



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

Amanda de Gênova Ribeiro

Atividade anti-hRSV da Quercetina Penta-acetilada através da
inibição da adesão viral à célula

São José do Rio Preto
2018

Amanda de Gênova Ribeiro

Atividade anti-hRSV da Quercetina Penta-acetilada através da
inibição da adesão viral à célula

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

Financiadora: CAPES e
FAPESP(14/12298-7)

Orientador: Dr^a. Karina Alves de
Todelo

São José do Rio Preto
2018

Ribeiro, Amanda de Gênova.

Atividade anti-hRSV da Quercetina Penta-acetilada através da
inibição da adesão viral à célula / Amanda de Gênova Ribeiro. --
São José do Rio Preto, 2018

64 f. : il., tabs.

Orientador: Karina Alves de Todelo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas

1. Virologia. 2. Vírus Sincicial Respiratório Humano. 3. Agentes
antivirais. 4. Flavonoides. 5. Quercetina. I. Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.858

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

Amanda de Gênova Ribeiro

Atividade anti-hRSV da Quercetina Penta-acetilada através da
inibição da adesão viral à célula

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

Financiadora: CAPES e
FAPESP(14/12298-7)

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Karina Alves de Toledo
UNESP – Câmpus de Assis
Orientadora

Prof^a. Dr^a Catarina dos Santos
UNESP – Câmpus de Assis

Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe
Universidade Federal de Juiz de Fora

São José do Rio Preto
06 de fevereiro de 2018

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	2
1.Introdução	3
1.1.Vírus Sincicial Respiratório	3
1.1.1.Epidemiologia e Patogênese	3
1.1.2.Estrutura e Genoma.....	5
1.1.3.Ciclo Replicativo do hRSV	8
1.1.4.Profilaxia e Tratamento	9
1.2.Flavonoides	11
1.2.1.Quercetina e derivado acetilado	12
2.Objetivos.....	13
2.1.Objetivo Geral	13
2.2.Objetivos Específicos.....	13
3.Materiais e Métodos.....	14
3.1.Reagentes.....	14
3.2.Cultura Celular	14
3.3.Estoque Viral	14
3.4.Análise por meio da adição do Sal de MTT	15
3.5.Determinação da CC ₅₀ da Quercetina Penta-acetilada em células Hep-2.....	15
3.6.Avaliação da ação anti-hRSV da Quercetina Penta-acetilada..	16
3.6.1.Ensaio Virucida	16
3.6.2.Ensaio de Pós-tratamento.....	16
3.7.Avaliação dos possíveis mecanismos envolvidos na ação anti-hRSV	17
3.8.Índice de Proteção Celular	18
3.9.Determinação do índice de Seletividade.....	18
3.10.Ensaio de placa	19
3.11.Contagem do número de placas.....	19
3.12.Análise Estatística	20
4.Resultados e Discussões.....	20
5.Conclusões.....	34
6.Referências Bibliográficas	35

RESUMO

No mundo, estima-se que exista cerca de 12 milhões de casos graves e 3 milhões de casos muito graves de infecção do trato respiratório inferior em crianças. Dentre os agentes etiológicos destas infecções, o Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) contribui para vários casos de bronquiolite, pneumonia e infecções pulmonares obstrutivas crônicas em pessoas de todas as idades, principalmente em crianças e idosos. Atualmente não existe vacinas ou medicamentos eficazes com atividade anti-hRSV. A semi-síntese a partir de moléculas naturais tem sido uma estratégia promissora na melhora da atividade biológica de compostos naturais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral *in vitro* da Quercetina Penta-acetilada (QPA) em células permissivas à infecção/replicação por hRSV (HEp-2). Os ensaios antivirais foram realizados com diferentes MOIs (0.1, 0.5 e 1.0) e analisados por adição do sal de MTT e posteriormente confirmados por ensaio de placa de lise. O composto QPA apresentou atividade anti-hRSV nos protocolos virucida e de pós-tratamento. O efeito virucida de QPA foi confirmado pelos ensaios de adsorção e tempo de adição. QPA inibiu a adsorção e os ensaios de tempo de adição confirmaram que a ação de QPA se dá principalmente nas primeiras fases do ciclo viral. Por meio do ensaio de placa de lise foi possível demonstrar e confirmar que a redução do número de focos virais nos protocolos virucida e pós-tratamento foi de 50%. Nossos dados indicam que o composto QPA apresenta um promissor papel anti-hRSV, por interagir com a partícula viral e inibir sua adesão à célula.

Palavras-chave: hRSV, antiviral, flavonoides, quercetina penta-acetilada

ABSTRACT

Lower respiratory tract infections are the main cause of infections in children, reaching approximately 12 million severe cases and 3 million very serious cases around the world. The human pneumovirus Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the major pathogen found in these cases and contributes to several cases of bronchiolitis, pneumonia and chronic obstructive pulmonary infections in people of all ages, especially in infants and the elderly. There are currently no vaccines and the therapeutic strategies in use present little efficacy or restricted use. Flavonoids are the focus of several studies that seek for effective and cost-effective antiviral drugs. Quercetin, a flavonoid commonly found in the human diet, has an inhibitory activity against several types of virus, including RSV. Chemical modification of molecules has been proven as a promising strategy to improve the biological activity of natural compounds. The aim of this work was to evaluate the antiviral activity of Quercetin Pentaacetate (QPA) against RSV in culture of HEP-2 cells in different protocols. The antiviral assays were performed with different MOIs (0.1, 0.5 and 1.0), evaluated by of MTT protocol and confirmed by plaque assay. QPA showed virucidal activity against RSV Such effect was confirmed by adsorption and addition time assays. QPA presented inhibitory activity in the adsorption and addition time assays, what confirmed that its activity occurs mainly in the early phases of the viral cycle. The plaque assay confirmed that the reduction in the number of viral foci in virucidal protocols was 50%. Our data indicate that QPA possess a promising anti-RSV activity, which is suggested to be related with the interference of RSV-F fusion activity.

Key words: RSV, antiviral, flavonoids, quercetin pentaacetate

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV)

Infecções agudas nas vias aéreas inferiores é a maior causa de hospitalizações de recém-nascidos, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Essas infecções são responsáveis por um alto índice de morbidade e mortalidade no mundo todo (CALVO et al., 2008). Dentre os agentes etiológicos causadores dessas infecções, os vírus são responsáveis pelas manifestações clínicas tais como, bronquiolite, bronquite, pneumonia e doença pulmonar obstrutiva crônica. Desde sua descoberta há 60 anos, o Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) foi isolado e descrito como o principal patógeno conhecido por causar infecções agudas no trato respiratório inferior, sendo mundialmente distribuído (Weissebach, 1998; Jennings, et al 2004; Iwane, 2004, Guthrie, 2005). Foi descrito primeiramente em 1956, e foi associado a um vírus denominado agente da coriza do Chimpanzé [Chimpanze coryza agente – CCA] por possuir características peculiares, tais como células gigantes multinucleadas com grande sincício e, por isso, foi denominado vírus sincicial respiratório (BLOUNT; MORRIS; SAVAGE, 1956).

1.1.1. Epidemiologia e Patogênese

Infecções por hRSV afetam aproximadamente 70% dos recém-nascidos até o primeiro ano de vida e 95% das crianças até os 2 anos de idade (EDNA et al., 2003). Muitos fatores de risco estão associados com a infecção por hRSV incluindo prematuridade, recém nascidos com baixo peso corpóreo, crianças com Síndrome de Down, doenças congênitas cardíacas (BOYCE et al., 2000; WANG; LAW; STEPHENS, 1995), indivíduos imunocomprometidos (NAVAS et al., 1992), além de pacientes com doenças pulmonares crônicas (AUJARD; FAUROY, 2002) e pacientes com infecções por HIV (MOYES et al., 2013). O hRSV também

acomete indivíduos saudáveis, mas na maioria dos casos, em adultos imunocompetentes a infecção é resolvida em aproximadamente uma semana (FALSEY et al., 2005).

A infecção por hRSV é considerada problemática de saúde pública a nível global, devido ao aumento nos índices de hospitalizações e seus altos custos de tratamento. Sabe-se que a incidência de infecções virais em países de clima tropical aumenta no período entre maio e julho, o qual compreende o outono e o inverno (VIEIRA et al., 2001). O contágio do vírus nos indivíduos acontece por meio da inalação de partículas virais infecciosas ou do contato direto com secreções nasofaríngeas expelidas por pessoas infectadas (HALL et al., 1981). Dentre indivíduos infectados, os que apresentam fatores de risco tendem a desenvolver a doença. O vírus pode permanecer viável em superfícies sólidas por até 6 horas, em luvas de borracha por aproximadamente 1 hora e na pele por 20 minutos (WRIGHT; PIEDIMONTE, 2011).

Uma das mais relevantes características das infecções por hRSV é a sua alta capacidade de reinfecção durante surtos epidêmicos. Dados epidemiológicos mostram que 36% dos indivíduos podem ser infectados ao menos duas vezes durante os períodos de maior incidência do vírus (outono e inverno), porém esses episódios de reinfecções não geram imunidade permanente (BUENO et al., 2008; DUDAS; KARRON, 1998). Até os 2 anos de idade, quase todas as crianças são infectadas e aproximadamente 50% delas serão infectadas duas vezes pelo hRSV (DUDAS; KARRON, 1998; KIM; CHANG, 2016).

O hRSV inicia sua replicação no epitélio nasofaríngeo, aderindo às células epiteliais do trato respiratório superior e pela aspiração de secreções nasofaríngeas, o vírus infecta o trato respiratório inferior (DOMACHOWSKE; ROSENBERG, 1999), onde induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-11 e TNF- α), as quais promovem o recrutamento de leucócitos para o local infectado. A infecção dura aproximadamente 10 dias, e é caracterizada pela infiltração perivascular

de células mononucleares, principalmente neutrófilos e linfócitos. Portanto, a resposta imune do hospedeiro envolve primeiramente células da imunidade inata (neutrófilos, monócitos e células NK), seguida de células da imunidade adaptativa (linfócitos B e T) (WELLIVER, 2008). Na maioria das vezes, a intensa replicação viral leva a formação de sincícios (massas multinucleadas formadas pela fusão de células) podendo culminar na disfunção e necrose tecidual caso a infecção não seja controlada em crianças (DUDAS; KARRON, 1998; KURT-JONES et al., 2000; RAJAN et al., 2013).

Os primeiros sintomas do hRSV aparentes em crianças são rinorréia, tosse, febre baixa e dificuldade de respirar. Em adultos e pacientes imunocomprometidos são relatados fadiga, tosse, cefaleia, febre e mal-estar (BORCHERS et al., 2013). O hRSV pode ocasionar infecções tanto no trato respiratório superior quanto no inferior (WU et al., 2007). As infecções no trato respiratório inferior geralmente são mais graves, pois podem causar pneumonia e/ou bronquiolite grave, bloqueando as vias respiratórias pela produção excessiva de muco, edema e debris celulares (HORNSLETH; LOLAND; LARSEN, 2001).

1.1.2. Estrutura e Genoma

hRSV é um vírus envelopado de RNA fita simples e linear que possui polaridade negativa, não segmentado e com nucleocapsídeo helicoidal. Pertence à família *Pneumoviridae*, gênero *Orthopneumovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV/2016). É representado por dois subtipos, nomeados por A e B. A principal diferença entre os subtipos ocorre na proteína G, que compartilha somente um de seis epítomos. Foram observadas também diferenças em um dos epítomos da proteína F e em dois epítomos da proteína M (MUFSON et al., 1985). O genoma viral é constituído de um RNA de aproximadamente 15.2 kb, que

codifica 10 genes em 11 proteínas, na qual a presença de duas sequências de leitura aberta no gene M2- produz as proteínas M2-1 e M2-2. Os genes são codificados na seguinte ordem 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'(Figura 1) (BOHMWALD et al., 2016).

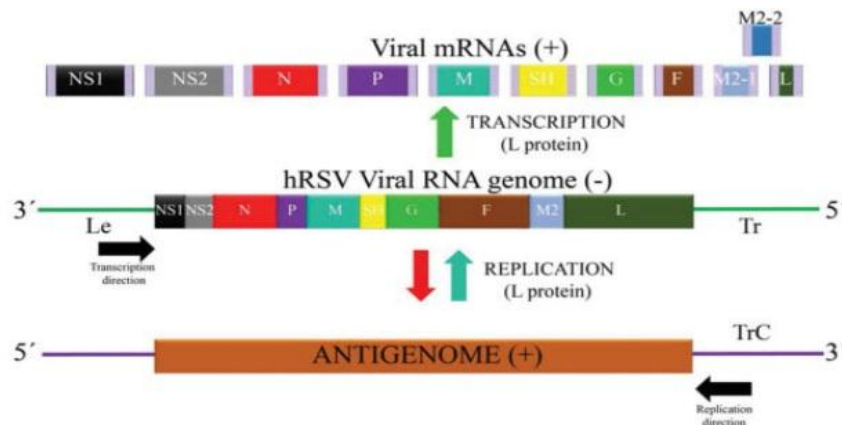


Figura 1. Representação esquemática do genoma viral. A transcrição é mediada pela proteína L que gera um mRNA para cada proteína e a largura de cada “box” representa a quantidade de transcrição de cada gene. A Replicação é mediada também pela proteína L e é necessária para a geração do antigenoma que irá gerar novos RNA hRSV. O segmento TrC é onde se localiza o sítio promotor da replicação (Bohmwald et al., 2016).

De todas as proteínas virais, duas são proteínas não estruturais (NS1 e NS2) responsáveis pela evasão da resposta imune. Das nove proteínas estruturais, cinco (N, P, L, M2-1 e M2-2) formam o complexo nucleocapsídeo envolvido na replicação e transcrição viral e, quatro (SH, M, G e F) estão associadas à membrana. As proteínas G e F são glicoproteínas envolvidas na adesão e fusão do vírus com a célula hospedeira (COLLINS; GRAHAM, 2008).

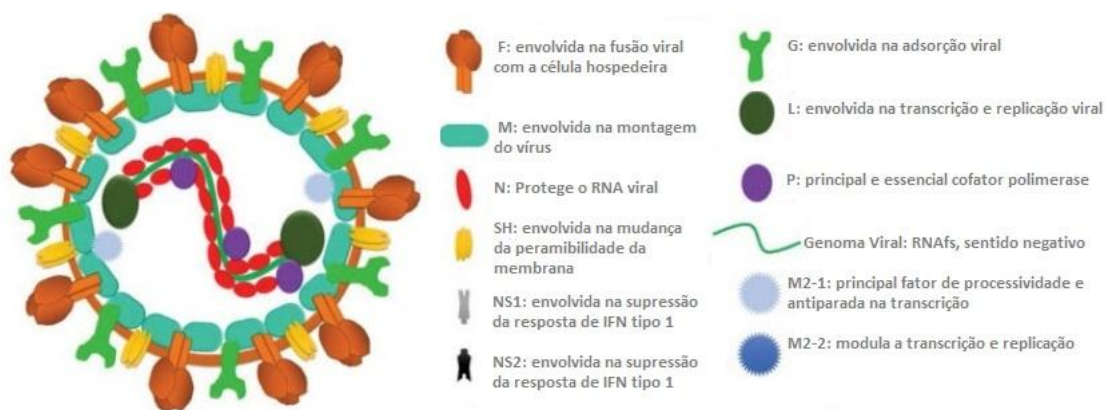


Figura 2. Representação esquemática da partícula viral de hRSV. Ao lado estão representadas todas as proteínas e suas principais funções (adaptado de Bohmwald et al., 2016).

