



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Marcelo Luiz Rubio

Estudo de potenciais inibidores de infecção causada por Vírus Sincicial
Respiratório em cultura de célula

São José do Rio Preto
2009

Marcelo Luiz Rubio

Estudo de potenciais inibidores de infecção causada por Vírus Sincicial
Respiratório em cultura de célula

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto
2009

Rubio, Marcelo Luiz.

Estudo de potenciais inibidores de infecção causada por Vírus Sincicial Respiratório em cultura de célula / Marcelo Luiz Rubio. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

61 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Fátima Pereira de Souza

Co-orientador: Paula Rahal

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Virologia molecular. 3. Infecção por RSV. 4. RSV (Virologia) – Inibição. 5. Inibição do RSV. 6. Glicosaminoglicanos. 7. Heparina. 8. Dextrana sulfatada. I. Souza, Fátima Pereira de. II. Rahal, Paula. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 578.2

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

MARCELO LUIZ RUBIO

**Estudo de potenciais inibidores de infecção causada por Vírus Sincicial
Respiratório em cultura de célula**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
Professora Doutora
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dr^a. Karina Alves de Toledo
UNESP – Botucatu

Dr^a. Paola Jocelan Provazzi Scaranzi
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 09 de Fevereiro de 2009.

AGRADECIMENTOS

À UNESP-IBILCE e a FEIS-UNESP por todo o aprendizado.

À Profª Drª Fátima Pereira de Souza pela orientação deste trabalho.

À Profª Drª Paula Rahal pela co-orientação e pela confiança em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey pela colaboração.

À FAPESP, a CAPES e a FUNDUNESP pelo apoio financeiro.

Aos professores doutores: Denise de Cerqueira Rossa Feres e Reinaldo Rossa Feres pelo incentivo em cursar Ciências Biológicas.

Aos integrantes do LEGO: Lenira, Jucimara, Paola, Marília, Paulinho, Erica, Carol Jardim, Carol Bonfim, Cíntia, Paulo, Lílian (Miuki), Lílian Pires, Fernanda, Valéria, André, Felipe (Kabação), e em especial a Marina por toda a ajuda, conselhos, apoio e amizade.

Aos meus eternos amigos da graduação que mesmo longe sempre ficarão na lembrança os momentos bons que passamos juntos. Gostaria de agradecer a duas pessoas em especial, que contribuíram muito para minha vida pessoal e que aconteça o que acontecer sempre guardarei-as no meu coração e que serão minhas eternas amigas: Ane e Ana Claudia. Obrigado por tudo.

Não poderia deixar de lembrar também dos meus grandes amigos conquistados na UNESP de Ilha Solteira que mesmo a longa distância sempre lembro deles e recordo os momentos bons que passamos juntos. Obrigado pelo apoio e pela amizade: André, Efrain, Raphael, Vinícius, Ludmila, Flávia, Lígia e outros que também não esquecerei.

Aos meus amigos de conversas, baladas, conselhos e companherismo: Diego, Marcela, Vanessa, Michele, Pedro, Priscila, Evelyn, Julia, Jennifer, Pierre, Emanuelle e Vitor. Valeu pelo apoio e conselhos.

Aos meus amigos e alunos do Colégio Adventista pela motivação em passar aquilo que eu sei. Torço por vocês e espero que vocês consigam atingir os seus objetivos. Se dedicarem e qualquer coisa estarei aqui. Obrigado.

Em especial gostaria de agradecer aos meus irmãos: Marcinho e Alexandre pela amizade e compreensão e saber que perto ou longe vocês sempre estarão no meu coração porque amizade igual a de vocês hoje em dia é difícil de conseguir, por isso quero dizer que sempre cultivarei essa nossa amizade porque vocês sempre na alegria ou na tristeza estiveram ao meu lado. Valeu. Amo vocês.

À minha família (nem todos), mas, aqueles que direta ou indiretamente torceram por mim não criticando mas sim apoiando, em especial: Minhas Avós, Minhas tias: Sueli, Aparecida, Elaine e Vera. Meus tios: Roberto, Ademir e Vladimir e meus primos: Tatiana, Patricia, Giovanna, Gabriel, Suzane, Daniele, Guilherme, Camila, Leonardo e Pedro Henrique. E também a Dora e o Valdecir que já são da minha família. Muito obrigado.

E é lógico que não poderia deixar de agradecer os meus grandes amores: Minha Mãe, Meu Pai, Meus irmãos: Vanessa e Juninho, e meus sobrinhos: Henrique e Beatriz que compartilham comigo tudo, tudo mesmo e amor é isso, é amar sem exigir nada em troca, é ajudar, é sofrer junto e rir depois, e ter onde quer que vá a certeza de que és feliz, muito feliz, extremamente feliz por que se ter um amor, às vezes dois, três e eu tenho todos vocês. Só consegui chegar aqui pela força que emana de vocês, amo todos vocês com tanta força e intensidade que acredito que não exista nada maior.

Agradeço a Deus pela dádiva da vida e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais e acolhedoras, por me dar amigos, uma família tão linda e vários amores.

Amo vocês.

RESUMO

O vírus sincicial respiratório (RSV), pertencente ao gênero *Pneumovirus* da família *Paramyxoviridae*, é um vírus envelopado com tamanho médio de 120 a 300nm, de simetria helicoidal, que apresenta um genoma de RNA fita simples não segmentado de polaridade negativa. Este genoma codifica 11 proteínas, dentre as quais as glicoproteínas de membrana que são responsáveis pela infectividade do vírus. A proteína F, em associação com a proteína G e SH, é responsável pela fusão da membrana viral à célula que será infectada, ou seja, esta proteína proporciona a entrada e instalação do vírus na célula. Conhecer a forma de interação das proteínas da membrana viral com a célula que será infectada é importante para propor um mecanismo de inibição deste processo de infecção viral. Existem evidências que os glicosaminoglicanos são potenciais inibidores da infecção causada por vários vírus. A hipótese é de que este processo de inibição ocorra devido à ligação dos glicosaminoglicanos às proteínas da membrana viral, mais especificamente na proteína G, que apresenta um domínio de ligação para heparina, impedindo desta forma, que o vírus se ligue na célula hospedeira e que inicie o processo de infecção. O objetivo deste trabalho foi verificar a atuação de glicosaminoglicanos como potenciais inibidores da infecção viral. Esta análise foi realizada por meio de experimento de cultivo de células Hep2 na presença dos glicosaminoglicanos heparina e dextrana sulfatada que foram inoculadas com o vírus sincicial respiratório do tipo A (RSVA) e analisados por meio das técnicas de PCR e Imunofluorescência Indireta. Os resultados mostraram que a heparina e a dextrana sulfatada apresentam efeito inibitório da infecção viral em cultivo de células Hep2.

Palavras-chave: Vírus Sincicial Respiratório, Inibição, Glicosaminoglicanos

ABSTRACT

The respiratory syncytial virus (RSV) is part of Pneumovirus genus of the Paramyxoviridae family, is an enveloped virus with average size of 120 to 300nm, helical symmetry, that presents a genome consisting of a single strand, no segmented, RNA negative. This genome codifies for 11 proteins including the membrane glycoproteins which are responsible for the infectivity of the virus. Protein F in association with protein G and SH is responsible for the fusion of the viral membrane with the cell that will be infected, that is, this protein provides the entrance and the virus to settle in the cell. To know the form of interaction of viral membrane proteins with the cell that will be infected is important to propose a mechanism to inhibit of this process of viral infection. Evidences exist that the glycosaminoglycans are potential inhibitors of the infection caused by some viruses. The hypothesis is that this process of inhibition occurs more specifically due to the interaction between glycosaminoglycans and the proteins of the viral membrane, more specifically in protein G, that presents a domain of linking for heparin, avoiding the virus to bind to the host cell and initiating the infection process. The aim of this work was to verify the performance of glycosaminoglycans as inhibitors of the viral infection. This analysis was accomplished through experiments of Hep2 cell culture in the presence of these glycosaminoglycans (heparin and dextran sulfate) that was inoculated with the respiratory syncytial virus type A (RSVA) and analyzed through the technique of PCR and Indirect Immunofluorescence. The results had shown that the heparin and the dextran sulfate presented an inhibitory effect of the viral infection in Hep2 cells culture.

Keywords: Respiratory Syncytial Virus, Inhibition, Glycosaminoglycans

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
1.1 EPIDEMIOLOGIA	3
1.2 CARACTERIZAÇÃO E MORFOLOGIA DO RSV	4
1.3 PROTEÍNAS TRANSMEMBRÂNICAS	7
1.3.1 Proteína F	7
1.3.2 Proteína G	9
1.3.3 Proteína SH	9
1.4 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	10
1.4.1 Heparina	10
1.4.2 Dextrana Sulfatada	13
1.5 INTERAÇÃO DA PROTEÍNA G COM POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	14
1.5.1 Proteína G e Heparina	14
1.5.2 Proteína G e Dextrana Sulfatada	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	20
3.1.1 Heparina	20
3.1.2 Dextrana Sulfatada	20
3.2 CULTURA DE CÉLULAS	20
3.2.1 Manutenção de linhagens celulares	20
3.3 Inoculação viral	22
3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	23
3.5 EXTRAÇÃO DE RNA	24
3.6 TRANSCRIÇÃO REVERSA	24
3.7 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA B-ACTINA	25
3.8 AMPLIFICAÇÃO	26
3.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	26
4. RESULTADOS	29
4.1 CONTROLE PARA A VERIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PCR	29
4.2 HEPARINA	30
4.2.1 Células tratadas com concentrações que variaram de 1 a 9µM	30
4.2.2 Vírus tratado com concentrações que variaram de 1 a 9µM	32
4.3 DEXTRANA SULFATADA	34
4.3.1 Células tratadas com concentrações que variaram de 1 a 9µM	34
4.3.2 Vírus tratado com concentrações que variaram de 1 a 9µM	35
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS	47

INTRODUÇÃO

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) infecta principalmente células epiteliais do trato respiratório causando infecções primárias que são em geral sintomáticas, com manifestações clínicas que variam de infecção aguda do trato respiratório, infecções na orelha média que progridem à otite aguda, pneumonia, bronquiolite severa, até um simples resfriado (OGRA, 2004). O indivíduo pode apresentar ainda sintomas tais como rinorréia e sibilância (ROCHA et al., 2007). Tem-se verificado como fatores de risco para doença respiratória: idade (lactentes jovens e idosos), aglomeração (lares com maior número de irmãos e creches); sexo masculino, desnutrição protéico-calórica, ausência de aleitamento materno e poluição ambiental (tabagismo materno e uso de lenha e gás dentro dos domicílios) (POST et al., 1992, MILLÁN et al., 1995). Em relação à evolução clínica desfavorável, os fatores mais fortemente associados ao pior prognóstico são as anormalidades anatômicas, metabólicas, imunológicas e genéticas (DENNY, 2001).

