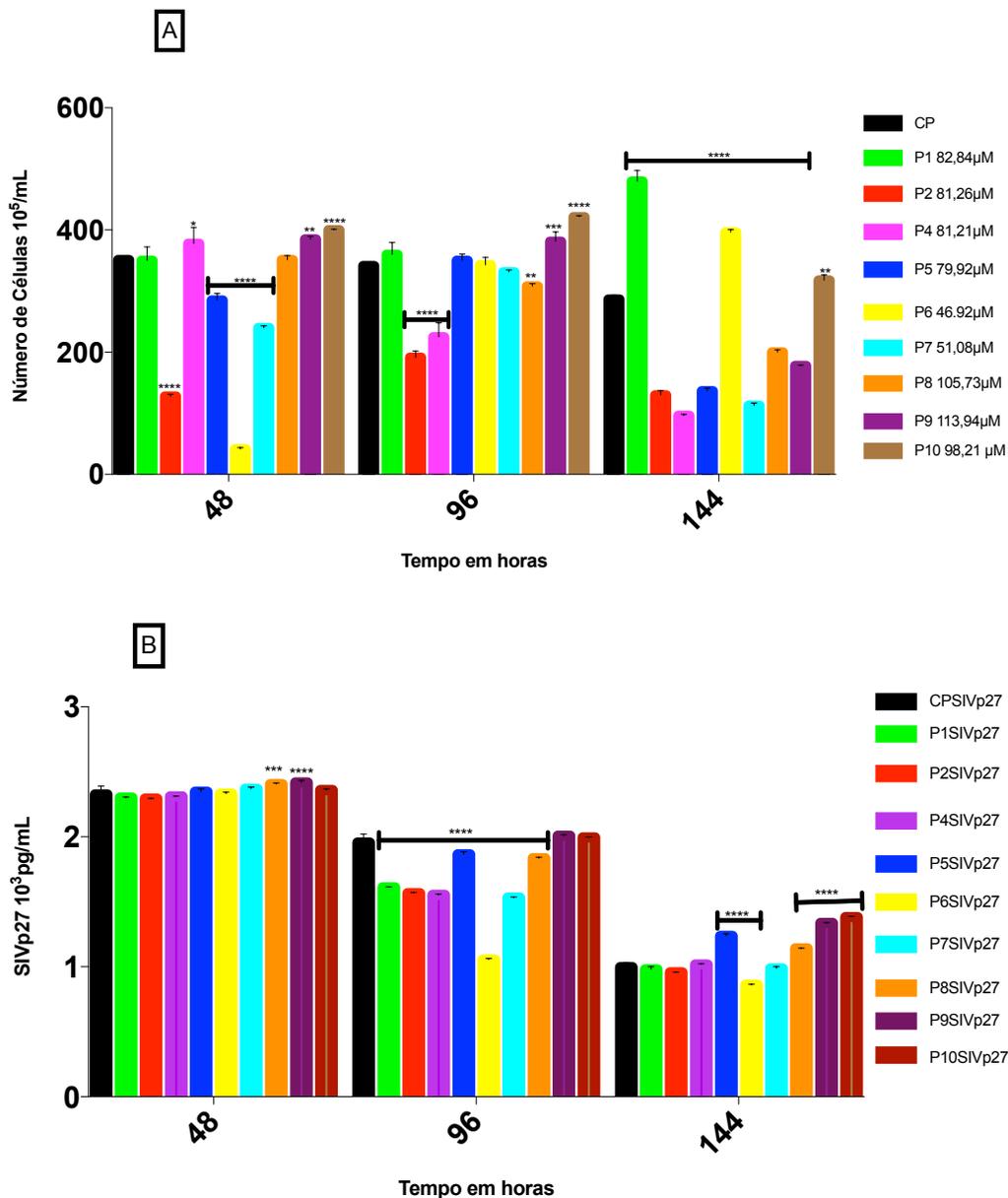


Figura 6. Número de células HUT-78 tratadas com peptídeos escorpiónicos, posteriormente infectadas com SIV_{mac251} às 24 horas de tratamento (6A), e quantificação de SIVp27, nessas mesmas células (6B) nos mesmos intervalos de tempo (Two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações de Bonferroni, com 95% de intervalo de confiança, **** $P < 0,0001$; * $P \leq 0,0338$ e $P \geq 0,0271$; ** $P \leq 0,0066$ e $P \geq 0,0032$; *** $P \leq 0,0003$ e $P \geq 0,0001$).

A partir destes resultados e apesar de que outros peptídeos pudessem ser selecionados, nos ensaios subsequentes houve a necessidade de se trabalhar com menos peptídeos e estes resultados prévios, apontaram para a seleção do P1 e P6 para as

próximas etapas do trabalho.

Os peptídeos 1 e 6, foram testados em outras linhagens celulares, conforme expresso na **figura 7**, em que células 174X100 foram tratadas independentemente com o P1 e AZT, e após 24 horas, submetidas por 2 horas a infecção com SIV_{BK-28}, constatou-se, após submissão ao ensaio estatístico que, após as 24 horas iniciais de tratamento com P1 e AZT, diferença significativa quanto à proliferação de células, comparando-se células não infectadas (CN) com células tratadas com o P1 e com AZT. Após 2 horas pós-infecção viral, às 26 horas de cultivo, com células tratadas com o P1 e AZT, tanto infectadas como não infectadas, observou-se diferença significativa, quando comparadas às células somente infectadas com SIV_{BK-28}, em que todos os tratamentos reduziram o número de células nas populações tratadas, com maior efeito nos tratamentos com o P1, tanto em células não infectadas como em infectadas. Às 74 horas de cultivo, tanto o tratamento com o P1 como com AZT, quer seja em células não infectadas como infectadas, apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas à população de células somente infectadas, com redução das células nos diferentes tratamentos, com maior intensidade em células tratadas com o P1. No intervalo seguinte, às 168 horas, houve redução estatisticamente significativa em número de células de populações tratadas com o P1, tanto de infectadas como de não infectadas, assim como em células não infectadas tratadas com AZT em comparação a população controle, de células somente infectadas, enquanto que, células infectadas e tratadas com AZT, tiveram o número de células incrementado em comparação ao CP. No intervalo final de tempo, às 240 horas de cultivo, apenas o tratamento com AZT de células infectadas diferiu de forma estatisticamente significativa do controle de células unicamente infectadas com SIV_{BK-28}. As células não infectadas, tratadas com AZT, foram todas mortas. Os tratamento com o P1, tanto em células não infectadas como infectadas, não diferiu de forma estatisticamente significativa em relação ao CP, que também apresentou bastante redução de células em sua população. Comparando o CP, de células unicamente infectadas com SIV_{BK-28}, e células não infectadas designadas como CN, observa-se que às 24 h, 26 h e 74 h, não houve diferença estatística significativa entre esses controles, CP e CN, relativo ao número de células nas populações em análise, enquanto que, às 168 h e 240 h, houve diferença estatisticamente significativa, quanto à proliferação de células, com incremento elevado do CN e bastante redução do CP.

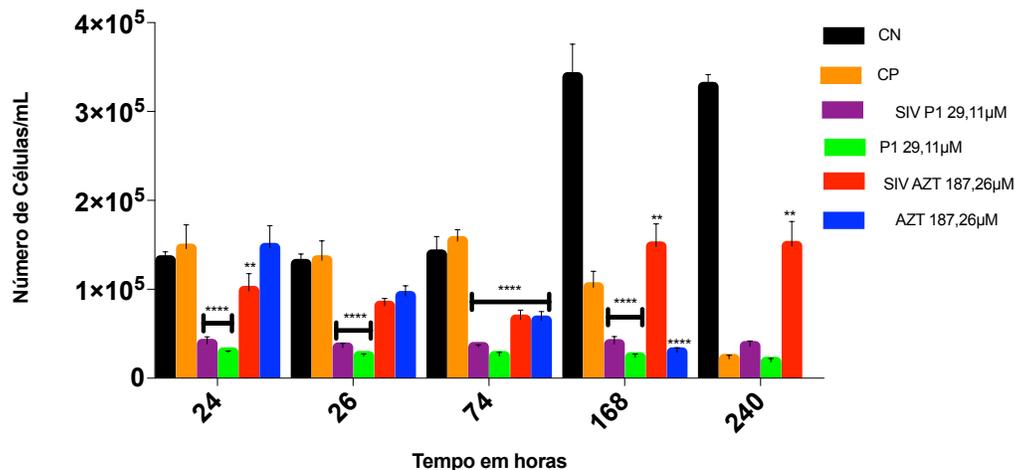


Figura 7. Células 174x100 tratadas com o P1, infectadas e não infectadas com SIV_{BK-28} e, infectadas e não infectadas tratadas com AZT (Two-way ANOVA, com 95% de confiança, teste de Bonferroni com múltiplas comparações, ****P<0,0001; ***P=0,0006; **P≥0,0024 e P≤0,0098).

Na **figura 8**, em que populações de células 174X100, não infectadas e infectadas com SIV_{BK-28}, foram tratadas com o P6 em duas concentrações seriadas, e como controles, foram utilizadas células não infectadas e infectadas tratadas com AZT, assim como células não infectadas e infectadas como controle negativo e positivo (CN e CP), observou-se que às 24 horas de cultivo, células tratadas com o P6 na concentração de 7,35 µM, incrementaram o número de células de forma significativa, quando comparadas aos controles, enquanto que, o P6 na menor concentração, não mostrou diferença significativa. Células infectadas e não infectadas, tratadas com AZT, mostraram diferença significativa, quando comparadas com o CP. O tratamento de células não infectadas com o P6 nas duas concentrações utilizadas não mostrou diferença significativa quando comparadas ao CP, relativo à proliferação celular. Às 48 horas de cultivo, apenas as células não infectadas, tratadas com o P6 nas duas concentrações, exibiram diferença na proliferação celular de forma significativa, quando comparadas ao controle positivo de células infectadas com SIV_{BK-28}, enquanto os outros tratamentos não apresentaram resultados significativos. No intervalo às 144 horas, somente o tratamento de células não infectadas com o P6 nas duas concentrações resultou em diferenças significativas, com elevado incremento no número de células ao comparar-se com o controle positivo. Os outros tratamentos não apresentaram diferenças significativas. No intervalo final, às 240 horas de cultivo, o tratamento de

células não infectadas com o P6 em ambas concentrações, mostraram resultados significativos, com elevado incremento no número de células quando comparadas ao controle positivo, enquanto que os outros tratamentos não resultaram em diferenças significativas. Ao se comparar o controle negativo, de células não infectadas com o controle positivo de células infectadas, ambos controles sem nenhum tratamento, observa-se que o CN apresentou maior proliferação celular que o CP, de forma significativa, exceto no intervalo final de 240 horas. As células não infectadas tratadas com o P6 nas duas concentrações, apresentaram diferença significativa relativo à proliferação de células não infectadas, utilizadas como CN, nos intervalos de 24 h e 240 h, em que às 24 h de cultivo, células não infectadas tratadas com o P6 nas duas concentrações proliferaram menos que o CN, enquanto que, a partir das 48 h de cultivo até o final, proliferaram mais as células não infectadas tratadas com o P6.

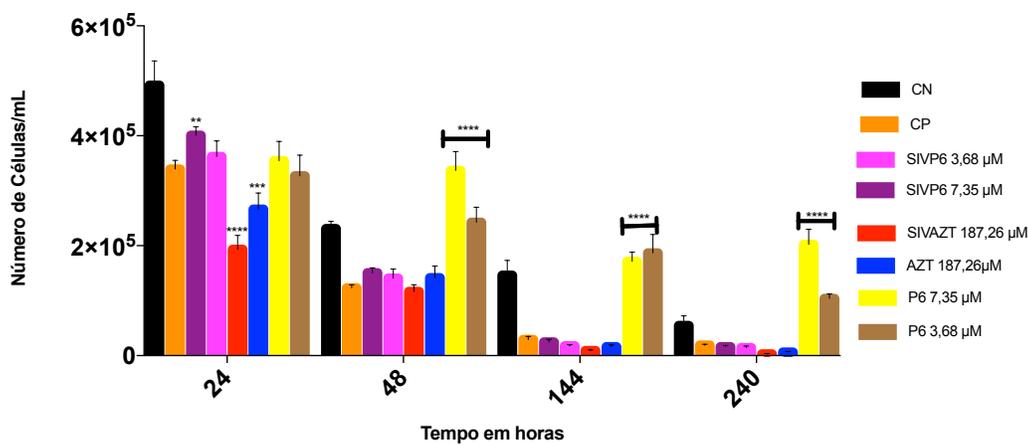


Figura 8. Células 174X100, infectadas com SIV_{BK-28} e não infectadas, tratadas com duas concentrações seriadas do P6, utilizando-se como controles, células infectadas e não infectadas tratadas com AZT e controles de células infectadas e não infectadas (Two-way ANOVA, com 95% de confiança, teste de Bonferroni com múltiplas comparações, ****P<0,0001; ***P=0,0004; **P=0,0041).

Células H9 foram quantificadas após tratamento com o P1 e P6, em diferentes concentrações (**Figura 9**) e os resultados analisados estatisticamente. Às 24 horas de tratamento, não houve diferença significativa quanto ao número de células em populações controle, sem nenhum tratamento, e populações tratadas com o P6 nas concentrações de 0,2404 e 2,404 µM, enquanto que, populações tratadas com o P1 em concentrações de 0,424, 4,244 e 42,44 µM, houve diferença significativa, no entanto, o P6 na concentração de 24,04 µM, houve diferença significativa no quantitativo de

células na população comparativamente ao controle. Às 48 horas de tratamento, não houve diferença significativa em populações tratadas com o P6 nas concentrações de 0,2404 e 2,404 μM em comparação com a população controle de células. Houve diferença significativa no tratamento das populações de células com o P1 nas 3 concentrações utilizadas. Novamente, o tratamento da população de células com o P6 na concentração de 24,04 μM resultou em diferença significativa no número de células em comparação ao controle. No intervalo de 72 horas de cultivo, tanto o P1 quanto o P6 em todas as concentrações utilizadas no tratamento das populações de células mostraram quantitativos significativamente diferentes. Às 96 horas de cultivo, houve diferença significativa quanto ao quantitativo de células, no tratamento com o P1 e P6, em todas as concentrações utilizadas, em comparação ao controle. No intervalo final, às 168 horas, o P1 nas concentrações de 0,4244 e 42,44 μM apresentaram ao tratamento das populações, diferença significativa em comparação ao controle, relativo ao quantitativo de células, enquanto que o tratamento com o P1 em concentração de 0,2404 μM , não apresentou diferença significativa aos parâmetros já citados. Relativo ao tratamento com o P6, apenas a concentração de 0,2404 μM diferiu significativamente da população controle. As outras concentrações do P1 e P6 não apresentaram diferenças significativas em seus tratamentos às populações de células em comparação ao controle negativo, referente ao quantitativo dessas células. Em resumo, às 24 horas, o P1 nas 3 concentrações utilizadas (0,4244-42,44 μM) apresentou-se tóxico às células H9, que no caso do P6, apenas a concentração de 24,04 μM foi tóxica. Posteriormente, às 48 horas, o P1 nas 3 concentrações ainda apresentou-se tóxico, enquanto o P6 apresentou-se tóxico apenas na concentração de 24,04 μM , enquanto a menor concentração de P6, de 0,2404 μM apresentou efeito mitogênico sobre as células H9, em referência ao controle. Às 72 horas, a única concentração tóxica foi do P1 a 42,44 μM , enquanto todas as outras concentrações exerceram efeito mitogênico. Às 96 horas, houve redução geral no quantitativo de células em comparação ao controle, enquanto que no intervalo final de 168 hs, o P1 na concentração de 4,244 μM apresentou número de células equivalente ao controle, assim como o P6 nas concentrações de 2,404 e 24,04 μM . As outras concentrações apresentaram efeito tóxico sobre as células H9.

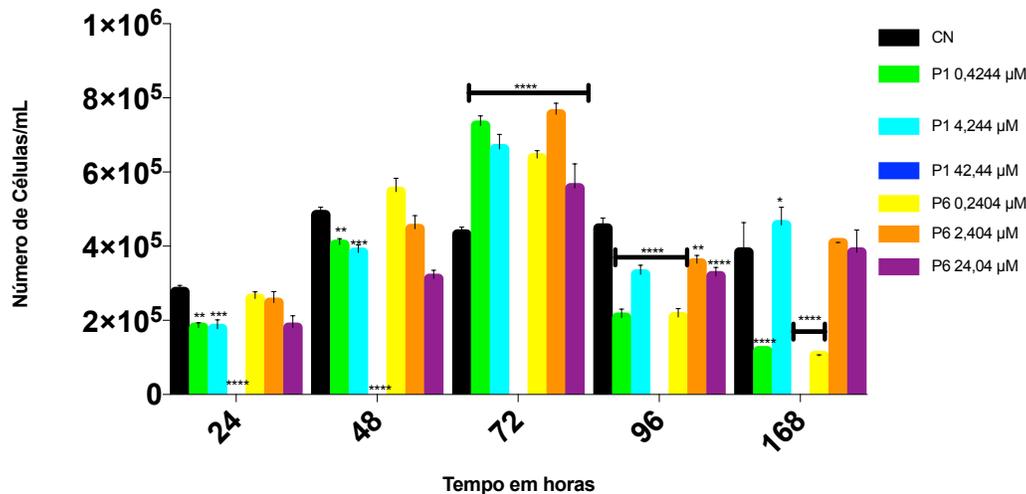


Figura 9. Quantificação de células H9 tratadas com diferentes concentrações de P1 e P6 ((Two-way ANOVA, com 95% de confiança, teste de Bonferroni com múltiplas comparações, **** $P < 0,0001$; *** $P \leq 0,0007$ e $P \geq 0,0005$; ** $P \leq 0,0095$ e $P \geq 0,0012$).

Após análise estatística, observa-se na **figura 10** que após 48 horas de cultivo, previamente à infecção por SIV_{mac251} , observa-se que células HUT-78 tratadas com o P6 e AZT foram reduzidas significativamente em número, em comparação às células sem nenhum tratamento. O tratamento com o P1 não mudou o comportamento da população de células em tratamento em comparação ao controle negativo. Às 96 horas de cultivo, a população de células tratadas com o P6 reduziram significativamente seu número em relação ao controle negativo, enquanto os outros tratamentos, incluindo as células unicamente infectadas com SIV_{mac251} , tomadas com controle positivo, CP, não tiveram o número de células em suas populações significativamente diferentes das células do controle negativo. Após 144 h de cultivo, apenas as células tratadas com o P6 e infectadas com SIV_{mac251} incrementaram de modo significativo o número de células na população tratada em comparação ao controle negativo, enquanto que os outros tratamentos e mesmo a população de células do controle positivo, apenas infectadas com SIV_{mac251} , não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle negativo. Às 192 horas de cultivo, apenas os tratamentos com o P1 e AZT, mostraram diferenças significativas em relação ao número de células da população controle. Os outros tratamentos não alteraram o número de células nas populações em tratamento tomando como referência o controle negativo. Às 240 horas de cultivo, os tratamentos

com o P1, AZT, SIVP1, SIVP6, SIVAZT e CP(SIV), reduziram o número de células nas populações em comparação ao controle negativo.

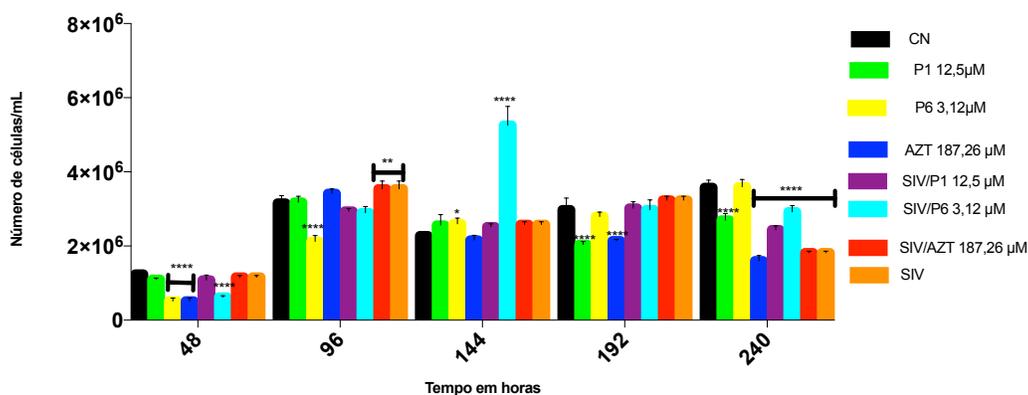


Figura 10. Quantificação de células HUT-78 tratadas com o P1 e P6 tomando como controles, células não infectadas e infectadas com SIV_{mac251}, tratadas ou não com AZT (Two-way ANOVA, com 95% de confiança, teste de Bonferroni com múltiplas comparações, ****P<0,0001; ***P=0,0001; **P=0,0099).

Na **figura 11** reportou-se análise estatística da produção de SIVp27 em células tratadas com o P1 e P6 e infectadas com SIV_{mac251}. Às 48 horas de cultivo, não houve diferenças significativas em nenhum dos tratamentos, incluindo os controles de células tratadas com AZT, quanto à produção de SIVp27 por células HUT-78 e, células unicamente infectadas. Às 96 horas de cultivo, também não houve diferença significativa entre os tratamentos, quanto à produção de SIVp27, em comparação ao controle positivo. Às 144 e 192 horas de cultivo, tão pouco se encontrou diferenças significativas entre os tratamentos realizados. Às 240 horas de cultivo, observou-se diferença significativa quanto à produção de SIVp27 entre os tratamentos com P1 e P6, em que células tratadas com P1 produzem mais SIVp27 que células tratadas com o P6. No intervalo final, às 288 horas, houve diferença bastante significativa quanto à produção viral entre os tratamentos com o P1 e P6, em que o P6 reduziu a produção a metade do que reduziu o P1. Também houve diferença significativa entre células tratadas com AZT e o controle positivo, com redução significativa de SIVp27 por AZT. O tratamento tanto com o P1 quanto com o P6 reduziram bastante de modo significativo a produção de SIVp27 em comparação ao controle positivo, com maior redução resultante do tratamento com o P6. Comparando-se à redução de SIVp27 entre os tratamentos com AZT e P6, também houve diferença significativa, com maior redução operada por AZT, similarmente com o P1.

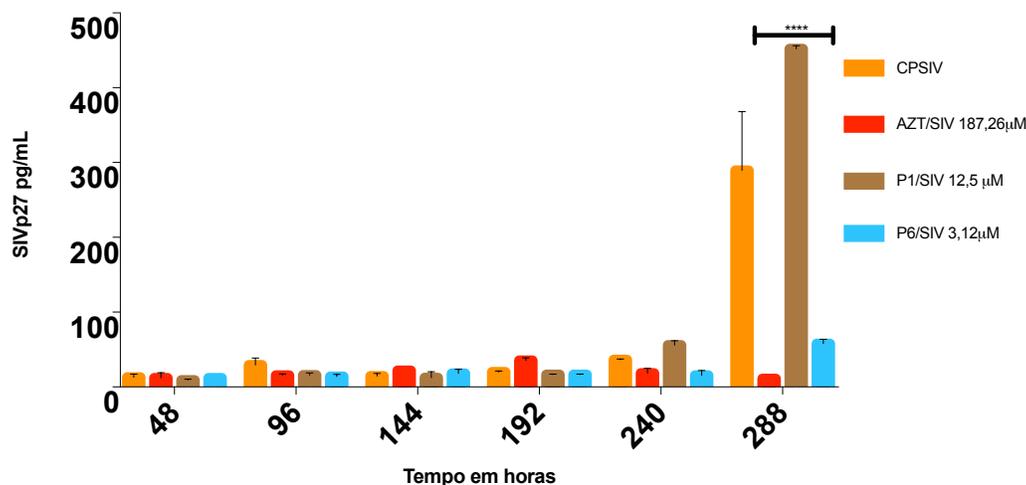


Figura 11. Produção de SIVp27 em células HUT-78 tratadas com o P1 e P6 e infectadas com SIV_{mac251}. (Two-way ANOVA, com 95% de confiança, teste de Bonferroni com múltiplas comparações, ****P<0,0001).

5.2 Ação dos Peptídeos Escorpiônicos 1 e 6 sobre virions de SIV_{mac251}

Sobrenadantes de células HUT-78 infectadas com SIV_{mac251} foram tratados com o P1 e P6 durante 1 hora, e posteriormente, os virions (do sobrenadante) tratados foram utilizados para infecção de células HUT-78, utilizando-se as concentrações de 12,5 µM para o P1 e 3,12 µM para P6 e como controle, após a infecção viral, as células foram tratadas com AZT, isoladamente ou em combinações, AZT+P6 e AZT+P1. Conforme se observa na **figura 12**, às 24 horas de cultivo, todos os tratamentos realizados, exceto com AZT, apresentaram resultados significativamente diferentes do controle (SIV), de células infectadas sem nenhum tratamento, em que virions tratados com o P1 e a combinação AZT+P1, produziram mais SIVp27 que as células controles infectadas com SIV_{mac251}, enquanto que, os tratamentos com o P6, AZT e a combinação de P6+AZT, reduziram a quantidade de SIVp27 produzida pelas células infectadas em comparação ao controle. Às 48 horas de cultivo, todos os tratamentos apresentaram resultados que diferiram significativamente do controle, em que o AZT, P6 e a combinação de P6+AZT, reduziram a produção de SIVp27, distintamente aos tratamentos com o P1 e AZT+P1, que incrementaram significativamente a produção viral quando comparadas ao controle. Às 72 horas de cultivo, todos os tratamentos, exceto com AZT, diferiram significativamente quanto à produção de SIVp27 em relação ao controle, de forma que,

os tratamentos com o P1 e P1+AZT incrementaram a produção viral e, com o P6 e P6+AZT, houve redução significativa da produção, quando comparados ao controle. Às 96 hs de cultivo, todos os tratamentos, exceto com a combinação de P1+AZT, diferiram significativamente em relação à produção viral quando comparadas ao controle, destacando-se que o tratamento com AZT, P1 e P1+AZT aumentaram a produção viral e, com P6 e P6+AZT, houve redução significativa da produção viral. No intervalo seguinte, às 120 h de cultivo, apenas o tratamento com o P1 não diferiu da produção viral do controle, mas o tratamento com AZT, P1 e P1+AZT incrementaram a produção viral, enquanto que o tratamento com o P6 e P6+AZT reduziram a produção viral em relação ao controle. Às 144 h de cultivo, todos os tratamentos diferiram significamente quanto à produção viral do controle de células somente infectadas com SIV_{mac251}. O tratamento com AZT e P1 resultaram em incremento na produção viral, enquanto que o P6, P6+AZT, P1 e P1+ AZT, reduziram a produção viral.