No processo de adesão e internalização do vírus, duas proteínas em particular são importantes: a proteína de ancoramento (G) e a proteína de fusão (F). A primeira medeia a adesão do vírus com a célula hospedeira. Já a segunda, promove a adesão e internalização do vírus na célula do hospedeiro, além de promover a formação de agregados de células multinucleadas (sincícios) permitindo a transmissão de vírus célula a célula.

A glicoproteína G é responsável pela adsorção/adesão do vírus com a célula hospedeira. Essa proteína, altamente glicosilada (KRUSAT; STRECKERT, 1997), pode interagir com heparina sulfatada e com os receptores CX3CR1 e TLR4, modulando a resposta imune e dando então início à etapa de internalização (MCLELLAN et al., 2013). Além disso, a glicoproteína G existe também como uma forma secretada, que age interagindo com anticorpos gerados pelo hospedeiro contra essa proteína. Essa forma solúvel evita a opsonização e neutralização do vírus por anticorpos G específicos (Brukeyev, 2008).

A proteína F é altamente conservada entre os subtipos A e B (MCLELLAN et al., 2013). Apresenta-se em sua forma inativa, denominada F_0 e é localizada na superfície do vírus. É convertida em proteína ativa após ser clivada por uma protease. Essa clivagem proteolítica gera as subunidades polipeptídicas, F_1 e F_2 , que são ligadas por uma ponte dissulfeto. A proteína F existe na superfície viral em um

estado de pré-fusão e pós-fusão (LILJEROOS et al., 2013). As proteínas do estado de pré-fusão se ligam às moléculas receptoras expressas na superfície celular (TLR4, ICAM-1 e nucleolinas), e passam por mudanças conformacionais para um estado de pós-fusão (BAREL et al., 2008; BEHERA et al., 2001; MARR; TURVEY, 2012; TAYYARI et al., 2011). Particularmente, as nucleolinas têm sido descritas como o principal receptor que interage com a proteína F, pois estudos demonstraram que células não permissivas, passaram a ser suscetíveis a infecção por hRSV após serem induzidas a expressar nucleolinas na sua superfície (TAYYARI et al., 2011).

A proteína estrutural SH (small hydrophobic) é a menor proteína viral localizada na superfície do vírion. Essa proteína é descrita como uma viroporina, pertencente à família das proteínas altamente hidrofóbicas que são capazes de formar canais de íon na membrana celular. Além disso, é descrita como não essencial para a replicação e disseminação viral, embora na sua ausência a replicação diminua (GAN et al., 2008).

Abaixo do envelope viral se localizam as proteínas N, P, L, M, M2-1 e M2-2. A nucleoproteína N está em contato com o genoma viral e sua função é proteger o RNA viral (juntamente com as proteínas P e L) da produção de interferons pela célula hospedeira. Juntas, essas três proteínas constituem a ribonucleoproteína (RNP), que regula a transcrição e replicação do RNA viral (TAWAR et al., 2009). Stokes et al., 2003 demonstrou que a região C-terminal da proteína N, é essencial para a replicação, e também é sítio de ligação para a proteína P.

A fosfoproteína P foi descrita como uma chaperona, auxiliando as proteínas do complexo RNP a atingirem a conformação terciária correta, além de aumentar a especificidade do encapsulamento do RNA viral, impedindo que a proteína N se ligue aos RNAs celulares (SPEHNER; DRILLIEN; HOWLEY, 1997). A fosforilação da proteína P tem uma importante função na patogênese mediada pelo vírus, pois é necessária para uma eficiente replicação viral (LU et al., 2002). A fosforilação da

Ser232 e Ser237 é essencial para ativar a transcrição viral (BARIK; MCLEAN; DUPUY, 1995); a fosforilação na Ser54 é crucial para o desnudamento da partícula viral no início da infecção para iniciar a transcrição e, sua desfosforilação promove associação com a proteína M que é um processo crucial para o processo de brotamento da partícula viral (ASENJO; RODRÍGUEZ; VILLANUEVA, 2005).

A maior proteína viral é a L, possuindo seis regiões conservadas entre as famílias dos vírus de RNA com polaridade negativa, o que a torna um alvo promissor para as pesquisas de compostos com atividade antiviral (TIONG-YIP et al., 2014). A proteína L atua como uma RNapolimerase-RNA-dependente, sua principal função é na replicação e transcrição do genoma viral, regulada pelo complexo RNP (COLLINS et al., 1996). Pelo hRSV ser de polaridade negativa, a proteína L transcreve o genoma diretamente para mRNA para a expressão de cada gene do vírus (COWTON; MCGIVERN; FEARNES, 2006). Durante a replicação, a proteína L copia o genoma completo do vírus de polaridade negativa para polaridade positiva, que é então chamado de antígenoma (Figura 1). Esse RNA é então usado como molde para gerar novas fitas de RNA negativo, o qual será finalmente encapsulado (COWTON; MCGIVERN; FEARNES, 2006; FEARNES; COLLINS; PEEPLES, 2000).

A proteína de matriz M é essencial para a replicação do hRSV e se localiza no núcleo celular nos estágios iniciais do ciclo viral. É deslocada para o citoplasma nos estágios finais do ciclo viral, nos quais se associa com as proteínas N, P e M2-1 (GHILDYAL et al., 2005, 2009; TENG; COLLINS, 1998). A proteína M é diretamente relacionada com a maturação dos filamentos virais. Foi descrito que linhagens de hRSV que não expressam a proteína M, mostram significativas perdas de infectividade (MITRA et al., 2012).

A fosfoproteína M2-1 atua na transcrição do vírus como um fator de processividade e antiparada (COLLINS et al., 1996). Para exercer sua

função antiparada, a M2-1 necessita estar em sua forma tetramérica, pois sem essa oligomerização a proteína não pode exercer sua função corretamente. Outra importante função é que ela auxilia na interação da proteína M com o nucleocapsídeo para a liberação da partícula viral (LI et al., 2008).

A proteína M2-2 está envolvida na regulação da transcrição e da replicação pela enzima polimerase. A expressão elevada de M2-2 inibe completamente a replicação de hRSV, reforçando assim sua função na regulação da transcrição e da replicação do RNA viral (BERMINGHAM; COLLINS, 1999).

Além das proteínas estruturais mencionadas anteriormente, o genoma do hRSV também codifica duas proteínas não estruturais, nomeadas NS1 e NS2. Ambas são pouco conservadas e antagonizam a resposta antiviral celular e a indução de produção de interferon (IFN), que é secretado pelas células hospedeiras como uma das primeiras linhas de defesa contra infecção viral (BOSSERT; CONZELMANN, 2002; BOSSERT; MAROZIN; CONZELMANN, 2003; SCHLENDER et al., 2000; SPANN et al., 2004).

1.1.3. Ciclo Replicativo do hRSV

A infecção das células do epitélio respiratório começa com a adsorção dos vírions com a superfície das células alvo mediado pela proteína G (LAMBERT et al., 2014). Após essa interação, que ajuda o vírus a aderir na membrana da célula que será infectada, a proteína F interage com seu receptor, a nucleolina (TAYYARI et al., 2011). A entrada do hRSV ocorre particularmente em microdomínios ricos em colesterol na superfície da célula hospedeira. A fusão do hRSV com a membrana da célula hospedeira depende de interações das proteínas G e F com seus receptores e do rearranjo dos filamentos de actina perto dos micro domínios de colesterol (LAY et al., 2013).

Após a fusão do vírus com a membrana celular ocorre o lançamento do nucleocapsídeo viral para dentro do citoplasma da célula hospedeira. Aqui, o nucleocapsídeo é dissociado pelo complexo RNP e da proteína M, que é mediada pela fosforilação da proteína P (ASENJO; RODRÍGUEZ; VILLANUEVA, 2005). O processo de transcrição é mediado pela proteína L e ocorre em corpos de inclusão junto com as proteínas N e P. A proteína L associada com a proteína P é capaz de reconhecer a região promotora no sentido 3' e iniciar a transcrição dos genes virais. Depois de transcrito, o genoma será replicado gerando um antígenoma, uma enzima chamada polimerase irá reconhecer a região promotora TcR do antígenoma e gerar o RNA viral. As novas fitas de RNA são imediatamente encapsuladas com o auxílio da proteína N (COWTON; MCGIVERN; FEARN, 2006).

A maturação e montagem do vírus, após a sua transcrição e replicação, depende da localização da proteína M e ocorre em domínios ricos em colesterol (RODRIGUEZ; RAMILO, 2014). A proteína M é exportada do núcleo para o citoplasma e o processo de maturação e montagem começa e envolve interações com as proteínas de superfície G, F e SH. O complexo RNP interage com a proteína M para finalizar o processo de montagem e em seguida ocorre liberação dos vírions (JUMAT et al., 2015).

1.1.4. Profilaxia e Tratamento

Significativos avanços no conhecimento sobre a biologia, imunologia, fisiopatologia e epidemiologia do hRSV foram obtidos nos últimos anos, porém, continuadas pesquisas com o objetivo de desenvolver agentes antivirais seguros, eficazes e de baixo custo contra o hRSV não têm tido sucesso. A dificuldade inclui o fato de que a infecção natural pelo vírus não gera imunidade permanente no hospedeiro (HALL et al., 1991). Muitas vacinas não conferem imunidade nos primeiros seis meses de vida,

e é neste período que muitas crianças desenvolvem bronquiolites (STENSBALLE et al., 2009). A mortalidade associada com bronquiolites, combinada com a alta frequência e distribuição mundial, fazem do hRSV alvo para o desenvolvimento de vacinas que possam ser administradas nos primeiros meses de vida (DOMACHOWSKE; ROSENBERG, 1999). Além das dificuldades encontradas no seu desenvolvimento, a razão pela qual ainda não existe vacina disponível é, principalmente, devido a possibilidade da vacinação potencializar a doença, como foi observado no caso da vacina inativada por formalina (KAPIKIAN et al., 1969; KIM et al., 1969).

Como tratamento profilático, atualmente disponível e recomendado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), está a administração do anticorpo Palivizumab (Synagis[®]) que se liga à proteína F do hRSV (YU et al., 2006). O Palivizumab é um anticorpo monoclonal neutralizante específico da proteína F, que vem sendo usado amplamente para proteger de forma passiva crianças pertencentes ao grupo de risco, evitando o aparecimento de doenças mais graves (GESKEY; THOMAS; BRUMMEL, 2007; MEJÍAS; RAMILO, 2008; WANG; BAYLISS; MEADS, 2011). O principal problema é o alto custo envolvido no tratamento.

Outro fármaco licenciado (1985) para uso em crianças hospitalizadas é a Ribavirina (Virazole[®]) com ampla ação antiviral. Por se tratar de um nucleosídeo análogo, ele inibe a síntese de ácido nucleico viral, interferindo na replicação do vírus. É um agente antiviral com efeitos potencialmente mutagênicos e teratogênicos (VENTRE; RANDOLPH, 2004). Devido aos tratamentos atuais serem oferecidos somente a pacientes com fatores de risco, atualmente inúmeras pesquisas em andamento tentam desenvolver um tratamento eficaz, que seja de uso geral para pacientes com infecção por hRSV. Os alvos mais estudados são as glicoproteínas G e F, pois são importantes para o ciclo replicativo do vírus. Alguns compostos que apresentaram tais efeitos são SP-303 (BARNARD et al., 1993), VP-14637 (DOUGLAS et al., 2003), RSV604

(CHAPMAN et al., 2007), GS5806 (DEVINCENZO et al., 2014), JNJ-2408068, JNJ-49153390, TMC-353121, BTA-9881 and BMS-433771 (BATTLES et al., 2016). Porém esses compostos ainda não são usados para tratamento, pois mais estudos são necessários para entender os seus respectivos mecanismo de ação.

1.2 Flavonoides

Produtos de origem natural têm sido alvo para pesquisadores cujo objetivo é a busca de agentes antivirais contra infecções respiratórias. Os vegetais são fonte de uma ampla gama de compostos, geralmente oriundos do metabolismo secundário, como os alcaloides, flavonoides e outros, com grande potencial medicinal (FORMICA; REGELSON, 1995; DOUGLAS KINGHORN, 2001).

Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal e são amplamente distribuídos no reino vegetal. Quimicamente os flavonoides são constituídos por um esqueleto de 15 carbonos consistindo de dois anéis benzênicos (A e B) ligados por um anel pirano (C) (Figura 3). Eles são divididos em uma variedade de classes (flavonas, flavonols, flavononas, entre outros), que diferem no nível de oxidação e no padrão de distribuição do anel pirano (C) (MIDDLETON, 1998).

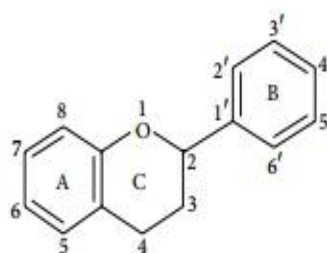


Figura 3. Estrutura básica de um flavonoide. (Kumar and Pandey, 2013)

Em humanos, os flavonoides têm sido alvo de muitas pesquisas médicas, pois é reportado que eles possuem muitas propriedades biológicas, incluindo ação antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral,

antialérgica, antineoplásica, anti-hipertensiva, antihepatóxico, além de possuir atividade antiviral (Haysteen, 1983; Middleton and Chithan, 1986; Harbone and Baxter, 1999; Harbone and Williams, 2000). A Quercetina (Figura 4A) pertence à classe dos flavonols, um dos flavonoides mais abundantes e conhecidos que podem ser encontrados em uma variedade de alimentos comuns como: maçãs, uvas, tomates, cebolas e chás (Terahara, 2015).

Atualmente, algumas pesquisas apontam uma aparente atividade inibitória de alguns flavonoides contra tipos específicos de vírus. Selway et al. (1986), demonstraram que os compostos Quercetina, Morina e Rutina possuem atividade contra mais de sete tipos de vírus, incluindo o vírus simples da herpes (HSV) e vírus sincicial respiratório (RSV). O mecanismo antiviral sugerido é a inibição da ligação das proteínas virais à membrana da célula hospedeira. Além do flavonoide Quercetina, alguns outros compostos incluindo Resveratrol, Apigenina, Myricetina e Tricetina se mostraram como potenciais candidatos no processo de desenvolvimento de novas drogas contra infecções severas por hRSV (VARGAS et al., 2015).

1.1.5. Quercetina e derivado acetilado

A Quercetina (3,3',4',5,6-Pentahydroxyflavone) (Figura 4A) é o principal flavonoide presente na dieta humana. É um dos mais potentes bioflavonoides estudados e possui uma variedade de atividades farmacológicas, tais como seus efeitos antivirais sob a transcriptase reversa do HIV e outros retrovírus, herpes simplex do tipo 1, polio-vírus do tipo-1, parainfluenza do tipo-3 e hepatite-C (GONZALEZ et al., 2009). Kaul e colaboradores (1985) demonstraram que Quercetina possui ação antiviral sobre o vírus hRSV por apresentar atividade virucida e por inibir sua replicação em células infectadas. O aprofundamento dos estudos iniciados por Kaul e colaboradores demonstrou atividade virucida da

quercetina (16-30%) frente uma infecção de MOI 0.1 e ausência de proteção quando as células já estavam infectadas (dados ainda não publicados).