O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) é um dos principais causadores de doenças respiratórias em crianças (LOVATO et al., 2007). O RSV tem pico de incidência entre 2 e 7 meses de vida, com predomínio no inverno e primavera (ROCHA et al., 2007). Recém nascidos prematuros e indivíduos imunossuprimidos têm risco aumentado de morte durante a infecção pelo RSV. Estima-se que o RSV seja responsável por 3000 a 4000 mortes por ano, sendo assim, importante estudá-lo e caracterizar a epidemiologia molecular do mesmo (OGRA, 2004).

Introdução

Esse vírus embora seja sensível à temperatura, é recuperado após mais de uma hora em luvas contaminadas com secreção nasal infectada pelo vírus. Esta estabilidade hospitalar contribui para colocá-lo como um patógeno nosocomial (CARVALHO et al., 2007).

A replicação desse vírus é restrita a células epiteliais do trato respiratório onde induz a expressão de um conjunto de citocinas. Por esse motivo, o epitélio é considerado o local iniciador primário da inflamação pulmonar na infecção por RSV (ZHANG et al., 2001). Estudos epidemiológicos indicam que todas as faixas etárias apresentam infecção em frequência considerável por esse vírus, mas a maior incidência ocorre nos lactentes institucionalizados que não apresentam infecções prévias (98%) (STAAT, 2002). A infecção por vírus sincicial respiratório (RSV) em lactentes é uma das principais causas de internação durante o inverno (BORSOTTI et al., 2008).

Em média, 45% das crianças hospitalizadas por uma semana e 100% das hospitalizadas por um mês adquirem a infecção na vigência de surtos epidêmicos e aproximadamente metade da equipe hospitalar que trabalha com essas crianças também adquire a infecção, sendo que a forma mais importante de transmissão se dá por meio de partículas de secreção nasal, saliva e pela inoculação ou pelo contato com superfícies contaminadas (STAAT, 2002). O período de incubação entre a exposição e o aparecimento da doença é de 4 à 5 dias e a eliminação do vírus pode persistir por 1 à 3 semanas (BROOKS et al., 2000).

1.2 Caracterização e morfologia do RSV

O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) é um vírus envelopado de simetria helicoidal, com genoma de RNA fita simples de polaridade negativa, não segmentado, pertencente ao gênero *Pneumovirus* da família *Paramyxoviridae*, que inclui outros patógenos humanos tais como o vírus do sarampo e o vírus parainfluenza (MORTON, 2003).

Introdução

O envelope viral é composto por uma membrana plasmática derivada da bicamada lipídica contendo proteínas transmembrânicas virais (Figura 1). A RNA polimerase viral é encapsulada com o virion e transcreve o RNA genômico em mRNA (DUDAS & KARRON, 1998).

O RNA contém cerca de 15200 nucleotídeos e é transcrito em mRNAs poliadenilados monocistrônicos. O genoma viral (RSV) codifica 9 proteínas estruturais e 2 não estruturais (Figura 2). Dentre as proteínas estruturais estão as glicoproteínas de fusão (F), a glicoproteína de ligação (G) e a proteína SH que são essenciais para a entrada do vírus nas células epiteliais do trato respiratório. Estas proteínas são também importantes no desenvolvimento da resposta imune (OGRA, 2004).

A proteína F, em associação com a proteína G e SH, é responsável pela ligação do envelope do vírus à célula que será infectada, ou seja, esta proteína proporciona a entrada e instalação do vírus na célula hospedeira (LANGEDIJK et al., 1998).

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, a RNA polimerase viral transcreve o RNA e são sintetizados múltiplos mRNAs que, após a tradução originam as proteínas virais específicas. Das onze proteínas, duas são não estruturais (NS1 e NS2), três (N, P e L) estão associadas com o nucleocapsídeo e seis, estão associadas com o envelope, três das quais (F, G e SH) são transmembrânicas de superfície e três (M, M2-1 e M2-2) são proteínas de matriz (DUDAS & KARRON, 1998).

Introdução

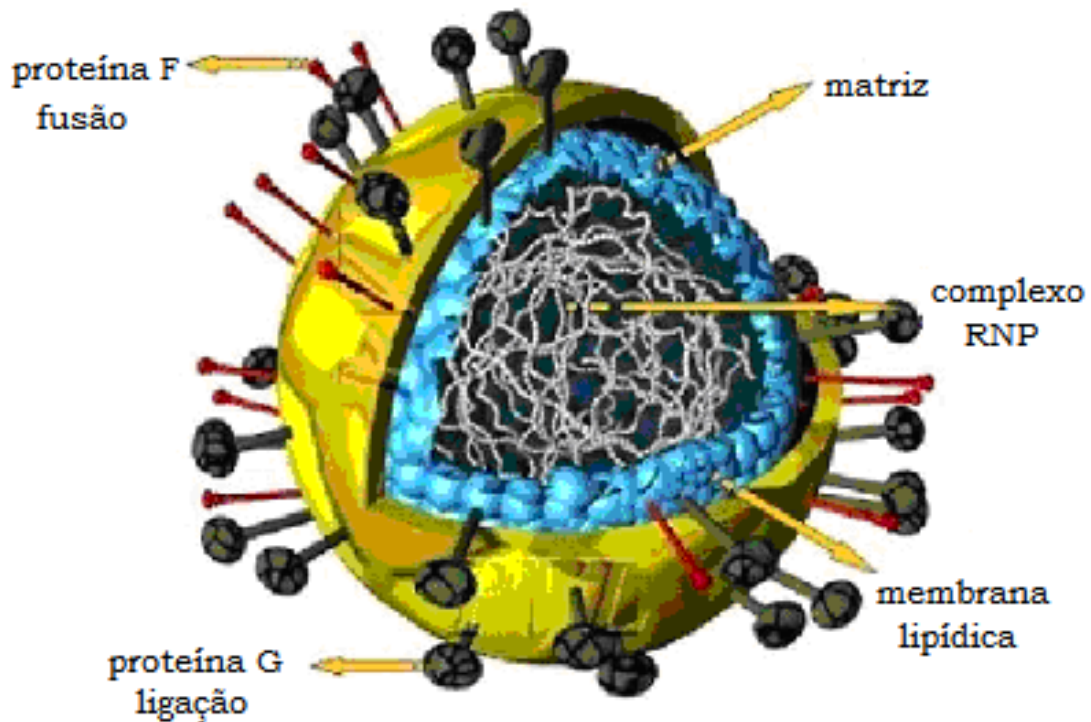


Figura-1: Representação esquemática da morfologia e constituição do RSV evidenciando a proteína F de fusão, a proteína G de ligação, a matriz, o complexo ribonucleocápsico e a membrana lipídica ([www.virology.net/ Big_Virology/BVRNApara.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNApara.html)).

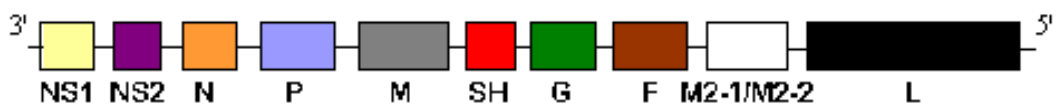


Figura-2: Representação esquemática do genoma do Vírus Sincicial Respiratório. NS1 e NS2 são proteínas não estruturais; N, P e L são proteínas que estão associadas ao nucleocapsídeo; F, G e SH são proteínas transmembrânicas de superfície e M, M2-1 e M2-2 são proteínas de matriz (www.micro.msb.le.ac.uk).

Introdução

Após a síntese das proteínas, o nucleocapsídeo helicoidal é montado e a proteína de matriz promove a interação da célula com o envelope sendo o vírus liberado por brotamento através da membrana celular (LEVINSON & JAWETZ, 1998).

As glicoproteínas (F) e (G) são importantes na infectividade e na patogênese do RSV, sendo um dos principais alvos para o desenvolvimento de vacina (ZHAO et al., 2000).

Os vírus RSV são classificados em dois grupos (A e B) com base na sua reatividade com anticorpos monoclonais. Estudos de seqüência dos genes da nucleoproteína N, da fosfoproteína P, da proteína hidrofóbica SH e da proteína de ligação G têm confirmado essa divisão em grupos A e B, e identificado também outras variantes ou linhagens dentro de cada um dos grupos (PERET et al., 1998, ROCA et al., 2001).

1.3 Proteínas Transmembrânicas

1.3.1 Proteína F

A proteína F é uma das proteínas de membrana que apresenta papel importante para a replicação viral *in vitro* e *in vivo*. Além do mais, ela possui muitos aspectos característicos semelhantes com proteínas homólogas de outros Paramyxovirus (MATHEWS et al., 2000). Essa proteína é classificada como uma glicoproteína do tipo I por ser uma proteína de envelope que contém coiled-coils, como as demais proteínas de fusão dos Paramyxovirus e a glicoproteína 160 do HIV (gp160) entre outras glicoproteínas (DIMITROV, 2004).

A proteína F é sintetizada como um precursor inativo (F0) de 574 aminoácidos e peso molecular de 67 kDa. O precursor F0 é clivado durante o transporte para a superfície da célula por proteases furina-like em dois polipeptídeos, F1 e F2, ligados por uma ponte de dissulfeto, sendo que o polipeptídeo F2 é proveniente da extremidade N-terminal e o polipeptídeo F1 é proveniente da extremidade C-terminal de

Introdução

F0 (GONZÁLES-REYES et al., 2001). Esse processamento proteolítico ocorre em dois sítios distintos que são separados por 27 aminoácidos (RUIZ-ARGUELLO et al., 2002). A clivagem em ambos os sítios é requerida para a aquisição do potencial de fusão de membrana da proteína F. Estudos em microscopia eletrônica mostraram que após a clivagem dos dois sítios ocorre uma mudança conformacional na proteína que é importante para a concretização do processo de infecção (GONZÁLES-REYES et al., 2001). Além dessa, outras mudanças conformacionais ocorrem durante a ligação e a fusão do vírus à célula hospedeira (ZHU et al., 2003). Com isso, as seqüências de partes internas da proteína, capazes de desestabilizar a membrana da célula hospedeira, são externalizadas (DIMITROV, 2004).

Há evidências de que interações da proteína F com proteoglicanos heparan-sulfato (HSPG) facilitam a ligação e a entrada do vírus na célula hospedeira, o que mostra que os glicosaminoglicanos (GAGs) da superfície da célula podem representar um tipo de receptor para RSV (SHMIDT et al., 2004). Após a ligação com o receptor, a proteína é marcada por mudanças conformacionais que direcionam o processo de entrada do vírus na célula hospedeira (DIMITROV et al., 2004).

Introdução

1.3.2 Proteína G

A proteína G é uma das três glicoproteínas encontradas na superfície viral, e é sintetizada como uma proteína nuclear de 298 aminoácidos. Ela apresenta características incomuns comparadas a outras glicoproteínas do Paramyxovirus (BOURGEOIS, 1998).

