

## RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 12/04/2023.



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

Isabella Otenio de Lourenço

**Estudo da interação da proteína NS1 do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e dinâmica molecular**

São José do Rio Preto  
2019

Isabella Otenio de Lourenço

**Estudo da interação da proteína NS1 do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e dinâmica molecular**

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

Financiadora: CNPq - Proc.:134461/2017-7

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto  
2019

L892e Lourenço, Isabella Otenio de  
Estudo da interação da proteína NS1 do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e dinâmica molecular / Isabella Otenio de Lourenço. -- São José do Rio Preto, 2019  
97 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto  
Orientador: Marcelo Andres Fossey  
Coorientadora: Fátima Pereira de Souza

1. Biofísica molecular. 2. Virologia. 3. Moléculas. 4. Biomoléculas. 5. Proteínas recombinantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Isabella Otenio de Lourenço

Estudo da interação da proteína NS1 do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e dinâmica molecular

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

Financiadora: CNPq - Proc.134461/2017-7

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Dr. Alexandre Suman de Araujo  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli  
UNESP – Câmpus de Araraquara

São José do Rio Preto  
12 de abril de 2019

Dedico este trabalho a minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu pudesse focar nos meus estudos e por me apoiar e me incentivar a continuar.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador e co-orientadora, Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fátima Pereira de Souza, por terem me dado a oportunidade de continuar minha carreira científica, por todos os ensinamentos passados a mim que, com toda certeza, levarei comigo por toda a minha carreira profissional e, também, pessoal. Sou muito grata por tudo que aprendi durante o período e pelo crescimento profissional durante o mestrado.

Aos professores Dr. Márcio Colombo, Dr. Fernando Alves de Melo e Dr. Raghuvir K. Arni pela ajuda prestada disponibilizando o uso de equipamentos ou reagentes de seus laboratórios para a realização deste projeto. Assim como o Prof. Dr. Luis Octávio Regasini por ter disponibilizado os ligantes utilizados neste estudo.

Agradeço a Dr.<sup>a</sup> Gabriela Campos de Araújo pelo primeiro contato com os estudos dos métodos computacionais, indicação de materiais de estudo da fundamentação e metodologia e ao Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso pelos conhecimentos e discussões nos estudos computacionais. Também agradeço aos alunos de estágio, IC e alunos da Pós-Graduação do laboratório de Biologia Molecular por toda a ajuda prestada e amizade. À Evelyn Pedroso Toscano Quintino pela parceria, amizade e companheirismo no projeto e por nunca medir esforços para me ajudar nos experimentos e discussões sobre os resultados.

Agradeço a minha família pelo apoio e por me incentivar nos estudos, principalmente, minha mãe Marilda Ottenio e meu namorado, Felipe Vieira dos Santos Izumi, pelo apoio e ajuda em me manter focada e não desistir nos momentos difíceis.

A FAPESP (Processo FAPESP 2011/07137-6, 2013/24355-2, 2016/17378-4) e FINEP (Processo FAPESP 2016/01749-3) pelo apoio no desenvolvimento de pesquisa, proporcionando infraestrutura, e a PROPG pelo apoio na divulgação do trabalho em congressos.

## RESUMO

As infecções causadas pelo vírus sincicial respiratório humano (hRSV) podem provocar sintomas leves e indistinguíveis de resfriados comuns em adultos e crianças saudáveis, mas também é uma das principais causas de infecções agudas do trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquiolite, em recém nascidos prematuros, crianças de até dois anos e idosos. A infecção por hRSV não garante proteção contra contaminações subsequentes, e o desenvolvimento de terapias antivirais efetivas ou vacina preventiva ainda não estão disponíveis. Neste sentido, faz-se necessária a busca por alvos proteicos importantes para o combate da infecção viral e de potenciais inibidores destas proteínas. A proteína Não-Estrutural 1 (NS1) é de suma importância para o sucesso da replicação viral, capaz de reduzir a resposta imunológica, em particular a resposta do interferon do tipo I, e prevenir a apoptose celular, sendo um possível alvo de tratamento contra a infecção por hRSV. Mediante a isto, o estudo sobre a interação da NS1 com ligantes para o seu bloqueio pode possibilitar o entendimento dos mecanismos de inibição, nos quais os flavonoides têm sido descritos como sendo supressores eficazes. Além disso, essas moléculas são potenciais fármacos pelo seu baixo custo de obtenção e poucos efeitos adversos. O objetivo deste estudo foi investigar a interação entre a proteína NS1 do hRSV com alguns flavonoides utilizando espectroscopia de fluorescência e *docking* molecular. A NS1 foi expressa, purificada e quantificada por espectroscopia de UV/VIS e dicroísmo circular. A flexibilidade estrutural foi verificada por dinâmica molecular. A análise da interação proteína/ligante foi realizada por espectroscopia de fluorescência. A interação da NS1 com os flavonoides estudados teve maior contribuição devido a interações hidrofóbicas. Os resultados sugerem que a interação depende das estruturas dos flavonoides e da posição de suas hidroxilas. Entretanto, a ordem de grandeza de ligação foi moderada ( $10^4 \text{ M}^{-1}$ ) para todas as moléculas estudadas, com isso o flavonoide poderia interagir com a NS1 impedindo, momentaneamente, a proteína de bloquear as vias do IFN- $\alpha$ , e logo desassociarem para que o flavonoide possa ser complexado por outras proteínas NS1.

**Palavras-chaves:** hRSV, proteína NS1, flavonol, espectroscopia de fluorescência, *docking* molecular, dicroísmo circular, dinâmica molecular.

## ABSTRACT

Human respiratory syncytial virus (hRSV) infections can cause mild symptoms of common colds in adults and children, but it is also a leading cause of acute lower respiratory tract infections such as pneumonia and bronchiolitis in premature newborns, children until two years old and elderly people. The hRSV infections does not guarantee protection against subsequent contamination, and the development of effective antiviral therapies or preventive vaccine is not available yet. Therefore, it is necessary to search for important proteins targets to combat viral infection and potential inhibitors of these proteins. Non-Structural 1 protein (NS1) is of utmost importance for the viral replication success, capable of reducing the immune response, in particular the interferon type I response, and preventing cell apoptosis, being a possible target of treatment against hRSV infection. It is important to study the interaction of NS1 with ligands for the blockade of this protein, and thus to use it as a possible target for treatment against hRSV infection. The study on the interaction of NS1 with ligands is important to understanding the mechanisms of inhibition, which flavonoids have been described as affective suppressors. These molecules are potential drugs because of their low cost of procurement and few adverse. The aim of this study was to investigate the interaction between the hRSV NS1 protein and some flavonoids using fluorescence spectroscopy and molecular docking. NS1 protein was expressed, purified and quantified by UV/VIS spectroscopy and circular dichroism. Structural flexibility was verified by molecular dynamics. Protein-ligands interaction analysis was performed by fluorescence spectroscopy. The interaction of the protein with the studied flavonoids had their greatest contribution due to hydrophobic interactions. The results suggest the interaction depends on the flavonoid structures, the position of their hydroxyls, and the affinity to NS1. However, the order of magnitude of binding was moderate ( $10^4 \text{ M}^{-1}$ ) for the molecules in this study, so the flavonoid could interact with NS1 momentarily impossibility the protein from blocking IFN- $\alpha$  pathways, and then disassociating to that the flavonoid can be complexed by other NS1.

**Keywords:** hRSV, NS1 protein, flavonol, fluorescence spectroscopy, molecular docking, circular dichroism, molecular dynamics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da estrutura e organização do vírion e a organização gênica do hRSV.....	17
Figura 2: Ciclo replicativo do RSV.....	22
Figura 3: Inibição da resposta imune do hospedeiro pelas proteínas virais NS1 e NS2. ....	24
Figura 4: Estrutura química dos flavonoides. ....	27
Figura 5: Estrutura química do flavonoide quercetina. ....	28
Figura 6: Luz polarizada circularmente para a direita.....	31
Figura 7: Rotações das moléculas e espectro padrão de CD. ....	32
Figura 8: Diagrama de <i>Jablonski</i> .....	34
Figura 9: Fluoróforos intrínsecos bioquímicos e seus espectros de emissão e absorção.....	36
Figura 10: Representação de interações entre átomos e a representação das diferentes descrições dos 20 aminoácidos em um campo de força. ....	44
Figura 11: Mapa do plasmídeo pJexpress401-NS1. ....	51
Figura 12: Representação em <i>cartoon</i> e superfície da estrutura cristalográfica da proteína NS1 depositada no PDB 5CJ2. ....	58
Figura 13: SDS-PAGE a 15% corado com <i>Coomassie brilliant blue</i> R250 com o resultado do teste de indução da expressão da proteína NS1 com diferentes combinações de antibióticos. ....	61
Figura 14: SDS-PAGE a 15% corado com <i>Coomassie brilliant blue</i> R-250 da purificação por cromatografia de afinidade.....	63
Figura 15: SDS-PAGE a 15% corado com <i>Coomassie brilliant blue</i> R-250 da purificação por cromatografia de exclusão molecular. ....	64
Figura 16: Espectro de dicroísmo circular da proteína NS1. ....	65
Figura 17: Avaliação da dinâmica molecular da proteína NS1. ....	67
Figura 18: Espectro característico do coeficiente de absorvidade dos flavonoides. ....	69
Figura 19: Espectro de coeficiente de absorvidade molar em tampão PBS pH 7,4 e 2 mM de DTT dos flavonoides miricetina, kaempferol, morina e morina penta acetilada. ....	70

Figura 20: Espectro de emissão normalizado do complexo NS1-ligante em 292 K.....	71
Figura 21: Gráfico de <i>Stern-Volmer</i> para a supressão de fluorescência da NS1 pela formação de complexo com ligantes em 292 e 310 K. ....	72
Figura 22: Gráfico de duplo-log para a supressão de fluorescência da NS1 pelos flavonoides em 2 temperaturas. ....	73
Figura 23: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com miricetina por <i>docking</i> molecular. ....	80
Figura 24: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com kaempferol por <i>docking</i> molecular. ....	81
Figura 25: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com morina por <i>docking</i> molecular.....	82
Figura 26: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com morina penta acetilada por <i>docking</i> molecular. ....	83

