

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/03/2018.

BRUNO RAFAEL PEREIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-hRSV DA QUERCETINA E SEUS DERIVADOS
ACETILADOS**

ASSIS

2016

BRUNO RAFAEL PEREIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-hRSV DA QUERCETINA E SEUS DERIVADOS
ACETILADOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestrado Acadêmico em Biociências (Área de conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientadora: Dra. Karina Alves de Toledo

ASSIS
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

L864a Lopes, Bruno Rafael Pereira
Avaliação da atividade Anti-hRSV da quercetina e seus derivados
acetilados / Bruno Rafael Pereira Lopes. Assis, 2016.
60 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de
Assis – Universidade Estadual Paulista
Orientadora: Dra. Karina Alves de Toledo

1. Quercetina. 2. Vírus Sincicial Respiratório Humano. 3. Agentes
antivirais. I. Título.

CDD 615.72

BRUNO RAFAEL PEREIRA LOPES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-hRSV DA QUERCETINA E
SEUS DERIVADOS ACETILADOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras – UNESP para a obtenção do título de Mestrado Acadêmico em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Data da Aprovação: 16/03/2016

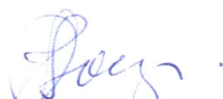
COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: PROFA. DRA. Karina Alves de Toledo - UNESP/Assis



Membros: PROFA. DRA. Valéria Marta Gomes do Nascimento - UNESP/Assis



PROFA. DRA. Fátima Pereira de Souza - UNESP/São José do Rio Preto

Dedico essa dissertação à

Minha família, minha orientadora e aos colegas de trabalho pela força e apoio nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sabedoria, paciência e por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas.

À minha família, pelo apoio incondicional, carinho e alegrias.

À minha orientadora, que sempre esteve atenta ao desenvolvimento do projeto, comemorando cada conquista obtida.

Aos colegas de trabalho, pela ótima convivência e auxílio imprescindível.

LOPES, B.R.P. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-hRSV DA QUERCETINA E SEUS DERIVADOS ACETILADOS.** 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências) Faculdade de Ciências e Letras de Assis - Universidade Estadual Paulista. Assis, 2016.

RESUMO

No mundo, estima-se que exista cerca de 12 milhões de casos graves e 3 milhões de casos muito graves de infecção do trato respiratório inferior em crianças anualmente. Dentre os agentes etiológicos destas infecções, o vírus sincicial respiratório humano (hRSV) é a principal causa de internações infantis em países desenvolvidos, agravando os casos de bronquiolite, pneumonia e infecções pulmonares obstrutivas crônicas em pessoas de todas as idades, principalmente crianças e idosos. Estudos preliminares demonstraram que a Quercetina possui ação virucida sobre hRSV, além de inibir sua replicação. Entretanto, não se tem conhecimento do quanto promissora é a atividade antiviral de Quercetina sobre o vírus hRSV ou mesmo se esta atividade poderia ser melhorada através de mudanças químicas em sua estrutura molecular. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer o índice de seletividade (IS) para Quercetina e seus derivados acetilados durante a infecção por hRSV através de ensaios *in vitro*. A análise de viabilidade celular através da adição do sal de MTT determinou os valores de CC50 para Quercetina na presença/ausência do vermelho de fenol (85 e 11,4 μM , respectivamente). Dentre as condições testadas, Quercetina apresentou atividade virucida (16-30% de proteção celular) sem apresentar efeitos no pré ou pós-tratamentos. Os valores de CC50 dos compostos derivados Q1 e Q2 foram 37,1 μM e 53,15 μM , respectivamente. O composto Q1 apresentou atividade anti-hRSV nos protocolos virucida e pós-tratamento (60-90%; 4-8 μM). O composto Q2 não apresentou atividade anti-hRSV relevante em nenhuma das condições testadas. A proteção celular apresentada pela Quercetina não possibilitou o cálculo de IS (CC50/CE50) o que nos sugere que este composto não seja um promissor agente anti-hRSV. Os índices de Seletividade calculados para o composto Q1 nos protocolos virucida e pós-tratamento foi de 9,27. O conjunto de resultados obtidos neste trabalho apresenta menor citotoxicidade e melhor performance anti-hRSV do composto Q1 em relação à Quercetina comercial. Estes dados nos estimulam a dar continuidade aos estudos do composto Q1 com o intuito de melhorarmos sua atividade antiviral e assim propormos um novo composto que seja efetivos na prevenção e/ou tratamento das infecções por hRSV.