A proteína G é sintetizada como um precursor de 36kDa que é modificado pela adição de açúcares na região N-terminal originando um complexo intermediário de 45kDa. Estes açúcares são convertidos para tipos complexos e estão ligados ao grupo dos açúcares que são adicionados para produzir a molécula madura de aproximadamente 90kDa. Esta proteína apresenta altos índices dos aminoácidos serina, treonina e prolina. (BOURGEOIS, 1998; MELERO, 2004).

A glicoproteína G é produzida como uma proteína transmembrânica do tipo II, G_m, que apresenta uma região hidrofóbica insolúvel e como uma proteína solúvel, G_s, que é secretada pelas células infectadas. A proteína G é uma proteína responsável por mediar a maioria das interações entre o vírus sincicial respiratório e as células alvo ligando-se aos proteoglicanos da superfície celular, já que a proteína G apresenta um domínio de ligação para a heparina (proteoglicanos). Este domínio está representado por regiões ricas em aminoácidos básicos, ou seja, carregadas positivamente, que se ligam às cargas negativas da heparina (MELERO, 2004).

1.3.3 Proteína SH

Outra proteína, nomeada SH, é uma glicoproteína hidrofóbica encontrada na superfície viral, e sua função é desconhecida. Porém existem algumas especulações de que a proteína SH parece mediar a fusão da proteína F com a membrana (BOURGEOIS, 1998).

Introdução

Estudos baseados na expressão recombinante das proteínas F, G e SH, mostraram que apenas a coexpressão das proteínas F e G não resultaram na fusão celular, enquanto a coexpressão das proteínas F e SH resultaram na indução de significativa fusão celular em cultura de células. Isto sugere que a proteína SH tem importância na formação do sincício juntamente com a proteína F (HEMINWAY et al, 1994). Outro fator que corrobora esse estudo é que a proteína SH é expressa em altos níveis na superfície das células infectadas, mas é incorporada ineficientemente na partícula viral (RUIZ-ARGUELLO et al., 2002).

1.4 Polissacarídeos Sulfatados

Polissacarídeos sulfatados e polissacarídeos modificados (com grupos hidroxilas convertidos à grupos sulfato com diferentes graus de substituição) solúveis em água têm proporcionado um grande número de aplicações no campo biomédico e farmacêutico (CRESCENZI, 1994). Estudos com estes polissacarídeos mostram que esses sistemas podem ser usados, por exemplo, como modificadores de viscosidade, matrizes para imobilização de enzimas e drogas, como materiais que servem como suporte para cromatografia hidrofóbica e como agente terapêutico no tratamento de pacientes com trombose e em pacientes com risco de desenvolvê-la (LONGHI, 2001). Entre os polissacarídeos modificados com utilizações farmacêuticas a heparina e a dextrana têm sido os mais estudados (LU et al., 1995).

1.4.1 Heparina

Descoberto acidentalmente em 1916 por um estudante de medicina chamado Jay Mclean, esse glicosaminoglicano tem sido utilizado há quase 70 anos, e é mais conhecido por suas propriedades como agente anticoagulante e antitrombótico (PAVÃO, 2002). Trata-se de um importante agente terapêutico no tratamento de pacientes com trombose e em pacientes com risco de desenvolvê-la (LONGHI, 2001).

Introdução

Estruturalmente, as heparinas são glicosaminoglicanos sulfatados de peso molecular variável, compostos de unidades de ácido idurônico e glucosamina, que se alternam unidas por ligações glicosídicas (VOET, 1995; BOURGEOIS, 1998; VACCARI et al., 2003). A heparina apresenta uma relação de 2,5 grupos sulfatados (SO_3^-) para 1 grupo carboxílico (COO^-) por unidade dissacarídica (VOET, 1995; FOSSEY, 2003). Estes dois grupos, carboxila e sulfato, desempenham papel importante na formação de proteoglicanos e na ligação de ligantes carregados, como por exemplo, proteínas e íons bivalentes (CRESCENZI et al., 1989). A fórmula estrutural de um dissacarídeo da heparina pode ser observada na Figura 3.

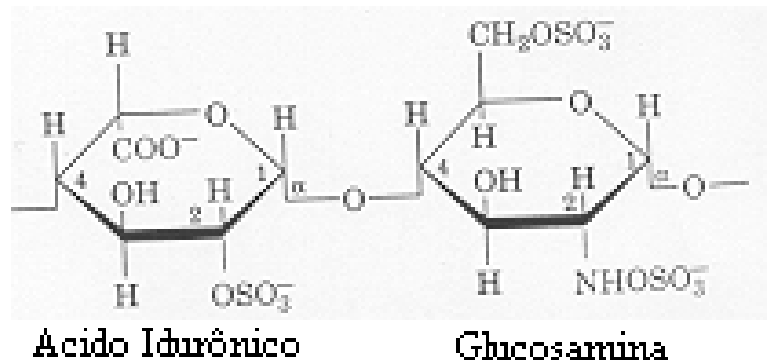


Figura-3: Representação da unidade dissacarídica da heparina (modificado de VOET, 1995).

Sob o ponto de vista químico a heparina é um glicosaminoglicano sulfatado com grande quantidade de cargas elétricas; constitui-se no ácido macromolecular mais forte existente no organismo e assim pode se ligar a resíduos de aminoácidos básicos de proteínas. Pode ser distinguida de outros polissacarídeos pela sua extrema acidez, decorrente da presença de radicais sulfatados (SO_3^-) e do grupo carboxílico (COO^-) na sua molécula (CASU, 1989). O polímero apresenta micro-heterogeneidade estrutural devido a sulfatação e a acetilação variáveis (MULLOY, 1996).

Introdução

As heparinas são solúveis em água e são metabolizadas pelo fígado, possuindo meia vida entre 90 minutos e 2 horas que pode ser afetada por alterações do fluxo sanguíneo hepático, metabolismo e hipotermia (26°C a 28°C) (BARROSO, 2002).

A heparina produzida pelo nosso próprio organismo é sintetizada pelos mastócitos (CATANI et al., 2001), e não tem função bem esclarecida ainda. Admite-se que atue no mecanismo de defesa imunológica contra infecções bacterianas, na geração de neocapilares e no metabolismo de lipídeos (GRAVLEE et al., 1988; OLIVERCRONA et al., 1989).

Os mastócitos são definidos por conterem grânulos em seu citoplasma que são marcados com corantes básicos que indicam a presença de glicosaminoglicanos sulfatados. Os mastócitos contêm grandes quantidades de heparina localizadas em seus grânulos intracelulares. Estudos mostram que os glicosaminoglicanos sulfatados são os maiores polissacarídeos sintetizados pelos mastócitos da mucosa intestinal de camundongos. (OLIANI et al., 1997)

A molécula de heparina, utilizada na área farmacêutica, é extraída de tecidos altamente vascularizados como a mucosa intestinal de suínos ou de células pulmonares de bovinos, com ação anticoagulante e atua na prevenção de trombose (BARROWCLIFFE, 1989). Durante isolamento, as cadeias glicosaminoglicanas tornam-se levemente degradadas produzindo mistura heterogênea de fragmentos com massa molecular entre 3.000 e 30.000 Da (VACCARI et al., 2003).

A interação da heparina com a antitrombina desempenha um papel importante nos mecanismos de regulação da coagulação. Estudos da estrutura cristalográfica do complexo antitrombina-heparina indicam que algumas regiões de contato dessa proteína apresentam um grande número de resíduos básicos. Estes resultados sugerem que a interação eletrostática entre grupos básicos da proteína e grupos ácidos do polissacarídeo desempenha um papel fundamental no reconhecimento molecular entre antitrombina e heparina (FOSSEY, 2003).

Introdução

Apesar de ser amplamente utilizada no tratamento de trombozes a heparina tem vários efeitos colaterais. Além disso, o custo da extração da heparina é mais elevado do que o da dextrana, pois a heparina é extraída da mucosa intestinal de suíno enquanto uma das fontes mais usual de extração da dextrana é a partir de uma bactéria presente na cana-de-açúcar (YAMADA et al., 1997).

1.4.2 Dextrana Sulfatada

A estrutura primária da dextrana é composta de resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 6$) formando uma cadeia longa e flexível, apresentando 2 grupos sulfatos (SO_3^-) por unidade dissacarídica (Figura-4) (JEANES, 1996).

A dextrana é um polissacarídeo de alto peso molecular produzido a partir da sacarose por várias bactérias, mas somente *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum* são usadas para propósito comercial (WITVROUW & DE CLERQ, 1997).

A dextrana sofre um processo de modificação e recebe grupos sulfatos no lugar dos grupos hidroxilas, o que permite a sua sulfatação. A possibilidade de modificação da estrutura da dextrana deve-se, sobretudo, à presença dos grupos hidroxílicos (ELAMAK et al., 2000).

A conversão ou modificação é comumente definida como “grau de substituição” (α), expresso como número médio de substituintes por resíduo, e como cada monossacarídeo da estrutura possui três grupos hidroxílicos livres, o grau de substituição (α) pode variar de zero a três e a dextrana passa a ser então sulfatada. A modificação de dextrana com grupos carregados é feita em geral por meio de reações específicas como a carboximetilação (CHAUBET et al., 1995) ou sulfatação (ELAMAK et al., 2000).

A dextrana sulfatada foi estudada para agir como substituinte da heparina no tratamento de trombose por ter características físico-químicas semelhantes e menor efeito colateral, sendo também

Introdução

utilizada em ensaios de inibição da atividade viral do HIV (CRESCENZI et al., 1989; YAMADA et al., 1997). Sua utilização no campo médico-farmacêutico inclui a aplicação em procedimentos que envolvem transfusão de sangue (FISHER et al., 1985), e sua função tem sido objeto de vários estudos pelo fato da escolha de grupos apropriados poder atrasar a coagulação do plasma (KRENTSEL et al., 1997).

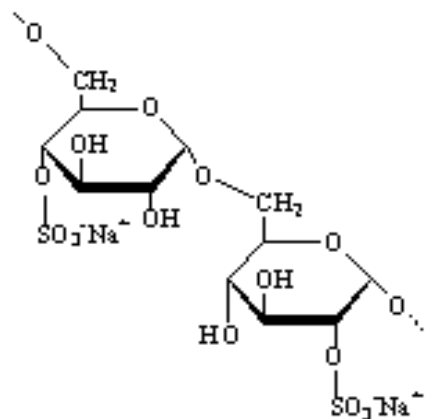


Figura-4: Representação da unidade dissacarídica da Dextrana (DONOSO, 2003).

1.5 Interação da Proteína G com Polissacarídeos Sulfatados

1.5.1 Proteína G e Heparina

Muitos vírus, incluindo herpesvírus (FLYNN, 1995), os vírus da imunodeficiência humana, os *Flavivírus*, os *Picornavírus* e os *Alphavírus*, utilizam a heparina sulfatada para mediar o ataque e a infecção das células alvo (FELDMAN, 1999).