O estudo da ação antiviral dos flavonoides tem caminhado desde 1940, e somente nas últimas décadas tentativas de sintetizar modificações químicas têm sido realizadas para aprimorar a ação antiviral de alguns compostos (CUSHNIE; LAMB, 2005). Em estudo realizado por (DANIHELOVÁ et al., 2013), foi sugerido que a acetilação de Quercetina provavelmente ajuda a molécula a penetrar através da membrana celular. Nesse sentido, a acetilação da molécula de Quercetina poderia melhorar sua performance como agente virucida anti-hRSV, além de inibir a replicação viral em células já infectadas por um $\text{MOI} \geq 0.1$.

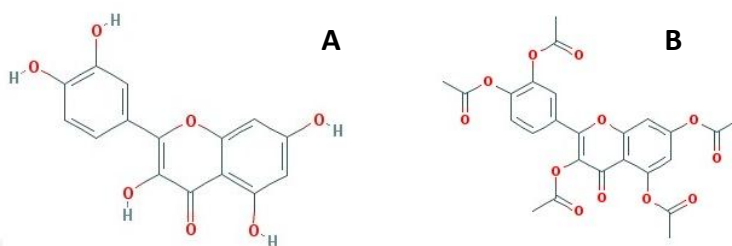


Figura 4. Estrutura química Quercetina (A) e Quercetina Penta-acetilada (QPA) (B). PubChem /NCBI

A quercetina penta-acetilada – QPA (3,3',4',5,7-Pentaacetoxyflavone), um derivado acetilado de Quercetina (Figura 4B) possui efeito inibitório na produção de Prostagladina-E2 e Óxido Nítrico induzidos por LPS, além de suprimir a expressão de iNOS (inibidores de óxido nítrico sintase) e COX-2 (Ciclooxygenase-2), quando em combinação com análogos de L-arginina (CHEN et al., 2001). Outra propriedade da QPA é a inibição do crescimento e viabilidade da linhagem de células HL-60 ($\text{CC}_{50} < 48 \mu\text{M}$) (DÍAZ et al., 2008), e a modulação da atividade catalítica de certas enzimas, tais como as enzimas P-450, NADPH-citocromo C-redutase e glutathione S-transferase (KOHLI et al., 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliação *in vitro* da atividade antiviral da Quercetina Penta-acetilada no curso da infecção pelo Vírus Sincicial Respiratório humano.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Analisar a citotoxicidade da Quercetina Penta-acetilada sob células HEp-2 utilizando a técnica de viabilidade celular por ensaio de MTT;
- b) Determinar o índice de seletividade da Quercetina Penta-acetilada em relação ao hRSV nos protocolos virucida e de pós-tratamento;
- c) Avaliação dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade anti-hRSV da Quercetina Penta-acetilada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos passíveis de contaminação foram realizados em câmaras de fluxo laminar, com soluções, vidrarias e produtos esterilizados por autoclavação ou filtração.

3.1. Reagentes

O derivado acetilado foi sintetizado pelo Dr. Luis Otávio Regasini (Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, UNESP). Brevemente, a molécula original da quercetina foi submetida a reações de acetilação utilizando uma solução de anidrido acético e piridina (1:1, 200 mL) à 80°C por 5 dias. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna de fase normal (CC-FN; 3 cm x 13 cm), eluída com Hex:AcOEt (80→0% de Hexano), obtendo-se 40 frações de 35 mL cada, as quais foram reunidas segundo seu perfil cromatográfico delineado por CCDA utilizando Hex:AcOEt (1:1) como fase móvel. O produto majoritário foi reunido e nomeado como QPA.

3.2. Cultura Celular

Células HEp-2 (carcinoma de orofaringe) obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² (Corning Glass Works, Nova York, NY, USA) incubadas em estufa umedecida à 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultura DMEM F12 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Vitrocell, Campinas, SP, Brasil,) e acrescido de antibióticos e antimicóticos (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). A escolha das células HEp-2 foi baseada na literatura por serem células oriundas do trato respiratório humano e por serem permissivas à infecção e replicação do vírus hRSV (GUPTA et al.,

1996).

3.3. Estoque viral

O vírus hRSV cepa Long, cedido pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (Professor Livre-docente de Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP) foi amplificado em culturas de células HEp-2. Os estoques virais foram preparados em meio de cultivo DMEM F12 incompleto (não acrescido de SFB). Após a coleta do estoque viral, as alíquotas foram congeladas em DMEM F12 acrescido de trealose 10% e mantidas em freezer a -80°C até o momento do uso (Gupta et al. 1996). O título viral foi estabelecido pelo método de formação de placas de lise como descrito por McKimmBreschkin, 2004 e confirmado pelo ensaio de TCDI₅₀ (RASMUSSEN et al., 2011).

3.4. Análises por adição do sal de MTT

Para todos os tratamentos, as células receberam meio de cultivo DMEM-F12 acrescido com SFB 2% com o intuito de manter os nutrientes celulares e a validade dos antibióticos. A adição do sal de MTT [1- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-Diphenylformazan Thiazolyl blue formazan] no quarto dia de tratamento foi feita seguindo as recomendações do fabricante (Sigma). Após os respectivos tratamentos em placas de 96 poços, o meio de cultura foi substituído por 50 µl de solução de MTT (0.5mg/ml diluído em DMEM F12 incompleto) e a placa incubada por aproximadamente 2 horas. Em seguida, a solução de MTT foi substituída por 100µl de dimetilsulfóxido puro (DMSO, Sigma) para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância da solução foi mensurada em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer), em comprimento de onda de 560nm. A metabolização do sal é diretamente proporcional à taxa metabólica, possibilitando assim inferir a

viabilidade celular a partir da absorbância mensurada (Equação 1).

Equação (1)

$$Viabilidade\ Celular = \frac{Abs_{teste} * 100}{Abs_{controle}}$$

3.5. Determinação da CC₅₀ da Quercetina Penta-acetilada em células HEp-2

Células HEp-2 na presença de meio de cultivo DMEM F12 acrescido com SFB 10% foram plaqueadas em placa de 96 poços (5x10⁴/poço) e incubadas por 24 horas para que atingissem confluência de aproximadamente 80%. A monocamada recebeu diferentes concentrações de QPA (2-1024µM) diluídas em DMEM-F12 acrescido com SFB 2% (100µL/poço). A cultura foi mantida por 4 dias em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. A viabilidade das células HEp-2 foi avaliada no quarto dia através do ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT, e sua absorbância foi lida à 560nm em aparelho de espectrofotometria. Células cultivadas apenas na presença de meio de cultivo foram consideradas como 100% viáveis. Desta forma, os valores de CC₅₀ (concentração citotóxica que reduz em 50% a viabilidade celular) foram obtidos por análise de regressão dos percentuais referentes às diferentes concentrações das amostras testadas. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de células viáveis assumindo o controle celular como 100% de viabilidade.

3.6. Avaliação da ação anti-hRSV da Quercetina Penta-acetilada

Para avaliação da ação antiviral da QPA duas abordagens metodológicas foram realizadas nesse estudo, virucida e pós-tratamento. Em todos os ensaios, células HEp-2 foram plaqueadas em placas de 96

poços (5×10^4 /poço) e mantidas por 24 horas em meio de cultivo DMEM F12 acrescido com SFB 10%.

3.6.1 Ensaio virucida

Realizado como descrito por Petricevich e Mendonca, 2003, com algumas modificações. As suspensões de hRSV (MOI 1, 0.5 e 0.1) foram incubadas por 1 hora à 4°C na presença de diferentes concentrações de QPA (1.5-24µM). Ao final da incubação, as alíquotas virais tratadas com QPA foram adicionadas nas monocamadas de células HEp-2 e então incubadas com as células por um período de 2 horas à 37°C, em seguida o inóculo foi substituído por meio DMEM-F12 2% SFB com volume final de 100µL. A placa foi incubada por quatro dias em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ e no quarto dia a revelação da placa pelo sal de MTT.

3.6.2. Ensaio de Pós-tratamento

Neste ensaio, células Hep-2 foram infectadas com soluções de RSV (MOI 1, 0.5 e 0.1) e incubadas durante 2 horas à 37°C. Em seguida, a suspensão viral foi substituída por diferentes concentrações de QPA (1.5-24µM) em um volume final de 100µl. A placa foi incubada por quatro dias em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ e no quarto dia a revelação da placa pelo sal de MTT.

3.7. Avaliação dos possíveis mecanismos envolvidos na ação anti-hRSV

3.7.1. Ensaio de Adesão

O ensaio de adsorção foi realizado como descrito por Kimura et al. (2000). Neste ensaio, a suspensão de hRSV (MOI 0.5) foi incubada por 1 hora à 4°C ou 37°C na presença de diferentes concentrações de QPA (1.5-12µM). Células HEp-2 foram previamente resfriadas à 4°C por 30 minutos antes de receber a suspensão viral contendo MOI 0.5 e o composto QPA em diferentes concentrações. Nestas condições, células, vírus e QPA foram mantidos por 2h antes de serem lavados com solução fisiológica de cloreto de sódio 0.15M para eliminação das partículas virais não adsorvidas. A placa foi incubada por quatro dias em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ e no quarto dia a revelação da placa pelo sal de MTT.

3.7.2. Ensaio de Internalização

Neste ensaio, células HEp-2 foram previamente resfriadas à 4°C por 30 minutos antes de receber a suspensão viral contendo os três MOIs (0.1, 0.5 e 1.0). Nestas condições, as células foram mantidas por 2h. Ao final deste período, as células foram lavadas com solução fisiológica de cloreto de sódio 0.15M para eliminação das partículas virais não adsorvidas. As células foram reaquecidas por 5min a 37°C e submetidas à nova incubação na presença de diferentes concentrações de QPA. Durante 1h a temperatura de 37°C foi mantida para internalização das partículas virais. Partículas não adsorvidas foram removidas por lavagem com tampão citrato (pH 3.0). A placa foi incubada por quatro dias em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ e no quarto dia a revelação da

placa pelo sal de MTT.

3.7.3. Ensaio de Tempo de Adição

Células HEp-2 na presença de meio de cultivo DMEM F12 acrescido com SFB 10% foram plaqueadas em placa de 96 poços (5×10^4 /poço) e incubadas por 24 horas para que atingissem confluência de aproximadamente 80%. Células Hep-2 foram infectadas com solução de hRSV (MOI 0.5) durante 1h, após esse período o inóculo foi substituído por meio DMEM-F12 2% SFB com volume final de 50µL em todos os poços. No tempo 0, a suspensão viral com MOI 0.5 foi acrescida juntamente com o composto QPA. Nos intervalos seguintes, as diferentes concentrações do composto QPA foram adicionadas no decorrer de 48 horas, respeitando os seguintes intervalos: 3h, 6h, 12h, 24h, 36h e 48h pós-infecção. Ao final das 48 horas, a placa foi incubada à 37°C por quatro dias até a revelação da placa pelo sal de MTT (adaptado de Roymans et al., 2010).

3.8. Índice de proteção celular

Todos os ensaios tiveram por amostras controle (i) células não tratadas e não infectadas e (ii) células não tratadas que foram infectadas com o vírus. A viabilidade celular foi avaliada no quarto dia através do ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT, e a leitura de absorbância foi realizada em aparelho de espectrofotometria a 560nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de células viáveis assumindo o controle celular não tratado e não infectado como 100% de viabilidade. A porcentagem de proteção obtida em cada tratamento foi calculada como se segue:

Equação (2)

$$Proteção\ Celular = \frac{DO_{AT} \cdot 100}{DO_{CC100}}$$

Onde:

DO é a densidade óptica após leitura do sal de MTT em 560 nm;

DO_{AT} é a densidade óptica obtida para cada uma das amostras-teste – DO_{CV} (densidade óptica do controle viral) e

DO_{CC100} é DO_{CC} – DO_{CV} (densidade óptica do controle celular – densidade óptica do controle viral).

3.9. Determinação do Índice de Seletividade

O Índice de Seletividade (IS) indica o quão promissor é a atividade antiviral de determinado composto, relacionando sua CC₅₀ com a CE₅₀ (CC₅₀ – efeito citotóxico do composto em 50% das células e CE₅₀ – concentração da amostra teste necessária para resultar em 50% de proteção celular).

Equação (3)

$$Índice\ de\ Seletividade\ (IS) = \frac{CC_{50}}{CE_{50}}$$

Determina-se que compostos que apresentem IS ≥ 4 possuem atividade antiviral promissora (LYU; RHIM; PARK, 2005).

3.10. Ensaio de placa de lise

Células HEp-2, cultivadas em placas de 24 poços, foram tratadas e infectadas de acordo com os procedimentos descritos anteriormente e o

ensaio foi realizado com adaptações pelo método descrito por (MCKIMM-BRESCHKIN, 2004). Para visualização das placas de lise, a monocamada celular recebeu meio *overlay* (meio de cultivo contendo agarose 0.6%). Nestas condições, as células foram mantidas à 37°C, na presença de CO₂ 5%, por um período de 6 dias ou até a visualização de placas de lise com o auxílio de microscópio óptico. As células foram formalizadas com formaldeído 1% diluído em solução salina 0.15M. As placas de lise foram evidenciadas após descarte do meio *overlay* e adição de solução de vermelho neutro 0.05% que permaneceu por 1 dia à temperatura ambiente.

3.11. Contagem do número de placas

O número de placas de lise foi contado por meio de um algoritmo baseado em processamento de imagens e reconhecimento de padrões, que tem por objetivo fazer a contagem automática das placas de lise da infecção viral. O algoritmo carrega a imagem da placa de 24 poços, retirada do scanner HP Color LaserJet CM2320nf Multifunction Printer, em formato BMP e resolução (DPI) de 1200, para então aplicar uma série de filtros que visam transformar e padronizar a imagem, para uma binária cujos objetos formados pelos pixels com valor um (cor branca) representam uma placa de lise. O somatório de todos os objetos é a quantidade total de placas de lise.

3.12. Análise Estatística

Os dados experimentais foram processados com o auxílio dos softwares Microsoft Excel e Graphpad Prism 6 e avaliados por análise de variância (one-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. Foi considerado um nível de significância de $p \leq 0.05$. As repetições de cada experimento foram indicadas em cada figura respectiv

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

LOPES (2016) demonstraram de maneira preliminar que a molécula de Quercetina Penta-acetilada (QPA) possui potencial como agente anti-hRSV, pois na presença deste composto, células Hep-2 inoculadas com M.O.I. 0.5 foram protegidas da morte celular causada pelo vírus. Estes resultados foram obtidos quando do tratamento do vírus ou das células pós-infecção. Por outro lado, nenhuma melhora na viabilidade celular foi percebida quando as células foram previamente tratadas com o composto e posteriormente infectadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a ação virucida e de pós-tratamento anti-hRSV de QPA e propor mecanismos de ação.

A molécula de QPA foi sintetizada pelo Dr. Luis Otávio Regasini (docente do departamento de Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, UNESP) como descrito em Material e Métodos. Inicialmente foi determinado o valor da concentração citotóxica para 50% das células Hep-2 (CC_{50}). A determinação deste parâmetro se faz importante na correlação com resultados obtidos nos ensaios antivirais e no cálculo do Índice de Seletividade (IS) (equação 3). Este índice indica o quão promissora é a atividade antiviral de uma molécula-teste, sendo calculado com base na determinação da CC_{50} e a concentração eficiente do composto que protege 50% das células durante uma infecção (CE_{50}), assim, $IS = CC_{50}/CE_{50}$. Compostos antivirais promissores são caracterizados por apresentar um Índice de Seletividade ($IS \geq 4$) (LYU; RHIM; PARK, 2005).