Palavras-chave: QUERCETINA. hRSV. ANTIVIRAL. DERIVADOS ACETILADOS.

LOPES, B.R.P. **EVALUATE ANTI-hRSV ACTIVITY OF QUERCETIN AND ACETYLATED DERIVATIVES**. 2016. 60 f. Dissertation (Master's degree in biosciences) Faculdade de Ciências e Letras de Assis - Universidade Estadual Paulista. Assis, 2016.

ABSTRACT

Worldwide, is estimated that there are about 12 million serious cases and 3 million severe cases of lower respiratory tract infection in children every year. Among the etiological agents of these infections, respiratory syncytial virus (hRSV) is the leading cause of children's hospitalizations in developed countries, aggravating cases of bronchiolitis, pneumonia and chronic obstructive pulmonary infections in people of all ages, especially children and the elderly. Preliminary studies demonstrated that Quercetin has virucidal action on hRSV, and inhibits replication. However, we do not know how promising is the antiviral activity of Quercetin on the hRSV. The objectives of this work is to understand the action of Quercetin and some of its derivatives acetylated on the steps of the replicative cycle of hRSV, determining the selectivity index for each compound. The development of this project will assist in the search for effective compounds in the prevention and/or treatment of hRSV infections. In the cytotoxicity assays, Quercetin showed CC50 values variable depending on the presence/absence of phenol red (11.4 and 85 μM respectively). Among the concentrations tested Quercetin only showed a slight virucidal activity (16-30% concentration 5-10 μM). The CC50 values were derived compounds 37.1 μM for Q1 and Q2 to 53.15 μM . Compound Q1 showed anti-hRSV activity in virucidal and post-treatment protocol (60-90% at 4-8 μM). The Q2 compound showed no anti-hRSV relevant activity. The presence or absence of phenol red had great influence in determining the CC50 values of Quercetin (11.4 μM and 85 μM with phenol red). In addition, Quercetin showed little (virucidal protocol without phenol) or no anti-hRSV activity. Thus it has not been possible to establish the EC50 of Quercetin and determine its selectivity index (SI). The Q1 compound showed a greater CC50 value (37.1 μM) and relevant anti-hRSV activity in post-treatment and virucidal protocols (SI 9.27). Among the compounds tested, Q2 showed the highest value of CC50 (53.15 μM without phenol) however, had little or no anti-hRSV activity, making it impossible to determine their SI.

Keywords: QUERCETIN. hRSV. ANTIVIRAL. ACETYLATED DERIVED.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC-FN	Cromatografia em coluna de fase normal
CC50	Concentração que induz morte celular em 50% das células
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CE50	Concentração que impede a morte em 50% das células
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
FDA	Food and Drug Administration
hRSV	Vírus sincicial respiratório humano
IS	Índice de seletividade
MOI	" <i>Multiplicity of infection</i> " Multiplicidade da infecção
MTT	(1- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-Diphenylformazan Thiazolyl blue formazan
OMS	Organização mundial de saúde
Q1	Composto derivado acetilado penta-acetilado
Q2	Composto derivado acetilado tetra-acetilado
SFB	Soro fetal bovino
TCID50	" <i>50% tissue culture infective dose</i> " Suspensão viral que reduz a viabilidade em 50%

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. REVISÃO	09
1.1. hRSV.....	09
1.1.1. Genoma e Estrutura.....	09
1.1.2. Ciclo Reprodutivo.....	12
1.1.3. Patologia.....	13
1.1.4. Epidemiologia.....	14
1.1.5. Tratamento.....	15
1.2. Quercetina.....	16
1.3. Hipótese de Trabalho.....	18
1.4. Objetivos.....	20
2. ARTIGO	21
2.1. Resumo.....	22
2.2. Introdução.....	24
2.3. Resultados.....	25
2.4. Conclusões.....	32
2.5. Materiais e Métodos.....	33
2.5.1. Reagentes.....	33
2.5.2. Cultura Celular.....	33
2.5.3. Estoque Viral.....	34
2.5.4. Ensaio de Viabilidade Colorimétrico com MTT.....	34
2.5.5. Avaliação da Citotoxicidade.....	35