Estudos mostraram que o RSV poderia ligar-se a heparina, enquanto nenhum receptor específico foi descrito para reconhecer a glicoproteína G (KRUSAT, 1997). *In vivo*, a heparina é encontrada primariamente nos grânulos de mastócitos e basófilos, entretanto um composto similar a heparina

Introdução

sulfatada é encontrado também na superfície da maioria dos tipos celulares de mamíferos e na matriz extracelular (FELDMAN, 1999).

A heparina liga-se a proteína G por meio de interações eletrostáticas. Esta ligação é gerada entre as cargas negativas dos grupos sulfatos da heparina e as cargas positivas dos aminoácidos das proteínas. Esta ligação ocorre dentro do domínio de ligação da heparina contido na proteína G (HBD), (CARDIN, 1989, FLYNN, 1995, TRYBALA, 1996).

O domínio de ligação da proteína G contém conjuntos de aminoácidos positivamente carregados ($^{180}\text{P} - \text{K}^{233}$) correspondente à região imunodominante da proteína. Postulou-se então que as interações entre o RSV e a heparina estariam mediadas nesta região imunodominante da proteína G. Entretanto, não houve nenhuma evidência experimental para corroborar esta suposição (KRUSAT, 1997).

Existem alguns experimentos descritos na literatura em que inibidores moleculares ou peptídeos glicosilados foram utilizados e a infectividade viral foi reduzida, sugerindo assim que os inibidores glicosilados reduzem a infectividade viral. Os polissacarídeos sulfatados, incluindo a heparina, foram utilizados para inibir o efeito citopático do RSV, e sugeriu-se que estes inibidores interferem na fusão do vírus com a célula (FELDMAN, 1999).

1.5.2 Proteína G e Dextrana Sulfatada

As moléculas polianiônicas grandes, tais como polissacarídeos sulfatados (incluindo dextrana sulfatada e heparina solúvel), polímeros polianiônicos sintéticos e as proteínas negativamente carregadas foram utilizados para inibirem amplamente diversos vírus envelopados. Foi relatado recentemente que a carga negativa líquida do peptídeo é um fator determinante para sua atividade antiviral e que ele, como outros polianiônicos, inibe o acesso do vírus à célula hospedeira. Experimentos de citometria de fluxo mostraram

Introdução

que a dextrana inibe a ligação do vírus às células à temperatura de 4°C nas mesmas concentrações eficazes que impedem a infectividade viral (BUDGE, 2004).

Interessantemente, as experiências de adição de glicosaminoglicanos em intervalos de tempos em culturas de células infectadas com vírus, mostraram que a heparina solúvel pode também inibir a infectividade de vírus quando pré-ligada às células a 4°C, este resultado também foi observado com a dextrana sulfatada. Esta experiência sugere um papel potencial dos glicosaminoglicanos na inibição da infecção causada por RSV. Experimentos de neutralização com vírus recombinantes e dextrana sulfatada mostraram atividades antivirais reduzidas na ausência de glicoproteína G de RSV, confirmando que os glicosaminoglicanos se ligam a proteína G (BUDGE, 2004).

OBJETIVOS

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi avaliar o efeito de glicosaminoglicanos (heparina e dextrana sulfatada) como potenciais inibidores de infecção causada por Vírus Sincicial Respiratório do tipo A em cultura de célula Hep2.

Os objetivos específicos realizados foram:

1- Avaliar por meio das técnicas de PCR e Imunofluorescência Indireta se houve infecção viral e determinar a concentração mínima de heparina ou dextrana sulfatada suficiente para inibir a infecção viral, utilizando-se concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 μ M;

2- Verificar por meio das técnicas de PCR e Imunofluorescência Indireta, entre os glicosaminoglicanos (heparina ou dextrana sulfatada), qual seria o mais eficiente no processo de inibição da infecção pelo RSV em cultura de célula;

3- Verificar por meio das técnicas de PCR e Imunofluorescência Indireta se a eficiência na prevenção da infecção por RSV seria mais eficaz quando as células fossem tratadas com os glicosaminoglicanos antes da inoculação viral ou se a eficiência seria maior quando o vírus fosse tratado e não a célula antes do processo de inoculação.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados duas vezes.

3.1 Polissacarídeos Sulfatados

3.1.1 Heparina

Amostras do glicosaminoglicano heparina de procedência *Sigma Co* de massa molecular 12.000 Da, com uma relação de 2,5 grupos sulfatados para 1 grupo carboxílico por unidade dissacarídica, foram utilizadas em concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 μ M.

3.1.2 Dextrana Sulfatada

As amostras do polissacarídeo sulfatado dextrana utilizadas em concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 μ M, apresentam massa molecular de 8.000 Da de procedência *Sigma Co*.

3.2 Cultura de células

3.2.1 Manutenção de linhagens celulares

As amostras de células Hep2 (*Human Epithelial Cells*), originárias de carcinoma de laringe estocadas em nitrogênio líquido, foram expostas à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos. Depois desta etapa foi adicionado 1ml destas células e 4 ml de meio completo (DEMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 10mg/ml de penicilina, 50mg/ml de sulfato de gentamicina, 10mM dos aminoácidos não essenciais e 100mM de piruvato de sódio em garrafas de 25 cm², e mantidas a 37°C em estufa sob atmosfera de 5% de CO₂. O meio foi trocado após 48 horas.

Material e Métodos

Quando a cultura tornou-se confluenta (tapete celular completo), o meio foi desprezado e depois o tapete celular foi lavado com PBS (tampão fosfato salino) 1x, pH 7,0. Em seguida foi adicionada à garrafa 2ml de tripsina-EDTA (*Cultilab*). Nesta etapa movimentou-se suavemente a garrafa de 30 a 60 segundos por inversão e a mesma foi mantida em estufa a 37°C por aproximadamente 10 minutos, quando foi observado o descolamento das células.

A seguir as células foram ressuspensas em 10 ml de meio essencial contendo 10% de soro fetal bovino, 10mg/ml de penicilina e 50mg/ml de sulfato de gentamicina, 10mM de aminoácido não essencial e 100mM de piruvato de sódio, homogeneizando bem a garrafa e adicionou-se mais 10ml de meio. Este conteúdo foi distribuído em placas (Figura-5) que foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 48 horas até que as células atingissem semi-confluência (tapete celular quase completo), estando prontas para a inoculação do vírus.






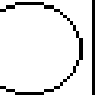
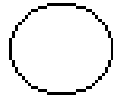




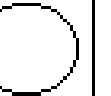





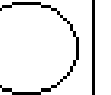





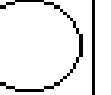
	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

Figura-5: Esquema da placa utilizada para cultivo celular.

Material e Métodos

3.3 Inoculação viral

No referido experimento foram realizados dois tipos de inoculações. Na primeira placa cada “well” (poço) contendo células Hep2 ao atingirem semi-confluência teve o meio desprezado e o tapete celular lavado duas vezes com 100µl de tampão PBS 1X pH 7,0. Em seguida, as células de cada “well” foram imersas em 200µl de solução de polissacarídeos sulfatados (heparina e dextrana sulfatada) nas concentrações que variaram de 1 a 9 µM e depois de meia hora foi realizada a inoculação viral com 15µl de vírus RSV do tipo A (por “well”), este inóculo foi espalhado uniformemente sobre o tapete celular para que ocorresse a adsorção viral. Na segunda placa, as amostras virais (15µl de RSVA) foram submetidas a 200µl de soluções destes polissacarídeos sulfatados em concentrações que variaram de 1 a 9 µM para cada “well” e depois de meia hora, essas soluções (polissacarídeo e RSVA) foram adicionadas a cada “well” da cultura celular, novamente o inóculo foi espalhado uniformemente para que ocorresse a adsorção viral. Este experimento foi realizado utilizando heparina e dextrana sulfatada.

Nesse experimento foram utilizados um controle negativo e um positivo, sendo que no controle negativo as células não foram inoculadas com o RSVA e nem receberam solução de polissacarídeos (heparina e dextrana sulfatada), enquanto no controle positivo foi inoculado 15µl de RSVA e não foi adicionada nenhuma solução de polissacarídeo sulfatado. Depois de cada inoculação foram adicionados 500µl de meio de manutenção (MEM 2%) enriquecido com 2% de soro fetal bovino em cada “well” da placa. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Estas culturas foram observadas diariamente, até o surgimento do efeito citopático (4 dias depois da inoculação).

Os experimentos foram realizados de maneira que um “well” apresentasse cultura celular e o outro “well” ficasse vazio na placa, como representado na Figura-6.

Material e Métodos

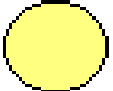








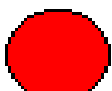

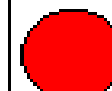




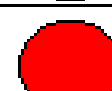




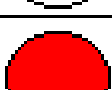

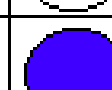
	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

Figura-6: Esquema ilustrativo da montagem do experimento, (amarelo) = controle negativo, (vermelho) = diferentes concentrações dos polissacarídeos sulfatados e (azul) = controle positivo.

3.4 Preparação das amostras

Depois de 4 dias da inoculação, as células de cada “well” foram raspadas e para 250µl de amostra foram adicionados 750µl de Trizol-LS (*GIBCO*) e estocadas em freezer a -80°C para posterior extração de RNA. Os 450µl do material restante foram utilizados para a preparação das lâminas de imunofluorescência.

Material e Métodos

3.5 Extração de RNA

Nas alíquotas de cada amostra contendo Trizol-LS foram adicionados 200µl de clorofórmio puro (*Merck*). As amostras foram então homogeneizadas e refrigeradas em gelo por 5 minutos. O material foi centrifugado a 12000 rpm (Centrifuge 5415R – Eppendorf) por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo RNA foi transferido para os tubos que continham 400µl de isopropanol gelado e então, homogeneizados por 5 segundos, refrigerados em gelo por 15 minutos e centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados aos tubos 800µl de etanol 75% gelado (*Merck*), seguido de uma centrifugação a 8000 rpm por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o “pellet”, após secagem, ressuspensão em 12,5µl de solvente contendo 12,375µl de água tratada com DEPC e 0,125µl de RNase OUT (*Invitrogen*) por amostra.

3.6 Transcrição Reversa

O cDNA foi sintetizado utilizando-se 12,5µl de RNA total ao qual foi adicionado 12,5µl de “Mix” contendo 2,5µl de RT Tampão, 2,5µl Primer Randômico, 1µl dNTP, 1,25µl de Transcriptase Reversa Multiscribe (*Applied*) e 5,25µl de água DEPC para cada amostra. Em seguida, o material foi levado ao termociclador nos seguintes ciclos: a 25°C por 10 minutos, seguido a 37°C por 2 horas e foi mantido à temperatura de 4°C por curto intervalo de tempo.

Material e Métodos

3.7 Amplificação do gene da β -actina

O cDNA obtido dos experimentos foram utilizados para a realização da PCR do gene constitutivo, sendo o gene utilizado o da β -actina, o qual serviu de controle para a verificação da inibição da PCR.