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Forças atuantes de acordo com a energia do sistema.....	42
Quadro 2: Parâmetros da proteína NS1 gerados pela ferramenta ProtParam.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa da estrutura secundária da proteína NS1 por CD comparada com as estimativas da estrutura resolvida por cristalografia (CHATTERJEE <i>et al.</i> , 2017) e com a estrutura clusterizada pela dinâmica molecular.....	66
Tabela 2: Constantes de supressão de <i>Stern-Volmer</i> ( $k_{SV}$ ) do complexo NS1-ligantes em 292 e 310K. $R > 0,99$ . ....	73
Tabela 3: Valores das constantes de ligação ( $k_b$ ) e número de ligantes por sítio de interação ( $n$ ) para as temperaturas de 292 e 310K. $R > 0,99$ .....	75
Tabela 4: Valores de $1/T$ e $-R\ln k_b$ para as temperaturas de 292 e 310K para o gráfico de van't Hoff. ....	76
Tabela 5: Valores das variações da energia livre de Gibbs $\Delta G$ , de entalpia $\Delta H$ e entropia $\Delta S$ .....	77
Tabela 6: Relação das distâncias das ligações entre resíduos da cadeia lateral da proteína NS1 envolvidos na ligação com a miricetina. ....	97
Tabela 7: Relação das distâncias das ligações entre resíduos da cadeia lateral da proteína NS2 envolvidos na ligação com a kaempferol.....	97
Tabela 8: Relação das distâncias das ligações entre resíduos da cadeia lateral da proteína NS1 envolvidos na ligação com a morina. ....	97
Tabela 9: Relação da distância da ligação entre resíduo da cadeia lateral da proteína NS1 envolvidos na ligação com a morina penta acetilada. ....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$k_{SV}$	Constante de <i>Stern-Volmer</i>
$k_b$	Constante de ligação
<b>BME</b>	<i><math>\beta</math>-mercaptoetanol</i>
<b>CD</b>	Dicroísmo Circular
<b>D.O</b>	Densidade óptica
<b>DM</b>	Dinâmica molecular
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>hRSV</b>	Vírus Sincicial Respiratório Humano
<b>IFN</b>	<i>Interferon</i>
<b>IFNAR</b>	Receptor Interferon $\alpha/\beta$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IPS-1</b>	estimulador de promotor de interferon beta do tipo 1
<b>IPTG</b>	<i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-thiogalactopyranoside</i>
<b>IRF-3</b>	Fator 3 Regulatório de Interferon
<b>ISG</b>	Gene Estimulado por Interferon
<b>LRTI</b>	Infecções agudas do trato respiratório inferior
<b>MAVS</b>	Proteína de sinalização mitocondrial
<b>n</b>	Número de ligantes por sítios de ligação
<b>NF-<math>\kappa</math><math>\beta</math></b>	Fator Nuclear Kappa $\beta$
<b>NS1</b>	Proteína Não-estrutural 1
<b>NS2</b>	Proteína Não-estrutural 2
<b>PRRs</b>	Receptores de reconhecimento de padrões
<b>RANTES</b>	Regulador da Ativação, Expressão e Secreção em Células T Normais
<b>RIG-I</b>	Gene Induzível pelo Ácido Retinóico 1
<b>RLR</b>	Receptor tipo RIG-I
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteína
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
<b>STAT</b>	Transdutora de sinal e ativadora de transcrição
<b>Th1</b>	Linfócitos

<b>TLR3</b>	Receptor do Tipo Toll 3
<b>TRAF3</b>	Fator Associado ao Receptor de Necrose Tumoral 3
<b>Tris</b>	N-tris[hidroximetil]aminoetano
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Vis</b>	Visível

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
1.1	O Vírus Sincicial Respiratório .....	15
1.2	Classificação do Vírus Sincicial Respiratório .....	17
1.3	As proteínas do RSV .....	18
1.4	Ciclo replicativo viral .....	21
1.5	Papel das proteínas Não Estruturais (NS) na infecção viral .....	23
1.6	Flavonoides.....	25
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	30
2.1	Determinação da fração de estruturas secundárias de proteína por medidas espectroscópicas de Dicroísmo Circular (CD) .....	30
2.2	Absorção de radiação e emissão de fluorescência.....	33
2.3	Efeitos da geometria e da amostra .....	36
2.4	Supressão de fluorescência e quenching colisional.....	37
2.5	Equilíbrio de ligação dos complexos proteína-ligante .....	39
2.6	Termodinâmica da interação de proteína e ligante .....	41
2.7	Dinâmica molecular (DM).....	43
2.8	Docking molecular .....	47
3	OBJETIVOS.....	49
3.1	Objetivo geral.....	49
3.2	Objetivos específicos .....	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	50
4.1	DNA recombinante pJexpress401-NS1 .....	50
4.2	Transformação do plasmídeo pJexpress401-NS1 .....	51
4.3	Teste de indução da expressão da proteína NS1 em Rosetta-Gami 2 (DE3).....	52
4.4	Indução de expressão da proteína NS1 em larga escala .....	53
4.5	Preparação da amostra para purificação .....	53
4.6	Purificação da proteína NS1 por cromatografia de afinidade em sistema AKTA.....	53
4.7	Purificação da proteína NS1 por cromatografia de exclusão molecular em sistema AKTA.....	54

4.8	Caracterização dos flavonoides e quantificação de proteína por medidas espectrofotométricas .....	54
4.9	Estrutura secundária por deconvolução espectral de CD .....	56
4.10	Espectroscopia de Fluorescência da NS1 por titulação de flavonoides para verificação de interação .....	57
4.11	Simulação de DM da proteína NS1 e docking molecular dos complexos .....	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
5.1	Parâmetros físicos e químicos fornecidos pela ferramenta ProtParam .....	60
5.2	Teste de indução da expressão da proteína NS1 .....	60
5.3	Purificação da proteína NS1 por cromatografias de afinidade e exclusão molecular.....	62
5.4	Determinação da fração de estruturas secundárias de proteína por CD .....	64
5.5	Dinâmica Molecular da proteína NS1 .....	66
5.6	Determinação do coeficiente de extinção molar de flavonoides .....	68
5.7	Supressão de Fluorescência da NS1 pela Morina .....	70
5.8	Parâmetros termodinâmicos da interação da NS1 com flavonoides.....	76
5.9	Interação proteína-ligante por docking molecular .....	78
6	CONCLUSÃO .....	84
7	TRABALHOS FUTUROS .....	85
8	BIBLIOGRAFIA .....	86
9	ANEXOS .....	95
9.1	Anexo A: Sequenciamento do gene NS1 .....	95
9.1.1	Sequência de nucleotídeos do gene NS1.....	95
9.1.2	Sequência de aminoácidos da proteína NS1.....	95
9.2	Anexo B: Meio de cultura LB pH 7,5 .....	95
9.2.1	Meio líquido LB.....	95
9.2.2	Meio sólido LB .....	96
9.3	Anexo C: Tampão PBS pH 7,4 .....	96
10	APÊNDICE.....	97
10.1	Distâncias das interações entre os átomos da NS1 com os flavonoides .....	97

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O Vírus Sincicial Respiratório

O vírus sincicial respiratório humano (hRSV) foi isolado pela primeira vez em 1956, por Morris, Blount e Savage, em estudo para investigar o agente etiológico responsável pela doença respiratória aguda em chimpanzes do Instituto de Pesquisa Walter Reed Army, nos Estados Unidos da América, sendo descrito como “agente de coriza de chimpanzé” (MORRIS *et al.*, 1956; COLLINS & GRAHAM, 2008). Em 1957, após estudos em cultura de tecido, o vírus foi renomeado para vírus sincicial respiratório (RSV), devido ao seu padrão exclusivo de formar sincícios celulares multinucleados e, só em 1981, começou a caracterização detalhada do RSV com a clonagem molecular e sequenciamento do seu genoma (COLLINS *et al.*, 2013; HOGAN *et al.*, 2018).

A maioria das infecções por hRSV ocorrem em surtos sazonais no mundo todo (GRIFFITHS *et al.*, 2017) e é transmitido por contato direto e indireto com secreções nasais ou orais contaminadas (HOGAN *et al.*, 2018). Apresenta sintomas leves e indistinguíveis de resfriados comuns em adultos e crianças saudáveis, mas também é uma das principais causas de infecções virais agudas do trato respiratório inferior (LRTI), como pneumonia e bronquiolite, em recém nascidos prematuros, crianças e idosos (IM *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2019), asma e alergias (CAO *et al.*, 2016). Além disso, também atinge indivíduos imunocomprometidos, causando elevada mortalidade (COLLINS & GRAHAM, 2008; ROSSEY *et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2016).

Globalmente, o hRSV é responsável por mais de 30 milhões de infecções do LRTI, três milhões de hospitalizações e de 50 a 75 mil mortes a cada ano em crianças menores de cinco anos de idade, tendo a maior incidência em países em desenvolvimento (XIE *et al.*, 2019). Em idosos, as infecções por hRSV causam morbidade e mortalidade tanto quanto as infecções por influenza. Já em pacientes com transplante de células-tronco a mortalidade por infecção por hRSV é estimada entre 6 e 80%. Entretanto, as infecções por hRSV também produzem morbidade significativa em populações adultas saudáveis (CULLEN *et al.*, 2019).

Alguns fatores podem aumentar o risco de infecção por hRSV, como uma associação entre doenças graves e indução de hiper-reatividade das vias aéreas durante a infância, pneumonia em pacientes imunocomprometidos e infecção em

idosos que resultam no excesso de mortalidade. Outros fatores estão relacionados a condições dos pacientes, incluindo nascimento prematuro, baixa imunidade, doenças pulmonares ou cardíacas crônicas ou imunossupressão, vias aéreas estreitas ou fatores de natureza genética (COLLINS *et al.*, 2013).

A infecção por RSV afeta principalmente o epitélio bronquial, bronquíolo e alveolar humano (COLLINS *et al.*, 2013; LAY *et al.*, 2013) que resulta em aglomerados de células epiteliais das vias respiratórias apicais ciliadas induzindo seu desprendimento, perda de cílios, formação de sincícios esporádicos, hipersecreção de muco (SEMPLE *et al.*, 2007; COLLINS *et al.*, 2013), infiltração pulmonar aguda (LAY *et al.*, 2013), aumento da replicação viral e a redução da atividade imunológica antiviral, acarretando a redução na produção de interferon (IFN) (COLLINS *et al.*, 2013).

