

RESSALVA

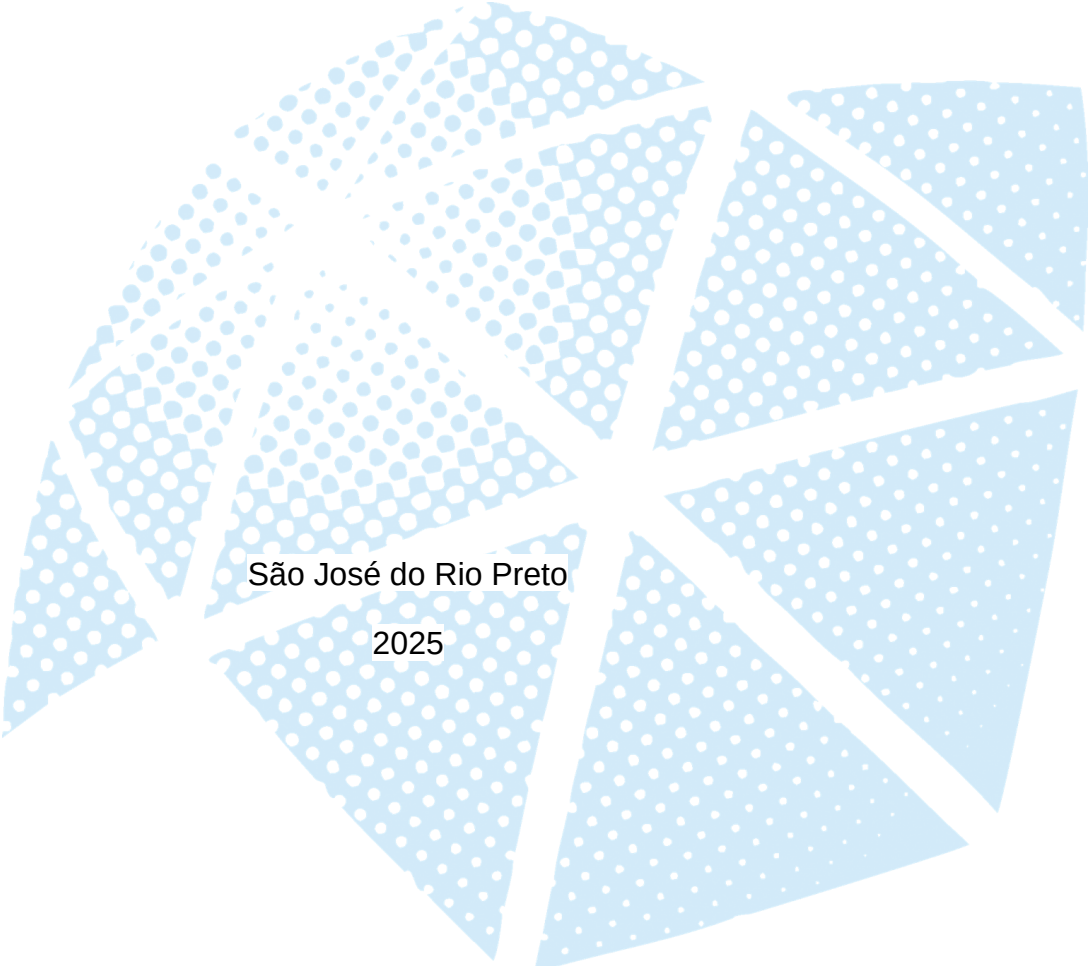
Atendendo solicitação da autora, o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 28/02/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

Instituto de Biociências, Letras e Exatas - Campus de São José do Rio Preto

Jéssica Maróstica de Sá

**Cumarinas e hesperetina como candidatas antivirais contra o vírus Sincicial
Respiratório Humano**



São José do Rio Preto

2025

Jéssica Maróstica de Sá

**Cumarinas e hesperetina como candidatas antivirais contra o vírus
Sincicial Respiratório Humano**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Exatas, São José do Rio Preto, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas.

Área de Concentração:
Farmacologia e Biotecnologia

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

Coorientador: Prof^o Dr^o. Ícaro
Putinhon Caruso

Coorientador: Dr^o Mark Edward
Peeples

São José do Rio Preto

2025

S111c

Sá, Jéssica Maróstica de

Cumarinas e hesperetina como candidatas antivirais contra o vírus Sincial Respiratório Humano / Jéssica Maróstica de Sá. -- São José do Rio Preto, 2025

144 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.

Orientadora: Fátima Pereira de Souza

Coorientador: Ícaro Putinhon Caruso

Coorientador: Mark Edward Peebles

1. Virologia. 2. Compostos Naturais. 3. hRSV. 4. Cumarinas. 5. Hesperetina.
I. Título.

Jéssica Maróstica de Sá

**Cumarinas e hesperetina como candidatas antivirais contra o vírus
Sincicial Respiratório Humano**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Exatas, São José do Rio Preto, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas

Área de Concentração: Farmacologia e Biotecnologia

Data da defesa: 28/02/2025

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Exatas - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto
USP - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto

Prof. Dr. Edison Luiz Durigon
USP - Universidade de São Paulo - São Paulo – SP

Profa. Dra. Paula Rahal
UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Exatas - São José do Rio Preto

Profa. Dra. Célia Regina Nogueira de Camargo
UNESP – Faculdade de Medicina de Botucatu

Agradecimentos

A realização desta tese seria impossível sem o apoio, carinho e dedicação de tantas pessoas e instituições que de forma direta ou indireta, estiveram ao meu lado durante essa caminhada. Cada gesto, palavra de incentivo, troca de ideias e ato de amor contribuiu para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza, dedico minha mais sincera e profunda gratidão. Sua paciência, sua imensa sabedoria e a maneira generosa como compartilha conhecimento foram verdadeiros pilares nesta jornada. Cada orientação e cada conselho foram como bússolas que me ajudaram a trilhar o caminho certo, e sua confiança em mim foi um estímulo essencial. Sua dedicação vai muito além da ciência, foi uma verdadeira mentoria de vida que levarei comigo para sempre.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso, minha imensa admiração e gratidão. Suas orientações precisas, sua visão crítica e sua capacidade de enxergar além do óbvio enriqueceram profundamente esta tese. Mas, acima de tudo, quero agradecer por sua paciência e apoio constante, que me deram segurança e tranquilidade para enfrentar os desafios que surgiram ao longo do caminho.

Durante meu doutorado sanduíche, tive a alegria e o privilégio de ser orientada pelo Dr. Mark E. Peeples. Sua paixão pela ciência, sua visão inovadora e seu entusiasmo contagiante foram fontes inesgotáveis de inspiração. A acolhida calorosa e o ambiente de trabalho estimulante que ele proporcionou no Abigail Wenex Institute Research, no Nationwide Children's Hospital, foram fundamentais para o desenvolvimento de parte deste estudo. Aprender com ele foi um dos maiores presentes que esta jornada me deu, tanto acadêmica quanto pessoal.

Ao Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey, deixo meu profundo reconhecimento e apreço. Obrigada por suas contribuições intelectuais valiosas, por acreditar no meu potencial e por me incentivar a explorar novos horizontes. Sua confiança em mim foi um impulso significativo para que eu me superasse em cada etapa deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio, que colaborou com este projeto cedendo o uso do liofilizador do seu laboratório todas as vezes que foram necessárias.

Ao Prof. Dr. Eduardo Mafud Cilli pela síntese do undecapeptídeo e ao Prof. Dr. Fabio Ceneviva Lacerda Almeida pela doação do plasmídeo do domínio N terminal da nucleoproteína, sem vocês os experimentos moleculares não seriam tão interessantes.

Ao Prof. Dr. Luis Octávio Regasini e o MSc. Alvaro Luiz Helena do Departamento de Química pelas modificações realizadas na molécula umbeliferona e por todos outros compostos cedidos ao nosso grupo, muito obrigada pela ajuda e parceria de sempre.

Ao laboratório de espectroscopia pela utilização dos fluorímetro, utilizados nas análises de anisotropia de fluorescência.

Às instituições que tornaram este sonho realidade, minha mais sincera gratidão. À UNESP e ao Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB), por ser a base que sustentou minha formação, fornecendo a estrutura acadêmica e científica necessárias para que este trabalho fosse possível. Ao Abigail Wenex Institute Research, por me acolher de forma tão generosa e oferecer um ambiente estimulante para o desenvolvimento da pesquisa.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio dos Processo nº 2020/13582-1 e 2022/10481-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos meus queridos amigos e colegas de grupo de pesquisa, Jefferson de Souza Busso e Ilada Thongpan, minha imensa gratidão. Cada conversa, cada troca de ideias, cada risada e cada desafio compartilhado no laboratório fizeram dessa jornada algo muito mais leve e significativo. Vocês foram mais do que colegas e terei sempre um carinho especial por cada momento vivido ao lado de vocês.

À minha mãe, Gesebel Maróstica de Sá, minha inspiração e exemplo de força, sua coragem, determinação e amor incondicional foram minha maior motivação. Obrigada por cada palavra de incentivo, por cada gesto de carinho e por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma duvidava. As minhas irmãs, Lizandra Maróstica de Sá e Sibeli Martins Maróstica, e ao meu irmão Daniel Maróstica Marim, meus grandes amores, obrigada por serem meu porto seguro, por me encherem de amor, por dividirem a vida comigo e por estarem sempre prontos para me apoiar. Vocês são meu refúgio e meu maior orgulho.

Ao meu amado namorado, João Victor da Silva Sereni, meu companheiro de todas as horas, obrigada por sua paciência, compreensão e carinho infinitos. Sua presença constante e seu apoio inabalável foram fundamentais para que eu pudesse enfrentar os desafios dessa jornada. Obrigada por celebrar cada pequena conquista comigo e por estar ao meu lado em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis.

Às minhas amigas de todas as horas, Artemiza da Silva Miranda e Giovana Cavenaghi Guimarães, obrigada por todo carinho, amizade, conselho e palavra de conforto e por tornarem essa caminhada mais leve e feliz.

Agradeço ainda a todos os professores, colegas e amigos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada palavra de incentivo, cada sorriso e cada gesto de apoio foram combustível para que eu continuasse firme nesta caminhada.

Por fim, a todos que fizeram parte dessa trajetória de alguma forma, direta ou indiretamente, saibam que levo cada um de vocês no coração. Vocês foram peças essenciais na realização deste sonho, e sou eternamente grata por terem cruzado meu caminho. Obrigada, do fundo do meu coração!

*“We are what we repeatedly do.”
Aristoteles*

Resumo

O vírus sincicial respiratório humano (hRSV) é um dos principais causadores de doenças respiratórias agudas que acomete principalmente crianças até os 2 anos e idosos, responsável por complicações como bronquiolite e pneumonia. Existem duas vacinas disponíveis, *Arexvy*® para idosos e a *Abrysvo*™ que pode ser administrada em gestantes. Em termos profiláticos, existem anticorpos monoclonais, como o Palivizumabe e o Nirsevimabe para pacientes pediátricos de alto risco, e como tratamento, um antiviral de amplo espectro, a Ribavirina, porém não existe medicamento específico. Dentre as proteínas codificadas pelo vírus, a nucleoproteína N destaca-se por sua importância na proteção do RNA viral e por sua atuação como molde para a replicação e transcrição viral. O reconhecimento eficiente e específico do molde NC pela polimerase é mediado pela fosfoproteína P. Isso deve-se à interação de resíduos do C-terminal da fosfoproteína em um bolso hidrofóbico no domínio N-terminal da nucleoproteína (N-NTD). O presente projeto realizou uma investigação da interação da cumarina, esculetina, esculina, 4-metil esculetina, umbeliferona com o N-NTD, e de competição com o undecapeptídeo (6FAM-DSDNDLSLEDF) via ressonância magnética nuclear e anisotropia de fluorescência. Realizamos ensaios de citotoxicidade e inibição viral das cumarinas e da hesperetina, nas células HEp-2, A549 e HBE (*human bronchial epithelial*) diferenciada. Os resultados de competição por STD-RMN das cumarinas com o undecapeptídeo pelo N-NTD da nucleoproteína mostraram que a cumarina compete pelo sítio, enquanto para as demais cumarinas observou-se um deslocamento e uma leve diminuição nos sinais, indicando que essas possam estar se ligando junto com undecapeptídeo no *hotspot* ou próximo a ele. Nas análises de anisotropia de fluorescência também foi observado competição da cumarina com o undecapeptídeo, pelo sítio N-NTD. A análise de perturbação de deslocamento químico do N-NTD na presença da cumarina mostra que os resíduos Lys46, Arg132, Tyr135 e His151, são resíduos do *hotspot* que apresentaram as variações mais significativas. Nos ensaios de inibição viral em células A549, a 4-metil, esculetina e hesperetina diminuíram a replicação viral, em 70, 89 e 50%, respectivamente. Quando encapsuladas com β - ciclodextrina, a cumarina, esculetina e hesperetina apresentaram ação inibitória contra o hRSV, especialmente nas células HBE diferenciadas. Concluímos que as cumarinas diminuíram a infecção viral em cultura celular e podem ter como alvo alguma proteína do ciclo replicativo do vírus, como a nucleoproteína. Porém são necessárias mais investigações para identificar o alvo celular ou viral dessas cumarinas, assim como realizar modificações químicas nessas moléculas fenólicas, que contribuam para o aumento da inibição contra o RSV e que diminuam seus efeitos tóxicos.

Palavras-chave: nucleoproteína do RSV; cumarinas; hesperetina; anisotropia de fluorescência; RMN; cultura de HBE; A549; HEp-2.

Abstract

The human respiratory syncytial virus (hRSV) is one of the main causes of acute respiratory diseases that mainly affects children up to the age of 2 and the elderly, responsible for complications such as bronchiolitis and pneumonia. Two vaccines are available, Arexvy® for the elderly and Abrysvo™, which can be administered to pregnant women. In prophylactic terms, there are monoclonal antibodies, such as Palivizumab and Nirsevimab for high-risk pediatric patients, and as a treatment, a broad-spectrum antiviral, Ribavirin, but there is no specific drug. Among the proteins encoded by the virus, nucleoprotein N stands out for its importance in protecting viral RNA and acting as a template for viral replication and transcription. The efficient and specific recognition of the NC template by the polymerase is mediated by phosphoprotein P. This is due to the interaction of residues from the C-terminus of the phosphoprotein in a hydrophobic pocket in the N-terminal domain of the nucleoprotein (N-NTD). The present project investigated the interaction of coumarin, esculetin, esculin, 4-methyl esculetin, umbelliferone with the N-NTD, and competition with the undecapeptide (6FAM-DSDNDLSLEDF) via nuclear magnetic resonance and fluorescence anisotropy. We carried out cytotoxicity and viral inhibition tests on coumarins and hesperetin in HEp-2, A549 and differentiated human bronchial epithelial (HBE) cells. The results of the STD-MRN competition of the coumarins with the undecapeptide for the N-NTD of the nucleoprotein showed that coumarin competes for the site, while for the other coumarins there was a displacement and a slight decrease in the signals, indicating that they may be binding together with the undecapeptide in the hotspot or close to it. Fluorescence anisotropy analyses also showed that coumarins competed with undecapeptide for the N-NTD site. The chemical shift perturbation analysis of the N-NTD in the presence of coumarin shows that residues Lys46, Arg132, Tyr135 and His151 are the hotspot residues that showed the most significant variations. In viral inhibition tests on A549 cells, 4-methyl, esculetin and hesperetin reduced viral replication by 70, 89 and 50%, respectively. When encapsulated with β -cyclodextrin, coumarin, esculetin and hesperetin showed inhibitory action against hRSV, especially in differentiated HBE cells. We concluded that coumarins reduced viral infection in cell culture and may have targeted some protein in the virus's replicative cycle, such as nucleoprotein. However, further research is needed to identify the cellular or viral target of these coumarins, as well as to make chemical modifications to these phenolic molecules that contribute to increased inhibition against RSV and reduce their toxic effects.

Keywords: RSV nucleoprotein; coumarins; hesperetin; fluorescence anisotropy; NMR; HBE culture; A549; HEp-2.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Informe Gripal da Secretária de Vigilância em Saúde e Ambiental do Ministério da Saúde do Brasil de acordo com as semanas epidemiológicas de 2024. As curvas representam os vírus identificados sendo: COVID (rosa), Influenza (verde musgo), OVR (outros vírus respiratórios) (verde), Rinovírus (azul), VRS (vírus Sincicial Respiratório) (fúcsia)..... 23
- Figura 2:** A estrutura do vírus sincicial respiratório (hRSV). O genoma do hRSV tem 15,2 kb de RNA de sentido negativo não segmentado que codifica 11 proteínas virais. O envelope viral do RSV contém três glicoproteínas transmembranas: glicoproteína de ligação (G), proteína de fusão (F) e pequena proteína hidrofóbica (SH). As proteínas da matriz (M) estão presentes no lado interno do envelope viral. O RNA viral é fortemente encapsulado por nucleoproteínas (N) e a grande proteína (L), fosfoproteína (P) e proteína M2-1 que medeiam a transcrição do RNA viral. A proteína M2-2 regula o RNA síntese viral..... 29
- Figura 3:** Detalhes do bolso de ligação P-CTD e a rede de interação com o N-NTD. (A e B) Imagens ampliadas da ligação da (A) fenilalanina (P1) e (B) Asp-Phe (P2), correspondendo ao terminal PC. O N-NTD está em marrom e mostrado em representação *cartoon*, com estruturas secundárias rotuladas. Resíduos envolvidos na ligação através de interações eletrostáticas (linhas tracejadas) ou van der Waals são mostradas em representação em *sticks* e coloridas por tipo de átomo, com carbonos em marrom. P1 e P2 estão representadas em *sticks* (C) Superposição das conformações P2 e P1. Átomos com contatos polares conservados são indicados por asteriscos, notavelmente, dois átomos de oxigênio (asteriscos vermelhos). (D) Detalhes da interação de empilhamento duplo entre o anel aromático de P2 e as cadeias laterais de H151 e R132, com interações eletrostáticas entre P2 e o N-NTD indicadas por linhas tracejadas pretas. O eixo normal ao plano do anel P-F24 é indicado pela linha pontilhada violeta..... 32
- Figura 4:** Localização do sítio de ligação da Hst no N-NTD. (A) Resultados de STD-RMN da interação de 2,9 mM de Asp-Phe com 10 μ M de N-NTD na ausência e presença de 400 μ M de Hst a 298 K. O espectro de referência 1 D 1H NMR do dipeptídeo livre está assinalado a verde, enquanto os espectros de diferença para a ligação do dipeptídeo ao N-NTD na ausência e na presença de Hst são apresentados em azul e vermelho, respetivamente. A atribuição de prótons de Asp-Phe é apresentada no espectro de referência, e os sinais de ressonância de Hst do efeito STD estão marcados com asteriscos. A redução das percentagens de epítomos de ligação (vermelho) devido à competição com Hst é indicada na estrutura molecular de Asp-Phe perto dos átomos. (B) Titulação da anisotropia de fluorescência do undeca-peptídeo (0-0,85 μ M) em solução 1,0 μ M de N-NTD na ausência (quadrados pretos) e na presença (círculos vermelhos) de 10 μ M de Hst a 298 K. As linhas pretas e vermelhas denotam ajustes de decaimento exponencial. A inserção corresponde à experiência de controle da titulação de etanol em solução 1,0 μ M de N-NTD contendo 100 nM de undeca-peptídeo (linha tracejada verde)..... 34