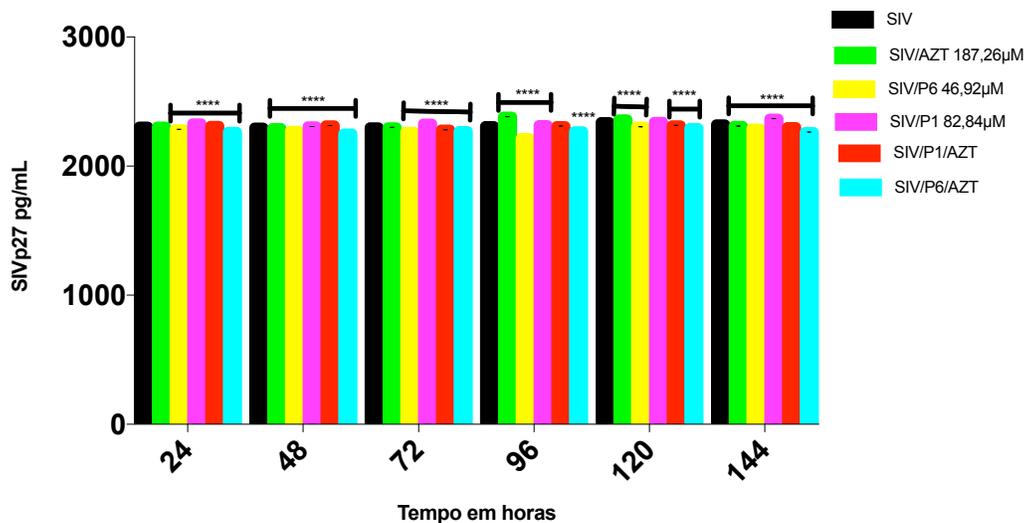


Figura 12. Produção de SIVp27 após tratamento de virions com P1 e P6. Virions de SIV_{mac251} submetidos a diferentes tratamentos, com P1, P6 e AZT e combinações, utilizados para infectar células HUT-78 para posterior quantificação de SIVp27 (Two-way ANOVA, com 95% de confiança, teste de Bonferroni com múltiplas comparações, ****P<0,0001).

5.3 Citotoxicidade dos Peptídeos Escorpíonicos sobre Células Linfoblásticas

5.3.1 Quantificação da Desidrogenase Láctica

No ensaio de citotoxicidade, utilizando-se como parâmetro a quantificação de desidrogenase láctica por células HUT-78 infectadas ou não com SIV_{mac251}, submetidas a

diferentes tratamentos, com o P1, P6 e AZT, constatou-se, conforme a **figura 13**, que à medida que se reduz de forma significativa a concentração de P1, de 50 a 12,5 μM , tanto em células não infectadas como infectadas com $\text{SIV}_{\text{mac251}}$, aumenta a produção de desidrogenase láctica. Células tratadas com AZT em células não infectadas como em infectadas, a produção de desidrogenase láctica é significativamente distinta da população de células controle. Células não infectadas e infectadas tratadas com o P6, nas três concentrações de 12,5 a 3,125 μM apresentaram de forma significativa diferença na produção de LDH por células da população controle. Comparando-se a população de células do controle negativo com células da população do controle positivo, unicamente infectadas com $\text{SIV}_{\text{mac251}}$, observou-se diferença significativa quanto à liberação de desidrogenase láctica. Em resumo, células tratadas com o P1 na concentração de 50 μM , infectadas ou não, liberaram muito menos LDH que células do controle negativo. Da mesma forma, células tratadas com o P6, nas 3 concentrações, tanto em células infectadas como não infectadas, reduziu significativamente a liberação de LDH comparativamente a população de células do controle negativo. As populações de células tratadas com o P1 em concentrações de 25 e 12,5 μM , infectadas ou não, tratadas com AZT, em células infectadas ou não, e controle positivo, de células unicamente infectadas, apresentaram maior liberação de LDH que as células da população controle, sem infecção e sem tratamento.

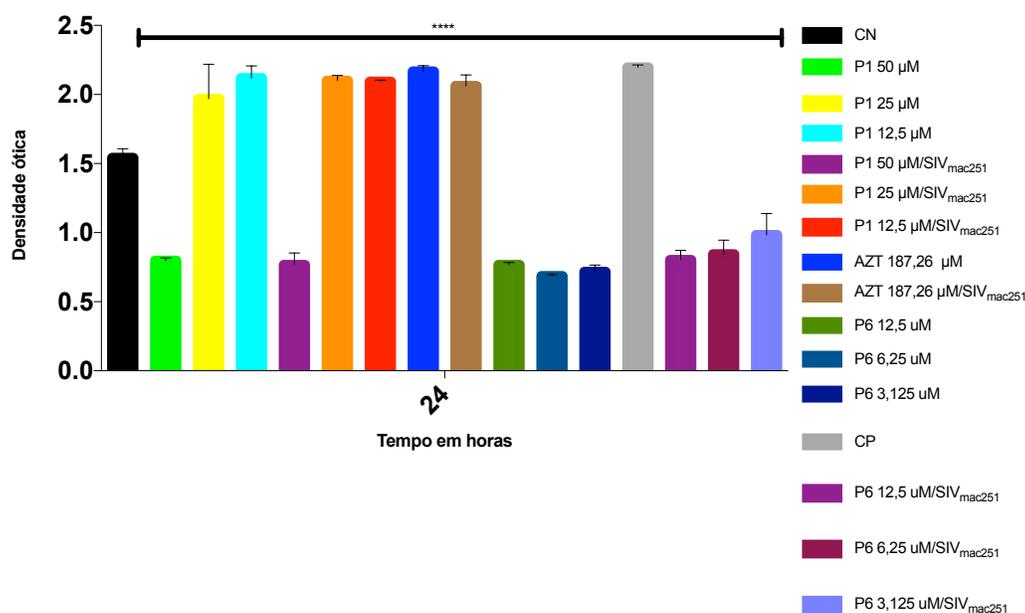


Figura 13. Quantificação de desidrogenase láctica em células HUT-78 submetidas a diferentes tratamentos, como P1, P6 e AZT em células não infectadas e infectadas com SIV_{mac251} (One-way ANOVA com múltiplas comparações no teste de Bonferroni, com 95% de confiança, ****P<0,0001).

5.3.2 Avaliação de Citotoxicidade por Citometria de Fluxo

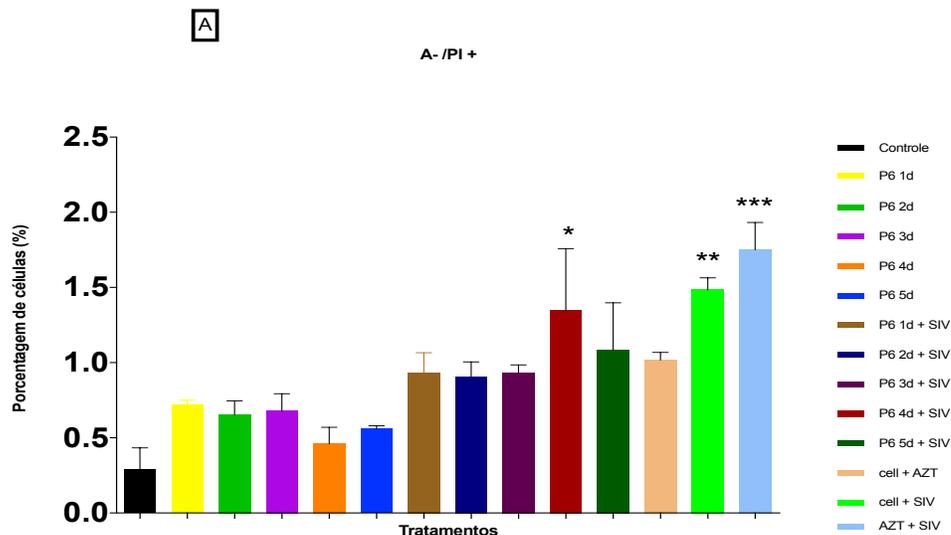


Figura 14 A. Avaliação da morte celular através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por Citometria de fluxo após exposição das células HUT-78 ao P6 e P6 + SIV_{mac251} em várias diluições (1d-2d-3d-4d e 5d) por 24 horas. Na **Figura 14A** observa-se células mortas (Anexina-, PI+) Neste ensaio, as células infectadas com SIV_{mac251} e tratadas com AZT apresentaram maior porcentagem de células mortas, enquanto que células somente tratadas com P6 e em mais baixas concentrações apresentaram menor porcentagem de células mortas, efeito este mais visível em células infectadas com SIV e tratadas com o P6, com maior porcentagem nos tratamento de maior concentração de P6. Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com controle (*P<0,01;**P<0,001 e ***P<0,0001).

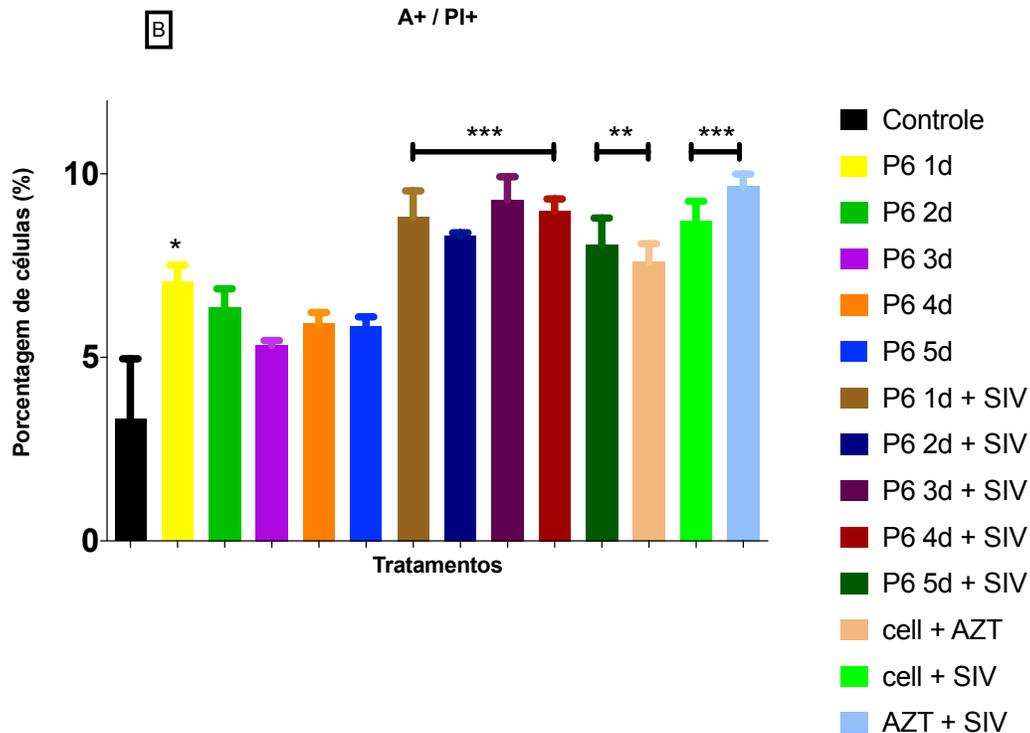


Figura 14B Avaliação da morte celular através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por Citometria de fluxo após exposição das células HUT-78 ao P6 e P6 + SIV_{mac251} em várias diluições (1d-2d-3d-4d e 5d) por 24 horas. A figura 14B observa-se estágio de apoptose tardia ou necrose (Anexina +, PI+). Detectou-se neste ensaio que células infectadas com SIV_{mac251} e tratadas quer seja com P6 ou AZT apresentam maior porcentagem de células em apoptose tardia ou necrose, enquanto que células não infectadas e células apenas tratadas com o P6, menor porcentagem de apoptose tardia ou necrose. Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com controle (*P<0,01;**P<0,001 e ***P<0,000).

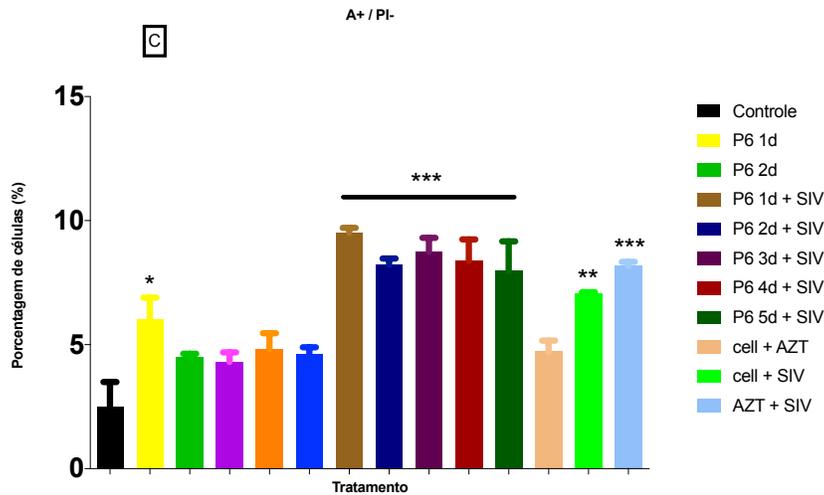


Figura 14C Avaliação da morte celular através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por Citometria de fluxo após exposição das células HUT-78 ao P6 e P6 + SIV_{mac251} em várias diluições (1-2-3-4 e 5) por 24 horas. Na **Figura 14C** observa-se que a maior porcentagem de células em estágios iniciais de apoptose, encontram-se entre células HUT-78 infectadas e tratadas com o P6 e AZT, enquanto que células unicamente tratadas com AZT e sem nenhum tratamento não infectadas, apresentaram a menor porcentagem de células em estágios iniciais de apoptose, embora células tratadas com concentração elevada de P6, apresentaram maior porcentagem de células neste estágio. Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com controle (* $P < 0,01$; ** $P < 0,001$ e *** $P < 0,000$).

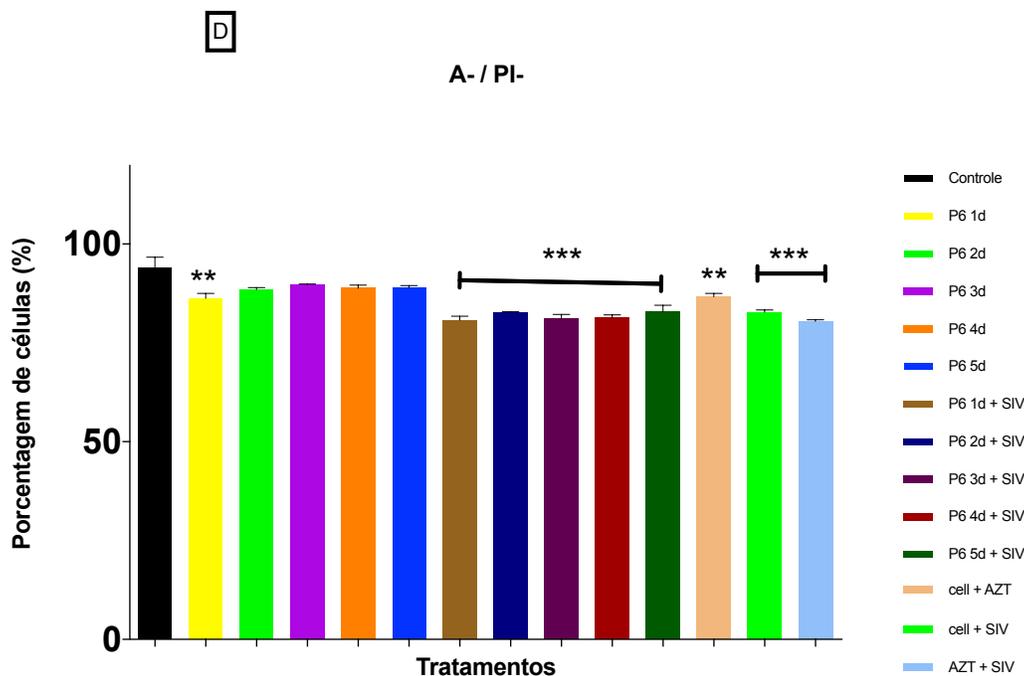


Figura 14D Avaliação da morte celular através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por Citometria de fluxo após exposição das células HUT-78 ao P6 e P6 + SIV_{mac251} em várias diluições (1-2-3-4 e 5) por 24 horas. Na **Figura 14D** observa-se células não apoptóticas ou viáveis (Anexina -, PI-). As células infectadas e tratadas com P6 apresentaram menores níveis e equivalentes de células viáveis, enquanto que células não infectadas e não tratadas assim como células somente tratadas com P6 apresentaram maior porcentagem de células viáveis, exceto células tratadas com P6 em maior concentração. Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com controle (*P<0,01; **P<0,001 e ***P<0,000).

5.4. Produção de citocinas por células linfoblásticas e células leucocitárias primárias quando submetidas a tratamento com o peptídeo 6.

Não houve produção de IFN- γ , IL-8, IL-4, IL-6 e IL-10 em nenhum grupo de células HUT-78 submetidas aos tratamentos com o P6, com ou sem infecção viral e, ainda em células infectadas ou não e tratadas ou não com AZT. Apenas células tratadas com AZT, quer seja células infectadas ou não com SIV_{mac251} apresentaram baixos níveis de IL-8, em torno de 31,3 pg/mL desta citocina.

As células leucocitárias primárias, de modo geral, sob quaisquer tratamento, produziram citocinas, havendo no entanto, variação, dependendo do tratamento ao qual essas células foram submetidas. Como denotado na **Figura 15**, após análise estatística,

células leucocitárias infectadas com SIV_{mac251}(LEU SIV) são as que mais produzem IFN- γ , seguido das células leucocitárias tratadas com P6 (LEU P6) e infectadas com SIV_{mac251}(LEU P6/SIV). Observa-se que no intervalo inicial de 120 horas de cultivo, não se detectou níveis significativos de produção de IFN- γ , mas no intervalo seguinte, após as 240 horas de cultivo, não houve diferença significativa na produção de IFN- γ quando se compara as células leucocitárias com as tratadas com P6, enquanto que as células tratadas com AZT infectadas e não infectadas, tratadas com o P6 e infectadas, e apenas infectadas, apresentaram diferenças significativas ao comparar-se com células leucocitárias não infectadas sem nenhum tratamento, em que a maior produção de IFN- γ ocorreu com células tratadas com o P6 e infectadas, e unicamente infectadas. No intervalo seguinte, às 360 horas de cultivo, todos os tratamentos tiveram significativamente maior produção de IFN- γ que a população de células controles, sem nenhum tratamento e sem infecção, destacando-se a maior produção de IFN- γ por células tratadas com P6 e infectadas. Às 480 horas de cultivo, houve diferença significativa em todos os tratamentos comparativamente ao controle negativo, em relação à produção de IFN- γ , em que células infectadas com SIV_{mac251} e também células unicamente tratadas com o P6, apresentaram maior produção de IFN- γ . Às 600 h de cultivo, todos os tratamentos diferiram significativamente da produção de IFN- γ por células de população controle negativo, em que células unicamente infectadas e células apenas tratadas com P6 tiveram maior produção de IFN- γ , e células tratadas com AZT, e células tratadas com o P6 e infectadas, apresentaram menor produção de IFN- γ . No intervalo final de tempo, às 720 h, todos os tratamentos, exceto com o P6, resultaram significativamente distintos quanto à produção de IFN- γ comparados ao controle negativo, em que apesar da diferença, houve bastante redução na produção de IFN- γ .

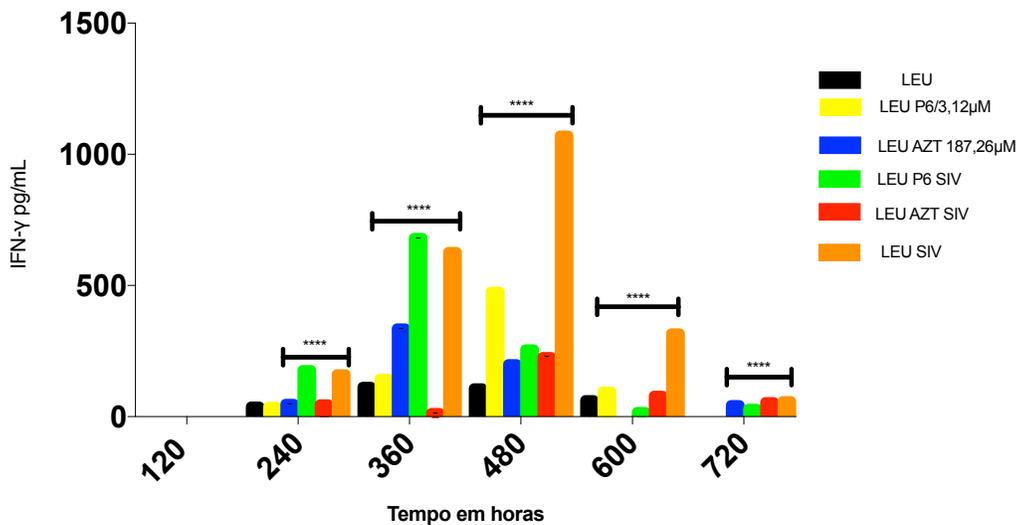


Figura 15. Produção de IFN- γ por células leucocitárias primárias sob tratamentos com o peptídeo escorpiónico 6 (Two-way ANOVA, com 95% de confiança, teste de Bonferroni com múltiplas comparações, **** $P < 0,0001$).

Conforme ilustrado na **Figura 16**, após análise estatística, observa-se que nos intervalos iniciais de cultivo até as 480 horas, a produção de IL-4 por células leucocitárias primárias humanas sob os diferentes tratamentos foi ínfimo, sem diferenças significativas referentes ao controle negativo, de células não infectadas, sem nenhum tratamento. Às 600 h de cultivo, com baixa significância, observou-se diferença entre células controle e células infectadas com SIV_{mac251} e tratadas com AZT, enquanto os outros tratamentos não apresentaram diferença significativa. No intervalo final, decorridas 720 h de cultivo, observou-se que células tratadas com o P6 e infectadas, células infectadas com SIV e tratadas com AZT e células unicamente infectadas com SIV_{mac251}, apresentaram diferenças significativas quando comparadas com a população de células do controle negativo, enquanto que os outros tratamentos não diferiram significativamente do controle negativo. Células unicamente infectadas produziram bastante IL-4, seguidas pelas tratadas com o P6 e infectadas.

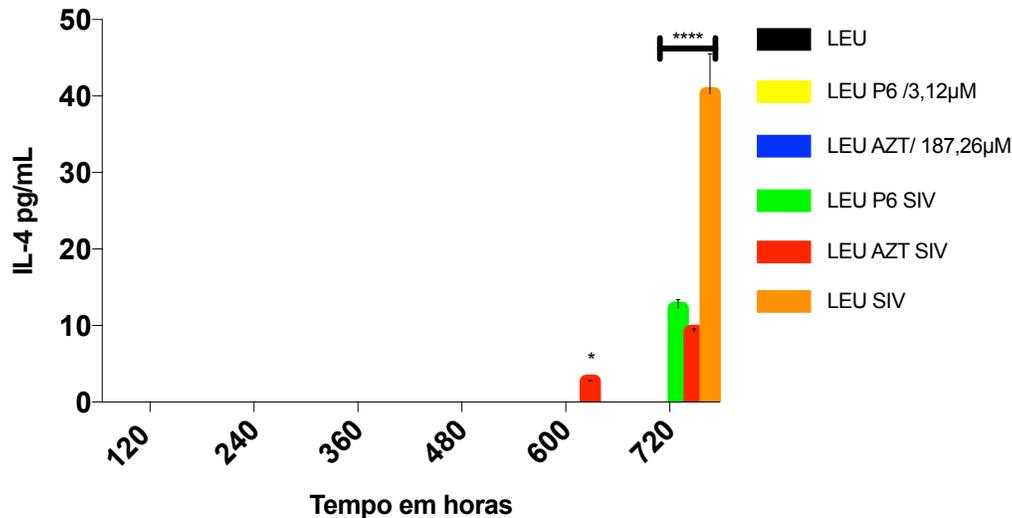


Figura 16. Produção de IL-4 por células leucocitárias primárias tratadas com o peptídeo escorpiônico 6 (Two-way ANOVA, com 95% de confiança, teste de Bonferroni com múltiplas comparações, **** $P < 0,0001$).

Não se detectou produção de IL-8 em células leucocitárias em quaisquer dos tratamentos submetidos.

Conforme a **Figura 17**, após análise estatística, no intervalo inicial de 120 h de cultivo, observou-se que houve diferença significativa em todos os tratamentos avaliando-se a produção de IL-6 tomando como comparação a produção por células leucocitárias humanas não infectadas e sem nenhum tratamento, em que todos os tratamentos produziram menos IL-6 que a população de células controle (LEU). No intervalo seguinte de tempo, às 240 h, todos os tratamentos apresentaram diferença significativa quanto à produção de IL-6 comparando com o controle negativo, destacando-se que apenas a população de células unicamente infectadas com SIV_{mac251} apresentou maior produção de IL-6 que as demais populações em tratamento. Às 360 h seguintes de cultivo, ainda persistiu a diferença significativa de todos os tratamentos versus o resultado de produção de IL-6 em células sem nenhum tratamento não infectadas, da população controle, em que se observou redução drástica na produção de IL-6 em todas as populações de células, incluindo-se o controle. No intervalo seguinte, às 480 hs de cultivo, ainda houve diferença significativa em quanto à produção de IL-6 em comparação a população de células controle. Nos intervalos finais de cultivo, às 600

e 720 horas de cultivo, todos os tratamentos resultaram em diferença significativa quanto à produção de IL-6 tomando como referência o controle.

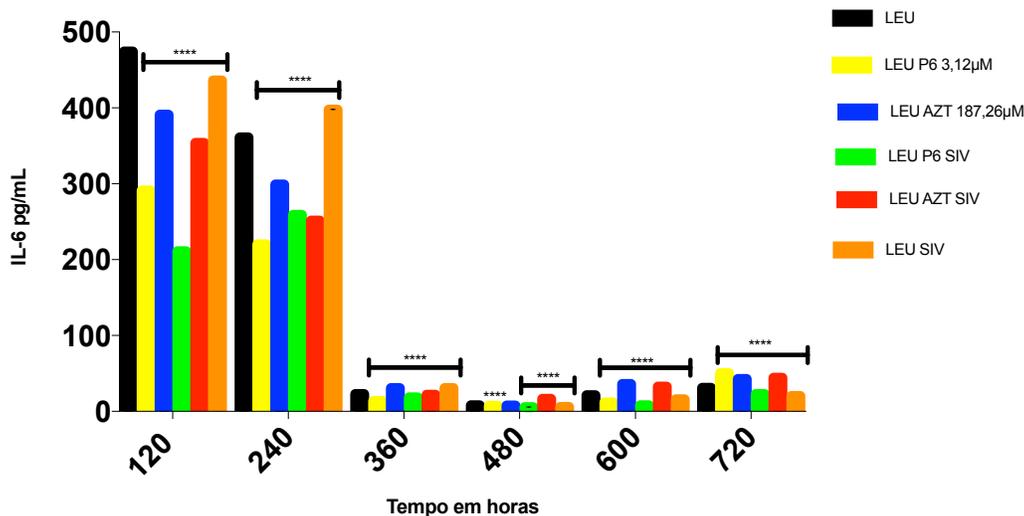


Figura 17. Produção de IL-6 por células leucocitárias primárias sob tratamento com o peptídeo escorpiônico 6 (Two-way ANOVA, com 95% de confiança, teste de Bonferroni com múltiplas comparações, ****P<0,0001).

