

**BRUNO RAFAEL PEREIRA LOPES**

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

ASSIS

2016

**BRUNO RAFAEL PEREIRA LOPES**

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

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

Orientadora: Dra. Karina Alves de Toledo

ASSIS  
2016

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

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

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

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

CDD 615.72

BRUNO RAFAEL PEREIRA LOPES

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

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

Data da Aprovação: 16/03/2016

COMISSÃO EXAMINADORA



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



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



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

**Dedico essa dissertação à**

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

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

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

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

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

## RESUMO

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

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

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

### **ABSTRACT**

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

**Keywords: QUERCETIN. hRSV. ANTIVIRAL. ACETYLATED DERIVED.**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. hRSV

#### 1.1.1. Genoma e estrutura

O vírus sincicial respiratório humano é membro da família *Paramyxoviridae* do gênero *Pneumovirus*. Os membros desta família são caracterizados por serem vírus envelopados e possuírem uma fita de RNA genômico não segmentada de sentido negativo [1]. O genoma do hRSV tem aproximadamente 15,2kb distribuídos em 10 genes que codificam 11 proteínas devido a fase de leitura aberta no gene M2 [2].

Existe somente um sorotipo de hRSV subdividido em dois principais grupos antigênicos [3-5]. Dentre as particularidades de cada subtipo, as variações na proteína transmembrana G são utilizadas atualmente na determinação de qual subtipo um isolado de hRSV pertence, geralmente através de ensaios de neutralização *in vitro* e pela reatividade a anticorpos monoclonais [4, 6].

As proteínas virais podem ser classificadas em estruturais, quando constituem alguma estrutura da partícula viral infectante (vírion), ou não estruturais, quando não podem ser observadas na estrutura no vírion. Os primeiros genes do hRSV originam duas proteínas não estruturais denominadas NS1 e NS2 que, nos estágios iniciais da infecção, auxiliam na transcrição do restante do genoma (Figura 1) [7-9].

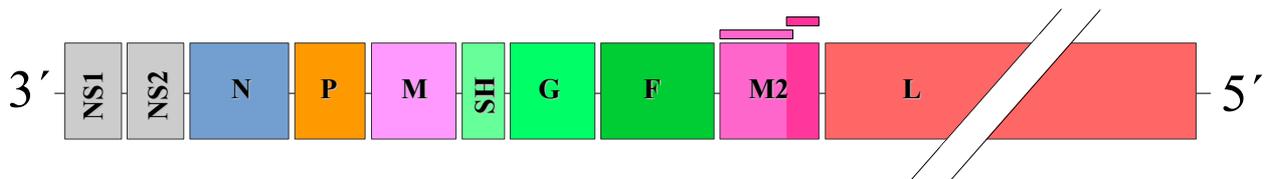


Figura 1: Esquema da distribuição dos genes do hRSV. Destacado em verde as três proteínas transmembrana que medeiam as etapas iniciais do processo de entrada do vírus à célula hospedeira.

A primeira proteína estrutural a ser transcrita (N) origina o capsômero que, quando agrupados ao redor do genoma, formarão o capsídeo. No hRSV a associação do capsídeo ao genoma forma um complexo de simetria helicoidal conhecido como nucleocapsídeo, que confere estabilidade e resistência as RNAses, além de proteger o vírus da produção de interferons pela célula hospedeira [7].

A fosfoproteína P atua como uma chaperona, auxiliando outras proteínas virais a atingirem a conformação terciária correta, além de aumentar a especificidade do encapsulamento do RNA viral, impedindo que a proteína N se ligue aos RNA's celulares [10].

O envelope viral é constituído majoritariamente pela proteína M que, nos estágios iniciais da infecção, pode atuar inibindo a transcrição das moléculas da célula hospedeira, priorizando a transcrição das moléculas virais. A proteína M desempenha papel crucial no brotamento da partícula viral, interagindo com o complexo ribonucleoprotéico (RNP) facilitando a montagem e inibindo atividade transcricional do nucleocapsídeo antes da encapsulação [11, 12].

A menor proteína estrutural (SH) ainda não tem função claramente definida. Alguns trabalhos indicam que a proteína SH atua em conjunto com a proteína G melhorando a atividade da proteína F [13]. Outros estudos suscitam que a proteína SH pode inibir a apoptose em diferentes linhagem celulares de mamíferos pelo bloqueio do TNF- $\alpha$  mediado pela sinalização apoptótica ou que a proteína SH altere a permeabilidade da membrana [14].

A glicoproteína G é pouco conservada dentre os subtipos de hRSV, ela se liga a um receptor celular desconhecido, aderindo o vírion à membrana da célula hospedeira, dando início a etapa de internalização [15].

A proteína transmembrana mais estudada é a proteína F, responsável pela fusão do envelope viral à membrana citoplasmática, liberando o nucleocapsídeo no citosol [15]. A proteína F apresenta estrutura muito semelhante entre os *Pneumovirus* o que a torna um alvo interessante para o desenvolvimento de vacinas e drogas antivirais [16]. Trabalhos realizados com mutantes deficientes em proteína G e SH mostram que a proteína F é a única proteína transmembrana essencial a infecção do vírion *in vitro* [17-19].

Devido a uma fase de leitura aberta o gene M2 codifica duas proteínas M2-1 e M2-2. A proteína M2-1 promove a transcrição dos mRNA's virais prevenindo a parada precoce da transcrição por um mecanismo não totalmente descrito [20]. Acredita-se que a proteína M2-1 interaja com o mRNA em formação estabilizando o complexo de transcrição (RNP) ou que, a M2-1 melhore a atividade da polimerase aumentando sua afinidade pelo RNA genômico [21].

O balanço entre a transcrição e replicação é mediado pela proteína M2-2, que atua em conjunto com as proteínas não estruturais (NS1 e NS2) principalmente nos estágios finais da infecção auxiliando na etapa de montagem do vírion [2].

A maior proteína viral é a proteína L, com cerca de 250kDa ela apresenta seis regiões conservadas entre a família dos vírus de RNA com polaridade negativa de fita simples não segmentados, o que a torna um alvo promissor para as pesquisas de compostos com atividade antiviral [22]. A proteína L atua como uma RNA-polimerase-RNA-dependente auxiliando na formação da estrutura do *cap* e no processo de poliadenilação [23, 24].

Os membros da família *Paramyxoviridae* geralmente são esféricos e apresentam bicamada lipídica herdada da célula do hospedeiro durante o processo de replicação. O tamanho do vírion pode variar de 120 a 350nm entretanto, dados de microscopia de força atômica sugerem que o diâmetro do vírion do hRSV seja de 150 a 200nm [25].

As glicoproteínas são ligadas ao envelope viral e se estendem através da bicamada lípica formando picos superficiais de 8 a 12nm [7]. No interior do envelope as proteínas M2-1 e M2-2 ficam dispersas enquanto que as demais proteínas (N, P e L) associam-se ao RNA formando o complexo RNP (Figura 2).

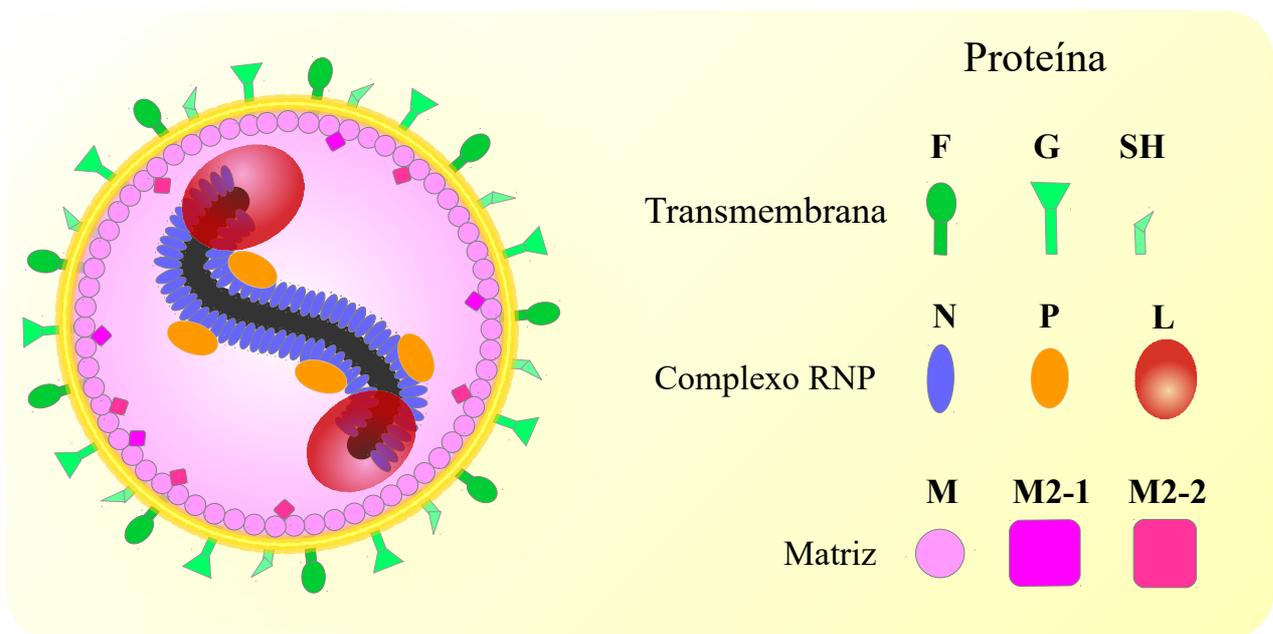


Figura. 2: Representação esquemática da estrutura do hRSV.

### 1.1.2. Ciclo replicativo

Embora o mecanismo detalhado de infecção do hRSV não seja totalmente descrito, os paramixovírus apresentam um ciclo replicativo que compreende basicamente as mesmas etapas.

O vírus adsorve nas proteínas da membrana da célula hospedeira e em seguida a proteína G se liga a um receptor celular não conhecido aderindo o vírion e estabilizando sua posição. Existem trabalhos que apontam o TRL4 como um provável receptor para a proteína G [26]. Um estudo recente descreveu uma colocalização entre vírions aderidos e a presença superficial da nucleolina na membrana celular, entretanto, isoladamente as

proteínas não interagiram [27]. Após a adesão a proteína F é clivada por uma protease celular e torna-se ativa, promovendo a fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática, liberando o complexo RNP e as proteínas da matriz no citosol [1].

Ao atravessar a membrana celular as proteínas virais iniciam a transcrição dos mRNA's e do antigenoma. Os mRNA's recém-transcritos serão traduzidos em novas proteínas virais pelo maquinário celular e o antigenoma será transcrito novamente dando origem a uma cópia do genoma, ampliando o número de genomas disponíveis para a transcrição. O ciclo de transcrição/tradução permanecerá ativo durante todo o curso da infecção, amplificando o número de proteínas virais no citosol, formando os corpúsculos de inclusão [28].

As proteínas M2-1, M2-2, NS1 e 2 regulam a atividade do complexo RNP estabelecendo um equilíbrio entre a produção de proteínas virais e da montagem e brotamento dos vírions [8]. A montagem do envelope viral acontece em regiões específicas da superfície celular onde a proteína M interage com o complexo RNP e as proteínas SH, G e F, encapsulando o RNP e herdando uma bicamada lipídica da célula hospedeira durante o processo de brotamento [29].

### 1.1.3. Patologia

Geralmente o hRSV entra pelas narinas e infecta as células epiteliais da fossa nasal, iniciando sua replicação no epitélio nasofaríngeo onde induz a produção de uma série de citocinas (IL-8, IL10, IL12 e TNF- $\alpha$ ) que promovem o influxo leucocitário. A intensa replicação viral culmina na formação de sincícios (massas multinucleadas de citoplasma formada pela fusão de células) levando a disfunção e necrose tecidual [26, 30].