Estudos com células humanas imortalizadas *in vitro* demonstraram que o vírus pode replicar em células derivadas de tecidos pulmonares, de rim, fígado, tecido neural, cólon, mama e ovário (ZHANG *et al.*, 2002, COLLINS *et al.*, 2013). Portanto, a replicação do RSV não está necessariamente restrita ao seu tecido de origem no trato respiratório ou ao epitélio, mas as células altamente diferenciadas são muito mais permissivas do que outras células.

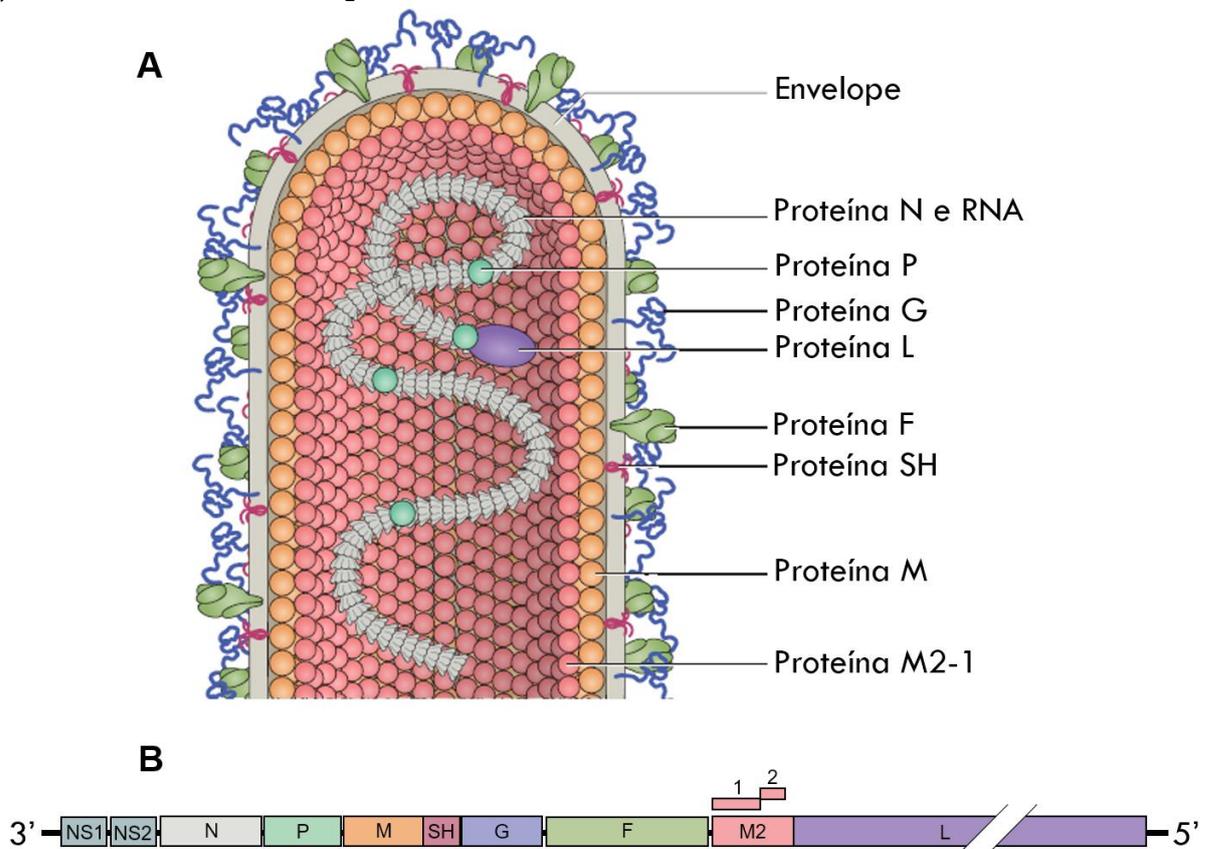
Nenhuma terapia antiviral efetiva ou vacina preventiva está atualmente disponível, embora muitos alvos candidatos tenham sido avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos ao longo de várias décadas (ATWELL *et al.*, 2016; CAO *et al.*, 2016; CULLEN *et al.*, 2019). Uma das dificuldades é pelo fato de a infecção por hRSV não garantir proteção em infecções subseqüentes, podendo ocorrer repetidas vezes ao longo de vários anos ou na mesma estação. Este fato indica que os seres humanos possuem uma deficiência nas respostas da memória à infecção por RSV devido a falha na ativação da memória preexistente após uma segunda infecção, além das mutações nas proteínas de Fusão (F) e Glicoproteína (G) presentes no envelope viral (**Figura 1.A**) prejudicarem a especificidade dos candidatos a antivirais (CULLEN *et al.*, 2019).

O palivizumab (Synagis®), um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra um epítipo conservado da proteína F do hRSV, é a única terapia profilática aprovada para a prevenção da infecção pelo hRSV em recém-nascidos com menos de 24 meses de idade. No entanto, seu uso atualmente é limitado a um subconjunto de bebês de alto risco devido aos altos custos e efeitos colaterais exacerbados. O uso

é aprovado para prematuros nascidos com menos de 29 semanas de gestação, lactentes com doença pulmonar crônica de prematuridade como idade gestacional menor do que 32 semanas de gestação e lactentes com necessidade de oxigênio suplementar nos primeiros 28 dias de vida, com congênitos hemodinamicamente significativos doença cardíaca, e distúrbios neuromusculares que prejudicam a depuração das vias aéreas (REZAEI *et al.*, 2017; HOGAN *et al.*, 2018; XEI *et al.*, 2019; XING & PROESMANS, 2019).

## 1.2 Classificação do Vírus Sincicial Respiratório

**Figura 1:** Esquema da estrutura e organização do vírion e a organização gênica do hRSV. **(A)** A glicoproteína (G), proteína de Fusão (F) e a Pequena Proteína Hidrofóbica (SH) estão situadas no envelope viral. Uma camada abaixo da membrana viral é formada pela proteína de matriz (M) e é responsável pela forma filamentosa do vírion. A proteína M2-1 interage tanto com a proteína M como a Nucleoproteína (N), que envolve o genoma viral. A proteína Polimerase (L) e a Fosfoproteína (P) também se associam à proteína N. **(B)** Representação do genoma do vírus sincicial respiratório (RSV) contendo 10 genes que codificam 11 proteínas, sendo que o gene M2 codifica as proteínas M2-1 e M2-2. Os genes mais transcritos são aqueles que codificam as proteínas Não-Estrutural 1 (NS1) e Não-Estrutural 2 (NS2), que inibem a apoptose e respostas do interferon. responsável pela codificação das proteínas virais contendo 10 genes.



FONTE: Adaptado BATTLE *et al.* (2019).

O RSV é classificado na família *Pneumoviridae* na ordem *Mononegavirales* (ESNEAU *et al.*, 2019), e existe como dois subgrupos antigénicos, tipo A e tipo B, que podem ser diferenciados pelo sequenciamento de nucleotídeos e pelo padrão de reação de anticorpos monoclonais à Glicoproteína (G) e a proteína de Fusão (F) (HOGAN *et al.*, 2018).

O vírion do RSV consiste em partículas esféricas de 100 a 350 nm formadas por nucleocapsídeo envolto num envelope lipídico derivado da membrana plasmática da célula hospedeira (COLLINS *et al.*, 2013), (**Figura 1.A**). O genoma viral do RSV consiste em RNA de cadeia simples de sentido negativo 3'-5' (CAO *et al.*, 2016) e não-segmentado de 15,2 kb organizado em 10 genes (ESNEAU *et al.*, 2019; XING & PROESMANS, 2019) que codificam, separadamente, 11 proteínas: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 e L, sendo que as proteínas M2-1 e M2-2 são codificadas pelo mesmo gene, M2 (CAO *et al.*, 2016; XING & PROESMANS, 2019) (**Figura 1.B**).

### 1.3 As proteínas do RSV

Ambas as proteínas G e F do RSV podem interagir com o polímero de açúcar heparan sulfato sendo fortemente glicosiladas. Embora a glicoproteína (G) seja conhecida como proteína de ligação devido às suas propriedades de ligação a glicosaminoglicanos, ela não é necessária para a infecção de células *in vitro*, e assim a proteína de Fusão (F) pode ter mais probabilidade de ter uma ligação específica ao receptor da membrana plasmática da célula hospedeira (BATONICK *et al.*, 2008; COLLINS *et al.*, 2013), porém a infecção *in vivo* requer a proteína G (LAY *et al.*, 2013).

A proteína G, com 298 resíduos de aminoácidos, além de ser responsável pela adsorção, é também um importante alvo para anticorpos neutralizantes (LAY *et al.*, 2013). As mais extensivas diferenças genéticas e antigénicas entre os tipos A e B do vírus estão localizados nesta glicoproteína devido a suas mutações (HOGAN *et al.*, 2018).

A proteína de Fusão (F), com 574 resíduos de aminoácidos, medeia a ligação do RSV a células hospedeiras, fusão das membranas lipídicas e distribuição do material genético do vírus ao citoplasma (HOGAN *et al.*, 2018; COLLINS *et al.*, 2013) e diferentemente da proteína G, a proteína F é bem conservada, tornando-a uma boa candidata para o desenvolvimento de vacinas. No entanto, é estruturalmente

complexa com múltiplas conformações e numerosos epítomos antigénicos (XIE *et al.*, 2018).

A SH é uma proteína transmembrana, de 64 resíduos de aminoácidos, e mesmo não sendo essencial para a infecção viral (SCHMIDT & VARGA, 2017), estudos sugerem que a SH pode ter um papel na fusão viral. Por ser uma viroporina, uma classe de proteínas virais pequenas, pode modificar a permeabilidade da membrana e inibir a apoptose da célula durante a infecção por formar uma estrutura semelhante a poros na membrana das células infectadas. Embora o papel exato da atividade dos canais iónicos SH na infecção pelo RSV permaneça incerto, esta proteína parece funcionar como um canal seletivo de cátions que altera a permeabilidade da membrana implicando em implicações importantes para a resposta imune (COLLINS *et al.*, 2013; LAY *et al.*, 2013; ARAUJO *et al.*, 2016; SCHMIDT & VARGA, 2017).