A produção de IL-10 por células leucocitárias primárias está detalhado na **Figura 18**, após análise estatística, em que nos intervalos iniciais, não houve produção de IL-10. Sequencialmente, às 240 h, todos os tratamentos resultaram em diferenças significativas quanto à produção de IL-10, comparadas ao controle, sem infecção nem tratamento, dos quais, os tratamentos com AZT, tanto em células infectadas como não infectadas, e células tratadas com o P6 e, células infectadas com SIV_{mac251}. No intervalo seguinte, após 360 h de cultivo, houve diferença significativa nos resultados concernentes à produção de IL-10 em comparação ao controle negativo, em que células tratadas com o P6, infectadas ou não, exibiram maior produção de IL-10, assim como células tratadas com AZT, não infectadas. No seguinte intervalo, às 480 h de cultivo, todos os tratamentos resultaram em produção de IL-10 significativamente distintos do controle de população de células sem tratamento e sem infecção, exceto a população tratada com AZT. Nesse intervalo, não se detectou produção de IL-10 em população de células do controle, tão pouco a população unicamente tratada com AZT. Nos intervalos finais de tempo, às 600 e 720 horas de cultivo, todos os tratamentos diferiram significativamente quanto à produção de IL-10 por células da população controle. Nesses intervalos, detectou-se novamente a produção de IL-10 por células da população

controle, só não superando no intervalo de 600 hs a população de células tratada com o P6 e infectada com SIV_{mac251}, enquanto que no intervalo final, o controle superou a produção de todas as outras populações.

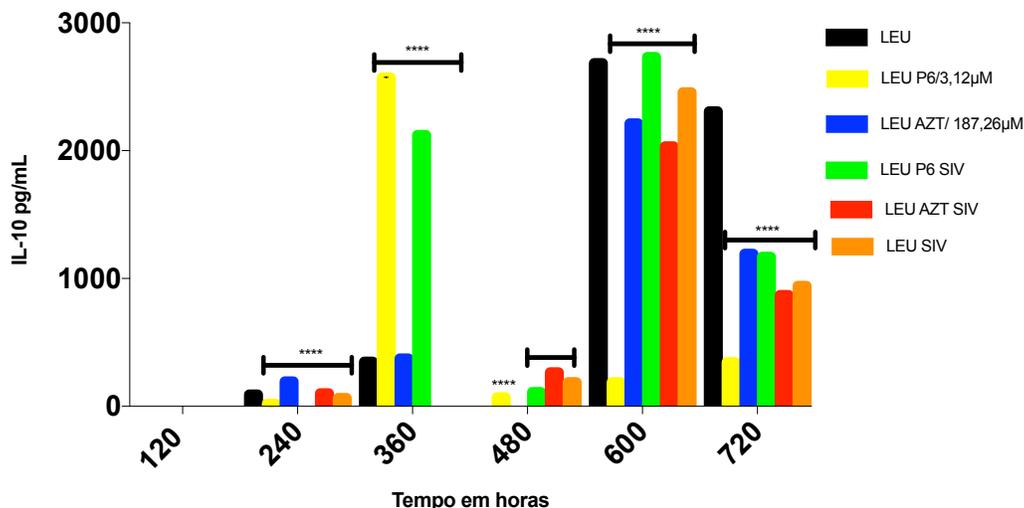


Figura 18. Produção de IL-10 por células leucocitárias submetidas a tratamento com o peptídeo esocriônico 6 (Two-way ANOVA, com 95% de confiança, teste de Bonferroni com múltiplas comparações, ****P<0,0001).

5.4.1 Análise Ultraestrutural de Células Submetidas a Diferentes Tratamentos

Células leucocitárias primárias humanas foram submetidas a tratamentos com o P6, tanto em células infectadas com SIV_{mac251} como em células não infectadas e utilizado como controles, células infectadas com SIV_{mac251} e tratadas com AZT e células não infectadas sem nenhum tratamento. Conforme se observa na **Figura 19**, a célula polimorfonuclear (centralizada) apresenta vesículas volumosas no citoplasma, em processo de liberação de vesículas e consequente extravasamento de seus grânulos e destruição de citoplasma da célula adjacente, na mesma figura observa-se ainda célula com morfologia típica de linfócito (direita superior) com destruição citoplasmática.

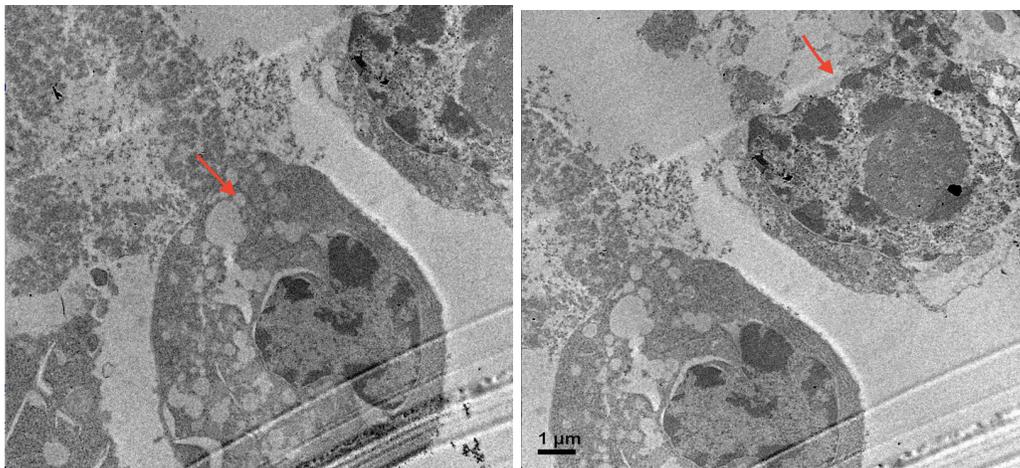


Figura 19. Células leucocitárias primárias infectadas com SIV_{mac251} e tratadas com AZT (Aumento de 10 K). Setas na imagem esquerda indicam vesículas citoplasmáticas e na imagem à direita, destruição do citoplasma.

Observa-se na **Figura 20**, célula com morfologia linfocítica típica com citoplasma em fase de destruição com indicação de processo apoptótico, progressivo, quando ainda se detecta o núcleo celular com morfologia conservada.

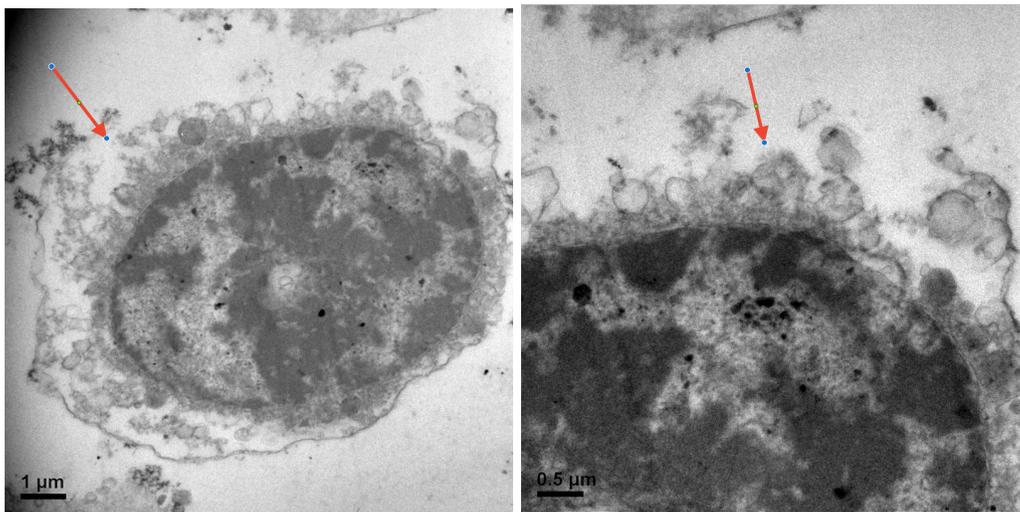


Figura 20. Células leucocitárias primárias tratadas com o peptídeo escorpiônico 6 e infectadas com SIV_{mac251} . Setas em ambas imagens indicam processo apoptótico progressivo (Aumento de 10K e 25 K).

Em célula com morfologia típica de linfócitos, exibida na **Figura 21**, observa-se estruturas brotando da membrana citoplasmática que sugerem ser virions, visto que são células infectadas com SIV_{mac251} sem nenhum tratamento.

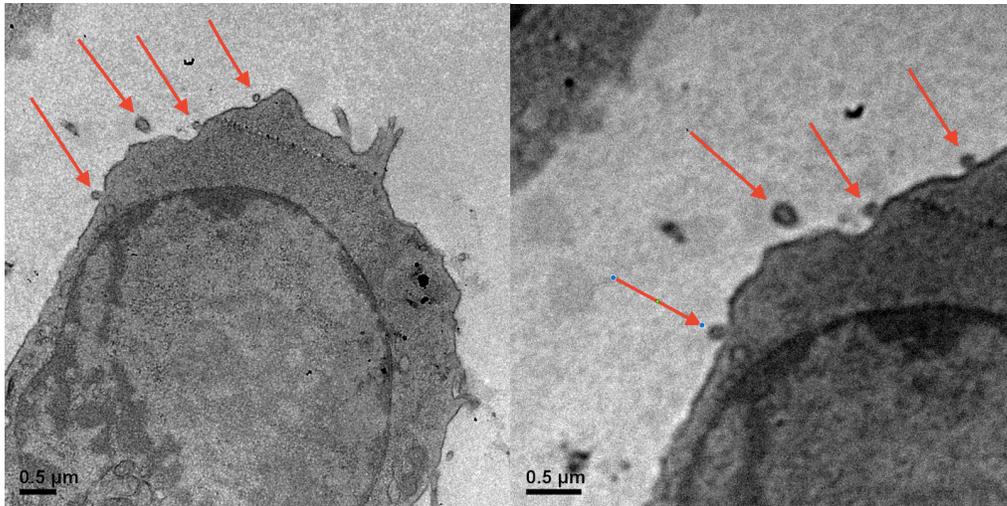


Figura 21. Células leucocitárias primárias infectadas com SIV_{mac251} sem tratamento. Setas indicam brotamento de virions e exossomas. (Aumento de 20K e 30 K)

Células leucocitárias sem nenhum tratamento não infectadas, exibem, conforme a **Figura 22**, morfologia sem alterações.

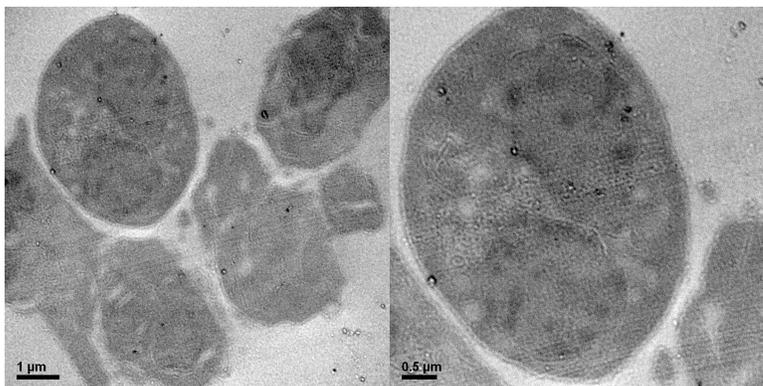


Figura 22. Células leucocitárias primárias não infectadas sem nenhum tratamento (Aumento de 15 K e 25 K).

Células leucocitárias, com morfologia condizente com linfócitos, tratadas com o P6, exibem extravasamento do conteúdo nuclear, denotado na **Figura 23**, em que se observa igual densidade do material nuclear e citoplasmático, exceto na região perinuclear, com acúmulo de cromatina e poro nuclear bem definido.

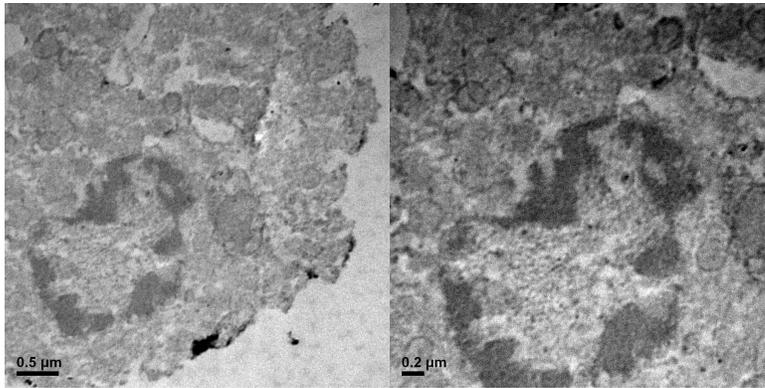


Figura 23. Células leucocitárias tratadas por 72 hs com o peptídeo escorpiônico 6 (Aumento de 20 K e 25 K).

Na **figura 24**, observa-se célula com morfologia linfocítica típica, tratadas com AZT, em que há bastante comprometimento do material e organelas citoplasmáticas.

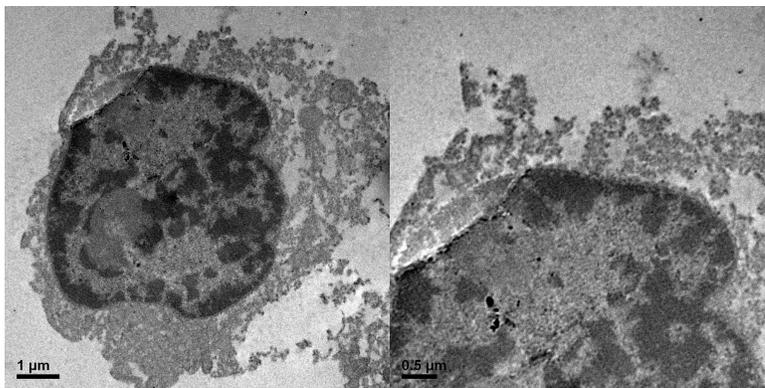


Figura 24. Células leucocitárias humanas tratadas com AZT (Aumento de 20 K e 30K).

5.4.2. Análise de Produção de HIV defeitivo

Células HeLa P4 foram transfectadas com pCHIV e controles, realizando-se a quantificação da produção de virions defeitivos de HIV por luminescência, decorrente da presença da proteína amarela fluorescente. Não houve diferença significativa entre o controle, de células transfectadas tratadas com AZT, e células tratadas com o P6, previamente e posteriormente à transfecção, conforme demonstrado na **Figura 25**, enquanto que, comparando-se o tratamento com o P6, pré e pós-transfecção observou-se que houve diferença significativa, em que a produção de virions defeitivos no sobrenadante é maior em tratamento pós-transfecção que no pré-transfecção.

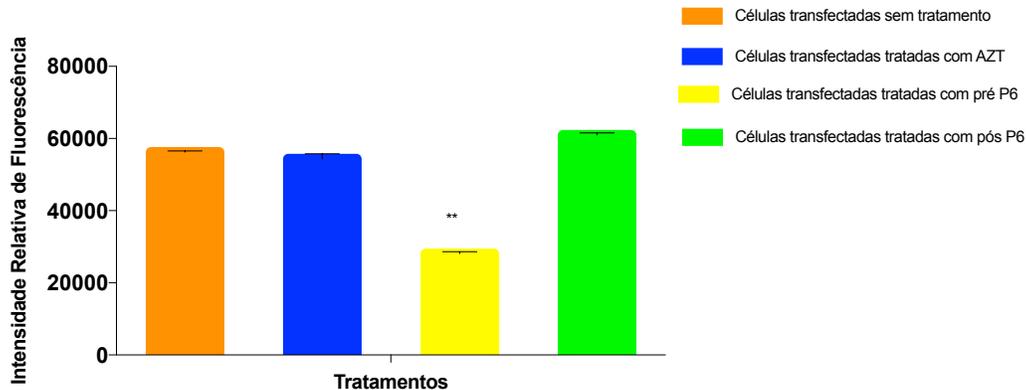


Figura 25 Células HeLa P4 transfectadas com pCHIV^{efp}, submetidas a diferentes tratamentos (One-Way ANOVA, Teste de Bonferroni em múltiplas comparações, **P=0,0046).

6. DISCUSSÃO

As análises iniciais do trabalho evidenciaram que dos peptídeos escorpiônicos sintéticos, o P6 e P1 apresentaram melhor performance em ensaios de citotoxicidade e atividade antirretroviral. Inicialmente, conforme descrito na **figura 4**, em concentrações elevadas dos peptídeos, entre 23,46 μ M (P6) a 56,97 μ M (P9), observou-se que no intervalo inicial, o P1 (41,42 μ M), P6 e P4 (40,60 μ M) foram mais tóxicos, no entanto, nos intervalos seguintes, o P2 (40,63 μ M) foi o mais tóxico. O P10 (49,10 μ M) apresentou atividade mitogênica em todos os intervalos de tempo, embora o P6 entre às 124 horas a 168 horas tenha apresentado atividade mitogênica.

Apesar de que, buscou-se entre os peptídeos atividade antirretroviral e que, dentre os vários mecanismos de atividade antiviral, há aqueles que interferem com o metabolismo celular, visto que a replicação viral depende da maquinaria biosintética da célula, geralmente os antivirais apresentam determinado grau de toxicidade para a célula hospedeira. Cita-se como exemplo, com o advento da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), a AIDS e patologias associadas têm sido controladas, mas por outro lado, tornou-se frequente a incidência de distúrbios neurocognitivos associados ao HIV-1, em que a associação da 3'-azido-2',3'-deoxitimidina (AZT) e indinavir (IDV) podem interferir na fisiologia das células endoteliais da barreira hemato-encefálica, amplificando ainda mais a condição descrita. Detectou-se níveis anormais de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a exposição, indicando que mecanismos que induzem estresse oxidativo estavam envolvidos, com a perda do

potencial de membrana da mitocôndria (MANDA *et al.*, 2011). Por outro lado, peptídeos que exerçam atividade mitogênica são importantes como agentes que reverterem a latência lentiviral, de forma a induzir a expressão dessas formas latentes, tornando-as alvos aos agentes antirretrovirais (SHAN *et al.*, 2012; BARTON *et al.*, 2016). Como previamente revisado, durante a infecção lentiviral, as formas replicativas geram progênes distintas da infecção inicial, e os provírus da infecção original, integrados ao genoma da célula hospedeira, residem latentes em locais de difícil acesso aos medicamentos antirretrovirais, chamados santuários celulares e anatômicos, principalmente nas criptas intestinais e sistema nervoso central (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015).

Observou-se nesses ensaios iniciais, de avaliação de atividade citotóxica e mitogênica dos peptídeos em estudo, que em altas concentrações, o P1 mostrou-se tóxico e o P6 nos intervalos iniciais reduziu o número de células na população, no entanto, do intervalo intermediário ao final, apresentou atividade mitogênica (**Figura 4**).

Trabalhando com a linha celular 174X100, em que se avalia a densidade celular decorrente do tratamento com o PE1 (29,11 μM) e posterior infecção com SIV_{BK-28}, observou-se que às 24 h reduziu-se bastante o número de células na população tratada com P1, e às 48 h, após 24 h de infecção viral, e nos intervalos subsequentes, até às 240 h de cultivo, o número de células permaneceu reduzido em relação ao controle de células não infectadas, CN, e células unicamente infectadas, CP. As células tratadas com AZT reduziram-se a cada intervalo de tempo, até desaparecerem completamente no intervalo final, enquanto as células infectadas e tratadas com AZT foram incrementado seu número, chegando a aproximadamente a metade do número de células da população do CN (**Figura 7**).

Importante enfatizar que células infectadas com SIV, independente da cepa (*viral strain*), ou qualquer outro lentivírus, entram em rápida proliferação, em infecção natural, tendendo a tornar-se crônica, levando a depleção dessas células alvo (XU *et al.*, 2015; CHEW *et al.*, 2016). Em cultivos “*in vitro*” observou-se também a rápida proliferação de células infectadas, HUT-78, 174X100 ou H9, mas que geralmente ao fim do experimento, em torno de 300 a 400 horas de cultivo, as células morrem (DA MATA *et al.*, 2011).

Da mesma forma que analisou-se o efeito do tratamento de P1 em células 174X100, realizou-se com P6 em concentrações de 7,35 e 3,68 μM (**Figura 8**). Nas 24 horas iniciais de cultivo, o número de células após o tratamento com P6, nas duas

concentrações, é equivalente ao da população controle. Às 48 horas de cultivo, 24 horas após a infecção viral, a população de células tratadas com P6, com maior ênfase para a maior concentração, apresentou maior número de células que o controle negativo, de células não infectadas e sem nenhum tratamento, e também maior número de células do que o CP, aproximadamente 2/3 mais de células. Às 144 horas de cultivo, o tratamento com o P6, nas duas concentrações, resultou em densidade celular similar ao do CN, enquanto que o CP apresentou redução extrema de sua população. No intervalo final, às 240 horas, o número de células na população tratada com P6, na maior concentração, representou aproximadamente 2/3 na população de células do controle negativo, enquanto a menor concentração, reduziu a metade das células da concentração maior do P6. Em relação as células tratadas com P6 e posteriormente infectadas com SIV_{BK-28}, assim como as infectadas e não infectadas tratadas com AZT, observou-se que às 48 h de cultivo, ou 24 h pós-infecção, a população de células tratadas com P6 e infectadas, reduziram-se aproximadamente a metade do número de células da população do CN e pouco maior que do grupo controle de células infectadas, CP, similarmente ao que ocorreu com as tratadas unicamente com AZT e, infectadas e tratadas com AZT. Às 144 h de cultivo, todos os tratamentos, exceto com P6, nas duas concentrações, reduziram drasticamente o número de células em suas populações, embora o controle negativo, de células não infectadas sem tratamento, apresentaram número de células equivalente ao de células tratadas com P6 na maior concentração. No intervalo final, repetiu-se o que ocorreu no intervalo anterior, exceto que o número de células tratadas com P6 na menor concentração teve maior redução no número de células na população que a concentração maior.

Utilizando-se células H9, conforme a **Figura 9**, avaliou-se a variação da densidade celular em tratamentos com P1 e P6 em 3 concentrações seriadas. Às primeiras 24 h de tratamento, o P1 nas concentrações de 0,4244 e 4,244 μM , a população reduziu seu número de células a aproximadamente 2/3 do número de células da população controle, enquanto o tratamento com a maior concentração de P1, 42,44 μM , destruiu totalmente as células. Neste mesmo intervalo, a população de células tratadas com P6 nas menores concentrações, 0,2404 e 2,404 μM , praticamente apresentaram quantitativo similar de células na população em relação ao controle de células sem tratamento, enquanto que a maior concentração do P6, 24,04 μM , reduziu o número de células a níveis equivalentes ao número de células das populações tratadas com P1, nas duas menores concentrações. No intervalo seguinte de 48 h, houve

incremento geral no número de células em todos os tratamentos, com maior efeito decorrente do tratamento com P6 na menor concentração, 0,2404 μM . Os outros tratamentos reduziram o número de células, com maior impacto para o P6 na concentração de 24,04 μM . No intervalo de 72 hs de cultivo, todos os tratamentos incrementaram o número de células em suas populações, inclusive ultrapassando o número de células do controle. Às 96 h seguintes, todos os tratamentos reduziram o número de células em suas populações, com maior redução com o P1 a 0,4244 μM e P6 a 0,2404. No intervalo final, o P1 na concentração de 4,244 μM , e o P6 nas concentrações de 2,404 e 24,04 μM , incrementaram o número de células equivalentes ao controle, enquanto que, o tratamento com P1 a 0,4244 μM e P6 a 0,2404 μM reduziram o número de células na população de forma similar, equivalente a 1/3 do número de células na população controle. Observou-se que P6 nas maiores concentrações apresentou-se mitogênico, enquanto P6 em menor concentração, tóxico. Quanto ao P1, a menor concentração apresentou-se tóxico, e a maior, de 4,244 μM não alterou o comportamento das células.

Selecionando-se menores concentrações de P1, 12,5 μM , e PE6, 3,12 μM , analisou-se a variação do número de células HUT-78 (**Figura 10**). O tratamento com o P1 de modo geral acompanhou a oscilação da densidade celular similarmente ao que ocorreu com as células sem tratamento e não infectadas, CN, nos intervalos iniciais, de 48 a 144 h e, nos intervalos intermediários a finais, de 192 às 336 h, ocorreu redução no número de células. O tratamento com o P6, inicialmente, das 48 às 96 h, reduziu o número de células em comparação ao controle negativo, e posteriormente, das 144 às 336 h, o número de células mantiveram-se equivalentes ao CN. Relativo ao tratamento e posterior infecção com SIV_{mac251}, observou-se que com P1, no intervalo das 48 às 192 horas, o número de células permaneceram equivalentes ao CN e, sequencialmente, no intervalo de 240 a 288 h de cultivo, o número de células reduziu-se a aproximadamente 1/3 da população controle. Com o tratamento com P6 e posterior infecção viral, observou-se redução substancial no número de células na população, correspondente a metade do número de células da população controle. No intervalo seguinte, às 96 h, houve recuperação do número de células na população, muito próximo ao número de células da população controle. Às 144 h, houve um pico bastante elevado no número de células na população, correspondente a mais que o dobro do número de células do controle negativo e positivo. Posteriormente, o número de células descendeu, próximo aos níveis da população do controle negativo, mas ainda o dobro de células do controle

positivo, igualando-se no intervalo final, 336 h, ao controle negativo. O tratamento com AZT, tanto de células não infectadas como infectadas, de modo geral reduziu o número de células, exceto no intervalo de 96 h, quando pouco ultrapassou o número de células do controle negativo. Células infectadas, tratadas com AZT, apresentaram comportamento similar as não infectadas tratadas com AZT, pouco diferindo com o tratamento com P1, e menos eficiente na redução de células que o P6.

Com vistas a avaliar a produção viral em células HUT-78, tratadas com o P1 e P6, observou-se que não houve diferença significativa durante o período de 168 horas de cultivo, mesmo com o uso de AZT, sem que houvesse redução da produção viral. Dessa foram, tomou-se como referência, os resultados anteriores, explicitados na **Figura 11**, em que às 240 h de cultivo, houve diferença significativa quanto à produção viral, em que células tratadas com P6 reduziu mais a produção viral que P1, embora não menos que células tratadas com AZT.

De modo geral, o tratamento com o P6, nos intervalos iniciais comportou-se como citotóxico e posteriormente mitogênico, o que faz-se supor que debris celulares ou fatores envolvidos em apoptose ou mesmo necrose induziriam a mitose de células sobreviventes em maior velocidade. O P1 em concentrações elevadas comportou-se como citotóxico e em concentrações menores, praticamente não alterou o comportamento das células.

A ação direta do P1 e P6 sobre virions de SIV foi avaliada, tratando-se o sobrenadante de células HUT-78 infectadas com SIV_{mac251} com esses Ps (**Figura 12**). Como previamente o sobrenadante destas células infectadas foi quantificado por ELISA para a produção de SIVp27, observou-se que, não houve nenhum efeito inibitório da infecção viral sobre novas células HUT-78, com os sobrenadantes tratados, visto que a produção de SIVp27 continuou elevada, sem nenhuma redução, portanto, descartou-se possível ação dos peptídeos sobre o envoltório viral e, como o virion adquire seu envoltório ao brotar da célula infectada, com rearranjo da bicapa lipídica para inserção das glicoproteínas virais, é muito provável também que esses Ps não exerçam efeitos citotóxicos atuando sobre a membrana da célula hospedeira. Embora nestes ensaios tenha-se utilizado AZT, a não redução da produção viral era esperada, visto que este antirretroviral não atua sobre o envoltório viral e sim, durante o mecanismo de transcrição reversa, em que o AZT é incorporado competitivamente em lugar dos deoxinucleotídeos utilizados para a síntese de DNA (PAPADOPULOS-ELEOPULOS *et al.*, 1999).