A maioria das infecções por hRSV se restringem ao trato respiratório superior e tem duração média de até 8 dias. Quando o vírus atinge o trato respiratório inferior pode

causar pneumonia e/ou bronquiolite severa, bloqueando as vias respiratórias pela produção excessiva de muco, edema e debris celulares. No trato respiratório inferior a infecção pode durar meses, a respiração torna-se ofegante, difícil e dolorosa, agravando o quadro clínico do paciente que pode vir a óbito por falência respiratória [31].

Os principais sintomas relatados em crianças infectadas por hRSV são rinorreia, febre baixa, prostração, tosse e respiração ofegante. Em adultos infectados são relatados faringite, rinorreia, fadiga, tosse, cefaleia, mal-estar e febre.

#### 1.1.4. Epidemiologia

As infecções com o hRSV são comuns, estima-se que praticamente todas as crianças com até 2 anos de idade tenha sido infectada pelo menos uma vez. O hRSV infecta também adultos de todas as idades, principalmente idosos e indivíduos imunocomprometidos. Na maioria dos casos, o indivíduo imunocompetente consegue resolver a infecção sem maiores complicações ou sequelas em menos de uma semana [32].

O hRSV geralmente infecta através do contato direto dos aerossóis expelidos durante a tosse ou expiro de um indivíduo contaminado, com as mucosas nasais, bucais e oculares de outras pessoas [33]. Crianças com até 2 anos de idade ou adultos com hábitos onicofágicos são especialmente susceptíveis ao contágio de diversas doenças, incluindo o hRSV, devido ao constante contato das mãos com a mucosa bucal.

Os dois subtipos de hRSV tem distribuição mundial e são altamente contagiosos, sendo comum encontrar um indivíduo concomitantemente infectado pelo subtipo A e B. Vários estudos relacionam as formas mais graves de infecção respiratória aguda (IRA) ao subtipo A. As infecções por hRSV ocorrem o ano todo, entretanto, é nos meses de inverno que costumam ocorrer os surtos epidêmicos e o maior número de casos graves que

requerem hospitalização [34].

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que todo ano ocorram mais de 64 milhões de novos casos de infecções por hRSV ao redor do mundo e cerca de 5% deles requerem hospitalização, resultando em mais de 150 mil mortes anuais [34].

#### 1.1.5. Tratamento

Não existe tratamento específico para a doença causada pelo hRSV. Medidas de alívio dos sintomas, suporte ventilatório e manutenção do estado geral, quando necessárias, são indicadas. O tratamento atual recomendado pelo FDA (*“Food and Drug Administration”*) consiste na administração conjunta de Palivizumab (um anticorpo monoclonal que tem como alvo a proteína F do hRSV), Ribavirina (um análogo de nucleosídeo) [35] e outras drogas que combatem os principais sintomas da doença [33, 36]. Entretanto a eficácia desse tratamento depende do diagnóstico precoce da infecção por hRSV, o que geralmente não é possível devido à similaridade sintomática com outras infecções, custo do tratamento e risco mutagênico do paciente [37, 38].

As proteínas G e F tem sido alvo de muitos estudos que visam neutralizar a infecção viral pela inativação dessas proteínas utilizando anticorpos específicos [39, 40]. Esses anticorpos se ligariam ao sítio ativo da proteína viral, reduzindo o contato das proteínas G e F com as proteínas da membrana celular, dificultando e/ou impedindo a adesão do hRSV à parede celular. Atualmente os dois principais anticorpos utilizados para a prevenção de infecções por hRSV são o RespiGam e o Palivizumab (Synagis). O RespiGam é um anticorpo policlonal obtido de humanos saudáveis e resistentes ao hRSV e obteve sucesso na prevenção de infecções causadas por hRSV em crianças pertencentes ao grupo de risco (imunocomprometidos, imunossuprimidos e/ou com

doença cardíaca congênita) [41-43]. O anticorpo monoclonal Palivizumab é um neutralizante específico para a proteína F, que oferece uma proteção efetiva superior ao RespiGam, e que vem sendo usado amplamente para proteger de forma passiva crianças pertencentes ao grupo de risco, evitando o aparecimento de doenças mais severas [32, 38, 44]. O atual desafio é produzir uma vacina eficiente e de ampla proteção, capaz de induzir a imunidade para os dois subtipos de hRSV (A e B), principalmente em idosos, crianças e recém-nascidos onde o índice de reinfecção é alto devido à imaturidade do sistema imunológico nestes indivíduos.

A amplificação do espectro de estudos para encontrar novos compostos e/ou estratégias de combate ao hRSV é fundamental para reduzir as infecções e controlar a doença, principalmente em locais com grande fluxo de indivíduos suscetíveis, tais como hospitais, creches e escolas primárias.

## **1.2. Quercetina**

Produtos de origem natural têm despontado como uma relevante fonte de insumos para pesquisa, assumindo papel de destaque em áreas como agricultura e farmacologia. Os compostos de origem natural são fonte única de uma ampla gama de compostos, geralmente oriundos do metabolismo secundário, como os alcaloides, flavonoides e outros, com grande potencial medicinal [23-25]. Os flavonoides são compostos polifenólicos sintetizados pelo metabolismo secundário vegetal que compartilham semelhante estrutura química (esqueleto de difenil propano com dois anéis benzênicos).

Os flavonoides tipo Quercetina (Figura 3) são a classe mais abundante entre flavonoides conhecidos. Podem ser encontrados em uma variedade de alimentos comuns como: maçãs, uvas, tomates, cebolas, chás etc [28]. A Quercetina corresponde cerca de 90% da ingestão humana diária de flavonoides (50-500mg/dia) [29, 30].

A literatura trata sobre o vasto potencial benéfico da Quercetina. Estudos *in vitro* descrevem propriedades antioxidante, hepatoprotetora, antitumoral, antiinflamatória, nefroprotetoras, imunomodulatória, anti-histamínica, regulatória da pressão arterial, antifibriogênica, gastroprotetiva etc [23]. A Quercetina possui atividade antimicrobiana contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Micrococcus luteus*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis* [31-33].

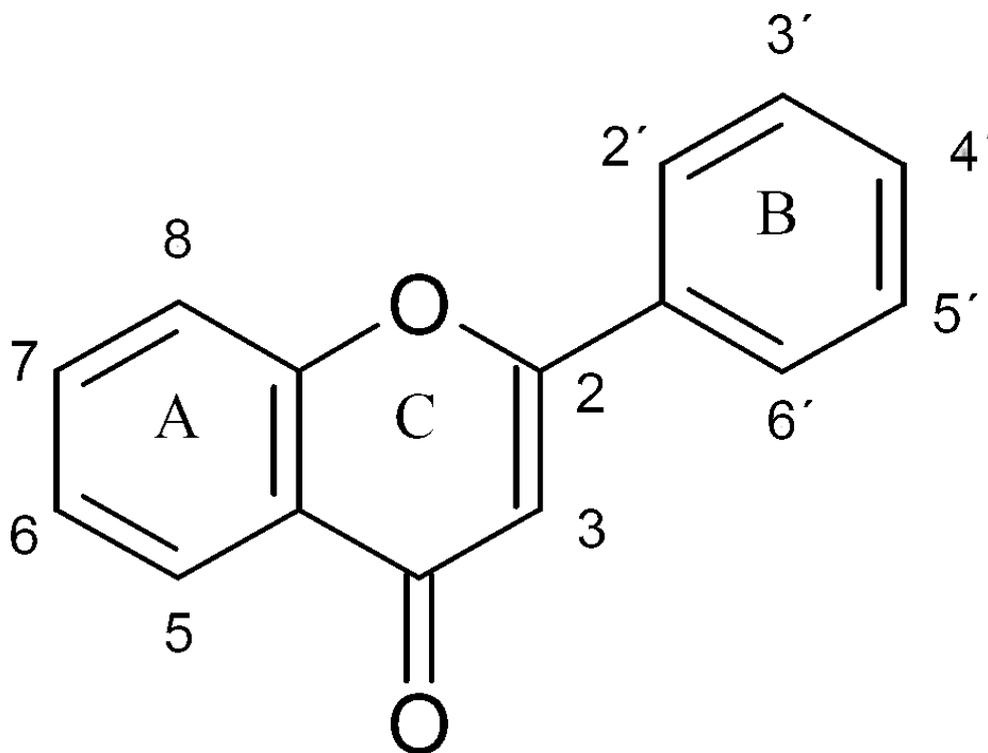


Figura. 3: Estrutura básica dos flavonoides. A Quercetina possui radical -OH nas posições 3,3',4',5,6.

A Quercetina apresenta também atividade antiviral contra herpes simplex tipo 1, parainfluenza tipo 3, a transcriptase reversa do HIV e outros retrovírus [34, 35]. Sua atividade antiviral está principalmente relacionada à capacidade desse composto em se ligar à glicoproteínas do envelope ou ao capsídeo viral, interferindo na ligação e

penetração do vírus na célula [23]. *In vitro* a Quercetina apresenta interessante efeito anti-hRSV Kaul et al. (1985) registrou em células infectadas um efeito anti-hRSV dose dependente da Quercetina, capaz de reduzir a as placas de lise em células HEp-2 inibindo a replicação viral.

### 1.3. HIPÓTESE DO TRABALHO

As infecções do trato respiratório são as formas de infecção mais comuns que afetam o homem e, dentre essas, predominam as de causa viral. Os vírus também podem acometer o trato respiratório inferior, causando bronquiolite, bronquite e pneumonia. O vírus respiratório sincicial humano (hRSV) é uma das principais causas de infecções do trato respiratório inferior em recém-nascidos e crianças. Isto é especialmente verdadeiro para os grupos de alto risco, incluindo crianças com doença cardíaca congênita e pacientes imunodeprimidos, onde a infecção por hRSV provoca uma mortalidade severa. Estima-se que a infecção respiratória aguda por hRSV causou cerca de 66.000-199.000 mortes de crianças com menos de cinco anos de idade em todo o mundo no ano de 5 2013). A imunoproliferação com um anticorpo neutralizante hRSV (palivizumabe) confere proteção substancial contra doenças por hRSV, porém nenhuma vacina licenciada está disponível atualmente. Assim, existe uma necessidade no desenvolvimento de vacinas e terapêuticas eficazes e seguras. Durante os últimos anos a pesquisa de novos fármacos antivirais passou por grandes avanços, com a descoberta de novos alvos moleculares e com o desenvolvimento da síntese orgânica, o que tem resultado em substâncias bioativas mais eficazes e/ou menos tóxicas, que podem ser utilizadas como modelos de novos fármacos. Estudos anteriores mostraram inibição do hRSV por vários compostos [36-39].

Estudos em andamento sob a coordenação da Dra. Fátima Pereira de Souza

(IBILCE-UNESP) sugerem que a Quercetina e a Morina apresentam potencial de interação com proteínas do vírus hRSV, tais como, proteína G, proteína NS1, NS2, M2-1 e M2-2. Neste contexto, os flavonoides por apresentarem um potencial candidato para a interação com estas proteínas alvo, estão diretamente relacionados à interação, bloqueio do sistema imunológico e replicação viral.

A Quercetina (3,3',4',5,6-Pentahidroxi-flavona) é o principal flavonoide presente na dieta humana. Várias propriedades terapêuticas da Quercetina, têm sido estudadas nas últimas décadas, dentre elas, 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 [35]. Kaul e colaboradores (1985) demonstraram que Quercetina possui ação antiviral sob o vírus hRSV por apresentar atividade virucida e por inibir sua replicação em células infectadas [34].