O intervalo de concentrações de QPA para a determinação da CC_{50} foi baseado em estudos prévios com Quercetina (CHOI et al., 2009; JOHARI et al., 2012). O valor da CC_{50} obtido para o composto QPA foi de 38.8 μM (Figura 5). Este valor foi maior do que aquele determinado para a Quercetina (11,4 μM) em células Hep-2 (Lopes, 2016) e maior que a

CC₅₀ determinada para células epiteliais de adenocarcinoma cervical humano (HeLa), 29.6 μ M (DANIHELOVÁ et al., 2013).

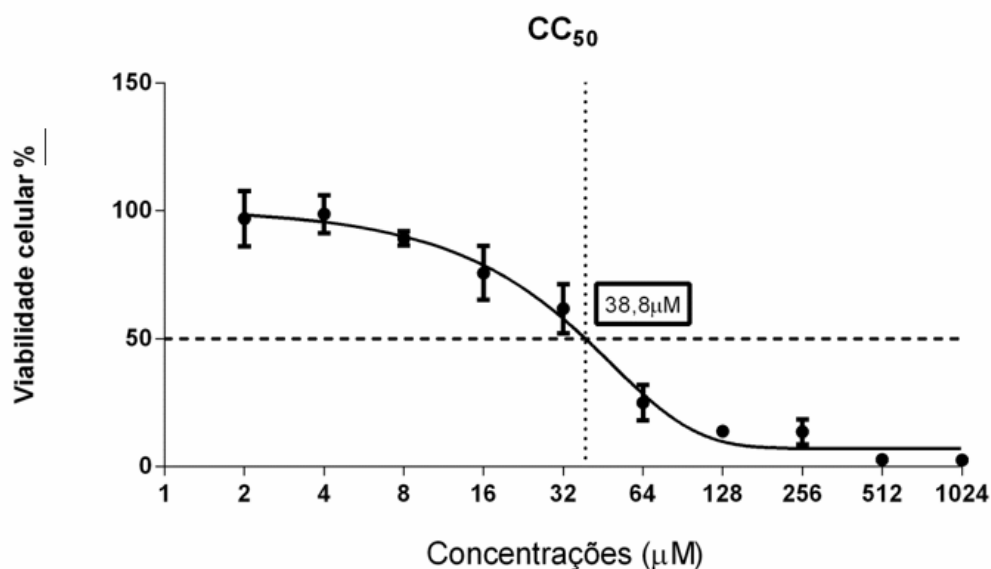


Figura 5. Determinação da CC₅₀ de QPA em células Hep-2. Células HEp-2 (5×10^4) foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de QPA (2-1024 μ M) durante 4 dias à 37°C. A viabilidade das células foi avaliada através do ensaio de MTT. A absorbância obtida em 560nm foi convertida em porcentagem de células viáveis assumindo o controle celular (QPA 0 μ M) como 100% de viabilidade. O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. A curva é o resultado da média dos valores obtidos $\pm$ desvio padrão.

A ação anti-hRSV de QPA foi avaliada em células Hep-2 infectadas ou não com diferentes M.O.I. (*Multiplicity of infection*). O título viral foi estabelecido pelo método de formação de placas de lise como descrito por (MCKIMM-BRESCHKIN, 2004) e confirmado pelo ensaio de TCDI₅₀ (RASMUSSEN et al., 2011). Em todos os ensaios antivirais, foram estabelecidos controles internos. Desta forma, células infectadas com hRSV (MOI 0.1, 0.5 e 1.0) e não tratadas com QPA, serviram como controle viral. Células cultivadas em meio DMEM F12, 2% SFB, sem a

presença do vírus e não tratadas com QPA, serviram como controle celular. Após 3 dias de cultivo, a morfologia destas células foi avaliada microscopicamente. Células não infectadas (controle celular) apresentaram tapete celular confluyente, ausência de células mortas ou mesmo sincícios (Figura 6A). Células infectadas com hRSV (controle viral) apresentaram morfologia alterada, alongada, redução no número de células e presença de sincícios (Figura 6 B, C e D).

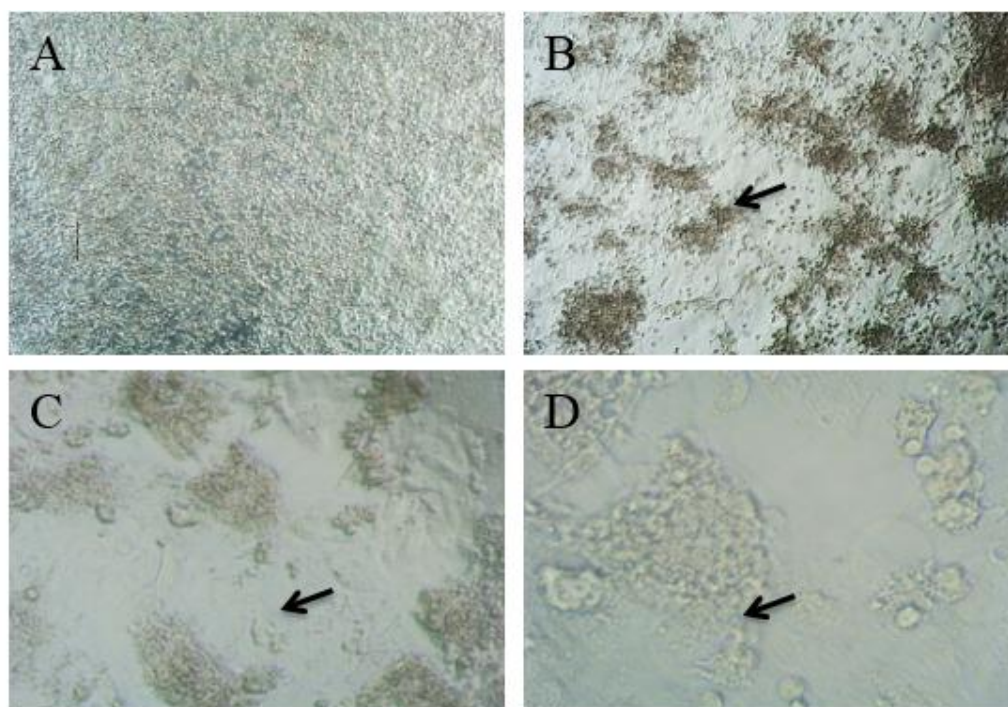


Figura 6. Controle celular representado por células Hep-2 não infectadas (A) e controle viral (MOI 0.5) representado por células infectadas por hRSV (B,C,D). Em A (4x), as células apresentam confluência e nenhuma formação de sincícios. Na figura B (4x), C (10x) e D (20x) há presença de sincícios (setas) e redução do número de células.

Com o objetivo de avaliar uma ação direta de QPA sobre a partícula viral, foram realizados ensaios de protocolo virucida. Assim, diferentes MOIs (0.1, 0.5 e 1.0) foram incubados por 1 hora à 4°C com

diferentes concentrações de QPA (1.5-24 μ M) para então serem usados na infecção celular. O tratamento da partícula viral com QPA ($\leq 12\mu$ M) resultou em elevada proteção celular nos três MOIs testados (Figura 7 A-C). Os testes realizados com MOI 0.1 apresentaram proteção celular da ordem de 100% em todas as concentrações de QPA testadas (1.5-24 μ M) (Figura 7A). Na análise morfológica das células (Figura 8), células não infectadas (controle celular) apresentaram confluência, nenhuma formação de sincícios e ausência de células mortas. Células infectadas (controle viral) apresentam morfologia alongada, redução do número de células e a presença elevada de sincícios. Para o MOI 0.1 todas as concentrações que foram efetivas na proteção celular (1.5-12 μ M) apresentaram uma baixa quantidade ou quase nenhuma formação de sincícios em relação ao controle viral.

Nos ensaios seguintes, o inóculo viral (MOI) foi aumentado com o intuito de se verificar um limiar na ação anti-hRSV de QPA. Observamos que o aumento no inóculo viral resultou em redução do efeito anti-hRSV de QPA. Assim, inóculos 5x e 10x maiores (MOI 0.5 e 1.0), tratados com concentrações $\leq 12\mu$ M resultaram em valores de proteção celular de 50-75% ou de no máximo 50%, respectivamente (Figura 7B-C). A concentração de QPA de 24 μ M não foi considerada efetiva para os MOIs de 0.5 e 1.0, uma vez que reduziu o número de células viáveis (Figura 7B-C). Na análise morfológica para o MOI 0.5 todas as concentrações apresentaram uma baixa quantidade de sincícios em relação ao controle viral, onde seu tamanho também foi reduzido (Figura 9). Já para o MOI 1.0, a incubação das partículas virais com as concentrações de 1.5-12 μ M resultou em uma redução na formação de sincícios em relação ao controle viral (Figura 10), mas se compararmos com outros MOIs testados, a eficiências destas concentrações em inibir a formação de sincícios foi menor.

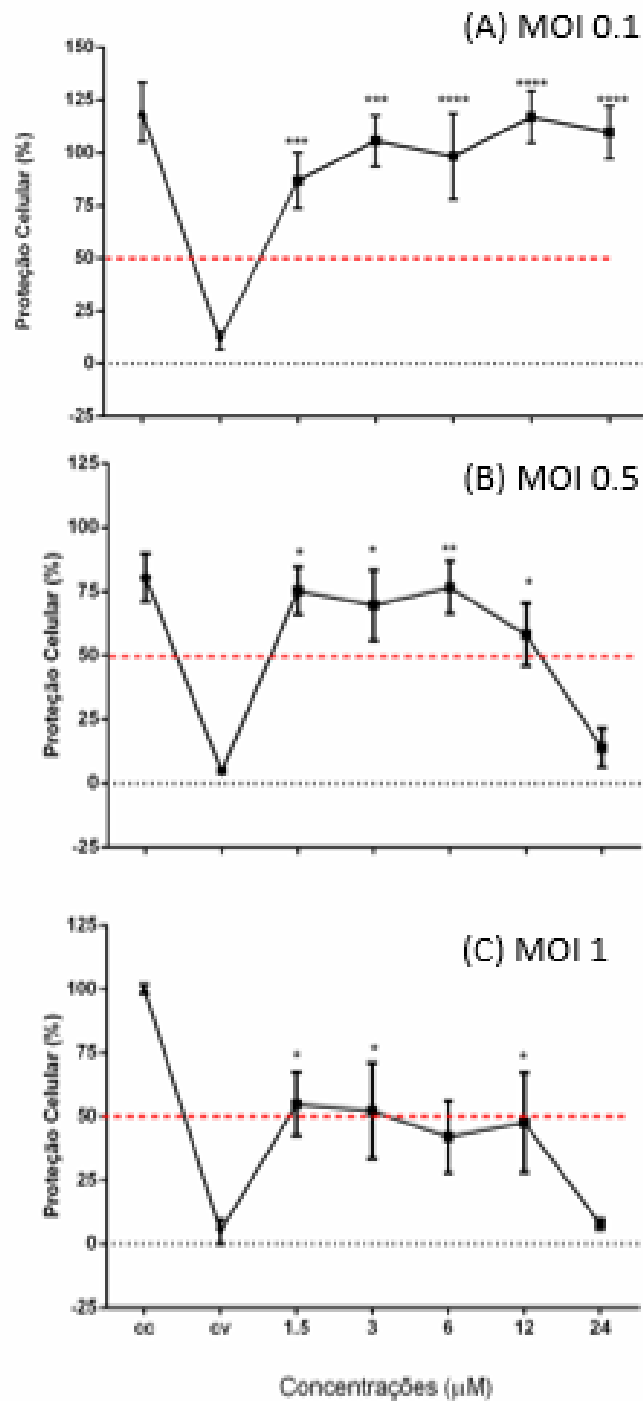


Figura 7. Avaliação da atividade virucida (A,B,C) do composto QPA nas concentrações de 1.5-24μM em diferentes MOIs. Os dados representam a média de um experimento realizado em triplicata. Os dados foram analisados com auxílio do software Graphpad Prism 6 e os valores expressam média ± desvio padrão (One-way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni, *p≤0.05).

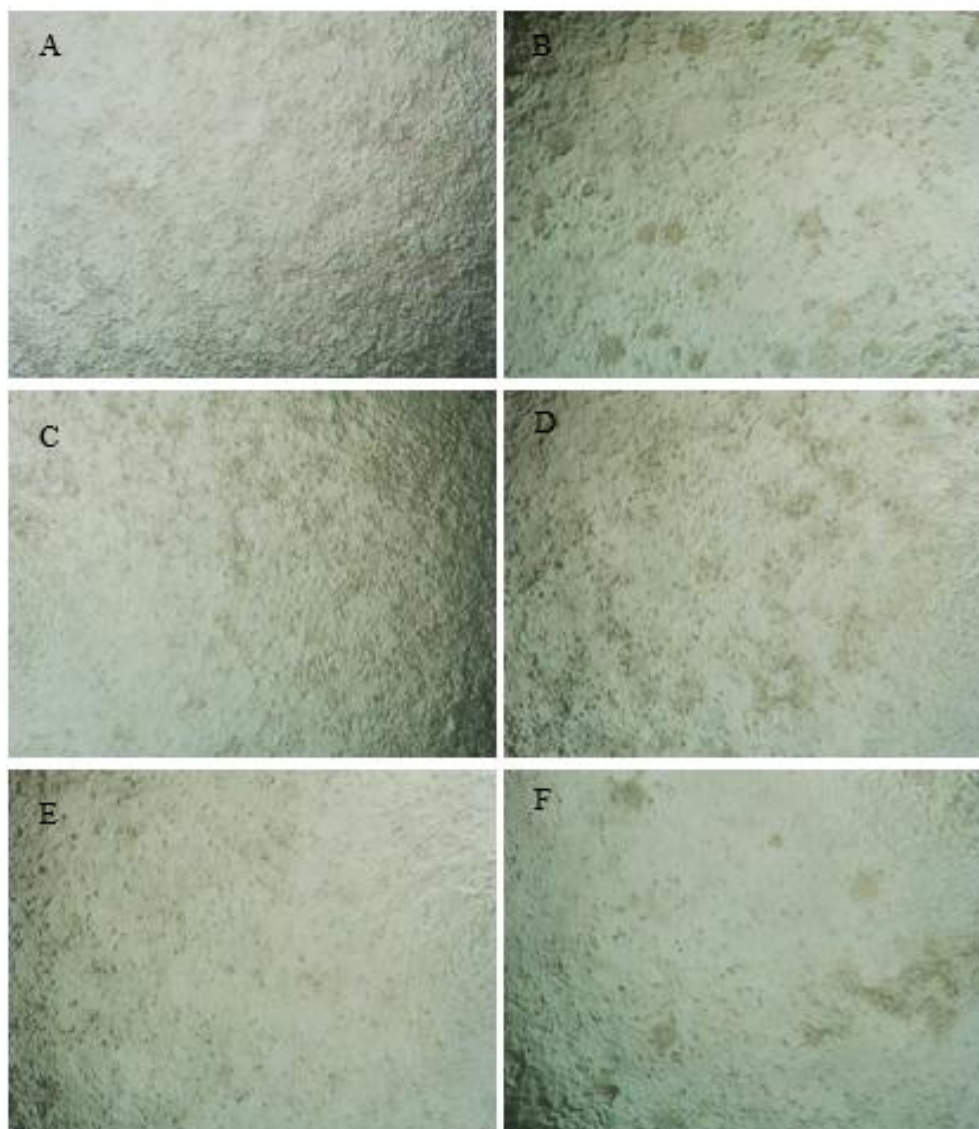


Figura 8 . Ensaio Virucida MOI 0.1 - Controle celular representado por Células Hep-2 não infectadas (A) e Controle Viral representado por células infectadas por hRSV (B). Em A (4x), as células apresentam confluência e nenhuma formação de sincícios. Na figura B (4x) há presença de sincícios e redução do número de células. Nas figuras C (1,5μM), D (3 μM), E (6 μM), e F (12 μM) há redução do número de sincícios e aumento no número de células viáveis. (4x)