Figura 5: Estrutura química da hesperetina (flavonoide) e das cumarinas naturais usadas no presente estudo.....	37
Figura 6: Exemplos de medicamentos usados clinicamente de derivados de cumarinas.....	38
Figura 7: (A) Representações esquemáticas da β -ciclodextrina. As setas aberta e fechada apontam para os grupos hidroxila. A arquitetura da ciclodextrina (CD) tem forma toroidal com cavidade de $0,79 \pm 0,01$ nm e os diâmetros exteriores $1,54 \pm 0,04$ nm. (B) Ilustração esquemática da associação da ciclodextrina (CD) livre e do fármaco para formar complexos, (1) complexo fármaco-CD 1:1 (2) complexo fármaco-CD 1:2. (C) Modelos propostos de complexos de inclusão entre a prostaglandina E2 e α -CD, β -CD e γ -CD.....	42
Figura 8: Representação das diferentes morfologias dos tipos celulares estudados (A) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de cultura de células HBE bem diferenciadas após 4 semanas do processo de diferenciação. O inserto mostra algumas células que não apresenta cílios. (B) células HEp-2 e (C) células A549.....	46
Figura 9: Processos de purificação do N-NTD. (A) Etapas da purificação da proteína N-NTD do hRSV por cromatografia de afinidade com resina de Ni-NTA- SDS-PAGE 15% corado com Coomassie <i>brilhant blue</i> R (Sigma Aldrich). 1: amostra antes da indução; M: marcador de massa molecular; 2: amostra depois da indução; 3: eluição com 60 mM de imidazol; 4: eluição com 80 mM de imidazol; 5: eluição com 150 mM de imidazol; 6: eluição com 250 mM de imidazol; 7: eluição com 500 mM de imidazol; 8: eluição com 1 M de imidazol. A caixa vermelha indica a massa molecular correspondente à proteína N-NTD (26 kDa). (B) Cromatograma correspondente ao processo de purificação por exclusão molecular. O pico representado próximo de 60 ml corresponde a eluição da proteína N-NTD (26 kDa).....	61
Figura 10: Espectro de CD-UV <i>far</i> do domínio N-NTD do hRSV (40,0 μ M) a 25 °C (298 K) e em solução tampão de 50 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (pH 6,5) contendo NaF 150 mM.....	62
Figura 11: Espectro de referência da interação das cumarinas (500 μ M) com o N-NTD (20 μ M), está representado pela linha azul e a linha vermelha apresenta o STD-RMN das interações, mostrando os hidrogênios da molécula que receberam maior magnetização proveniente da proteína. A estrutura química mostra o mapa de epítomos da interação. (A) cumarina (B) esculetina (C) esculina (D) 4-metil esculetina e (E) umbeliferona.....	64
Figura 12: Medidas de anisotropia de fluorescência. As curvas das titulações do undecapeptídeo no N-NTD são representadas pelas linhas com quadrados em preto; as titulações do peptídeo nos complexos N-NTD/cumarinas são representadas pelas linhas com círculos em vermelho. (A) N-NTD/cumarina, (B) N-NTD/esculetina, (C) N-NTD/esculina, (D) N-NTD/4-metil esculetina e (E) N-NTD/umbeliferona.....	69

Figura 13: Medidas de anisotropia de fluorescência. As curvas das titulações do undecapeptídeo no N-NTD são representadas pela linha preta com quadrados; as titulações do peptídeo no N-NTD na presença do etanol são representadas pela linha vermelha com círculos..... 70

Figura 14: O espectro de STD dos complexos N-NTD/cumarinas são representados pela linha azul. A linha vermelha caracteriza o espectro de STD da competição entre o peptídeo e a cumarina pelo bolso hidrofóbico no domínio N-NTD. Os asteriscos (*) indicam os sinais da cumarina que apresentaram diminuição e as cerquilhas (#) apontam os sinais do peptídeo..... 71

Figura 15: Ligação do complexo N-NTD/cumarina investigada por espectroscopia de RMN. (A) Espectro bidimensional 1H - 15 N HSQC do N-NTD livre (preto) e ligado a cumarina (1,2 benzopirona) (vermelho) coletado usando um espectrômetro de RMN de 14,1 T (frequência de 1H, 600 MHz) a uma temperatura de 25°C. As setas azuis indicam os resíduos que apresentaram perturbação e deslocamento químico ($\Delta\delta$) após a ligação da molécula. (B) Histograma de deslocamento químico dos resíduos de aminoácidos do NNTD na presença da 1,2- benzopirona. A linha sólida denota $(\Delta\delta)_{ave}$ e a linha tracejada indica $(\Delta\delta)_{ave} + SD$ 75

Figura 16: Ligação do complexo N-NTD/esculetina investigada por espectroscopia de RMN. (A) Espectro bidimensional 1H - 15 N HSQC do N-NTD livre (preto) e ligado a esculetina (vermelho). As setas azuis indicam os resíduos que apresentaram perturbação e deslocamento químico ($\Delta\delta$) após a ligação da cumarina. (B) Histograma de deslocamento químico dos resíduos de aminoácidos do NNTD na presença da molécula. A linha sólida denota $(\Delta\delta)_{ave}$ e a linha tracejada indica $(\Delta\delta)_{ave} + SD$ 77

Figura 17: Ligação do complexo N-NTD/esculina investigada por espectroscopia de RMN. (A) Espectro bidimensional 1H - 15 N HSQC do N-NTD livre (preto) e ligado a esculina (vermelho). As setas azuis indicam os resíduos que apresentaram perturbação e deslocamento químico ($\Delta\delta$) após a ligação da cumarina. (B) Histograma de deslocamento químico dos resíduos de aminoácidos do NNTD na presença da molécula. A linha sólida denota $(\Delta\delta)_{ave}$ e a linha tracejada indica $(\Delta\delta)_{ave} + SD$ 79

Figura 18: Ligação do complexo N-NTD/4-metil esculetina investigada por espectroscopia de RMN. (A) Espectro bidimensional 1H - 15 N HSQC do N-NTD livre (preto) e ligado a esculetina (vermelho). As setas azuis indicam os resíduos que apresentaram perturbação e deslocamento químico ($\Delta\delta$) após a ligação da molécula. (B) Histograma de deslocamento químico dos resíduos de aminoácidos do NNTD na presença da 4- metil esculetina. A linha sólida denota $(\Delta\delta)_{ave}$ e a linha tracejada indica $(\Delta\delta)_{ave} + SD$ 81

Figura 19: Ensaio de citotoxicidade por MTT de cumarinas naturais (cumarina, esculetina, esculina, 4-metilesculetina e umbeliferona) em células HEP-2 após 48 horas de incubação com os compostos testados. O hexágono com linha vermelha a tracejado representa a estaurosporina (1 mM), controle negativo..... 83

Figura 20: Ensaio de citotoxicidade por MTT dos compostos (cumarina, esculetina, esculina, 4-metil esculetina, umbeliferona e hesperetina) em células A549 após 48 horas de incubação com os compostos. A barra azul representa o controle positivo (não tratado) e a barra vermelha representa a estaurosporina (1mM), controle negativo.....	84
Figura 21: (A) Imagens de microscopia de fluorescência obtidas utilizando o filtro da proteína verde fluorescente (GFP) após 24, 48 e 72 h, para demonstrar a propagação da infecção pelo vírus nas células tratadas, em comparação com o controle não tratado e controle tratado com DMSO. Tratamento da infecção por rgRSV de células HEp-2 com cumarina, esculetina, esculina, 4-metilesculetina e umbeliferona (antes e depois da infecção). (B) A linha preta representa a infecção por RSV na presença das cumarinas, a linha vermelha é o controle com solvente DMSO e a linha azul representa a infecção sem compostos.....	85
Figura 22: Ensaio de inibição em células A549 infectadas RSV-luc e tratadas com cumarinas e hesperetina, por 48 h para cumarina, esculetina, esculina, 4-metilesculetina, umbeliferona e 24 h para hesperetina. As linhas com círculos pretos representam a infecção por RSV na presença dos compostos; as linhas com quadrados vermelhos mostram a infecção por RSV na presença do DMSO e as linhas com triângulos azuis representa a infecção por RSV na ausência do composto.....	86
Figura 23: Curva de inibição da linhagem A549 infectada de pelo RSV-luc na presença dos compostos esculetina, 4-metilesculetina e hesperetina, após 24 e 48 horas.....	87
Figura 24: Ensaio de citotoxicidade em células A549 após 24 horas para umbeliferona acetilada e prenilada. A barra azul representa o controle positivo (apenas células) e a barra vermelha representa o controle negativo (estaurosporina).....	88
Figura 25: Ensaio de inibição em células A549 infectadas com RSV-luc e tratadas umbeliferona acetilada e prenilada após 24 h. As linhas com círculos pretos representam a infecção por RSV na presença dos compostos, as linhas com quadrados vermelhos mostram a infecção por RSV na presença de DMSO e as linhas com triângulos azuis representam a infecção por RSV sem DMSO e compostos.....	89
Figura 26: Ensaio de citotoxicidade por MTT da cumarina, esculetina, esculina, 4-metil esculetina, umbeliferona e hesperetina em células A549 após 48 horas de incubação. A barra azul representa o controle positivo (não tratado) e a barra vermelha representa a estaurosporina (1 mM), controle negativo.....	91
Figura 27: Ensaio de inibição dos compostos encapsulados na linhagem A549 inoculadas com RSV-luc, após 48 horas. As linhas pretas com círculos representam a infecção por RSV na presença dos compostos encapsulados	

(cumarina, esculetina, esculina, 4-metil esculetina, umbeliferona e hesperetina); as linhas vermelhas com quadrados mostram a infecção por RSV na presença apenas de β -ciclodextrina; e as linhas azuis com triângulo representam a infecção por RSV sem quaisquer adições..... 92

Figura 28: Ensaio de inibição dos compostos encapsulados em culturas de HBE diferenciadas inoculadas com RSV-luc, após 48 horas. As linhas pretas com círculos representam a infecção por RSV na presença dos compostos encapsulados (cumarina, esculetina, esculina, 4-metil esculetina, umbeliferona e hesperetina); as linhas vermelhas com quadrados mostram a infecção por RSV na presença apenas de β -ciclodextrina; e as linhas azuis com triângulo representam a infecção por RSV sem quaisquer adições..... 93

Figura 29: Replicação e disseminação do RSV em diferentes linhagens celulares e em culturas primárias de HBE na presença de cumarinas, hesperetina e umbeliferonas modificadas. A replicação e disseminação do RSV que expressa GFP em (A) células HEp-2 foram medidas pelo título viral em unidades formadoras de focos (UFF) + desvio padrão (DP). A replicação e disseminação do RSV que expressa luciferase foram medidas em unidades relativas de luz (RLU- *Relative Light Units*) + DP em (B e D) células A549 e (C) culturas de HBE diferenciadas. Diferenças estatisticamente significativas são indicadas como segue: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$; ns indica não significativo..... 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Eficiência de encapsulamento obtidos por espectroscopia de UV-vis... 90

Tabela 2: Citotoxicidade e atividade antiviral das cumarinas e a hesperetina. A tabela apresenta a CC_{50} (concentração que provoca 50% de citotoxicidade), a IC_{50} (concentração que inibe 50% da replicação viral) e o índice de seletividade (SI) correspondente para cada composto..... 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	<i>circular dichroism</i>
D.O	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
hRSV	<i>human respiratory syncycyal virus</i>
Hsp	hesperetina
$I^{\perp}$	orientação perpendicular
I_{STD}	intensidade de diferença de transferência de saturação
I_{SAT}	intensidade de saturação
$I^{\parallel}$	orientação paralela
I_0	intensidade 0
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
Na_2HPO_4	<i>dibasic sodium phosphate</i>
NaH_2PO_4	<i>monobasic sodium phosphate</i>
LB	meio de cultura Luria- Bertani
NaCl	cloreto de sódio
NC	nucleocapsídeo
Ni-NTA	<i>nickel-charged affinity resin</i>
N-NTC	<i>C-terminal domain of nucleoprotein of hRSV</i>
N-NTD	<i>N-terminal domain of nucleoprotein of hRSV</i>
NS1	<i>protein nonstructural 1 do hRSV</i>
NS2	<i>protein nonstructural 2 do hRSV</i>
OH	hidroxila
P-CTD	<i>N-terminal domain of phosphoprotein of hRSV</i>
pD441	plasmídeo com o gene do N terminal da nucleoproteína do hRSV
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
P-NTD	<i>N-terminal domain of phosphoprotein of hRSV</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RMN	ressonância magnética nuclear
RNP	complexo ribonucleoproteico

SDS	dodecil sulfato de sódio
STD	<i>saturation transfer difference</i>
<i>T_m</i>	temperatura de <i>melting</i>
Tris-HCl	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>
UV-Vis	ultravioleta visível
<i>r</i>	anisotropia
θ	elipcidade molar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Vírus sincicial respiratório humano (hRSV).....	21
1.1.1 Patologia, epidemiologia, prevenção e tratamento	21
1.1.2 Ciclo replicativo e genoma do hRSV.....	25
1.1.2.1 Proteínas	26
1.2 Flavonoides e cumarinas	35
1.3 Encapsulamento de moléculas hidrofóbicas	39
1.4 Modelos para desenvolvimento de terapias contra o hRSV.....	43
2 OBJETIVOS.....	48
2.1 Objetivo geral	48
2.1.2 Objetivos específicos	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 Expressão e purificação da proteína em meio de cultura LB e mínimo M9	50
3.2 Preparo dos estoques de cumarinas.....	51
3.3 Dicroísmo circular	51
3.4 Diferença de transferência de saturação por RMN	52
3.5 Análise da interação dos complexos N-NTD/cumarinas por anisotropia de fluorescência.....	54
3.6 Análise de perturbação por deslocamento químico (^1H - ^{15}N HSQC RMN)	55
3.7 Ensaio celular.....	56
3.7.1 Citotoxicidade	57
3.7.2 Teste de inibição do RSV	58
3.8 Encapsulamento dos compostos fenólicos	59
3.8.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H (1D- ^1H)	59
3.9 Análise Estatística.....	59
3.10 Índice de Seletividade (IS)	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Expressão e purificação do domínio N- terminal nucleoproteína (N- NDT) do Vírus Sincicial Respiratório humano	61
4.2 Interação das cumarinas com a nucleoproteína por STD-RMN.....	62
4.3 Competição das cumarinas com o undecapeptídeo da P pelo bolso hidrofóbico da proteína N-NTD por anisotropia de fluorescência	68
4.4 Competição das cumarinas com o undecapeptídeo pelo bolso hidrofóbico da proteína N-NTD por STD-RMN	70

4.5 ^1H - ^{15}N HSQC por RMN das interações das cumarinas no bolso hidrofóbico no N-NTD	74
4.6 Ensaios celulares	83
4.6.1 Citotoxicidade das cumarinas e hesperetina nas linhagens HEp-2 e A549	83
4.6.2 Teste de atividade antiviral das cumarinas naturais e do flavonoide hesperetina	84
4.6.3 Quantificação da infecção e propagação do RSV-luc (luciferase) em células A549 tratadas com as cumarinas e hesperetina	85
4.6.4 Ensaio citotóxico e teste de inibição em células A549 das umbeliferonas modificadas	87
4.6.5 Teste de inibição das cumarinas e hesperetina encapsuladas	89
4.7 Avaliação comparativa dos efeitos antivirais	95
4.8 Índice de seletividade	97
5 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICE A	122
Espectros de ^1H RMN das modificações (prenilação e acetilação) realizadas na umbeliferona	
APÊNDICE B	128
<i>Coumarins and Hesperetin Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection</i>	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus sincicial respiratório humano (hRSV)

1.1.1 Patologia, epidemiologia, prevenção e tratamento

Nos últimos anos, o mundo vivenciou inúmeras epidemias de vírus respiratórios, os quais foram responsáveis por alto índice de morbidade e mortalidade. Pesquisas mostraram que essas epidemias foram causadas por cinco famílias virais diferentes, sendo elas, *Adenoviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Picornaviridae* e *Pneumoviridae*, em comum esses vírus são de RNA (exceto a *Adenoviridae*), os quais são caracterizados por altas taxas de mutação. Esta característica aumenta a capacidade do vírus de adaptação e resistência a tratamentos, dificultando o controle epidemiológico. Desta maneira, é essencial estudar esses vírus direcionando a busca por antivirais e vacinas, para controlar o contágio e disseminação (GRAY et al., 2021).

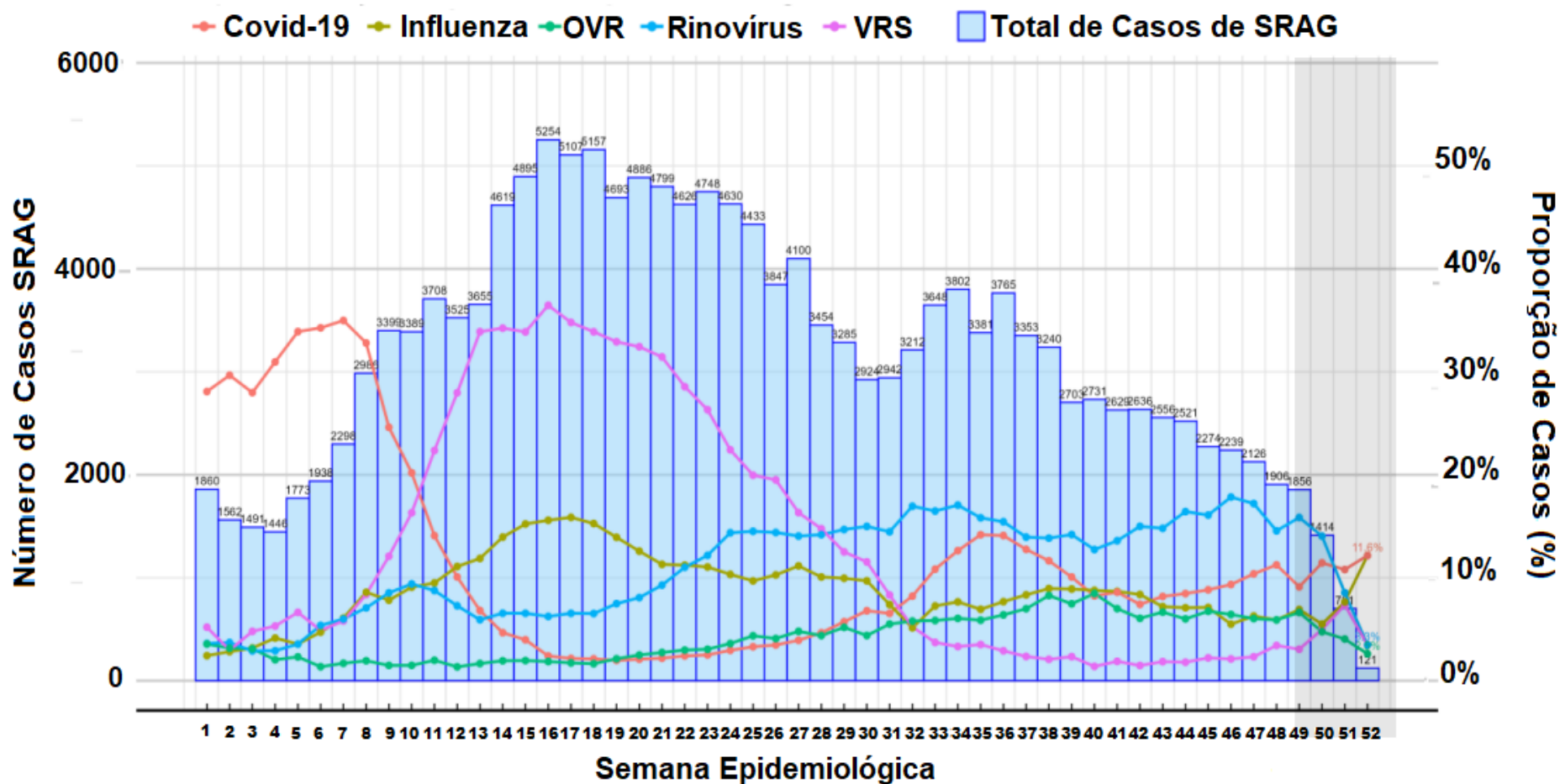
Dentre as famílias virais citadas, o vírus Sincicial Respiratório Humano (*human Respiratory Syncytial Virus* - hRSV), da família *Pneumoviridae* é um dos principais agentes causadores de doenças respiratórias agudas, como pneumonia e bronquiolite, em crianças menores de 2 anos no mundo todo, com alta taxa de mortalidade para os pacientes que apresentam imunodeficiência congênita, disfunção cardíaca ou broncopulmonar, hipertensão, prematuridade e baixo peso ao nascimento. O hRSV é responsável também por moléstia respiratória em idosos acima de 60 anos, atrás somente das infecções causadas pelo vírus influenza (ZHU et al., 2021; COLLINS & CROWE JR, 2007; HALL et al., 2009; OTHUMPANGAT et al., 2009; FALSEY et al., 2005; RICCETTO et al., 2009).