A presente proposta tem por objetivo ampliar os estudos realizados por Kaul e seus colaboradores de forma a respondermos questões ainda não investigadas como:

1. Qual o índice de seletividade para Quercetina em relação ao vírus hRSV? Algumas substâncias apresentam intensa atividade antiviral, porém, exercem concomitantemente efeito citotóxico. O índice de seletividade (IS) indica o quão promissor é a atividade antiviral de determinado composto, pela razão entre dois outros índices (CC50 – efeito citotóxico e CE50 – ação antiviral). Preconiza-se que compostos que apresentem  $IS \geq 4$  possuem atividade antiviral promissora.
2. Em qual(is) fase(s) do ciclo viral a Quercetina atua como composto antiviral? A determinação de qual(is) fase(s) do ciclo viral é(são) afetado(s) pela Quercetina pode auxiliar numa melhor estratégia de intervenção farmacológica e no

desenvolvimento de tratamentos mais efetivos.

3. Quercetinas derivadas podem apresentar índice de seletividade melhor quando comparado à Quercetina comercial? O uso de moléculas derivadas direciona o desenho de novas drogas que possam apresentar uma melhor atividade antiviral associada a um menor efeito citopático e/ou efeitos colaterais, além de menor custo.

#### **1.4. OBJETIVOS**

Objetivo Geral: Avaliar a potencial atividade anti-hRSV da Quercetina comercial e seus derivados.

Objetivos Específicos:

1. Analisar a citotoxicidade da Quercetina comercial sob células HEp-2 empregando a técnica de viabilidade celular por ensaio de MTT;
2. Determinar o índice de seletividade da Quercetina comercial em relação ao hRSV nos protocolos de pré-tratamento, virucida e pós-tratamento;
3. Analisar a citotoxicidade dos derivados acetilados Q1 e Q2 sob células HEp-2 empregando a técnica de viabilidade celular por ensaio de MTT;
4. Determinar o índice de seletividade dos derivados acetilados Q1 e Q2 em relação ao hRSV nos protocolos de pré-tratamento, virucida e pós-tratamento

## 2. ARTIGO

Versão preliminar do manuscrito seguindo as instruções da Revista BMC Microbiology

(<http://www.biomedcentral.com/bmcmicrobiol/authors/instructions/researcharticle>)

### **AValiação DA ATIVIDADE ANTI-hRSV DA QUERCETINA E SEUS DERIVADOS ACETILADOS**

Bruno Rafael Pereira Lopes<sup>a\*</sup>, Mirian Feliciano da Costa<sup>a</sup>, Tiago Francisco da Silva<sup>a</sup>,  
Amanda de Genova Ribeiro<sup>a</sup>, Fátima Pereira de Souza<sup>b</sup>, Karina Alves Toledo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista – UNESP (FCL-Assis), Brasil; <sup>b</sup> Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista – UNESP (IBILCE, São José do Rio Preto), Brasil

- *Autor Correspondente:* Bruno Rafael Pereira Lopes, Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900, Assis/SP, Brasil. Tel: + 55-18-3302-5848; *E-mail:* [brunorp@hotmail.com](mailto:brunorp@hotmail.com)

E-mail dos autores:

Bruno Rafael Pereira Lopes – [brunorp@hotmail.com](mailto:brunorp@hotmail.com)

Mirian Feliciano da Costa – [mirianfc@gmail.com](mailto:mirianfc@gmail.com)

Tiago Francisco da Silva – [titto.13.ax@gmail.com](mailto:titto.13.ax@gmail.com)

Amanda de Genova Ribeiro – [amandagenova@hotmail.com](mailto:amandagenova@hotmail.com)

Fátima Pereira de Souza – [fatyssouza@gmail.com](mailto:fatyssouza@gmail.com)

Karina Alves Toledo – [karinafcla@gmail.com](mailto:karinafcla@gmail.com)

## 2.1. RESUMO

**Introdução:** 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 todo ano. Dentre os agentes etiológicos destas infecções, o vírus sincicial respiratório (hRSV) é a principal causa de internações infantis em países desenvolvidos. Os casos de bronquiolite, pneumonia e infecções pulmonares obstrutivas crônicas em pessoas de todas as idades, principalmente crianças e idosos se agravam pela falta de drogas específicas e de vacinas anti-hRSV. Estudos preliminares indicaram efeito anti-hRSV do flavonoide Quercetina sem avançar na descrição desta atividade. O objetivo deste trabalho foi estabelecer o índice de seletividade (IS) para Quercetina em protocolos antivirais para hRSV e aumentar este índice através da síntese e teste de derivados acetilados. **Resultados:** A análise de viabilidade celular através da adição do sal de MTT determinou os valores de CC50 para Quercetina na presença/ausência do vermelho de fenol (85 e 11,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Dentre as condições testadas, Quercetina apresentou atividade virucida (16-30% de proteção celular) sem apresentar efeitos no pré ou pós-tratamentos. Os valores de CC50 dos compostos derivados Q1 e Q2 foram 37,1  $\mu\text{M}$  e 53,15  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O composto Q1 apresentou atividade anti-hRSV nos protocolos virucida e pós-tratamento (60-90%; 4-8  $\mu\text{M}$ ). O composto Q2 não apresentou atividade anti-hRSV relevante em nenhuma das condições testadas. A proteção celular apresentada pela Quercetina não possibilitou o cálculo de IS (CC50/CE50) o que nos sugere que este composto não seja um promissor agente anti-hRSV. O Índice de Seletividade calculado para o composto Q1 nos protocolos virucida e pós-tratamento foi de 9,27. **Conclusões:** O conjunto de resultados obtidos por nós apresenta menor citotoxicidade e melhor performance anti-hRSV do composto Q1 em relação à Quercetina comercial. Estes dados nos estimulam a dar continuidade aos estudos do composto Q1

com o intuito de melhorarmos sua atividade antiviral e assim propormos um novo composto que seja efetivos na prevenção e/ou tratamento das infecções por hRSV.

**Palavras-chave:** hRSV, Quercetina, antiviral, derivado acetilado

## 2.2. INTRODUÇÃO

O vírus Sincicial Respiratório (hRSV) está relacionado a milhões de casos de internações graves e morte de crianças e idosos no mundo todo devido a infecções no trato respiratório [1, 2]. Praticamente todas crianças com até 2 anos de idade são infectadas pelo vírus ao menos uma vez e, apesar de décadas de pesquisa, não existem vacinas e as estratégias terapêuticas existentes têm pouca eficácia e/ou uso restrito, principalmente quando a infecção atinge o trato respiratório inferior [3]. Novos compostos de origem natural e sintética (alcaloides, esteroides, flavonoides) têm sido estudados intuindo encontrar agentes antivirais eficazes e com efeitos colaterais reduzidos [4]. A Quercetina (3,3',4',5,6-Pentahidroxiflavona) é um flavonoide que apresenta propriedades anti-inflamatória, antioxidante, anti-câncer, efeitos antianafilaxia e contra o envelhecimento [5, 6]. Estudos preliminares demonstraram que a Quercetina possui ação virucida sobre o hRSV, além de inibir sua replicação [7]. No entanto, não se tem conhecimento do quão promissora é a atividade antiviral de Quercetina sobre o vírus hRSV e se a eficácia desta atividade poderia ser melhorada através de mudanças em sua estrutura química. Assim, os objetivos deste trabalho foram compreender a ação da Quercetina sobre as fases do ciclo replicativo do hRSV e realizar mudanças em sua estrutura química que pudesse melhorar sua atividade anti-hRSV. Para tanto, Quercetina e seus derivados acetilados foram incubados em células permissivas à infecção por hRSV (HEp-2) em diferentes protocolos de pré- e pós-tratamento e virucida. A proteção celular foi avaliada por ensaios de MTT. Em nossos ensaios a Quercetina apresentou sutil atividade anti-hRSV, bem como o derivado Q2. O derivado Q1 apresentou maior valor de CC50 e efeito protetivo em dois protocolos (virucida e pós-tratamento). O desenvolvimento deste projeto poderá auxiliar na busca por compostos efetivos na prevenção e/ou tratamento das infecções por hRSV.

### 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a atividade anti-hRSV da Quercetina tomamos por parâmetro o estudo de Kaul e seus colaboradores (1985). Iniciamos nossos ensaios pela determinação da CC50 através da análise do efeito citotóxico da Quercetina em células HEP-2 (Figura 1; equação 1), pois esse importante parâmetro não foi determinado no estudo anterior. A obtenção do valor da CC50 é indispensável no cálculo do Índice de Seletividade de um composto (equação 2). Este índice indica o quão promissora é a atividade antiviral da molécula-teste. Testes piloto foram realizados para estabelecer a quantidade ideal de células a serem utilizadas nos experimentos. Determinamos a quantidade de  $5 \times 10^4$  células por poço em uma placa de 96 poços, pois nesta condição as células atingiam confluência em 24 horas sem a formação de sobrecamadas além de gerar boa visualização dos resultados após o teste colorimétrico com sal de MTT, ou seja, densidade óptica acima de 0,4 unidades) [8].

Optamos pelo uso em paralelo de duas formulações do meio de cultivo DMEM F12, uma com vermelho de fenol (8,63 mg/L) e outra sem o composto. O vermelho de fenol é um reagente indicador de pH que é acrescido à maioria dos meios de cultura celular pelas empresas fabricantes. A descrição dos experimentos realizados por Kaul e seus colaboradores não especifica se o meio de cultivo utilizado continha ou não o vermelho de fenol. Esta informação se faz necessária uma vez que o composto em questão e os flavonoides podem interagir entre si, já que são moléculas densamente deslocalizadas, o que pode afetar as propriedades biológicas do composto teste (Figura 2).

O intervalo de concentrações de Quercetina testadas para a determinação da CC50 foram baseadas em estudos prévios [9-11]. Utilizou-se concentrações decrescentes partindo de 1024  $\mu\text{M}$  mantendo diluição seriada na base 2 em meio de cultivo acrescido ou não de vermelho de fenol, até o valor mínimo de 0,5  $\mu\text{M}$ . Após 3 dias de cultivo, o

experimento foi revelado através da adição do sal de MTT para determinação da viabilidade celular à 560 nm em um leitor de ELISA (Figura 1). Para apresentar um bom Índice de Seletividade os valores da CC50 deve ser maiores que os valores da CE50.

Através dos resultados obtidos de cinco experimentos independentes realizados em triplicata, foi possível determinar a equação da curva através de regressão não linear sigmoidal de quatro parâmetros [12]. Os valores da CC50 obtidos para a Quercetina foram de 85 e 11,2  $\mu\text{M}$ , dependendo da presença ou não do vermelho de fenol no meio de cultivo, respectivamente (Figura 3). Nestas concentrações, a Quercetina se mostrou tóxica para 50% das células em cultivo.

Os valores de CC50 obtidos neste trabalho foram muito menores daquele determinado por Kaul e seus colaboradores que relatavam o surgimento de efeitos citotóxicos somente acima dos 200  $\mu\text{M}$ . Ambos estudos foram realizados com a mesma linhagem celular e o mesmo diluente para Quercetina (DMSO). A Quercetina diluída foi aliquotada e mantida protegida da luz à  $-80^{\circ}\text{C}$  pelo período máximo de 1 mês. Em nossos resultados, a presença do vermelho de fenol no meio de cultivo durante a determinação da CC50 resultou numa redução da citotoxicidade celular da ordem de 8 vezes (8x).

