



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA



SHIRAZ FEFERBAUM LEITE

ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PROTEÍNAS ISOLADAS DE SERPENTES BRASILEIRAS
NO CICLO REPLICATIVO DO ENTEROVÍRUS A-71

UBERLÂNDIA

2022

SHIRAZ FEFERBAUM LEITE

ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PROTEÍNAS ISOLADAS DE SERPENTES BRASILEIRAS
NO CICLO REPLICATIVO DO ENTEROVÍRUS A-71

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina na Universidade Federal
de Uberlândia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Carolina
Gomes Jardim

Co-orientador: Me. Igor de Andrade
Santos

UBERLÂNDIA

2022

ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PROTEÍNAS ISOLADAS DE SERPENTES BRASILEIRAS
NO CICLO REPLICATIVO DO ENTEROVÍRUS A-71

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina na Universidade Federal
de Uberlândia.

Uberlândia, 29 de março de 2022.

Banca examinadora formada por:

Profª Drª Ana Carolina Gomes Jardim

Profª Drª Carolina Colombelli Pacca

Me. Nágela Bernadelli Sousa Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço eternamente à minha família que sempre acreditou em mim e me instigou a ter sede pelo conhecimento

Agradeço ao meu namorado que desde o início esteve constantemente me incentivando a lutar pelos meus sonhos e nunca me deixou desistir

Agradeço ao meu grupo da faculdade pelos dias infinitos que passávamos na UFU, pelas risadas, parceria e lanches compartilhados

Agradeço a todos os meus amigos que me acompanham desde o ensino médio, a presença de vocês na minha vida faz toda a diferença

Agradeço à minha orientadora Ana Carolina por ter me recebido de braços abertos no laboratório de virologia e ter me dado a oportunidade de me apaixonar pela área

Agradeço imensamente ao meu coorientador Igor por cada ensinamento transmitido e a paciência de dez monges

Agradeço aos colegas de laboratório pelo acolhimento e ajuda sempre que necessitei

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Partícula viral do Enterovírus A-71.	11
Figura 2: Genoma do Enterovírus A-71.	12
Figura 3: Representação esquemática do ciclo replicativo do Enterovírus A-71.	14
Figura 4: Esquema do plasmídeo referente à construção p-EVA71-B2 do vírus completo de EV-A71.	20
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de linearização plasmidial, purificação do DNA linear e transcrição de RNA.	23
Figura 6: Visualização do ensaio de titulação do EV-A71 em placa de 96 poços.	24
Figura 7: Calculadora de TCID ₅₀ .	24
Figura 8: Viabilidade celular das proteínas isoladas de peçonha de serpentes nas concentrações de 50, 25, 5 e 1 µg/mL em células Vero.	25
Figura 9: Efeito das proteínas isoladas de serpente na viabilidade e replicação do EV-A71 em células Vero.	26
Figura 10: Concentração efetiva de 50% (EC ₅₀) das proteínas de peçonha de serpentes.	27
Tabela 1: Dados comparativos de CC ₅₀ , EC ₅₀ e SI, entre as proteínas isoladas.	27

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. História, epidemiologia e transmissão.....	9
1.2. Enterovírus A-71	10
1.3. Prevenção e tratamento contra o EV-A71	15
1.4. Compostos naturais como recurso para a identificação de candidatos a fármacos	15
1.5. Atividades biológicas de proteínas isoladas da peçonha de serpentes	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Proteínas isoladas da peçonha de serpentes	18
3.2. Cultura de células Vero	18
3.3. Ensaio de viabilidade celular e determinação de CC ₅₀	18
3.4. Produção de partículas virais do EV-A71	19
3.5. Titulação viral	20
3.6. Ensaio antiviral e determinação de EC ₅₀	21
3.7. Análise estatística	21
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Produção e titulação de partículas virais do EV-A71.....	21
4.2. Análise da viabilidade celular sob o tratamento com as proteínas isoladas de serpente	25
4.3. Proteínas isoladas de serpente inibem a replicação do EV-A71 <i>in vitro</i>	25
4.4. Proteínas isoladas de serpentes apresentam alto índice de seletividade.....	26
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	30
7. REFERÊNCIAS	30