A proteína de Matriz (M), de 256 resíduos de aminoácidos, não é necessária para iniciar a formação de partículas virais, mas na sua ausência, as partículas permanecem atrofiadas e imaturas, pois a M está envolvida na montagem viral e brotamento (COLLINS *et al.*, 2013). É uma proteína fosforilada, não glicosilada, localizada externamente à camada de nucleocapsídeo, ligando o envelope da bicamada lipídica com o nucleocapsídeo. Assim, desempenha um papel na condução da interação coordenada entre os componentes estruturais virais, facilitando a montagem do vírus. A proteína M está presente em corpos de inclusão citoplasmáticos formados durante a infecção viral e é associada ao nucleocapsídeo, direcionando-o às regiões da membrana celular, onde se localizam as glicoproteínas virais (OLIVEIRA *et al.*, 2013; SHAHRIARI *et al.*, 2018).

A proteína M2-1, com 194 resíduos de aminoácidos, forma um tetrâmero e medeia a associação da proteína M com o nucleocapsídeo, formado pelas proteínas N, P, L e a M2-1 (OLIVEIRA *et al.*, 2013; BATTLES *et al.*, 2019). Funciona como um cofator transcricional do complexo RNA polimerase dependente de RNA, aumentando a processabilidade da polimerase, e previne a interrupção da transcrição prematura (TEIXEIRA *et al.*, 2017; GUIMARAES *et al.*, 2018). A proteína M2-2, com 88 ou 90 resíduos de aminoácidos, é responsável pela substituição da transcrição do RNA pela replicação do genoma. Ambas as proteínas têm suas funções principais desconhecidas (COLLINS *et al.*, 2013; REZAEI *et al.*, 2017).

A proteína Polimerase (L), com 2.165 resíduos de aminoácidos, consiste na principal subunidade de RNA polimerase dependente de RNA (TREMAGLIO *et al.*, 2013) e é responsável pela replicação do genoma viral (COLLINS *et al.*, 2013; SCHMIDT & VARGA, 2017).

A Nucleoproteína N, com 391 resíduos de aminoácidos, associa-se com o genoma para formar o complexo ribonucleoproteína (RNP) para encapsular tanto o genoma viral quanto o seu homólogo de sentido positivo. Assim, protege o genoma e reduz o reconhecimento pelos receptores de reconhecimento padrão da célula (SCHMIDT & VARGA, 2017). Além disso, proteína N modula a transcrição e replicação viral (ASENJO *et al.*, 2012; COLLINS *et al.*, 2013).

A Fosfoproteína (P), com 241 resíduos de aminoácidos, serve como um cofator importante para o complexo polimerase e auxilia na proteção do genoma do vírus, interagindo com a nucleoproteína (N) e a com a Polimerase (L) dependente de RNA, para formar o nucleocapsídeo (GALLOUX *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; ASENJO & VILLANUEVA, 2016).

As proteínas Não Estrutural 1 (NS1), com 139 resíduos de aminoácidos, e a proteína Não Estrutural 2 (NS2), com 124 resíduos de aminoácidos (COLLINS *et al.*, 2013), são expressas em células infectadas, em que os mRNAs são relativamente abundantes, devido à proximidade das suas extremidades 3' ao promotor no genoma de cadeia negativa (YANG *et al.*, 2015). A estrutura cristalográfica da proteína NS1 mostrou uma homologia estrutural com a proteína de Matriz (M) de *Monogavirales*, além de partilharem sequências significativas (CHATTERJEE *et al.*, 2017), porém, a proteína NS2 continua não apresentando nenhuma homologia com outras proteínas (SWEDAN *et al.*, 2009, LING *et al.*, 2009).

As proteínas NS não são essenciais para o processo de replicação do RSV, porém a deleção de qualquer um dos genes atenua significativamente a replicação *in vitro* e *in vivo* (SCHMIDT & VARGA, 2017). As proteínas NS desempenham um papel chave na subversão da resposta imune inata do hospedeiro e podem cooperar ou atuar individualmente para inibir a indução de interferon do tipo I (IFN) e genes estimulados por IFN (YANG *et al.*, 2015; COLLINS *et al.*, 2013). Podem, também, inibir a apoptose para prolongar a vida da célula e aumentar a eficiência da replicação (COLLINS *et al.*, 2013).

## 1.4 Ciclo replicativo viral

A infecção na célula hospedeira, especialmente nas células epiteliais das vias respiratórias, inicia-se com a adsorção do RSV pela ligação da proteína G às proteínas de superfície celular, permitindo que a proteína F do RSV se ligue a receptores *Toll-like* 4 (TLR4) na superfície celular, desencadeando a ativação de quinases que potencializam a entrada de partículas virais de RSV nas células hospedeiras alvo. Durante ou após a ligação ao receptor, o envelope viral se funde à membrana da célula hospedeira liberando o conteúdo da partícula viral infectante e, em seguida, ocorre a dissociação do complexo RNP da proteína de Matriz pela fosforilação da proteína P (GRIFFITHS *et al.*, 2017; LAY *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2013).

As proteínas envolvidas na transcrição do vírus podem ser transportadas da partícula viral para a célula-alvo pois, o RSV é um vírus de RNA de sentido negativo e o RNA genômico isolado não é infeccioso, ao contrário de muitos vírus de RNA de sentido positivo (GRIFFITHS *et al.*, 2017). Então, uma vez dentro do citoplasma, o RNA de fita simples sentido negativo é transcrito pela RNA polimerase viral para produzir RNA viral de sentido positivo. Os RNAs de sentido positivo são utilizados tanto como mRNA para a tradução das proteínas estruturais do vírus quanto servem de molde para a replicação do genoma, sendo que esses processos ocorrem simultaneamente no citoplasma celular (LAY *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2013).

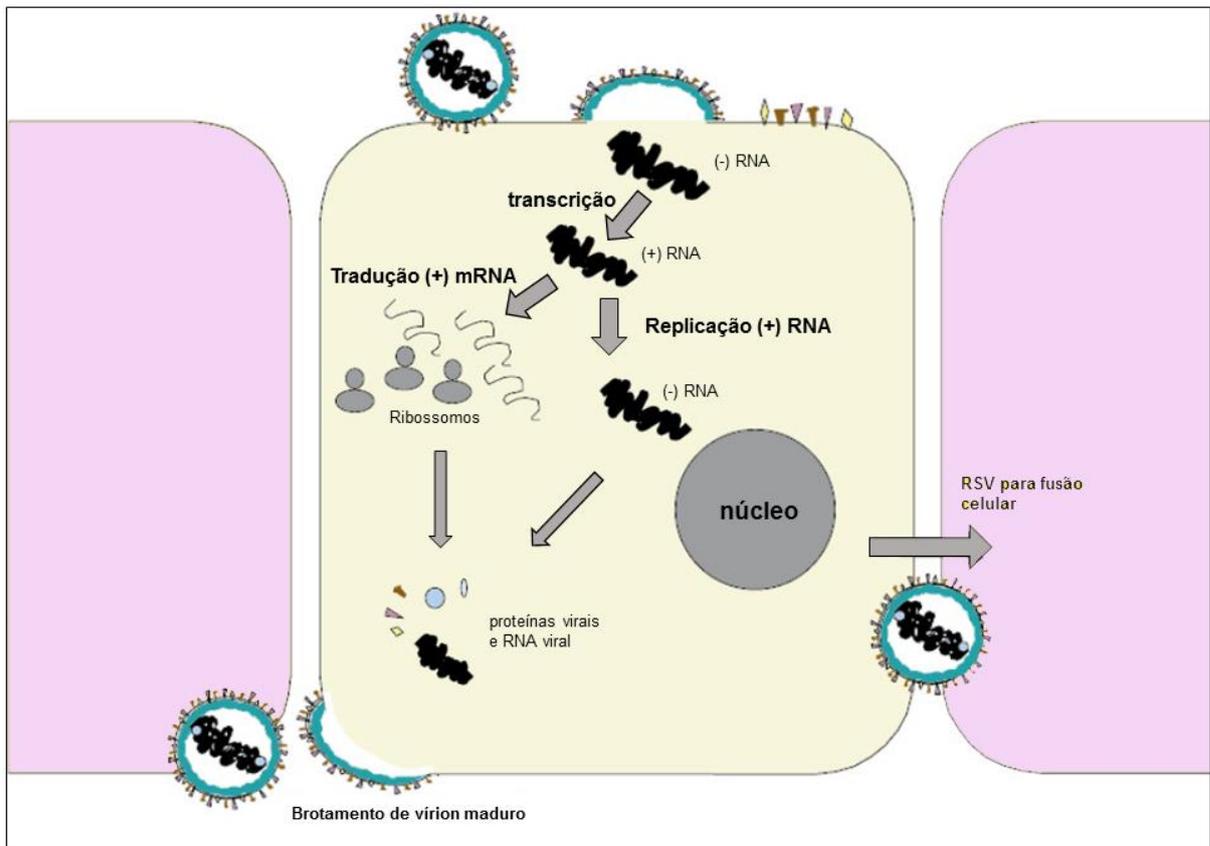
Após a síntese das proteínas e a replicação do material genético, a montagem e brotamento dos vírions maduros de RSV ocorrem na membrana plasmática, onde contém bolsas lipídicas modificadas pelo vírus envolvendo todas as proteínas de superfície virais e a proteína de Matriz (M). Dentro do vírion, a proteína M se liga à proteína M2-1 do complexo RNP e recruta esta estrutura para a membrana celular para a montagem do vírus e a ruptura das células infectadas para a fusão do vírus com células adjacentes (COLLINS *et al.*, 2013; HACKING *et al.*, 2002; LAY *et al.*, 2013). O ciclo replicativo viral é ilustrado na **Figura 2**.