A disparidade entre nossos resultados poderia ainda ser decorrência do uso de métodos ou protocolos diferentes para a avaliação da citotoxicidade porém, esta comparação fica prejudicada à medida que os primeiros autores não especificam tais parâmetros. Com o intuito de aprofundarmos a comparação entre os dois estudos, os ensaios envolvendo Quercetina foram continuados sempre mantendo um paralelo entre a presença ou não do vermelho de fenol.

Nos ensaios para avaliação da atividade anti-hRSV da Quercetina, utilizamos duas concentrações de MOI's (0,1 e 0,5; *Multiplicity of infection*). Desta maneira, a falta de efeito antiviral dos compostos não poderia ser atribuída a um alto inóculo viral.

Os estoques virais foram preparados em meio de cultivo DMEM-F12 livre de vermelho de fenol e acrescido de 2% de soro fetal bovino (SFB). A titulação dos estoques virais foi realizada através do ensaio de redução de placas (Figura 4) e confirmada pelo cálculo da TCID<sub>50</sub> [13, 14].

Em todos os ensaios foram avaliadas células não foram infectadas e não tratadas (controle positivo) e células controle infectadas com hRSV (MOI 0,1 ou 0,5) e não tratadas (controle negativo). Após 2-3 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. Células infectadas com hRSV (controle viral) apresentaram morfologia alongada, redução no número de células aderidas e presença de sincícios (Figura 5).

Determinamos a CC50 da ribavirina seguindo o mesmo protocolo de pós-tratamento utilizado para a quercetina testando as concentrações de 16-64 µM (*dados não mostrados*). A ribavirina apresentou CC50 semelhante ao descrito na literatura, oferecendo efeito protetivo em 50% das células na concentração de 38 µM [13, 15].

Os ensaios para a avaliação anti-hRSV da Quercetina foram realizados seguindo protocolos de pré-tratamento, virucida e pós-tratamento (Figura 6). As concentrações de Quercetina usadas foram sempre aquelas abaixo do valor de CC50, ou seja, menor que 85 µM na presença do vermelho de fenol e menor que 11,4 µM na ausência do composto indicador de pH (Figura 3).

Nos ensaios de pré-tratamento (Figura 7a, coluna da esquerda), os dados quantitativos do sal de MTT indicaram total ausência de efeito protetivo em todas condições testadas, ou seja, diferentes concentrações de Quercetina, diferentes MOI (0,1 e 0,5) ou presença/ausência de vermelho de fenol. A porcentagem de proteção celular (inibição viral) foi calculada considerando células infectadas com hRSV e não tratadas (correspondente a 0% de proteção celular) e células não infectadas (correspondente a 100% de proteção celular) (equação 3).

Os ensaios que testaram a ação virucida da Quercetina demonstraram algum efeito apenas quando o MOI mínimo foi testado (0,1) na presença de meio de cultivo livre de vermelho de fenol (Figura 7 a, coluna central). Nesta condição, as concentrações de 2,5-10  $\mu$ M apresentaram proteção média em 16-30% das células. Nos testes com MOI 0,5 o hRSV não foi inibido pela Quercetina, sugerindo que a Quercetina possa apresentar atividade anti-hRSV somente na presença de inóculos menores. Esta observação nos induz a supor que no trabalho desenvolvido por Kaul (1985) o MOI utilizado seja ainda menor que 0,1 e que os ensaios tenham sido realizados em meio de cultivo livre de vermelho de fenol. Este parâmetro ajudaria a explicar a atividade virucida da Quercetina relatada pelos pesquisadores. Nas demais condições testadas no protocolo virucida a Quercetina não apresentou nenhum efeito protetor.

A ausência de efeito anti-hRSV da Quercetina foi também observada nos ensaios de pós-tratamento (Figura 7, coluna da direita) nas condições testadas, ou seja, diferentes concentrações de Quercetina, diferentes MOI (0,1 e 0,5) ou presença/ausência de vermelho de fenol. Nenhuma das concentrações de Quercetina testadas apresentaram proteção celular mínima de 50% que favorecesse a determinação dos valores de CE50.

Os resultados apresentados por nós indicam que a molécula de Quercetina não se apresenta como um promissor composto anti-hRSV. Kaul e seus colaboradores (1985)

descrevem uma ação virucida e de pós-tratamento para esta molécula. A falta de efeito no pré-tratamento foi observada em ambos os trabalhos mesmo ao avaliar períodos longos de incubação (2-18h). Algumas diferenças metodológicas podem ajudar a explicar tais divergências. Primeiramente, os métodos de avaliação da proteção celular diferem já que nós usamos ensaios de adição de MTT e Kaul usou ensaio de redução de placa. A adição do sal de MTT quantifica indiretamente o número de células viáveis enquanto que a redução de placa permite quantificar o número de partículas que obtiveram sucesso na infecção. Além disso, Kaul e seus colaboradores não relatam o MOI utilizado por eles em seus ensaios. O uso de MOI superiores não resultou em proteção celular, sugerindo que no referido trabalho foi usado um número menor de partículas virais, acarretando assim num melhor efeito anti-hRSV da Quercetina.

Em concentrações menores que 11,2  $\mu\text{M}$ , Kaul e seus colaboradores apresentam índices de proteção celular na ordem de 30% no protocolo virucida enquanto que nas concentrações próximas dos 85  $\mu\text{M}$ , relatam proteção de 70% nos testes virucida e 20% de proteção nos ensaios de pós-tratamento. Em concentrações mais altas (até 200  $\mu\text{M}$ ), descrevem níveis de proteção em ambos tratamentos com valores próximos a 100%. Tais concentrações não foram testadas por nós já que excedem os valores de CC50 estipulado em nosso protocolo de citotoxicidade.

No protocolo virucida descrito por de Kaul et al. 1985 o vírus é incubado por 1 hora à temperatura ambiente com a Quercetina, inoculado nas células e após 2 horas o inóculo é retirado antes de dar continuidade ao cultivo. A ausência de efeito antiviral observado por nós ocorreu após incubação de 2 horas do vírus com Quercetina, no gelo e incubado por 2 horas. A escolha em manter o vírus no gelo durante a incubação com Quercetina levou em consideração uma possível interferência no aumento da temperatura com relação à

manutenção do número de partículas infectantes. Sabe-se que a exposição prolongada do vírus a temperatura ambiente (25 °C) pode resultar em redução do título viral [16].

A molécula de Quercetina foi submetida a reações de acetilação que geraram dois compostos derivados (Q1 e Q2). Estas moléculas foram sintetizadas e cedidas pelo Dr. Luis Otávio Regasini (docente do departamento de Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, UNESP) e estão sob o pedido de patente.

Em posse dos derivados acetilados, foi dado prosseguimento ao *screening* antiviral destas moléculas. A exemplo da Quercetina, a diluição dos compostos foi realizada em DMSO e as alíquotas foram mantidas protegidas da luz e estocadas à -80°C pelo período máximo de 1 mês. Todos os ensaios utilizando os compostos derivados foram realizados na presença de meio de cultivo DMEM F12 2% livre de vermelho de fenol. Ademais, todos os protocolos seguiram os procedimentos já descritos para Quercetina.

Os ensaios realizados para obtermos a CC50 dos compostos Q1 e Q2 foram realizados e os resultados apresentados na Figura 8. Os valores da CC50 obtidos para os compostos Q1 e Q2 foram 37,1 e 53,15 µM, respectivamente. Partindo do princípio de que estes ensaios já foram realizados em meio de cultivo livre do vermelho de fenol, podemos fazer uma primeira comparação entre os compostos acetilados e a Quercetina. Os compostos acetilados apresentaram valores de CC50 maior do que o valor determinado para a Quercetina e este parâmetro foi da ordem de 3,4 vezes para Q1 e 4,6 vezes para Q2.

O composto Q1 não apresentou efeito nos ensaios de pré-tratamento quando testado nas concentrações de 4-32 µM. Nos protocolos virucida e de pós-tratamento entretanto, notou-se efeito protetivo significativo (Figura 9). O composto Q1 proporcionou proteção celular crescente à medida que a concentração do composto diminui quando seu efeito virucida foi testado. Neste contexto, a concentração de 4 µM apresentou proteção

máxima com média de 60%. A menor proteção no intervalo de concentração de 8-32  $\mu\text{M}$  pode ter sido um reflexo da citotoxicidade celular que estas concentrações apresentaram anteriormente (de 20-50%).

No protocolo de pós-tratamento, o composto Q1 apresentou efeito semelhante ao encontrado no ensaio virucida. Nesta ocasião, as concentrações de 4 e 8  $\mu\text{M}$  promoveram proteção celular média de 91% e 88%, respectivamente. Doses maiores (16  $\mu\text{M}$  e 32  $\mu\text{M}$ ) apresentaram menor proteção celular ou nenhuma proteção.

O composto Q2 quando testado sob as mesmas condições do composto Q1 e no intervalo de concentração de 8-64  $\mu\text{M}$  não apresentou nenhum efeito anti-hRSV (Figura 9). Estes resultados foram muito semelhantes aqueles apresentados pela Quercetina.

Em resumo, nossos resultados confrontam parcialmente com aqueles apresentados por Kaul (1985) por demonstrar que a Quercetina não possui grande atividade anti-hRSV. A comparação entre os nossos resultados e aqueles apresentados por Kaul ficou prejudicada em virtude da falta de informações relevantes que pudessem esclarecer tais diferenças entre os dois estudos. As condições testadas por nós envolveram principalmente variações no uso de meio de cultivo (livre ou não de vermelho de fenol) e MOI de 0,1 ou 0,5. Quercetina apresentou CC50 de 85 e 11,2  $\mu\text{M}$  dependendo da presença ou ausência de vermelho de fenol, respectivamente. Doses menores que a CC50 não apresentaram um efeito mínimo de 50% de proteção celular frente a infecção por hRSV, impossibilitando a determinação da CE50 e conseqüentemente do índice de seletividade (IS).

A Quercetina passou por reações de acetilação e os dois compostos derivados foram denominados Q1 e Q2. O composto Q1 apresentou efeito anti-hRSV em concentrações menores do que aquela determinada como sua CC50 (37,1  $\mu\text{M}$ ). Nos

protocolos virucida e de pós-tratamento foi possível determinar a CE50 em valores  $<4 \mu\text{M}$ . Nestas condições, o IS foi de 9,27. Este valor pode ser melhorado a medida que concentrações menores sejam testadas. Os ensaios de pré-tratamento do composto Q1 e todos aqueles usados para o composto Q2 não apresentaram qualquer efeito anti-hRSV.

Por apresentar uma atividade antiviral apenas durante o ensaio virucida podemos iniciar algumas hipóteses de que o efeito antiviral de Quercetina seja uma ação direta do flavonoide com a partícula viral em que os principais alvos seriam as proteínas de superfície F, G e SH. Tais interações impossibilitariam que as partículas de hRSV, estando adsorvidas pelas moléculas de Quercetina, realizassem sua adesão/interação com células HEp-2. O fato de não ter apresentado efeitos anti-hRSV sob os protocolos de pré- e pós-tratamento indicam ausência de efeito da Quercetina sob receptores celulares para hRSV e sob fases mais tardias do ciclo viral.

O derivado acetilado Q1 por apresentar efeitos anti-hRSV nos protocolos virucida e de pós-tratamento indica que este composto atua diretamente na partícula viral como demonstrado pela Quercetina. Além disso, Q1 parece afetar etapas mais tardias da replicação viral: no brotamento viral ou interferindo na maquinaria celular, impedindo a formação de partículas maduras e infecciosas e/ou mesmo pela alteração da replicação intracelular através das proteínas NS1 e NS2. A realização de ensaios complementares como “tempo de adição” poderão no futuro testar tais hipóteses e melhorar o entendimento sobre o mecanismo antiviral apresentado por este derivado.