A infecção pelo RSV inicia-se quando o vírus é inalado através de gotículas de salivas, por meio das membranas das mucosas bucal ou nasal, onde infecta as células epiteliais das vias aéreas (AEC) do trato respiratório superior. Em seguida, propagam-se para o sistema respiratório inferior e atingem os bronquíolos, onde a replicação viral é mais efetiva (KALER et al., 2023). As AECs têm superfícies polarizadas e ciliadas, e começam a ser infectadas pelo RSV após a fixação do vírus em sua superfície apical. Esse processo induz uma resposta imunológica, com o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T, que contribui para a inflamação e produção de citocinas pró-inflamatórias como interferons, fator de necrose tumoral (TNF α e β) e interleucinas (THORNHILL & VERHOEVEN, 2020; KALER et al., 2023). A secreção de citocinas pró-inflamatórias amplifica o dano tecidual e contribui para a disfunção

das vias respiratórias. Adicionalmente, o RSV compromete a integridade e a funcionalidade do epitélio ciliar, que prejudica os mecanismos de defesa inata do hospedeiro e facilita infecções secundárias oportunistas. Assim, a combinação de lesão epitelial, hipersecreção de muco e resposta inflamatória exacerbada, resulta em manifestações clínicas, como a bronquiolite e a pneumonia, as quais destacam o impacto patológico do vírus sincicial respiratório (GRIFFITHS et al., 2016).

O hRSV causa milhões de morte todos os anos, no mundo todo. Em um estudo realizado no ano de 2015, que englobou diferentes países, mostrou que as infecções por hRSV causaram a morte de 59.600 mil crianças menores de 5 anos de idade, além de 3,2 milhões de hospitalizações dentre crianças e idosos (SHI et al., 2017). No Brasil, anualmente é realizado um levantamento para identificar os vírus respiratórios circulantes, a fim de remanejar as vacinas existentes e conter o contágio. O último boletim (Figura 1) realizado pelas unidades sentinelas de vigilância sanitária no Brasil em 2024, entre as 1ª e 52ª semanas epidemiológicas, mostrou que o hRSV teve maior circulação e mais casos de infecção entre a 9ª e 31ª semana, quando comparado aos outros vírus circulantes. Durante o ano de 2024 foram registrados 164.243 casos de síndromes respiratórias agudas graves (SRAG) e o hRSV foi responsável por 25.807 desses casos. Os casos de SRAG entre crianças abaixo de ano de idade foi de um total de 48.041, sendo 18.587 causadas pelo vírus sincicial respiratório. Na faixa de 1 a 4 anos detectou-se 33.908 casos e 5.395 por hRSV, e entre 5 e 11 anos foram 18.804 infecções respiratórias agudas, e 634 provocadas pelo vírus sincicial. O boletim gripal ainda relata a morte 10.494 pacientes, sendo 398 ocasionadas por complicações causadas pelo RSV e 165 dentre esses, são de pacientes com menos de 1 ano de vida (BRASIL, 2024). No entanto, esses números podem ser muito maiores segundo especialistas, pois a coleta de dados e diagnósticos destes vírus nem sempre são realizados de maneira adequada.

Figura 1: Informe Gripal da Secretária de Vigilância em Saúde e Ambiental do Ministério da Saúde do Brasil de acordo com as semanas epidemiológicas de 2024. As curvas representam os vírus identificados sendo: COVID (rosa), Influenza (verde musgo), OVR (outros vírus respiratórios) (verde), Rinovírus (azul), VRS (vírus Sincial Respiratório) (fúcsia).



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2024.

Recentemente, foram licenciadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) duas vacinas contra o hRSV, a Arexvy® da GlaxoSmithKline e a ABRYSVO® da Pfizer. A vacina Arexvy® voltada para adultos com mais de 60 anos, deve ser aplicada por via intramuscular em dose única, apresenta redução de 82,6% na incidência de infecções causadas pelo RSV e redução de 94,1% dos casos graves. A construção desta vacina é baseada no sistema de proteína recombinante adjuvada, no qual se tem uma subunidade (pré fusão (pré-F)) da proteína de fusão (glicoproteína F) do RSV, considerada mais imunogênica que a conformação pós fusão (pós-F), é juntamente formulada com o adjuvante AS01E (composto por monofosforil lipídeo A (MPL)) e saponina extraída de *Quillaja saponaria*, os quais propiciam uma resposta imune mais eficiente nos sistemas imunológicos menos responsivos (KASLOW, 2023 A; ISON et al. 2024; CHANDLER et al., 2024). Já a vacina ABRYSVO® pode ser administrada tanto em idosos quanto em grávidas, utilizando uma única dose intramuscular. Durante a gravidez, a vacina é aplicada entre as 24ª e 36ª semanas e confere imunidade ao recém-nascido até os 6 meses. Os estudos mostraram uma redução de 81,8% das hospitalizações de lactentes nos primeiros 90 dias de vida e de 69,4% nos primeiros 6 meses de vida do bebê. Esta é uma vacina bivalente composta por duas subunidades da proteína de fusão (pré-F) dos subgrupos RSV-A e RSV-B, subgrupos frequentemente responsáveis por infecções respiratórias graves. (KASLOW, 2023 B; (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2023).

Em casos de alto risco de infecção pelo RSV, é utilizado como medida profilática a administração de anticorpos monoclonais (mAbs), como o Palivizumabe e o Nirsevimabe. O Palivizumabe é um anticorpo monoclonal que reconhece o sítio antigênico II presente nas conformações pré-F e pós-F da glicoproteína F do RSV. Porém, sua afinidade e eficácia são mais elevadas na forma pós-fusão da proteína F, tornando sua capacidade neutralizante menos potente em comparação ao anticorpo Nirsevimabe que se ligam especificamente à forma pré-fusão da proteína F. Enquanto o Palivizumabe precisa ser administrado mensalmente por meio intravenoso durante a temporada do RSV, o Nirsevimabe é aplicado uma só vez antes da temporada do RSV, ocasionando assim uma proteção mais longa com uma única dose e facilitando a logística da imunização (RODRIGUEZ-FERNANDEZ et al., 2021; SIMÕES et al., 2023).

No entanto, até o momento não existe um antiviral específico para tratar infecções pelo hRSV, apenas um antiviral de amplo espectro, a ribavirina, que só é utilizado em casos graves. A ribavirina é um análogo da guanossina ativo contra vírus de RNA e DNA, aprovada para tratar pacientes pediátricos na forma aerossolizada, embora seja frequentemente utilizado como *off-label* em outras populações. No entanto, o tratamento com ribavirina mostrou-se controverso devido à falta de ensaios clínicos randomizados controlados, as preocupações com a exposição ocupacional e ao alto custo do medicamento (FOOLAD et al., 2019). Diante da ausência de medicamentos específicos, eficazes e com custos acessíveis, faz-se necessário o estudo para o desenvolvimento de novos antivirais contra o hRSV (ANANWORANICH & HEATON, 2021).

1.1.2 Ciclo replicativo e genoma do hRSV

O hRSV é um vírus de RNA de sentido negativo, fita simples não segmentado envolto por um envelope lipídico que apresenta uma simetria helicoidal e tamanho médio de 120 a 300 nm, da ordem Mononegavirales e espécie *Orthopneumovirus hominis* e apresenta dois subtipos, A e B (ICTV, 2024). Seu genoma é composto por 15.222 nucleotídeos distribuídos em 10 genes, os quais codificam 11 proteínas. Dessas 11 proteínas (Figura 2), duas (M2-1 e M2-2) são expressas pelo gene M2. O vírus apresenta três glicoproteínas de superfície: a proteína de adesão (G), a proteína de fusão (F) e a pequena proteína hidrofóbica (SH) (CONLEY et al., 2022; COLLINS & KARRON, 2013).

A infecção pelo RSV inicia-se pelo reconhecimento e fusão das glicoproteínas de membrana G e F, respectivamente, com a membrana celular do hospedeiro, enquanto a proteína de membrana SH aparentemente não desempenha função nesse processo (COLLINS et al., 2013). A fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira, mediada pela proteína F, é o principal mecanismo de entrada viral, porém, há também indícios de que o vírus utilize endocitose mediada por clatrina para invadir a célula (LIU et al., 2024; KOLOKOLTSOV et al., 2007; SRINIVASAKUMAR et al., 1991). A replicação e a transcrição do genoma viral ocorrem apenas no citoplasma celular, sendo independentes de processos nucleares. Isso é corroborado pela capacidade do RSV de se replicar em células enucleadas e na presença de inibidores como a actinomicina D, destacando a ausência de envolvimento essencial do núcleo celular (COLLINS et al., 2013).

A transcrição e a replicação do RNA pelo vírus sincicial respiratório ocorrem de forma concomitante no citoplasma da célula hospedeira. Os mRNAs e as proteínas virais começam a ser detectados intracelularmente entre 4 e 6 horas após a infecção, atingindo níveis máximos de acumulação por volta de 15 a 20 horas. Nesse estágio, observa-se uma possível regulação negativa da transcrição, favorecendo a replicação de RNA e a síntese de genomas virais destinados ao empacotamento em novos vírions, um processo aparentemente regulado pela proteína M2-2 (SCUDERO et al., 2023; BERMINGHAM E COLLINS, 1999). A liberação de vírions maduros inicia-se entre 10 e 12 horas após a infecção, atinge seu pico em aproximadamente 24 horas e persiste até que as células infectadas se deterioreem, geralmente entre 30 e 48 horas após a infecção (COLLINS et al., 2013).

1.1.2.1 Proteínas

A proteína de adesão (G) é fundamental para a adesão viral às células hospedeiras, facilitando a infecção por meio da ligação a glicosaminoglicanos na superfície celular. A cadeia polipeptídica da proteína G possui entre 289 e 299 aminoácidos (~33 kDa), o que pode variar de acordo com a cepa, é modificada por palmitoilação (SIBERT et al., 2024; COLLINS E MOTTET, 1992) e cerca de 60% de sua massa molecular corresponde a carboidratos, com 30 a 40 glicanas O- ligadas e 4 a 5 glicanas N-ligadas (BERGERON et al., 2023; SATAKE et al., 1985; WERTZ et al., 1985). O tamanho da proteína G varia conforme o tipo celular em que é produzida, indo de 80 a 100 kDa em linhagens celulares imortalizadas (GARCIA-BEATO et al., 1996) e até 180 kDa em culturas primárias de epitélio brônquico humano (HAE) (KWILAS et al., 2009). Este aumento de massa molecular pode ser resultado de maior glicosilação ou da formação de dímeros estabilizados por ligações não dissulfeto (MCLELLAN et al., 2013). A região central da G contém um domínio altamente conservado de 13 aminoácidos, que se sobrepõe a uma estrutura formada por quatro resíduos de cisteína ligados em pares (1–4 e 2–3) (GORMAN et al., 1997) e em seguida, está o domínio de ligação à heparina (HBD), responsável pela interação com sulfato de heparano (HS) na superfície celular. A proteína G possui uma massa molecular de aproximadamente 32 kDa na sua forma não processada pós-traducional. Quando completamente glicosilada em células HEp-2, atinge cerca de 95 kDa. Em células Vero, após glicosilação e clivagem, por meio da catepsina L, uma protease lisossomal que possui atividade em ambientes ácidos (como nos lisossomos) (TURK

et al., 2011), a massa molecular da G é reduzida para cerca de 55 kDa. Já em células epiteliais brônquicas humanas primárias, após o processamento pós-traducional, a proteína G pode alcançar cerca de 170 kDa (KING et al., 2021; CORRY et al., 2015).

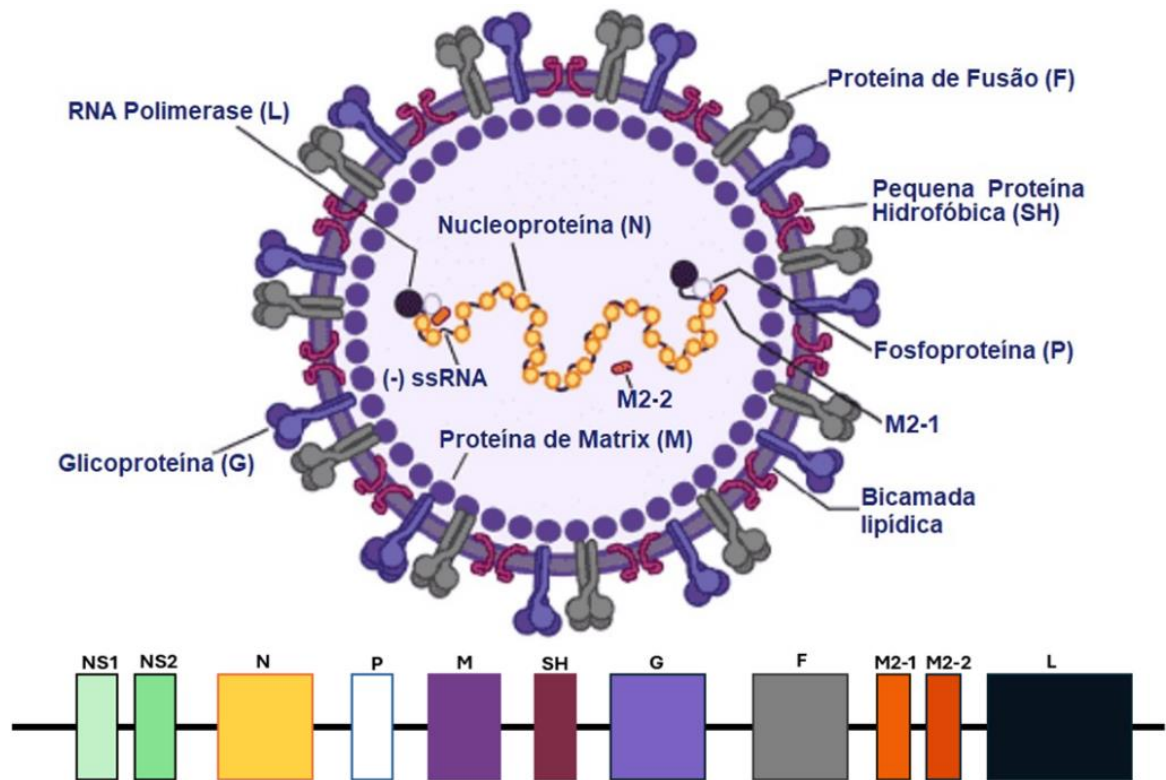
A proteína de fusão (F) é uma glicoproteína de membrana integral do tipo I, a qual facilita a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira, permitindo a entrada do material genético viral no citoplasma celular. A proteína de fusão é inicialmente sintetizada como um precursor inativo, F0, que contém 574 aminoácidos (REZENDE et al., 2023; COLLINS AND MOTTET, 1991). O F0 sofre um processamento pós-traducional, o qual inclui uma clivagem proteolítica pela protease furina do hospedeiro e então essa clivagem gera duas subunidades, F1 e F2, que permanecem ligadas por pontes de dissulfeto e a proteína não é capaz de promover a fusão das membranas viral e celular (LI et al., 2007; COLLINS AND MOTTET, 1991). A transição para a forma pós-fusão ocorre quando a proteína F sofre uma mudança estrutural induzida por fatores como a interação com a célula hospedeira e mudanças no pH. Essa reconfiguração expõe um domínio hidrofóbico na subunidade F1, permitindo que ela se insira na membrana celular e envelope viral, facilitando a fusão entre elas. A conversão para a forma pós-fusão é essencial para que o vírus consiga liberar seu material genético dentro da célula hospedeira, dando início à infecção (GIDWANI et al., 2024; MCLELLAN et al., 2013).

Além disso, a proteína F é responsável pela fusão de células infectadas com células adjacentes não infectadas, promovendo a formação de sincícios, que são estruturas multinucleadas resultantes da fusão de múltiplas células. Esse efeito citopático é bastante característico do RSV e é o que confere nome ao vírus. Essa característica permite que o RSV se espalhe eficientemente pelo epitélio respiratório sem a necessidade de liberar novas partículas virais no ambiente extracelular, contribuindo para sua disseminação rápida e eficaz. A proteína F também desempenha um papel fundamental na patogênese do vírus, sendo um alvo potencial para o desenvolvimento de vacinas e terapias antivirais (GIDWANI et al., 2024; MCLELLAN et al., 2010). A estrutura pré-fusão conformação mais instável e antigênica, tem sido usada no *design* de vacinas, com o objetivo de induzir uma resposta imune contra o RSV (PATEL et al., 2019; WU et al., 2007). Neste mesmo sentido, a busca por inibidores que bloqueiam a transição da proteína F para a forma pós-fusão também são interessantes, para impedir a fusão viral e impedir a infecção.

A proteína SH (*small hydrophobic protein*) é uma proteína transmembrana que consiste em aproximadamente 64 (subtipo A) e 65 (subtipo B) aminoácidos, constituindo uma região extracelular curta, com uma única hélice transmembrana e uma cauda citoplasmática (GAN et al., 2012). Embora a função do SH não esteja totalmente definida, estudos sugerem que ele pode atuar como uma viroporina, formando poros na membrana celular e alterando assim a permeabilidade (TRANTAFILOU et al., 2013; PEREZ et al., 1997; FUENTES et al., 2007), e assim promovendo a liberação de virions e regulando o ambiente intracelular para permitir a replicação viral, razões pelas quais essa proteína está associada a fatores de virulência. Além de seu papel nas complicações da patogênese do vírus, o SH também desempenha um papel na evasão imunológica, inibindo as vias inflamatórias, como as mediadas por TNF- α e NF- κ B, o que reduz a apoptose imunomediada e promove a sobrevivência de células infectadas (VAN ROYEN et al., 2022; LIN et al., 2003). O estudo de Fuentes e seus colaboradores mostraram que o SH também pode interferir no sistema imunológico inato na detecção de vírus e impedir a ativação de proteínas como RIG-I e MDA5, essenciais para o reconhecimento do RNA viral (FUENTES et al., 2007). A proteína SH é altamente conservada entre as estirpes de RSV e é um potencial alvo terapêutico (CHEN et al., 2000). Inibidores de viroporina, os quais bloqueiam a formação de poros via SH, e estratégias de vacinas usando genes deletados da SH são investigados para reduzir a replicação viral, a exacerbação da inflamação e a morbidade relacionada à infecção (VAN ROYEN et al., 2022; FUENTES et al., 2007).

Na face interna do envelope viral encontra-se a proteína de matriz (M) que tem o papel-chave na montagem e liberação do vírions maduros. Ela interage diretamente com proteínas virais nucleocapsídeas (N e P) e a proteína de polimerase (L) e M2-1, facilitando a replicação do RNA viral e a transcrição (DICKENS et al., 1984; TREVISAN et al., 2018). Além disso, a proteína M desempenha um papel crucial na organização da membrana lipídica, promovendo o direcionamento do nucleocapsídeo para as regiões da membrana onde as glicoproteínas virais, F e G, estão localizadas. Esse direcionamento é necessário para o processo de brotamento, no qual o vírus é liberado da célula hospedeira para infectar novas células (GHILDYAL et al., 2005).

Figura 2: A estrutura do vírus sincicial respiratório (hRSV). O genoma do hRSV tem 15,2 kb de RNA de sentido negativo não segmentado que codifica 11 proteínas virais. O envelope viral do RSV contém três glicoproteínas transmembranas: glicoproteína de ligação (G), proteína de fusão (F) e pequena proteína hidrofóbica (SH). As proteínas da matriz (M) estão presentes no lado interno do envelope viral. O RNA viral é fortemente encapsulado por nucleoproteínas (N) e a grande proteína (L), fosfoproteína (P) e proteína M2-1 que medeiam a transcrição do RNA viral. A proteína M2-2 regula o RNA síntese viral.