As reações foram realizadas em 12,5 μ l para cada amostra, utilizando 0,5 μ l de cDNA, 0,10 μ l da enzima Taq DNA polimerase (5U/ μ l), 2,10 μ l de dNTPs mix (1,25mM), 1,25 μ l Tampão (10X), 0,375 μ l de MgCl₂ (50mM), 0,50 μ l dos *primers* (10 μ M) e 7,2 μ l de água DEPC.

A reação compreendeu uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C, para o anelamento dos iniciadores, e 1 minuto a 72°C, para extensão das cadeias, além de 7 minutos a 72°C, para a extensão final.

Após a reação, o produto da reação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1%, para verificar a amplificação de um fragmento de 613pb referente ao gene β -actina. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

As seqüências de bases dos iniciadores utilizados para amplificação do fragmento de 613pb do gene β -ACTINA estão descritas a seguir:

5' GGCATCGTGATGGACTCC G 3'

3' GCTGGAAGGTGGACAGCG 5'

Material e Métodos

3.8 Amplificação

Para a verificação do efeito dos glicosaminoglicanos na prevenção da infecção pelo RSV foram realizadas reações de PCR (Reação de polimerização em cadeia), visando amplificar um fragmento de 650pb correspondente à posição 504 do gene da proteína G até a posição 186 do gene da proteína F do RSV. As reações foram realizadas em 25µL, contendo 2,5 µl de cDNA diluído em 22,5µl de solução contendo para cada amostra 16µl de água DEPC, 2,5µl de tampão (10X), 0,5µl dNTP 10µM, 0,75µl MgCl²⁺ 50Mm, 1,25µl *primer* FV- (10pmol) 5'-YCAATTTGAAGTGTTCAACTT-3', (PERET et al., 2000), 1,25µl *primer* GAB+(10pmol) 5' CAACTCCATTGTTATTTGCC-3' (PERET et al., 1998) e 0,25 µl de *Taq DNA Polimerase*. Em todos os experimentos, um dos tubos não recebeu DNA, tal procedimento foi usado como controle negativo da amplificação (branco).

A reação compreendeu uma etapa inicial de 5 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, além de 7 minutos a 72°C. Após estes ciclos as amostras foram submetidas a 4°C por curto intervalo de tempo. Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio e submetidos à transiluminação UV.

3.9 Imunofluorescência Indireta

A investigação da presença do vírus foi realizada também por Imunofluorescência Indireta utilizando o kit da *Chemicon International Inc*. As alíquotas de cultura de célula foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos e lavadas com PBS pH 7,2 por 2 vezes. O “pellet” foi então ressuspensão em PBS e depositado em lâmina. As lâminas foram secas em fluxo laminar e fixadas com acetona a 4°C por 10 minutos. A seguir, as lâminas foram embrulhadas em papel absorvente e papel alumínio e armazenadas a -20°C, por até quatro dias.

Material e Métodos

Após estabilizar as lâminas à temperatura ambiente, foi realizada a reação utilizando como primeiro anticorpo, o Mabs, que é um anticorpo contra a proteína G. A reação foi incubada a 37°C em câmara úmida por 30 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS com pH 7,2 contendo Tween 20-0,05%. Após a secagem, foi utilizado como segundo anticorpo um conjugado anti-IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). O material foi incubado por 30 minutos a 37°C em câmara úmida e lavado com PBS. Depois de secas, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e analisadas no microscópio de fluorescência (ZEISS) com epi-iluminação.

Como controle do experimento de Imunofluorescência Indireta foi utilizado a lâmina do Kit, como mostrada na Figura 7. Nesta figura podemos observar: em A, as células estão vermelhas, devido ao corante de contraste Azul de Evans presente no conjugado FITC, este resultado indica que as células não estão infectadas, e em B, podemos observar que algumas células são delimitadas com uma coloração fluorescente verde brilhante, indicando que as células estão infectadas pelo RSV.

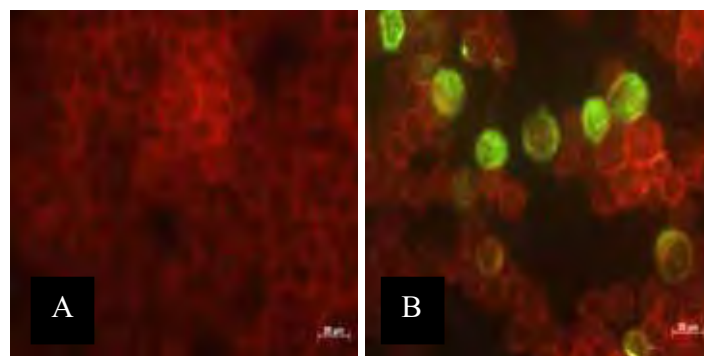


Figura-7: Figura resultante da lâmina de controle do kit de identificação viral. A: controle negativo e B: controle positivo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Controle para a verificação da inibição da PCR

Os resultados para a verificação de inibição da PCR foram obtidos por meio da amplificação por PCR de um fragmento de 613pb do gene β -Actina, o qual serviu de controle para a verificação da inibição da PCR pelos glicosaminoglicanos (Heparina e Dextrana Sulfatada).

Os nossos resultados evidenciam que a Heparina e a Dextrana Sulfatada nas concentrações de 1 a $8\mu\text{M}$ não inibem a PCR. Esse resultado pode ser observado na Figura 8, que mostra o gel de agarose 1%, evidenciando a amplificação do gene da β -Actina nas amostras de células Hep2 tratadas com Heparina nas concentrações de 1 a $8\mu\text{M}$.

Esse resultado também foi observado para a Dextrana Sulfatada, onde foi verificada a amplificação do gene da β -Actina, nas amostras de células Hep2 tratadas com concentração de 1 a $9\mu\text{M}$ de Dextrana Sulfatada.

Quando foi utilizada a concentração de $9\mu\text{M}$, tanto de heparina quanto de dextrana sulfatada, não ocorreu a amplificação do gene da β -Actina, indicativo de que nessa concentração e em concentrações maiores de $9\mu\text{M}$ os potenciais inibidores interferem na PCR. Esse resultado pode ser observado na canaleta 9 da Figura 8 que representa a concentração de $9\mu\text{M}$ de heparina, onde não há a banda correspondente ao gene da β -Actina.

Resultados

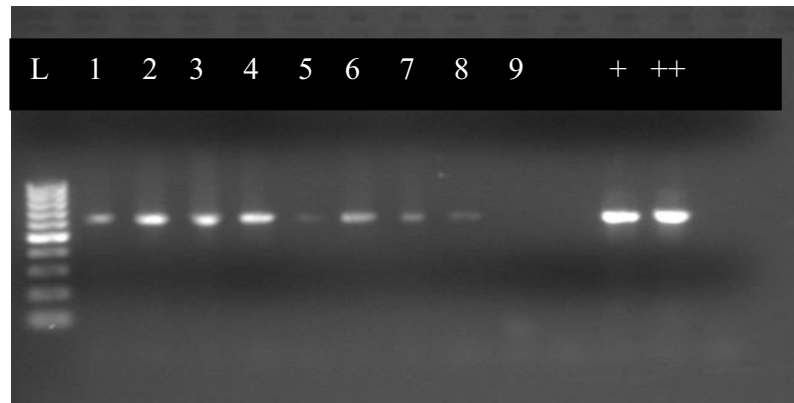


Figura 8: Gel de agarose 1% evidenciando a amplificação do gene β -actina (613pb) nas amostras de células Hep2 tratadas com Heparina nas concentrações de 1 a $9\mu\text{M}$. L: Marcador de peso molecular (100 pb), Os números representam as concentrações, em μM , de Heparina utilizada no experimento, + : Controle positivo do experimento e ++ : Controle positivo padrão.

4.2 Heparina

4.2.1 Células tratadas com concentrações que variaram de 1 a $9\mu\text{M}$

Nos resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), obtidos quando as células foram tratadas nas concentrações de 1 a $9\mu\text{M}$ de Heparina, antes da inoculação viral, podemos observar que as concentrações 1 e $2\mu\text{M}$ de Heparina mostram positividade viral, visualizada pela presença de banda que corresponde a um produto de amplificação de 650 pb, painel A da Figura 9. Já nas concentrações de 3 à $9\mu\text{M}$ não houve amplificação. Podemos observar também banda correspondente a 650 pb no controle positivo do experimento na canaleta +, onde a inoculação foi realizada sem o acréscimo de Heparina.

Resultados

Os resultados obtidos por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta nas concentrações de 1 a 9 μ M de Heparina podem ser observados no painel B da Figura 9, onde o painel B (-) mostra o controle negativo e o painel B (2) mostra o resultado obtido com as células que foram tratadas com Heparina na concentração de 2 μ M e que foram posteriormente inoculadas com o RSVA, nesse caso, podemos observar que ocorreu uma fluorescência verde brilhante indicativo de infectividade viral, esse resultado também foi observado na concentração de 1 μ M, mostrando que a Heparina na concentração abaixo de 2 μ M não inibe a infectividade viral.

O painel B (8) da Figura 9 está representando os resultados obtidos quando as células foram tratadas com Heparina nas concentrações de 3 a 9 μ M para depois serem inoculadas com o RSVA sendo que o painel apresentado neste caso refere-se à concentração de 8 μ M, nessas concentrações as células apresentavam-se vermelhas, indicativo de que não ocorreu a infecção viral. Já o painel B (+) da Figura 9 mostra o controle positivo, nesse caso, observamos uma reação positiva devido à fluorescência verde brilhante observada.

Os nossos resultados evidenciam que em concentrações acima de 3 μ M a Heparina está inibindo a infectividade viral.

Resultados

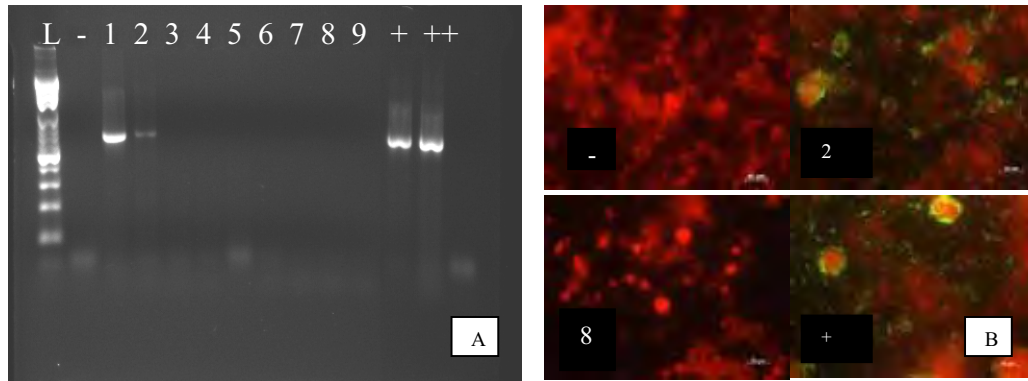


Figura 9: Painel comparativo dos resultados de PCR em Gel de Agarose e Imunofluorescência Indireta quando as células foram tratadas com Heparina. Painel A: Foto do Gel de Agarose. L: Marcador de peso molecular (100 pb); - : Controle negativo do experimento; + : Controle positivo do experimento; ++ : Controle positivo padrão. Os números indicam as concentrações de Heparina utilizadas no experimento. Painéis B: Imunofluorescência Indireta das células tratadas com Heparina. - : Controle negativo do experimento; + : Controle positivo do experimento; 2 e 8: Representam as concentrações de 2 μ M e 8 μ M de Heparina.