Porém, a célula possui mecanismos para impedir a replicação viral reconhecendo por meio de receptores o material genético invasor e, assim, iniciando cascatas de respostas imunológicas. Os receptores consistem em receptores de *Toll-like* (TLRs), sendo o TLR3 e TLR4 os mais abundantes, que reconhecem qualquer RNA de cadeia dupla em compartimentos endocíticos, já o Gene Induzível pelo Ácido Retinóico 1 (RIG-I), membros da família de *like* receptores (RLR) detecta trifosfato

contendo RNA de cadeia simples no citoplasma durante o ciclo viral reprodutivo (SPANN *et al.*, 2005; LAY *et al.*, 2013). E tendo identificado o RNA viral, iniciam as cascatas de sinalização que ativam os fatores de transcrição nuclear *Factor-k $\beta$*  (NF- $\kappa$  $\beta$ ) e fatores reguladores de interferon 3 (IRF-3). Estes são translocados para o núcleo para promover a transcrição de genes pró-inflamatórios no pulmão.

A ativação de NF- $\kappa$  $\beta$  e IRF-3 é mediada pela RIG-I e o estimulador de promotor de interferon beta do tipo 1 (IPS-1) nos estágios iniciais da infecção por RSV e induzem a expressão de IFNs do tipo I, quimiocinas pró-inflamatórias, CCL5/RANTES e produção da interleucinas 8 (IL-8). Os IFNs do tipo I são moduladores importantes na resposta imune adaptativa, especialmente por ativar a resposta de células Nk (*natural killer*) e de células T citotóxicas (LAY *et al.*, 2013).

**Figura 2:** Ciclo replicativo do RSV. O vírus entra por fusão na membrana plasmática e libera seu RNA gênico senso negativo (preto) no citoplasma. A polimerase usa o genoma como molde para produzir RNAs senso positivo, que é utilizado tanto como mRNAs que traduzem proteínas virais quanto para a replicação e saem da célula hospedeira por brotamento pela membrana plasmática, produzindo vírions maduros descendentes que infectam outras células.



FONTE: adaptado de HACKING *et al.* (2002).

## 1.5 Papel das proteínas Não Estruturais (NS) na infecção viral

Uma vez que TLRs ativam caminhos que negligenciam uma infecção viral em desenvolvimento, o RSV possui mecanismos moleculares que suprimem a imunidade inata sem afetar a resposta inflamatória do hospedeiro. As proteínas NS1 e NS2 inibem os IFNs do tipo I, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (SCHMIDT & VARGA, 2017) das células epiteliais das vias respiratórias inibindo uma resposta imunológica de células T citotóxicas, especialmente a Th1 (LAY *et al.*, 2013) podendo cooperar ou agir individualmente para inibir a indução de IFNs de tipo I e genes estimulados por IFN (ISGs) (SPANN *et al.*, 2005).

A NS1 é a principal responsável pela supressão do IFN tipo I em células dendríticas humanas e foi relatada para co-localizar com a proteína de sinalização mitocondrial (MAVS) associada às mitocôndrias e o receptor *Toll-like* 3 (TLR3) (SCHMIDT & VARGA, 2017; PRETEL *et al.*, 2013), já a NS2 pode ligar-se ao N-terminal da RIG-I, que está envolvida na sinalização para a produção de IFN (LING *et al.*, 2009; SCHMIDT & VARGA, 2017). As ações das proteínas NS1 e NS2 impedem que o RIG-I e o MAVS se unam, resultando na inibição da ativação do IRF-3 e a fosforilação e translocação para o núcleo celular de IRF-3, destacando a importância das interações entre NS1 e NS2 com RIG-I e MAVS (OPENSHAW *et al.*, 2017; SCHMIDT & VARGA, 2017).

Alternativamente, a NS1 também pode inibir o IRF-3 por ligação direta ao IRF-3 e seu coativador transcricional, necessário para a atividade de ligação de DNA do IRF-3, o rompimento dessa interação pela NS1 impede que o IRF-3 se ligue e ative a transcrição do promotor do IFN- $\beta$  (OPENSHAW *et al.*, 2017; SCHMIDT & VARGA, 2017).

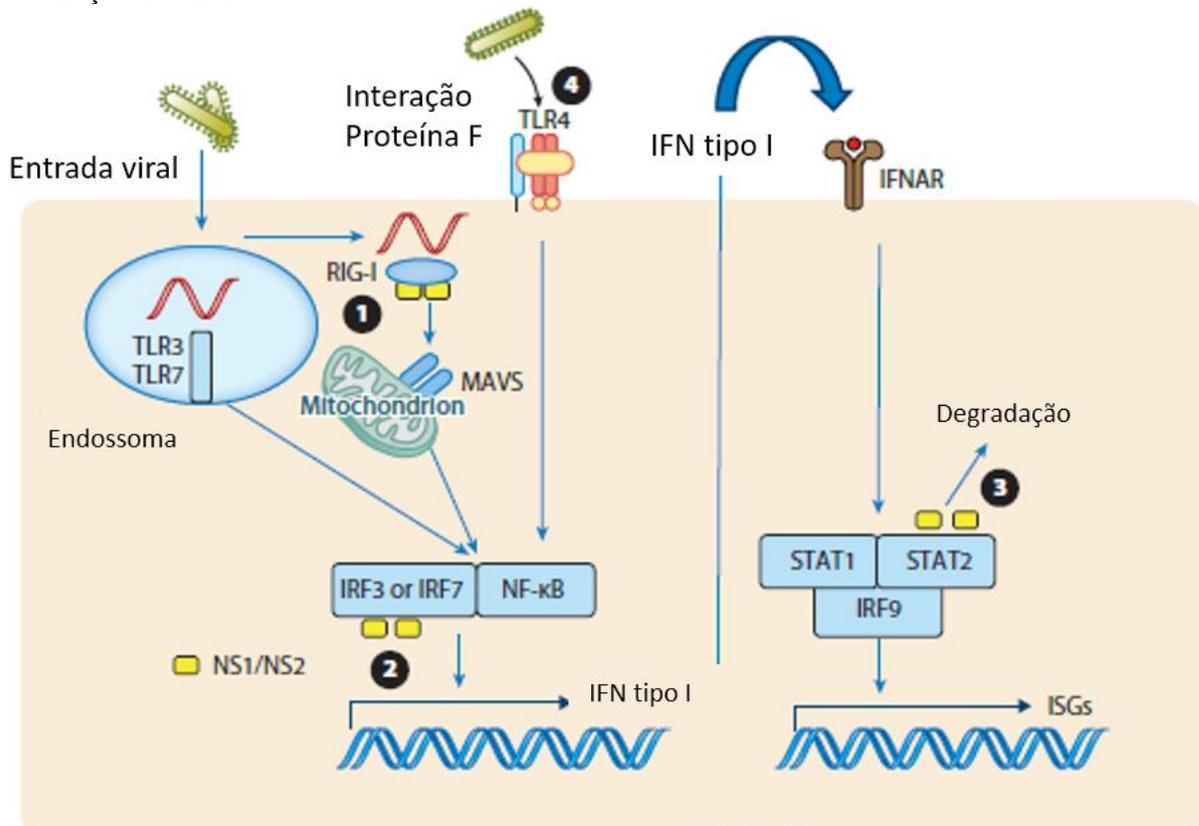
Tanto a NS1 como a NS2 previnem a apoptose precoce de uma forma independente do IFN e suprimem a maturação das células dendríticas e da resposta dos linfócitos T (YANG, *et al.* 2015). Com isso, NS1 inibe a diferenciação de linfócitos T através de mono-ubiquitinação, o que pode estar associado com aumento da susceptibilidade à asma após a infecção pelo RSV (LING e al., 2009; PRETEL *et al.*, 2013; LAY *et al.*, 2013).

O IFN- $\alpha$  e o IFN- $\beta$  ligam a receptores de IFN (IFNAR), que se multimeriza e se torna fosforilado por tirosinas quinases, tornando-se um local de ancoragem para as proteínas de sinalização STAT2 e STAT1. Essas proteínas se ativam e associam-se

ao IRF-9 e translocam-se para o núcleo, ativando a transcrição de vários ISGs. A NS1 e NS2 atuam cooperativamente para reduzir os níveis de STAT2 total degradando-as por agregação e, assim, impedem a transcrição de ISGs e, conseqüentemente, inibem a sinalização dependente de IFN, no entanto, as NS podem inibir a STAT2 em algum grau isoladamente (OPENSHAW *et al.*, 2017; SCHMIDT & VARGA, 2017).

A capacidade de reduzir a resposta antiviral da célula, em particular a resposta do IFN do tipo I, é um fator importante para a replicação viral e os múltiplos mecanismos que o RSV evoluiu para bloquear a resposta do IFN na célula mostra a importância desta inibição para o vírus (COLLINS *et al.* 2013; GRIFFITHS *et al.*, 2017; SCHMIDT & VARGAS, 2017). A **Figura 3** esquematiza as ações das proteínas NS1 e NS2 durante o bloqueio do interferon.

**Figura 3:** Inibição da resposta imune do hospedeiro pelas proteínas virais NS1 e NS2. O RSV pode entrar na célula hospedeira por interação da proteína F em receptores na membrana da célula (TLR4) ou por endocitose. Após a ativação dos receptores de reconhecimento de padrões, principalmente RIG-I, TLR4 e TLR3, por infecção por RSV nas células, IRF-3 e NF- $\kappa$ B são translocados para o núcleo, promovendo a transcrição de genes pró-inflamatórios no pulmão, incluindo IFN e genes estimulados por Interferon. Porém, (1) a proteína NS2 do RSV liga-se ao RIG-I e prejudica a sinalização inata via MAVS e (2) a NS1 perturba a ligação de IRF3 ao promotor de IFN- $\beta$ . (3) A NS1 e NS2 aumentam a degradação de STAT2. (4) A proteína F do RSV liga-se ao TLR4 e pode dessensibilizar as vias de sinalização de TLR.



FONTE: adaptado de OPENSHAW *et al.* (2017).

## 1.6 Flavonoides

Os Flavonoides são compostos de baixo peso molecular de origem natural, sendo encontrados em quase todos os alimentos vegetais, como frutas, vegetais e sementes, assim como em bebidas, como o vinho tinto, chá, café e cerveja. Embora não sejam sintetizados pelo Ser Humano nem por outros animais (TARAHOVSKY *et al.*, 2014; DANIHELOVÁ *et al.*, 2012), são importantes componentes da dieta humana e, geralmente, considerados não nutrientes por não terem valor nutricional (BEHLING *et al.*, 2004).