Fonte: Adaptado de JUNG et al., 2020.

As proteínas M2-1 e M2-2 são codificadas pelo gene M2, visto que o RNAm da M2 contém duas ORFs (*Open Reading Frames*) sobrepostas e cada uma expressa uma proteína (SCUDERO et al., 2023). A ORF1 codifica a proteína M2-1 com 194 aa, que atua como antiterminador, essencial no processo de transcrição, facilitando a progressão da polimerase viral pelas regiões intergênicas e assegurando a terminação e reinício da transcrição (CARTEE & WERTZ, 2001; COLLINS et al., 2007). A segunda ORF, a ORF2, codifica a proteína M2-2 que tem entre 83 e 90 aa, a qual em um estudo foi verificado que a sua coexpressão reduz significativamente a síntese de RNA em um sistema modelo e essa regulação garante a produção eficiente de novos vírus em estágios mais avançados da infecção (BRAUN et al., 2021; BERMINGHAM et al., 1999).

Há também duas proteínas não estruturais 1 e 2 (NS1 e NS2) que atuam inibindo a resposta imunológica do hospedeiro, principalmente no bloqueio das vias de

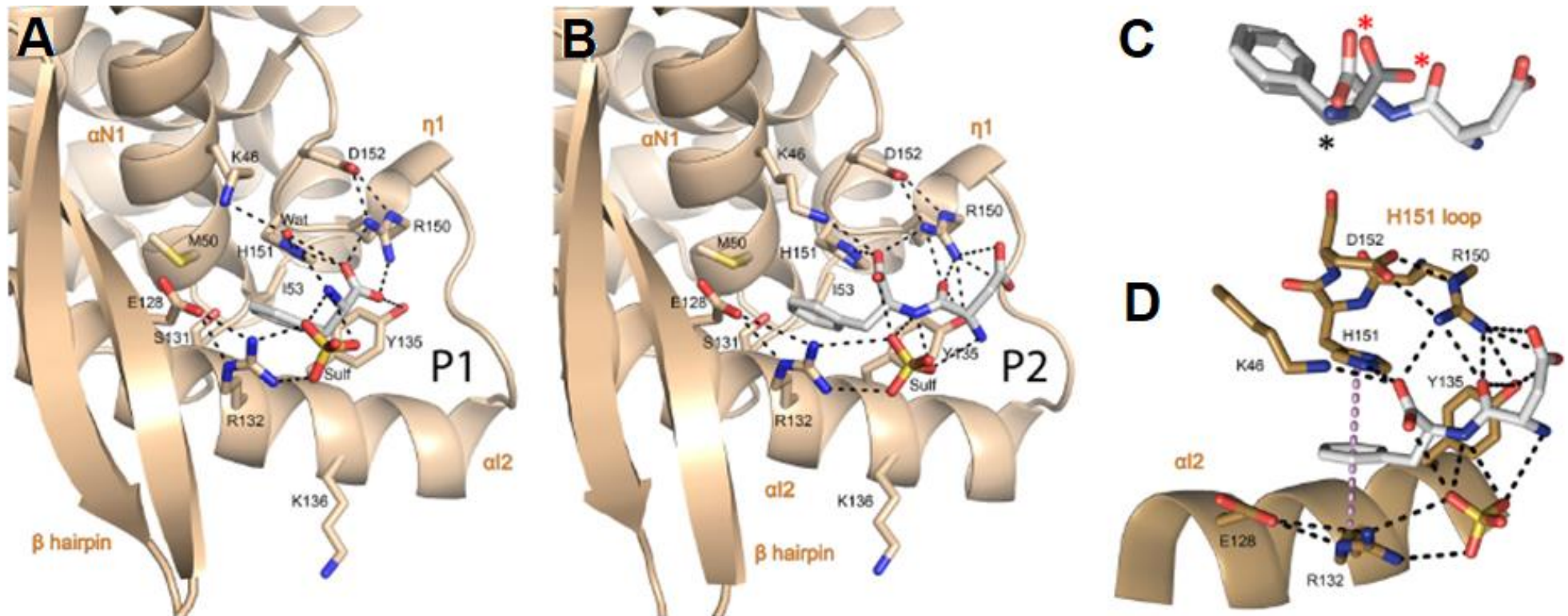
interferons (INF) alfa e beta e desintegrando os complexos de reconhecimento viral, como RIG-I e MDA5 (VAN ROYEN et al., 2022; COLLINS & CROWE JR, 2007; PEREZ et al., 1997; GHILDYAL et al., 2002 e 2005; SPANN et al., 2004; COLLINS & KARRON, 2013).

Neste estudo, destaca-se a nucleoproteína (N) que é essencial no processo de replicação do vírus, juntamente com a fosfoproteína (P), a RNA polimerase dependente de RNA (*RNA dependent RNA polymerase* – RdRp) (L) e M2-1, que juntas formam o complexo ribonucleoproteico (RNP). Durante o processo de replicação do hRSV ocorre um reconhecimento eficiente e específico da fosfoproteína pela nucleoproteína, crítico para a síntese de RNA viral. E então, ainda no processo de replicação e transcrição, a fosfoproteína posiciona a proteína L no molde NC e a M2-1 ajuda na translocação do complexo da polimerase ao longo do nucleocapsídeo helicoidal (FEARNS & COLLINS, 1999).

A estrutura da proteína N tem uma região central, a qual é dividida em dois domínios N e C-terminal denominados N-NTD (resíduos 28–254) e N-CTD (resíduos 254–360), respectivamente, com o RNA ligado entre esses domínios majoritariamente formados por estruturas α -hélices (TAWAR et al., 2009). A fosfoproteína (P) consiste em um domínio de tetramerização flanqueado por duas regiões longas intrinsecamente desordenadas, nomeadas de domínios N e C-terminal (P-NTD e P-CTD, respectivamente) (CASTAGNE et al., 2004). Tran et al. (2007) mostraram que os nove últimos resíduos do C-terminal (Asp233–Phe241) da proteína P são essenciais para sua ligação a nucleoproteína e, conseqüentemente, para a síntese de RNA viral (TRAN et al., 2007). Em particular, a mudança do último resíduo de aminoácido Phe241 do C-terminal da P para alanina anula tanto a ligação com a proteína N como também a síntese de RNA viral (GALLOUX et al., 2012). No estudo de Galloux e colaboradores foram realizadas deleções e mutações sítio dirigidas da proteína N, exatamente no bolso hidrofóbico do domínio N-NTD que corresponde à região de ligação do P-CTD, no qual também foram identificados resíduos com cadeias laterais hidrofóbicas e básicas (Lys46, Met50, Ile53, Ser131, Arg132, Tyr135, Arg150, His151), os quais são críticos para a interação N/P e síntese de RNA (GALLOUX et al., 2012).

Em outro estudo de Ouizougoun-Oubari et al. (2015), foi utilizado o dipeptídeo (Asp240-Phe241) do C-terminal da fosfoproteína em experimentos de interação com a nucleoproteína, em que é possível observar que a Phe241 está completamente enterrada no bolso hidrofóbico do N-NTD localizado entre as hélices I2 (resíduos Ser131, Arg132 e Tyr135) e N1 (resíduos Met50 e Ile53) e o *loop* no qual encontra-se a hélice 3_{10} η 1 (resíduos Arg150 e His151). As Figuras 3A e 3B mostram que Phe241 está estabilizada por interações de hidrogênio e que o grupo aromático da fenilalanina 241 da proteína P ajusta-se perfeitamente ao bolso hidrofóbico. Um dos lados do anel aromático da Phe241 faz uma interação de empilhamento π π com o grupo imidazólico da His151 da proteína N (Figura 3D). O outro lado do anel benzênico da Phe241 empilha contra a parte alifática da cadeia lateral de R132 (OUIZOUGUN-OUBARI et al., 2015).

Figura 3: Detalhes do bolso de ligação P-CTD e a rede de interação com o N-NTD. (A e B) Imagens ampliadas da ligação da (A) fenilalanina (P1) e (B) Asp-Phe (P2), correspondendo ao terminal PC. O N-NTD está em marrom e mostrado em representação *cartoon*, com estruturas secundárias rotuladas. Resíduos envolvidos na ligação através de interações eletrostáticas (linhas tracejadas) ou van der Waals são mostradas em representação em *sticks* e coloridas por tipo de átomo, com carbonos em marrom. P1 e P2 estão representadas em *sticks* (C) Superposição das conformações P2 e P1. Átomos com contatos polares conservados são indicados por asteriscos, notavelmente, dois átomos de oxigênio (asteriscos vermelhos). (D) Detalhes da interação de empilhamento duplo entre o anel aromático de P2 e as cadeias laterais de H151 e R132, com interações eletrostáticas entre P2 e o N-NTD indicadas por linhas tracejadas pretas. O eixo normal ao plano do anel P-F24 é indicado pela linha pontilhada violeta.

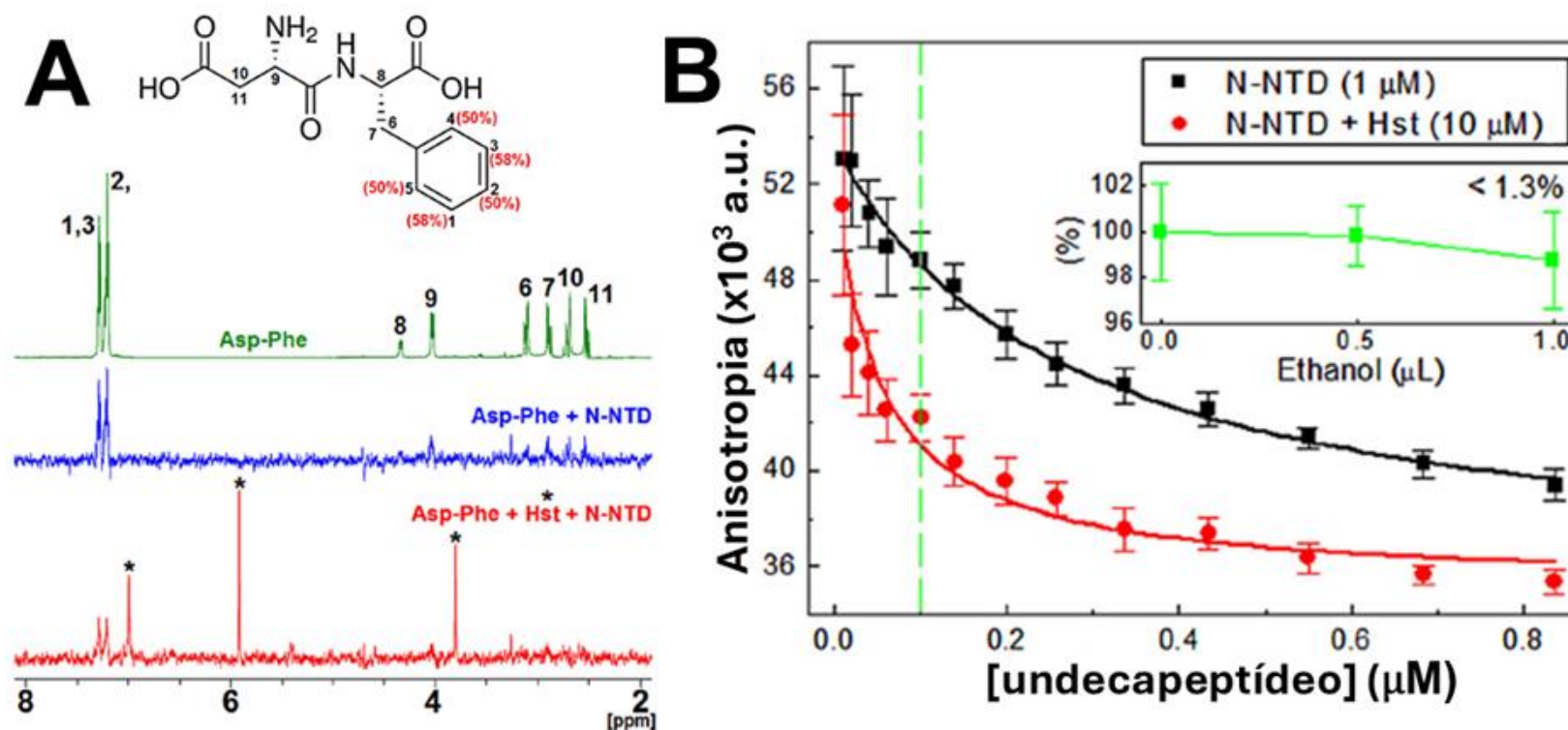


Fonte: OUIZUGUN-TOUBARI et al., 2015.

Em um estudo anterior do nosso grupo, foram realizados experimentos de caracterização do bolso hidrofóbico da nucleoproteína e análises de interação com moléculas polifenólicas que contribuíram para mostrar as particularidades e especificidades de ligação dessas moléculas com o sítio. Foi realizada uma triagem por STD–RMN (Diferença de Transferência de Saturação por ressonância magnética nuclear) com nove flavonoides (apigenina, baicalina, crisina, hesperedina, hesperetina, morina, nairigina, quercetina e rutina), dos quais somente a hesperetina apresentou ligação com o N-NTD. Experimentos de competição utilizando o dipeptídeo Asp240-Phe241 do C-terminal da fosfoproteína, realizados por anisotropia de fluorescência e STD-RMN, evidenciaram a especificidade da interação da hesperetina (Hst) com o bolso hidrofóbico na N, sugerindo que o anel aromático A desse flavonoide apresenta um encaixe específico a esse bolso hidrofóbico. No experimento STD, no espectro de diferença para a interação N-NTD/Asp-Phe (Figura 4 A), pode ser observado, no espectro em azul, a presença dos sinais de ressonância em 7,21 e 7,28 ppm correspondentes aos prótons do anel de benzeno da cadeia lateral da fenilalanina (hidrogênios: 1 a 5), os quais diminuem significativamente na presença da Hst. A porcentagem média de redução da intensidade dos epítomos de ligação da cadeia lateral da fenilalanina do dipeptídeo promovida pela competição com Hst foi de 53,2%, demonstrado no mapa de epítomos na estrutura molecular da hesperetina (SÁ et al., 2020).

Nos experimentos de anisotropia de fluorescência, o undecapeptídeo C-terminal da proteína P (6-FAM-DSDNDLSLEDF) foi utilizado como concorrente específico para a Hst através do *hotspot* de ligação N/P no N-NTD. O aumento observado no valor da anisotropia revelou uma redução da mobilidade molecular do undecapeptídeo, o que sugere a sua ligação à N-NTD. A constante de dissociação constante de dissociação do complexo N-NTD/undecapeptídeo determinada foi de $2,12 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Em seguida, foram efetuadas titulações do undecapeptídeo, na ausência e na presença de $10 \mu\text{M}$ de Hst, numa solução $1,0 \mu\text{M}$ de N-NTD. A Figura 4B mostra que, na presença de Hst ocorreu uma recuperação mais rápida do valor da anisotropia de fluorescência do undecapeptídeo livre, que é de 0,03. Portanto, a diminuição mais rápida da anisotropia de fluorescência do undecapeptídeo ligado ao N-NTD na presença de Hst sugere que este flavonoide compete com o undecapeptídeo pelo bolso hidrofóbico do local de interação N/P na no N-NTD (SÁ et al., 2020).

Figura 4: Localização do sítio de ligação da Hst no N-NTD. (A) Resultados de STD-RMN da interação de 2,9 mM de Asp-Phe com 10 μ M de N-NTD na ausência e presença de 400 μ M de Hst a 298 K. O espectro de referência 1 D 1 H NMR do dipeptídeo livre está assinalado a verde, enquanto os espectros de diferença para a ligação do dipeptídeo ao N-NTD na ausência e na presença de Hst são apresentados em azul e vermelho, respectivamente. A atribuição de prótons de Asp-Phe é apresentada no espectro de referência, e os sinais de ressonância de Hst do efeito STD estão marcados com asteriscos. A redução das percentagens de epítomos de ligação (vermelho) devido à competição com Hst é indicada na estrutura molecular de Asp-Phe perto dos átomos. (B) Titulação da anisotropia de fluorescência do undeca-peptídeo (0-0,85 μ M) em solução 1,0 μ M de N-NTD na ausência (quadrados pretos) e na presença (círculos vermelhos) de 10 μ M de Hst a 298 K. As linhas pretas e vermelhas denotam ajustes de decaimento exponencial. A inserção corresponde à experiência de controle da titulação de etanol em solução 1,0 μ M de N-NTD contendo 100 nM de undeca-peptídeo (linha tracejada verde).



Fonte: SÁ et al., 2020. Autoria própria.

A partir dos resultados apresentados, pode-se destacar que o bolso hidrofóbico do N-NTD é um alvo promissor para o desenvolvimento de antivirais contra o hRSV e que os compostos fenólicos como os flavonoides apresentam-se como potenciais candidatos. Diante da similaridade química, estrutural e ação biológica, entre os flavonoides e as cumarinas, nessa presente pesquisa, testamos algumas cumarinas.

1. 2 Flavonoides e cumarinas

Os flavonoides representam uma ampla e diversificada classe de compostos bioativos naturais amplamente reconhecidos por sua relevância biológica e farmacológica. Sua estrutura química é composta por um esqueleto central de carbono C6–C3–C6, conhecido como fenil- benzopirano, o qual confere uma estrutura altamente versátil, que permite uma grande variedade de modificações estruturais (CHEN et al., 2023). As diferentes classes de flavonoides distinguem-se principalmente pelo grau de oxidação e/ou pela saturação presente no anel heterocíclico C. Entre as principais classes estão as flavanas, flavanonas, flavonas, flavonóis e flavanóis, sendo estes últimos subdivididos em flavan-3-ol, flavan-4-ol e flavan-3,4-diol (KARAK, 2019). As variações estruturais dentro de cada classe derivam do padrão de substituição nos anéis A e B. Substituintes comuns incluem grupos hidroxilas (OH) e metoxilas (OMe), bem como modificações mais complexas, como glicosilações e acilações. Essas alterações contribuem significativamente para a diversidade funcional e biológica dos flavonoides, influenciando propriedades como solubilidade, biodisponibilidade e atividade biológica (JAN et al., 2021; GROTEWOLD, 2006).

Esses compostos são metabólitos secundários amplamente distribuídos em plantas e fungos, onde desempenham papéis cruciais na defesa contra patógenos. Sua presença na dieta humana é bastante significativa, sendo encontrada em alimentos como frutas, vegetais, chá, café e vinho. A fácil absorção dessas moléculas pelo corpo humano desperta grande interesse no campo farmacêutico, especialmente devido ao seu potencial antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno e neuroprotetor (ANWAR et al., 2020). Esses compostos também demonstraram capacidade de modular vias sinalização celular, como a cascata do NF- κ B, e de interagir com enzimas e receptores envolvidos em processos inflamatórios (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2011).