4.2.2 Vírus tratado com concentrações que variaram de 1 a 9 μ M

Os resultados obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) demonstram que quando o vírus foi tratado em diferentes concentrações de Heparina que variaram de 1 a 9 μ M antes da inoculação observou-se que nas concentrações de 1 a 4 μ M ocorreu amplificação do gene correspondente a 650pb, como mostrado no painel A da Figura 10.

Os resultados obtidos pela técnica de Imunofluorescência Indireta com concentrações de Heparina que variaram de 1 a 9 μ M estão demonstrados no Painel B da Figura 10. Podemos observar no painel B (1) da Figura 10 à ocorrência da coloração verde fluorescente na célula, indicativo da presença

Resultados

de vírus. Nesta e nas concentrações de até $4\mu\text{M}$ de Heparina o vírus consegue infectar a célula, mas em concentrações maiores que variam de 5 a $9\mu\text{M}$ de Heparina como representado no painel B (8) da figura 10 que mostra a concentração de $8\mu\text{M}$, as células estão vermelhas, indicativo de ausência de vírus, mostrando assim que nessas concentrações de Heparina não ocorreu à infecção viral.

Os nossos resultados evidenciam que nas concentrações de Heparina, abaixo de $4\mu\text{M}$, o vírus consegue infectar a célula, mostrando uma eficiência na inibição da infecção viral em concentrações acima de $4\mu\text{M}$ de Heparina quando o vírus é tratado com esse glicosaminoglicano antes da inoculação.

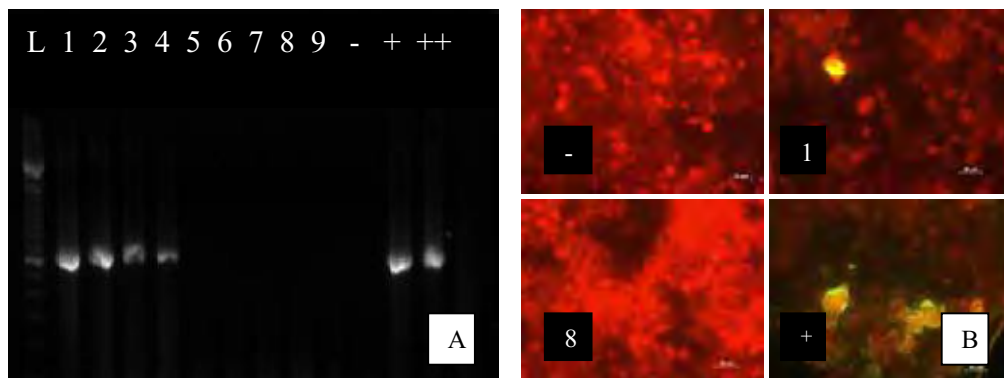


Figura 10: Painel comparativo dos resultados de PCR em Gel de Agarose e Imunofluorescência Indireta quando o vírus foi tratado com Heparina. A: Foto do Gel de Agarose. L: Marcador de peso molecular (100 pb); - : Controle negativo do experimento; + : Controle positivo do experimento; + + : Controle positivo padrão. Os números indicam a concentração de Heparina utilizada no experimento. B: Imunofluorescência Indireta do vírus tratado com Heparina. - : Controle negativo do experimento; + : Controle positivo do experimento; 1 e 8: Representam as concentrações de $1\mu\text{M}$ e $8\mu\text{M}$ de Heparina.

Resultados

4.3 Dextrana Sulfatada

4.3.1 Células tratadas com concentrações que variaram de 1 a 9 μ M

Nos resultados obtidos através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) observou-se que quando as células foram tratadas nas concentrações de 1 a 9 μ M de Dextrana Sulfatada constatou-se que ocorreu amplificação nas concentrações de 1 a 4 μ M. Este resultado mostra que estas concentrações não são suficientes para inibirem a infecção viral, já acima destas concentrações representadas pelas concentrações de 5 a 9 μ M, observou-se que não houve amplificação, como mostrado no painel A da Figura 11.

O painel B da Figura 11 mostra os resultados obtidos através da técnica de Imunofluorescência Indireta. O painel B (2) da Figura 11 mostra as células que foram tratadas com Dextrana Sulfatada na concentração de 2 μ M que apresentaram fluorescência verde brilhante, indicativo de presença viral, nestes resultados observamos presença viral em concentrações de até 4 μ M. Acima da concentração de 4 μ M de Dextrana Sulfatada já começa a ocorrer a inibição da infecção viral como mostrado no painel B (7) da Figura 11.

Os nossos resultados mostraram uma eficiência na inibição da infecção viral em concentrações acima de 4 μ M de Dextrana Sulfatada quando as células são tratadas com esse glicosaminoglicano antes da inoculação.

Resultados

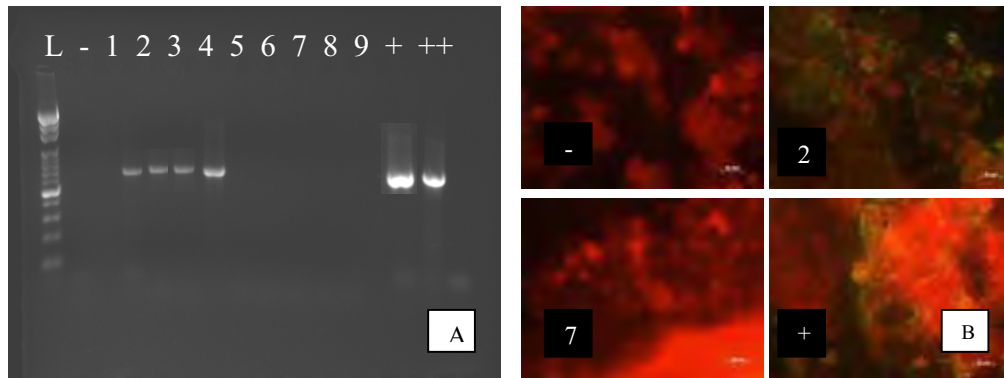


Figura 11: Painel comparativo dos resultados de PCR por Gel de Agarose e Imunofluorescência Indireta quando as células foram tratadas com Dextrana Sulfatada. A: Foto do Gel de Agarose. L: Marcador de peso molecular (100 pb); - : Controle negativo do experimento; + : Controle positivo do experimento; ++ : Controle positivo padrão. Os números indicam a concentração de Dextrana Sulfatada utilizada no experimento. B: Imunofluorescência Indireta das células tratadas com Dextrana Sulfatada. - : Controle negativo do experimento; + : Controle positivo do experimento; 2 e 7: Representam as concentrações de 2 μ M e 7 μ M de Dextrana Sulfatada.

4.3.2 Vírus tratado com concentrações que variaram de 1 a 9 μ M

Quando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase foi utilizada, nas concentrações de Dextrana Sulfatada que variaram de 1 a 9 μ M observou-se que não ocorreu amplificação nas amostras que representam as concentrações de 2 a 9 μ M, indicativo de que ocorreu inibição da infecção viral a partir da concentração de 2 μ M, conforme mostrado no painel A da Figura 12.

Na avaliação dos resultados através da técnica de Imunofluorescência Indireta, os resultados obtidos quando foram utilizadas concentrações de Dextrana Sulfatada que variaram de 1 a 9 μ M podem ser observados no painel B da Figura 12. O painel B (1) da Figura 12 mostra o resultado obtido quando foi

Resultados

utilizada a concentração de 1 μ M de Dextrana Sulfatada, nesse caso, ocorreu uma reação positiva, visto que as células apresentam uma fluorescência verde brilhante, evidenciando a ocorrência da infecção viral.

O painel B (8) da Figura 12 demonstra o resultado obtido quando foram utilizados 8 μ M de Dextrana Sulfatada, nesse caso, não ocorreu a infecção viral, visto que, as células apresentam-se vermelhas, evidenciando dessa forma que o vírus RSVA quando tratado com Dextrana Sulfatada nessa concentração inibe totalmente a infectividade viral. Esse resultado também foi observado nas concentrações que variaram de 2 a 9 μ M.

Os nossos resultados mostraram uma eficiência na inibição da infecção viral em concentrações acima de 2 μ M de Dextrana Sulfatada quando o vírus é tratado com esse glicosaminoglicano antes da inoculação.

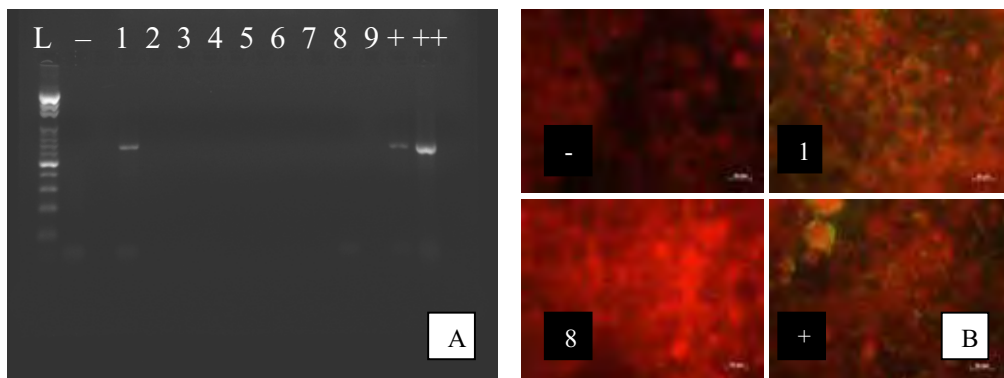


Figura 12: Painel comparativo dos resultados de PCR por Gel de Agarose e Imunofluorescência Indireta quando o vírus foi tratado com Dextrana Sulfatada. A: Foto do Gel de Agarose. L: Marcador de peso molecular (100 pb); - : Controle negativo do experimento; + : Controle positivo do experimento; + + : Controle positivo padrão. Os números indicam a concentração de Dextrana Sulfatada utilizada no experimento. B: Imunofluorescência Indireta do vírus tratado com Dextrana Sulfatada. - : Controle negativo do experimento; + : Controle positivo do experimento; 1 e 8: Representam as concentrações de 1 μ M e 8 μ M de Dextrana Sulfatada.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A ligação e a penetração do vírus na célula hospedeira são etapas essenciais para a infecção por vários vírus e esses são mediados pela interação com os glicosaminoglicanos celulares (THAMMAWAT et al., 2008), entre eles estão alguns vírus envelopados tais como o Herpes vírus, o Vírus Sincicial Respiratório (RSV), o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), bem como vírus não envelopados tais como o Adenovírus. O fato das células apresentarem glicosaminoglicanos na sua superfície pode estar relacionado a outros fatores como concentrar o vírus na superfície celular, localizar outros ligantes como fatores de crescimento e aumentar a eficiência de receptores secundários (SIMON et al., 2002).