O termo flavonoide deriva do latim '*flavus*', que significa amarelo, e durante muito tempo foram conhecidos como 'pigmento das flores', por serem considerados responsáveis pela tonalidade amarela, laranja e vermelha das flores e folhas durante o outono (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Descobertos pelo bioquímico Alberto Gyorgi, possuem propriedades antioxidantes (ALVES *et al.*, 2007), anti-inflamatória, antialérgica e antitumoral e antiviral. Sabe-se que a quercetina tem atividade antiviral contra o vírus herpes simples do tipo I e vírus parainfluenza do tipo 3. De modo semelhante, foi demonstrado que a morina é eficaz contra o vírus herpes, porém a rutina não tem qualquer atividade antiviral para este vírus (KAUL *et al.*, 1985). Os flavonoides também possuem atividade vasodilatadora, analgésica, anti-hepatotóxica, bem como atividade antimicrobiana (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Os flavonoides são moléculas que possuem papel protetor da saúde humana atuando contra toxinas e infecções (ALMEIDA *et al.*, 2004; DANIHELOVÁ *et al.*, 2012), por influenciarem nas propriedades físicas e estruturais da bicamada lipídica podendo agir na transdução de sinais celulares e regulação do metabolismo. Além disso, são capazes de são mais solúveis em regiões ou ambientes hidrofóbicos como na interfase das membranas biológicas, particularmente nas regiões contendo colesteróis da membrana celular (TARAHOVSKY *et al.*, 2014).

As classes de flavonoides diferem-se no nível de oxidação e no modelo de substituição da cadeia heterocíclica C e sua grande diversidade estrutural é devida a modificações que esses compostos podem sofrer, como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação (ALMEIDA *et al.*, 2004). Mas todos os compostos possuem como estrutura básica um esqueleto de difenil propano (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>) com dois anéis

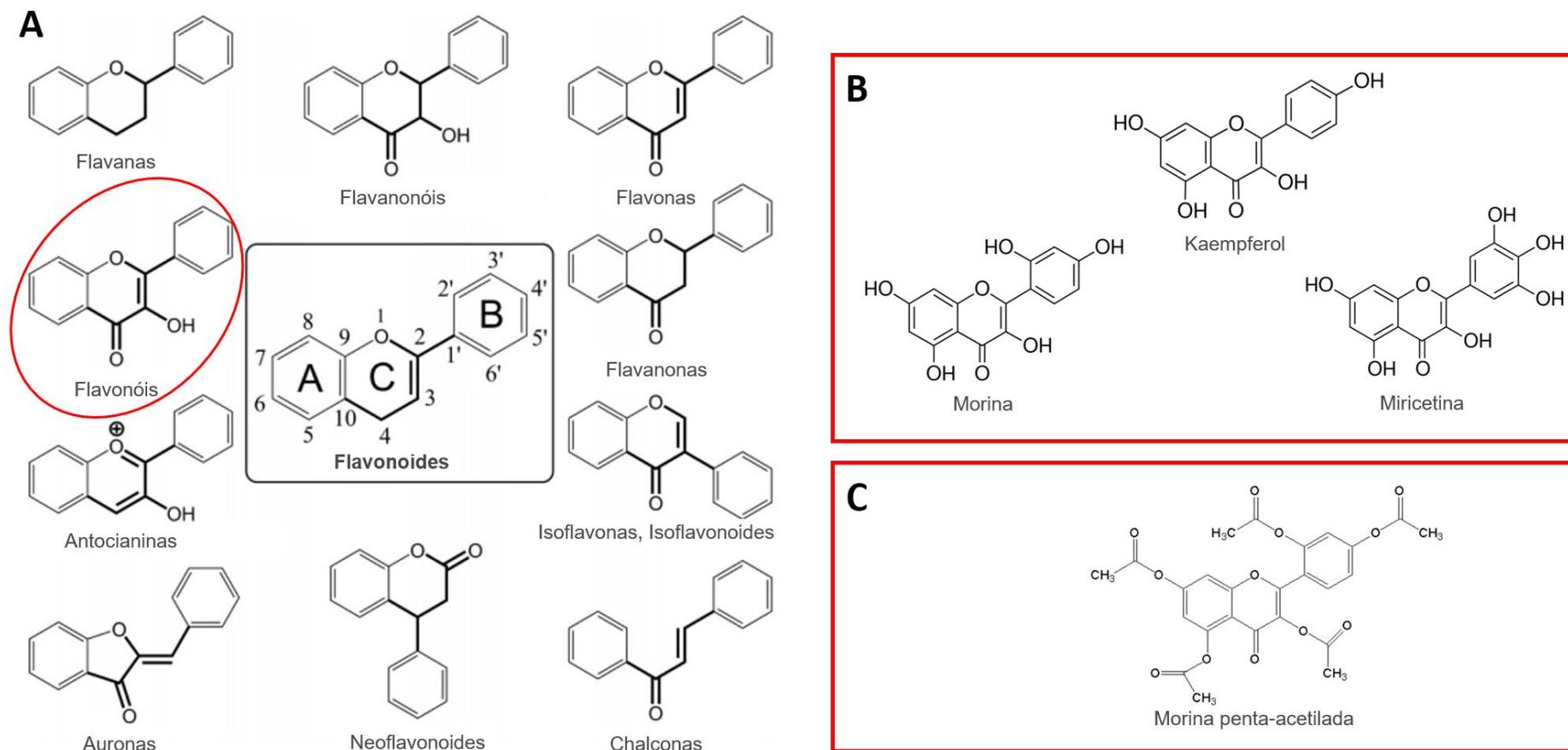
benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (**Figura 4.A**) (BEHLING *et al.*, 2004; TARAHOVSKY *et al.*, 2014).

Os flavonoides utilizados neste trabalho são da família das flavonol (**Figura 4.A**), sendo eles a miricetina, kaempferol e morina (**Figura 4.B**). Além disso, estudou-se um derivado de morina, morina penta-acetilada (**Figura 4.C**), que contém cinco substituições de hidroxilas por acetilações. Como já foi demonstrado que a quercetina (**Figura 5**) possui atividade antiviral no RSV em cultura de célula (ZAKARYAN *et al.*, 2017), buscou-se uma molécula da mesma família que pudesse ter uma atividade antiviral pelo RSV, atuando como um inibidor de proteína viral.

A morina (**Figura 4.B**) é um dos flavonóis mais comuns presentes na natureza, e especialmente abundante em cebola, folhas de goiabeira e algas (WANG *et al.*, 2014). Este flavonol possui propriedades antioxidantes e protege as células contra os danos causados pelos radicais livres. As propriedades antioxidantes da morina são direcionadas à eliminação de hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) e ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), espécies altamente reativas, devido as hidroxilas de sua estrutura doarem um átomo de hidrogênio aos radicais e, assim, inibir a peroxidação lipídica (ZENG *et al.*, 1997; NAFISI *et al.*, 2008; GUSDINER *et al.*, 2011), e também apresenta propriedades antibacteriana, anti-inflamatória e antiviral para o vírus da herpes (SUCIPTO *et al.*, 2017).

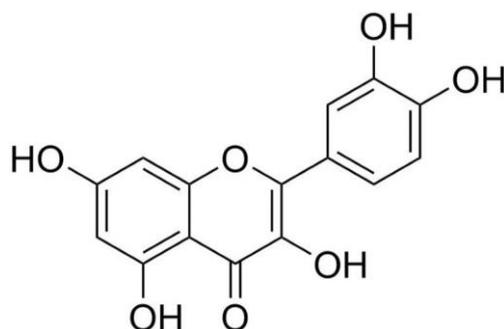
O estudo de GUSDINER *et al.* (2011) sugeriu que a acetilação protege os grupos hidroxila da quercetina de reações metabólicas, como metilação, sulfatação ou glicosilação, melhorando a ação anti-inflamatória em úlcera gástrica de ratos, já que esses metabolitos não possuem ação anti-inflamatória. Em outro estudo, de SANTOS *et al.* (2003), a ação antiviral de compostos polihidrosteróis sulfatados aumentou com a adição de acetilação em testes de culturas de célula com o vírus. Mediante estes estudos (GUSDINER *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2003) e ao fato de a morina ser um dos flavonoides mais abundantes na natureza, a acetilação deste flavonoide poderia ter uma ação antiviral melhorada, tendo, então, produzido um produto derivado da morina, morina penta acetilada (**Figura 4.C**).

**Figura 4:** Estrutura química dos flavonoides. **(A)** Ao centro tem-se a estrutura básica dos flavonoides sendo os anéis A e B anéis benzênicos e o anel C é pirano, e ao redor, estruturas dos grupos que compõem os flavonoides **(B)**. Flavonoides da família flavonol utilizados neste estudo. **(C)** Morina penta acetilada onde os grupos hidroxilas da estrutura da morina foram substituídas por grupos acetil. As estruturas em A e C foram construídas pelo software ChemDraw.



FONTE: adaptada de TARHOVSKY *et al.* (2014)

**Figura 5:** Estrutura química do flavonoide quercetina. A quercetina é um flavonoide do grupo flavonol, contendo cinco grupos hidroxila em sua estrutura, nas posições 5, 7, 3' e 4' nos anéis benzênicos, além da hidroxila fixa ao grupo flavonol na posição 3 do anel pirano.



FONTE: SIGMA<sup>1</sup>

A miricetina (**Figura 4.B**) é um composto fenólico muito comum em frutas vermelhas, vegetais e em chás e vinhos e possui variações glicosiladas. Foi isolada pela primeira vez no final do século XVIII, a partir da casca de *Myrica esculenta* (Myricaceae), colhidas na Índia, pelo interesse na propriedade de tingimento do composto, que forma cristais amarelos de cor clara (SEM WAL *et al.*, 2016).

Este flavonoide apresenta atividades anti-inflamatórias, analgésicas, antitumorais, hepatoprotetores, antidiabéticas e antivirais (SEM WAL *et al.*, 2016), e foi demonstrado que a combinação de miricetinas glicosiladas possuem atividade antiviral contra o vírus da herpes (MEDINI *et al.*, 2016) e HIV (ORTEGA *et al.*, 2017), sugerindo que a mesma ação ocorra com a miricetina. A miricetina, e outros flavonoides com grupos hidroxilas, possui atividade antiviral contra RSV, sugerindo que tais características estruturais poderiam aumentar a atividade antiviral, sendo um grande potencial na prevenção e tratamento da infecção por RSV (SONG *et al.*, 2016).