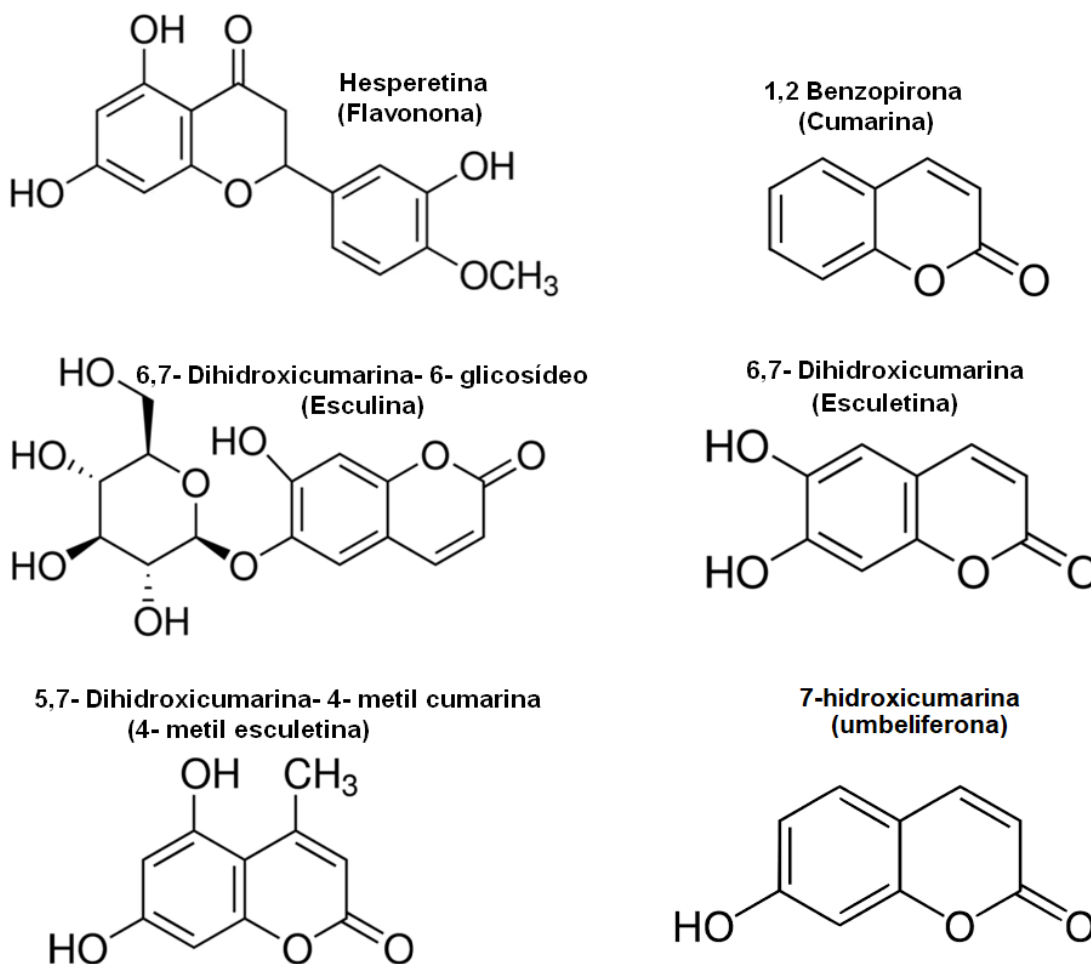
Dentre a família dos flavonoides destacamos a hesperetina, que é um composto fenólico derivado de frutas cítricas que tem atraído atenção significativa por suas propriedades antivirais. De acordo com Agrawal et al. (2021), a hesperetina (Figura 4) é considerada uma candidata promissora para profilaxia e tratamento contra o SARS-CoV-2 devido à sua capacidade de inibir a replicação viral. O estudo utilizou ensaios em culturas celulares *in vitro* para avaliar os efeitos antivirais dos flavonoides, e os resultados mostraram uma redução significativa na carga viral nas células tratadas (AGRAWAL et al., 2021). Uma pesquisa realizada por Kaul e colaboradores (1985) mostrou que os flavonoides quercetina e hesperetina são capazes de inibir aproximadamente 90% da replicação do hRSV em ensaios de cultura celular (KAUL et al., 1985). O estudo biomolecular do nosso grupo com a hesperetina e a nucleoproteína do RSV, apresentou uma alta evidência de que esse flavonoide se liga a proteína N com bastante singularidade (SÁ, et al., 2020) e diante desses achados, neste estudo com células de epitélio brônquico humano, incluímos a hesperetina para analisar sua ação anti - RSV em células mais especializadas.

Outra família de moléculas com atividade biológica interessantes são as cumarinas. As cumarinas (Figura 5) são compostos fenólicos que foram isolados pela primeira vez em 1820 por Vogel da amêndoa do fruto da árvore da espécie *Coumarouna odorata* (*Dipteryx odorata*, Willd, *Fabaceae*), espécie de árvore nativa da América Central e norte da América do Sul, conhecida popularmente como cumaru no Brasil e internacionalmente como *tonka beans* (TOMA et al., 2025; BORGES, et al., 2005). Essas moléculas ocorrem naturalmente como metabólitos secundários podendo ser encontradas em raízes, folhas, frutos (morango, cereja e damasco) e sementes de plantas das famílias *Umbelliferae*, *Rutaceae* e entre outras, além de fungos e bactérias. As cumarinas são lactonas resultantes da oxidação do ácido cis-o-hidróxi-cinâmico, composto com característica cristalina e com odor doce semelhante ao da baunilha (TSIVILEVA et al., 2022).

As cumarinas, também conhecidas como moléculas α -benzopiranas, são divididas em quatro subgrupos: hidroxycumarinas, cumarinas isoprenílicas, piranocumarinas e furanocumarinas, as quais possuem diversas aplicações como a fabricação de produtos de limpeza, aditivos em alimentos, cosméticos, fragrância em perfumes e como foco neste estudo na área farmacoterapêutica, devido às propriedades bioativas

como anticoagulante, antibióticas, bronco dilatadora, fungicida e analgésica (AMBREEN et al., 2019).

Figura 5: Estrutura química da hesperetina (flavonoide) e das cumarinas naturais usadas no presente estudo.

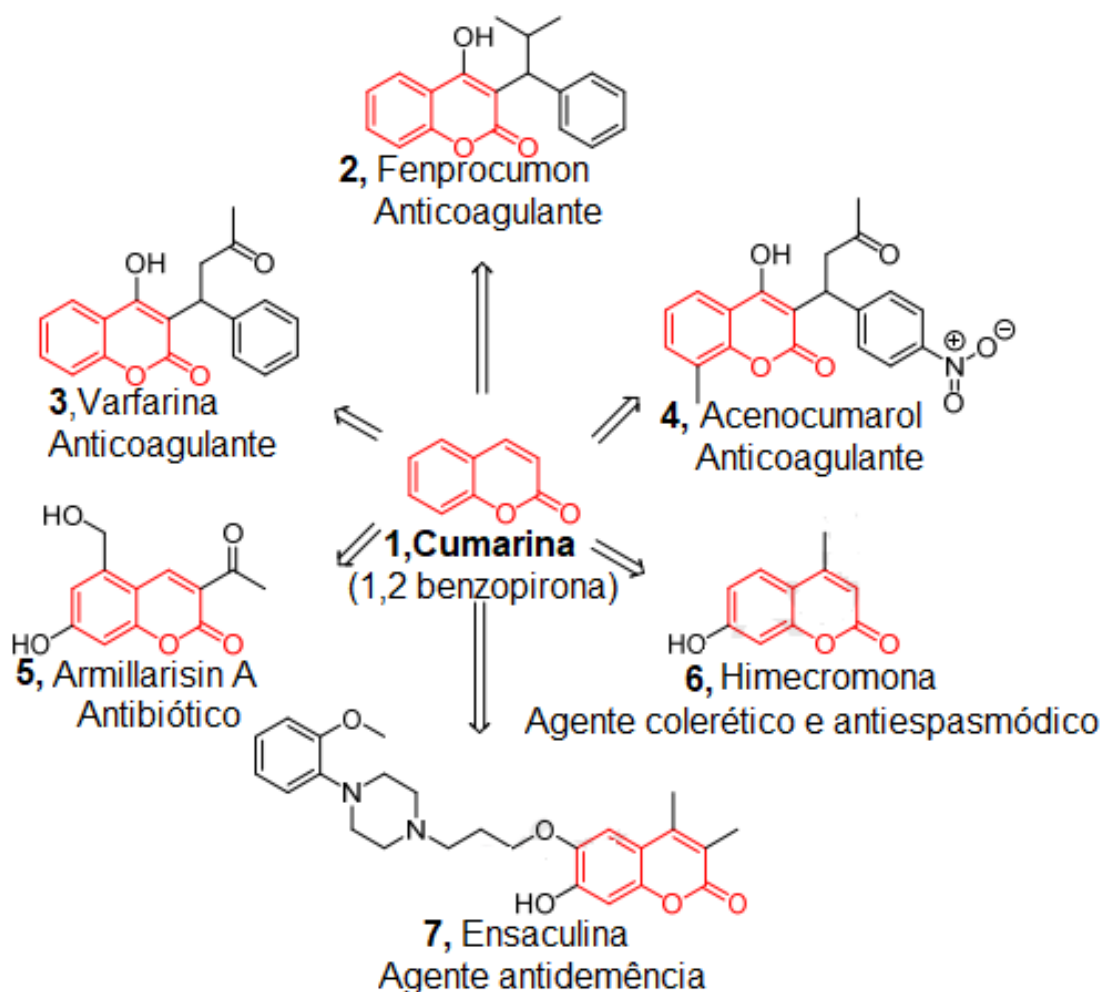


Fonte: Autoria própria.

Atualmente, a indústria farmacêutica comercializa vários medicamentos com terapêuticas importantes produzidos a partir das cumarinas e suas modificações químicas. Por exemplo, fenprocumon, varfarina e acenocumarol são considerados potentes anticoagulantes, o armillarisin A é um antibiótico, o himecromona é um agente colerético e antiespasmódico e a ensaculina possui atividade antidemência no sistema neurotransmissor (SALEHIAN et al., 2020). Diante destes medicamentos podemos inferir que as propriedades farmacológicas e as aplicações terapêuticas das cumarinas dependem fortemente do padrão de substituição de grupos químicos em seus anéis aromáticos (Figura 6) (SALEHIAN et al., 2020). Dentro deste mesmo conceito, estudos demonstraram também a ação antiviral das cumarinas e flavonoides

em diferentes tipos de vírus. Yeh e colaboradores mostraram, no ensaio de redução de placas, que a angelicina, uma furanocumarina, reduziu a infecção pelo vírus da gripe influenza em 50% a uma concentração de 20 nM e completamente a 100 nM (YEH et al., 2010). Além disso, Khomenko e coautores encontraram atividade antiviral de cumarinas e monoterpenos modificados, em células HEP-2, realizando ensaios de redução de título do RSV, no qual em todos os pontos de tempo analisados foi observada inibição do vírus (KHOMENKO et al., 2021)

Figura 6: Exemplos de medicamentos usados clinicamente de derivados de cumarinas



Fonte: Adaptado de SALEHIAN et al., 2020.

A investigação desses compostos fenólicos, assim como suas possíveis modificações químicas podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para tratamento contra a infecção causada pelo hRSV, melhorando a qualidade de vida dos pacientes acometidos.

1.3 Encapsulamento de moléculas hidrofóbicas

A encapsulação é uma técnica frequentemente utilizada para aumentar a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade de compostos bioativos, especialmente os hidrofóbicos, que apresentam reduzida solubilidade em meio aquoso. Dentre os sistemas de encapsulação, as ciclodextrinas (CDs) se destacam por sua estrutura química peculiar, formada por oligossacarídeos cíclicos capazes de formar complexos de inclusão (CHRISTAKI et al., 2023; SCHMID, 1996). As ciclodextrinas (CD) são uma classe de oligômeros cíclicos de glucopirranose formados durante a ação de enzimas como CD glicosiltransferases (CGTases) sobre o amido, com uma característica estrutural toroidal que forma uma cavidade lipofílica truncada em formato de cone permitindo a acomodação seletiva de moléculas hidrofóbicas em seu interior. As hidroxilas estão orientadas para o para o exterior das ciclodextrinas, enquanto a cavidade central é revestida por carbonos esqueléticos e oxigênios etéreos, o que lhe conferem um carácter lipofílico (WÜPPER et al., 2021; LOFTSSON et al., 2007). As principais ciclodextrinas naturais são α (alfa), β (beta) e γ (gama), que compreendem seis, sete e oito unidades de glucopirranose, respetivamente (TANNOUS et al., 2021). No entanto, visando aumentar a capacidade das ciclodextrinas naturais de formar complexos de inclusão e adequá-las a aplicações específicas, foram desenvolvidos derivados quimicamente modificados como, as ciclodextrinas hidroxialquiladas (Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e Hidroxietil- β -ciclodextrina (HE- β -CD)), metiladas (Metil- β -ciclodextrina (M- β -CD) e randomicamente metilada- β -ciclodextrina (RM- β -CD)), sulfobutil-éteres (Sulfobutil-éter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD)), carboximetiladas (Carboximetil- β -ciclodextrina (CM- β -CD)), amidoaminadas (Amino-ciclodextrinas), catiônicas ((2-hidroxi-3-[trimetilamônio]propil)- β -ciclodextrina), polímeros de β -ciclodextrinas reticuladas, fosforiladas (Fosfo- β -ciclodextrina), tioladas (Tio-ciclodextrinas) e modificação de cavidade interna, com grupos ácidos ou básicos na cavidade interna (AIASSA et al., 2023; CHALLA et al., 2005).

Fatores como tamanho da molécula e da cavidade da CD, pH e temperatura exerce influência significativa durante o processo de encapsulamento tanto na formação, quanto no desempenho dos complexos entre fármacos e CDs (CHIANG et al., 2014; CASTILHO et al., 1999; DIAZ et al., 1999; MURA et al., 1999). Para uma formação eficiente do complexo, o tamanho da cavidade da CD deve ser adequado

para encapsular a molécula de um tamanho específico (JACOB & NAIR, 2018; MURA et al., 1999-B; LUTKA, 2002). Comparando com as CDs neutras, a complexação tende a ser mais eficaz quando a CD e o fármaco possuem cargas opostas; no entanto, pode ser menos eficiente quando ambos apresentam cargas iguais (NAGASE et al., 2001; JAIN & ADEYEYE, 2001). No caso de fármacos ionizáveis, a presença de carga desempenha um papel essencial na eficiência da complexação, de forma que ajustes no pH da solução podem alterar a constante de estabilidade do complexo. Em geral, as formas não iônicas dos fármacos apresentam maior capacidade de formar complexos com CDs do que suas formas iônicas (SAMUELSEN et al., 2019; TROS DE ILARDYA et al., 1998).

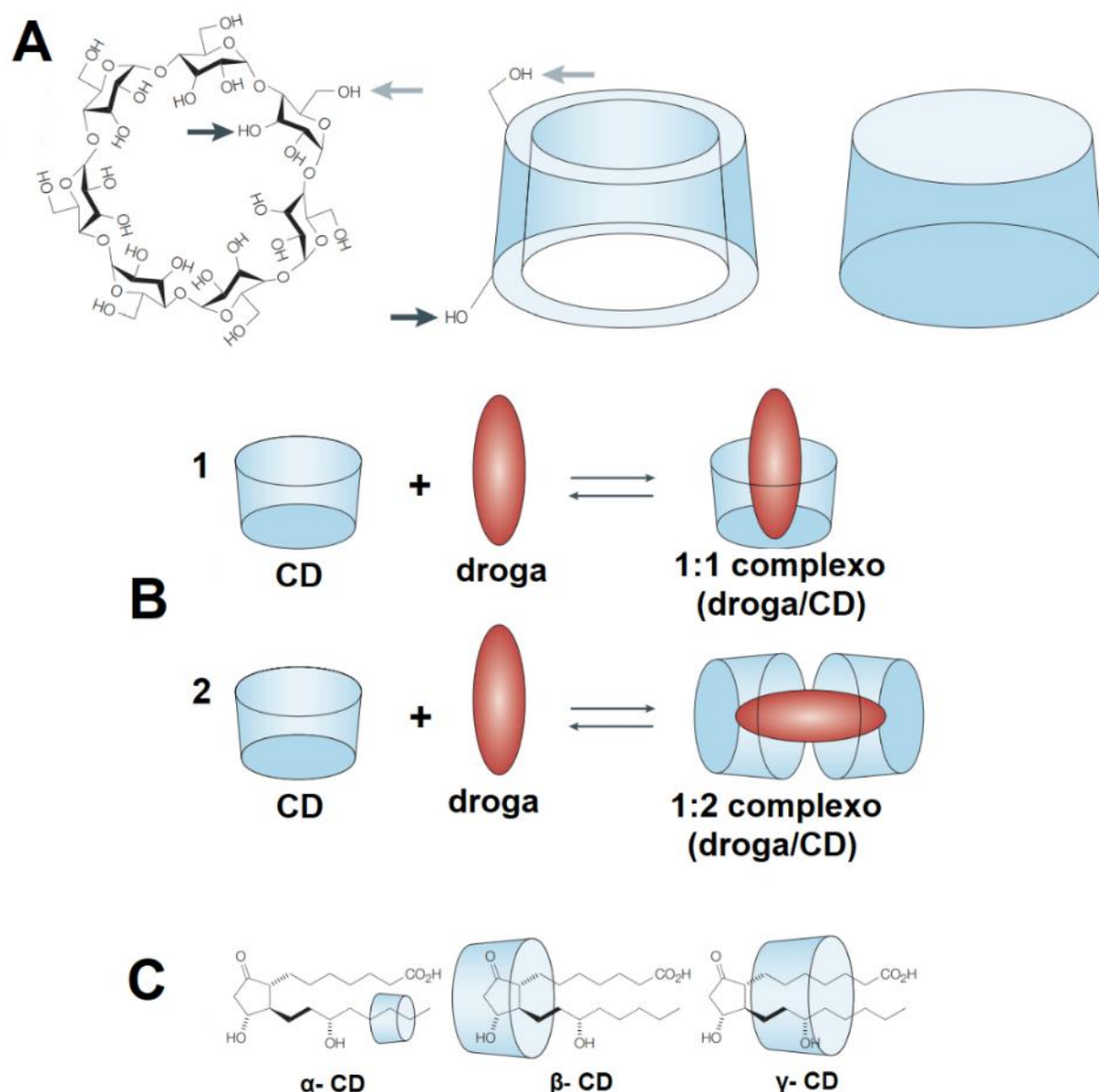
Mudanças de temperatura também podem afetar a complexação entre fármacos e CDs. Na maioria dos casos, o aumento da temperatura reduz a constante aparente de estabilidade do complexo. Esse efeito é atribuído a uma possível diminuição das forças de interação, como as forças de van der Waals e hidrofóbicas (SAKAY et al., 2023; CHALLA et al., 2005; JAIN & ADEYEYE, 2001; ZARZYCKI & LAMPARCZYK, 1998). No entanto, quando a interação entre o fármaco e a CD é predominantemente dirigida por entropia, como no caso da liberação de moléculas de água que hidratam as moléculas do hospedeiro e do hóspede durante a formação do complexo, os efeitos da temperatura podem ser insignificantes (MISKOLCZY et al., 2022; NAGASE et al., 2001).

Neste estudo foi utilizada a β -ciclodextrina (Figura 7A) para encapsular as cumarinas e hesperetina, moléculas com caráter hidrofóbico, com intuito de aumentar a solubilidade e permeabilidade destes compostos. As ciclodextrinas livres, as moléculas livres e seus complexos de inclusão coexistem em um estado de equilíbrio dinâmico, além disso as dimensões e características físico-químicas da molécula hospede precisam ser adequadas para a formação do complexo. Esse equilíbrio é representado na Figura 7B para complexos de inclusão do tipo 1:1 e 1:2, nos quais o fármaco pode ser parcialmente ou completamente incorporado à cavidade da CD. A Figura 6C exemplifica como os diferentes tipos de CDs (α -, β - e γ -CD) podem se associar à prostaglandina E2, no qual é observado que a compatibilidade entre fármaco e CD depende do tamanho da cavidade (DAVIS & BREWSTER, 2004).

A β - ciclodextrina apresenta algumas características físico-químicas como: sete unidades de glicose em sua estrutura química, solubilidade em água 1,85 g/100 mL em 25 °C, diâmetro da cavidade de 6,0- 6,5 Å (angstrom), pKa 12,202, temperatura de decomposição 280 °C e tensão superficial de 73 nM/m (POULSON et al., 2022; CHALLA et al., 2005; LOFTSSON & DUCHENE, 2007) e características estruturais, como massa molar elevada (1.135 g/mol) e um baixo coeficiente de partição octanol/água, que limitam sua capacidade de permeação através de membranas biológicas (POULSON et al., 2022; LIPINSKI et al., 2001). Diante disso, as CDs interagem com a membrana celular para promover a liberação do fármaco na superfície da célula ou facilitar sua entrada por mecanismos como endocitose mediada por receptores. As CDs funcionalizadas, por exemplo, podem se ligar a receptores de transferrina, frequentemente super expressos em células tumorais, ou a receptores de folato, comuns em células cancerígenas, promovendo entrega direcionada. Modificações também permitem interações com receptores de lectinas, *scavenger* ou lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Uma vez internalizado, o fármaco é liberado devido a alterações nas condições intracelulares, como pH, força iônica ou competição com biomoléculas presentes no ambiente celular (CEBORSKA, 2017; LOFTSSON & BREWSTER, 2012).