Figura 9 . Ensaio Virucida MOI 0.5 - Controle celular representado por Células Hep-2 não infectadas (A) e Controle Viral representado por células infectadas por hRSV (B). Em A (4x), as células apresentam confluência e nenhuma formação de sincícios. Na figura B (4x) há presença de sincícios e redução do número de células. Nas figuras C (1,5 μ M), D (3 μ M), E (6 μ M), e F (12 μ M) há redução do número de sincícios e aumento no número de células viáveis. (4x)

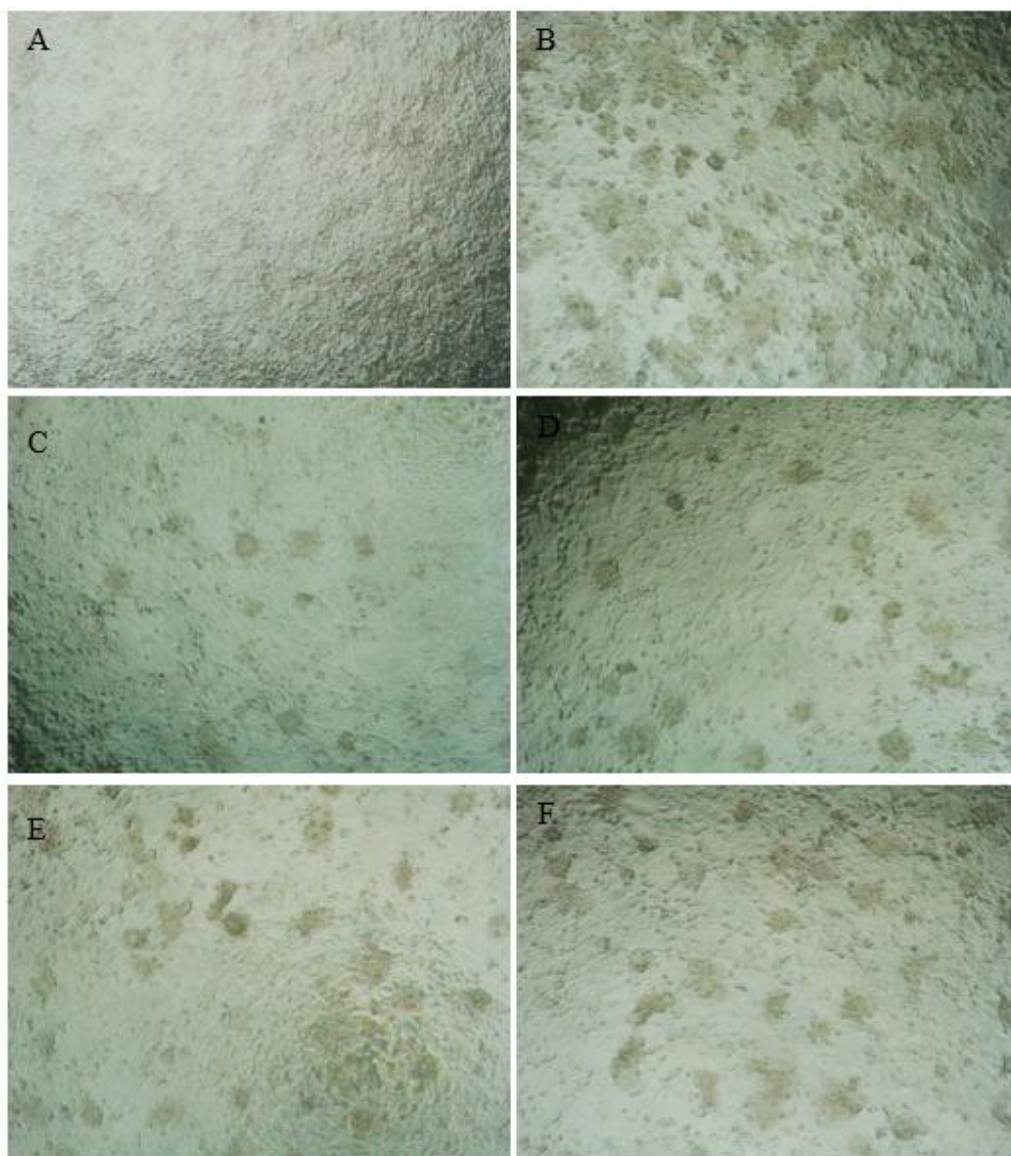


Figura 10. Ensaio Virucida MOI 1.0 - Controle celular representado por Células Hep-2 não infectadas (A) e Controle Viral representado por células infectadas por hRSV (B). Em A (4x), as células apresentam confluência e nenhuma formação de sincícios. Na figura B (4x) há presença de sincícios e redução do número de células. Nas figuras C (1,5μM), D (3 μM), E (6 μM), e F (12 μM) há uma discreta redução do número de sincícios e aumento no número de células viáveis. (4x)

A análise dos dados nos sugeri que a concentração de 24 μ M de QPA juntamente com a carga viral aumentada (0.5 e 1.0), agiram de maneira sinérgica com relação ao efeito citotóxico individual de cada uma. Os resultados obtidos nos ensaios virucida indicam que o composto QPA possui atividade anti-hRSV com efeito direto sobre as partículas virais, sugerindo uma interação entre o composto e as proteínas presentes na superfície viral, G, SH ou F. Segundo a literatura, a proteína G e SH não são totalmente necessárias para a infecção por hRSV, pois em trabalhos realizados com mutantes deficientes em proteína G e SH mostram que a proteína F é a única proteína transmembrana essencial à infecção do vírion *in vitro* (BOHMWALD et al., 2016; BUKREYEV; YANG; COLLINS, 2012; COLLINS; GRAHAM, 2008; DUDAS; KARRON, 1998).

hRSV F é o principal alvo para intervenção farmacológica anti-hRSV por ser essencial para a entrada do vírus, pois facilita a fusão da membrana viral com a membrana plasmática celular independentemente do pH, ocasionando a infecção da célula hospedeira (Walsh and Hruska, 1983; Battles et al., 2016). Há dois estados de conformação para hRSV F: um estado meta-estável adotado antes da interação vírus-célula (pré-fusão) e um estado que ocorre após a fusão das membranas do vírus e da célula (pós-fusão) (MCLELLAN et al., 2013). hRSV F é essencial para infecção, pois vírions mutantes, sem proteína F (hRSV Δ F), não são capazes de infectar (BATONICK; OOMENS; WERTZ, 2008; MASTRANGELO; HEGELE, 2013). Células infectadas por hRSV expressam proteína F em sua superfície, o que resulta em fusão com células vizinhas, especialmente *in vitro*, levando à formação de células multinucleadas chamadas sincícios (BATTLES et al., 2016).

Battles et al. (2016) demonstraram que moléculas pequenas, inibidoras do hRSV, interagem com a proteína F, sugerindo um possível mecanismos de ação. Elas se ligam com alta afinidade a um bolsão trissimétrico dentro da cavidade central da estrutura pré-fusão da hRSV F. A estabilização da hRSV F de pré-fusão, decorrente da interação,

restringe o movimento de duas regiões altamente instáveis (peptídeo de fusão hRSV F e região HRB). Análises de *docking molecular* indicaram que as moléculas preenchem completamente a cavidade previamente descrita e foram caracterizados basicamente pela mesma energia de interação (em torno de -6.5 kcal/mol). Quercetina interage na mesma região, através de uma ligação de hidrogênio, mas se movimenta para fora dela em simulações *in sílica* de dinâmica molecular (Lopes et al. *submetido*). O composto QPA estabelece interações hidrofóbicas constantes e estáveis com as fenilalaninas (resíduos 488, cadeias A, B e C) do bolsão trissimétrico (*comunicação pessoal de Feliciano, M.C.*). No mesmo estudo, não foi possível verificar ligações de hidrogênio entre o QPA e a proteína F, o que sugere outros tipos de interações como forças dipolo-dipolo.

Nos ensaios de pós-tratamento, diferentes MOIs (0.1, 0.5 e 1.0) foram incubados por 2 horas com células Hep-2. Posteriormente, as células infectadas receberam diferentes concentrações de QPA (1.5-24 μ M). Os resultados obtidos mostram que a presença da QPA (1.5-24 μ M), após o inóculo viral de MOI 0.1, proporcionou proteção celular (25% a 100%) (Figura 7D). Na análise citomorfológica (Figura 12), células não infectadas (controle celular) apresentaram confluência, nenhuma formação de sincícios e ausência de células mortas. Células infectadas (controle viral) apresentam morfologia alongada, redução do número de células e a presença elevada de sincícios. Para o MOI 0.1, as concentrações de 1.5-6 μ M induziram uma discreta redução na formação de sincícios em relação ao controle viral. Apenas a concentração de 12 μ M reduziu drasticamente a formação de sincícios.

Com o aumento no inóculo viral (MOI 0.5) a única concentração que apresentou proteção celular, com diferença significativa ($p < 0.001$), foi de 24 μ M (~25%) (Figura 7E). O aumento do inóculo viral para MOI 1.0 (2 vezes maior) resultou em redução acentuada dos efeitos anti-hRSV de QPA, similarmente aos resultados obtidos com MOI 0.5. Apenas na

concentração de 24 μ M de QPA foi possível observar uma leve manutenção da viabilidade celular (~25%) com proteção celular estatisticamente significativa ($p < 0.01$) em relação ao controle viral (0%) (Figura 7F).

O efeito protetor nos ensaios de pós-tratamento foi perdido à medida que o inóculo viral foi aumentado (MOIs de 0.5 ou 1.0), não havendo proteção >50%. A falta de proteção celular em MOI 0.5 e 1.0 pode indicar um efeito de pós-tratamento limitado de QPA em situações em que a carga viral se encontra elevada. Na análise morfológica das células, nas infecções com MOI 0.5 e 1.0, a formação de sincícios apresentou semelhanças (Figuras 13 e 14). Nas concentrações de 1.5-6 μ M houve formação de sincícios e morte celular, parâmetros que foram reduzidos na concentração de 12 μ M.

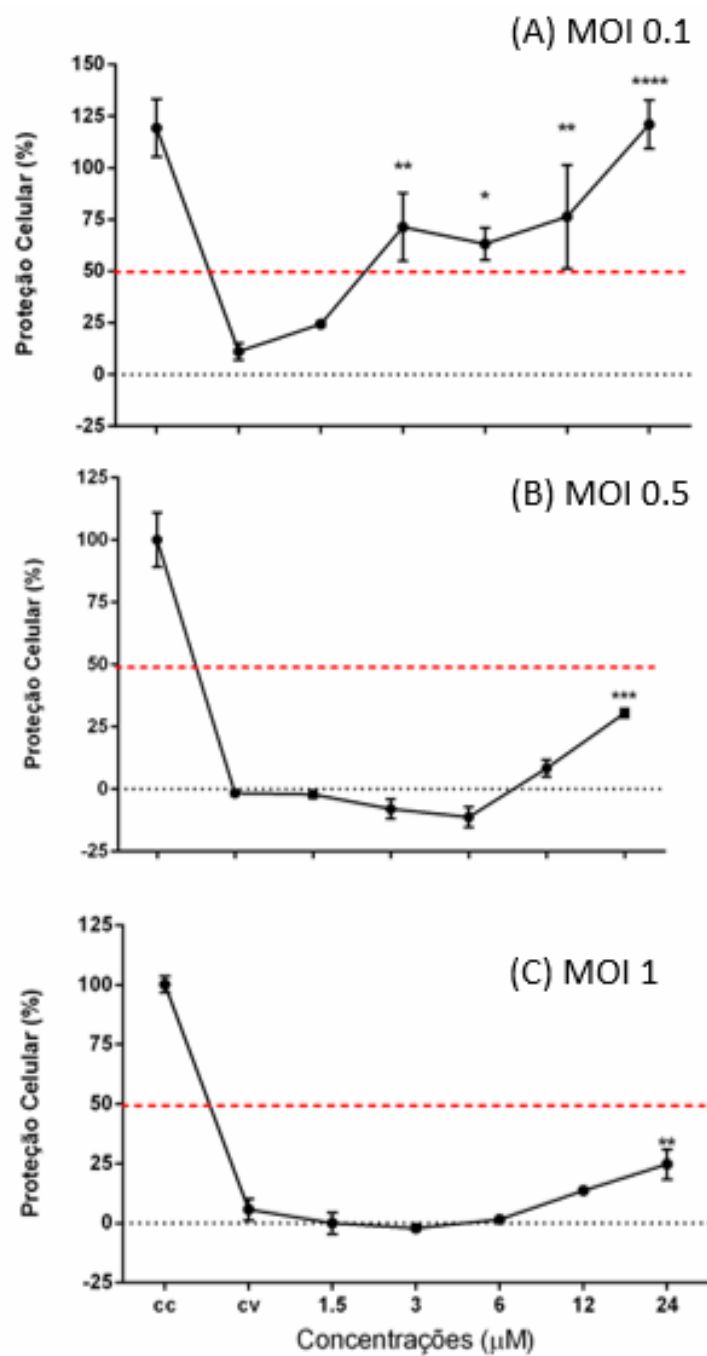


Figura 11. Avaliação da atividade de pós-tratamento (A, B, C) do composto QPA nas concentrações de 1.5-24μM em diferentes MOIs. Os dados representam a média de um experimento realizado em triplicata. Os dados foram analisados com auxílio do software Graphpad Prism 6 e os valores expressam média ± desvio padrão (One-way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni, *p≤0.05).