RESUMO

Os enterovírus são vírus causadores de diversas doenças ao redor do mundo. Dentre eles, o Enterovírus A-71 (EV-A71) é a segunda maior causa da Doença Mão, Pé e Boca em regiões da Ásia-Pacífico. Atualmente, não existem tratamentos específicos que atuem diretamente no ciclo replicativo do EV-A71, e, nesse contexto, identificar moléculas com atividade antiviral é imprescindível. As proteínas isoladas da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* sp. e *Crotalus* sp. têm demonstrado atividade antiviral, antibacteriana e antiparasitária, representando uma interessante alternativa para o desenvolvimento de terapêuticas contra o EV-A71. Portanto, nesse trabalho avaliamos o potencial anti-EV-A71 das fosfolipases A2 MjTX-I e MjTX-II, isoladas de *Bothrops moojeni*, e das proteínas crotamina e fosfolipase A2_{CB} (PLA-2_{CB}), isoladas de *Crotalus Durrissus Terrificus*. Para isso, o EV-A71 foi produzido através da transfecção de RNA viral em células Vero, e posteriormente titulado por TCID₅₀. Para identificar o potencial das proteínas, os ensaios de EC₅₀ e CC₅₀ foram realizados tratando as células Vero com as proteínas em uma diluição seriada, na presença ou ausência do EV-A71 a 100TCID₅₀, respectivamente. Como resultado, as proteínas MjTX-I, MjTX-II, crotamina e PLA-2_{CB} apresentaram valores de EC₅₀ de 5.9, 6.3, 8.3 e 4.2 µg/mL, respectivamente. Os valores de CC₅₀ foram > 1000 µg/mL para a MjTX-I e crotamina, enquanto para MjTX-II e PLA-2_{CB} foram de 427.6 e 52.3 µg/mL, nesta ordem. Nesse sentido, as proteínas avaliadas obtiveram valores de SI elevados, sendo >170,8 e >120,4 para MjTX-I e a crotamina, respectivamente, e 67.4 e 12.5 para a MjTX-II e PLA-2_{CB}, respectivamente. Os dados apresentados aqui, conforme o levantamento bibliográfico realizado, demonstram, pela primeira vez, o potencial inibitório dessas proteínas contra o EV-A71, que pode resultar futuramente na prospecção de moléculas ativas e aplicáveis na clínica médica.

ABSTRACT

Enteroviruses are a group of viruses that cause several diseases around the world. Among them, Enterovirus A-71 (EV-A71) is the second main cause of Hand, Foot, and Mouth Disease in Asia-Pacific regions. Currently, there are no specific treatments that act directly on the replicative cycle of EV-A71, and, in this context, identifying molecules with antiviral activity is crucial. Proteins isolated from the venom of snakes of the genus *Bothrops* sp. and *Crotalus* sp. have demonstrated antiviral, antibacterial, and antiparasitic activity, representing an interesting alternative to the development of therapeutic against EV-A71. Therefore, here we evaluated the anti- EV-A71 potential of the phospholipases A2 MjTX-I e MjTX-II, isolated from *Bothrops moojeni*, and the proteins crotamine and phospholipase A2_{CB} (PLA-2_{CB}), isolated from *Crotalus Durrissus Terrificus*. For this, EV-A71 was produced by transfection of the viral RNA in Vero cells, and later titrated by TCID₅₀. To identify the potential of the proteins, EC₅₀ and CC₅₀ were performed by treating Vero cells with the proteins in a serial dilution in the presence or absence of EV-A71 at 100TCID₅₀, respectively. As a result, the proteins MjTX-I, MjTX-II, crotamine and PLA-2_{CB} showed EC₅₀ values of 5.9, 6.3, 8.3 and 4.2 µg/mL, respectively. CC₅₀ values were > 1000 µg/mL for MjTX-I and crotamine, while for MjTX-II and PLA-2_{CB} were 427.6 and 52.3 µg/mL, in that order. In this sense, the evaluated proteins obtained high SI values, being > 170.8 and > 120.4 for MjTX-I and crotamine, respectively, and 67.4 and 12.5 for MjTX-II and PLA-2_{CB}, respectively. To the best of our knowledge, the data presented here demonstrate, for the first time, the inhibitory potential of these proteins against EV-A71, which may result in the prospecting of active molecules and applicable in the medical clinic in the future.