## **2.4. CONCLUSÕES**

O flavonoide Quercetina apresenta atividade virucida para o vírus hRSV ( $\leq 30\%$ ). Mudanças químicas na estrutura deste flavonoide, através de acetilações, reduziram os efeitos citotóxicos e potencializam o efeito virucida da molécula comercial. O cálculo do

Índice de Seletividade de um dos compostos derivados (Q1) resultou em valores  $>4$ , o que viabiliza o composto como um promissor agente antiviral.

Os resultados aqui apresentados e a continuidade dos estudos poderão indicar novos compostos que sejam efetivos na prevenção e no tratamento das infecções causadas por hRSV, contribuindo desta forma com recentes estudos na área médica, bioquímica e de microbiologia.

## **2.5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 2.5.1. Reagentes

A ribavirina foi adquirida na forma de cápsulas com 200 mg (Schering-Plough, Rebetol), diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma ref. D4540-1L) e estocada em freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. A Quercetina (3,3',4',5,6-Pentahidroxi-flavona (Sigma ref. Q4951) foi diluída em DMSO em concentração de 200 mM e mantida em freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Os derivados acetilados foram cedidos pelo Dr. Luis Otávio Regasini (Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, UNESP)

### 2.5.2. Cultura celular

Células HEp-2 (carcinoma de orofaringe) obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ ref. 0101) foram cultivadas em garrafas de cultura de  $75\text{ cm}^2$  (Corning ref. 3290) incubadas em estufa umedecida a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  e meio de cultura DMEM F12 (Sigma ref. D8900-10X1L) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab ref. 0521-500) e acrescido de antibióticos e antimicóticos (Life ref. 15240-062). A escolha das células HEp-2 foi baseada na literatura por serem células oriundas do trato respiratório humano e permissivas a infecção pelo vírus hRSV [16, 17].

### 2.5.3. Estoque viral

O vírus hRSV cepa A2, 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 livre de vermelho de fenol e acrescido de 2% de soro fetal bovino (SFB). Após coleta, as alíquotas virais foram congeladas, tituladas e mantidas em freezer -80 °C até o momento do uso. O título viral foi estabelecido pelo método de formação de placas de lise como descrito por McKimm-Breschkin (2004) (Figura 4) e confirmado pelo ensaio de TCID<sub>50</sub> [13].

### 2.5.4. Ensaio de viabilidade colorimétrico com MTT

O sal de MTT (1- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-Diphenylformazan Thiazolyl blue formazan, Sigma ref. M2003) foi diluído em meio de cultura DMEM F12 seguindo a concentração recomendada pelo fabricante (0,5 mg/ml) em um volume final de 50 µl/poço. Após o respectivo tratamento, o meio de cultivo foi substituído pela solução de MTT e incubado por 3 horas. Em seguida, a solução de MTT foi substituída por 50µl de dimetilsulfóxido puro (DMSO, Sigma ref. D4540-1L) para solubilização dos cristais de formazana. A absorbância da solução foi mensurada em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer, ref. 51119000), com comprimento de onda de 560 nm (específico para coloração azulada resultante da metabolização do sal). A metabolização do sal é diretamente proporcional a viabilidade celular, possibilitando inferir a viabilidade celular a partir da absorbância mensurada.

$$\text{Equação (1)} \quad \text{Viabilidade Celular} = \frac{\text{Abs.}_{\text{teste}} * 100}{\text{Abs.}_{\text{controle}}}$$

### 2.5.5. Avaliação da citotoxicidade dos compostos

Células HEp-2 ( $5 \times 10^4$ /poço), diluídas em meio de cultivo DMEM F12, foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas a 37 °C para que atingissem confluência  $\geq 80\%$ . A monocamada recebeu diversas concentrações do composto teste (de 0,5 a 1024  $\mu\text{M}$  em diluições seriadas na base 2) e com volume final de 100  $\mu\text{l}$ /poço. Após 3 dias em cultura a viabilidade foi mensurada pelo ensaio colorimétrico de MTT. Células cultivadas apenas na presença de meio de cultivo foram consideradas como 100% viáveis (Figura 1). Desta forma, os valores de CC50 (concentração em que cada composto teste reduz em 50% a viabilidade celular) foram obtidas por análise de regressão não linear sigmoidal de 4 parâmetros com auxílio do software GraphPad Prism 6.

### 2.5.6. Avaliação da ação antiviral

Para avaliação da ação antiviral dos compostos foi realizado um *screening* com o auxílio do ensaio colorimétrico com sal de MTT usando três abordagens metodológicas diferentes (Figura 6). No **pré-tratamento** (Figura 6A), células HEp-2 ( $5 \times 10^4$ ) cultivadas em placas de 96 poços foram tratadas por um período de 2 horas à 37 °C com diferentes concentrações do composto teste (concentrações variando de acordo com a CC50 de cada composto) com um volume final de 100  $\mu\text{l}$ , em seguida o sobrenadante foi substituído por solução de hRSV contendo MOI de 0,1 a 0,5 dependendo do teste. Células não tratadas foram infectadas pelo hRSV como controle positivo da infecção. As placas foram incubadas por 3 dias em estufa à 37 °C, na presença de CO<sub>2</sub> 5%. O ensaio **virucida** foi realizado como descrito por Petricevich, Mendonca (2003) com algumas modificações [18]. Uma suspensão de hRSV (MOI 0,1 a 0,5 dependendo do teste) foi

incubada por 2 horas à 4 °C na presença de diferentes concentrações do composto teste. Células HEP-2 ( $5 \times 10^4$ ) cultivadas em placas de 96 poços foram incubadas por 3 dias com a aquela suspensão viral diluída 10x (mantendo o MOI desejado) (Figura 6B).

No **pós-tratamento**, células HEP-2 ( $5 \times 10^4$ ) cultivadas em placas de 96 poços, foram mantidas na presença do vírus hRSV (MOI de 0,1 a 0,5 dependendo do teste) por 2 horas à 37 °C. Em seguida a suspensão viral foi substituída por diferentes concentrações de composto teste (concentrações variando de acordo com a CC50 de cada composto) com um volume final de 100µl, os quais foram mantidos por 3 dias de cultivo. Células não tratadas foram infectadas com o vírus como controle da infecção viral (Figura 6C).

A porcentagem de proteção obtida em cada tratamento foi calculada como se segue:

$$\text{Equação (3) Prote\c{c}\~ao Celular} = \frac{DO_{AT} * 100}{DO_{CC100}}$$

$DO$  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)

$DO_{CC100}$  é  $DO_{CC} - DO_{CV}$  (densidade óptica do controle celular - densidade óptica do controle viral)

### 2.5.7. Determinação do Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) fornece indício do quão promissor é a atividade antiviral de determinado composto relacionando sua CC50 com a CE50 [19].

$$\text{Índice de Seletividade (IS)} = \frac{CC50}{CE50}$$

## Equação (2)

O valor de CC50 foi determinado como indicado no item “*Avaliação da citotoxicidade dos compostos*”.

O valor de CE50 foi determinado como indicado no item “*Avaliação da ação antiviral*”, onde corresponde a 50% de proteção celular.

### 2.5.8. Análise dos Dados

Os dados experimentais foram processados com auxílio dos softwares Microsoft Excel e Graphpad Prism 6, utilizando os testes estatísticos Anova one-way seguido por Bonferroni. Os gráficos apresentam a média de cada grupo  $\pm$ SD. Todos os ensaios foram realizados no mínimo em triplicata de três ensaios independentes.

## **2.6. DISPONIBILIDADE DOS DADOS**

Quando da submissão do manuscrito, os dados serão disponibilizados na plataforma pública online FigShare ([www.figshare.com](http://www.figshare.com)).

## **2.7. CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

Conceberam e desenharam os experimentos: BRPL, TFS, FPS, KAT; Realizaram os experimentos: BRPL, TFS, AGR; Analisaram os dados: BRPL, MFC, TFS, AGR, FPS, KAT; Contribuíram com ferramentas de análises/material/reagentes: BRPL, FPS, KAT; Escreveram o manuscrito: BRPL, KAT

## 2.8. CONFLITO DE INTERESSES

Os autores desse artigo declaram não ter nenhuma competição de interesses.

## 2.9. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPESP (Processo 2014/12298-7) e à CAPES (bolsa de mestrado); apoio técnico de todo o laboratório do Dr. Eurico de Arruda Neto (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Brasil), em especial a Dra. Miriã Ferreira Criado.

## 2.10. REFERÊNCIAS

1. Falsey AR, Walsh EE: **Respiratory syncytial virus infection in adults.** *Clinical microbiology reviews* 2000, **13**(3):371-384.
2. Baker KA, Ryan ME: **RSV infection in infants and young children. What's new in diagnosis, treatment, and prevention?** *Postgraduate medicine* 1999, **106**(7):97-99, 103-104, 107-108 passim.
3. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ: **Respiratory syncytial virus--a comprehensive review.** *Clinical reviews in allergy & immunology* 2013, **45**(3):331-379.
4. Ojwang JO, Ali S, Smee DF, Morrey JD, Shimasaki CD, Sidwell RW: **Broad-spectrum inhibitor of viruses in the Flaviviridae family.** *Antiviral research* 2005, **68**(2):49-55.
5. Formica JV, Regelson W: **Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids.** *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 1995, **33**(12):1061-1080.
6. Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL: **Quercetin and rutin as**

- inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia.** *Carcinogenesis* 1991, **12**(7):1193-1196.
7. Kaul TN, Middleton E, Jr., Ogra PL: **Antiviral effect of flavonoids on human viruses.** *Journal of medical virology* 1985, **15**(1):71-79.
  8. Twentyman PR, Luscombe M: **A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity.** *British journal of cancer* 1987, **56**(3):279-285.
  9. Choi HJ, Kim JH, Lee CH, Ahn YJ, Song JH, Baek SH, Kwon DH: **Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus.** *Antiviral research* 2009, **81**(1):77-81.
  10. Choi HJ, Song JH, Park KS, Kwon DH: **Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication.** *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2009, **37**(3-4):329-333.
  11. Johari J, Kianmehr A, Mustafa MR, Abubakar S, Zandi K: **Antiviral activity of baicalein and quercetin against the Japanese encephalitis virus.** *International journal of molecular sciences* 2012, **13**(12):16785-16795.
  12. DeLean A, Munson P, Rodbard D: **Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves.** *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1978, **235**(2):G97-102.
  13. Rasmussen L, Maddox C, Moore BP, Severson W, White EL: **A high-throughput screening strategy to overcome virus instability.** *Assay and drug development technologies* 2011, **9**(2):184-190.
  14. McKimm-Breschkin JL: **A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus**

- direct visualization of plaques without immunostaining.** *Journal of virological methods* 2004, **120**(1):113-117.
15. Morfin F, Dupuis-Girod S, Mundweiler S, Falcon D, Carrington D, Sedlacek P, Bierings M, Cetkovsky P, Kroes A, Van Tol M: **In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent.** *Antiviral therapy* 2005, **10**(2):225-229.
  16. Gupta CK, Leszczynski J, Gupta RK, Siber GR: **Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin.** *Vaccine* 1996, **14**(15):1417-1420.
  17. Srinivasakumar N, Ogra P, Flanagan T: **Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay.** *Journal of virology* 1991, **65**(8):4063-4069.
  18. Petricevich VL, Mendonça RZ: **Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth.** *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 2003, **42**(2):143-153.
  19. Sidwell R: **Determination of antiviral activity.** *Drugs and the pharmaceutical sciences* 1986, **27**:433-480.