Os glicosaminoglicanos são encontrados na superfície de tipos celulares de mamíferos, em tecidos e na matriz extracelular. Vários vírus, incluindo o RSV, têm utilizado os glicosaminoglicanos, particularmente a heparina, para a ligação celular e entrada do vírus à célula. Estudos recentes mostram que a infecção por RSV é inibida na presença de soluções, tal como, heparina e pela remoção enzimática de glicosaminoglicanos da superfície celular (THAMMAWAT et al., 2008).

O vírus sincicial respiratório (RSV), que é um paramyxovirus como o metapneumovírus humano, é o vírus humano mais relacionado com o metapneumovírus. Experimentos com uma abordagem semelhante à utilizada para o RSV, determinaram que os glicosaminoglicanos têm um papel importante na infecção por metapneumovírus humano. O tratamento das células com glicosaminoglicanos reduz a infecção e ligação do metapneumovírus humano com a proteína G (THAMMAWAT et al., 2008).

O tratamento com heparina não tem efeito sobre o crescimento ou viabilidade das células Hep2, indicando que o decréscimo da infecção não é devido à toxicidade celular. Em estudos recentes foi

Discussão

observado que a heparina diminui em 60% a infecção por metapneumovírus humano. O tratamento prévio do metapneumovírus humano com heparina e dextrana sulfatada antes da inoculação nas células Hep2 inibiu a infecção por esse vírus em uma forma dose-dependente, enquanto o pré-tratamento do vírus com dextrana não sulfatada não teve qualquer efeito (THAMMAWAT et al., 2008).

Nos experimentos realizados no nosso estudo, com polissacarídeos sulfatados em cultura celular e amostras virais, observou-se por meio das técnicas de PCR e Imunofluorescência Indireta que a heparina e a dextrana sulfatada podem inibir a infecção viral, o que está de acordo com a literatura referente a estudos de inibição causada pelo RSVA onde a heparina diminui a efetividade do vírus exibindo uma alta especificidade (STEVEN et al., 2000).

Os nossos resultados mostraram que a heparina, quando utilizada para tratar a célula antes da inoculação viral, inibiu a infecção viral a partir da concentração de 3 μ M. No entanto, os resultados obtidos quando utilizou a heparina para tratar o vírus antes da inoculação viral a eficiência da inibição da infecção viral ocorreu a partir da concentração de 5 μ M. Os nossos resultados do experimento utilizando heparina no vírus levantam uma questão referente à importância dos glicosaminoglicanos na contribuição da infecção.

Notamos que a eficiência da heparina é maior quando se trata a célula do que quando se trata o vírus antes da inoculação viral. Uma explicação para esta diferença pode ser devido à existência de uma maior quantidade de receptores virais para a heparina do que as concentrações utilizadas (1 a 4 μ M). Dessa forma, concentrações abaixo de 4 μ M de heparina não seria suficiente para bloquear os receptores virais que estariam livres e interagindo com a célula, prosseguindo assim o processo de infecção.

Possivelmente a maior eficiência ao tratar a célula em relação ao vírus também ocorre porque os glicosaminoglicanos formam uma camada sobre a superfície celular, impedindo que o vírus encontre os

Discussão

receptores da superfície celular para iniciar o processo de ligação do vírus a célula, em outras palavras, pode ser que ainda exista receptores virais livres nesta concentração de heparina, mas os receptores celulares não estão expostos para permitir que ocorra a interação e conseqüentemente o vírus infecte a célula.

Em estudos semelhantes ao nosso, a infecção por metapneumovírus humano tem sido inibida pela presença da heparina na cultura celular, sugerindo que a ligação desse vírus à célula hospedeira pode ser mediada pela interação com proteínas virais principalmente com a proteína G (THAMMAWAT et al., 2008).

Segundo Peeples (2000), não está claro que tipo de glicosaminoglicano e quais componentes destes glicosaminoglicanos estão envolvidos, e nem se a importância dos glicosaminoglicanos está em bloquear os receptores virais ou celulares, e em que magnitude eles contribuem na infecção.

Dados da literatura mostram que a proteína G é o alvo para a ligação da heparina, mas nenhum receptor foi descrito para o RSV e que comparações de seqüências da proteína G dos vírus dos dois grupos antigênicos (RSVA e RSVB) identificaram um segmento de 13 aminoácidos conservado no meio do ectodomínio da proteína G (aa 164-167). Este segmento conservado, que é estritamente hidrofóbico, foi proposto como um suposto sítio receptor de ligação da heparina. (MARTINEZ et al., 2000).

Estudos mais minuciosos, realizados recentemente, evidenciam que ocorre a ligação da proteína G ao tipo selvagem das células CHO que apresentam glicosaminoglicanos padrões, enquanto em células CHO com GAGs deficientes não ligação houve infecção viral. Esses resultados mostram que os glicosaminoglicanos da superfície celular e a interação da proteína G desempenham um papel fundamental na infectividade do metapneumovírus humano (THAMMAWAT et al., 2008).

Discussão

Além disso, no trato respiratório de camundongos, a replicação do vírus com falta da proteína G foi altamente restrita, indicando que a proteína G é necessária para a infecção do RSV in vivo (THAMMAWAT et al., 2008).

Embora tenha sido demonstrado que tanto a infectividade do metapneumovírus humano e a ligação da proteína G são mediados por interações com os glicosaminoglicanos, isto não é necessariamente indicativo que o mecanismo de inibição da infectividade está relacionado unicamente pela redução da ligação na proteína G. No caso do RSV, a proteína F também desempenha um papel mediador na infecção através do mecanismo dependente de GAG (THAMMAWAT et al., 2008).

A ligação das proteínas aos glicosaminoglicanos celulares é frequentemente mediada por interações eletrostáticas. Vários vírus utilizam os glicosaminoglicanos da superfície celular para facilitar a ligação e/ou a fusão do vírus à célula hospedeira. Esse processo é frequentemente mediado por essas interações eletrostáticas que ocorrem entre as cargas positivas das proteínas do vírus e a carga negativa dos glicosaminoglicanos da superfície celular (THAMMAWAT et al., 2008).

Os resultados encontrados quando foi utilizada a dextrana sulfatada mostraram também um efeito inibitório deste glicosaminoglicano. Observou-se que, ao contrário da heparina, a dextrana sulfatada apresenta eficiência maior quando o vírus é tratado antes da inoculação do que quando a célula é tratada, pois concentrações acima de 2 μ M de dextrana sulfatada no vírus foram suficientes para causar a inibição, quando comparado aos 5 μ M na célula. Este resultado mostra ainda a diferença na eficiência de inibição da infecção viral para os dois glicosaminoglicanos e, ainda, que estes têm eficiências diferentes, quando se trata o vírus e quando se trata a célula antes da inoculação. A explicação para esta diferença de condição de eficiência pode estar associada às características físico químicas destes dois glicosaminoglicanos.

Discussão

Os glicosaminoglicanos celulares que contêm ácido idurônico, incluindo a heparina inibem a infecção por RSV (THAMMAWAT et al., 2008). Peeples (2000) relata que o fato de um polissacarídeo sulfatado apresentar ácido idurônico faz com que ele iniba a infecção. Em contrapartida, o fato de não apresentar este ácido permite que o RSV se instale na célula. O que nos levaria a pensar que a heparina inibe a infecção por apresentar ácido idurônico, porém a dextrana sulfatada não apresenta ácido idurônico e inibe a infecção viral, sugerindo que exista outro mecanismo que auxilie no efeito inibitório além da presença do ácido idurônico.

Outro possível mecanismo envolvido no processo pode ser o grau de sulfatação dos polissacarídeos sulfatados, porque quanto mais grupos sulfatados um polissacarídeo possui mais cargas negativas (SO_3^-) ele possuirá, o que aumentará a sua afinidade pela proteína G.

Melero (2004) demonstra que a proteína G apresenta um domínio de ligação para a heparina rico em aminoácidos básicos, carregadas positivamente, que se ligam às cargas negativas da heparina. Portanto, apesar da dextrana sulfatada não possuir ácido idurônico ela possui em média dois grupos sulfatos por dissacarídeo. Já a heparina apresenta tanto o ácido idurônico quanto alto grau de sulfatação (aproximadamente 2,5 grupos sulfatos por dissacarídeo), evidenciando assim o maior poder de inibição da infecção viral mesmo em concentrações tão baixas: sob tratamento na célula inibe a partir de $3\mu\text{M}$ e no vírus inibe em concentrações superiores a $4\mu\text{M}$.

Estes resultados evidenciam ainda que o grau de sulfatação tem um certo limite na interação (2,0 grupos sulfatos por dissacarídeo) e acima deste não apresenta aumento na eficiência. Esta evidência mostra que a dextrana está apresentando uma maior eficiência na presença da infecção viral do que a heparina. Estes resultados foram confirmados por meio das duas técnicas utilizadas: PCR e Imunofluorescência Indireta.

Discussão

Outra explicação pode ser que a proteção que os glicosaminoglicanos proporcionam impede a infecção viral, uma vez que o vírus não consegue se adsorver à membrana da célula, em tempo suficiente para que ocorra a fusão viral, processo fundamental para que a infecção viral se concretize.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A heparina e a dextrana sulfatada são eficientes inibidores de infecção por RSV em cultivo de células Hep2;
2. As duas técnicas (PCR e Imunofluorescência Indireta) mostram coerência nos resultados obtidos, elas se complementam;
3. A concentração de heparina que apresenta efeito para inibição da infecção viral é a partir de $3\mu\text{M}$ quando as células são tratadas antes da inoculação e a partir de $5\mu\text{M}$ quando o vírus é tratado antes da inoculação viral. A concentração de dextrana sulfatada que apresenta efeito para inibição da infecção viral é a partir de $5\mu\text{M}$ quando as células são tratadas antes da inoculação e a partir de $2\mu\text{M}$ quando o vírus é tratado antes da inoculação viral;
4. A heparina apresenta maior eficiência na inibição da infecção viral quando as células são tratadas antes da inoculação viral, enquanto a dextrana sulfatada apresenta maior eficiência na inibição da infecção viral quando o vírus é tratado antes da inoculação.