Em contrapartida, a metil- β -ciclodextrina por exemplo, tem afinidade pelo colesterol e pode extraí-lo, assim como outros componentes lipídicos da membrana das células e em concentrações elevadas, pode causar hemólise dos eritrócitos. Adicionalmente, a administração parentérica das formas complexadas com colesterol não é possível pois acumulam no fígado e pode produzir lesões nos túbulos renais. Neste contexto, as β -CDs modificadas e funcionalizados podem atenuar estes problemas, visto que já existem medicamentos, complexos fármaco- β - ciclodextrina, aprovados e comercializados na Europa e Japão, como Benexate, Dexametasona, Iodo, Nimesulida, Nitroglicerina, Omeprazol, Dinoprostona (PGE₂), Piroxicam, ácido tiaprofénico (CHRISTAKI et al., 2023; DAVIS & BREWSTER, 2004).

Figura 7: (A) Representações esquemáticas da β -ciclodextrina. As setas aberta e fechada apontam para os grupos hidroxilas na cavidade interna e externa da molécula. A arquitetura da ciclodextrina (CD) tem forma toroidal com cavidade de $0,79 \pm 0,01$ nm e os diâmetros exteriores $1,54 \pm 0,04$ nm. (B) Ilustração esquemática da associação da ciclodextrina (CD) livre e do fármaco para formar complexos, (1) complexo fármaco-CD 1:1 (2) complexo fármaco-CD 1:2. (C) Modelos propostos de complexos de inclusão entre a prostaglandina E2 e α -CD, β -CD e γ -CD.



Fonte: Adaptado de DAVIS & BREWSTER, 2004.

A permeabilidade de moléculas pequenas e hidrofóbicas através das membranas celulares é frequentemente limitada devido à natureza hidrofóbica da bicamada lipídica, que atua como uma barreira seletiva. Embora moléculas pequenas possam, teoricamente, atravessar a membrana por difusão passiva, as moléculas hidrofóbicas enfrentam dificuldades para se dissolver na fase aquosa ao redor da célula, resultando em baixa solubilidade e biodisponibilidade. A literatura sugere que

moléculas com peso molecular inferior a aproximadamente 500 Da têm maior probabilidade de atravessar a membrana celular por difusão passiva, pois seu tamanho reduzido facilita a passagem pela bicamada lipídica (TOPUZ & UYAR, 2024; LIPINSKI et al, 2001). Em relação às cumarinas, a cumarina possui um peso molecular de 146,16 Da, a esculetina 178,18 Da, a esculina 304,30 Da, a 4-metil-esculetina 192,21 Da, a umbeliferona 162,17 Da e a hesperetina 302,26 Da, são pequenas o suficiente para possivelmente atravessar as membranas por difusão passiva. No entanto, suas propriedades hidrofóbicas podem limitar essa permeabilidade, principalmente se mais de uma molécula se agrupar e formar agregados, tornando-se uma molécula grande que não poderia atravessar a membrana celular sem o auxílio de um veículo (NCBI, 2024). O encapsulamento dessas moléculas em sistemas como ciclodextrinas (CDs) oferece uma solução eficaz, pois as CDs formam complexos de inclusão que protegem as moléculas hidrofóbicas da interação com o ambiente aquoso, melhorando sua solubilidade e estabilidade. Além disso, esse processo facilita a entrega controlada e direcionada, permitindo que a molécula seja liberada de forma eficaz dentro da célula ou em locais específicos, superando as limitações impostas pela membrana lipídica e otimizando a absorção e o efeito terapêutico (TOPUZ & UYAR, 2024; LOFTSSON & BREWSTER, 2012).

1.4 Modelos para desenvolvimento de terapias contra o hRSV

Apesar da relevância clínica causada pelas infecções do RSV, existe um desafio grande para o desenvolvimento de terapias e profilaxias em modelos *in vivo*. O organismo que oferece uma alternativa mais próxima da infecção humana é a dos primatas, contudo, devido às questões éticas e logísticas, esses modelos são menos viáveis para estudos em larga escala (ZOHAR et al., 2022; TAYLOR, 2017). Os ratos, camundongos e hamsters, têm sido até o presente momento, o modelo animal mais utilizado e que apesar de apresentar algumas limitações na replicação viral e na manifestação de sintomas clínicos como observados em humanos, têm fornecido respostas bem relevantes para os estudos com vírus sincicial respiratório humano (SITTHICHAROENCHAI et al., 2020; TAYLOR, 2017). Utiliza-se também modelos *in vitro*, como culturas de células, que apesar de não reproduzirem completamente a resposta imunológica sistêmica e a patogênese observadas em modelos *in vivo*, proporciona compreensão sobre os mecanismos moleculares da infecção (ALTAMIRANO-LAGOS et al., 2019; VILLENAVE et al., 2012).

Os ensaios celulares permitem a utilização de diferentes tipos celulares que podem ser de diversas origens, conhecidas como linhagens celulares imortalizadas e cultura de células primárias. As linhagens celulares são populações de células obtidas de tecidos que foram modificadas para crescer e se replicar indefinidamente em condições laboratoriais controladas (KAUR & DUFOUR, 2012; BERRIDGE et al., 2005). Esse comportamento é alcançado através de um processo de imortalização, o qual interrompe os mecanismos celulares responsáveis pela senescência, estado em que as células perdem a capacidade de se dividir, embora permaneçam metabolicamente ativas, e morte programada. A método de imortalização é realizado com a introdução de genes virais, como do HPV (Papilomavírus Humano) e o Epstein-Barr Vírus (EBV), ou alterações genéticas direcionadas, permitindo que as células continuem se dividindo sem as limitações naturais do ciclo celular natural (BIENKOWSKA-HABA et al., 2018; FRESHNEY, 2010; MAQSOOD et al., 2013).

Em contrapartida, as culturas de células primárias consistem em células isoladas diretamente de tecidos ou órgãos de um organismo, mantidas em um ambiente que simula as condições naturais do corpo humano. Essas células, diferentemente das linhagens imortalizadas, possuem uma capacidade de proliferação limitada e entram em senescência após poucas divisões celulares. Apesar dessa limitação, as culturas primárias preservam melhor as características fisiológicas, bioquímicas do tecido de origem e função do tecido de onde são derivadas, tornando-as excelente para estudos que requerem um modelo experimental mais próximo do estado *in vivo* (AMELIAN et al., 2017)

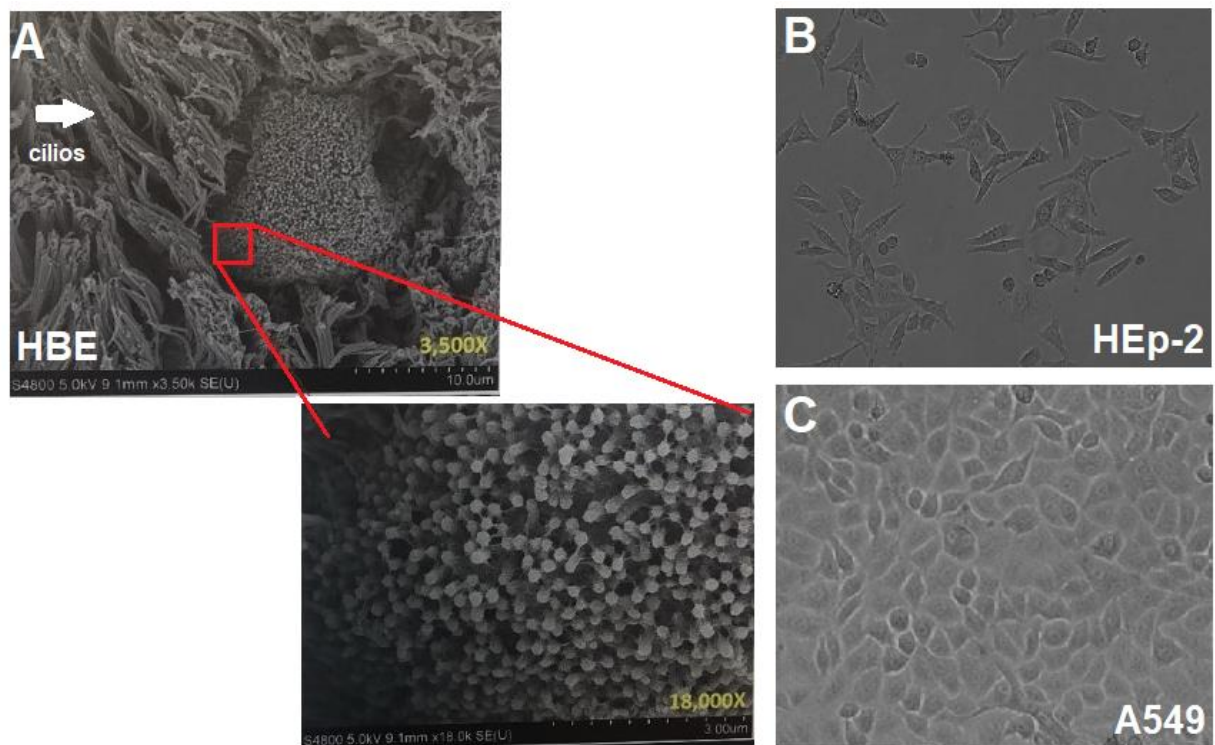
Neste estudo, foram utilizadas nos ensaios algumas linhagens celulares que melhor representam o trato respiratório humano, como as linhagens HEp-2, A549 e cultura de células primárias HBE (*human bronchial epithelium*) bem diferenciadas. A linhagem celular HEp-2 foi descrita pela primeira vez em 1954 por Howard W. Toolan, é derivada de um carcinoma epidermoide de laringe, com morfologia poligonais, núcleos grandes e arredondados. Porém, após análises subsequentes, incluindo estudos com isoenzimas, identificação de cromossomos específicos de células HeLa e técnicas de impressão digital de DNA, revelaram que as células HEp-2 eram, na verdade, resultantes de uma contaminação por células HeLa, uma linhagem derivada de adenocarcinoma cervical (GORPHE, 2019; GARTLER, 1968; TOOLAN, 1954; MOORE et al., 1955; CHEN et al., 1988). Essas descobertas destacam a importância

da autenticação rigorosa de linhagens celulares em pesquisas científicas para garantir a validade dos resultados experimentais. As células HEp-2 são imprescindíveis quando se estuda o vírus sincicial respiratório, devido sua alta permissividade à infecção, capacidade de aderência e proliferação em condições controladas, além de facilitar a replicação viral e a fusão celular. Utilizar células HEp-2 como modelo experimental nos ensaios com o RSV é bastante pertinente devido a capacidade desta célula de formar sincícios, que é o efeito citopático mais característicos das infecções causadas por vírus sincicial respiratório (RAJAN et al., 2022).

O segundo tipo de célula experimentado, a linhagem celular A549, foi isolada por Giard e colaboradores de em 1972, de um adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, de um paciente masculino de 58 anos e é amplamente utilizada como modelo de epitélio respiratório alveolar tipo II (ATII) (GIARD et al., 1973). As células epiteliais alveolares do tipo 1 (ATI) e tipo 2 (ATII) são altamente especializadas e desempenham funções distintas nas regiões alveolares. As células ATI, de morfologia epitelial cúbica ou coluna, com núcleos grandes e citoplasma abundante, cobrem cerca de 95% da superfície alveolar, estabelecendo contato direto com células endoteliais capilares para formar a barreira de troca gasosa. Já as células ATII, mais compactas, ocupam os 5% restantes da superfície alveolar e são multifuncionais, sendo descritas como “defensoras do alvéolo”. Uma característica marcante das células ATII é a presença de corpos multilamelares (MLB), que armazenam dipalmitoilfosfatidil colina (DPCC), o principal componente lipídico do surfactante pulmonar. Este surfactante reduz a tensão superficial nos alvéolos, prevenindo o colapso pulmonar ao final da expiração. Além disso, as ATII desempenham um papel crucial na imunidade inata dos pulmões, contribuindo com proteínas de surfactante que exibem propriedades antimicrobianas e modulam a inflamação causada por irritantes inalados. As células ATII são responsáveis também pelo transporte ativo de sódio, facilitando a remoção de fluidos alveolares, e atuam como progenitoras, regenerando células ATI danificadas para manter a arquitetura funcional do pulmão. Essa capacidade regenerativa destaca a importância das ATII na homeostase e reparação do tecido pulmonar (KENHUB, 2023; COOPER et al., 2016). As células A549 apesar de terem origem cancerígena representam adequadamente os alvéolos pulmonares, no entanto nos ensaios com o RSV, esta linhagem não apresenta efeitos citopáticos consideráveis, não forma sincícios, sendo necessário a utilização de um

vírus marcado ou anticorpos específicos que identifiquem a infecção (RAJAN et al., 2022). A Figura 8 mostra a morfologia das células utilizadas.

Figura 8: Representação das diferentes morfologias dos tipos celulares estudados (A) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de cultura de células HBE bem diferenciadas após 4 semanas do processo de diferenciação. O inserto mostra algumas células que ainda não se diferenciaram. (B) células HEp-2 e (C) células A549.



Fonte: Autoria própria.

E por fim, testamos a atividade antiviral das cumarinas e hesperetina em cultura de HBE bem diferenciada. As células epiteliais brônquicas humanas (HBE) são obtidas a partir de tecido pulmonar humano de um doador, quando submetidas a um protocolo otimizado de cultivo, apresentam diferenciação em um epitélio mucociliar pseudoestratificado bem diferenciado que replica com alta fidelidade as características do epitélio das vias aéreas humanas *in vitro*. O protocolo inclui etapas como a obtenção de tecido pulmonar excisado, digestão enzimática para liberar as células epiteliais, cultivo inicial para expansão celular e posterior diferenciação em cultura na interface ar-líquido (ALI) para promover a formação de um epitélio mucociliar funcional (AHMED et al., 2022; FULCHER et al., 2005). Esse modelo é amplamente empregado em pesquisas para elucidar os mecanismos fisiológicos das vias aéreas, bem como os processos patogênicos associados a doenças respiratórias. As culturas bem diferenciadas de HBE permitem a investigação detalhada de funções críticas, como a integridade da barreira epitelial, a produção e secreção de muco, além

das respostas imunológicas inatas, tornando-as ferramentas essenciais para estudos translacionais e terapêuticos (DE SÁ et al., 2024; ZANG et al., 2002).

Em relação aos receptores celulares, em células imortalizadas, o RSV utiliza a glicoproteína G a qual se liga aos proteoglicanos de heparam sulfato (HSPG), essencial no processo de infecção. Os HSPG são macromoléculas compostas por uma proteína central à qual estão covalentemente ligadas cadeias de heparam sulfato, um tipo de glicosaminoglicano sulfatado e estão localizados na superfície celular ou na matriz extracelular (WIDJOJOATMODJO et al., 2018). Por outro lado, nas células epiteliais brônquicas humanas (HBE), especialmente na superfície apical das células ciliadas, os HSPG não estão presentes para facilitar a entrada viral (ZHANG et al., 2005). Em vez disso, o CX3CR1, um receptor que interage com o motivo CX3C presente na glicoproteína G, é o principal mediador da infecção em culturas de HBE (JOHNSON et al., 2015). O CX3CR1 é um receptor de quimiocina pertencente à família dos receptores acoplados à proteína de membrana G (GPCR), e sua principal função é mediar a atração de células do sistema imunológico em resposta à quimiocina fractalkine (CX3CL1). O CX3CR1 está expresso em diversas células do sistema imunológico, células não imunes, como células endoteliais e neurônios e em células HAE (*human airway epithelial*) (Zhang et al., 2002; KING et al., 2021). Sendo assim, a diferença na utilização de receptores destaca a complexidade dos mecanismos de infecção do RSV, o que pode causar variações nas respostas dos antivirais que utilizam esses receptores celulares para inibição da infecção viral.**2**

5 CONCLUSÃO

Os estudos moleculares realizados demonstraram que a cumarina 1,2-benzopirona interage de forma específica com o bolso hidrofóbico da nucleoproteína do vírus sincicial respiratório (RSV), competindo diretamente com o undecapeptídeo, oriundo da fosfoproteína. Embora sua estrutura química seja relativamente pequena, a cumarina foi capaz de perturbar eficazmente a interação do peptídeo com o sítio hidrofóbico da nucleoproteína. Essa descoberta ressalta o potencial da 1,2-benzopirona como uma molécula de interesse, apresentando características que a tornam uma excelente candidata para investigações mais aprofundadas. Portanto, a 1-2 benzopirona deve ser considerada uma molécula de alto valor para o avanço das pesquisas no campo do RSV.

Nos ensaios celulares, as cumarinas, incluindo a cumarina, 4-metil esculetina e esculetina, demonstraram grande capacidade em inibir a replicação do RSV. Considerando que, neste estudo, foram utilizados os modelos *ex vivo* bastante representativos e fidedignos para investigar terapias contra o vírus sincicial respiratório humano, e essas moléculas conseguiram ultrapassar a barreira de células mucociliadas das culturas de epitélio brônquico humano, fica evidente a ação desses compostos fenólicos. Esses resultados sugerem que as cumarinas possuem um excelente perfil antiviral, corroborando sua eficácia e confirmando seu grande potencial como agentes terapêuticos contra o RSV. Diante disso, podemos afirmar que esses compostos fenólicos têm características químicas, estruturais e biológicas excepcionais, como sua capacidade de interação molecular com proteínas virais, propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de sua versatilidade estrutural, que permite modificações químicas para otimizar a solubilidade e a biodisponibilidade, posicionando-os como promissores candidatos para o desenvolvimento de tratamentos terapêuticos eficazes contra o RSV.

Além disso, em nosso estudo, a β -ciclodextrina se mostrou fundamental para permitir que algumas das cumarinas permeassem a membrana celular e atingissem seus alvos. Essa ação corroborou com a literatura existente, que reconhece a β -ciclodextrina como um excelente veículo para o transporte de pequenas moléculas hidrofóbicas, permitindo uma maior biodisponibilidade e facilitando a entrega de compostos terapêuticos. No entanto, são necessárias mais investigações para

determinar a estequiometria ideal dos complexos β -ciclodextrina/cumarina e β -ciclodextrina/hesperetina, a fim de otimizar sua eficácia e segurança. Adicionalmente, é essencial identificar os alvos virais ou celulares responsáveis pela inibição do RSV, para proporcionar uma compreensão mais completa dos mecanismos de ação desses compostos.

Ainda, é importante ressaltar que, para que esses compostos fenólicos se tornem terapias viáveis contra o RSV, mais estudos são necessários para investigar possíveis modificações químicas nas estruturas dessas moléculas. Tais modificações poderiam potencializar sua ação anti-RSV, aumentando sua ação inibitória e ao mesmo tempo reduzir sua citotoxicidade, um aspecto crucial para garantir a segurança em tratamentos terapêuticos.

Em resumo, os resultados obtidos até agora demonstram um grande potencial das cumarinas como agentes antivirais contra o RSV, mas é fundamental continuar com a pesquisa, visando otimizar suas propriedades terapêuticas e ampliar nosso entendimento sobre seus mecanismos de ação. A combinação entre a modificação de estruturas moleculares e o uso de veículos como a β -ciclodextrina oferece uma base sólida para o avanço dessas moléculas no desenvolvimento de tratamentos para o RSV, e outras infecções respiratórias virais.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, P.K.; AGRAWAL, C.; BLUNDEN, G. Pharmacological Significance of Hesperidin and Hesperetin, Two Citrus Flavonoids, as Promising Antiviral Compounds for Prophylaxis Against and Combating COVID-19. **Nat. Prod. Commun**, v.16, p. 1–15, Oct. 2021.DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X211042540>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X211042540>. Acesso em: 02 fev. 2024.