2.5.6. Avaliação da Ação Antiviral.....	35
2.5.7. Determinação do Índice de Seletividade.....	36
2.5.8. Análise dos Dados.....	37
2.6. Disponibilidade dos Dados.....	37
2.7. Contribuição dos Autores.....	37
2.8. Conflito de Interesses.....	38
2.9. Agradecimentos.....	38
2.10. Referências.....	38
2.11. Legenda das Figuras.....	40
2.12. Figuras.....	45
3. Conclusões Gerais.....	54
4. Referências da Revisão Bibliográfica.....	55

3. CONCLUSÕES GERAIS

A atividade anti-hRSV da quercetina e de seus derivados foi avaliada, concluindo-se que:

1. Empregando a técnica de viabilidade celular por ensaio de MTT, os valores de CC50 para Quercetina comercial foram determinados em 85 e 11,4 μM dependendo da presença ou ausência de vermelho de fenol nas culturas de células HEp-2;
2. Quercetina apresentou atividade virucida (16-30% de proteção celular) nas seguintes condições: concentrações de 1,25-10 μM , MOI 0,1 em meio de cultivo sem vermelho de fenol. Os protocolos de pré- ou pós-tratamentos não foram promissores em nenhuma das condições testadas.
3. Os compostos derivados de Quercetina tiveram seus valores de CC50 determinados em 37,1 μM (Q1) e 53,15 μM (Q2) sob células Hep-2 empregando-se a técnica de viabilidade celular por ensaio de MTT.
4. O composto Q1 apresentou atividade anti-hRSV nos protocolos virucida e pós-tratamento (60-90%) com valores de CE50 <4 μM , e portanto, Índice de Seletividade de 9,27. O composto Q2 não apresentou atividade anti-hRSV relevante em nenhuma das condições testadas.

4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Collins PL: **Respiratory syncytial virus and metapneumovirus.** *Fields virology* 2007:1601-1646.
2. Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H: **Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication.** *Journal of virology* 2005, **79**(22):13943-13952.
3. **Insights in the oxygenolysis mechanism of flavonoids by Quercetin 2,3-Dioxygenase.** *Eur Biophys J Biophys* 2005, **34**(6):736-736.
4. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL: **The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987, **84**(16):5625-5629.
5. Norrby E, Mufson MA, Sheshberadaran H: **Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus.** *Journal of general virology* 1986, **67**(12):2721-2729.
6. Botosso VF, Paolo MdA, Ueda M, Arruda E, Gilio AE, Vieira SE, Stewien KE, Peret TC, Jamal LF, de MC Pardini MI: **Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus.** *PLoS pathogens* 2009, **5**(1):e1000254.
7. Collins PL, Graham BS: **Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis.** *Journal of virology* 2008, **82**(5):2040-2055.
8. Lo MS, Brazas RM, Holtzman MJ: **Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness.** *Journal of virology* 2005, **79**(14):9315-9319.

9. Zhang W, Yang H, Kong X, Mohapatra S, San Juan-Vergara H, Hellermann G, Behera S, Singam R, Lockey RF, Mohapatra SS: **Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene.** *Nature medicine* 2005, **11**(1):56-62.
10. Spehner D, Drillien R, Howley PM: **The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein.** *Virology* 1997, **232**(2):260-268.
11. LENARD J: **Negative-strand virus M and retrovirus MA proteins: all in a family?** *Virology* 1996, **216**(2):289-298.
12. Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J: **Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells.** *Journal of General Virology* 2002, **83**(4):753-757.
13. Techaarpornkul S, Barretto N, Peeples ME: **Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene.** *Journal of virology* 2001, **75**(15):6825-6834.
14. Collins PL, Mottet G: **Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus.** *Journal of general virology* 1993, **74**(7):1445-1450.
15. Walsh EE, Hruska J: **Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein.** *Journal of virology* 1983, **47**(1):171-177.
16. Melero JA, Mas V: **The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals.** *Virus research* 2015, **209**:128-135.
17. Bukreyev A, Whitehead SS, Murphy BR, Collins PL: **Recombinant respiratory**

- syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse.** *Journal of virology* 1997, **71**(12):8973-8982.
18. Jin H, Zhou H, Cheng X, Tang R, Munoz M, Nguyen N: **Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated *in vitro* and in vivo.** *Virology* 2000, **273**(1):210-218.
 19. Karron RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML, Harris DO, Randolph VB, Udem SA, Murphy BR: **Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication *in vitro*: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997, **94**(25):13961-13966.
 20. Collins PL, Hill MG, Cristina J, Grosfeld H: **Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(1):81-85.
 21. Cartee TL, Wertz GW: **Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection.** *Journal of virology* 2001, **75**(24):12188-12197.
 22. Tiong-Yip CL, Aschenbrenner L, Johnson KD, McLaughlin RE, Fan J, Challa S, Xiong H, Yu Q: **Characterization of a respiratory syncytial virus L protein inhibitor.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014, **58**(7):3867-3873.
 23. Stec DS, Hill MG, Collins PL: **Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses.** *Virology* 1991, **183**(1):273-287.