Nos ensaios de citometria de fluxo em que se avalia a morte celular, quer seja programada, apoptose, ou necrose, observou-se que quanto mais concentrado P6, mais tóxico. Quando se compara os tratamentos de células infectadas com SIV_{mac251}, previamente a infecção com P6 ou posteriormente a infecção como ocorre com AZT, ainda é mais tóxico o AZT, no entanto, não há dados suficientes para avaliação destes parâmetros. Há correspondência entre os dados obtidos com a citometria de fluxo com as contagens de células vivas coradas com azul de tripan, embora a citometria forneça mais detalhes, informando o tipo de morte celular pelos marcadores com anexina e iodeto de propídio. Da mesma forma, os ensaios de quantificação de LDH em células submetidas ao P6 e P1, redundaram nos mesmos resultados, que quanto maior a concentração do peptídeo (P1/50 μ M e P6/12,5 μ M), mais tóxico a célula, com 50% de viabilidade, expressando-se por maior produção de LDH e ainda, células infectadas e tratadas com os Ps ou com AZT, maior é a toxicidade, destacando-se com maior evidência a toxicidade por o P6, que mesmo em concentrações menores, 6,25-3,125 μ M, persiste o efeito tóxico. Em intervalos mais longos, em ensaios de viabilidade celular com azul de tripan, observou-se a reversão do efeito citotóxico, para a proliferação celular.

Estudos de outros autores (DANIELE-SILVA *et al.*, 2016) que também utilizaram peptídeos sintéticos, embora obtidos do transcriptoma da glândula do veneno de *Tityus stigmurus*, Stigmurin e TsAP-2, foram tóxicos a células estabelecidas aderentes HepG2 em 20 e 40 μ M, reduzindo a viabilidade celular em 35 e 68 % respectivamente. As células utilizadas nos ensaios derivam de carcinoma hepático, o que torna difícil a comparação com os estudos aqui realizados, além do que outras linhas celulares aderentes utilizadas apresentaram variações na toxicidade. Importante ressaltar que análises de citotoxicidade em linhagens estabelecidas, quer sejam aderentes ou em suspensão, é de significado restrito, pois não correspondem a sistemas *in vivo*, adequando-se melhor células de cultivos primários. De qualquer forma, em comparações generalizadas, observa-se que o P6 em menores concentrações, 24,04 μ M (**Figura 9**) e 3,12 μ M (**Figura 10**) em células H9 e HUT-78 respectivamente, foi mais tóxico (**Figura 10**) que os reportados para os peptídeos sintéticos de *Tityus stigmurus*.

Em outros estudos, de SIMON (2014), o P1 deste estudo, causou hemólise abaixo de 50% em concentrações de até 50 μ M, e em testes de citotoxicidade em macrófagos murinos primários. Em concentrações de até 25 μ M foi detectado mais que 50% de viabilidade celular, enquanto que em células estabelecidas de monócitos

humanos, THP-1, apresentaram maior resistência à toxicidade que em células primárias, e não apresentou atividade fungicida. Na concentração de 12,5 μ M, este peptídeo foi capaz de reduzir a produção de TNF- α em macrófagos murinos primários. Comumente ao encontrado por SIMON (2014), as células estabelecidas que aqui se trabalha, são mais resistentes à toxicidade que células primárias, obviamente que devido a transformação e malignização destas células (FUKUDA *et al.*, 2016).

Os medicamentos antirretrovirais, como visto, atuam em diferentes sítios e em mecanismos celulares intrínsecos, enquanto que, os fatores de restrição, como também já revisado, são induzidos em resposta à infecção viral, pela própria célula hospedeira. Com as informações obtidas acerca da citotoxicidade e atividade mitogênica dos peptídeos em estudo, avaliou-se também o perfil da produção de determinadas citocinas quando submetidas ao tratamento com o P6. Inicialmente submeteu-se células HUT-78 ao tratamento com o P6, e em diferentes intervalos de cultivo, quantificou-se a produção de IFN- γ , IL-8, IL-4, IL-6 e IL-10, sem que houvesse detecção de nenhuma das citocinas. Apenas em células tratadas com AZT detectaram-se baixos níveis de produção de IL-8, aproximadamente 31,3 pg/mL.

Considerando-se que a linhagem estabelecida HUT-78 deriva de neoplasmas, de duas formas de linfoma cutâneo de células T, com localização na pele, *mycosis fungoides* e também circulante no sangue “Sezary syndrome”, com fenótipo de linfócitos T auxiliares diferenciados, que, *in vitro* (BUNN e FOSS, 1996), não tem colaboração de células com diferentes funções no sistema imunológico, poderia explicar a incapacidade na produção de citocinas após estímulo com os peptídeos em estudo. Dessa forma, utilizou-se células leucocitárias humanas primárias, obtidas em gradiente de sacarose, sem separação das diferentes populações, exceto hemácias e plaquetas. A cooperação entre as diferentes populações de células, tais como células apresentadoras de antígeno (APCs), representadas por células dendríticas ou mesmo linfócitos B e macrófagos, além de outras linhagens como monócitos, linfócitos T e os diferentes granulócitos (eosinófilos, neutrófilos e basófilos), permitiu que dentre estas células leucocitárias submetidas ao tratamento com os peptídeos selecionados, fosse possível a produção de citocinas. Observou-se que células leucocitárias, tanto infectadas como não infectadas, produziram IFN- γ . Usualmente, esta citocina pró-inflamatória é detectada na corrente circulatória de indivíduos infectados com HIV, estando ou não em tratamento antirretroviral. SELIMOVA *et al.*, (2016) reportaram a detecção de IFN- γ em 94% dos

pacientes infectados com HIV, em tratamento ou não. Dentre as células leucocitárias, reporta-se a produção de IFN- γ por células NK (P=0,038), obtidas de indivíduos avirêmicos, infectados com HIV-1 sob terapia antirretroviral, em que suas células foram incubadas com MGN1703, molécula ligante de receptores *Toll-like* 9 (TLR9) (OFFERSEN *et al.*, 2016). Após a interação de receptores TLR9 com ligandos tais como motivos dinucleotídicos não metilados de citosina guanina, ocorre a expressão de IFN- α por células dendríticas plasmacitóides. Interferons alfa/beta (IFN-alpha and -beta) induzidos por infecção viral são potentes indutores de citotoxicidade mediada por células NK, as quais são diferenciadas a partir de células tronco-hematopoéticas na medula óssea, e variado número de moléculas de superfície são expressas nestas células em estágios específicos de diferenciação na linhagem linfóide. Essas células e ainda as iNKT, com duplos marcadores de células NK e T, são braços efetores da imunidade inata, capazes de organizar e desfechar rápida e efetiva ação antiviral em células infectadas (KIM *et al.*, 2016).

Dentre as células leucocitárias, as NK são as que produzem IFN- γ em maior abundância, no entanto, células NK em símios infectados com SIV, apresentam diminuída habilidade em secretar IFN- γ , TNF- α e IL-2, com escalada progressão à doença, mas ainda sustentando a proliferação de NK citotóxicos, no entanto com menos atividade lítica (SCHAFER *et al.*, 2015). Em hospedeiros naturais do SIV assintomáticos, embora com viremia alta e elevada carga viral intestinal, o controle precoce da inflamação é crucial para o estabelecimento de equilíbrio entre a infecção viral e a homeostase do sistema imune. Nos estágios iniciais da infecção, células dendríticas plasmacitóides, células dendríticas mielóides e células NK são reduzidas a níveis mínimos, mas são restabelecidos ao fim da infecção aguda (HUOT *et al.*, 2016). Em paralelo aos sistemas *in vitro* aqui utilizados, percebe-se que, apesar de que não se detectou as diferentes populações de células no cultivo de leucócitos primários, a produção de IFN- γ indica a presença de células NK e iNKT. Em termos gerais, o P6, em concentração de 3,12 μ M comportou-se como potente indutor de IFN- γ , com maior pico de produção de 500 pg/mL às 480 h de cultivo (**Figura 15**).

Observações microscópicas dos cultivos de leucócitos indicaram a presença constante de células fagocitárias (**Figura 26**). A diferenciação de monócitos circulantes a macrófagos teciduais é induzida por sinalização durante eventos inflamatórios, eventos estes com papel fundamental da IL-4, a qual induz o acúmulo de macrófagos

teciduais via auto-renovação. Por sua vez, dentre células produtoras de IL-4, destacam-se linfócitos T auxiliares foliculares, linfócitos T auxiliares do tipo 2, eosinófilos e basófilos. Toda esta operação visa fazer frente a agressões, diferenciando e mobilizando macrófagos para eliminar patógenos, quer via fagocitose ou por liberação de citocinas que amplificam a resposta imune ou enzimas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (JENKINS *et al.*, 2011; O'NEILL & PEARCE, 2016). Nos ensaios realizados neste trabalho, a IL-4 só foi detectada às 720 horas de cultivo, em células tratadas com P6 e infectadas com SIV_{mac251}. Não houve indícios que o tratamento com P6 fosse capaz de induzir a produção de IL-4.

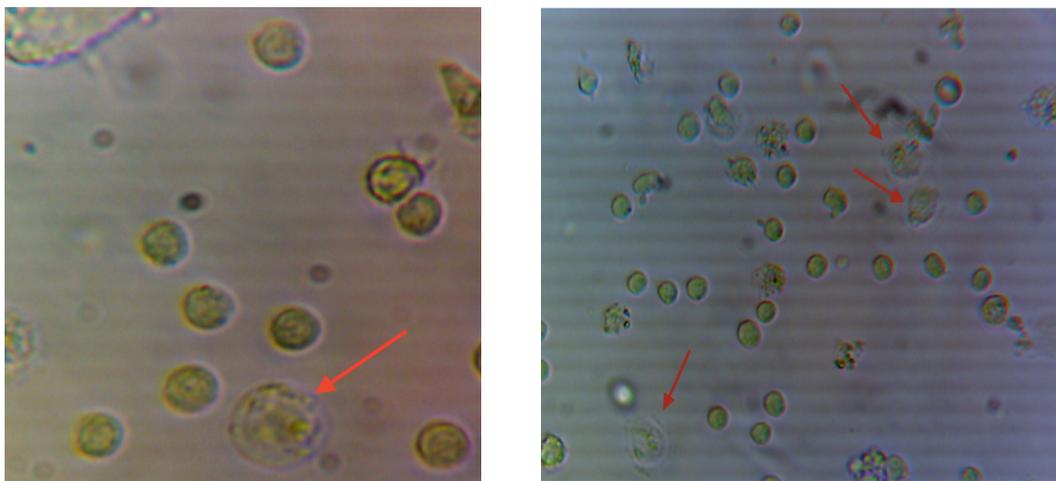


Figura 26. Visualização frequente de células fagocitárias nos cultivos primários de leucócitos humanos.

Células imunossupressoras liberam fatores imunossupressivos, dentre os quais IL-6 e IL-10 (KOZŁOWSKA *et al.*, 2013). Usualmente, a IL-6 juntamente com IFN- α , Fator Necrotizante de Tumor alfa (TNF- α), IL-1 e IL-8 estão entre as primeiras citocinas produzidas durante os estágios mais iniciais da infecção (VAN REETH *et al.*, 2002). Recentemente, Strutt *et al.* (2016) demonstraram a ação indispensável da IL-6 na sinalização precoce e direta à células T CD4 de memória na programação máxima da resposta secundária efetora no local da infecção, durante desafios heterosubtípicos, apontando para novo papel desta citocina co-estimulatória em respostas em reemergência de patógenos. Analisou-se neste trabalho, nos intervalos iniciais de cultivo, das 120 às 240 h, a elevada produção de IL-6 por todas as populações de células leucocitárias (**Figura 17**), com maior produção de forma espontânea, por células sem tratamento, seguido por células infectadas com SIV_{mac251}, células tratadas com AZT, células infectadas e tratadas com AZT, células tratadas com P6 e células tratadas com

P6 e infectadas com SIV_{mac251}, sequencialmente incrementando-se mais a produção de IL-6 em células infectadas, seguida de células sem nenhum tratamento e não infectadas, células tratadas com AZT, células tratadas com P6 e infectadas. Nos intervalos finais, houve redução brusca da produção de IL-6 em todas as populações de células, independentemente do tratamento, se infectadas ou não. De modo geral, a produção de IL-6 é ubíqua entre células leucocitárias, quer seja tratadas ou não com o P6 e AZT, infectadas ou não com SIV.

Macrófagos ativados por IFN- γ exibem perfil pró-inflamatório (M1), enquanto que os que são ativados por citocinas do tipo TH2, IL-4 e IL-13, expressam propriedades anti-inflamatórias e reparadoras de tecido (M2). Dessa forma, nas análises deste trabalho, os macrófagos ativados são do tipo M1, e visto que, a IL-10 está envolvida em processos de desativação do macrófago (HERBEIN & VARIN, 2010), propõe-se que, às 360 h de cultivo, ocorre reversão da atividade macrofágica, com elevada produção de IL-10 (**Figura 18**) por linfócitos T CD4⁺. *In vivo*, estes mecanismos culminam em imunossupressão, com a inoperância das células macrofágicas, inclusive a sinalização por essas células, comprometendo a rede de comunicações entre as diferentes células do sistema imune. Por outro lado, em portadores assintomáticos do HTLV-1, reporta-se alta frequência de monócitos pró-inflamatórios e produção de IL-10/T CD4⁺ e IL-10/T CD8⁺ anti-inflamatórios, como mecanismo imunoregulatório para neutralizar a produção de TNF- α produzido por monócitos (GONCALVES *et al.*, 2008). Embora não se tenha dosado a produção de TNF- α neste trabalho, observou-se a longa duração dos cultivos, até 3 meses, o que sustenta a ação da IL-10 detectada em altos níveis nos ensaios deste trabalho, impedindo a ação tóxica de TNF- α sobre as células leucocitárias. No estudo de SIMON (2014) de viabilidade de macrófagos murinos primários, o mesmo P6 deste estudo, apresentou baixa toxicidade na concentração de 6,25 μ M, tão pouco alterou a produção de TNF- α , porém apresentou potencial fungicida sobre *Cryptococcus neoformans*.

A inibição e quantificação morfológica da produção de virions por células infectadas *in vitro* com SIV_{mac251} foi avaliada em estudos de imagem em microscopia eletrônica de transmissão. Células HUT-78 e leucocitárias primárias tratadas com PE6, infectadas ou não, assim como células tratadas com AZT e, células infectadas e posteriormente tratadas com AZT, foram processadas conforme descrito em material e métodos e as micrografias eletrônicas exibidas em resultados. Conforme observado na

figura 19, em células leucocitárias infectadas com SIV_{mac251} e tratadas com AZT não se observou o brotamento de virions, embora lesões citoplasmáticas tenham sido evidenciadas, com destruição do citoplasma, mas aparente conservação da estrutura nuclear. A toxicidade do AZT é patente na imagem observada na **Figura 24**, visto que o SIV não é citopático e, possíveis lesões são reportadas com a formação de sincícios e não destruição de estruturas citoplasmáticas (NARDACCI *et al.*, 2015). Dentre as drogas aprovadas para uso humano mas que se reporta toxicidade, cita-se o AZT, com forte efeito sobre mitocôndrias, preponderantemente do músculo cardíaco (VARGA *et al.*, 2015). Células leucocitárias tratadas com P6 sofreram também lesões difusamente localizadas no citoplasma (**Figura 20**), assim como extravasamento do material nuclear e acúmulo de cromatina internamente a carioteca (**Figura 23**). Não foi possível detectar o brotamento de virions em células tratadas com P6 e infectadas com SIV_{mac251}. Apenas em células controles, infectadas sem nenhum tratamento, foi possível visualizar-se o brotamento de partículas virais e possivelmente de exossomas, vesículas carreando virions. A produção de exossomas, em sofisticado mecanismo enzimático, de proteção e exportação de virions, não é exclusivo de retrovírus, mas de diferentes famílias virais, incluindo de vírus não envelopados (PETRIK, 2016).

Tanto o SIV como o HIV são membros da mesma subfamília, lentivirinae, assim sendo, como forma segura, sem risco biológico, optou-se por avaliar a atividade do peptídeo em estudo, na produção de HIV defectivos, codificados em plasmídeo, pCHIV carreando gene codificando para a proteína amarela, transfectando células HeLA P4, previamente tratadas com P6 e, como controle, tratadas após a transfecção, com AZT. Conforme mostrado na **Figura 25**, a intensidade relativa de fluorescência foi menor em células tratadas com P6 e posteriormente transfectadas com HIV, correspondendo a aproximadamente a metade de fluorescência detectada em células transfectadas sem tratamento, tratadas com AZT e em tratamento posterior com P6 e consequente transfecção com pCHIV. Estes resultados ainda são preliminares, visto que seria importante haver controle sem transfecção e comparação com o lisado de células de todos os tratamentos.

7. Conclusão

Exclui-se a possibilidade que P1 e P6 tenham ação sobre membranas biológicas diretamente, pois ao se tratar virions de SIV, envelopados, não se registra a perda de infectividade. Aventa-se a hipótese de indução de citocinas e quimiocinas por ação

desses peptídeos em discussão (JIANG *et al.*, 2003; PUCCA *et al.*, 2016), ou ainda de fatores de restrição da célula hospedeira, pelo fato de se ter detectado neste estudo, a produção de citocinas em células tratadas com os peptídeos em evidência achado já reportado, embora sem envolvimento de peptídeos escorpiônicos (SAIDI *et al.*, 2016). Os estudos de citotoxicidade, avaliada por produção e liberação de desidrogenase láctica por mitocôndrias de células em sofrimento ou por marcadores celulares de apoptose e necrose celular em citometria de fluxo, mostram que a ação de P6 não é citolítica, mas indutora de apoptose.

Embora não se possa definitivamente demonstrar que P6 esteja interferindo na produção de virions de lentivírus, pode-se afirmar que há redução de SIVp27. Adicionalmente, em células leucocitárias primárias tratadas com P6, analisadas por microscopia eletrônica, não se observou o brotamento de partículas virais, enquanto que células infectadas por SIV_{mac251} sem nenhum tratamento, é evidente o brotamento de virions da membrana citoplasmática. Outro lentivírus, HIV modificado, para inserção de seu genoma em plasmídeo com marcador para a tradução de proteína amarela, foi utilizado para transfectar células HeLa P4, após tratamento com P6, observando-se que estas células tratadas previamente à transfecção, apresentaram redução na progênie de HIV defectivo, enquanto células tratadas após a transfecção e controles, não tiveram os níveis de produção viral reduzidos.

Particular peculiaridade de P6, foi sua atividade tóxica nos estágios iniciais do cultivo celular e posterior ação mitogênica, como forma de resposta celular à agressão inflingida pelo peptídeo, que de certa forma também afetou o ciclo de replicação viral, reduzindo a síntese da SIVp27.

8. Perspectivas

A análise proteômica das células sob os diferentes tratamentos será fundamental para que se possa compreender os mecanismos envolvidos na citotoxicidade decorrente do tratamento com os peptídeos sintéticos experimentados neste trabalho, assim como a interferência no metabolismo viral pela maquinaria celular, com redução de proteínas virais e inabilidade para a montagem de novos virions. A possível manipulação dos peptídeos sintéticos com marcadores de baixo peso molecular poderia permitir o rastreamento destas moléculas nos diferentes compartimentos celulares, o que facilitaria a compreensão dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade, proliferação celular e interferência nos mecanismos de replicação viral.

9. REFERÊNCIAS

- ABBAS A K, LICHTMAN A H, PILLAI S. *Imunologia celular e molecular*. 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- AIKEN C. HIV: Antiviral action countered by Nef. **Nature**. 526, 202–203. doi:10.1038/nature15637). 2015.
- ALMAAYTAH A, ALBALAS Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. **Peptides**. 51:35-45. doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.021. 2014.
- ALRAJHI A A, ALMOHAIZEIE A. Snake venom preparation for drug-resistant human immunodeficiency virus. **Ann Saudi Med**. 28(4):292-3. 2008.
- ALTFELD M, GALE M JR. Innate immunity against HIV-1 infection. **Nat Immunol**. 16(6):554-62. doi: 10.1038/ni.3157.) 2015.
- ANDAVAN GS, LEMMENS-GRUBER R. Cyclodepsipeptides from marine sponges: natural agents for drug research. **Mar Drugs**. 8(3):810-34. doi: 10.3390/md8030810. 2010.
- ANDREW A J, MIYAGI E, KAO S, STREBEL K. The formation of cysteine-linked dimers of BST-2/tetherin is important for inhibition of HIV-1 virus release but not for sensitivity to Vpu. **Retrovirology** 6:80. 2009.
- APETREI C, METZGER M J, RICHARDSON D, LING B, TELFER P T, REED P, ROBERTSON D L, MARX P A. Detection and partial characterization of simian immunodeficiency virus SIVsm strains from bush meat samples from rural Sierra Leone. **J Virol**. 79(4):2631-2636. 2005.
- ARTS E J L, HAZUDA DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2(4):a007161). 2012.
- BALASUBRAMANIAM M, FRRED E O. New insights into HIV assembly and trafficking. **Physiology (Bethesda)**. 26(4):236-51. doi:1 0.1152/physiol.00051.2011.
- BANDYOPADHYAY S, NG BY, CHONG C, LIM MZ, GILL SK, LEE KH, SIVARAMAN J, CHATTERJEE C. Micelle bound structure and DNA interaction of brevinin-2-related peptide, an antimicrobial peptide derived from frog skin. **J Pept Sci**. 20(10):811-21. doi: 10.1002/psc.2673. 2014.
- BANERJEE N, MUKHOPADHYAY S. Viral glycoproteins: biological role and application in diagnosis. **Virus Dis**. 27(1):1-11. doi: 10.1007/s13337-015-0293-5. 2016.
- BARTON K, HIENER B, WINCKELMANN A, RASMUSSEN TA, SHAO W, BYTH K, LANFEAR R, SOLOMON A, MCMAHON J, HARRINGTON S, BUZON M, LICHTERFELD M, DENTON PW, OLESEN R, ØSTERGAARD L, TOLSTRUP M, LEWIN SR, SØGAARD OS, PALMER S. Broad activation of latent HIV-1 in vivo. **Nat Commun**. 7:12731. doi: 10.1038/ncomms12731. 2016.
- BEACHBOARD D C, HORNER S M. Innate immune evasion strategies of DNA and RNA viruses. **Curr Opin Microbiol**. 32:113-119. doi: 10.1016/j.mib.2016.05.015. 2016.
- BOSINGER S E, JACQUELIN B, BENECKE A, SILVESTRI G, MÜLLER-TRUTWIN M. Systems biology of natural simian immunodeficiency virus infections. **Curr Opin HIV AIDS**. 7(1):71-8. doi: 10.1097/COH.0b013e32834dde01.2012.

- BRAHMA RK, MCCLEARY RJ, KINI RM, DOLEY R. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. **Toxicon**. 93:1-10. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.10.022. 2015.
- BRAITBERG G, SEGAL L. Spider bites: assessment and management. **Aust Fam Physician**. 38(11): 862. 2009.
- BROGDEN K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology** 3, 238-250 (March 2005) | doi:10.1038/nrmicro1098. 2005.
- BULET P, HETRU C, DIMARCQ J L, HOFFMANN D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Dev Comp Immunol**. 23(4-5):329-44. 1999.
- BUNN PA J R, FOSS FM. T-cell lymphoma cell lines (HUT102 and HUT78) established at the National Cancer Institute: history and importance to understanding the biology, clinical features, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL). **J Cell Biochem Suppl**;24:12-23.1996.
- BYKOV YS, CORTESE M, BRIGGS JA, BARTENSCHLAGER R. Correlative light and electron microscopy methods for the study of virus-cell interactions. **FEBS Lett**. Jul;590(13):1877-95. doi: 10.1002/1873-3468.12153. 2016
- CALVETE J J. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. **Toxicon**. 75:44-62. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.03.020. 2013.
- CHEN NY, ZHOU L, GANE PJ, OPP S, BALL NJ, NICASTRO G, ZUFFEREY M, BUFFONE C, LUBAN J, SELWOOD D, DIAZ-GRIFFERO F, TAYLOR I, FASSATI A. HIV-1 capsid is involved in post-nuclear entry steps. **Retrovirology**. 13:28. doi: 10.1186/s12977-016-0262-0. 2016.
- CHEN Y, CAO L, ZHONG M, ZHANG Y, HAN C, LI Q, YANG J, ZHOU D, SHI W, HE B. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. **PLoS one**. 7(4): e34947. 2012.
- CHEW GM, FUJITA T, WEBB GM, BURWITZ BJ, WU HL, REED JS, HAMMOND KB, CLAYTON KL, ISHII N, ABDEL-MOHSEN M, LIEGLER T, MITCHELL BI, HECHT FM, OSTROWSKI M, SHIKUMA CM, HANSEN SG, MAURER M, KORMAN AJ, DEEKS SG, SACHA JB, NDHLOVU LC. TIGIT MARKS. Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. **PLoS Pathog**. 12(1):e1005349. doi: 10.1371/journal.ppat.1005349. 2016.
- CHIPPAUX J, ALAGÓN A. Envenomation and poisoning by venomous or poisonous animals.VII: Arachnidism in the New World. **Med Trop (Mars)**. 68(3):215-221. 2008.
- CHOUGRANI I, LUTON D, MATHERON S, MANDELBROT L, AZRIA E. Safety of protease inhibitors in HIV-infected pregnant women. **HIV/AIDS (Auckland, NZ)**. 5: 253. 2013.
- COLE A M, LEHRER R I. Minidefensins: antimicrobial peptides with activity against HIV-1. **Curr Pharma Des**. 9(18):1463-1473. 2003.

CORIC P, TURCAUD S, SOUQUET F, BRIANT L, GAY B, ROYER J, CHAZAL N, BOUAZIZ S. Synthesis and biological evaluation of a new derivative of bevirimat that targets the Gag CA-SP1 cleavage site. **Eur J Med Chem.** 62:453-65. 2013.

CORY T J, SCHACKER T W, STEVENSON M, FLETCHER C V. Overcoming pharmacologic sanctuaries. **Curr Opin HIV AIDS.** 8(3):190-5. doi: 10.1097/COH.0b013e32835fc68a. 2013.

CULLEN B R. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. **Microbiol Rev.** 56(3):375-94.1992.

DA MATA E C G. Avaliação de atividade antirretroviral de plantas amazônicas utilizando como modelo o vírus da imunodeficiência símia, dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 2011.

DA MATA E C G, MOURÃO C B F, RANGEL M, SCHWARTZ E F. Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, DOI: 10.1186/s40409-016-0089-0. Jan 06. 2017.

DANIELE-SILVA A, MACHADO R J, MONTEIRO N K, ESTRELA A B, SANTOS E C, CARVALHO E, ARAÚJO JÚNIOR R F, MELO-SILVEIRA R F, ROCHA H A, SILVA-JÚNIOR A A, FERNANDES-PEDROSA M F. Stigmurin and TsAP-2 from Tityus stigmurus scorpion venom: Assessment of structure and therapeutic potential in experimental sepsis. **Toxicon.** 121:10-21. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.08.016. 2016.