## 2.11. LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático do ensaio de determinação da concentração citotóxica (CC50).

Figura 2. Semelhança estrutural entre as moléculas da Quercetina e do vermelho de fenol.

Figura 3. Determinação da CC50 para Quercetina em células HEp-2. Células HEp-2 foram plaqueadas numa densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço e mantidas por 24 horas em uma placa de cultura de 96 poços, na presença de meio de cultivo DMEM-F12 10%. O meio de cultivo foi então substituído por 100  $\mu$ l de Quercetina em diferentes concentrações (0,5-1024  $\mu$ M). A diluição do flavonoide foi feita em DMEM-F12 2% livre ou acrescido de vermelho de fenol e a cultura mantida por 3 dias em estufa umidificada à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. No dia 2, após adição de Quercetina, todos os poços da cultura foram acrescidos de 50  $\mu$ l de DMEM-F12 2% apropriado com o intuito de manter os nutrientes celulares. A viabilidade das células HEp-2 foi avaliada no 4º dia através do ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT, com sua absorbância sendo lida à 560 nm em um leitor de ELISA. As concentrações de Quercetina (0,5-1024  $\mu$ M) são representadas em Logue base 2 onde as incubações foram realizadas em meio de cultivo DMEM-F12 livre (A) ou não (B) de vermelho de fenol. A determinação do valor da CC50 foi calculado através de uma regressão não linear sigmoideal de quatro parâmetros. O gráfico representa um dos cinco experimentos independentes realizados em triplicata e a curva é o resultado da média dos valores obtidos num único ensaio.

Figura 4. Titulação viral através de ensaio de formação de placas de lise. Células HEp-2 foram plaqueadas, inoculadas (hRSV) e cultivadas segundo instruções de McKimm-Breschkin (2004). CC: controle celular, CV: controle viral executado com alíquota pura do estoque viral; de -1 a -8 são diluições do estoque viral na base 10 (de 1:10 até 1:100.000.000). As setas presentes na diluição -8 indicam alguns focos virais visíveis na placa e que foram utilizados na determinação do título viral.

Figura 5. Morfologia celular de células HEp-2 infectadas ou não por hRSV pós cultivo de 2-3 dias. Células HEp-2 ( $5 \times 10^4$ ) foram semeadas em placas de 96 poços. Vinte e quatro horas após, as células foram inoculadas com hRSV (Controle viral MOI 0,5; volume de 20 $\mu$ l) ou apenas NaCl 0,15M (controle celular) por 2 horas à 37 °C. A cultura foi lavada com NaCl 0,15M e mantida em 100  $\mu$ l de meio DMEM F12 2% livre de vermelho de fenol por 2-3 dias a 37 °C em estufa umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. A morfologia foi avaliada e documentada por microscópio de luz branca em aumentos de 40-200X.

Figura 6. Desenho experimental para os ensaios de pré-tratamento, virucida e pós-tratamento. Em todos os ensaios células HEp-2 ( $5 \times 10^4$  por poço) foram plaqueadas numa placa de 96 poços no Dia -1 e mantidas por 24 horas em meio de cultivo DMEM-F12 10% em condições de estufa umidificada, 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C. Os inóculos virais variaram entre MOI de 0,1 e 0,5. Ao final do tratamento, as culturas foram mantidas em 100  $\mu$ l de meio de cultivo. No Dia 2 todas as culturas receberam adição de 50  $\mu$ l de meio de cultivo e assim foram mantidas até o momento da adição do sal de MTT (Dia 3). (A) Pré tratamento: as células foram incubadas (2 horas) com diferentes concentrações de Quercetina (0-64  $\mu$ M) diluída em meio livre ou não de vermelho de fenol DMEM-F12 2% até ser substituída pelo inóculo viral que foi mantido por adicionais 2 horas. O inóculo foi lavado e a cultura mantida por 3 dias. (B) Virucida: alíquotas individuais do vírus hRSV foi incubado no gelo na presença de diferentes concentrações de Quercetina durante 2 horas com volume final de 10 $\mu$ l. Estas alíquotas foram diluídas 10x para então serem adicionadas aos poços da placa de 96 contendo monocamadas de células HEp-2. O inóculo viral foi então incubado com as células por um período de 2 horas a 37 °C. As partículas virais não infectantes foram removidas por lavagem (NaCl 0,15M) e a cultura celular mantida em estufa umidificada, 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C por 3 dias. (C) Pós-tratamento: as células foram infectadas com hRSV durante 2 horas à 37 °C. As partículas

virais não infectantes foram removidas por lavagem (NaCl 0,15M). Os poços receberam meio de cultivo contendo Quercetina em concentrações diferentes. A cultura foi mantida por 3 dias até a adição do sal de MTT.

Figura 7. Avaliação da atividade anti-hRSV da Quercetina. A atividade anti-hRSV da Quercetina foi testada em células HEp-2 em diferentes concentrações e MOI (0.1 ou 0.5) em meio de cultivo contendo ou não vermelho de fenol. A Ribavirina foi testada no ensaio de pós-tratamento, apresentando um IS de 29,9 (dados não mostrados). As culturas foram mantidas por 3 dias e a viabilidade das células HEp-2 foi avaliada no através do ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT, com sua absorbância sendo lida à 560 nm em um leitor de ELISA. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

Figura 8. Determinação da CC50 para os compostos Q1 e Q2 em células HEp-2. Células HEp-2 ( $5 \times 10^4$ ) foram incubadas com 100  $\mu$ l dos compostos Q1 (A) ou Q2 (B) em diferentes concentrações (1-1024  $\mu$ M). Os compostos foram diluídos em meio DMEM-F12 2% livre de vermelho de fenol e a cultura mantida por 3 dias em estufa umidificada à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade celular foi avaliada no 4º dia através do ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT, com sua absorbância sendo lida à 560 nm em um leitor de ELISA. A determinação do valor da CC50 (Q1 37,1  $\mu$ M e Q2 53,15  $\mu$ M) foi calculado através de uma regressão não linear sigmoidal de quatro parâmetros. O gráfico representa a média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Figura 9. Avaliação da atividade anti-hRSV dos compostos Q1 e Q2. A atividade anti-

hRSV dos compostos Q1 e Q2 foi testada em células HEp-2 em diferentes concentrações sob MOI de 0,5 em meio de cultivo livre de vermelho de fenol. A Ribavirina foi testada no ensaio de pós-tratamento, apresentando um IS de 29,9 (dados não mostrados). As culturas foram mantidas por 3 dias e a viabilidade das células HEp-2 foi avaliada no através do ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT, com sua absorbância sendo lida à 560 nm em um leitor de ELISA. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

## 2.12. FIGURAS

Figura 1

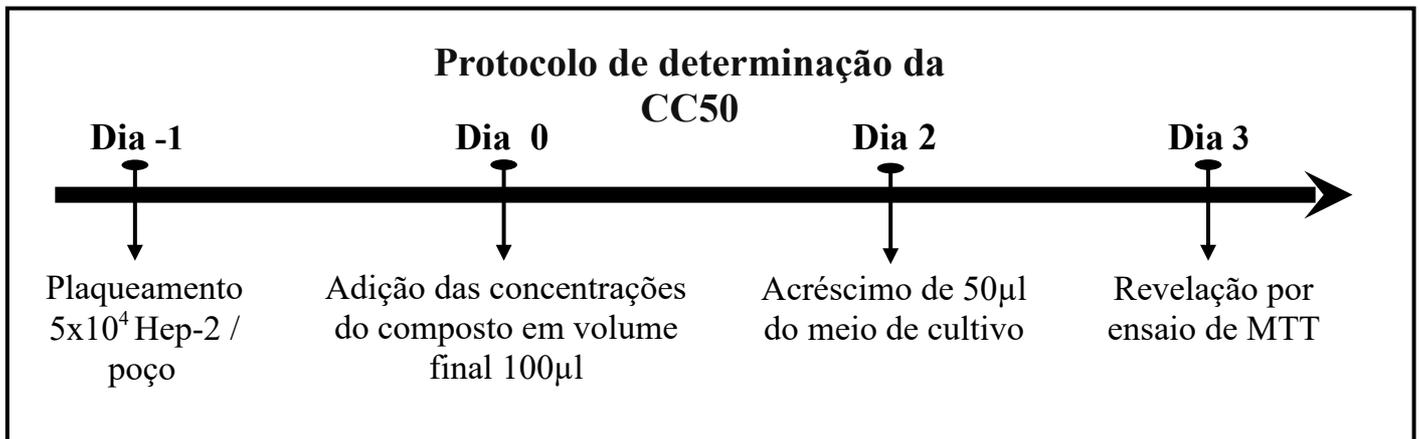


Figura 2

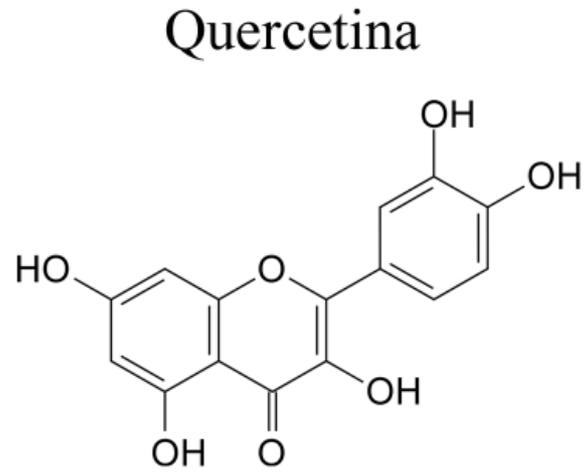
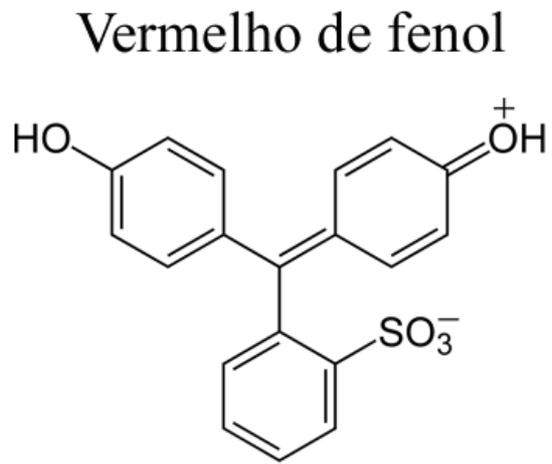