AHMED, E. et al. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Severe COPD into Functional Airway Epithelium. **Cells**, v. 11, p. 2422, Aug. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11152422>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9368529>. Acesso em: 20 jan. 2025.

AIASSA V. et al. Cyclodextrins and Their Derivatives as Drug Stability Modifiers. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 16, p.1074, Jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph16081074>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10459549>. Acesso em: 20 jan. 2025.

ALTAMIRANO-LAGOS, M.J. et al. Current Animal Models for Understanding the Pathology Caused by the Respiratory Syncytial Virus. *Front Microbiol.*, v.10, p. 873, May. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00873>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6510261>. Acesso em: 20 jan. 2025.

AMBREEN, H. S. et al. Biotransformation of newly synthesized coumarin derivatives by *Candida albicans* as potential antibacterial, antioxidant and cytotoxic agents. **Process Biochemistry**, v.87, p.138-144, Dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511319302703?via%3Dihub>. Acesso em: 22 mar.2023.

AMELIAN, A. et al. Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. **Pharmacological Reports**, v. 69, p. 861-870, Oct. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1734114016303462?via%3Di hub>. Acesso em: 18 jan.2023.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. RSV Vaccine in Pregnancy Prevents Severe Illness in Infants. **AAP Grand Rounds**, v. 50, p. 3, Jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1542/gr.50-1-3>. Disponível em: <https://publications.aap.org/aapgrandrounds/article-abstract/50/1/3/191734/RSV-Vaccine-in-Pregnancy-Prevents-Severe-Illness?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 04 abr.2024.

ANANWORANICH, J.; HEATON, P. M. Bringing preventive RSV monoclonal antibodies to infants in low- and middle-income countries: challenges and opportunities. **Vaccines (Basel)**, v. 9, p. 961, Aug. 2021.DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines9090961>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34579198/>. Acesso em: 13 mai.2023.

ANWAR, S. et al. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.10.011>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26474524/>. Acesso em: 05 out. 2024.

BECKETT, D. Measurement and analysis of equilibrium binding titrations: A beginner's guide. **Methods Enzymology**, v. 488, p. 1-16, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381268-1.00001-X>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21195222/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

BENZATTI, F. P. et al. Investigation of the interaction between coumarins and its derivatives with human serum albumin: STD-NMR, fluorescence and docking molecular studies. **International Journal of Sciences**, v. 5, p. 1-11, Feb. 2016. DOI: <https://doi.org/10.18483/ijSci.777>. Disponível em: <https://www.ijsciences.com/pub/article/777>. Acesso em: 20 set.2024.

BERGERON, H.C. et al. Immune Prophylaxis Targeting the Respiratory Syncytial Virus (RSV) G Protein. **Viruses**, v.15, p. 1067, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15051067>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/15/5/1067>. Acesso em: 16 jan. 2025.

BERMINGHAM, A.; COLLINS, P. L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, p. 11259-11264, Sep.1999. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11259>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10500164/>. Acesso em: 28 mar.2024.

BERRIDGE, M.; TAN, A. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, p. 474-482, Jun. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8390225/>. Acesso em: 23 mai.2023.

BERRIDGE, M. V. et al. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127-152, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16216776/>. Acesso em 03 out. 2024.

BORGES, F. et al. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 887-916, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867053507315>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15853704/>. Acesso em: 30 abr.2024.

BRAUN, M.R. et al. Respiratory syncytial virus M2-1 protein associates non-specifically with viral messenger RNA and with specific cellular messenger RNA transcripts. **PLoS Pathog**, v.17, p. e1009589, May. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009589>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1009589>. Acesso em: 16 jan. 2025.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Informe SE 48 de 2024. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/covid-19/publicacoes-tecnicas/informes/informe-se-48-de-2024.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2025.

BIENKOWSKA-HABA, M. et al. A new cell culture model to genetically dissect the complete human papillomavirus life cycle. **PLoS Pathog.**, v. 14, p. e1006846, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006846>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article%3Fid%3D10.1371/journal.ppat.1006846>. Acesso em: 20 jan. 2025.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M. et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 298–344, Apr. 2011. DOI: <https://doi.org/10.2174/138955711795305335>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21428901/>. Acesso em: 06 mar. 2024.

CARVAJAL, J. J. et al. Host components contributing to respiratory syncytial virus pathogenesis. **Front Immunol.**, v. 10, p. 2152, Sep. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02152>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31572372>. Acesso em: 25 jan. 2025.

CARTEE, T. L.; WERTZ, G. E. Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection. **Journal of Virology**, v. 75, p. 12188–12197, Dec. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12188-12197.2001>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11711610/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

CASTAGNE, N. et al. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 1643–1653, Jun. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.79830-0>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15166449/>. Acesso em: 19 set. 2024.

CEBORSKA M. Folate appended cyclodextrins for drug, DNA, and siRNA delivery. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 120, p. 133-145, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.09.005>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28893691>. Acesso em: 20 jan. 2025.

CHAIRA, T.; SUBRAMANI, C.; BARMAN, T. K. ADME, pharmacokinetic scaling, pharmacodynamic and prediction of human dose and regimen of novel antiviral drugs. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1212, Apr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041212>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/4/1212>. Acesso em: 23 abr. 2023.

CHALLA, R. et al. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, p. E329–E357, Oct. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1208/pt060243>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2750546/>. Acesso em: 18 fev. 2024.

CHANDLER, R. et al. Immunogenicity, reactogenicity, and safety of AS01E-adjuvanted respiratory syncytial virus (RSV) prefusion F protein-based candidate vaccine (RSVPreF3 OA) when co-administered with a seasonal quadrivalent influenza vaccine in older adults: Results of a phase 3, open-label, randomized controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, ciad786, Jan. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciad786>. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciad786/7512839>. Acesso em: 22 set. 2023.

CHANDRASEKARAN, S.; MUTHU VIJAYAN ENOCH, I. Host–guest association of coumarin 343 with β -cyclodextrin and C-hexylpyrogallol[4]arene: opposite fluorescent behavior and prototropic characteristics. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 80, p. 225–234, Jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10847-014-0380-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10847-014-0380-z>. Acesso em: 10 nov. 2024.

CHAWLA, K. et al. Autophagy in virus infection: A race between host immune response and viral antagonism. **Immuno**, v. 2, p. 153–169, Jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/immuno2010012>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-5601/2/1/12>. Acesso em: 12 set. 2024.

CHEN, J. et al. Self-assembled liposome from multi-layered fibrous mucoadhesive membrane for buccal delivery of drugs having high first-pass metabolism. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, p. 303–314, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.062>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517318303703?via%3Dihub>. Acesso em: 14 mai. 2024.

CHEN, S. A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. **Molecules**, v. 28, p. 4982, Jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28134982>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/13/4982>. Acesso em: 16 jan. 2025.

CHEN, M. D. et al. Conservation of the respiratory syncytial virus SH gene. **Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 1228–1233, Oct. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1086/315829>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/182/4/1228/920389>. Acesso em: 16 jan. 2025.

CHEN, T. R. Reevaluation of HeLa, HeLa S3, and HEp-2 karyotypes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 48, p. 19–24, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1159/000132579>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3180844/>. Acesso em: 03 abr. 2024.

CHEN, Y. et al. Mapping of binding interfaces of the proteins of the bacterial phosphotransferase system, HPr and IIAGlc. **Biochemistry**, v. 32, p. 32–37,

Jan.1993. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00052a006>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8418852/>. Acesso em: 22 jul. 2024.

CHIANG, P. C.; SHI, Y.; CUI, Y. Temperature Dependence of the Complexation Mechanism of Celecoxib and Hydroxyl- β -cyclodextrin in Aqueous Solution. **Pharmaceutics**, v. 6, p.467-480, Aug. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6030467>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4190530>. Acesso em: 16 jan. 2025.

CHRISTAKI S. et al. Cyclodextrins for the Delivery of Bioactive Compounds from Natural Sources: Medicinal, Food and Cosmetics Applications. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 16, p.1274, Sep. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph16091274>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10535610>. Acesso em: 20. Jan. 2025.

COLEMAN, S. M.; MCGREGOR, A. A bright future for bioluminescent imaging in viral research. **Future Virology**, v. 10, p. 169–183, Feb. 2015. DOI: <https://doi.org/10.2217/fvl.14.96>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/fvl.14.96>. Acesso em: 15 fev. 2024.

COLLINS, P.L.; FEARN, R.; GRAHAM, B.S. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 372, p.3-38, Mar. 2013. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_1. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4794264>. Acesso em: 08 jan. 2025.

COLLINS, P. L.; HILL, M. G.; CAMARGO, E.; GROSFELD, H.; CHANOCK, R. M.; MURPHY, B. R. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the M2 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 11563–11567, Dec.1995. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11563>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.92.25.11563>. Acesso em: 13 jan. 2025.

COLLINS, P. L.; MOTTET, G. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 3095–3101, Dec. 1991. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-12-3095>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-72-12-3095>. Acesso em: 30 mar. 2024.

COLLINS, P. L.; KARRON, R. A. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 6. ed. v. 1. Wolters Kluwer HealthAdis (ESP), 2013. p. 1086–1123.

COLLINS, P. L.; CROWE, J. E. Jr. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1601–1646.

COLLINS, P. L.; MCINTOSH, K.; CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. In: FIELDS, B. N. (Ed.). **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, v. 1, p. 1602–1645, 2007.

CONLEY, M. J. et al. Helical ordering of envelope-associated proteins and glycoproteins in respiratory syncytial virus. **EMBO J.**, v. 41, p.109728, 2022. DOI: <https://doi.org/10.15252/embj.2021109728>. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.2021109728>. Acesso em: 16 jan. 2025.

COOPER, J. R. et al. Long-term culture of the A549 cancer cell line promotes multilamellar body formation and differentiation towards an alveolar type II pneumocyte phenotype. **PLoS ONE**, v. 11, p. e0164438, Oct. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164438>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0164438>. Acesso em: 15 jul.2024.

CORRY, J. et al. Preventing cleavage of the respiratory syncytial virus attachment protein in Vero cells rescues the infectivity of progeny virus for primary human airway cultures. **Journal of Virology**, v. 90, p. 1311–1320, Jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02351-15>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.02351-15>. Acesso em: 22 ago. 2023.

COULDWELL, W. T. et al. Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines. **FEBS Letters**, v. 345, p. 43–46, May. 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00415-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00415-3). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8194597/>. Acesso em: 15 jun.2024.

CHRISTAKI, S. et al. Cyclodextrins for the Delivery of Bioactive Compounds from Natural Sources: Medicinal, Food and Cosmetics Applications. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 16, p. 1274, Sep. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph16091274>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10535610>. Acesso em: 16 jan. 2025.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 1023–1035, Dec. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd1576>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd1576>. Acesso em: 17 abr. 2024.

DELAGLIO, F. et al. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, p. 277–293, Nov. 1995. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00197809>. Acesso em: 19 jan. 2024.

DE SÁ, J. M. et al. Coumarins and Hesperetin Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection. **Int J Mol Sci.**, v. 25, p.13301, Dec. 2024. DOI:

<https://doi.org/10.3390/ijms252413301>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39769063>. Acesso em: 20 jan. 2025.

DIAZ, D.; ESCOBAR LLANOS, C. M.; BERNAD, M. J. B. Study of the binding in an aqueous medium of inclusion complexes of several cyclodextrins involving fenoprofen calcium. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, p. 107–110, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1081/ddc-100102150>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10028427/>. Acesso em: 29 jul.2024.

DICKENS, L. E.; COLLINS, P. L.; WERTZ, G. W. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. **Journal of Virology**, v. 52, p. 364–369, Jan. 1984. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.52.2.364-369.1984>. Disponível em:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.52.2.364-369.1984>. Acesso em: 10 abr. 2024.

FALSEY, A. R. et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1749–1759, Apr. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043951>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15858184/>. Acesso em: 05 fev. 2024.

FOOLAD, F. et al. Oral versus aerosolized ribavirin for the treatment of respiratory syncytial virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, p. 1641–1649, Sep. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy760>. Disponível em:
<https://academic.oup.com/cid/article/68/10/1641/5092771>. Acesso em: 12 out.2024.

FEARNS, R.; COLLINS, P. L. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. **Journal of Virology**, v. 73, p. 5852–5864, Jul. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.73.7.5852-5864.1999>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.73.7.5852-5864.1999>. Acesso em: 27 nov. 2024.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. 1. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Sep. 2010. p. 187–206. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470649367>. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/978047064936>. Acesso em: 07 jan. 2024.

FUENTES, S. T. et al. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. **Journal of Virology**, v. 81, 2007. DOI: 10.1128/jvi.02717-06.

FULCHER, M. L. et al. Well-differentiated human airway epithelial cell cultures. **Methods in Molecular Medicine**, v. 107, p. 183–206, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1385/1-59259-861-7:183>. Disponível em:
<https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-861-7:183>. Acesso em: 17 set. 2023.

GALLOUX, M. et al. Characterization of a viral phosphoprotein binding site on the surface of the respiratory syncytial nucleoprotein. **Journal of Virology**, v. 86, p. 8375–8387, Aug. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00058-12>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22623798/>. Acesso em: 13 jun. 2023.

GAN, S. W. et al. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 24671–24689, Jul. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.332791>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820433198?via%3Dihub>. Acesso em: 20 ago. 2024.

GARCIA-BEATO, R. et al. Host cell effect upon glycosylation and antigenicity of human respiratory syncytial virus G glycoprotein. **Virology**, v. 221, p. 301–309, Jul. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0379>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682296903797?via%3Dihub>. Acesso em: 03 nov. 2024.

GARTLER, S. M. Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell lines. **Nature**, v. 217, p. 750–751, Feb. 1968. DOI: <https://doi.org/10.1038/217750a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/217750a0>. Acesso em: 18 set. 2024.

GENBANK. Human Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Protein 1, Nonstructural Protein 2, Nucleocapsid Protein, Phosphoprotein, Matrix Protein, Small Hydrophobic Protein, Glycoprotein, Fusion Glycoprotein, 22K/M2 Protein and L Protein mRNA, Complete cds.; Accession No. M74568.1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M74568>. Acesso em: 19 set. 2024.

GHILDYAL, R. et al. Nuclear import of the respiratory syncytial virus matrix protein is mediated by importin beta1 independent of importin alpha. **Biochemistry**, v. 44, p. 12887–12895, Sep. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi050701e>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16171404/>. Acesso em: 04 mai. 2024.

GHILDYAL, R. (a) et al. Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1879–1884, Jul. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.80829-0>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15958665/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

GHILDYAL, R. (b) et al. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 753–757, Apr. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-4-753>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11907323/>. Acesso em: 17 out. 2024.

GIARD, D. J.; et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, p. 1417–1423, Nov. 1973. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4357758/>. Acesso em: 21 nov. 2024.

GIDWANI, S. V. Et al. Engineered dityrosine-bonding of the RSV prefusion F protein imparts stability and potency advantages. **Nat Commun**, v. 15, p. 2202, Feb. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46295-8>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-46295-8>. Acesso em: 16 jan. 2025.

GORMAN, J. J. et al. Antiviral activity and structural characteristics of the nonglycosylated central subdomain of human respiratory syncytial virus attachment (G) glycoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 38988–38994, Oct. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M106288200>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820741621?via%3Dihub>. Acesso em: 06 mar. 2024.

GORPHE P. A comprehensive review of Hep-2 cell line in translational research for laryngeal cancer. **Am J Cancer Res.**, v. 9, p. 644-649, Apr. 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6511639>. Acesso em: 20 jan. 2025.

GRAY, R.; STUDSTILL, C. J.; NUNN, C. L. Mitigating future respiratory virus pandemics: new threats and approaches to consider. **Viruses**, v. 13, p. 637, Apr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13040637>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/4/637>. Acesso em: 11 ago. 2024.

GRIFFITHS, C.; DREWS, S. J.; MARCHANT, D. J. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. **Clin Microbiol Rev.**, v. 30, p. 277-319, Nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-16>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5217795/#abstract1>. Acesso em: 20 jan. 2025.

GROTEWOLD, E. The Science of Flavonoids. New York: Springer, 2006. Jan.

GRZESIEK, S. et al. The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. **Biochemistry**, v. 35., p. 10256–10261, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi9611164>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8756680/>. Acesso em: 13 dez. 2024.

HALL, C. B. et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 588–598, Feb. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804877>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19196675/>. Acesso em: 20 out. 2024.

HALLAK, L. K. et al. Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. **Virology**, v. 271, p. 264–275, Jun. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0293>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682200902939?via%3Dihub>. Acesso em: 28 jan. 2024.

HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS NONSTRUCTURAL PROTEIN 1, NONSTRUCTURAL PROTEIN 2, NUCLEOCAPSID PROTEIN,

PHOSPHOPROTEIN, MATRIX PROTEIN, SMALL HYDROPHOBIC PROTEIN, GLYCOPROTEIN, FUSION GLYCOPROTEIN, 22K/M2 PROTEIN AND L PROTEIN MRNA, Complete cds. GenBank; Accession No. M74568.1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M74568.1>. Acesso em: 19 set. 2024.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Acesso em: 05 mar. 2025. Disponível em: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202401651&taxon_name=Orthopneumovirus%20hominis.

ISKINEYEVA, A. et al. Combined in silico and experimental investigations of resveratrol encapsulation by beta-cyclodextrin. **Plants**, v. 11, p. 1678, Jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11131678>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/13/1678>. Acesso em: 25 abr. 2024.

ISON, M. G. et al. Descamps, for the AReSVi-006 Study Group., Efficacy and Safety of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Prefusion F Protein Vaccine (RSVPreF3 OA) in Older Adults Over 2 RSV Seasons, **Clinical Infectious Diseases**, v. 78, p. 1732–1744, Jun. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciae010>. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/78/6/1732/7585312>. Acesso em: 09 dez. 2024.

JAIN, A. C.; ADEYEYE, M. C. Hygroscopicity, phase solubility and dissolution of various substituted sulfobutylether beta-cyclodextrins (SBE) and danazol-SBE inclusion complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, p. 177–186, Jan. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(00\)00607-4](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(00)00607-4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11165075/>. Acesso em: 25 nov. 2025.

JAN, R. et al. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy*, v. 11, p. 968, May. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/11/5/968>. Acesso em: 16 jan. 2025.

JACOB, S., NAIR, A. B. Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. **Drug Development Research**, v.79, p. 201–217, May. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/ddr.21452>. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ddr.21452>. Acesso em: 16 jan. 2025.

JOHNSON, S. M. et al. Respiratory syncytial virus uses CX3CR1 as a receptor on primary human airway epithelial cultures. **PLoS Pathogens**, v. 11, p. 1–16, Dec. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005318>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005318>. Acesso em: 14 abr. 2024.

JUNG, H. I. E.; KIM, T. H.; LEE, H. K. Contribution of dendritic cells in protective immunity against respiratory syncytial virus infection. **Viruses**, v. 12, p. 102, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12010102>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/1/102>. Acesso em: 04 fev. 2024.

KALER, J. et al. Respiratory Syncytial Virus: A Comprehensive Review of Transmission, Pathophysiology, and Manifestation. **Cureus**, v. 15, p. e36342, Mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.36342>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10111061>. Acesso em: 25 jan. 2025.

KARAK, P. Biological activities of flavonoids: An overview. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 10, p. 1567–1574, Apr. 2019. Disponível em: <https://ijpsr.com/bft-article/biological-activities-of-flavonoids-an-overview/?view=fulltext>. Acesso em: 16 jan. 2025.

KASLOW, D. C. (a) Approval letter: Abrysvo. Silver Spring, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/168890/download>. Acesso em: 22 out. 2024.

KASLOW, D. C. (b) Approval letter: Arexvy. Silver Spring, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/167806/download>. Acesso em: 22 out. 2024.