DIAMOND G, BECKLOFF N, WEINBERG A, KISICH KO. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. **Curr Pharm Des.** 15(21):2377-92. 2009.

DÍAZ-CARBALLO D, UEBERLA K, KLEFF V, ERGUN S, MALAK S, FREISTUEHLER M, SOMOGYI S, KÜCHERER C, BARDENHEUER W, STRUMBERG D. Antiretroviral activity of two polyisoprenylated acylphloroglucinols, 7-epi-nemorosone and plukenetione A, isolated from Caribbean propolis. **Int J Clin Pharmacol Ther.** 48(10):670-7. 2010.

DOS SANTOS MACHADO L, DE CARVALHO EV, DE AFFONSECA E SILVA FV, DOS SANTOS CABREIRA PV, FRANCO OL. Elucidating Unusual Modes of Action and Resistance of Antibacterial Peptides. **Curr Top Med Chem.** Jul 13. 2016.

DUBOS R J, CATTANEO C. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: iii. preparation and activity of a protein-free fraction. **J Exp Med.** 70(3):249-56. 1939.

DUBOS R J, HOTCHKISS R D. The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli. **J Exp Med.** 73(5):629-40. 1941.

ELLITHEY MS, LALL N, HUSSEIN AA, MEYER D. Cytotoxic and HIV-1 enzyme inhibitory activities of Red Sea marine organisms. **BMC Complement Altern Med.** 14:77. doi: 10.1186/1472-6882-14-77. 2014.

ETIENNE L, BIBOLLET-RUCHE F, SUDMANT PH, WU LI, HAHN BH, EMERMAN M. The Role of the Antiviral APOBEC3 Gene Family in Protecting Chimpanzees against Lentiviruses from Monkeys. **PLoS Pathog.** 11(9):e1005149. doi:10.1371/journal.ppat.1005149. 2015.

FACKLER O T. Spotlight on HIV-1 Nef: SERINC3 and SERINC5 Identified as Restriction Factors Antagonized by the Pathogenesis Factor. **Viruses.** 7(12):6730-8. doi: 10.3390/v7122970. 2015.

- FALANGA A, LOMBARDI L, FRANCI G, VITIELLO M, IOVENE MR, MORELLI G, GALDIERO M, GALDIERO S. Marine Antimicrobial Peptides: Nature Provides Templates for the Design of Novel Compounds against Pathogenic Bacteria. **Int J Mol Sci.** 17(5). pii: E785. doi: 10.3390/ijms17050785. 2016.
- FASSEL TA, RAISCH KP, CHETTY N, GROSSBERG SE, KUSHNARYOV VM. Ruthenium red preserves glycoprotein peplomers of C-type retroviruses for transmission electron microscopy. **Biotech Histochem.** 73(4):222-7. 1998.
- FENARD D, LAMBEAU G, MAURIN T, LEFEBVRE J-C, DOGLIO A. A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor. **Mol Pharmacol.** 60(2):341-347. 2001.
- FENARD D, LAMBEAU G, VALENTIN E, LEFEBVRE J-C, LAZDUNSKI M, DOGLIO A. Secreted phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. **J Clin Invest.** 104(5):611-618. 1999.
- FUKUDA T, IINO Y, EITSUKA T, ONUMA M, KATAYAMA M, MURATA K, INOUE-MURAYAMA M, HARA K, ISOGAI E, KIYONO T. Cellular conservation of endangered midget buffalo (Lowland Anoa, *Bubalus quarlesi*) by establishment of primary cultured cell, and its immortalization with expression of cell cycle regulators. **Cytotechnology.** DOI: 10.1007/s10616-016-0004-0. 2016.
- GANZ T, SELSTED M E, SZKLAREK D, HARWIG S S, DAHER K, BAINTON D F, LEHRER R I. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. **J Clin Invest.** 76:1427-1435. 1985.
- GAZDAR A F, CARNEY D N, BUNN P A, RUSSEL E K, JAFFE E S, SCHECHTER, G P, GUCCION J G. Mitogen requirements for the *in vitro* propagation of cutaneous T-cell lymphomas. **Blood.** 55:409-417. 1980.
- GEKKER G, HU S, SPIVAK M, LOKENSGARD JR, PETERSON PK. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. **J Ethnopharmacol.** 102(2):158-63. 2005.
- GENTILUCCI L, TOLOMELLI A, SQUASSABIA F. Peptides and peptidomimetics in medicine, surgery and biotechnology. **Curr Med Chem.** 13(20):2449-66. 2006.
- GOODSELL D.S. Illustrations of the HIV life cycle. **Curr Top Microbiol Immunol.** 389:243-52. doi: 10.1007/82_2015_437. 2015.
- GONCALVES DU, PROIETTI FA, BARBOSA-STANCIOLI EF, MARTINS ML, RIBAS JG, MARTINS-FILHO OA, TEIXEIRA-CARVALHO A, PERUHYPE-MAGALHÃES V, CARNEIRO-PROIETTI AB. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. **Inflamm Allergy Drug Targets.** 7(2):98-107. 2008.
- GOUJON C, MONCORGÉ O, BAUBY H, DOYLE T, BARCLAY WS, MALIM MH. Transfer of the amino-terminal nuclear envelope targeting domain of human MX2 converts MX1 into an HIV-1 resistance factor. **J Virol.** 88(16):9017-26. doi: 10.1128/JVI.01269-14. 2014.
- GOULDER P J, WATKINS D I. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. **Nat Rev Immunol.** 8(8):619-30. doi: 10.1038/nri2357. 2008.
- GUILHELMELLI F, VILELA N, ALBUQUERQUE P, DERENGOWSKI L. DA S, SILVA-PEREIRA I,

- KYAW CM. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Front Microbiol.** 4:353. doi: 10.3389/fmicb.2013.00353. 2013.
- GÜNTHER-AUSBORN S, STEGMANN T. How lysophosphatidylcholine inhibits cell-cell fusion mediated by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. **Virology.** Sep 1;235(2):201-8. 1997.
- GUO C, LIU S, YAO Y, ZHANG Q, SUN MZ. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon.** 60(3):302-11. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.05.001. 2012.
- GURNANI N, MEHTA D, GUPTA M, MEHTA B K. Natural Products: Source of Potential Drugs. **African J Basic & Appl Sci.** 6 (6):171-186. 2014.
- GUTIÉRREZ C, MADRID NP, MORENO S. Is it possible to cure HIV infection? **Rev Esp Quimioter.** 28 Suppl 1:54-6. 2015.
- HAHN, B. H., SHAW, G. M., DE COCK, K. M.; SHARP, P. M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science.** 287:607-14, 2000.
- HARISH Z, RUBINSTEIN A, GOLODNER M, ELMALIAH M, MIZRACHI Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. **Drugs Exp Clin Res.** 23(2):89-96.1997.
- HEIGELE A, SCHINDLER M, GNANADURAI C W, LEONARD J A, COLLINS K L, KIRCHHOFF F. Down-modulation of CD8 $\alpha\beta$ is a fundamental activity of primate lentiviral Nef proteins. **J Virol.** 86(1): 36-48. 2012.
- HERBEIN G, VARIN A. The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation? **Retrovirology.** 7:33. doi: 10.1186/1742-4690-7-33. 2010.
- HERMLE J1, ANDERS M, HEUSER AM, MÜLLER B. A simple fluorescence based assay for quantification of human immunodeficiency virus particle release. **BMC Biotechnol.** 10:32. doi: 10.1186/1472-6750-10-32) 2010.
- HIRSCH JG. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. **J Exp Med.** 103: 589-611. 1956.
- HMED B, SERRIA HT, MOUNIR ZK. Scorpion peptides: potential use for new drug development. **J Toxicol.** 2013:958797. doi: 10.1155/2013/958797. 2013.
- HOLLENBAUGH JA, MONTERO C, SCHINAZI RF, MUNGER J, KIM B. Metabolic profiling during HIV-1 and HIV-2 infection of primary human monocyte-derived macrophages. **Virology.** 491:106-14. doi: 10.1016/j.virol.2016.01.023). 2016.
- HUANG C C, STRICHER F, MARTIN L, DECKER J M, MAJEED S, BARTHE P, HENDRICKSON W A, ROBINSON J, ROUMESTAND C, SODROSKI J, WYATT R, SHAW G M, VITA C, KWONG P D. Scorpion-toxin mimics of CD4 in complex with human immunodeficiency virus gp120 crystal structures, molecular mimicry, and neutralization breadth. **Structure.** 13(5):755-68. 2005.
- HUOT N, RASCLE P, GARCIA-TELLEZ T, JACQUELIN B, MÜLLER-TRUTWIN M. Innate immune cell responses in non pathogenic versus pathogenic SIV infections. **Curr Opin Virol.** 19:37-44. doi: 10.1016/j.coviro.2016.06.011. 2016.

INVITROGEN. Disponível em: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cryopreservation-of-mammalian-cells.html>> Acesso em: 7 de abril, 2012.

ISHIDA H, NGUYEN LT, GOPAL R, AIZAWA T, VOGEL HJ. Overexpression of Antimicrobial, Anticancer, and Transmembrane Peptides in *Escherichia coli* through a Calmodulin-Peptide Fusion System. **J Am Chem Soc.** 138(35):11318-26. doi: 10.1021/jacs.6b06781. 2016.

ITO J, CHANG FR, WANG HK, PARK YK, IKEGAKI M, KILGORE N, LEE KH. Anti-AIDS agents. 48.(1) Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **J Nat Prod.** 64(10):1278-81. 2001.

IZIDORO LF, SOBRINHO JC, MENDES MM, COSTA TR, GRABNER AN, RODRIGUES VM, DA SILVA SL, ZANCHI FB, ZULIANI JP, FERNANDES CF, CALDERON LA, STÁBELI RG, SOARES AM. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **Biomed Res Int.** 2014:196754. doi: 10.1155/2014/196754. 2014.

JENKINS SJ, RUCKERL D, COOK PC, JONES LH, FINKELMAN FD, VAN ROOIJEN N, MACDONALD AS, ALLEN JE. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. **Science.** 332(6035):1284-8. doi: 10.1126/science.1204351. 2011.

JIANG JQ, BALASUBRAMANIAN S, HAWLEY-FOSS NC, BADLEY AD, ROSENTHAL KL, COPELAND KF. Production of CD8+ T cell nonlytic suppressive factors by CD28, CD38, and HLA-DR subpopulations. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 19(6):497-502. 2003.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IL, CAMPOS PF, CHING AT, MACKESSY SP. Colubrid Venom Composition: An -Omics Perspective. **Toxins (Basel).** 8(8). pii: E230. doi: 10.3390/toxins8080230. 2016.

KALYANARAMAN V S, SARNGADHARAN M G, ROBERT-GUROFF M, MIYOSHI I, GOLDE D, GALLO R C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science.** 218(4572):571-3. 1982.

KAMYSZ W. Are antimicrobial peptides an alternative for conventional antibiotics? **Nucl Med Rev Cent East Eur.** 8(1):78-86. 2005.

KANKI P J, ALROY J, ESSEX M. Isolation of T-lymphotropic retrovirus related to HTLV-III/LAV from wild-caught African green monkeys. **Science.** 230(4728):951-4. 1985.

KANZAKI L I B, CASSEB, J. Human T-Lymphotropic Viruses Evolution Possibly Explained by Primate Deltaretrovirus Geographical Segregation **Retrovirology: Research and Treatment.** 1:15-20, 2008.

KAUR G, SHARMA G, KUMAR N, KAUL M H, BANSAL R A, VAJPAYEE M, WIG N, SHARMA S K, MEHRA N K. Genomic architecture of HIV-1 infection: Current status & challenges. **Indian J Med Res.** 138(5). 2013.

KELLY BN, KYERE S, KINDE I, TANG C, HOWARD BR, ROBINSON H, SUNDQUIST WI, Summers MF, Hill CP: Structure of the antiviral assembly inhibitor CAP-1 complex with the HIV-1 CA protein. **J Mol Biol.** 373(2):355-366. 2007.

KIM EM, LEE EH, LEE HY, CHOI HR, JI KY, KIM SM, KIM KD, KANG HS.

Axl signaling induces development of natural killer cells in vitro and in vivo. **Protoplasma**. Aug 22. 2016.

KIRCHHOFF F. Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution? **Nat Rev Microbiol**. 7(6):467-76, 2009.

KLEANDROVA VV, RUSO JM, SPECK-PLANCHE A, DIAS SOEIRO CORDEIRO MN. Enabling the Discovery and Virtual Screening of Potent and Safe Antimicrobial Peptides. Simultaneous Prediction of Antibacterial Activity and Cytotoxicity. **ACS Comb Sci**. 18(8):490-8. doi: 10.1021/acscombsci.6b00063. 2016.

KOŁODZIEJ M, JONIEC J, BARTOSZCZE M, MIRSKI T, GRYKO R. Peptides--a new strategy for combating viral infections. **Przegl Epidemiol**. 65(3):477-82.2011.

KUPZIG S, KOROLCHUK V, ROLLASON R, SUGDEN A, WILDE A, BANTING G. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. **Traffic**. 4:694-709. 2003.

LAND AM, WANG J, LAW EK, ABERLE R, KIRMAIER A, KRUPP A, JOHNSON WE, HARRIS RS. Degradation of the cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B by SIV Vif. **Oncotarget**. 6(37):39969-79. doi: 10.18632/oncotarget.5483. 2015.

LEE H-T, LEE C-C, YANG J-R, LAI J. Z. C., CHANG K Y. A Large-Scale Structural Classification of Antimicrobial Peptides.

BioMed Research International. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/475062>. 2015.

LEE J, LEE DG. Antimicrobial Peptides (AMPs) with Dual Mechanisms: Membrane Disruption and Apoptosis. **J Microbiol Biotechnol**. 25(6):759-64. 2015.

LERCHE N W. Simian retroviruses: infection and disease--implications for immunotoxicology research in primates. **J Immunotoxicol**. 7(2):93-101, 2010.

LEVY J A. The multifaceted retrovirus. **Cancer Res**. 46(11):5457-68. 1986.

LI C, DOWD C S, ZHANG W, CHAIKEN I M. Phage randomization in a charybdotoxin scaffold leads to CD4-mimetic recognition motifs that bind HIV-1 envelope through non-aromatic sequences. **Journal Pept Res**. 57(6):507-18.2001.

LI J, XU X, XU C, ZHOU W, ZHANG K, YU H, ZHANG Y, ZHENG Y, REES HH, LAI R, YANG D, WU J. Anti-infection peptidomics of amphibian skin. **Mol Cell Proteomics**. 6(5):882-94. 2007.

LI YL, CHANDRASEKARAN V, CARTER SD, WOODWARD CL, CHRISTENSEN DE, DRYDEN KA, PORNILLOS O, YEAGER M, GANSER-PORNILLOS BK, JENSEN GJ, SUNDQUIST WI. Primate TRIM5 proteins form hexagonal nets on HIV-1 capsids. **Elife**. 5. pii: e16269. doi: 10.7554/eLife.16269. 2016.

LOHNER K. Novel Antibiotics Based upon the Multiple Mechanisms of Membrane Perturbation by Antimicrobial Peptides. **Curr Top Med Chem**. Jul 13. 2016.

MA, Y.; ZHAO, Y.; ZHAO, R.; ZHANG, W.; HE, Y.; WU, Y.; CAO, Z.; GUO, L.; LI, W. Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptome analysis. **Proteomics**. 10 (13):2471-2485. 2010.

MAHAUAD-FERNANDEZ WD, OKEOMA CM. The role of BST-2/Tetherin in host protection and disease manifestation. **Immun Inflamm Dis.** 4(1):4-23. doi: 10.1002/iid3.92). 2015.

MANDA KR, BANERJEE A, BANKS WA, ERCAL N. Highly active antiretroviral therapy drug combination induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in immortalized human blood-brain barrier endothelial cells. **Free Radic Biol Med.** 50(7):801-10. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.029. 2011.

MARTIN I, RUYSSCHAERT JM. Lysophosphatidylcholine inhibits vesicles fusion induced by the NH2-terminal extremity of SIV/HIV fusogenic proteins. **Biochim Biophys Acta.** Nov 22;1240(1):95-100. 1995.

MARX, P. A., LI, Y., LERCHE, N. W., SUTJIPTO, S., GETTIE, A., YEE, J. A., BROTMAN, B. H., PRINCE, A. M., HANSON, A., WEBSTER, R.G., DESROSIERS, R. C. Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a West African pet *Sooty mangabey*. **J. Virol.** 65:4480-4485, 1991.

MEENAKSHISUNDARAM R, UMA A, THIRUMALAIKOLUNDUSUBRAMANIAN P. RE: Snake venom preparation for drug-resistant human immunodeficiency virus. **Ann Saudi Med.** 29(2):159. 2009.

MEENAKSHISUNDARAM R, SWENI S, THIRUMALAIKOLUNDUSUBRAMANIAN P. Hypothesis of snake and insect venoms against Human Immunodeficiency Virus: a review. **AIDS Res Ther.** 6:25. doi: 10.1186/1742-6405-6-25. 2009.

MEIJE Y, TÖNJES R R, FISHMAN J A. Retroviral restriction factors and infectious risk in xenotransplantation. **Am J Transplant.** 10(7):1511-6. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03146.x. 2010.

MELANA SM, NEPOMNASCHY I, SAKALIAN M, ABBOTT A, HASA J, HOLLAND JF, POGO BG. Characterization of viral particles isolated from primary cultures of human breast cancer cells. **Cancer Res.** 67(18):8960-5. 2007.

MENALDO DL, JACOB-FERREIRA AL, BERNARDES CP, CINTRA AC, SAMPAIO SV. Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A2 from *Bothrops atrox* snake venom. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.** 21:28. doi: 10.1186/s40409-015-0027-6. 2015.

MESSIAEN P, WENSING AM, FUN A, NIJHUIS M, BRUSSELAERS N, VANDEKERCKHOVE L. Clinical use of HIV integrase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One.** 8(1):e52562. doi: 10.1371/journal.pone.0052562. 2013.

MEULENDYKE KA, CROTEAU JD, ZINK MC. HIV life cycle, innate immunity and autophagy in the central nervous system. **Curr Opin HIV AIDS.** 9(6):565-71. doi: 10.1097/COH.000000000000106. 2014.

MISRA A, THIPPESHAPPA R, KIMATA JT. Macaques as model hosts for studies of HIV-1 infection. **Front Microbiol.** 4:176. doi: 10.3389/fmicb.2013.00176). 2013.

MOUSSEAU G, MEDIOUNI S, VALENTE S T. Targeting HIV transcription: the quest for a functional cure. **Curr Top Microbiol Immunol.** 389:121-45. doi: 10.1007/82_2015_435. 2015.

MUKHERJEE AK, KALITA B, MACKESSY SP. A proteomic analysis of Pakistan *Daboia russelii russelii* venom and assessment of potency of Indian polyvalent and monovalent antivenom. **J Proteomics.** Jul 20;144:73-86. doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.001.2016.

MULDER KC, LIMA LA, MIRANDA VJ, DIAS SC, FRANCO OL. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. **Front Microbiol.** 4:321. doi: 10.3389/fmicb.2013.00321. 2013.

MURPHY K. *Imunobiologia de Janeway*, 8.ed- Porto Alegre: ARTMED, 2014.

NAIDER F, ANGLISTER J. Peptides in the treatment of AIDS. **Curr Opin Struct Biol.** 19(4):473-82. doi: 10.1016/j.sbi.2009.07.003. 2009.

NAKASHIMA H, MASUDA M, MURAKAMI T, KOYANAGI Y, MATSUMOTO A, FUJII N, YAMAMOTO N. Anti-human immunodeficiency virus activity of a novel synthetic peptide, T22 ([Tyr-5,12, Lys-7]polyphemusin II): a possible inhibitor of virus-cell fusion. **Antimicrob Agents Chemother.** Jun;36(6):1249-55. 1992.

NARDACCI R, PERFETTINI JL, GRIECO L, THIEFFRY D, KROEMER G, PIACENTINI M. Syncytial apoptosis signaling network induced by the HIV-1 envelope glycoprotein complex: an overview. **Cell Death Dis.** Aug 6;6:e1846. doi: 10.1038/cddis.2015.204.2015.

NIH AIDS REAGENT (Instituto Nacional de Saúde dos EUA). Disponível em: <<https://www.aidsreagent.org/index.cfm>> Acesso em: 7 de janeiro de 2013.

NUÑEZ M. Clinical syndromes and consequences of antiretroviral-related hepatotoxicity. **Hepatology.** 52(3):1143-55, 2010.

OFFERSEN R, NISSEN SK, RASMUSSEN TA, ØSTERGAARD L, DENTON PW, SØGAARD OS, TOLSTRUP M. A Novel Toll-Like Receptor 9 Agonist, MGN1703, Enhances HIV-1 Transcription and NK Cell-Mediated Inhibition of HIV-1-Infected Autologous CD4+ T Cells. **J Virol.** 90(9):4441-53. doi: 10.1128/JVI.00222-16. 2016.

OMBREDANE A S. Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso do tubérculo de *Curcuma longa* L. associadas à quitosana e avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em câncer de pele não melanoma (linhagem A431). Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 2016.

ONO M. Molecular biology of type A endogenous retrovirus. **Kitasato Arch Exp Med.** Sep;63(2-3):77-90. 1990.

O'NEILL LA, PEARCE EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. **J Exp Med.** 213(1):15-23. doi: 10.1084/jem.20151570. 2016.

ORTIZ E, GURROLA G.B, SCHWARTZ E F, POSSANI L P. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon** 93, 125-135. 2015.

PAGAA (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents). Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services. Disponível em: <www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf> Acesso em: 4 de fevereiro de 2014.

PAPADOPULOS-ELEOPULOS E, TURNER VF, PAPADIMITRIOU JM, CAUSER D, ALPHONSO H, MILLER T. A critical analysis of the pharmacology of AZT and its use in AIDS. **Curr Med Res Opin.** 15 Suppl 1:S1-45. 1999.

- PEETERS M, DELAPORTE E. Simian retroviruses in African apes. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, n. 6, p. 514-520. 2012.
- PESCHEL A, SAHL H-G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nat. Rev. Microbiol.** 4(7), 529-536, 2006.
- PETRIK J. Immunomodulatory effects of exosomes produced by virus-infected cells. **Transfus Apher Sci.** 55(1):84-91. doi: 10.1016/j.transci.2016.07.014. 2016.
- PEYTAVIN G, CALVEZ V, KATLAMA C. CCR5 antagonists: a new class of antiretrovirals. **Therapie.** 64(1):9-16. 2008.
- PIRTSKHALAVA M, GABRIELIAN A, CRUZ P, GRIGGS HL, SQUIRES RB, HURT DE, GRIGOLAVA M, CHUBINIDZE M, GOGOLADZE G, VISHNEPOLSKY B, ALEKSEYEV V, ROSENTHAL A, TARTAKOVSKY M. DBAASP v.2: an enhanced database of structure and antimicrobial/cytotoxic activity of natural and synthetic peptides. **Nucleic Acids Res.** Jul 27;44(13):6503. doi: 10.1093/nar/gkw243. 2016.
- PLAZA A, BIFULCO G, KEFFER JL, LLOYD JR, BAKER HL, BEWLEY CA. Celebesides A-C and theopapuamides B-D, depsipeptides from an Indonesian sponge that inhibit HIV-1 entry. **J Org Chem.** 74(2):504-12. doi: 10.1021/jo802232u. 2009.
- POWELL RD, HOLLAND PJ, HOLLIS T, PERRINO FW. Aicardi-Goutieres syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleotide triphosphohydrolase. **J Biol Chem.** 286(51):43596-600. doi: 10.1074/jbc.C111.317628). 2011.
- PUCCA MB, CERNI FA, PINHEIRO-JUNIOR EL, ZOCCAL KF, BORDON KDE C, AMORIM FG, PEIGNEUR S, VRIENS K, THEVISSSEN K, CAMMUE BP, JÚNIOR RB, ARRUDA E, FACCIOLI LH, TYTGAT J, ARANTES EC. Non-disulfide-bridged peptides from Tityus serrulatus venom: Evidence for proline-free ACE-inhibitors. **Peptides.** 2016;82:44-51. doi: 10.1016/j.peptides.2016.05.008. 2016.
- PUJANTELL M, BADIA R, RAMIREZ C, PUIG T, CLOTET B, BALLANA E, ESTÉ JA, RIVEIRA-MUÑOZ E. Long-term HIV-1 infection induces an antiviral state in primary macrophages. **Antiviral Res.** 133:145-155. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.08.004. 2016.
- RANGEL M, DE SANTANA CJ, PINHEIRO A, DOS ANJOS L, BARTH T, PIRES JÚNIOR OR, FONTES W, CASTRO MS. Marine Depsipeptides as Promising Pharmacotherapeutic Agents. **Curr Protein Pept Sci.** May 26. 2016.
- RASHID MA, GUSTAFSON KR, CARTNER LK, SHIGEMATSU N, PANNELL LK, BOYD MR. Microspinosamide, a new HIV-inhibitory cyclic depsipeptide from the marine sponge *Sidonops microspinososa*. **J Nat Prod.** 64(1):117-21. 2001.
- RAZONABLE RR. Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. **Mayo Clin Proc.** 86(10):1009-26. doi: 10.4065/mcp.2011.0309.
- REY-SUÁREZ P, NÚÑEZ V, FERNÁNDEZ J, LOMONTE B. Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom. **J Proteomics.** 136:262-73. doi: 10.1016/j.jprot.2016.02.006. 2016.

ROGOZA L, SALAKHUTDINOV N, TOLSTIKOV G. Polymethyleneamine alkaloids of animal origin: II. polyamine neurotoxins. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**. 32(1):23-36. 2006.

SAADATMAND J, KLEIMAN L. Aspects of HIV-1 assembly that promote primer tRNA(Lys3) annealing to viral RNA. **Virus Res**. 169(2):340-8. doi: 10.1016/j.virusres. 2012.

SAÏDI H, BRAS M, FORMAGLIO P, MELKI MT, CHARBIT B, HERBEUVAL JP, GOUGEON ML. HMGB1 Is Involved in IFN- α Production and TRAIL Expression by HIV-1-Exposed Plasmacytoid Dendritic Cells: Impact of the Crosstalk with NK Cells. **PLoS Pathog**. 12(2):e1005407. doi: 10.1371/journal.ppat.1005407. 2016.

SALTER R D, HOWELL D N, CRESSWELL P. Genes regulating HLA class-I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. **Immunogenetics** 21:235-246, 1985.

SCHAFER J L, LI H, EVANS T I, ESTES J D, REEVES R K. Accumulation of Cytotoxic CD16+ NK Cells in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Lymph Nodes Associated with In Situ Differentiation and Functional Energy. **J Virol**. 89(13): 6887–6894. doi: 10.1128/JVI.00660-15. 2015.

SCHINDLER M, MÜNCH J, KUTSCH O, LI H, SANTIAGO M L, BIBOLLET-RUCHE F, MÜLLER-TRUTWIN M C, NOVEMBRE F J, PEETERS M, COURGNAUD V. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. **Cell**. 125(6):1055-1067. 2006.