Figura 3

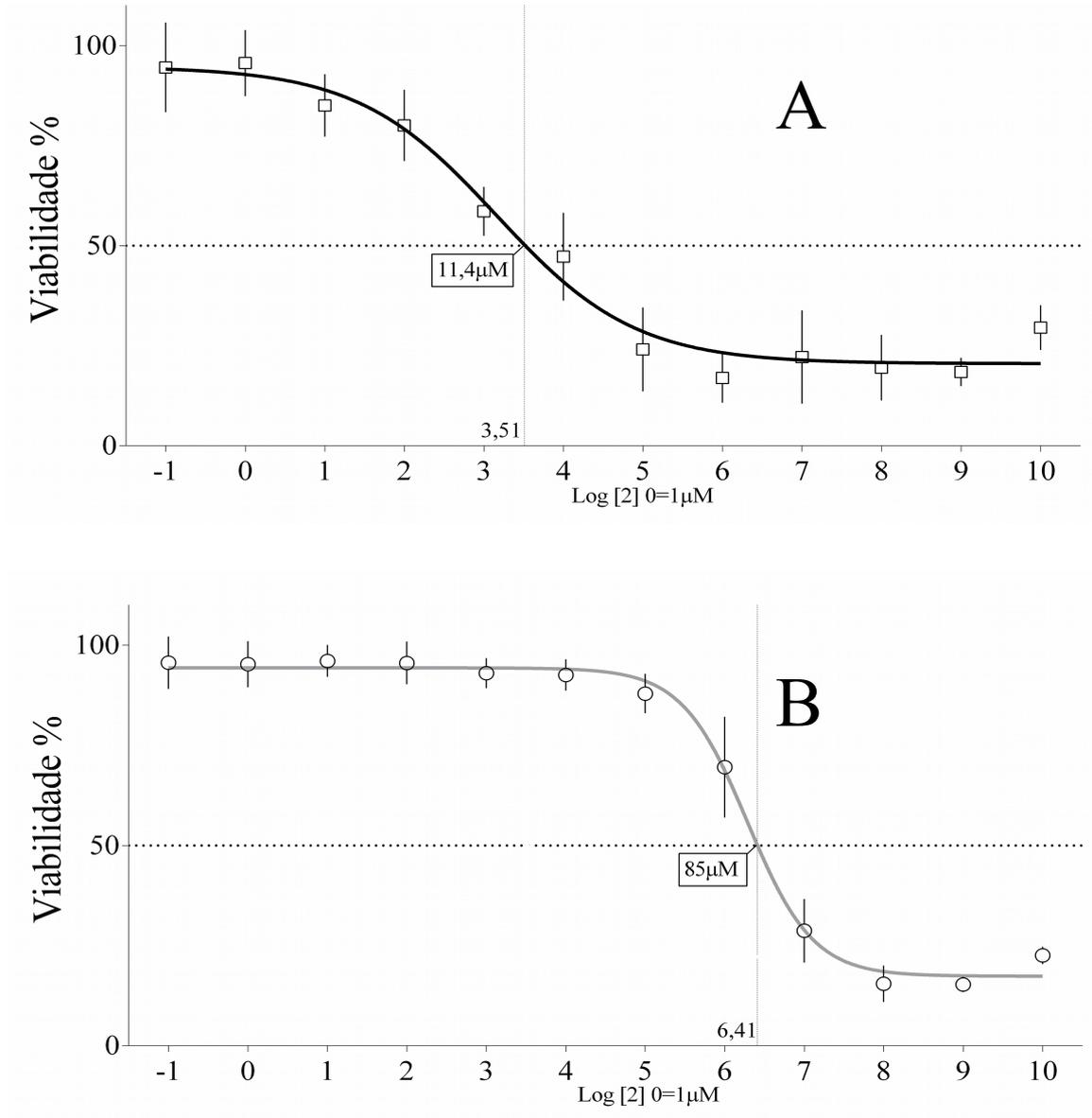
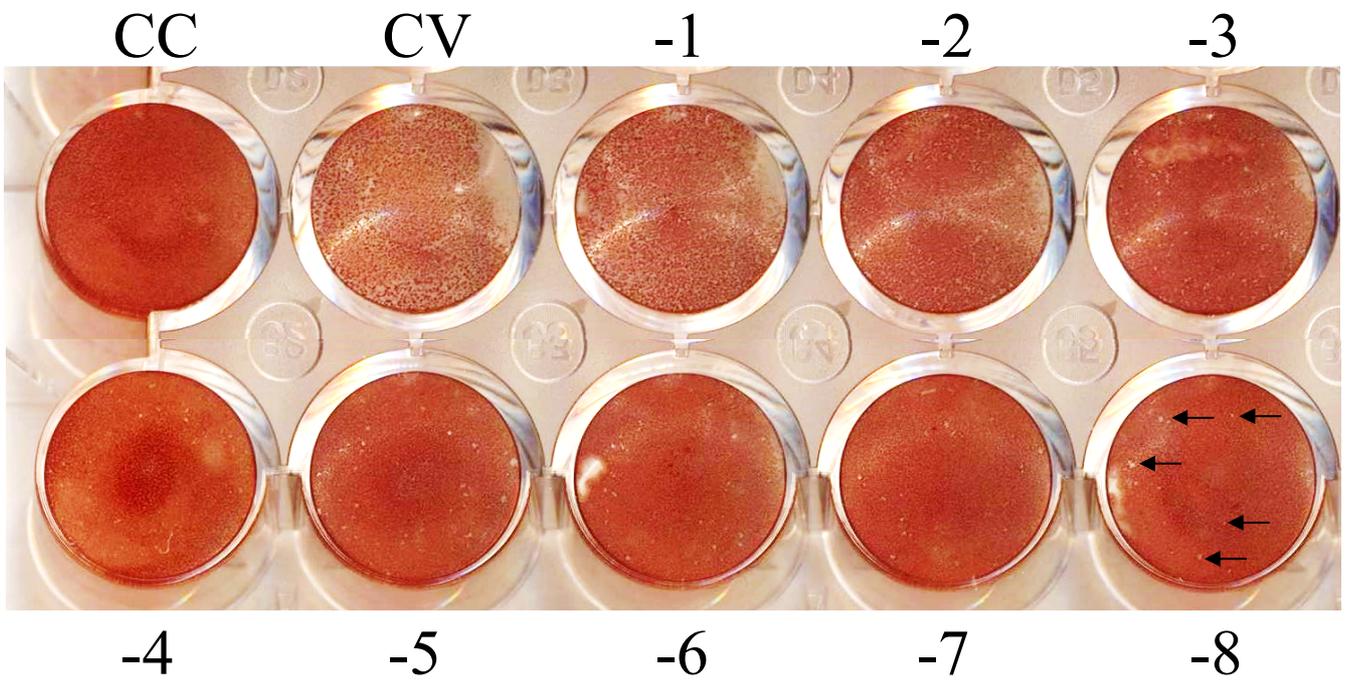
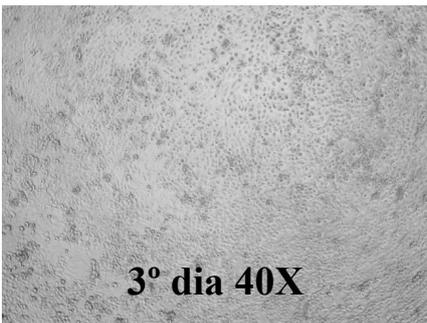
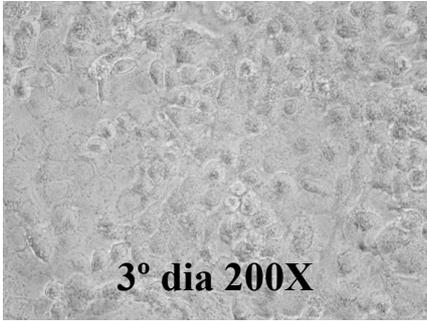


Figura 4



**Figura 5**

**Controle celular**



**Controle viral**

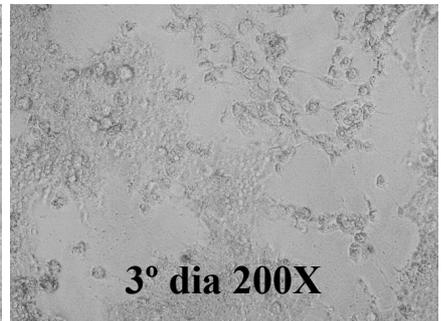
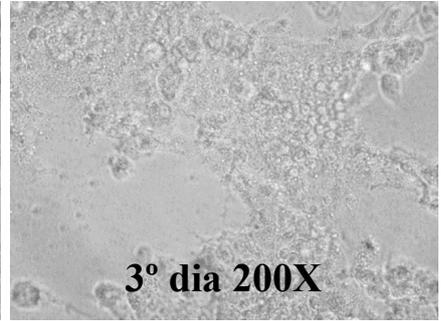
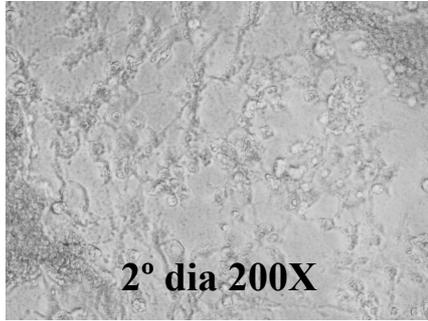