REFERÊNCIAS

Referências

7. REFERÊNCIAS

- BARROSO, R. C. et al. Evaluation of the protamine in the neutralization of heparin after cardiopulmonary bypass. **Rev Bras Circ Cardiovasc**, v. 17, n.1, 2002.
- BARROWCLIFFE, T. W. Heparin assay and standardization. In: Lane, D. A.; Linsdahl, V. Heparin. **Chemical and Biological properties, Clinical Applications**. C.R.C. Press, Boca Raton, 1989.
- BORSOTTI, M. V. C. et al. Prescrição de antibióticos em lactantes hospitalizados com neumonía por virus sincicial respiratório. **Arch Argent Pediatr**. v. 106, n. 6, p. 515-517, 2008.
- BOURGEOIS, C. et al. Heparin Like Structures on Respiratory Syncytial Virus are Involved in Its Infectivity In Vitro. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7221-7227, 1998.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 21. ed. Guanabara Koogan, 611p, 2000.
- BUDGE, P. J. et al. RhoA-Derived Peptide Dimers Share Mechnistic Properties with Other Polyanionic Inhibitors of Respiratory Syncytial Virus (RSV), Including Disruption of viral Attachment and Dependence on RSV G. **Respiratory Care**, v. 48, n. 3, p. 209-216, 2004.
- CARDIN, A. D., WETRAUB, H. J. R.. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. **Arteriosclerosis**, v. 9, p. 21-32, 1989.
- CARVALHO, W. B. et al. Bronquiolite aguda, uma revis o atualizada. **Rev Assoc Med Bras**. v. 53 n. 2, p. 182-188, 2007.
- CASU, B. Methods of structural analysis. In: Lane, D. A.; Linsdahl, V. Heparin. **Chemical and Biological properties, Clinical Applications**. C. R. C. Press, Boca Raton, 1989.

Referências

- CATANI, R. et al. Heparina de alto peso molecular. Uma alternativa nas operações com circulação extracorpórea: estudo experimental. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 16, n. 2, p. 160-170, Jun 2001.
- CHAUBET, F. et al. Carbohydrate Polymers, v. 28, p. 145, 1995.
- CRESCENZI, V. et al. Biomedical and biotechnological polysaccharides. **Gondor and Beach Science Publishers**, 1989.
- DENNY F.W. Jr. The impact of respiratory virus infections on the world's children. In: Skoner DP, editor. **Asthma and respiratory infections**. New York: Marcel Dekker; p.1-22, 2001.
- DIMITROV, D.S. Vírus Entry: Molecular Mechanisms And Biomedical Applications. In: **Nature Reviews**, p. 109-122, v.2, 2004.
- DONOSO, C. G.; FOSSEY, M. A. Estudos da interação entre homo-polipeptídeos catiônicos com dextranas com diferentes graus de sulfatação. Relatório de Iniciação Científica – FAPESP, processo 02/07189-7, 2003.
- DUDAS, R. D.; KARRON, R. T. Respiratory Syncytial Virus Vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, p. 430-439, 1998.
- ELAMAK, O.; LOVICH, M.A.; ELDEMAN, E. Biomaterials, v. 21, p. 2263, 2000.
- FELDMAN, S. A.; HENDRY, R. M.; BEELER, J. A. Identification of a Linear Heparin Binding Domain for Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein G. **Journal of Virology**, v. 73, p. 6610-6617, 1999.
- FISHER, A. M. et al. Biomaterials, v. 6, p. 198, 1985.
- FLYNN, S. J.; RYAN, P. A heterologous heparin-binding domain can promote functional attachment of a pseudorabies virus gC mutant to cell surfaces. **Journal of Virology**, v. 69, p. 834-839, 1995.

Referências

- FOSSEY, M. A. Et al. Study Of The Sulfated Polysaccharides And Polypeptides Interaction. **XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, Caxambu-MG, p. 120, 2003.
- GONZÁLES-REYES, L. Et al. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. In: **Microbiology**, p.9859-9864, v.98, 2001.
- GRAVLEE, G. P. et al. Early anticoagulation peak and rapid distribution after intravenous heparin. **Anesthesiology**, v. 68, p. 126-129, 1988.
- HEMINWAY, B. R. et al. Analysis of Respiratory Syncytial Virus F, G and SH Proteins in Cell Fusion. **Virology**, v. 200, p. 801-805, 1994.
- JEANES, A. Dextran. In: Jonh Wiley & Sons Inc. Encyclopedia of Polymer. **Science and Technology**, V. 4, P. 805-824, 1996.
- KRENTSEL, L. et al. Carbohydrate Polymers. V. 33, p. 63, 1997.
- KRUSAT, T.; STRECKERT, H. J. Heparin - dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. **Arch. Virol.**, v. 142, p. 1247-1254, 1997.
- LANGEDIJK, J. P. M. et al. Structural Homology of the central Conserved Region of the Attachment Protein G of Respiratory Syncytial Virus with the Fourth Subdomain of 55kDa Tumor Necrosis Factor Receptor. **Virology**, v. 243, p. 293-302, 1998.
- LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e Imunológica**. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 561p, 1998.
- LONGHI, Fernanda, LAKS, Dani and KALIL, Nelson G. N. Heparin-induced thrombocytopenia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 23, n. 2, 2001.

Referências

- LOVATO, L. T. et al. Viroses respiratórias emergentes: os vírus e seu diagnóstico. **RBAC**, v. 39, n. 3, p. 169-173, 2007.
- LU, M. et al. Bioseparation. v. 5, p. 351, 1995.
- MARTINEZ, I.; MALERO, J. A. Binding of human respiratory syncytial virus to cells implication of sulfated cell surface proteoglycans. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2715-2722, 2000.
- MATHEWS, J. M. et al. The Core of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Is a Trimeric Coiled Coil. In: **Journal of Virology**, p. 5911-5920, v.74, n°13, 2000.
- MELERO, J. A. et al. The Soluble Form of Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Protein Differs from the Membrane-Bound Form in Its Oligomeric State but Is Still Capable of Binding to Cell Surface Proteoglycans. **Journal of Virology**, v. 78, p. 3524-3532, 2004.
- MILLÁN, T. et al. Características biológicas y sociales de los menores de un año muertos por neumonía en la región metropolitana de Chile. 1995. **Rev Panam Salud Públ** ; 6:333-41. 1999.
- MORTON, C. J. et al. Structural characterization of respiratory syncytial virus fusion inhibitor escape mutants: homology model of the F protein and a syncytium formation assay. **Virology**, v. 311, p. 275-288, 2003.
- MULLOY, B. et al. The interaction between heparin and polylysine: a circular dichroism and molecular modelling study. **Brazilian journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 721-729, 1996.
- OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. **Pediatr Respir Rev.**, v. 5 Suppl A: S119-26, 2004.
- OLIANI, S. M. et al. Immunocytochemical localization of heparin in secretory granules of rat peritoneal mast cells using a monoclonal anti-heparin antibody (ST-1). **The journal of histochemistry & cytochemistry**, v. 45(2), p. 231-235, 1997.

Referências

- OLIVERCRONA, T.; BENGTTSSON-OLIVERCRONA, G. Heparin and lípases. In Lane, D. A.; Linsdahl, V.; Heparin. Chemical and Biological properties, Clinical Applications. C. R. C. Press, Boca Raton, 1989.
- PAVÃO, M. S. G. Structure and anticoagulant properties of sulfated glycosaminoglycans from primitive Chordates. **An. Acad. Bras. Ciênc.** v. 74, n. p. 105-112. 2002.
- PEEPLES, M. E. et al. Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. **Virology**, v. 271, n. 2, p. 264-275, 2000.
- PERET, T. et al. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of Human respiratory syncytial virus in a community. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2221-2229, 1998.
- PERET, T. C. T. et al. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. **J. Infect. Dis.** v. 181 p. 1891-1896, 2000.
- POST, C. L. A; Fatores prognósticos de letalidade hospitalar por diarreia ou pneumonia em menores de um ano de idade. Estudo de caso e controle. **Rev Saúde Pública.** 26:369-78. 1992.
- ROCA, A. et al. Genetic variability among group A and B respiratory syncytial viruses in Mozambique: identification of a new cluster of Group B isolates. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 103-111, 2001.
- ROCHA, A. O. Et al. Antibioticoterapia em crianças com pneumonia. **Gazeta Médica da Bahia**, Suplemento 1: S88-S92, 2007.
- RUIZ-ARGUELLO, M. B. et al. Effect of Proteolytic Processing at Two Distinct Sites on Shape and Aggregation of an Anchorless Fusion Protein of Human Respiratory Syncytial Virus and Fate of the Intervening Segment. **Virology**, p. 317-326, 2002.
- SCHMIDT, A.C., et al. Respiratory syncytial virus and other pneumoviruses: a review of the international symposium – RSV 2003. In: **Virus Research**, p.1-13, 2004.

Referências

- SIMON, J. W. et al. Heparin Binds to Murine Leukemia Virus and Inhibits Env-Independent Attachment and Infection. **Journal of Virology**, v. 76, n. 14, p. 6909-6918, 2002.
- STAAT, M. A. Respiratory Syncytial Virus Infections in Children. **Semin Respir. Infect**, v. 17, n. 1, p. 15-20, 2002.
- STEVEN, A. F. et al. The Fusion Glycoprotein of Human Respiratory Syncytial Virus Facilitates Virus Attachment and Infectivity via an Interaction with Cellular Heparan Sulfate. **Journal of Virology**, v. 74, p. 6442-6447, 2000.
- THAMMAWAT, S. et al. Role of Glicosaminoglicans and Charged Regions of Viral G Protein in Human Metapneumovirus Infection. **Journal of Virology**, v. 82, n. 23, p. 11767-11774, 2008.
- TRYBALA, E. et al. Mode of interaction between pseudorabics virus and heparan sulfate/heparin. **Virology**, v. 218, p. 35-42, 1996.
- VACCARI, Silvana F., BRUM JUNIOR, Liberato, MASIERO, Silvia M. K. et al. Comparison of the biological activities of unfractionated heparins in pharmaceutical products. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 25, n. 2, p. 103-110, 2003.
- VOET, D.; VOET, J. G. Biochemistry. **John Wiley Sons, INC**, 2. ed., 1995.
- ZHANG, Y. et al. Expression of Respiratory Syncytial Virus-Induced Chemokine Gene Networks in Lower Airway Epithelial Cells Revealed by cDNA Microarrays. **Journal of Virology**, v. 75, n. 19, p. 9044-9058, 2001.
- ZHAO, X. et al. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. **PNAS**, v. 97, p. 14172-14177, 2000.
- ZHU, J. et al. Design and analysis of post-fusion 6-helix bundle of heptad repeat regions from Newcastle disease virus F protein. **In: Protein Engineering**, p.373-379, v.16, n°5, 2003.
- WITVROUW, M.; DE CLERQ, E. Sulfated Polysaccharides Extacted from Sea Algae as Potencial Antiviral Drugs. **Elsevier Science, Ltd**, v.29, n° 4, p.497-511, 1997.

Referências

YAMADA, T. et al. Carbohydrate Polymeres. **Elsevier Science, Ltd**, v. 32, p. 51-55, 1997.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 09/03/2009

Assinatura