SEAMON KJ, SUN Z, SHLYAKHTENKO LS, LYUBCHENKO YL, STIVERS JT. SAMHD1 is a single-stranded nucleic acid binding protein with no active site-associated nuclease activity. **Nucleic Acids Res**. 43(13):6486-99. doi: 10.1093/nar/gkv633. 2015.

SELIMOVA LM, KALNINA LB, SEREBROVSKAYA LV, IVANOVA LA, GULYAEVA AN, NOSIK DN. Cytokines during the human immunodeficiency virus infection type 1(hiv-1). **Vopr Virusol**. 61(1):39-41. 2016.

SENF-RIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles genus*) venom toxins. **Biotechnology advances**. 26(3):210-218. 2008.

SHAN L, DENG K, SHROFF NS, DURAND CM, RABI SA, YANG HC, ZHANG H, MARGOLICK JB, BLANKSON JN, SILICIANO RF. Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation. **Immunity**. 36(3):491-501. doi: 10.1016/j.immuni.2012.01.014. 2012.

SHARP P M, HAHN B H. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**:. 1(1). 2011.

SHIN HJ, RASHID MA, CARTNER LK, BOKESCH HR, WILSON JA, MCMAHON JB, GUSTAFSON KR. Stelletapeptins A and B, HIV-inhibitory cyclic depsipeptides from the marine sponge *Stelletta* sp. **Tetrahedron Lett**. 56(28):4215-4219. 2015.

SHUBIN AV, DEMIDYUK IV, KOMISSAROV AA, RAFIEVA LM, KOSTROV SV. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. **Oncotarget**. Jun 17. doi: 10.18632/oncotarget.10150. 2016.

SIMON S K. Atividades de peptídeos derivados da peçonha de escorpiões em macrófagos murinos: avaliação da sua influência na resposta à cryptococose. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2014.

SMITH SM, WUNDER MB, NORRIS DA, SHELLMAN YG. A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. **PLoS One**. 6(11):e26908. doi: 10.1371/journal.pone.0026908. 2011.

STRAUSS JD, HAMMONDS JE, YI H, DING L, SPEARMAN P, WRIGHT ER. Three-Dimensional Structural Characterization of HIV-1 Tethered to Human Cells. **J Virol**. 90(3):1507-21. doi: 10.1128/JVI.01880-15. 2015.

STHOEGER Z, MAHLAB-GURI K. AIDS - an old disease with new challenges. *Harefuah*. 2013 Apr;152(4):194-5, 249; Vere Hodge RA.Meeting report: 28th International Conference on Antiviral Research in Rome, Italy. **Antiviral Res**. 123:172-87. doi:10.1016/j.antiviral.2015.09.015. 2015.

STODDART MJ. Cell viability assays: introduction. **Methods Mol Biol**.740:1-6. doi: 10.1007/978-1-61779-108-6_1. 2011.

STROHALMOVÁ-BOHMOVÁ K, SPIWOK V, LEPŠÍK M, HADRAVOVÁ R, KŘÍŽOVÁ I, ULBRICH P, PICOVÁ I, BEDNÁROVÁ L, RUMML T, RUMLOVÁ M. Role of Mason-Pfizer monkey virus CA-NC spacer peptide-like domain in assembly of immature particles. **J Virol**. 88(24):14148-60. doi: 10.1128/JVI.02286-14. 2014.

STRUTT TM, MCKINSTRY KK, KUANG Y, FINN CM, HWANG JH, DHUME K, SELL S, SWAIN SL. Direct IL-6 Signals Maximize Protective Secondary CD4 T Cell Responses against Influenza. **J Immunol**. pii: 1600033. 2016.

TANG EL, TAN CH, FUNG SY, TAN NH. Venomics of *Calloselasma rhodostoma*, the Malayan pit viper: A complex toxin arsenal unraveled. **J Proteomics**. 148:44-56. doi: 10.1016/j.jprot.2016.07.006. 2016.

TORRES T.S, CARDOSO S.W., VELASQUE L.S., VELOSO V.G., GRINSZTEJN B. Incidence rate of modifying or discontinuing first combined antiretroviral therapy regimen due to toxicity during the first year of treatment stratified by age. **Braz J Infect Dis**. 18(1):34-41. doi: 10.1016/j.bjid.2013.04.005. 2014.

USAMI Y, WU Y, GÖTTLINGER HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. **Nature**. 526(7572):218-23. doi: 10.1038/nature15400. 2015.

VANCOMPERNOLLE SE, TAYLOR RJ, OSWALD-RICHTER K, JIANG J, YOUREE BE, BOWIE JH, TYLER MJ, CONLON JM, WADE D, AIKEN C, DERMODY TS, KEWALRAMANI VN, ROLLINS-SMITH LA, UNUTMAZ D. Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. **J Virol**. 79(18):11598-606. 2005.

VAN EPPS HL. René Dubos: unearthing antibiotics. **J Exp Med**. 203(2):259. 2006.

VAN HERREWEGE Y, MORELLATO L A, DESCOURS A, AERTS L, MICHIELS J, HEYNDRIKX L, MARTIN L, VANHAM G. CD4 mimetic miniproteins: potent anti-HIV compounds with promising activity as microbicides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 61(4):818-826. 2008.

- VAN REETH K, VAN GUCHT S, PENZAERT M. In vivo studies on cytokine involvement during acute viral respiratory disease of swine: troublesome but rewarding. **Vet Immunol Immunopathol.** 87(3-4):161-8. 2002.
- VARGA ZV, FERDINANDY P, LIAUDET L, PACHER P. Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 309(9):H1453-67. doi: 10.1152/ajpheart.00554. 2015.
- VASSILEVSKI A, KOZLOV S, GRISHIN E. Molecular diversity of spider venom. **Biochemistry (Moscow).** 74(13):1505-1534. 2009.
- VILLARRUBIA VG, COSTA L A, DÍEZ R A. Secreted phospholipases A2 (sPLA2): friends or foes? Are they actors in antibacterial and anti-HIV resistance? **Med Clin (Barc).** 123(19):749-57.2004.
- VORONTSOVA OV, EGOROVA NS, ARSENIYEV AS, FEOFANOV AV. Haemolytic and cytotoxic action of laticin Ltc2a. **Biochimie.** 93(2):227-241. doi: 10.1016/j.biochi.2010.09.016. 2011.
- WACHINGER M, KLEINSCHMIDT A, WINDER D, VON PECHMANN N, LUDVIGSEN A, NEUMANN M, HOLLE R, SALMONS B, ERFLE V, BRACK-WERNER R. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. **J Gen Virol.** 79 (Pt 4):731-40. 1998.
- WANG Y, SCHMITT K, GUO K, SANTIAGO ML, STEPHENS EB. Role of the single deaminase domain APOBEC3A in virus restriction, retrotransposition, DNA damage and cancer. **J Gen Virol.** 97(1):1-17. doi: 10.1099/jgv.0.000320).2016.
- WOOLHOUSE M, SCOTT F, HUDSON Z, HOWEY R, CHASE-TOPPING. Human viruses: discovery and emergence. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 367(1604):2864-71.2012.
- XU H, WANG X, MALAM N, LACKNER AA, VEAZEY RS. Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Causes Ultimate Depletion of Follicular Th Cells in AIDS. **J Immunol.** 195(9):4351-7. doi: 10.4049/jimmunol.1501273. 2015.
- YI HY, CHOWDHURY M, HUANG YD, YU XQ. Insect antimicrobial peptides and their applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** 98(13):5807-22. doi: 10.1007/s00253-014-5792-6. 2014.
- YOSHIKAWA R, IZUMI T, YAMADA E, NAKANO Y, MISAWA N, REN F, CARPENTER MA, IKEDA T, MÜNK C, HARRIS RS, MIYAZAWA T, KOYANAGI Y, SATO K. A Naturally Occurring Domestic Cat APOBEC3 Variant Confers Resistance to Feline Immunodeficiency Virus Infection. **J Virol.** 90(1):474-85. doi: 10.1128/JVI.02612-15). 2015.
- ZAMPELLA A, SEPE V, LUCIANO P, BELLOTTA F, MONTI MC, D'AURIA MV, JEPSEN T, PETEK S, ADELIN MT, LAPRÉVÔTE O, AUBERTIN AM, DEBITUS C, POUPAT C, AHOND A. Homophymine A, an anti-HIV cyclodepsipeptide from the sponge Homophymia sp. **J Org Chem.** 73(14):5319-27. doi: 10.1021/jo800583b. 2008.
- ZASLOFF M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 84(15): 5449-5453. 1987.
- ZENG Y, LI H, ZHANG X, SHANG J, KANG Y. Basal transcription of APOBEC3G is regulated by USF1 gene in hepatocyte. **Biochem Biophys Res Commun.** 470(1):54-60. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.108). 2016.

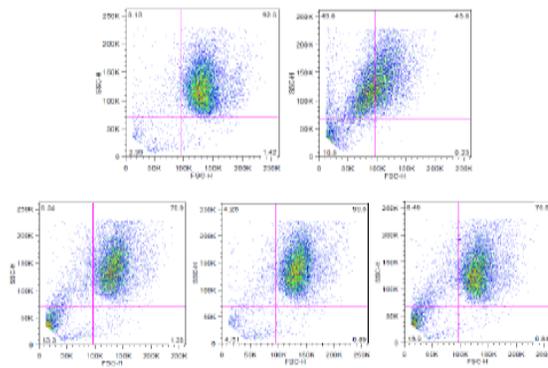
ZHAO X, WU H, LU H, LI G, HUANG Q. LAMP. A Database Linking Antimicrobial Peptides. **PLoS One** 8, e66557.2013.

ZHANG Y-J, WANG J-H, LEE W-H, WANG Q, LIU H, ZHENG Y-T, ZHANG Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom l-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochemical and biophysical research communications**. 309(3):598-604. 2003.

ZHANG L J, GALLO R L. **Curr Biol**. 26(1):R14-9. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.017. **Antimicrobial peptides**. 2016.

ZHOU Y, BAO R, HAIGWOOD N L, PERSIDSKY Y, HO W-Z. SIV infection of rhesus macaques of Chinese origin: a suitable model for HIV infection in humans. **Retrovirology**. 10(1): 89. 2013.

10. Anexos



Avaliação de parâmetros morfológicos da suspensão de HUT-78 por Citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com H₂O (A), H₂O₂ (B), AZT + SIV (C), células + AZT (D) e células + SIV (E). Legenda: FSC – tamanho; SSC- granulidade.

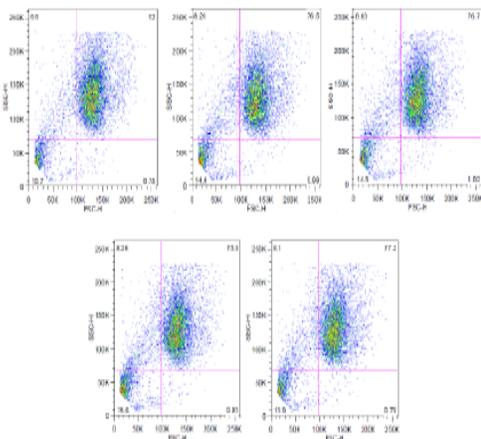
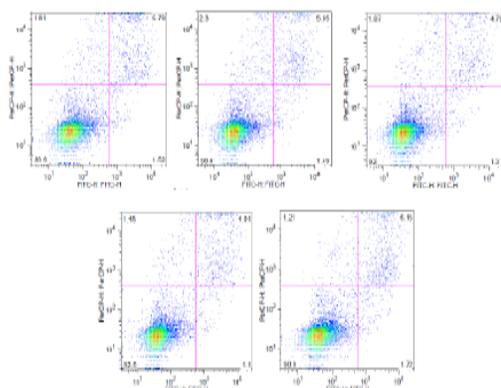
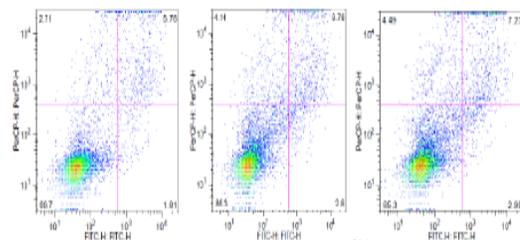


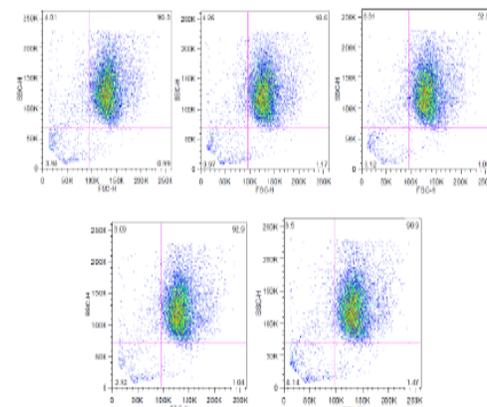
Figura: Avaliação de parâmetros morfológicos da suspensão de HUT-78 por Citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com P6 + SIV nas diluições 1 a 5. Legenda: FSC – tamanho; SSC- granulidade.



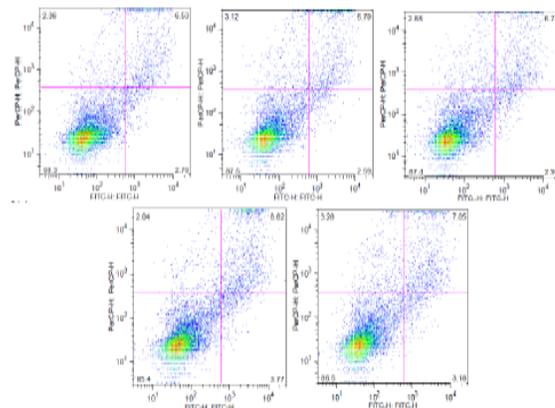
Dot plot da avaliação de morte celular de células HUT-78 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição com P6 em diferentes diluições



Dot plot da avaliação de morte celular de HUT-78 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição a (A) Cell + AZT, (B) cell + SIV e (C) AZT + SIV.



Avaliação de parâmetros morfológicos da suspensão de HUT-78 por Citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com P6 nas diluições 1 a 5. Legenda: FSC – tamanho; SSC- granulidade.



Dot plot da avaliação de morte celular de HUT-78 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição com P6 + SIV em diferentes diluições.

REVIEW

Open Access

Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds



Élida Cleyse Gomes da Mata¹, Caroline Barbosa Farias Mourão¹, Marisa Rangel^{1,2} and Elisabeth Ferroni Schwartz^{1*}

Abstract

Viruses exhibit rapid mutational capacity to trick and infect host cells, sometimes assisted through virus-coded peptides that counteract host cellular immune defense. Although a large number of compounds have been identified as inhibiting various viral infections and disease progression, it is urgent to achieve the discovery of more effective agents. Furthermore, proportionally to the great variety of diseases caused by viruses, very few viral vaccines are available, and not all are efficient. Thus, new antiviral substances obtained from natural products have been prospected, including those derived from venomous animals. Venoms are complex mixtures of hundreds of molecules, mostly peptides, that present a large array of biological activities and evolved to putatively target the biochemical machinery of different pathogens or host cellular structures. In addition, non-venomous compounds, such as some body fluids of invertebrate organisms, exhibit antiviral activity. This review provides a panorama of peptides described from animal venoms that present antiviral activity, thereby reinforcing them as important tools for the development of new therapeutic drugs.

Keywords: Antiretroviral agents, Antiviral agents, HIV, Scorpion venom, Snake venom, Amphibian venom, Insect venom, Marine animal peptides

Background

Considering the most common pathologies in humans and other animals, cardiovascular and infectious diseases and cancer are among the leading causes of deaths. The cultural and educational background of affected people largely influences the prevention and treatment of human diseases; nevertheless, the availability of new drugs contributes greatly to mitigating diseases.

More than 200 viruses are known to cause human diseases [1, 2]. Some of them present high public health importance, such as cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), hepatitis B and C viruses (HBV and HCV, respectively), herpes simplex virus (HSV), human immunodeficiency virus (HIV), rabies virus and Ebola virus. The most recent worldwide estimates presented by the World Health Organization (WHO) reported 1.5 million deaths caused by HIV in 2012, 400 million people living with hepatitis B or C, 80% of liver cancer deaths caused by hepatitis viruses, 500 thousand cases of cervical cancer

caused by HPV infection, and over 250 thousand cervical cancer deaths each year [3].

The very few antiviral drugs commercially available can induce severe and considerable adverse effects, especially to those patients receiving lifelong treatment for diseases such as HIV. Furthermore, viruses possess rapid mutational capacity to trick and infect host cells. All these facts together have propelled the prospection for new antiviral drugs, particularly from natural products, as they constitute more than 25% of the new drug prototypes approved in the last decades [4]. Among sources of natural products, animal venoms have revealed a great potential for drug discovery [5–7], and despite the harmful action mechanism of animal venoms, most of them have components holding potential medicinal properties to cure diseases.

It is widely reported in the literature that animal venoms are rich sources of antimicrobial substances, and contain a vast array of active biological compounds with distinct chemical structures [8]. Thus, antimicrobial peptides (AMPs) — a diversified group of peptides that exert essential function in the innate immune host response, when invaded by pathogenic organisms, such as bacteria, fungi and virus — are considered the first line of defense of

* Correspondence: efschwa@unb.br

¹Laboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

many organisms, including plants, insects, bacteria and vertebrates [9, 10].

Possible action mechanism of antiviral compounds

Some peptides exhibit direct virucidal activity; others disturb attachment of virus particles to the cell membrane surface or interfere with the virus replication. Because of the limited efficiency of commonly used drugs and emerging resistance of viruses, antiviral peptides may have the potential for development as putative therapeutic agents [11]. In addition to their reduced market availability, the collateral effects and toxicity of the synthetic antiviral drugs have triggered an expanded search for natural compounds displaying antiviral activities [12, 13]. Any compound to be utilized as an antiviral should comply with the virus pathways during the cellular infectious cycle. Initially, any RNA or DNA virus, enveloped or not, expresses glycoproteins that are responsible for the interaction with surface molecules, receptors, usually glycosylated proteins, integrated in the host cell membrane. At this step, any potential antiviral candidate must compete for the cell receptor by inhibiting the virus attachment to the cell membrane, thereby aborting the viral infection.

Other candidates may act intracellularly by interacting with the virion capsid to prevent its decapsidation; therefore, the viral nucleic acid would not be freed and transcribed. Concerning retroviruses, the antiviral candidates can act by inhibiting (i) the viral reverse transcriptase activity; (ii) the pre-integration complex, thus avoiding the transport of circular viral DNA to the nucleus; (iii) and also by inhibiting the action of the viral integrase, which would not allow the viral DNA to integrate into the cellular chromosome. The proviral DNA, after transcription, is transduced into a polyprotein that requires the viral protease in order to generate small proteins to assemble the viral capsid. In this manner, an antiviral compound could inhibit the viral protease by blocking the retroviral morphogenesis (Fig. 1) [14]. Some retroviral proteins play a major role in the pathogenesis, by down regulation of CD4 and MHC molecules of the host cell, driving them to the proteasome for degradation. If supposed antiviral candidates target these viral proteins, HIV-1 Nef, Tat and Vpr, their actions can be restrained. All the mentioned mechanisms are directly performed by retroviral molecules [15], but other mechanisms could also be triggered, such as those involved in the innate immune system, e.g. (i) the induction of toll-like receptor expression, that interacts

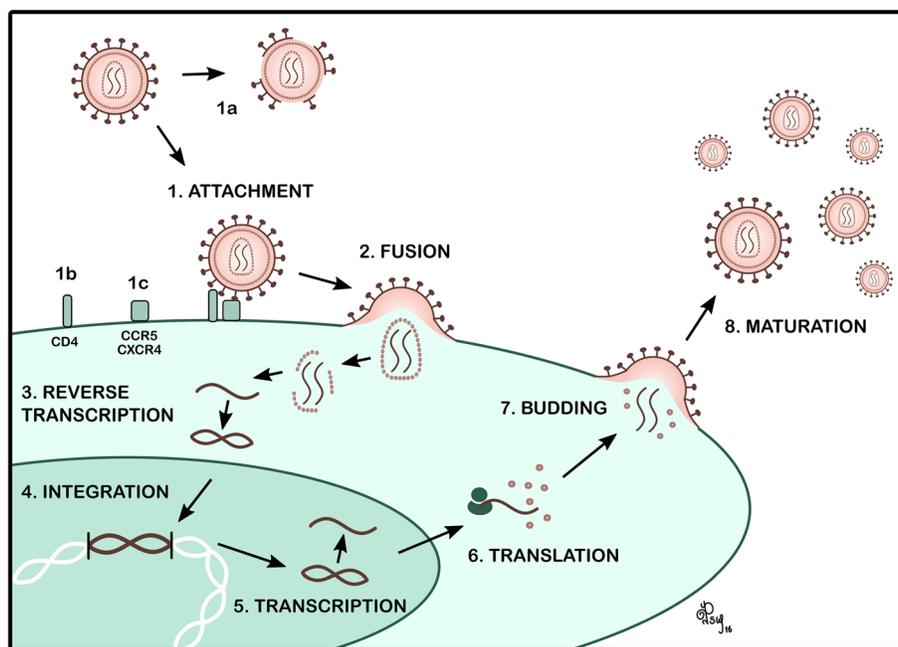


Fig. 1 Action mechanism of animal venom peptides or derivatives at different retrovirus replication cycle phases. **(1)** The ChTx and Scyllatoxin-based mimetics, such as CD4M33, inhibit the attachment of the viral glycoprotein (gp120) to the host cell receptor CD4. **(1a)** The peptides cecropin A, magainin 2, papuamide A, dermaseptin DS4, caerins 1.1 and 1.9 and maculatin 1.1 disintegrate the viral envelope. **(1b)** and **(1c)** The peptides CD4M33, BmKn2, Kn2-7, polyphemusin, tachyplesin, immunokine and p3bv obstruct the interaction of the viral gp 120 to the CXCR4 and CCR5 co-receptors. **(2)** The peptides miramides A–H inhibit the fusion of the viral envelope to the host cell membrane. **(3)** The peptides melittin, didemnis A, B and C interfere with the reverse transcription process, aborting the synthesis of double-stranded viral DNA. **(6)** The peptides hecate and TVS-LAO act in the post-translation process, in the cleavage of the GAG/POL protein precursor thus interfering in the assembly of the viral capsid and in the organization of the polymerase complex

with viral nucleic acid, or (ii) production of cytokines that stimulate the action of T cytotoxic cells, and NK cells, and even host cell expression of the major histocompatibility complex molecules, in order to present viral peptides to the other cells of the immune system [16]. Furthermore, antiviral compounds may activate innate restriction factors coded by the host cell [17].

Mechanisms of viral resistance to drugs

The viral DNA integration in the host cell chromosome represents the major problem to be overcome in a retroviral infection. Until now, there is no available drug capable of completely clearing the virus from the host [18]. Furthermore, silent retroviral infection is hidden at anatomical sites that are difficult to reach by drugs, such as the gut-associated lymphoid tissues, lymph nodes and central nervous system. Infected cells, including macrophages, are quiescent in these tissues and it is not known when they will activate and release new viral progenies. Another challenge for an antiviral candidate is posed by the mutation rate of viral genes, mainly among RNA virus, due to the polymerase synthesis error. This is much more intriguing among retroviruses, as the initial virion genome, maintained in quiescent cells in “sanctuary niche”, are distinct, mutated from each round of cell infection. Thus, in each cycle of viral infection, the hijacked cell produces a growing number of recombinant new virions [19].

Antiviral peptides obtained from animal venoms

Scorpion venoms

The arachnid venoms, utilized as a tool for defense and attack, by killing or immobilizing their prey for feeding or their possible competitors and predators, are composed of a rich molecular diversity and complex mixture, with an intricate protein and peptide expression by mechanisms of gene regulation still under investigation [20, 21]. Scorpion venoms have been exhaustively studied, mainly due to the clinical effects after envenomation in humans, which sometimes lead to death [22]. Paradoxically, biotechnological applications are devised by the increased understanding of the action mechanisms of venom components, and therefore, many research works deal with the generation of new drugs based on the structure and function of molecules found in these venoms [23–25].

With the rapid increase in the number of characterized scorpion venom compounds, many new drug candidates have been identified as potential medicines to deal with emerging medical global threats [8, 20]. In scorpions the biologically active peptides are classified as disulfide-bridged peptides (DBPs) and non-disulfide-bridged peptides (NDBPs) [26, 27], with the former being the main components of scorpion venoms, responsible for the neurotoxic symptoms and signs observed during scorpionism. Usually

these DBPs target the ion channels of excitable and non-excitable cell membranes. These properties make these molecules interesting prototypes of drugs for the treatment of diverse diseases, particularly those affecting the neural system [8].

In relation to the activity of scorpion venom compounds against retroviruses, such as HIV/SIV, it has been reported that some DBPs can bind to HIV gp120 glycoprotein due to molecular mimicry of lentiviruses host cell CD4⁺ receptor. As a result, they abolish the gp120-CD4 interaction, which is essential to initiate the conformational changes in the viral envelope that trigger viral entry into host cells [28]. These CD4 mimetic scorpion toxins contain about 30 amino acid residues, with three or four disulfide bridges, characterized by the cysteine-stabilized α/β motif (CS- α/β), in which a β -turn between the two β -strands in these peptides resembles the CDR₂ loop of CD4.

Both charybdotoxin (ChTx) and scyllatoxin, isolated from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom, present the CS- α/β motif and are capable of blocking K⁺ channels [29–32]. These toxins have been used effectively as molecular scaffolds for gp120-CD4 interaction assays [28, 33, 34]. Since the amino acid residues Phe⁴³ and Arg⁵⁹ of CD4 were shown to be critical for CD4 binding to gp120, equivalent amino acid residues were added to the new compounds.

Examples of mimetic peptides using ChTx as a scaffold include CD4M and TXM1, with 33 and 32 amino acid residues, respectively [33, 35]. Among the main modifications, the CD4 CDR₂ loop sequence ⁴⁰QGSE⁴³ was inserted in the equivalent position of the β -turn of ChTx. Thus, Phe²⁸ of CD4M, or Phe²⁷ of TXM1, would function as Phe⁴³ in CD4. The remaining sequence is similar between the two analogs, except in two positions: Arg²⁰ in TXM1 (Arg²⁵ in ChTx) is replaced by Lys in CD4M, and TXM1 has a Gly¹ as the N-terminal residue in place of Val¹-Ser² residues in CD4M. Thus, the charged N-terminus of the Gly¹ residue in TXM1 is in a position similar to that of the charged side-chain of Arg⁵⁹ in CD4 [33]. CD4M was able to inhibit gp120 binding to CD4 with an IC₅₀ value of 20 μ M [35]. Likewise, TXM1 also competed with CD4 for gp120 binding, besides causing a CD4-like enhancement in gp120 binding to the antibody 17b [33]. Subsequently, other CD4 mimetics exhibiting gp120 affinity were successfully generated by phage epitope randomization of the β -turn loop in a ChTx-based scaffold [28].