1. INTRODUÇÃO

1.1. História, epidemiologia e transmissão

O enterovírus A71 (EV-A71) foi isolado e caracterizado entre 1969 e 1973, devido a uma associação a casos de doenças neurológicas ocorridas na Califórnia (SCHMIDT; LENNETTE; HO, 1974). Desde então, casos do EV-A71 foram relacionados com acometimentos no sistema nervoso na América, Oceania, Europa e Ásia (BROWN; PALLANSCH, 1995; CARDOSA et al., 2003; CHANG, 2008; KAMAU et al., 2021). O EV-A71 foi identificado como a segunda maior causa da Doença Mão, Pé e Boca (DMPB) (OOI et al., 2010), uma doença que afeta principalmente crianças abaixo de 5 anos de idade, resultando na maioria dos casos febre, dor de cabeça, vômitos e erupções cutâneas na boca, mãos e pés (WANG et al., 2019). Entre 2007 e início de 2008 foi registrado o maior surto epidêmico de DMPB na China, representando uma ameaça pública global (XING et al., 2015). Em 2019, a emergência da pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) desencadeou uma série de medidas de controle não farmacológicas, como distanciamento social, uso de máscaras e higienização de mãos, o que resultou na diminuição da transmissão da DMPB no ano de 2020 (NIU et al., 2021).

No Brasil, a primeira descrição do EV-A71 foi em um estudo sobre paralisia flácida aguda no ano de 1990, que mostrou a presença de anticorpos neutralizantes de EV-A71 em amostras séricas de 9 pacientes, dos 28 analisados (DA SILVA; FILLIPIS; SCHATZMAYR; CORTES, 1990). Ainda, Takimoto e colaboradores identificaram em São Paulo e Brasília, no período de 1988 a 1990, casos de crianças com sintomas de doença neurológica aguda que apresentavam resultado positivo para o EV-A71 (TAKIMOTO et al., 1998). O vírus está relacionado principalmente à doenças neurológicas no país, entretanto, o diagnóstico laboratorial não é usual, bem como a notificação dos casos ao Ministério da Saúde não é obrigatória, refletindo na subnotificação e falta de dados epidemiológicos do EV-A71 e das doenças relacionadas à ele, na literatura (CASTRO et al., 2005).

A transmissão ocorre principalmente via fecal-oral ou por secreções orofaríngeas, sendo altamente contagioso. Além disso, pode também contaminar superfícies e propiciar a transmissão por fômites (CHEN et al., 2007). Após o estabelecimento da infecção, o vírus se replica na cripta tonsilar e/ou em estruturas na parede do intestino, provocando o início da viremia e o surgimento dos sintomas. A replicação viral pode desenvolver quadros assintomáticos, entretanto, em casos sintomáticos a progressão pode se dar em quatro estágios: i) Doença Mão, Pé e Boca; ii) acometimento do sistema nervoso central; iii) desregulação do