KAUL, T. N.; MIDDLETON, E. J.; OGRA, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. **Journal of Medical Virology**, v. 15, p. 71–79, Jan. 1985. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.1890150110>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.1890150110>. Acesso em: 18 mai. 2024.

KAUR, G.; DUFOUR, J.M. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. **Spermatogenesis**, v. 2, p.1- 5, Jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.4161/spmg.19885>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3341241>. Acesso em: 20 jan. 2025.

KENHUB. Anatomia dos alvéolos. **Kenhub**, 2023. Disponível em: <https://www.kenhub.com/pt/library/anatomia/anatomia-dos-alveolos>. Acesso em: 20 jan. 2025.

KHOMENKO, T. M. et al. Monoterpene-containing substituted coumarins as inhibitors of respiratory syncytial virus (RSV) replication. **Molecules**, v. 26, Dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26247493>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/24/7493>. Acesso em: 30 abr. 2024.

KING, T. et al. The larger attachment glycoprotein of respiratory syncytial virus produced in primary human bronchial epithelial cultures reduces infectivity for cell lines. **PLoS Pathogens**, v. 17, p. e1009469, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009469>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1009469>. Acesso em: 22 mar. 2024.

KWILAS, S. et al. Respiratory syncytial virus grown in Vero cells contains a truncated attachment protein that alters its infectivity and dependence on glycosaminoglycans. **Journal of Virology**, v. 83, p. 10710–10718, Oct. 2009. DOI:

<https://doi.org/10.1128/JVI.00986-09>. Disponível em:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.00986-09>. Acesso em: 17 out. 2024.

LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 423–453, Apr.1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(99\)00010-1](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(99)00010-1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10418958/>. Acesso em: 06 ago. 2024.

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 2. ed. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, 1999.

LI, P. et al. Functional analysis of the N-linked glycans within the fusion protein of respiratory syncytial virus. **Methods in Molecular Biology**, v. 379, p. 69–83, 2007. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-393-6_5. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-393-6_5. Acesso em: 14 mai. 2024.

LIN, Y. et al. Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene. **Journal of Virology**, v. 77, p. 3371–3383, Mar. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.77.6.3371-3383.2003>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC149502/>. Acesso em: 08 jul. 2024.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3–26, Mar. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X00001290?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jul. 2024.

LIU, Y. et al. Cell entry of bovine respiratory syncytial virus through clathrin-mediated endocytosis is regulated by PI3K-Akt and Src-JNK pathways. **Front Microbiol.** v. 16, p.1393127, Apr. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1393127>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11059085>. Acesso em: 16 jan. 2025.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 3019–3032, Sep. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.23077>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022354915314234?via%3Dihub>. Acesso em: 11 ago. 2024.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1–11, Feb. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306009665?via%3Dihub>. Acesso em: 05 mar. 2024.

LOFTSSON, T. et al. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 2532–2546, Oct. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.20992>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022354916323656?via%3Di>hub. Acesso em: 23 nov. 2024.

LUTKA, A. Investigation of interaction of promethazine with cyclodextrins in aqueous solution. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 59, p. 45–51, Jan- Feb. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12026112/>. Acesso em: 26 mar. 2024.

MAEHARA, Y.; ANAI, H.; TAMADA, R.; SUGIMACHI, K. The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 23, p. 273–276, Mar. 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(87\)90070-8](https://doi.org/10.1016/0277-5379(87)90070-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0277537987900708?via%3Di>hub. Acesso em: 19 set. 2024.

MAQSOOD, M.I. et al. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. **Cell Biol Int.**, v. 37, p. 1038–1045, May. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbin.10137>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbin.10137>. Acesso em: 08 ago. 2024.

MAURIZ, E.; LECHUGA, L.M. Current Trends in SPR Biosensing of SARS-CoV-2 Entry Inhibitors. **Chemosensors**, v. 9, p. 330, Nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/chemosensors9120330>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9040/9/12/330>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MAYER, M.; MEYER, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 6108–6117, Jun. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja0100120>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja0100120>. Acesso em: 13 abr. 2024.

MCLELLAN, J.S. et al. Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 17, p. 248–250, Jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1723>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nsmb.1723>. Acesso em: 02 mai. 2024.

MCLELLAN, J.S.; RAY, W.C.; PEEPLES, M.E. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 372, p. 83–104, Dec. 2013. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_4. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-38919-1_4. Acesso em: 20 mai. 2024.

MEYER, B.; PETERS, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 42, n. 8, p.

864-890, Feb. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.200390233>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12596167>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MISKOLCZY, Z.; MEGYESI, M.; BICZÓK, L. Entropy-Driven Inclusion of Natural Protoberberine Alkaloids in Sulfobutylether- β -Cyclodextrin. **Molecules**, v. 27, p. 7514, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27217514>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/21/7514>. Acesso em: 20 Jan. 2025.

MOORE, A.E., et al. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. **Cancer Res.**, v. 15, p. 598–602, Oct.1955. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13261081>. Acesso em: 26 out. 2024.

MURA, P. et al. (a) Effects of the host cavity size and the preparation method on the physicochemical properties of ibuprofen-cyclodextrin systems. **Drug Dev Ind Pharm.**, v. 25, p. 279–287, Mar. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1081/ddc-100102172>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10071820>. Acesso em: 21 abr. 2024.

MURA, P. et al. (b). Influence of the preparation method on the physicochemical properties of ketoprofen-cyclodextrin binary systems. **Int J Pharm.**, v. 179, p. 117–128, Mar. 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(98\)00390-1](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(98)00390-1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10053208>. Acesso em: 08 mar. 2024.

NAGASE, Y. et al. Improvement of some pharmaceutical properties of DY-9760e by sulfobutyl ether beta-cyclodextrin. **Int J Pharm.**, v. 229, p. 163–172, Oct. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00851-1](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00851-1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11604269>. Acesso em: 11 ago. 2024.

NCBI. **PubChem**. Compound Summary for CID 323. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 10 dez. 2024.

OTHUMPANGAT, S. et al. NGF is essential survival factor for bronchial epithelial cells during respiratory syncytial virus infection. **PLoS ONE**, v. 4, p. 1–13, Jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006444>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19649262>. Acesso em: 07 set. 2024.

OUIZOUGUN-OUBARI, M., et al. A Druggable Pocket at the Nucleocapsid/Phosphoprotein Interaction Site of Human Respiratory Syncytial Virus. **Journal of Virology**, v. 89, p. 11129–11143, Nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01612-15>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26246564>. Acesso em: 22 mai. 2024.

PATEL, N. et al. Respiratory syncytial virus prefusogenic fusion (F) protein nanoparticle vaccine: Structure, antigenic profile, immunogenicity, and protection. **Vaccine**, v.37, p. 6112-6124, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.089>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31416644>. Acesso em: 16 jan. 2025.

PENG, S. et al. Progression of Antiviral Agents Targeting Viral Polymerases. **Molecules**, v. 27, p. 7370, Oct. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27217370>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/21/7370>. Acesso em: 18 mai. 2024.

PEREZ, M. et al. Membrane permeability changes induced in Escherichia coli by the SH protein of human respiratory syncytial virus. **Virology**, v. 235, p. 342–351, Sep. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8696>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9281514>. Acesso em: 10 dez. 2024.

PICARAZZI, F. et al. Targeting the RdRp of Emerging RNA Viruses: The Structure-Based Drug Design Challenge. **Molecules**, v. 25, p. 5695, Dec. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25235695>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/23/5695>. Acesso em: 17 mar. 2024.

POULSON, B.G. et al. Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications. **Polysaccharides**, v. 3, p. 1-31, Dec. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010001>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-4176/3/1/1>. Acesso em: 20 jan. 2025.

RAJAN, A. et al. Multiple Respiratory Syncytial Virus (RSV) Strains Infecting HEP-2 and A549 Cells Reveal Cell Line-Dependent Differences in Resistance to RSV Infection. **J Virol.**, v. 96, p. e0190421, Mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01904-21>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.01904-21>. Acesso em: 13 fev. 2024.

REZENDE, W. et al. The RSV F p27 peptide: current knowledge, important questions. **Front Microbiol.**, v. 21, p. 1219846, Jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1219846>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10320223>. Acesso em: 16 jan. 2025.

RICCETTO, A.G.L. et al. Genotypes and clinical data of respiratory syncytial virus and metapneumovirus in Brazilian infants: A new perspective. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 13, n. 1, p. 35–39, Feb. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702009000100008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjid/a/b8W9s7pCXSNRrBbJ9LBz86k/?lang=en>. Acesso em: 14 set. 2024.

RODRIGUEZ-FERNANDEZ, R.; MEJIAS, A.; RAMILO, O. Monoclonal Antibodies for Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 40, p. S35–S39, May. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003121>. Disponível em: https://journals.lww.com/pidj/fulltext/2021/05001/monoclonal_antibodies_for_prevention_of.8.aspx. Acesso em: 05 out. 2024.

RÜEGG, U.T.; BURGESS, G.M. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 10, p. 218–220, Jun. 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(89\)90263-0](https://doi.org/10.1016/0165-6147(89)90263-0). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614789902630?via%3Dihub>. Acesso em: 28 mar. 2024.

SÁ, J.M. et al. Hesperetin targets the hydrophobic pocket of the nucleoprotein/phosphoprotein binding site of human respiratory syncytial virus. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v. 40, p. 2156–2168, Oct. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1835717>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2020.1835717>. Acesso em: 26 dez. 2024.

SAKAY, S. et al. Effect of temperature on the structure and drug-release behaviour of inclusion complex of β -cyclodextrin with cyclophosphamide: a molecular dynamics study. **Soft Matter**, v.19, p. 2902-2907, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1039/d2sm01542k>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2023/sm/d2sm01542k>. Acesso em: 20 jan. 2025.

SALEHIAN, F. et al. Review: Biologically active 3,4-heterocycle-fused coumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 212, p. 113034, Feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113034>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523420310060?via%3Dihub>. Acesso em: 12 abr. 2024.

SAMUELSEN, L. et al. Correlation between the stability constant and pH for β -cyclodextrin complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 568, p. 118523, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118523>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517319305678>. Acesso em: 20 jan. 2025.

SATAKE, M. et al. Respiratory syncytial virus envelope glycoprotein (G) has a novel structure. **Nucleic Acids Res.**, v. 13, p. 7795–7812, Nov.1985. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/13.21.7795>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/13/21/7795/2381561>. Acesso em: 18 jul. 2024.

SCHMID, G. In: **Comprehensive Supramolecular Chemistry**, Atwood, J.; Davies, E.D.; MacNicol, D.D.; Vögtle, F., eds.; Pergamon: Oxford, 1996, p. 41–56.

SCUDERO, O.B. et al. The respiratory syncytial virus M2-2 protein is targeted for proteasome degradation and inhibits translation and stress granules assembly. **PLOS ONE**, v. 18, p. e0289100, Jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289100>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0289100>. Acesso em: 23 ago.2024.

SHAPIRO, E.T., et al. Quantitative investigation of the affinity of human respiratory syncytial virus phosphoprotein C-terminus binding to nucleocapsid protein. **Virology Journal**, v. 11, p. 191, Nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0191->

2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25407889>. Acesso em: 11 abr. 2024.

SHI, T. et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. **The Lancet**, v. 390, p. 946–958, Sep. 2017. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)30938-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)30938-8/fulltext). Acesso em: 22 nov. 2024.

SIBERT, B.S. et al. Assembly of respiratory syncytial virus matrix protein lattice and its coordination with fusion glycoprotein trimers. *Nature Communications*, v. 15, p. 5923- Oct. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50162-x>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-50162-x>. Acesso em: 16 jan. 2025.

SINGH, R. et al. Umbelliferone – An antioxidant isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. **Food Chemistry**, v. 120, p. 825–830, Jun. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.02>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609013144>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SIMÕES, E.A.F. et al. Efficacy of nirsevimab against respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections in preterm and term infants, and pharmacokinetic extrapolation to infants with congenital heart disease and chronic lung disease: a pooled analysis of randomised controlled trials. **Lancet Child Adolesc Health**, v. 7, p. 180–189, Mar. 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(22\)00321-2](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(22)00321-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352464222003212?via%3Dihub>. Acesso em: 20 dez. 2024.

SITTHICHAROENCHAI, P., Alnajjar, S.; Ackermann, M.R. A model of respiratory syncytial virus (RSV) infection of infants in newborn lambs. **Cell Tissue Res**, v. 380, p. 313–324, Apr. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03213-w>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-020-03213>. Acesso em: 25 jan. 2025.

SPANN, K. M. et al. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages., **J. Virol.**, v. 78, p. 4363-4369, Apr. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.8.4363-4369.2004>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15047850>. Acesso em: 30 mai. 2024.

SREERAMA, N., & WOODY, R. W. A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Analytical Biochemistry*, v. 209, p. 32–44, Feb. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1079>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269783710791?via%3Dihub>. Acesso em: 16 abr. 2024.

TANNOUS M, CALDERA F, HOTI G, DIANZANI U, CAVALLI R, TROTTA F. Drug-Encapsulated Cyclodextrin Nanosponges. **Methods Mol Biol.**, v. 2207, p. 247-283, Oct. 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0920-0_19. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-0920-0_19. Acesso em: 19 out. 2024.

TAWAR R.G. et al. Crystal Structure of a Nucleocapsid-Like Nucleoprotein-RNA Complex of Respiratory Syncytial Virus. **Science**, v. 326, p. 1279-1285, Nov. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1177634>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19965480>. Acesso em: 25 abr. 2024.

TAYLOR G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. **Vaccine**, v. 35, p. 469-480, Jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.054>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X16311161?via%3Dihub>. Acesso em 17 nov. 2024.

THORNHILL, E.M.; VERHOEVEN, D. Respiratory Syncytial Virus's Non-structural Proteins: Masters of Interference. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 10, p. 225, May. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00225>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7248305>. Acesso em: 25 jan. 2025.

TSVILEVA, O.M., KOFTIN, O.V., EVSEEVA, N.V. Coumarins as Fungal Metabolites with Potential Medicinal Properties. **Antibiotics (Basel)**, v. 26; p.1156, Aug. 2022 DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091156>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9495007>. Acesso em: 16 jan.2025.

TOMA, A.C., STEGMÜLLER, S., RICHLING, E. Coumarin contents of tonka (*Dipteryx odorata*) products. **Eur Food Res Technol.**, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-024-04648-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-024-04648-z>. Acesso em: 16 jan. 2025.

TOOLAN H.W. Transplantable human neoplasms maintained in cortisone-treated laboratory animals: H.S. No. 1; H.Ep. No. 1; H.Ep. No. 2; H.Ep. No. 3; and H.Emb.Rh. No. 1. **Cancer Res.**, v. 14, p. 660-666, Oct. 1954. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13209540>. Acesso em: 12 mai. 2024.

TOPUZ F, UYAR T. Recent Advances in Cyclodextrin-Based Nanoscale Drug Delivery Systems. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v.16, p. e1995, Nov- Dec. 2024. DOI: <https://doi.org/doi:10.1002/wnan.1995>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39480078>. Acesso em: 20 jan. 2025.

TRAN, T.L. et al. (a). The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 196–206, 2007. DOI:

<https://doi.org/10.1099/vir.0.82282-0>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17170452>. Acesso em: 09 dez. 2024.

TRAN, T.L. et al. (b) The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. **J. Virol.**, v. 83, p. 6363-6374, Jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00335-09>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19386701>. Acesso em: 18 set. 2024.

TREVISAN M, DI ANTONIO V, RADEGHIERI A, PALÙ G, GHILDYAL R, ALVISI G. Molecular Requirements for Self-Interaction of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein in Living Mammalian Cells. **Viruses**, v. 3, p. 109, Mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10030109>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/3/109>. Acesso em: 25 nov. 2024.

TRIANTAFILOU K. et al. Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. **Thorax**, v. 68, p. 66-75, Dec. 2013. Disponível em: <https://thorax.bmj.com/content/68/1/66.info>. Acesso em: 16 jan. 2025.

TROS DE ILARDUYA M.C. et al. Solubilization and interaction of sulindac with beta-cyclodextrin in the solid state and in aqueous solution. **Drug Dev Ind Pharm.**, v. 24, p. 301-306, Mar.1998. DOI: <https://doi.org/10.3109/03639049809085624>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9876589>. Acesso em: 12 mai. 2024.

TUCCI, V. et al. Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. **Cell**, v. 176, p. 952–965, Feb. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.043>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867419301060?via%3Dihub>. Acesso em: 07 mar. 2024.

TURK V, STOKA V, VASILJEVA O, RENKO M, SUN T, TURK B, TURK D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1824, p. 68-88, Jan 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963911002706?via%3Dihub>. Acesso em: 10 out. 2024.

VAN ROYEN, T. et al. How RSV Proteins Join Forces to Overcome the Host Innate Immune Response. **Viruses**, v. 17, p. 419, Feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14020419>. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8874859>. Acesso em: 16 jan. 2025.

VILLENAVE R. et al. In vitro modeling of respiratory syncytial virus infection of pediatric bronchial epithelium, the primary target of infection in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.109, p. 5040-5, Mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1110203109>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1110203109>. Acesso em: 23 fev. 2024.

VISTICA V.T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res.**, v. 51, p.2515-20, May. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2021931>. Acesso em 17 mai. 2024.

VRANKEN, W.F. et al. The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. **Proteins: Struct., Funct., Bioinf.**, v. 59, p. 687-696, Jun. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/prot.20449>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15815974>. Acesso em: 06 set. 2024.

WERTZ G.W. et al. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 82, p. 4075–4079, Jun. 1985. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4075>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.82.12.4075>. Acesso em: 09 mai. 2024.

WIDJOJOATMODJO M.N. et al. A highly attenuated recombinant human respiratory syncytial virus lacking the G protein induces long-lasting protection in cotton rats. **Virol J.**, 114. Jun. 2010. Disponível em: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-7-114>. Acesso em: 17 out. 2024.

WU H. et al. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. **J Mol Biol.**, v. 368, p. 652–665, May. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283607002057?via%3Dihub>. Acesso em: 21 nov. 2024.

WÜPPER S, LÜERSEN K, RIMBACH G. Cyclodextrins, Natural Compounds, and Plant Bioactives-A Nutritional Perspective. **Biomolecules**, v.11, p. 401, Marc.2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11030401>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7998733>. Acesso em: 16 jan. 2025.

YEH, J.Y. et al. Anti-influenza drug discovery: Structure-activity relationship and mechanistic insight into novel angelicin derivatives. **J. Med. Chem.**, v. 53, p. 1519–1533, Feb. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm901570x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20092255>. Acesso em: 05 mai. 2024.

ZARZYCKI P.K., LAMPARCZYK H. The equilibrium constant of β -cyclodextrin-phenolphthalein complex; influence of temperature and tetrahydrofuran addition. **J Pharm Biomed Anal.**, v.18, p.165-179,1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00150-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00150-2) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708598001502>. Acesso em: 30 jul. 2024.

ZHANG L. et al. Infection of Ciliated Cells by Human Parainfluenza Virus Type 3 in an In Vitro Model of Human Airway Epithelium. **J Virol.**, v.79, p. 1113–24, Jan. 2005.

DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1113-1124.2005>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.79.2.1113-1124.2005>. Acesso em: 12 jul. 2024.

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. **J Virol.**, v. 76, p. 5654-66, Jun. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5654-5666.2002>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.76.11.5654-5666.2002>. Acesso em: 17 nov. 2024.

ZHU, G. et al. Epidemiological characteristics of four common respiratory viral infections in children. **Virol. J.**, v. 18, p.10, 2021. doi: 10.1186/s12985-020-01475-y.

ZOHAR, T. et al. Upper and lower respiratory tract correlates of protection against respiratory syncytial virus following vaccination of nonhuman primates. **Cell Host & Microbe**, v. 30, p. 41 – 52, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.11.006>. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1931-3128%2821%2900512-6>. Acesso em: 25 jan. 2025.

ZUIDERWEG, E.R. Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy, **Biochemistry**, v. 41, p. 1-7, Jan. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi011870b>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11771996>. Acesso em: 10 dez. 2024.