Figura 6

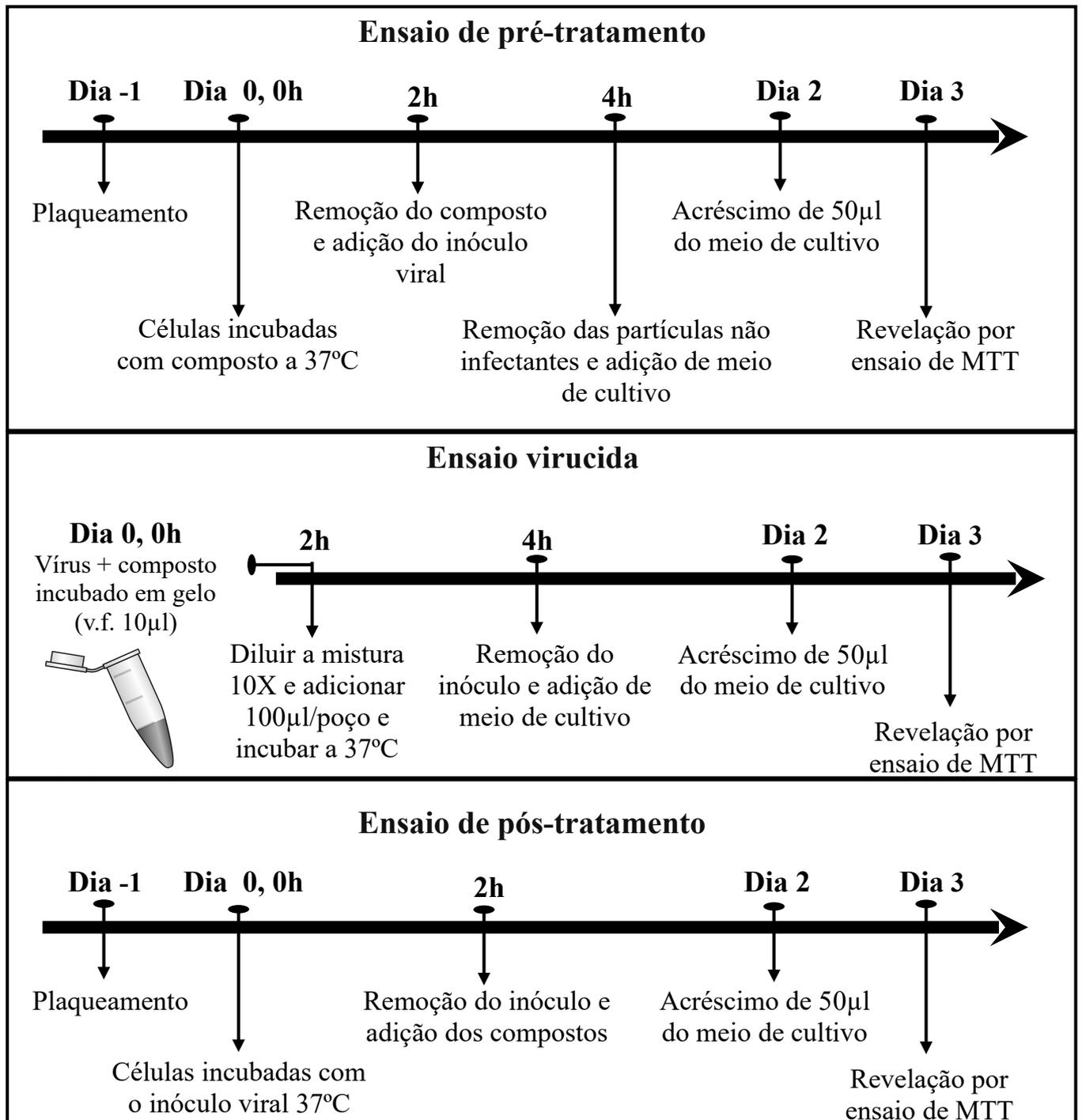


Figura 7

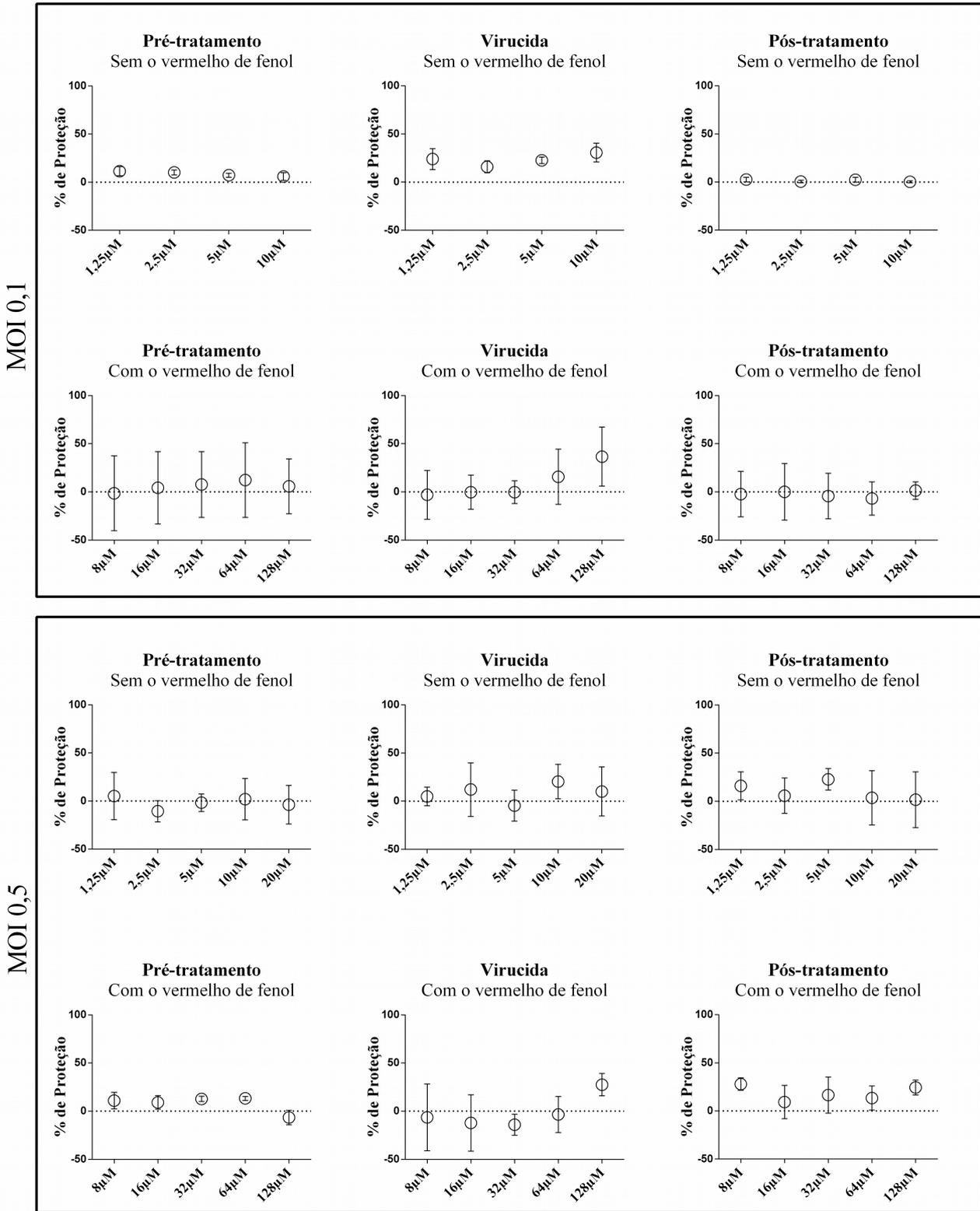


Figura 8

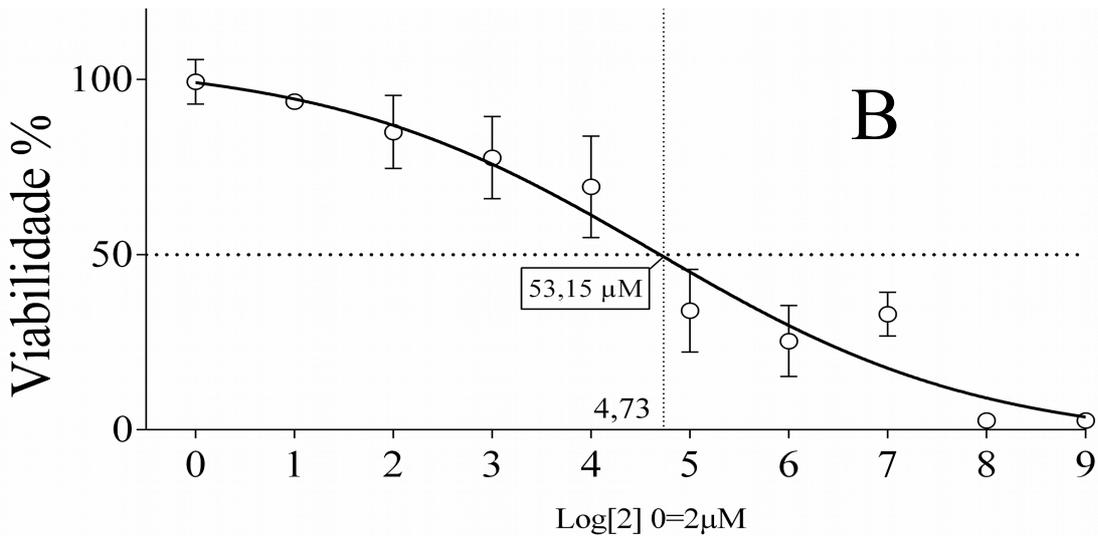
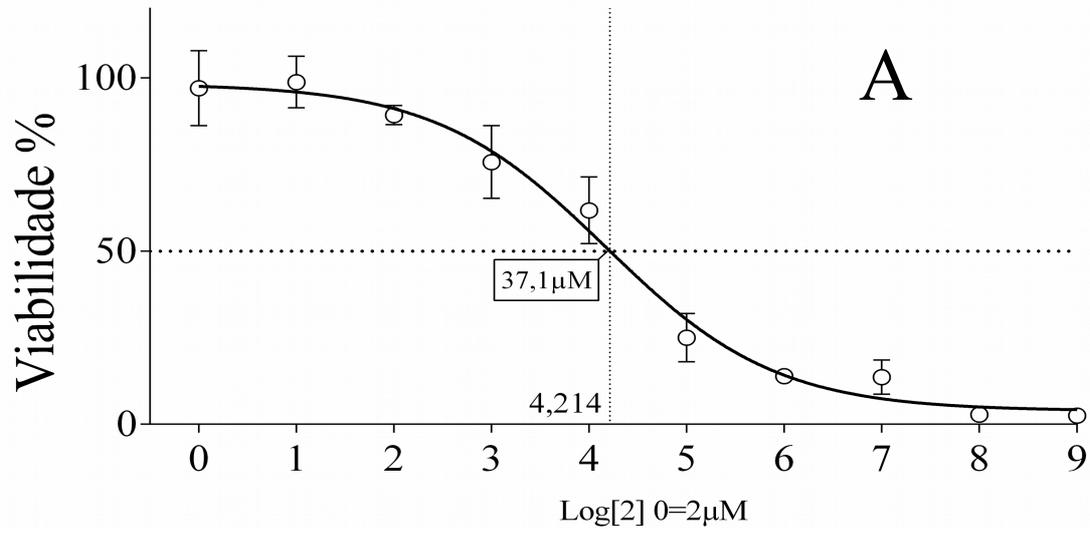
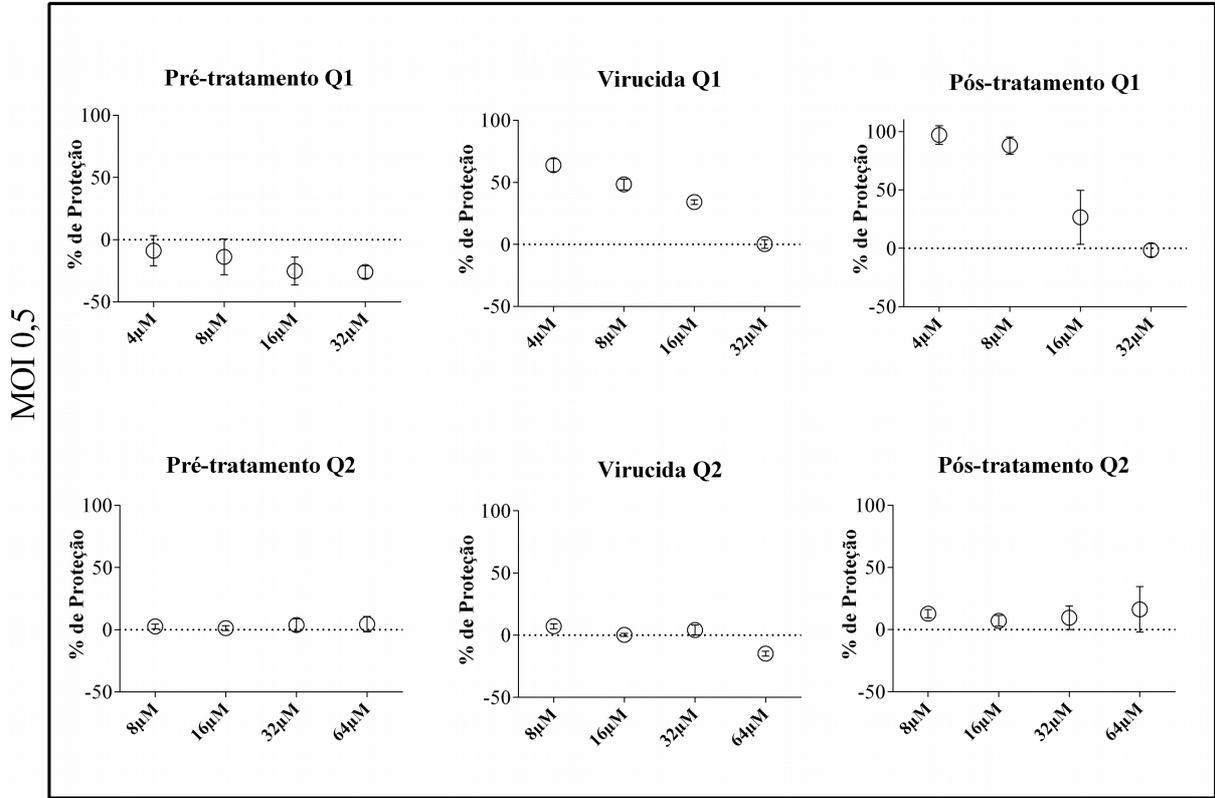


Figura 9



### 3. CONCLUSÕES GERAIS

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

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

#### 4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

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

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

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

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

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

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