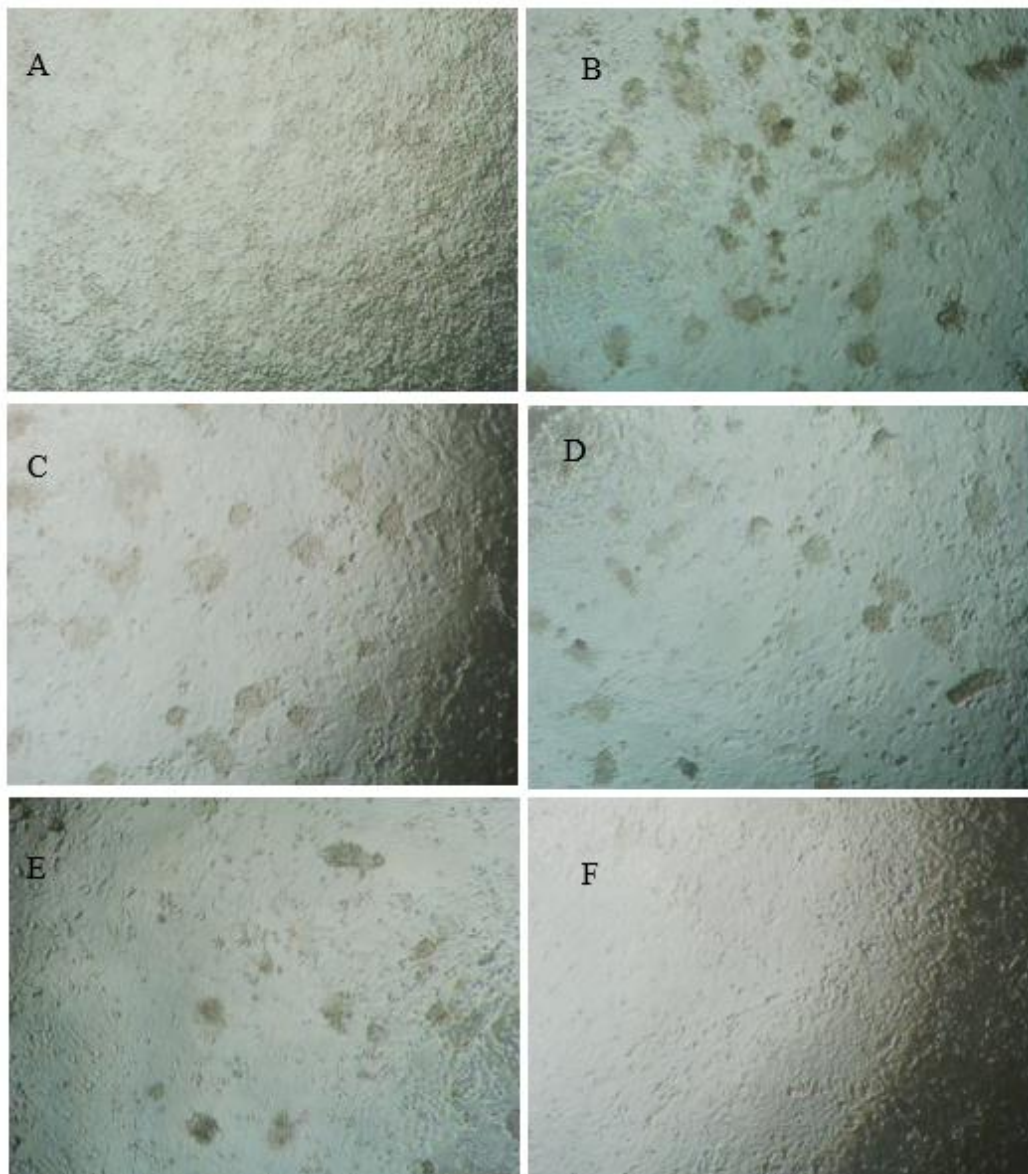


Figura 12 . Ensaio de Pós-tratamento MOI 0.1 - Controle celular representado por Células Hep-2 não infectadas (A) e Controle Viral representado por células infectadas por hRSV (B). Em A (4x), as células apresentam confluência e nenhuma formação de sincícios. Na figura B (4x) há presença de sincícios e redução do número de células. Nas figuras C (1,5μM), D (3 μM) e E (6 μM), há discreta redução do número de sincícios e em F (12 μM) há ausência de sincícios e aumento no número de células viáveis. (4x)

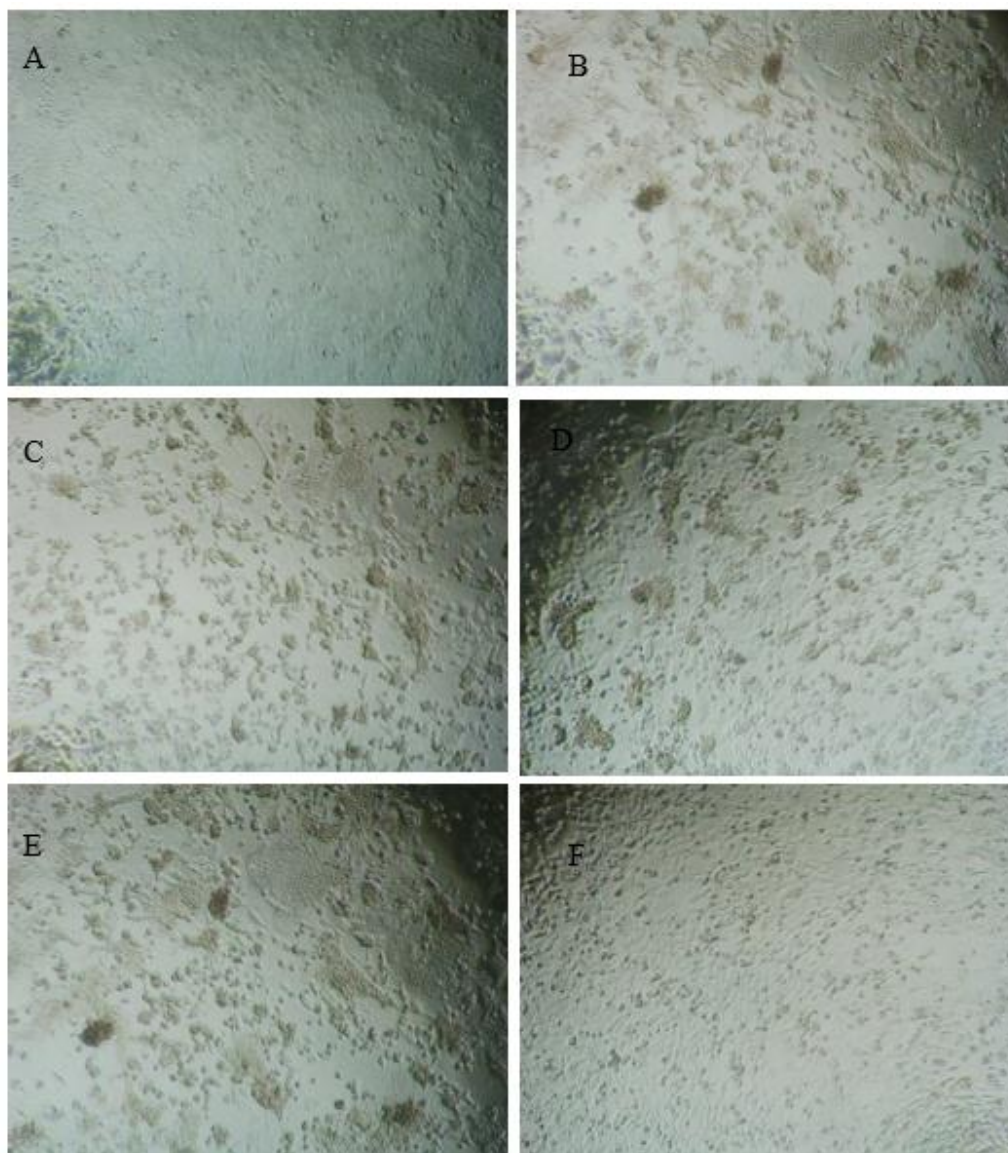


Figura 13 . Ensaio de Pós-tratamento MOI 0.5 - Controle celular representado por Células Hep-2 não infectadas (A) e Controle Viral representado por células infectadas por hRSV (B). Em A (4x), as células apresentam confluência e nenhuma formação de sincícios. Na figura B (4x) há presença de sincícios e redução do número de células. Nas figuras C (1,5μM), D (3 μM) e E (6 μM), há discreta redução do número de sincícios e em F (12 μM) há ausência de sincícios e aumento no número de células viáveis. (4x)

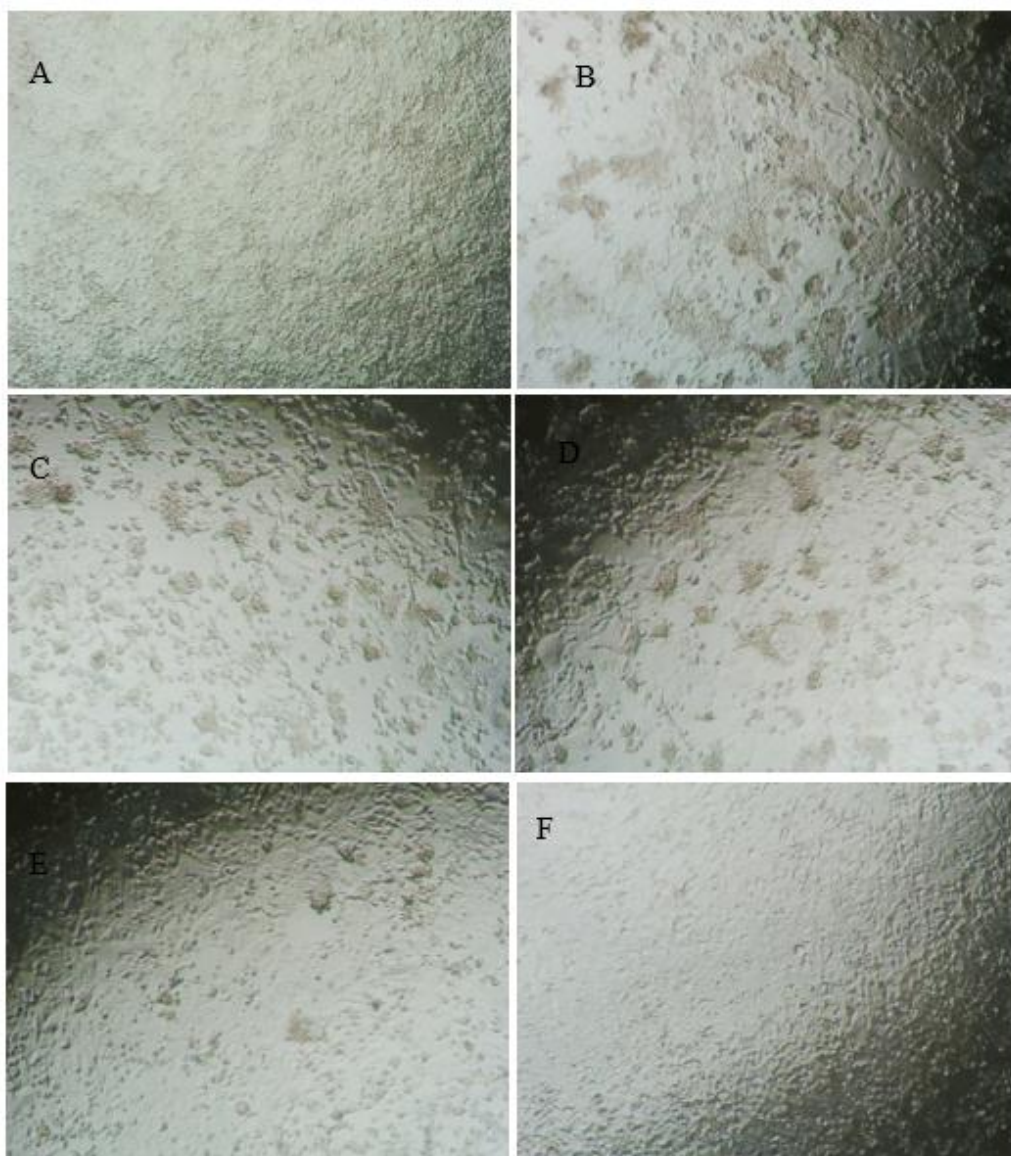


Figura 14. Ensaio de Pós-tratamento MOI 1.0 - Controle celular representado por Células Hep-2 não infectadas (A) e Controle Viral representado por células infectadas por hRSV (B). Em A (4x), as células apresentam confluência e nenhuma formação de sincícios. Na figura B (4x) há presença de sincícios e redução do número de células. Nas figuras C (1,5 μ M), D (3 μ M) e E (6 μ M), há discreta redução do número de sincícios e em F (12 μ M) há ausência de sincícios e aumento no número de células viáveis. (4x)

A Quercetina (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavona) é um composto fenólico com afinidade por substâncias hidrofóbicas. Interagindo com a região hidrofóbica da bicamada lipídica da membrana plasmática da célula. A penta-acetilação da molécula de Quercetina, substituiu seus grupos hidroxilas por grupos Acetilas, transformando a molécula em 3,3',4',5,7-Pentaacetoxylavone e fornecendo a ela características fracamente polares (apolares).

Danihelová et al. (2013) estudou a ação antioxidante e citotóxica dos derivados acetilados de quercetina em células epiteliais HeLa e NIH-3T3, e seus relatos mostram que o processo de acetilação da molécula de quercetina provavelmente auxiliou a penetração dos derivados acetilados na membrana plasmática de células cancerosas, inibindo o crescimento dessas células de forma mais efetiva do que o composto original, Quercetina. Podemos assim supor que, a penta-acetilação da molécula de Quercetina melhorou sua absorção pelas células Hep-2 através da bicamada lipídica da membrana plasmática. O mecanismo de ação sugerido por nós seria de que o composto QPA, num protocolo de pós-tratamento, atue interferindo em alguma etapa da replicação dos componentes virais, maturação, montagem e/ou liberação do vírus. Em estudo realizado por Graziani et al. (1979), mostraram que a Quercetina foi capaz de inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas em células tumorais. Bauer et al. (1981) mostrou que o flavonoide 4,6-dicloroflavano inibiu a síntese de RNA de Rinovírus sem afetar sua fase de adsorção e internalização. Outro flavonoide, o 4',5-dihidroxi- 3,3',7-trimetoxiflavona que possui atividade contra Rinovírus, mostrou agir inibindo a replicação viral por possivelmente interferir no desnudamento e no início de síntese de RNA viral. Nossos resultados, juntamente com os dados da literatura, demonstram que alguns flavonoides podem entrar na célula e inteferir na replicação viral.

Na Tabela 1 é possível observar os valores de CE_{50} e do IS para cada MOI testado. Invariavelmente, o IS da atividade virucida de QPA permaneceu próximo de 24.7. Para o pós-tratamento, o IS pode ser calculado apenas para o MOI de 0.1 (12.3). Nos demais casos, o IS não foi calculado, uma vez que os valores de CE_{50} não foram obtidos. Em resumo, a ação virucida de QPA se mostrou mais promissora em comparação ao pós-tratamento (sobre células já infectadas), justificando assim que esta atividade fosse melhor investigada.

Tabela 1. Valores de IS para os ensaios Virucida e de Pós-tratamento.

	Virucida			Pós-tratamento		
	MOI 0.1	MOI 0.5	MOI 1.0	MOI 0.1	MOI 0.5	MOI 1.0
CE_{50}	<1.5	<1.5	~1.5	~3	-	-
IS*	25.8	25.8	25.8	12.9	-	-

Tendo em vista uma melhor ação do composto QPA no protocolo Virucida e com o intuito de investigarmos por qual mecanismo de ação QPA estava inibindo o efeito citopático de hRSV, foram realizados ensaios de adesão/adsorção, internalização e tempo-de-adição.

Inicialmente, a capacidade de QPA em inibir a adesão do vírus à superfície da célula, foi testada nos ensaios de adesão/adsorção. Para isso, células resfriadas à 4°C receberam inóculos virais (MOI 0.5) previamente incubados por 1h com diferentes concentrações de QPA (1.5-12 μ M) sob temperaturas de 4°C ou 37°C. Após 2h de adsorção viral, o inóculo foi substituído por meio DEMEM F12, 2% SFB e as células incubadas durante 4 dias à 37°C. A incubação do vírus com o composto QPA à 4°C resultou em uma leve proteção celular (~25%) na

concentração de 1.5 μ M, porém não houve diferença estatisticamente significativa nessa concentração quando comparada ao controle viral (0%) (Figura 15A). Nas demais concentrações testadas, não houve qualquer índice de proteção celular.