24. Morin B, Kranzusch PJ, Rahmeh AA, Whelan SP: **The polymerase of negative-stranded RNA viruses**. *Current opinion in virology* 2013, **3**(2):103-110.
25. Tiwari PM, Eroglu E, Boyoglu-Barnum S, He Q, Willing GA, Vig K, Dennis VA, Singh SR: **Atomic force microscopic investigation of respiratory syncytial virus infection in HEp-2 cells**. *Journal of microscopy* 2014, **253**(1):31-41.
26. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ *et al*: **Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus**. *Nature immunology* 2000, **1**(5):398-401.
27. Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, Duan W, Mastrangelo P, Hegele RG: **Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus**. *Nature medicine* 2011, **17**(9):1132-1135.
28. García J, García-Barreno B, Vivo A, Melero JA: **Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein**. *Virology* 1993, **195**(1):243-247.
29. Bächli T, Howe C: **Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus**. *Journal of virology* 1973, **12**(5):1173-1180.
30. Rajan D, Gaston KA, McCracken CE, Erdman DD, Anderson LJ: **Response to rhinovirus infection by human airway epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells in an *in vitro* two-chamber tissue culture system**. *PloS one* 2013, **8**(6):e66600.
31. Hornsleth A, Loland L, Larsen LB: **Cytokines and chemokines in respiratory secretion and severity of disease in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection**. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan*

American Society for Clinical Virology 2001, **21**(2):163-170.

32. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ: **Respiratory syncytial virus--a comprehensive review**. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2013, **45**(3):331-379.
33. Mejias A, Ramilo O: **Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants**. *Biologics : targets & therapy* 2008, **2**(3):433-439.
34. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE: **Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults**. *New England Journal of Medicine* 2005, **352**(17):1749-1759.
35. Hall C, Walsh EE, Hruska JF, Betts RF, Hall WJ: **Ribavirin treatment of experimental respiratory syncytial viral infection: A controlled double-blind study in young adults**. *Jama* 1983, **249**(19):2666-2670.
36. Han LY, Wilson R, Slater S, Rutman A, Read RC, Snell NJ, Cole PJ: **In vitro and in vivo effects of ribavirin on human respiratory epithelium**. *Thorax* 1990, **45**(2):100-104.
37. Welliver RC: **Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection**. *The Journal of pediatrics* 2003, **143**(5 Suppl):S112-117.
38. Geskey JM, Thomas NJ, Brummel GL: **Palivizumab: a review of its use in the protection of high risk infants against respiratory syncytial virus (RSV)**. *Biologics : targets & therapy* 2007, **1**(1):33-43.
39. Choi Y, Mason CS, Jones LP, Crabtree J, Jorquera PA, Tripp RA: **Antibodies to the central conserved region of respiratory syncytial virus (RSV) G protein block RSV G protein CX3C-CX3CR1 binding and cross-neutralize RSV A and B**

- strains.** *Viral immunology* 2012, **25**(3):193-203.
40. Jorquera PA, Oakley KE, Powell TJ, Palath N, Boyd JG, Tripp RA: **Layer-By-Layer Nanoparticle Vaccines Carrying the G Protein CX3C Motif Protect against RSV Infection and Disease.** *Vaccines* 2015, **3**(4):829-849.
41. Snyder R: **RSV-IG (respigam).** *Neonatal network : NN* 1998, **17**(3):63-65.
42. Meissner HC, Rennels MB, Long SS, Pickering LK: **Immunoprophylaxis with RespiGam.** *Pediatrics* 2004, **113**(3 Pt 1):629.
43. Veerman M, Reuman P, Burchfield D, Sherman J: **Cost-effectiveness of RespiGam at a university teaching hospital.** *Pediatrics* 1997, **100**(1):160-161.
44. Frogel MP, Stewart DL, Hoopes M, Fernandes AW, Mahadevia PJ: **A systematic review of compliance with palivizumab administration for RSV immunoprophylaxis.** *Journal of managed care pharmacy : JMCP* 2010, **16**(1):46-58.