O kaempferol (**Figura 4.B**) é um flavonol natural encontrado em brócolis, repolho, feijão, tomate, morango e maçã. Foi descoberto que o kaempferol exercia atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antivactericidas e antitumoral (CHEN & CHEN, 2013). E dois trabalhos (LANI *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2016) evidenciaram que o kaempferol possui função antiviral contra Chikungunya e contra infecção por vírus da herpes bovina, além de terem efeitos anti-inflamatórios mediados por macrófagos (ZHU *et al.*, 2018).

Os compostos naturais têm sido estudados em várias áreas, incluindo aqueles relacionados ao desenvolvimento de medicamentos antivirais, devido à sua alta

<sup>1</sup> <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>

disponibilidade e baixa toxicidade (ZAKARYAN *et al.*, 2017). Por isso, a busca por um potencial ligante às proteínas virais associados com estudos em cultivo celular buscam, nesta classe de moléculas, potenciais inibidores de infecções provocadas por RSV. Além disso, é de suma importância a investigação de possíveis antivirais para um tratamento acessível e com baixos efeitos adversos. Sendo necessário expandir os conhecimentos e investigar o melhor alvo assim como o inibidor de maior eficiência, para desta forma, propor desenho de moléculas mais eficientes na absorção celular.

## 6 CONCLUSÃO

A proteína NS1 do RSV foi expressa, purificada em alto grau de pureza.

A estimativa de estrutura secundária por dicroísmo circular mostrou que a proteína apresenta 15% de  $\alpha$ -hélice, 31% de folha- $\beta$ , 54% de voltas e estruturas aleatórias. E possui flexibilidade em sua  $\alpha$ -hélice próxima ao C-terminal, evidenciada pela DM.

Em relação a estabilidade térmica, todos os flavonoides estudados tiveram resultados próximos e com a maior contribuição por interações hidrofóbicas na formação espontânea do complexo NS1-ligante e entropicamente dirigidas.

A ordem dos flavonoides de acordo com o valor da constante de ligação ( $k_b$ ) em 37 °C foi kaempferol>morina penta acetilada>morina $\geq$ miricetina.

Os cálculos da abordagem computacional corroboram com os resultados experimentais, fornecendo um detalhamento das contribuições hidrofóbicas na interação dos flavonoides com a proteína NS1 e a influência da estrutural dos flavonoides na formação do complexo.

A interação dos ligantes com a proteína poderia reduzir a flexibilidade da  $\alpha$ -hélice próxima ao C-terminal, perturbando a interação da NS1 com outras moléculas na via do IFN.

Os dados experimentais e computacionais obtidos neste trabalho evidenciam o indício de que a região da  $\alpha$ -hélice próxima ao C-terminal ser uma possível região de interações intermoleculares sendo necessário investigações por espectroscopia de RMN e simulação de dinâmica molecular do complexo para se determinar com precisão o sítio e a flexibilidade da região de ligação.

## 8 BIBLIOGRAFIA

ALLEWELL, N. M.; NARHI, L. O.; RAYMENT, I. *Molecular Biophysics for the Life Sciences*. Springer, 2013.

ALMEIDA, J. R. G. S., LIMA, J. T., NUNES, X. P., CERQUEIRA, G. S., FIGUEIREDO, C. S. Flavonóides da dieta e sua importância para a saúde humana. *Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança*, v.2, p.65-76, 2004.

ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. *Diálogos & Ciência*, v. 3, p. 1-8, 2007.

ARAUJO, G.C., SILVA, R.H., SCOTT, L.P., ARAUJO, A.S., SOUZA, F.P., DE OLIVEIRA, R.J. Structure and functional dynamics characterization of the ion channel of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein (SH) transmembrane domain by combining molecular dynamics with excited normal modes. *Journal of molecular modeling*, 22(12), p.286. 2016.

ASENJO, A. & VILLASNUEVAS, N. Phosphorylation of the human respiratory syncytial virus P protein mediates M2-2 regulation of viral RNA synthesis, a process that involves two P proteins. *Virus Research*: v. 211, p. 117–125, 2016.

ASENJO, A.; CUESTA, I.; VIVO, A.; VILLANUEVA, N. Phosphorylation of the human respiratory syncytial virus N protein provokes a decrease in viral RNA synthesis. *Virus Research*, v. 163, p. 396–400. 2012.

BATONICK, M.; OOMENS, A. G. P.; WERTZ, G. W. Human Respiratory Syncytial Virus glycoproteins are not required for apical targeting and release from polarized epithelial cells. *Journal of Virology*, v. 82, n. 17, p. 8664-8672, 2008.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 5(3): p. 285-292, 2004.

BERENDSEN, H.J., VAN DER SPOEL, D., VAN DRUNEN, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer physics communications*, 91(1-3), pp.43-56. 1995.

CAO, Y.G., HAO, Y., LI, Z.H., LIU, S.T., WANG, L.X. Antiviral activity of polysaccharide extract from *Laminaria japonica* against respiratory syncytial virus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, p.1705-1710. 2016.

CARUSO, ICARO P. Estudo da interação entre flavonóides e a Albumina do soro humano. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 2012.

CHATTERJEE, S., LUTHRA, P., ESAULOVA, E., AGAPOV, E., YEN, B. C., BOREK, D. M., EDWARDS, M. R., MITTAL, A., JORDAN, D., RAMANAN, P., MOORE, M. L., PAPPU, R. V., HOLTZMAN, M. J., ARTYOMOV, M. N., BASLER, C. F., AMARASINGHE, G. K., LEUNG, D. W. Structural basis for human respiratory syncytial virus NS1-mediated modulation of host responses. *Nature microbiology*, v. 2, n. 9, p. 17101, 2017.

CHEN, A.Y. & CHEN, Y.C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food chemistry*, 138(4), p.2099-2107. 2013.

COLLINS, P. L. & GRAHAM, B. S. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *Journal of virology*, v. 82, n. 5, p. 2040–2055. 2008.

COLLINS, PETER L.; FEARN, R.; GRAHAM, B. S. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines*: 372, p. 3–38, 2013.

CULLEN, L.M., SCHMIDT, M.R., MORRISON, T.G. Effect of Previous Respiratory Syncytial Virus Infection on Murine Immune Responses to F and G Protein Containing Virus-like Particles. *Journal of virology*, p. JVI-00087. 2019.

DANIHELOVÁ, M., VISKUPIČOVÁ, J., ŠTURDÍK, E. Lipophilization of flavonoids for their food, therapeutic and cosmetic applications. *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), p.59-69. 2012.

DeLano, W.L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography*, 40(1), p.82-92. 2002.

ESNEAU, C., RAYNAL, B., ROBLIN, P., BRÛLÉ, S., RICHARD, C.A., FIX, J., ELÉOUËT, J.F., GALLOUX, M. Biochemical characterization of the respiratory

syncytial virus N0-P complex in solution. *Journal of Biological Chemistry*, p.jbc-RA118. 2019.

FASMAN, G. D, Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Plenum Press, New York, ed. 1°. 1996.

FEROZ, S. R., MOHAMAD, S. B., LEE, G. S., MALEK, S. N. A., & TAYYAB, S. Supramolecular interaction of 6-shogaol, a therapeutic agent of *Zingiber officinale* with human serum albumin as elucidated by spectroscopic, calorimetric and molecular docking methods. *Phytomedicine*, 22(6), p. 621-630. 2015.

GALLOUX, M., TARUS, B., BLAZEVIC, I., FIX, J., DUQUERROY, S., ELÉOUËT, J.F. Characterization of a viral phosphoprotein binding site on the surface of the respiratory syncytial nucleoprotein. *Journal of virology*, 86(16), p.8375-8387. 2012.

GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTILER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M. R., APPEL, R. D., BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbooks*. Humana Press. p. 571-607. 2005.

GORDON, J. C.; MYERS, J. B.; FOLTA, T.; SHOJA, V.; HEATH, L. S.; ONUFRIEV, A. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Research*. (Web Server issue): v. 33, p. W368-W371. 2005.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature protocols*, v.1 n. 6, 2006.

GRIEP, M.A., BLOOD, S., LARSON, M.A., KOEPEL, S.A. AND HINRICHS, S.H. Myricetin inhibits *Escherichia coli* DnaB helicase but not primase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(22), p.7203-7208. 2007.

GRIFFITHS, C., DREWS, S.J., MARCHANT, D.J. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), p.277-319. 2017.

GRIMSLEY, G.R., PACE, C.N. Spectrophotometric determination of protein concentration. *Current protocols in protein science*, 33(1), pp.3-1. 2003.

GUIMARÃES, G.C., PIVA, H.R., ARAÚJO, G.C., LIMA, C.S., REGASINI, L.O., DE MELO, F.A., FOSSEY, M.A., CARUSO, Í.P., SOUZA, F.P. Binding investigation

- between M2-1protein from hRSV and acetylated quercetin derivatives: <sup>1</sup>H NMR, fluorescence spectroscopy, and molecular docking. *International journal of biological macromolecules*, 111, pp. 33-38. 2018.
- GUSDINAR, T., HEROWATI, R., KARTASASMITA, R.E., ADNYANA, I.K. Anti-inflammatory and antioxidant activity of quercetin-3, 3', 4'-triacetate. *Journal of pharmacology and toxicology*, 6, pp.182-188. 2011.
- HACKING, D.; HULL, J. Respiratory Syncytial Virus – Viral Biology and the Host Response. *Journal of infection*, v. 45, pp. 18-24, 2002.
- HOGAN, C.A., CAYA, C., PAPENBURG, J. Rapid and simple molecular tests for the detection of respiratory syncytial virus: a review. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(7), pp. 617–629. 2018.
- HU, X., KAPLAN, D., CEBE, P. Dynamic protein– water relationships during  $\beta$ -sheet formation. *Macromolecules*, 41(11), pp.3939-3948. 2008.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, v. 14, pp. 33-38. 1996.
- IM, K., KIM, J., MIN, H. Ginseng, the natural effectual antiviral: protective effects of Korean Red Ginseng against viral infection. *Journal of ginseng research*, 40(4), pp.309-314. 2016.
- JO, Y.M., KIM, J., CHANG, J. Vaccine containing G protein fragment and recombinant baculovirus expressing M2 protein induces protective immunity to respiratory syncytial virus. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 8(1), pp.43-53. 2019.
- KAUL, T. N.; MIDDLETON, E.; OGRA, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*. v. 15, pp. 71-79, 1985.
- LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, Ed. 3, 2006.
- LANI, R., HASSANDARVISH, P., CHIAM, C.W., MOGHADDAM, E., CHU, J.J.H., RAUSALU, K., MERITS, A., HIGGS, S., VANLANDINGHAM, D., BAKAR, S.A., ZANDI, K. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Scientific reports*, 5, pp.11421. 2015.