Embora o protocolo padrão de adsorção indique a incubação da partícula viral com o composto-teste à 4°C (Kimura et. al., 2000), sabe-se que a temperatura pode atuar como um fator facilitador de reações químicas e, portanto, de interações moleculares. A temperatura está relacionada com o grau de agitação das moléculas, fornecendo calor a uma determinada reação, aumentando a energia cinética das moléculas (movimento), favorecendo um maior número de choque entre elas e assim, aumentando o número de interações efetivas (Lavorenti, 2002). Assim, os ensaios de adesão foram repetidos onde a incubação do vírus com o composto QPA sob a temperatura de 37°C (Figura 15B). As demais etapas não foram modificadas. Os dados mostram que todas as concentrações testadas (1.5-12 μ M) foram efetivas em reduzir 50% do efeito citopático de hRSV. Pode-se concluir que o aumento na temperatura durante a incubação do vírus com o composto QPA, melhorou visivelmente sua ação anti-hRSV. Sugerimos ainda que a inibição da adsorção viral à superfície celular seja decorrente da interação de QPA com hRSV F.

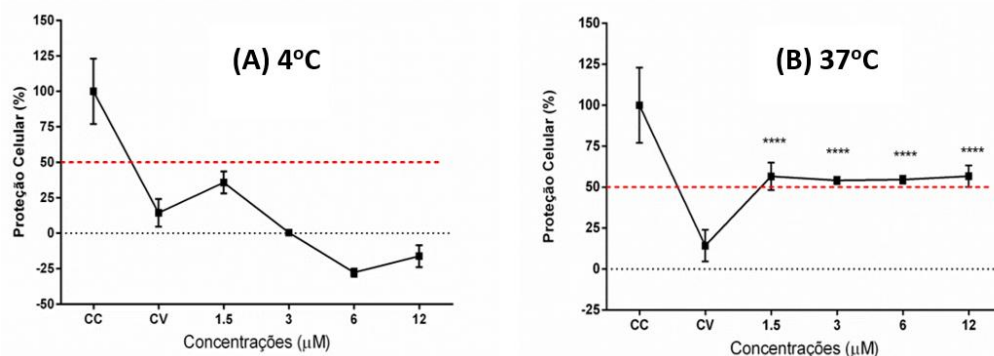


Figura 15. Efeito do ensaio de adesão do hRSV pela avaliação da % de proteção celular da QPA. Os dados representam a média de um experimento realizado em triplicata. Os dados foram analisados com auxílio do software Graphpad Prism 6 e os valores expressam média $\pm$ desvio padrão (One-way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni, $*p \leq 0.05$).

A partículas virais de hRSV após realizarem adsorção à superfície celular, penetram nas células alvo num processo denominado internalização. Esta etapa do ciclo viral foi testada na presença do composto QPA (Figuras 16A-B). Para os MOIs 0.1 e 0.5, nenhuma concentração (1.5-12 μ M) foi capaz de evitar ou reverter os danos celulares causados pela infecção viral, não apresentando nenhuma proteção estatisticamente significativa.

Quando a carga viral foi aumentada (MOI 1.0) houve discreta proteção sendo que a concentração de 12 μ M mostrou uma proteção de $\sim 12.5\%$ com valor estatisticamente significativo ($p < 0.05$) comparado ao controle viral (0%) (Figura 16C). Para a análises desses resultados, é importante lembrarmos que, nesse caso, diferentemente do ensaio de adesão, o vírus foi incubado por 2hs (MOI 0.1, 0.5 e 1.0) à 4° C para que ocorresse a sua adesão às células. Somente após essa etapa o composto foi adicionado e a temperatura aumentada para 37° C. Tendo em vista que, à 4° C o vírus se adere às células mas não as penetra, somente após o aquecimento das células podemos verificar se o composto QPA age impedindo a internalização do vírus. Nossos resultados demonstram

que houve redução no número de células viáveis (%) e que a proteção celular não passou de 12,5%. Sendo assim, o composto QPA não interferiu na etapa de internalização do vírus hRSV.

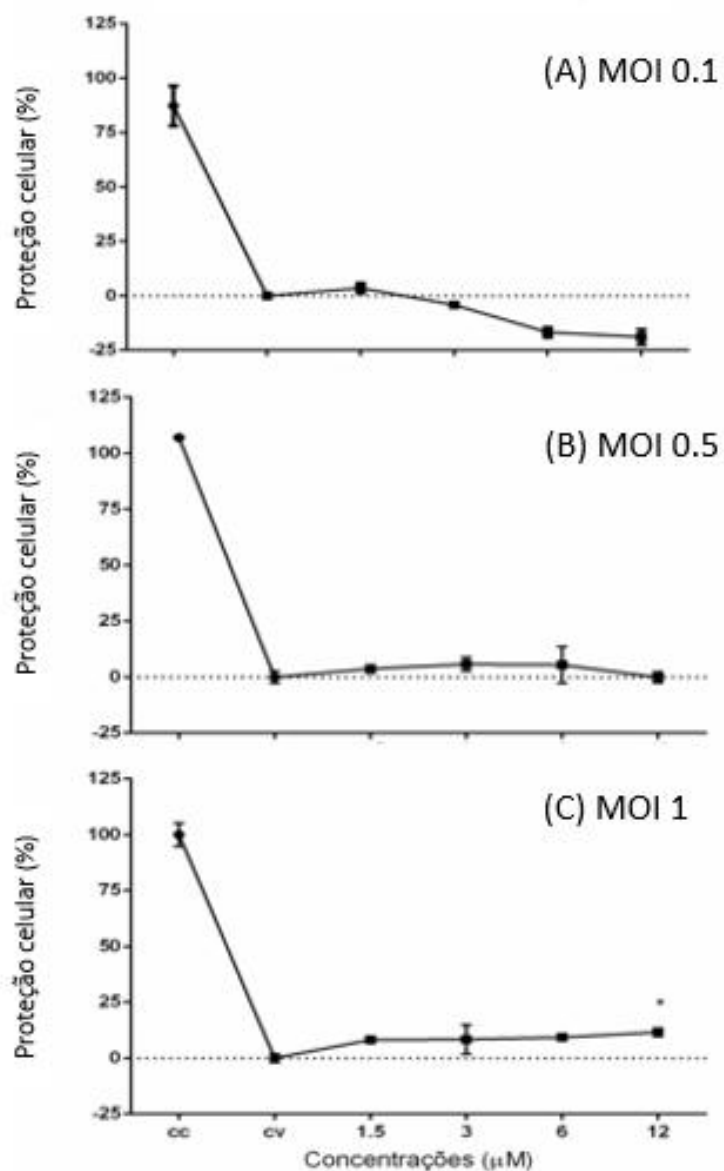


Figura 16. Efeito do ensaio de Internalização de QPA sobre o hRSV pela avaliação da % de proteção celular. Os dados representam a média de um experimento realizado em triplicata. Os dados foram analisados com auxílio do software Graphpad Prism e os valores expressam média $\pm$ desvio padrão (One-way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni, * $p \leq 0.05$)

(BARNARD et al., 1993), demonstrou que o composto polifenólico SP-303 não apresentou inibição da adesão viral, porém agiu inibindo a penetração do vírus com CE_{50} 0.48 μ M, sugerindo que o mecanismo pela qual SP-303 age interferindo na replicação de hRSV é na inibição da penetração das partículas virais na célula hospedeira. Apesar de ambos os estudos estarem utilizando os mesmos protocolos, nossos resultados não apresentaram concordância com os resultados de Barnard et al. (1993), pois os dados dos ensaios de internalização indicam que nenhuma das concentrações testadas (1.5-12 μ M) foi capaz de induzir proteção celular maior que 12,5% nos diferentes MOIs analisados.

Outras etapas do ciclo viral podem ser avaliadas através de ensaios denominados tempo-de-adição. Nestes ensaios, o composto-teste é adicionado à cultura celular em diferentes momentos da infecção viral. Para avaliar o efeito antiviral em função do tempo de adição de QPA, células Hep-2 foram infectadas com solução viral de MOI 0.5 (tempo 0) contendo ou não QPA. A partir desse momento, a suspensão viral foi sequencialmente substituída por 3 diferentes concentrações de QPA (3, 6 e 12 μ M) no decorrer de 48 h, respeitando o seguinte intervalo 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h pós-infecção.

Na primeira condição (Figura 17A), na concentração de 3 μ M, os resultados mostram que houve proteção celular na hora 0 de ~50%, e com diferença estatisticamente significativa $p < 0.001$ em relação ao controle viral (0%). O efeito desaparece nas horas seguintes (3-12 h) e retorna após 24 h de infecção, apresentando um aumento do efeito anti-hRSV (~25%), e mantendo esse efeito nos intervalos de 36 h e 48 h.

Na segunda condição (Figura 17B), na concentração de 6 μ M a adição do composto QPA às células infectadas nos períodos de (0-48 h) apresentou proteção (~25% a ~50%) com diferenças estatisticamente significativa em relação ao controle viral (0%) em todos os intervalos de tempo.

Na concentração de 12 μ M (Figura 17C), os resultados

demonstram proteção celular (50%) na hora 0. O efeito foi reduzido nos intervalos de 3 h, 6 h e 12 h. Após 24 h de infecção, a adição de QPA às células infectadas apresentou um discreto aumento na viabilidade celular (~25%) porém com resultados significativos somente nos intervalos de 36 h e 48 h.

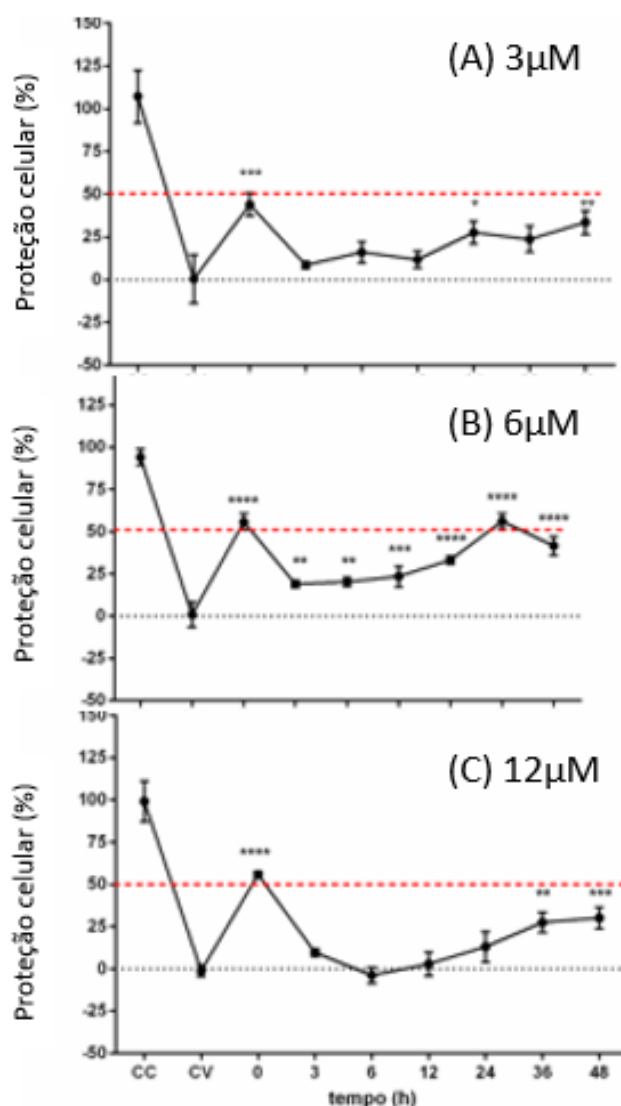


Figura 17. Avaliação do ensaio de Tempo de Adição do composto QPA nas concentrações de 3μM, 6μM, 12μM em diferentes intervalos de tempo (0-48hs). Os dados representam a média de um experimento realizado em triplicata. Os dados foram analisados com auxílio do software Graphpad Prism 6 e os valores expressam

média $\pm$ desvio padrão (One-way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni, * $p \leq 0.05$)

Segundo Douglas and Panis (2003), que avaliaram o efeito inibitório do composto trifenol VP-14637 (ViroPharma) contra o hRSV, por meio do ensaio de tempo de adição foi possível notar que o composto agiu como um inibidor de fusão do vírus, pois mostrou um grande aumento da viabilidade celular quando o composto foi adicionado na 0 h juntamente com o inóculo viral. Nossos resultados se assemelham aos de Douglas e colaboradores (2003), visto que a proteção celular (50%) só aparece no tempo 0, confirmando os resultados do ensaio virucida justificado pela hipótese em que há interação entre a molécula (QPA) e proteína F e que essa interação interfere na replicação do vírus.

A hipótese sugerida por nós para o retorno da proteção após 24 h de infecção se baseia no fato de que nas primeiras 24 h de infecção o vírus está replicando seu genoma, produzindo mRNA que será transcrito e traduzido em proteínas virais. Essas proteínas serão armazenadas temporariamente em corpúsculos de inclusão que serão transportadas para a membrana da célula (Mink et al., 1991; Cowton et al., 2006). Com base na literatura e pela análise dos nossos dados, sugerimos que no momento que o composto QPA é adicionado após 24 h de infecção e nos intervalos de 36 h e 48 h, as proteínas virais que já estão prontas para serem transportadas se tornam alvo do composto e esse transporte é afetado, e como consequência não há expressão das proteínas virais na superfície celular o que explicaria uma maior viabilidade celular no intervalo de 24 h, 36 h e 48 h.

Os resultados obtidos através dos ensaios de sal de MTT nos protocolos virucida e ensaio de adesão foram confirmados pela contagem do número de placas de lise em ensaio de redução de placa.

Inicialmente, a contagem das placas de lise foi realizada visualmente com auxílio de um negatoscópio. A placa de 24 poços foi posicionada sobre o negatoscópio e a contagem do número de placas de lises de cada

poço foi realizada para análise dos resultados. Através da contagem visual, foi possível notar que nos poços com tratamento com QPA havia uma gradual redução do número de placas de lise quando comparado ao grupo controle viral (vírus sem QPA). A contagem foi então realizada para os dois protocolos (virucida e adesão). Porém, houve dificuldades na contagem uma vez que o processo é trabalhoso e subjetivo. Com o objetivo de automatizar o processo de identificação e contagem de placas de lise, dependendo minimamente da intervenção humana, o Laboratório de Bioinformática-Unesp Campus de Assis, desenvolveu um algoritmo baseado em processamento de imagens e reconhecimento de padrões utilizando o software MATLAB[®] (MATrix LABoratory). A contagem automatizada nos garantiu um resultado padronizado, preciso e reproduzível.

A análise estatística do número de placas de lise demonstra que houve diferenças significativas em todas as concentrações testadas (1.5-12 μ M) quando comparadas ao controle viral, confirmando os dados obtidos anteriormente.

A ausência de estudos na literatura sobre ação antiviral do derivado Penta-acetilado de Quercetina, dificulta a comparação com nossos resultados. Demonstramos através de ensaio *in vitro* que a atividade antiviral de Quercetina Penta-acetilada (QPA) é promissora e o flavonoide se mostrou como um potencial candidato para o desenvolvimento de uma nova droga contra o hRSV, pois reduziu mais de 50% da infecção viral nos protocolos virucida e de pós-tratamento.