As to scyllatoxin scaffold-based mimetics, a 27-amino acid residue miniprotein named CD4M3 was constructed, which inhibited CD4 binding to gp120 with an IC₅₀ value of 40 μ M [34]. Structural and functional analysis performed with CD4M3 suggested additional mutations that, once incorporated in the new compound (CD4M9), caused an increased affinity for gp120, with IC₅₀ values of 0.1–1.0 μ M, depending on the viral strains. Additionally,

CD4M9 inhibited infection of CD4⁺ cells by different HIV-1 strains [34]. Its β -turn sequence (²⁰AGSF²³) is similar to that of TXM1. After that, based on CD4M9 structural analysis, a potent mimetic with bona fide CD4-like properties was synthesized [36]. Denominated CD4M33, it inhibited CD4-gp120 binding in different viral strains with 4.0–7.5 nM IC₅₀, with these values being comparable to those obtained with CD4. CDM33 also inhibited HIV-1 cell-cell fusion and infection of cells expressing CD4 and either the CCR5 or CXCR4 co-receptors at similar concentrations to CD4 [36]. Its three dimensional structure was further analyzed in complex with gp120 [37]. Then, another analog was designed, denominated F23, which differs from CD4M33 due to the presence of Phe²³ in replacement by biphenylalanine in position 23 (Bip²³). The authors showed that F23 had higher mimicry of CD4 than CD4M33. In addition, F23 presented increased neutralization against isolates of phylogenetically related primate lentiviruses [37].

The scorpion venom AMPs belong to NDBPs; many of them and their analogs exert strong antiviral activity, as shown in Table 1. Some of these compounds act by direct rupture of the viral envelope, thereby decreasing viral infectivity [8]. AMPs could also prevent or block the virion from entering into the cell by occupying cell receptors utilized by the viral glycoproteins [38]. Other AMPs do not compete with viral glycoproteins to get attached to cell receptors. Instead, they can cross the cell lipoprotein membrane and internalize themselves in the cytoplasm and organelles, yielding alterations in the profile of host cells that can enhance the defense against the virus or may also block the expression of viral genes in the host cell, halting viral dissemination to other cells [9].

Mucroporin is a cationic 17-amino-acid residue AMP isolated from *Lychas mucronatus* venom. One of its derivatives, named mucroporin-M1, has an enhanced net positive charge, and besides having antibacterial activity, presented antiviral activity against Measles, SARS-CoV and Influenza H5N1 viruses (Table 1), possibly through a direct interaction with the virus envelope [39]. Additionally, it has been shown to reduce the production of HBV antigens and viral DNA in cell culture microenvironment and also to hinder HBV infection in mouse models [40]. The molecular mechanism implicated reveals the specific activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) leading to down-regulation of HNF4 α expression and consequently less binding to the HBV pre-core/core promoter region [40]. Mucroporin-M1 also presented anti-HIV-1 activity [38].

An amphipathic α -helical peptide, Hp1090, was screened from the cDNA library of *Heterometrus petersii* venomous gland. This 13-amino-acid residue NDBP inhibited the HCV infection (Table 1), acting as a viricide against HCV particles and preventing the initiation of HCV infection by permeabilizing the viral envelope and decreasing virus infectivity [41]. Also from *H. petersii* venom gland cDNA library, other α -helical NDBPs were synthesized. Two of them, Hp1036 and Hp1239, exhibited potent virucidal activity against HSV-1 (Table 1) [42]. They showed inhibitory effects on multiple steps of the virus replication cycle, caused the destruction of the viral morphology and also entered the infected cells where they reduced viral infectivity.

From the cDNA library of *Mesobuthus martensii* venom gland, a compound denominated BmKn2 — with 13 amino acid residues — was cloned and synthesized. Based on its sequence, Kn2-7 was designed by making

Table 1 Scorpion peptides and derivatives with antiviral activity

Scorpion	Peptide name	Virus	EC ₅₀	Reference	
<i>Lychas mucronatus</i>	Mucroporin-M1	MeV	7.15 μ g/mL (3.52 μ M)	[39]	
		SARS-CoV	14.46 μ g/mL (7.12 μ M)	[39]	
		H5N1	2.10 μ g/mL (1.03 μ M)	[39]	
		HBV	–	[40]	
		HIV-1	–	[38]	
<i>Heterometrus petersii</i>	Hp1090	HCV	7.62 μ g/mL (5.0 μ M)	[41]	
		Hp1036	HSV-1	0.43 \pm 0.09 μ M	[42]
			Hp1239	HSV-1	0.41 \pm 0.06 μ M
<i>Mesobuthus martensii</i>	Kn2-7	HIV-1	2.76 μ g/mL (1.65 μ M)	[38]	
		Bmkn2	–	[38]	
<i>Chaerilus tryznai</i>	Ctry2459	HCV	1.84 μ g/mL	[43]	
		Ctry2459-H2	HCV	1.08 μ g/mL	[43]
		Ctry2459-H3	HCV	0.85 μ g/mL	[43]

EC₅₀ peptide concentration required to reduce virus infection by 50%, HIV-1 human immunodeficiency virus type 1, MeV measles virus, HBV hepatitis B virus, HCV hepatitis C virus, SARS-CoV severe acute respiratory syndrome/coronavirus, H5N1 influenza virus, HSV-1 herpes simplex virus type 1. Adapted from Hmed et al. [8]

the substitutions G3K, A4R and S10R, enhancing its net positive charge and α -helix structure [38]. Both compounds exerted anti-HIV-1 activity through inhibition of chemokine receptors CCR5- and CXCR4-mediated activities and replication of the viruses, of which Kn2-7 was the most potent (Table 1) [38].

Another NDBP, screened from *Chaerilus tryznai* scorpion venom gland, Ctry2459, was able to inhibit initial HCV infection in Huh7.5.1 cells by inactivating infectious viral particles (Table 1) [43]. However, due to the low bioavailability of this 13-amino-acid residue peptide, Ctry2459 could not suppress an established infection. Thus, in order to enhance the helicity, amphiphilicity and endosomal escape of peptides, the authors designed histidine-rich peptides based on a Ctry2459 template. Denominated Ctry2459-H2 and Ctry2459-H3, they were more effective against HCV than Ctry2459 (Table 1), significantly reducing intracellular viral production. Unlike Ctry2459, these analogs reduced the viral RNA by 40 and 70%, respectively; however, Ctry2459 diminished viral infectivity in a manner similar to that of wild-type peptide [43].

Recently, the antiviral activities of *Scorpio maurus palmatus* and *Androctonus australis* crude venoms were shown against HCV. They presented IC_{50} values of 6.3 ± 1.6 and 88.3 ± 5.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. *S. maurus palmatus* venom was considered a good natural source for characterizing new anti-HCV agents targeting the entry step, since it impaired HCV infectivity in cell culture, but not intracellularly, through a virucidal effect. This effect was not inhibited by a metalloprotease inhibitor or heating at 60 °C [44].

Snake venoms

Snake venoms are composed of a mixture of proteins, peptides (90–95%), free amino acids, nucleotides, lipids, carbohydrates and metallic elements coupled to proteins (5%) [45]. Some studies have reported the antiviral activity of snake venoms and their components against measles virus, Sendai virus, dengue virus (DENV), yellow fever virus (YFV) and HIV [46–50]. Thus, snake venoms are sources of promising candidates for new antiviral drugs (Table 2). In relation to antiretroviral activity, the benefits of treating a patient with multidrug-resistant HIV with a snake venom preparation in addition to the antiretroviral therapy were demonstrated in clinical practice [51]. The response was a decreased viral load and elevated T CD4⁺ cell count. The authors suggest that this activity may be related to the presence of some snake venom molecules that are homologous to HIV-1 glycoprotein or proteases [51, 52].

This homology occurs between the 30–40 highly conserved amino acid residues of snake venom neurotoxins long loop and the sequence 164–174 of short segment

HIV-1 gp120. As a result, both may compete for the same receptor or binding site and present anti-HIV activity [50]. The sequence homology between HIV gp120 and snake neurotoxins, such as cobratoxin and bungarotoxin, had generated some antiretroviral patents [53–55]. Linking the gp120 fragment to the HIV peptide fusion inhibitors (fragments of gp41 ectodomains) was shown to improve their anti-HIV efficacy [56]. Besides structural homology, other action mechanisms of snake venoms against HIV are also discussed in the literature, such as catalytic/inhibitory activity through enzymes, binding interference (receptor/enzyme), and induction/interaction at the membrane level [50].

The L-amino acid oxidases (LAAOs or LAOs, EC1.4.3.2), which constitute one of the most studied main components of snake venoms, are oxidoreductase flavoenzymes with molecular masses around 110 to 150 kDa and are usually non-covalently linked homodimeric glycoproteins [57, 58]. These compounds are widely distributed in other organisms and play an important role in biological activities such as apoptosis induction, cytotoxicity, inhibition or induction of platelet aggregation, hemorrhaging, hemolysis and edema, as well as anti-HIV, antimicrobial and antiparasitic activities [59]. TSV-LAO, characterized from *Trimeresurus stejnegeri* snake venom, seems to be the first snake venom LAO reported to present antiviral activity (Table 2) [60].

TSV-LAO is a glycoprotein with a molecular weight of about 58 kDa that also forms homodimers, similarly to LAOs from other snake venoms. Its precursor sequence, obtained by cDNA analysis, codes for a polypeptide of 516 amino acid residues, including an 18-amino-acid potential signal peptide that is identical to those of LAOs from other snake species. TSV-LAO inhibited HIV-1 infection and replication in a dose-dependent manner, and seems to act at nanomolar concentrations by inhibiting syncytium formation (EC_{50} of 1.5 nM) and HIV-1 p24 antigen expression (EC_{50} of 4.1 nM) [60].

Additionally, another LAO, isolated from *Bothrops jararaca* venom and denominated BjarLAAO-I (Table 2), reduced the viral load in cells infected with dengue virus type 3 strain exposed to the toxin in comparison to controls [61]. Its cDNA-deduced sequence has 484 amino acid residues and is similar to other snake venom LAOs. These flavoenzymes also produce hydrogen peroxide (H_2O_2) as a free radical, which appears to enhance their antiviral activity [60].

Other compounds found in snake venoms that exhibit antiviral activity are the phospholipases A₂ (PLA₂). Among their biological effects, they seem to interact with the host cells and prevent the intracellular release of virus capsid protein, suggesting that they block viral entry into the cells before virion uncoating [7, 49, 62]. The PLA₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (PLA₂-Cdt, Table 2)

Table 2 Examples of animal peptides presenting antiviral activity

Source	Species	Peptide name	Virus	Action mechanism	Reference
Frog	<i>Xenopus laevis</i>	Magainin 1 and 2	HSV-1 and HSV-2	Cellular target	[115]
Frog	<i>Rana brevipedaporsa</i>	Brevinin-1	HSV	Viral inactivation	[116]
Frog	<i>Phyllomedusa</i>	Dermaseptin S ₄	HSV-2	Viral envelope disruption	[69]
Frog	<i>Phyllomedusa</i>	Dermaseptin DS ₄	HIV-1	Viral envelope disruption	[117]
Frog	–	Dermaseptin S ₄	HSV-1	Viral membrane disruption	[118]
Frog	<i>Litoria caerulea</i>	Caerin 1.1	HIV	Viral envelope disruption	[70]
Frog	<i>Litoria chloris</i>	Caerin 1.9	HIV	Viral envelope disruption	[70]
Frog	<i>Litoria genimaculata</i>	Maculatin 1.1	HIV	Viral envelope disruption	[70]
Insect	<i>Vespula lewisii</i>	MP7-NH ₂	HSV	Viral envelope disruption	[74]
Insect	<i>Apis mellifera</i>	Melittin	HIV	CXCR4 and CCR5 tropic inhibition HIV-1 infectivity	[79]
Insect	Synthetic (from melittin)	Hecate	HSV	Cellular target	[83]
Insect	Bee venom	bvPLA ₂	HIV	Virion entry blocking into host cell	[65]
Insect	Synthetic (from bvPLA ₂)	p3bv	HIV	HIV glycoprotein fusion inhibition to CXCR4 cell receptor	[76]
Insect	<i>Calliphora vicina</i>	Alloferons 1 and 2	IAV/HSV	Immunomodulatory activity	[88]
Insect	<i>Hyalophora cecropia</i>	Cecropin A-magainin 2	HIV	Virion entry blocking into host cell	[85]
Ophidian	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	TSV-LAO	HIV-1	Syncytium formation inhibition and HIV-1 p24 antigen reduction	[60]
Ophidian	<i>Bothrops jararaca</i>	BjarLAO-I	DENV-3	Infected cells reduction	[61]
Ophidian	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	PLA ₂ -Cdt	DENV, YFV	Virus envelope cleavage and protein destabilization	[48, 63]
			HIV	Gag p24 processing inhibition	[62, 64]
Ophidian	<i>Bothrops leucurus</i>	BK-PLA ₂ ; BID-PLA ₂	DENV	Viral RNA levels reduction	[65]
Ophidian	<i>Naja kaouthia</i> (<i>Naja siamensis</i>)	Immunokine	HIV	CCR5 and CXCR4 receptors interaction	[7, 66]
Marine sponge	<i>Sidonops microspinosa</i>	Microspinosamide	HIV	Cytopathic effect inhibition	[111]
Marine sponge	<i>Siliquariaspongia mirabilis</i> and <i>Stelletta clavosa</i>	Mirabamides A-H	HIV	Viral glycoprotein fusion neutralization to the cell receptors	[94, 95]
Marine sponge	<i>Homophymia</i> sp.	Homophymine A	HIV	Virion entry inhibition	[96]
Marine sponge	<i>Theonella</i> sp.	Papuamides A and B	HIV	Virion entry inhibition	[106]
Marine sponge	<i>Theonella swinhoe</i>	Theopapuamide A	HIV	Virion entry inhibition	[105, 106]
Marine sponge	<i>T. swinhoe</i> and <i>T. cupola</i>	Koshikamides F, H	HIV	Virion entry inhibition	[104]
Marine sponge	<i>Siliquariaspongia mirabilis</i>	Theopapuamide B	HIV	Viral envelope disruption	[108]
Marine sponge	<i>Siliquariaspongia mirabilis</i>	Celebesides A–C	HIV	Virion entry inhibition	[108]
Marine sponge	<i>Callipelta</i> sp.	Callipeltin A	HIV	Virion entry inhibition	[109]
Marine sponge	<i>Neamphius huxleyi</i>	Neamphamide A	HIV	Virion entry inhibition	[110]
Horseshoe crab	<i>Tachypleus tridentatus</i>	Polyphemusin	HIV	Chemokine receptor, CXCR4/viral co-receptor attachment	[112]
Fish	<i>Pleuronectes americanus</i>	Pa-MAP	HSV	Viral envelope interaction	[91, 92]
Tunicate	<i>Trididemnum solidum</i>	Didemnins A, B and C	HSV-1 and 2; coxsackie virus A-21 and equine rhinovirus	Protein, DNA and RNA synthesis inhibition	[97]

HIV human immunodeficiency virus, HSV herpes simplex virus, IAV influenza virus, VSV vesicular stomatitis virus, DENV dengue virus. Adapted from Jenssen et al. [9] and Mulder et al. [77]

inhibited both DENV and YFV in Vero E6 cells [48]. This PLA₂ is part of crotoxin, a heterodimeric protein composed of two different subunits non-covalently linked: the basic PLA₂ (~16.4 kDa) and the acidic protein crotopotin (~9.0 kDa) [48].

The mechanism proposed for PLA₂-Cdt antiviral activity involves the cleavage of the glycerophospholipid virus envelope and protein destabilization on the virion surface, which partially exposes the genomic RNA and culminates with viral inactivation, making it unable to access the cell receptor [63]. PLA₂-Cdt also showed *in vitro* activity against HIV (Table 2) [62, 64], as well as the snake venom PLA_{2S} NmmCM_{III} from *Naja mossambica mossambica*, taipoxin from *Oxyuranus scutellatus*, and nigexine from *Naja nigricollis* [49]. Additionally, the PLA₂ variants, Lys49 and Asp49, denominated *BK-PLA₂* and *BID-PLA₂*, from *Bothrops leucurus* venom (Table 2), reduced dengue viral RNA in cells treated with these compounds, and presented cytotoxic activity against DENV-infected cells *in vitro* [65]. *BK-PLA₂* and *BID-PLA₂* have 121 and 122 amino acid residues, respectively, including seven disulfide bonds.

Another example of the antiviral effect of biomolecules extracted from snake venoms are the metalloprotease inhibitors, which could prevent the production of new HIV particles by inhibiting the viral proteases [50]. In addition, Immunokine® (OXO Chemie, Thailand), an oxidized derivative of the α -toxin extracted from *Naja siamensis* venom (Table 2), has been shown to inhibit infection of lymphocytes by HIV through the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 [7, 66].

Anuran skin peptides

Many reports detail potent antiviral activity of amphibian skin secretions. Such skin secretions constitute the amphibians' first line of defense, consisting of their innate immunity. The secretions produced by the anuran skin granular glands have been screened for many biological activities, including antimicrobial, antineoplastic, antiviral, contraceptive and anthelmintic activities [67, 68].

The dermaseptin family of antimicrobial peptides comprise 24–34 amino acids, exhibiting a linear polycationic molecule disposed as an amphiphilic α -helical structure when associated with a lipid cell bilayer. Bergaoui et al. [69] described the dermaseptin S₄, a chemically synthesized 28-amino-acid drug derived from an amphibian skin antimicrobial peptide, exhibiting anti-herpetic activity (HSV type 2), with reduced cytotoxic effects after biochemical modifications of the original peptide. It also reduced *in vitro* HIV-1 infection of an established cell line, P4-CCR5, expressing CD4, CCR5, and CXCR4 HIV-1 cell receptors and, primary T lymphocytes, being capable of acting on both R5 and X4 tropic HIV-1 virions. Upon

insertion in the viral envelope, the dermaseptin S₄ disrupts the virion [69].

Caerin 1.1, caerin 1.9 and maculatin 1.1, peptides also derived from the skin secretions of the amphibians *Litoria caerulea*, *Litoria chloris* and *Litoria genimaculata*, respectively, completely abolished HIV infection of T cells, after a few minutes of virion exposure to these modified peptides, which disintegrates the viral envelope, preventing viral fusion to the cell membrane. Furthermore, these molecules obstructed viral transfection from dendritic cells to T cells. Caerin peptides are composed of 25 amino acid residues in their structure, including four central amino acid residues not present in maculatin peptides. In lipid bilayer membranes, these peptides are adjusted to two α -helices, interlinked by a flexible hinge region limited by Pro¹⁵ and Pro¹⁹, which determine the disruption of viral envelope and cell membrane [70].

Insect venoms

Mastoparan is a tetradecapeptide present in wasp (*Vespa lewisii*) venom [71] that forms amphipathic helical structures that insert into lipid bilayers of bacteria, erythrocytes, mast cells and others, forming pores [72, 73]. Mastoparan-7, a mastoparan analogue, displayed a wide spectrum of antiviral activity against enveloped viruses of five different families (Rhabdoviridae, Poxviridae, Flaviviridae, Paramyxoviridae and Herpesviridae) in *in vitro* assays (Table 2). Structural studies have indicated pore formation by the insertion of the mastoparan amphiphilic α helix into the viral lipidic envelope, causing its disruption [74].

HIV virions usually infect the host cells in the genital mucosae, by infecting macrophages, being denominated M-tropic virus; after migrating to the lymph nodes, they infect T lymphocytes, changing into T-tropic virus [75]. Based on the HIV tropism, a phospholipase A₂ from bee venom, bvPLA₂, blocked the replication of both M and T-tropic HIV virions [65], while a small peptide derived from bvPLA₂, the p3bv, exclusively inhibited the replication of T-tropic virus, behaving as a ligand for the HIV-1 co-receptor CXCR4 [49, 76] (Table 2).

AMPs isolated from invertebrate organisms presented augmented antiviral activity in human diseases. Such peptides enclose melittin, cecropin and alloferon molecules [77] (Table 2). Melittin, isolated from honey bee (*Apis mellifera*) venom, is an amphipathic peptide composed of 26 amino acid residues, arranged in two α helical segments. Inserted in nanoparticles, melittin exhibited virucidal activity against HIV-1 in the VK2 cell line, an epithelial vaginal cell line, and also inhibited HIV infection in TZM-bl reporter cells (HeLa cell line expressing HIV receptors) [78–80]. Among other antiretroviral mechanisms, melittin complemented the azidovudin reverse transcription inhibition [81, 82]. Hecate, an analogue of melittin, selectively reduced the protein biosynthesis of virus-specified

glycoproteins B, C, D, and H of the HSV type 1 [83]. The mechanism is similar to the one detected among HIV-1 infected lymphoblastic cells, previously treated with melittin, by the intervention in the processing of the gag/pol protein precursor. Therefore, specific intracellular events are targeted by melittin and its derivatives [82, 84].

Cecropins, isolated mostly from the hemolymph of infected pupae of the silk moth *Hyalophora cecropia*, but also from other insects, tunicates and *Ascaris* nematodes, are a family of AMPs, containing 35–37 amino acid residues arranged in two amphiphilic α -helices linked by a Gly-Pro hinge. Synthetic hybrid peptides, namely cecropin A (1–8)-magainin 2 (1–12), exhibited potent antiviral activity by a mechanism mainly based on the compound hydrophobicity and α -helical content, inhibiting the virus-host cell fusion [85] (Table 2).

Alloferon 1 and 2 are peptides constituted of 12–13 amino acid residues, isolated from the hemolymph of the blowfly *Calliphora vicina*. Alloferons exert immunomodulatory activities to control infection by the human influenza virus in mice model of lethal pulmonary infection [75], whereas their derivatives also inhibited in vitro HSV replication in Vero cells [86, 87] (Table 2). These peptides also displayed a relevant role in the innate immunity, being considered prospective peptides for the pharmaceutical industry [88, 89].

Peptides from marine organisms

Sea organisms are also promising sources of antiviral cationic peptides. They present a broad spectrum of antiviral activity, while one single peptide may present activity against different viruses and other pathogens. The promiscuous antifreeze Pa-MAP peptide, which consists of an α -helix composed of 11 amino acid residues, was isolated from the polar fish *Pleuronectes americanus* (Table 2). The Pa-MAP exerted antimicrobial activity against bacteria, fungi, neoplastic cells, and also interacted with the viral envelope of the HSV types 1 and 2, inhibiting the infection of susceptible cells [77, 90–92].

Some sponge species contain linear or cyclic bioactive peptides composed of atypical amino acid residues, generating unique structures that are rarely found in terrestrial organisms [90, 93]. These compounds, particularly the cyclic depsipeptides mirabamides A-H, isolated from *Siliquaria spongia mirabilis* and *Stelletta clavosa*, obstruct the HIV-1 virion entry into TZM-bl cells, thus neutralizing the viral glycoprotein fusion for expressing CD4 and CCR5 HIV cell receptors [94, 95] (Table 2). Peptide concentrations between 40 and 140 nM were sufficient to inhibit infection by 50% (IC₅₀). Another cyclodepsipeptide, homophymine A, obtained from *Homophymia* sp., conferred 50% cell protection at 75 nM concentration against HIV-1 infection in vitro [96] (Table 2).

Discovered in the early 1980s, didemnins A, B and C from the Caribbean tunicate *Trididemnum solidum* were the first antiviral marine depsipeptides described. Didemnins were effective against vaccinia virus, HSV type 1 and 2, coxsackie virus A-21 and equine rhinovirus, presenting strong activity at low doses [97]. Furthermore, these peptides were active in in vivo assays in a rat model infected with herpes simplex virus, reducing the skin lesions after topical administration [98]. Didemnins inhibit protein, DNA and RNA synthesis in cells [99, 100]. The protein synthesis inhibition mechanism may be related to the binding of didemnins to the elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) [101]. Didemnin B underwent phases I and II of clinical trials in the 1980s, but presented low selectivity and therapeutic index, as well as toxic side effects [102]. Dehydrodidemnin B (Aplidin®, Pharma Mar SA, Spain) is currently under phase III of clinical trials as an anticancer drug against multiple myeloma and T-cell lymphoma [103].

Several antiviral peptides and depsipeptides have been described in marine sponges from the genus *Theonella* sp.: koshikamides F and H isolated from *T. swinhoei* and *T. cupola* [104]; papuamides A and B, and theopapuamide A from *Theonella* sp. and *T. swinhoei*, respectively [105–107]. All of them inhibited HIV entry into T cells. Theopapuamide B was isolated from an Indonesian sponge, *Siliquariaspongia mirabilis*, and was also able to inhibit HIV-1 entry into host cells [108]. Papuamide A presented antiviral activity not only against HIV-1, but also against vesicular stomatitis virus and amphotropic murine leukemia virus. Due to its tyrosine residue and the presence of a hydrophobic tail, the peptide may insert into the viral membrane, causing its rupture [105].

Other peptides from marine sponges that inhibit HIV-1 entry into host cells are: callipeltin A, isolated from sponges of the genus *Callipelta*, which displayed antiviral activity with a high selectivity index (29) between the virus and host cells (SI ratio 50% cytotoxic dose [CD₅₀]/ED₅₀) [109]; celebesides A-C from *Siliquariaspongia mirabilis* [108]; neamphamide A, from *Neamphius huxleyi*, a compound with structural similarities to callipeptins and papuamides that exhibited low toxicity to host cells and a selectivity index above 10 [110]; and microspinosamide, isolated from *Sidonops microspinosus* [111].

Marine arthropod species have also yielded antiviral peptides, tachyplesin and polyphemusin (T140), and shown anti-HIV-1 activity by attachment to the chemokine receptor, CXCR4, which is also the viral T cell co-receptor. Hemocytes of horseshoe crabs (*Tachyplesus tridentatus* and *Limulus polyphemus*) are an abundant source of tachyplesin and polyphemusin. The tachyplesin consists of 17–18 amino acid residues, primarily arranged in three tandem repeats of a tetrapeptide, hydrophobic amino acid-Cys-aromatic amino acid-Arg and an amidated

C-terminus, while the polyphemusin analog, T140, is composed of 14 amino acid residues, exposing an anti-parallel β -sheet conformation stabilized by a disulfide bridge between Cys⁴ and Cys¹³ [112, 113].

Conclusions

As a consequence of the scarcity of new families of anti-viral drugs, pharmaceutical companies have strengthened their efforts to increase developments of known current drugs, resulting in little or even no improvement to the existing therapies. These new patent protections guarantee the rights to the same stakeholders who are charging high consumer prices due to the lack of competition [114]. At the same time, the growing demand for new drugs and natural therapeutic products is a matter of extreme necessity to face the emergency of multiresistant viral pathogens. More than 45 compounds obtained from vertebrate and invertebrate organisms presented in vitro or in vivo antiviral activity. Although none of those has yet been launched on the market as an antiviral drug, they present chemical structures completely different from the current drugs used in therapy, despite acting on similar targets. Those compounds may lead to new classes of therapeutic drugs after additional chemical and pharmacological studies.

Emerging and reemerging viruses of medical relevance challenge health authorities all around the planet. Some viral vaccines have taken too long to be designed and approved for human and animal utilization, and even in some cases could not be developed. Preventive and curative measures should always be in the hands of health authorities to ensure control of epidemics, such as the recent Ebola virus in Africa or arboviruses, particularly in Brazil – represented by the dengue, chikungunya and Zika viruses – or worldwide pandemics, such as influenza and HIV. Therefore, prospection, screening and all other phases of biological activity, validation, clinical development of animal peptides represent an essential scientific investment for protecting and perpetuating humankind.