- LAY, M. L.; GONZÁLEZ, P. A.; LEÓN, M. A.; CÉSPEDES, P. F.; BUENO, S. M.; RIEDEL, C. A.; KALERGIS, A. M. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes and Infection*, v. 15, pp. 230-242, 2013.
- LING, Z.; TRAN, K. C.; TENG, M. N. Human Respiratory Syncytial Virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *Journal of Virology*, v. 83, n. 08, pp. 3734-3742, 2009.
- MEDINI, F., MEGDICHE, W., MSHVILDADZE, V., PICHETTE, A., LEGAULT, J., ST-GELAIS, A. AND KSOURI, R. Antiviral-guided fractionation and isolation of phenolic compounds from *Limonium densiflorum* hydroalcoholic extract. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), pp. 726-732. 2016.
- MORRIS, J.A., BLOUNT JR, R.E., SAVAGE, R.E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with goryza. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92(3), pp. 544-549. 1956.
- MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K. B.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of Computational Chemistry*. v. 19, pp. 1639-1662. 1998.
- NAFISI, S., HASHEMI, M., RAJABI, M., TAJMIR-RIAHI, H. A. DNA Adducts with Antioxidant Flavonoids: Morin, Apigenin, and Naringin. *DNA and Cell Biology*, 27(8), pp. 433–442. 2008.
- OLIVEIRA, A. P.; SIMABUCO, F. M.; TAMURA, R. E.; GUERRERO, M. C.; RIBEIRO, P. G. G.; LIBERMANN, T. A.; ZERBINI, L. Z.; VENTURA, A. M. Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. *Virus Research*, v. 177, pp. 108–112. 2013.
- OPENSHAW, P.J., CHIU, C., CULLEY, F.J., JOHANSSON, C. Protective and harmful immunity to RSV infection. *Annual review of immunology*, 35, pp. 501-532. 2017.
- ORTEGA, J.T., SUÁREZ, A.I., SERRANO, M.L., BAPTISTA, J., PUJOL, F.H. AND RANGEL, H.R. The role of the glycosyl moiety of myricetin derivatives in anti-HIV-1 activity in vitro. *AIDS research and therapy*, 14(1), pp.57. 2017.

- PENG, X., ZHANG, G., LIAO, Y., GONG, D. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on  $\alpha$ -glucosidase. *Food chemistry*, 190, pp.207-215. 2016.
- PRETEL, E.; CAMPOREALE, G.; TRAT-GAY, G. The Non-Structural NS1 Protein Unique to Respiratory Syncytial Virus: A Two-State Folding Monomer in Quasi-Equilibrium with a Stable Spherical Oligomer. *PLOS ONE*: v. 8, n. 9, ed. 74338, 2013.
- REITZ, J.R., MILFORD, F.J., CHRISTY, R.W. Foundations of electromagnetic theory. *Addison-Wesley Publishing Company*. 2008.
- REZAEI, F., LINFIELD, D.T., HARFORD, T.J., PIEDIMONTE, G. Ongoing developments in RSV prophylaxis: a clinician's analysis. *Current opinion in virology*, 24, pp.70-78. 2017.
- SANNER, MICHEL F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 1999, Vol 17, February. pp. 57-61. 1999.
- SANTOS, G.A.G., MURRAY, A.P., PUJOL, C.A., DAMONTE, E.B., MAIER, M.S. Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of 2 $\beta$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -cholestane. *Steroids*, 68(2), pp.125-132. 2003.
- SCHMID, N.; EICHENBERGER, A. P.; CHOUTKO, A.; RINIKER, S.; WINGER, M.; MARK, A. E.; van GUNSTEREN, W. F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal*. v. 40(7). pp. 843. 2011.
- SCHMIDT, M.E. & VARGA, S.M. Modulation of the host immune response by respiratory syncytial virus proteins. *Journal of Microbiology*, 55(3), pp.161-171. 2017.
- SEMPLE, M. G.; DANKERT, H. M.; EBRAHIMI, B. et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infants is associated with reduced airway interferon gamma and substance P. *PLoS ONE*, n. 10, 2007.
- SEMWAL, D. K., SEMWAL, R. B., COMBRINCK, S., VILJOEN, A. Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*, 8(2), pp.90. 2016.
- SHAHRIARI, S., WEI, K.J, GHILDYAL, R. Respiratory syncytial virus matrix (M) protein interacts with actin in vitro and in cell culture. *Viruses*, 10(10), pp.535. 2018.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental. Porto Alegre: Bookma, Ed. 5. 2002.

SONG, M., GAO, M.H., HUANG, W.H., LI, M.M., LI, H., LI, Y.L., ZHANG, X.Q. AND YE, W.C. Flavonoids from the Seeds of *Hovenia acerba* and Their In vitro Antiviral Activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 6(6). 2016.

SPANN, K. M.; TRAN, K. C.; COLLINS, P. L. Effects of proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF- $\kappa$ B, and proinflammatory cytokines. *Journal of Virology*, v. 79, n. 09, pp. 5353-5362, 2005.

SREERAMA, N.; WODDY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry*, 287 (2): 252–260, 2000.

STROET, M., CARON, B., VISSCHER, K.M., GEERKE, D.P., MALDE, A.K., MARK, A.E. Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. *Journal of chemical theory and computation*, 14(11), pp.5834-5845. 2018.

SUCIPTO, T.H., CHURROTIN, S., SETYAWATI, H.S., MULYATNO, K.C., AMARULLAH, I.H., UEDA, S., KOTAKI, T., SUMARSIH, S., WARDHANI, P., BENDRYMAN, S.S., ARYATI, A. INHIBITORY ACTIVITY OF COBALT (II)–MORIN COMPLEX AGAINST THE REPLICATION OF DENGUE VIRUS TYPE 2. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, 6(6), pp.141-144. 2017.

SWEDAN, S.; MUSIYENKO, A.; BARIK, S. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease multiple members of the cellular interferon pathways. *Journal of Virology*, 85(19): 10090–10100, 2009.

TARHOVSKY, Y.S., KIM, Y.A., YAGOLNIK, E.A., MUZAFAROV, E.N. Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(5), pp.1235-1246. 2014.

TEIXEIRA, T.S.P., CARUSO, Í.P., LOPES, B.R.P., REGASINI, L.O., DE TOLEDO, K.A., FOSSEY, M.A., DE SOUZA, F.P. Biophysical characterization of the interaction between M2-1 protein of hRSV and quercetin. *International journal of biological macromolecules*, 95, p .63-71. 2017.

- TENG, Y., ZHANG, H., LIU, R. Molecular interaction between 4-aminoantipyrine and catalase reveals a potentially toxic mechanism of the drug. *Molecular BioSystems*, 7(11), pp.3157-3163. 2011.
- TREMAGLIO, C. Z.; NOTON, S. L.; DEFLUBÉ, L. R.; FEARNES, R. Respiratory Syncytial Virus Polymerase Can Initiate Transcription from Position 3 of the Leader Promoter. *Journal of Virology*, v. 87, n. 6, pp. 3196–3207. 2013.
- VALEUR, BERNARD. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Willey-VCH. 2002.
- VERLI, H. *Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular*. 2014.
- WANG, Y., ZHANG, G., YAN, J., GONG, D. Inhibitory effect of morin on tyrosinase: insights from spectroscopic and molecular docking studies. *Food chemistry*, 163, pp.226-233. 2014.
- XIE, Q.; WANG, Z.; NI, F.; CHEN, X.; MA, J.; PATEL, N.; LU, H.; LIU, Y.; TIAN, J.H.; FLYER, D.; MASSARE, M.J. Structure basis of neutralization by a novel site II/IV antibody against respiratory syncytial virus fusion protein. *PloS one*, v. 14, n. 2, 2019.
- XING, Y. & PROESMANS, M. New therapies for acute RSV infections: where are we?. *European journal of pediatrics*, pp.1-8. 2019.
- YANG, P.; ZHENG, J.; WANG, S.; LIU, P.; XIE, M.; ZHAO, D. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2 are crucial pathogenic factors that modulate interferon signaling and Treg cell distribution in mice. *Virology*. v. 485, pp. 223-232. 2015.
- YUNTA, M.J. Docking and ligand binding affinity: uses and pitfalls. *American Journal of Modeling and Optimization*, v. 4, pp.74-114, 2016.
- ZAKARYAN, H., ARABYAN, E., OO, A., ZANDI, K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of virology*, v. 162, n. 9, pp.2539-2551, 2017.
- ZHANG, L.; PEEPLES, M. E.; BOUCHER, R. C.; COLLINS P. L.; PICKLES R. J. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *Journal of Virology*. v. 76, n 11, pp. 5654–5666, 2002.

ZHU, L.; WANG, P.; YUAN, W.; ZHU, G. Kaempferol inhibited bovine herpesvirus 1 replication and LPS-induced inflammatory response. *Acta virologica*, v. 62, n. 2, pp. 220-225, 2018.

ZENG, L.-H.; WU, J.; FUNG, B.; TONG, J. H.; MICKLE, D.; WU, T.-W. Comparative protection against oxyradicals by three flavonoids on cultured endothelial cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 75(6), pp. 717–720, 1997.

ROSSEY, I; SEDEYN, K.; BAETS, SARAH DE; SCHEPENS, B.; SAELENS, X. CD8+T cell immunity against human respiratory syncytial virus. *Vaccine*. v. 32, pp. 6130–6137, 2014.