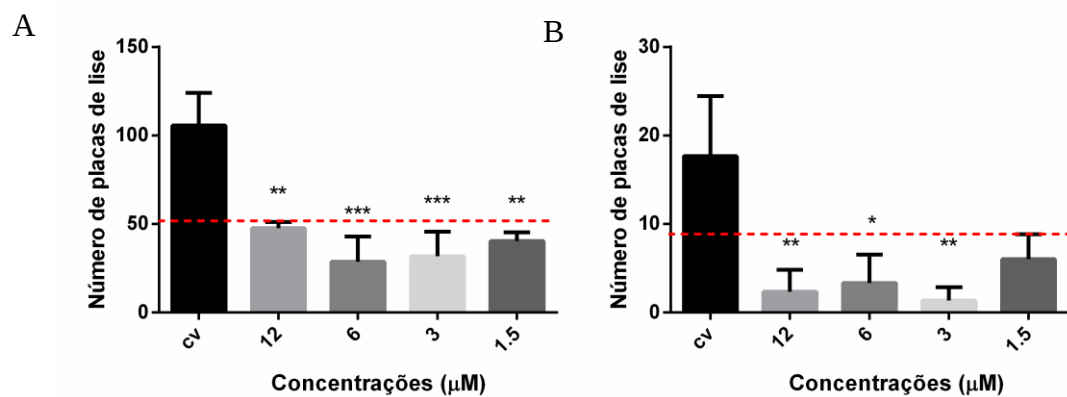


Figura 18. Contagem do número de Placas de lise. Virucida (A) e Adesão (B). A contagem foi realizada através do software MATLAB[®] (MATrix LABoratory). Os dados foram analisados com auxílio do software Graphpad Prism 6 e os valores expressam a média $\pm$ desvio padrão (One-way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni, * $p \leq 0.05$).

5. Conclusões

Em resumo, a conclusão geral do trabalho é que mudanças químicas na estrutura da molécula de Quercetina, através de acetilação, reduzem os efeitos citotóxicos e potencializam o efeito virucida da molécula. A QPA possui uma promissora atividade anti-hRSV por agir em protocolos virucida e de pós-tratamento, reduzindo o dano celular e a formação de sincícios causado pelo vírus. As interações entre glicoproteína F do vírus e a molécula penta-acetilada seria, ao menos parcialmente, responsáveis por tais efeitos.

Pontualmente, nossas conclusões foram:

- a) A QPA apresentou efeito citotóxico sobre células Hep-2 assumindo valor de $CC_{50} < 38.8 \mu M$;
- b) Os ensaios virucida e de pós-tratamento resultaram em um índice de seletividade, $25.8 \mu M$ e $12.9 \mu M$, respectivamente;
- c) As análises dos mecanismos antivirais (ensaio de adesão, internalização e tempo de adição) permitiram concluir que a QPA interfere no processo de adesão do vírus à célula a $37^{\circ}C$.

6. Referências Bibliográficas

ASENJO, A.; RODRÍGUEZ, L.; VILLANUEVA, N. Determination of phosphorylated residues from human respiratory syncytial virus P protein that are dynamically dephosphorylated by cellular phosphatases: A possible role for serine 54. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 4, p. 1109–1120, 2005.

AUJARD, Y.; FAUROUX, B. **Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in infants** *Respiratory Medicine*, 2002.

BAREL, M. et al. A novel receptor - Ligand pathway for entry of Francisella tularensis in monocyte-like THP-1 cells: Interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. **BMC Microbiology**, v. 8, 2008.

BARIK, S.; MCLEAN, T.; DUPUY, L. C. Phosphorylation of Ser232 directly regulates the transcriptional activity of the P protein of human respiratory syncytial virus: phosphorylation of Ser237 may play an accessory role. **Virology**, v. 213, n. 2, p. 405–412, 1995.

BARNARD, D. L. et al. Mode of inhibition of respiratory syncytial virus by a plant flavonoid, SP-303. **Chemotherapy**, v. 39, n. 3, p. 212–217, 1993.

BATONICK, M.; OOMENS, A. G. P.; WERTZ, G. W. Human respiratory syncytial virus glycoproteins are not required for apical targeting and release from polarized epithelial cells. **Journal of virology**, v. 82, n. 17, p. 8664–72, 2008.

BATTLES, M. B. et al. Molecular mechanism of respiratory syncytial virus fusion inhibitors. **Nat Chem Biol**, v. 12, p. 87–93, 2016.

BEHERA, A. K. et al. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 280, n. 1, p. 188–95, 2001.

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**, v. 96, n. 20, p. 11259–11264, 1999.

BLOUNT, R. E.; MORRIS, J. A.; SAVAGE, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 92, n. 3, p. 544–549, 1956.

BOHMWALD, K. et al. Human Respiratory Syncytial Virus: Infection and Pathology. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 37, n. 4, p. 522–537, 2016.

BORCHERS, A. T. et al. **Respiratory syncytial virus - A comprehensive review** *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 2013.

BOSSERT, B.; CONZELMANN, K.-K. Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. **Journal of virology**, v. 76, n. 9, p. 4287–93, 2002.

BOSSERT, B.; MAROZIN, S.; CONZELMANN, K.-K. Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. **Journal of virology**, v. 77, n. 16, p. 8661–8, 2003.

BOYCE, T. G. et al. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. **The Journal of pediatrics**, v. 137, n. 6, p. 865–870, 2000.

BUENO, S. M. et al. Host immunity during RSV pathogenesis. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1320–1329, 2008.

BUKREYEV, A.; YANG, L.; COLLINS, P. L. The Secreted G Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Antagonizes Antibody-Mediated Restriction of Replication Involving Macrophages and Complement. **Journal of Virology**, v. 86, n. 19, p. 10880–10884, 2012.

CALVO, C. et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 3, p. 268–272, 2008.

CHAPMAN, J. et al. RSV604, a novel inhibitor of respiratory syncytial virus replication. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3346–3353, 2007.

CHEN, Y. C. et al. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 537–548, 2001.

CHOI, H. J. et al. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3–4, p. 329–333, 2009.

COLLINS, P. L. et al. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 1, p. 81–85, 1996.

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

COWTON, V. M.; MCGIVERN, D. R.; FEARN, R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. **The Journal of general virology**, v. 87, n. Pt 7, p. 1805–21, 2006.

- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343–356, 2005.
- DANIHELOVÁ, M. et al. Antioxidant action and cytotoxicity on HeLa and NIH-3T3 cells of new quercetin derivatives. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 209–216, 2013.
- DEVINCENZO, J. P. et al. Oral GS-5806 Activity in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 8, p. 711–722, 2014.
- DÍAZ, J. G. et al. Cytotoxic activities of flavonoid glycoside acetates from *Consolida oliveriana*. **Planta Medica**, v. 74, n. 2, p. 171–174, 2008.
- DOMACHOWSKE, J. B.; ROSENBERG, H. F. **Respiratory syncytial virus infection: Immune response, immunopathogenesis, and treatment** *Clinical Microbiology Reviews*, 1999.
- DOUGLAS, J. L. et al. Inhibition of respiratory syncytial virus fusion by the small molecule VP-14637 via specific interactions with F protein. **J Virol.**, v. 77, n. 9, p. 5054–64, 2003.
- DOUGLAS KINGHORN, A. Pharmacognosy in the 21st century. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 135–48, 2001.
- DUDAS, R. A.; KARRON, R. A. Respiratory syncytial virus vaccines. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 430–9, 1998.
- EDNA, F. et al. Respiratory Syncytial Virus Infections during an Epidemic Period in Salvador, Brazil. Viral Antigenic Group Analysis and Description of Clinical and Epidemiological Aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 98, n. 6, p. 739–743, 2003.

FALSEY, A. R. et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 17, p. 1749–59, 2005.

FEARNS, R.; COLLINS, P. L.; PEEPLES, M. E. Functional analysis of the genomic and antigenomic promoters of human respiratory syncytial virus. **Journal of virology**, v. 74, n. 13, p. 6006–14, 2000.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. **Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids** Food and Chemical Toxicology, 1995.

GAN, S. W. et al. Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 17, p. 813–820, 2008.

GESKEY, J. M.; THOMAS, N. J.; BRUMMEL, G. L. Palivizumab: a review of its use in the protection of high risk infants against respiratory syncytial virus (RSV). **Biologics : targets & therapy**, v. 1, n. 1, p. 33–43, 2007.

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, n. 38, p. 12887–95, 2005.

GHILDYAL, R. et al. The respiratory syncytial virus matrix protein possesses a Crm1-mediated nuclear export mechanism. **Journal of virology**, v. 83, n. 11, p. 5353–62, 2009.

GONZALEZ, O. et al. The heat shock protein inhibitor quercetin attenuates hepatitis C virus production. **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1756–1764, 2009.

GUPTA, C. K. et al. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. **Vaccine**, v. 14, n. 15, p. 1417–1420, 1996.

HALL, C. B. et al. Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. **Infection and Immunity**, v. 33, n. 3, p. 779–783, 1981.

HALL, C. B. et al. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 163, n. 4, p. 693–698, 1991.

HORNSLETH, A.; LOLAND, L.; LARSEN, L. B. Cytokines and chemokines in respiratory secretion and severity of disease in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 21, n. 2, p. 163–170, 2001.

HUANG, K. et al. Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Motavizumab and Palivizumab Inhibit Fusion. **Journal of Virology**, v. 84, n. 16, p. 8132–8140, 2010.

JOHARI, J. et al. Antiviral activity of baicalein and quercetin against the Japanese encephalitis virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 16020–16045, 2012.

JUMAT, M. R. et al. Viperin protein expression inhibits the late stage of respiratory syncytial virus morphogenesis. **Antiviral Research**, v. 114, p. 11–20, 2015.

KAPIKIAN, A. Z. et al. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to Respiratory Syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. **American Journal of Epidemiology**, v. 89, n. 4, p. 405–421, 1969.

KIM, H. W. et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. **American Journal of Epidemiology**, v. 89, n. 4, p. 422–434, 1969.

KIM, J. Y.; CHANG, J. **In hot pursuit of the first vaccine against respiratory syncytial virus** *Yonsei Medical Journal*, 2016.

- KOHLI, E. et al. Comparison of the prevention of aflatoxin B1-induced genotoxicity by quercetin and quercetin pentaacetate. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 18, p. 2579–2582, 2002.
- KRUSAT, T.; STRECKERT, H. J. Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. **Archives of Virology**, v. 142, n. 6, p. 1247–1254, 1997.
- KURT-JONES, E. A. et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. **Nature Immunology**, v. 1, n. 5, p. 398–401, 2000.
- LAMBERT, L. et al. **Immunity to RSV in early-life** *Frontiers in Immunology*, 2014.
- LAY, M. K. et al. **Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response** *Microbes and Infection*, 2013.
- LI, D. et al. Association of Respiratory Syncytial Virus M Protein with Viral Nucleocapsids Is Mediated by the M2-1 Protein. **Journal of Virology**, v. 82, n. 17, p. 8863–8870, 2008.
- LILJEROOS, L. et al. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 11133–11138, 2013.
- LU, B. et al. The major phosphorylation sites of the respiratory syncytial virus phosphoprotein are dispensable for virus replication in vitro. **Journal of virology**, v. 76, n. 21, p. 10776–84, 2002.
- LYU, S.-Y.; RHIM, J.-Y.; PARK, W.-B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. **Archives of pharmacal research**, v. 28, n. 11, p. 1293–1301, 2005.

MARR, N.; TURVEY, S. E. Role of human TLR4 in respiratory syncytial virus-induced NF- κ B activation, viral entry and replication. **Innate Immunity**, v. 18, n. 6, p. 856–865, 2012.

MASTRANGELO, P.; HEGELE, R. G. RSV Fusion: Time for a new model. **Viruses**, v. 5, n. 3, p. 873–885, 2013.

MCKIMM-BRESCHKIN, J. L. A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus - Direct visualization of plaques without immunostaining. **Journal of Virological Methods**, v. 120, n. 1, p. 113–117, 2004.

MCLELLAN, J. S. et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. **Science**, v. 342, n. 6158, p. 592–598, 2013.

MEJÍAS, A.; RAMILO, O. Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants. **Biologics: Targets and Therapy**, v. 2, n. 3, p. 433–439, 2008.

MIDDLETON, E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 439, p. 175–182, 1998.

MITRA, R. et al. The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments. **Journal of Virology**, v. 86, n. 8, p. 4432–4443, 2012.

MOYES, J. et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus-associated acute lower respiratory tract infection hospitalizations among HIV-infected and HIV-uninfected South African children, 2010-2011. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. SUPPL. 3, 2013.

MUFSON, M. A. et al. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **The Journal of general virology**, v. 66 (Pt 10, n. November 1985, p. 2111–2124, 1985.

NAVAS, L. et al. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada. **The Journal of pediatrics**, v. 121, n. 3, p. 348–354, 1992.

RAJAN, D. et al. Response to Rhinovirus Infection by Human Airway Epithelial Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells in an In Vitro Two-Chamber Tissue Culture System. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

RASMUSSEN, L. et al. A High-Throughput Screening Strategy to Overcome Virus Instability. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 9, n. 2, p. 184–190, 2011.

RODRIGUEZ, R.; RAMILO, O. Respiratory syncytial virus: How, why and what to do. **Journal of Infection**, v. 68, n. SUPPL1, 2014.

SCHLENDER, J. et al. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. **Journal of virology**, v. 74, n. 18, p. 8234–8242, 2000.

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 [corrected]. **J Virol**, v. 78, n. 8, p. 4363–4369, 2004.

SPEHNER, D.; DRILLIEN, R.; HOWLEY, P. M. The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. **Virology**, v. 232, n. 2, p. 260–268, 1997.

STENSBALLE, L. G. et al. Respiratory syncytial virus neutralizing antibodies in cord blood, respiratory syncytial virus hospitalization, and recurrent wheeze. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 2, p. 398–403, 2009.

- TAWAR, R. G. et al. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1279–1283, 2009.
- TAYYARI, F. et al. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. **Nature Medicine**, v. 17, n. 9, p. 1132–1135, 2011.
- TENG, M. N.; COLLINS, P. L. Identification of the Respiratory Syncytial Virus Proteins Required for Formation and Passage of Helper-Dependent Infectious Particles. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 72, n. 7, p. 5707–5716, 1998.
- TIONG-YIP, C. L. et al. Characterization of a respiratory syncytial virus L protein inhibitor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3867–3873, 2014.
- VARGAS, J. E. et al. A network flow approach to predict protein targets and flavonoid backbones to treat respiratory syncytial virus infection. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- VENTRE, K.; RANDOLPH, A. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. **Cochrane database of systematic reviews (Online)**, n. 4, p. CD000181, 2004.
- VIEIRA, S. E. et al. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in Sao Paulo, Brazil. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 43, n. 3, p. 125–131, 2001.
- WANG, D.; BAYLISS, S.; MEADS, C. Palivizumab for immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in high-risk infants and young children: a systematic review and additional economic modelling of subgroup analyses. **Health Technology Assessment**, v. 15, n. 5, p. 1–124, 2011.

WANG, E. E.; LAW, B. J.; STEPHENS, D. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. **The Journal of pediatrics**, v. 126, n. 2, p. 212–9, 1995.

WELLIVER, R. C. The Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection: Friend or Foe? **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 34, n. 2, p. 163–173, 2008.

WRIGHT, M.; PIEDIMONTE, G. **Respiratory syncytial virus prevention and therapy: Past, present, and future** *Pediatric Pulmonology*, 2011.

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. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, n. 3, p. 652–665, 2007.

YU, K. L. et al. Respiratory syncytial virus fusion inhibitors. Part 3: Water-soluble benzimidazol-2-one derivatives with antiviral activity in vivo. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 5, p. 1115–1122, 2006.