Abbreviations

AMP: Antimicrobial peptide; ChTx: Charybotoxin; CMV: Cytomegalovirus; DBP: Disulfide-bridged peptide; DENV: Dengue virus; EBV: Epstein-Barr virus; H5N1: Influenza virus; HBV: Hepatitis B virus; HCV: Hepatitis C virus; HIV: Human immunodeficiency virus; HSV: Herpes simplex virus; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; MeV: Measles virus; NDBP: Non-disulfide-bridged peptide; SARS-CoV: Severe acute respiratory syndrome/coronavirus; VSV: Vesicular stomatitis virus; WHO: World Health Organization; YFV: Yellow fever virus

Acknowledgments

The authors thank Patrícia Souza Wanderley for Fig. 1 elaboration. Thanks are also due to the Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP) of UNESP for enabling the publication of this paper (Edital Toxinologia CAPES n. 063/2010, Process n. 230.38.006285/2011-21, AUXPE Toxinologia 1219/2011).

Funding

ECGM and CBFM received scholarship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). EFS is supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). This work was also supported by the Edital Toxinologia CAPES n. 063/2010, Process n. 230.38.000805/2011-92, AUXPE Toxinologia 2109/2011.

Authors' contributions

ECGM was a major contributor in writing the manuscript. All authors contributed in writing the manuscript, read and approved the final document.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Author details

¹Laboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil. ²Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute, São Paulo, SP 05508-900, Brazil.

Received: 26 July 2016 Accepted: 30 November 2016

Published online: 06 January 2017

References

- Woolhouse M, Scott F, Hudson Z, Howey R, Chase-Topping M. Human viruses: discovery and emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012;367(1604):2864–71. doi:10.1098/rstb.2011.0354.
- Chippaux JP. Outbreaks of Ebola virus disease in Africa: the beginnings of a tragic saga. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2014;20:44. doi:10.1186/1678-9199-20-44.
- World Health Organization (WHO). Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Accessed 1 Jan 2016.
- Martinez JP, Sasse F, Brönstrup M, Diez J, Meyerhans A. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. *Nat Prod Rep*. 2015;32(1):29–48. doi:10.1039/c4np00085d.
- Vigerelli H, Sciani JM, Jared C, Antoniazzi MM, Caporale GM, da Silva Ade C, et al. Bufotenine is able to block rabies virus infection in BHK-21 cells. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2014;20(1):45. doi:10.1186/1678-9199-20-45.
- Cunha-Neto RS, Vigerelli H, Jared C, Antoniazzi MM, Chaves LB, Silva ACR, et al. Synergic effects between ocellatin-F1 and bufotenine on the inhibition of BHK-21 cellular infection by the rabies virus. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2015;21:50. doi:10.1186/s40409-015-0048-1.
- Rivero JVR, de Castro FOF, Stival AS, Magalhães MR, Carmo Filho JR, Prímer IAH. Mechanisms of virus resistance and antiviral activity of snake venoms. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2011;17(4):387–93. doi:10.1590/S1678-91992011000400005.
- Hmed B, Serria HT, Mounir ZK. Scorpion peptides: potential use for new drug development. *J Toxicol*. 2013;2013:article ID 958797. doi:10.1155/2013/958797.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):491–511. doi:10.1128/CMR.00056-05.
- Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(12):1543–75. doi:10.3390/ph6121543.
- Kolodziej M, Joniec J, Bartoszcze M, Mirski T, Gryko R. Peptides - a new strategy for combating viral infections. *Przegl Epidemiol*. 2011;65(3):477–82 [Article in Polish].
- Torres TS, Cardoso SW, Velasque LS, Veloso VG, Grinsztejn B. Incidence rate of modifying or discontinuing first combined antiretroviral therapy regimen due to toxicity during the first year of treatment stratified by age. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(1):34–41. doi:10.1016/j.bjid.2013.04.005.
- Sthoeger Z, Mahlab-Guri K. AIDS — an old disease with new challenges. *Harefuah*. 2013;152(4):194–5, 249 [Article in Hebrew].
- Goodsell DS. Illustrations of the HIV life cycle. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;389:243–52. doi:10.1007/82_2015_437.
- Meulendyke KA, Croteau JD, Zink MC. HIV life cycle, innate immunity and autophagy in the central nervous system. *Curr Opin HIV AIDS*. 2014;9(6):565–71. doi:10.1097/COH.000000000000106.

16. Altfield M, Gale Jr M. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat Immunol*. 2015;16(6):554–62. doi:10.1038/ni.3157.
17. Meije Y, Tonjes RR, Fishman JA. Retroviral restriction factors and infectious risk in xenotransplantation. *Am J Transplant*. 2010;10(7):1511–6. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03146.x.
18. Mousseau G, Mediouni S, Valente ST. Targeting HIV transcription: the quest for a functional cure. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;389:121–45. doi:10.1007/82_2015_435.
19. Cory TJ, Schacker TW, Stevenson M, Fletcher CV. Overcoming pharmacologic sanctuaries. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013;8(3):190–5. doi:10.1097/COH.0b013e32835fc68a.
20. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*. 2015;93:125–35. doi:10.1016/j.toxicon.2014.11.233.
21. Vassilevski AA, Kozlov SA, Grishin EV. Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry (Mosc)*. 2009;74(13):1505–34.
22. Chippaux JP, Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop*. 2008;107(2):71–9. doi:10.1016/j.actatropica.2008.05.021.
23. Ojeda PG, Wang CK, Craik DJ. Chlorotoxin: structure, activity, and potential uses in cancer therapy. *Biopolymers*. 2016;106(1):25–36. doi:10.1002/bip.22748.
24. Jiménez-Vargas JM, Restano-Cassulini R, Possani LD. Toxin modulators and blockers of hERG K⁺ channels. *Toxicon*. 2012;60(4):492–501. doi:10.1016/j.toxicon.2012.03.024.
25. Rates B, Verano-Braga T, Santos DM, Nunes KP, Pimenta AM, De Lima ME. From the stretcher to the pharmacy's shelf: drug leads from medically important Brazilian venomous arachnid species. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011;10(5):411–9.
26. Quintero-Hernandez V, Jimenez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani LD. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*. 2013;76:328–42. doi:10.1016/j.toxicon.2013.07.012.
27. Almaaytah A, Albalas Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. *Peptides*. 2014;51:35–45. doi:10.1016/j.peptides.2013.10.021.
28. Li C, Dowd CS, Zhang W, Chaiken IM. Phage randomization in a charybotoxin scaffold leads to CD4-mimetic recognition motifs that bind HIV-1 envelope through non-aromatic sequences. *J Pept Res*. 2001;57(6):507–18.
29. Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M. Charybotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*. 1985;313(6000):316–8.
30. Banerjee A, Lee A, Campbell E, Mackinnon R. Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel. *eLife*. 2013;2:e00594. doi:10.7554/eLife.00594.
31. Chicchi GG, Gimenez-Gallego G, Ber E, Garcia ML, Winquist R, Cascieri MA. Purification and characterization of a unique, potent inhibitor of apamin binding from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom. *J Biol Chem*. 1988;263(21):10192–7.
32. Auguste P, Hugues M, Grave B, Gesquiere JC, Maes P, Tartar A, et al. Leiurotoxin I (scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ channels. Chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization. *J Biol Chem*. 1990;265(8):4753–9.
33. Zhang W, Canziani G, Plugariu C, Wyatt R, Sodroski J, Sweet R, et al. Conformational changes of gp120 in epitopes near the CCR5 binding site are induced by CD4 and a CD4 miniprotein mimetic. *Biochemistry*. 1999;38(29):9405–16. doi:10.1021/bi990654o.
34. Vita C, Drakopoulou E, Vizzavona J, Rochette S, Martin L, Menez A, et al. Rational engineering of a miniprotein that reproduces the core of the CD4 site interacting with HIV-1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(23):13091–6.
35. Drakopoulou E, Vizzavona J, Vita C. Engineering a CD4 mimetic inhibiting the binding of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein gp120 to human lymphocyte CD4 by the transfer of a CD4 functional site to a small natural scaffold. *Lett Pept Sci*. 1998;5(2):241–5. doi:10.1023/a:1008837427367.
36. Martin L, Stricher F, Missé D, Sironi F, Pugniere M, Barthe P, et al. Rational design of a CD4 mimic that inhibits HIV-1 entry and exposes cryptic neutralization epitopes. *Nat Biotechnol*. 2003;21(1):71–6. doi:10.1038/nbt768.
37. Huang CC, Stricher F, Martin L, Decker JM, Majeed S, Barthe P, et al. Scorpion-toxin mimics of CD4 in complex with human immunodeficiency virus gp120 crystal structures, molecular mimicry, and neutralization breadth. *Structure*. 2005;13(5):755–68. doi:10.1016/j.str.2005.03.006.
38. Chen Y, Cao L, Zhong M, Zhang Y, Han C, Li Q, et al. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. *PLoS One*. 2012;7(4):e34947. doi:10.1371/journal.pone.0034947.
39. Li Q, Zhao Z, Zhou D, Chen Y, Hong W, Cao L, et al. Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. *Peptides*. 2011;32(7):1518–25. doi:10.1016/j.peptides.2011.05.015.
40. Zhao Z, Hong W, Zeng Z, Wu Y, Hu K, Tian X, et al. Mucroporin-M1 inhibits hepatitis B virus replication by activating the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and down-regulating HNF4a in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2012;287(36):30181–90. doi:10.1074/jbc.M112.370312.
41. Yan R, Zhao Z, He Y, Wu L, Cai D, Hong W, et al. A new natural a-helical peptide from the venom of the scorpion *Heterometrus petersii* kills HCV. *Peptides*. 2011;32(1):11–9. doi:10.1016/j.peptides.2010.10.008.
42. Hong W, Li T, Song Y, Zhang R, Zeng Z, Han S, et al. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res*. 2014;102:1–10. doi:10.1016/j.antiviral.2013.11.013.
43. Hong W, Zhang R, Di Z, He Y, Zhao Z, Hu J, et al. Design of histidine-rich peptides with enhanced bioavailability and inhibitory activity against hepatitis C virus. *Biomaterials*. 2013;34(13):3511–22. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.075.
44. El-Bitar AM, Sarhan MM, Aoki C, Takahara Y, Komoto M, Deng L, et al. Virucidal activity of Egyptian scorpion venoms against hepatitis C virus. *Virology*. 2015;12:47. doi:10.1186/s12985-015-0276-6.
45. Calvete JJ, Juarez P, Sanz L. Snake venomomics. Strategy and applications. *J Mass Spectrom*. 2007;42(11):1405–14. doi:10.1002/jms.1242.
46. Petricevich VL, Mendonca RZ. Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. *Toxicon*. 2003;42(2):143–53.
47. Borkow G, Ovadia M. Selective lysis of virus-infected cells by cobra snake cytotoxins: A sendai virus, human erythrocytes, and cytotoxin model. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;264(1):63–8. doi:10.1006/bbrc.1999.1483.
48. Muller VD, Russo RR, Cintra AC, Sartim MA, Alves-Paiva Rde M, Figueiredo LT, et al. Crotoxin and phospholipases A₂ from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. *Toxicon*. 2012;59(4):507–15. doi:10.1016/j.toxicon.2011.05.021.
49. Fenard D, Lambeau G, Valentin E, Lefebvre JC, Lazdunski M, Doglio A. Secreted phospholipases A₂, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J Clin Invest*. 1999;104(5):611–8. doi:10.1172/JCI6915.
50. Meenakshisundaram R, Sweni S, Thirumalaikalundusubramanian P. Hypothesis of snake and insect venoms against Human Immunodeficiency Virus: a review. *AIDS Res Ther*. 2009;6:25. doi:10.1186/1742-6405-6-25.
51. Alrajhi AA, Almohaizee A. Snake venom preparation for drug-resistant human immunodeficiency virus. *Ann Saudi Med*. 2008;28(4):292–3.
52. Meenakshisundaram R, Uma A, Subramanian PT. RE: Snake venom preparation for drug-resistant human immunodeficiency virus. *Ann Saudi Med*. 2009;29(2):159.
53. Reid P, Raymond L. Modified venom and venom components as anti-retroviral agents. 2005. Patent US20050255097 A1. <http://www.google.com/gt/patents/US20050255097>. Accessed 9 Dec 2016.
54. Miller KD, Austin BS. Pan-antiviral peptides for protein kinase inhibition. 2010. Patent US7807635 B1. <http://www.google.pl/patents/US7807635>. Accessed 9 Dec 2016.
55. Reid P, Raymond L. Modified venom and venom components as anti-retroviral agents. 2006. Patent US20060088858 A1. <https://www.google.com/patents/US20060088858>. Accessed 9 Dec 2016.
56. Zhang D, Li W, Jiang S. Peptide fusion inhibitors targeting the HIV-1 gp41: a patent review (2009–2014). *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(2):159–73. doi:10.1517/13543776.2014.987752.
57. Izidoro LF, Sobrinho JC, Mendes MM, Costa TR, Grabner AN, Rodrigues VM, et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *Biomed Res Int*. 2014;(2014): article ID 196754. doi:10.1155/2014/196754.
58. Moustafa IM, Foster S, Lyubimov AY, Vrieling A. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. *J Mol Biol*. 2006;364(5):991–1002. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.032.
59. Guo C, Liu S, Yao Y, Zhang Q, Sun MZ. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon*. 2012;60(3):302–11. doi:10.1016/j.toxicon.2012.05.001.
60. Zhang YJ, Wang JH, Lee WH, Wang Q, Liu H, Zheng YT, et al. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309(3):598–604.
61. Sant'Ana CD, Menaldo DL, Costa TR, Godoy H, Muller VD, Aquino VH, et al. Antiviral and antiparasite properties of an L-amino acid oxidase from the

- snake *Bothrops jararaca*: cloning and identification of a complete cDNA sequence. *Biochem Pharmacol.* 2008;76(2):279–88. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.003.
62. Villarrubia VG, Costa LA, Diez RA. Secreted phospholipases A₂ (sPLA₂): friends or foes? Are they actors in antibacterial and anti-HIV resistance? *Med Clin (Barc).* 2004;123(19):749–57 [Article in Spanish].
 63. Muller VD, Soares RO, dos Santos Jr NN, Trabuco AC, Cintra AC, Figueiredo LT, et al. Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. *PLoS One.* 2014;9(11):e112351. doi:10.1371/journal.pone.0112351.
 64. Costa LA, Villarrubia VG. Use of a phospholipase A₂ for the preparation of pharmaceutical and/or cosmetic compositions for the local and/or systematic treatment and/or prevention of diseases and/or processes caused by intra— and extracellular pathogens expressing membrane phospholipids. 2002. Patent US20070184046. <https://www.google.com/patents/US20070184046>. Accessed 9 Dec 2016.
 65. Cecilio AB, Caldas S, Oliveira RA, Santos AS, Richardson M, Naumann GB, et al. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A₂ from snake venom and their antiviral activities against Dengue virus. *Toxins (Basel).* 2013;5(10):1780–98. doi:10.3390/toxins5101780.
 66. Shivaji PG. Therapeutic alternatives from venoms and toxins. *Indian J Pharmacol.* 2007;39(6):260–4. doi:10.4103/0253-7613.3914368.
 67. Gomes A, Giri B, Saha A, Mishra R, Dasgupta SC, Debnath A, et al. Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian J Exp Biol.* 2007;45(7):579–93.
 68. Conlon JM. Host-defense peptides of the skin with therapeutic potential: From hagfish to human. *Peptides.* 2015;67:29–38. doi:10.1016/j.peptides.2015.03.005.
 69. Bergaoui I, Zairi A, Tangy F, Aouni M, Selmi B, Hani K. In vitro antiviral activity of dermaseptin S₄ and derivatives from amphibian skin against herpes simplex virus type 2. *J Med Virol.* 2013;85(2):272–81. doi:10.1002/jmv.23450.
 70. VanCompernelle SE, Taylor RJ, Oswald-Richter K, Jiang J, Youree BE, Bowie JH, et al. Antimicrobial peptides from amphibian skin potentially inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. *J Virol.* 2005;79(18):11598–606. doi:10.1128/JVI.79.18.11598-11606.
 71. Hirai Y, Yasuhara T, Yoshida H, Nakajima T, Fujino M, Kitada C. A new mast cell degranulating peptide “mastoparan” in the venom of *Vespa lewisii*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1979;27(8):1942–4.
 72. Cabrera MP, Alvares DS, Leite NB, de Souza BM, Palma MS, Riske KA, et al. New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: lytic activity and clustering observed with giant vesicles. *Langmuir.* 2011;27(17):10805–13. doi:10.1021/la202608r.
 73. Leite NB, da Costa LC, dos Santos AD, dos Santos Cabrera MP, de Souza BM, Palma MS, et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. *Amino Acids.* 2011;40(1):91–100. doi:10.1007/s00726-010-0511-9.
 74. Sample CJ, Hudak KE, Barefoot BE, Koci MD, Wanyonyi MS, Abraham S, et al. A mastoparan-derived peptide has broad-spectrum antiviral activity against enveloped viruses. *Peptides.* 2013;48:96–105. doi:10.1016/j.peptides.2013.07.014.
 75. Bachis A, Cruz MI, Mochetti I. M-tropic HIV envelope protein gp120 exhibits a different neuropathological profile than T-tropic gp120 in rat striatum. *Eur J Neurosci.* 2010;32(4):570–8. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07325.x.
 76. Fenard D, Lambeau G, Maurin T, Lefebvre JC, Doglio A. A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A₂ inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor. *Mol Pharmacol.* 2001;60(2):341–7.
 77. Mulder KC, Lima LA, Miranda VJ, Dias SC, Franco OL. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Front Microbiol.* 2013;4:321. doi:10.3389/fmicb.2013.00321.
 78. Wickline SA, Lanza G, Hood J. Nanoparticulate-based contraceptive/anti-HIV. Composition and methods. 2012. Patent US20120100186 A1. Washington University. <https://www.google.ch/patents/US20120100186>. Accessed 9 Dec 2016.
 79. Hood JL, Jallouk AP, Campbell N, Ratner L, Wickline SA. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antivir Ther.* 2013;18(1):95–103. doi:10.3851/IMP2346.
 80. Ratcliffe N, Azambuja P, Mello CB. Recent advances in developing insect natural products as potential modern day medicines. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014: article ID 904958. doi:10.1155/2014/904958.
 81. Volker E, Saermark T. Method and composition for the treatment of mammalian hiv infection. 1991. Patent WO1991008753 A1. <https://www.google.com/patents/WO1991008753A1?cl=en10>. Accessed 9 Dec 2016.
 82. Moreno M, Giralte E. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. *Toxins (Basel).* 2015;7(4):1126–50. doi:10.3390/toxins7041126.
 83. Baghian A, Jaynes J, Enright F, Kousoulas KG. An amphipathic alpha-helical synthetic peptide analogue of melittin inhibits herpes simplex virus-1 (HSV-1)—induced cell fusion and virus spread. *Peptides.* 1997;18(2):177–83.
 84. Wachinger M, Saermark T, Erle V. Influence of amphipathic peptides on the HIV-1 production in persistently infected T lymphoma cells. *FEBS Lett.* 1992;309(3):235–41.
 85. Lee DG, Park Y, Jin I, Hahm KS, Lee HH, Moon YH, et al. Structure-antiviral activity relationships of cecropin A-magainin 2 hybrid peptide and its analogues. *J Pept Sci.* 2004;10(5):298–303. doi:10.1002/psc.504.
 86. Kuczer M, Dziubasik K, Midak-Siewirska A, Zahorska R, Luczak M, Konopinska D. Studies of insect peptides alloferon, Any-GS and their analogues. Synthesis and antiherpes activity. *J Pept Sci.* 2010;16(4):186–9. doi:10.1002/psc.1219.
 87. Kuczer M, Czarniewska E, Majewska A, Rozanowska M, Rosinski G, Lisowski M. Novel analogs of alloferon: Synthesis, conformational studies, pro-apoptotic and antiviral activity. *Bioorg Chem.* 2016;66:12–20. doi:10.1016/j.bioorg.2016.03.002.
 88. Chernysh S, Kim SI, Bekker G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):12628–32. doi:10.1073/pnas.192301899.
 89. Chernysh S, Irina K, Irina A. Anti-tumor activity of immunomodulatory peptide alloferon-1 in mouse tumor transplantation model. *Int Immunopharmacol.* 2012;12(1):312–4. doi:10.1016/j.intimp.2011.10.016.
 90. Cheung RC, Ng TB, Wong JH. Marine peptides: Bioactivities and Applications. *Mar Drugs.* 2015;13(7):4006–43. doi:10.3390/md13074006.
 91. Migliolo L, Silva ON, Silva PA, Costa MP, Costa CR, Nolasco DO, et al. Structural and functional characterization of a multifunctional alanine-rich peptide analogue from *Pleuronectes americanus*. *PLoS One.* 2012;7(10):e47047. doi:10.1371/journal.pone.0047047.
 92. Teixeira LD, Silva ON, Migliolo L, Fensterseifer IC, Franco OL. In vivo antimicrobial evaluation of an alanine-rich peptide derived from *Pleuronectes americanus*. *Peptides.* 2013;42:144–8. doi:10.1016/j.peptides.2013.02.001.
 93. Aneiros A, Garateix A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;803(1):41–53. doi:10.1016/j.jchromb.2003.11.005.
 94. Lu Z, Van Wagoner RM, Harper MK, Baker HL, Hooper JN, Bewley CA, et al. Mirabamides E–H, HIV-inhibitory depsipeptides from the sponge *Stelletta clavosa*. *J Nat Prod.* 2011;74(2):185–93. doi:10.1021/np100613p.
 95. Plaza A, Gustchina E, Baker HL, Kelly M, Bewley CA. Mirabamides A–D, depsipeptides from the sponge *Siliquariaspongia mirabilis* that inhibit HIV-1 fusion. *J Nat Prod.* 2007;70(11):1753–60. doi:10.1021/np070306k.
 96. Zampella A, Sepe V, Luciano P, Bellotta F, Monti MC, D’Auria MV, et al. Homophymine A, an anti-HIV cyclodepsipeptide from the sponge *Homophymia* sp. *J Org Chem.* 2008;73(14):5319–27. doi:10.1021/jo800583b.
 97. Rinehart Jr KL, Gloer JB, Hughes Jr RG, Renis HE, McGovern JP, Swynenberg EB, et al. Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a caribbean tunicate. *Science.* 1981;212(4497):933–5.
 98. Weed SD, Stringfellow DA. Didemnins A and B. Effectiveness against cutaneous *Herpes simplex* virus in mice. *Antiviral Res.* 1983;3(4):269–74.
 99. Crampton SL, Adams EG, Kuentzel SL, Li LH, Badiner G, Bhuyan BK. Biochemical and cellular effects of didemnins A and B. *Cancer Res.* 1984;44(5):1796–801.
 100. Li LH, Timmins LG, Wallace TL, Krueger WC, Prairie MD, Im WB. Mechanism of action of didemnin B, a depsipeptide from the sea. *Cancer Lett.* 1984;23(3):279–88.
 101. Crews CM, Collins JL, Lane WS, Snapper ML, Schreiber SL. GTP—dependent binding of the antiproliferative agent didemnin to elongation factor 1 alpha. *J Biol Chem.* 1994;269(22):15411–4.
 102. Munro MH, Blunt JW, Dumdei EJ, Hickford SJ, Lill RE, Li S, et al. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J Biotechnol.* 1999;70(1–3):15–25.
 103. Rangel M, Falkenberg M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *J Coast Life Med.* 2015;3(6):421–8.
 104. Plaza A, Bifulco G, Masullo M, Lloyd JR, Keffer JL, Colin PL, et al. Mutremdamide A and koshikamides C–H, peptide inhibitors of HIV-1 entry from different *Theonella* species. *J Org Chem.* 2010;75(13):4344–55. doi:10.1021/jo100076g.
 105. Andjelic CD, Planelles V, Barrows LR. Characterizing the anti-HIV activity of Papuamide A. *Mar Drugs.* 2008;6(4):528–49. doi:10.3390/md20080027.
 106. Ford PW, Gustafson KR, McKee TC, Shigematsu N, Maurizi LK, Pannell LK, et al. Papuamides A – D, HIV-inhibitory and cytotoxic depsipeptides from the

- sponges *Theonella mirabilis* and *Theonella swinhoei* collected in Papua New Guinea. *J Amer Chem Soc.* 1999;121(25):5899–909. doi:10.1021/ja990582o.
107. Binz TM, Maffioli SI, Sosio M, Donadio S, Muller R. Insights into an unusual nonribosomal peptide synthetase biosynthesis: identification and characterization of the GE81112 biosynthetic gene cluster. *J Biol Chem.* 2010;285(43):32710–9. doi:10.1074/jbc.M110.146803.
 108. Plaza A, Bifulco G, Keffer JL, Lloyd JR, Baker HL, Bewley CA. Celebesides A–C and theopapuamides B–D, depsipeptides from an Indonesian sponge that inhibit HIV-1 entry. *J Org Chem.* 2009;74(2):504–12. doi:10.1021/jo802232u.
 109. Zampella A, D'Auria MV, Paloma LG, Casapullo A, Minale L, Debitus C, et al. Callipeltin A, an anti-HIV cyclic depsipeptide from the New Caledonian Lithistida sponge *Callipelta* sp. *J Amer Chem Soc.* 1996;118(26):6202–9. doi:10.1021/ja954287p.
 110. Oku N, Gustafson KR, Cartner LK, Wilson JA, Shigematsu N, Hess S, et al. Neamphamide A, a new HIV-inhibitory depsipeptide from the Papua New Guinea marine sponge *Neamphius huxleyi*. *J Nat Prod.* 2004;67(8):1407–11. doi:10.1021/np040003f.
 111. Rashid MA, Gustafson KR, Cartner LK, Shigematsu N, Pannell LK, Boyd MR. Microspinamide, a new HIV-inhibitory cyclic depsipeptide from the marine sponge *Sidonops microspinosa*. *J Nat Prod.* 2001;64(1):117–21.
 112. Tamamura H, Xu Y, Hattori T, Zhang X, Arakaki R, Kanbara K, et al. A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140. *Bioch Biophys Res Commun.* 1998;253(3):877–82. doi:10.1006/bbrc.1998.9871.
 113. Tziveleka LA, Vagias C, Roussis V. Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. *Curr Top Medic Chem.* 2003;3(13):1512–35.
 114. Reis RS. Panorama patentário dos medicamentos antirretrovirais no Brasil. PhD thesis. Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ; 2012. http://www.ie.ufrj.br/images/pos-graduacao/pped/defesas/05-Roberto_Reis.pdf.
 115. Albiol Matanic VC, Castilla V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;23(4):382–9. doi:10.1016/j.ijantimicag.2003.07.022.
 116. Yasin B, Pang M, Turner JS, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, et al. Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(3):187–94.
 117. Lorin C, Saidi H, Belaid A, Zairi A, Baleux F, Hocini H, et al. The antimicrobial peptide dermaseptin S₄ inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology.* 2005;334(2):264–75. doi:10.1016/j.virol.2005.02.002.
 118. Belaid A, Aouni M, Khelifa R, Trabelsi A, Jemmali M, Hani K. In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *J Med Virol.* 2002;66(2):229–34.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