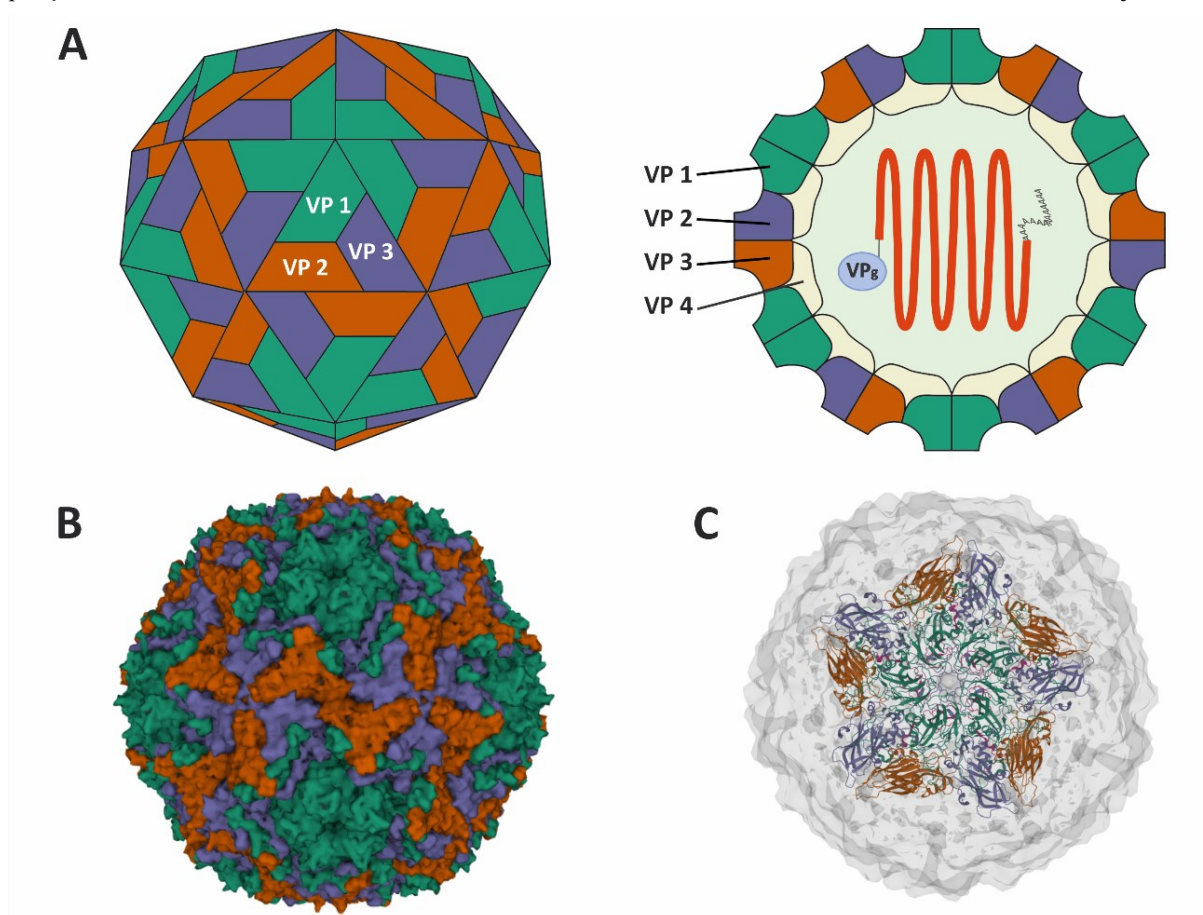
sistema nervoso autônomo, causando insuficiência cardiopulmonar em casos mais severos; iv) convalescença (CHANG et al., 2019; COX et al., 2017).

Dentre os causadores da DMPB, o EV-A71 se tornou o mais relevante por apresentar tropismo pelo tecido neural, podendo desencadear doenças associadas ao sistema neurológico, como meningite asséptica, encefalite, síndrome poliomielítica e paralisia flácida aguda (CASTRO et al., 2005; SOLOMON et al., 2010). Em casos graves, o EV-A71 pode afetar o tronco encefálico, provocando sequelas e até óbitos (CHANG; CHEN; CHEN, 2018). O aumento no número de casos ocorre nas épocas mais quentes do ano (WANG et al., 2018). Embora indivíduos de ambos os sexos sejam passíveis de se contaminar com a doença, os indivíduos do sexo masculino possuem uma maior propensão (ZHUANG et al., 2015).

1.2. Enterovírus A-71

Os enterovírus pertencem ao gênero *Enterovirus*, família Picornaviridae, e são classificados nos grupos A-E, de acordo com diferenças baseadas na morfologia, genoma, estratégia de replicação e propriedades antigênicas. O EV-A71 está classificado no grupo A, possuindo mais de 30 cepas (BESSAUD et al., 2014; HYYPIÄ et al., 1997; XU et al., 2018). O vírion é não envelopado, de formato icosaédrico e material genético composto por uma fita simples de RNA com polaridade positiva, contendo uma extensão de aproximadamente 7,400 nucleotídeos (MCMINN, 2002) (**Figura 1**).

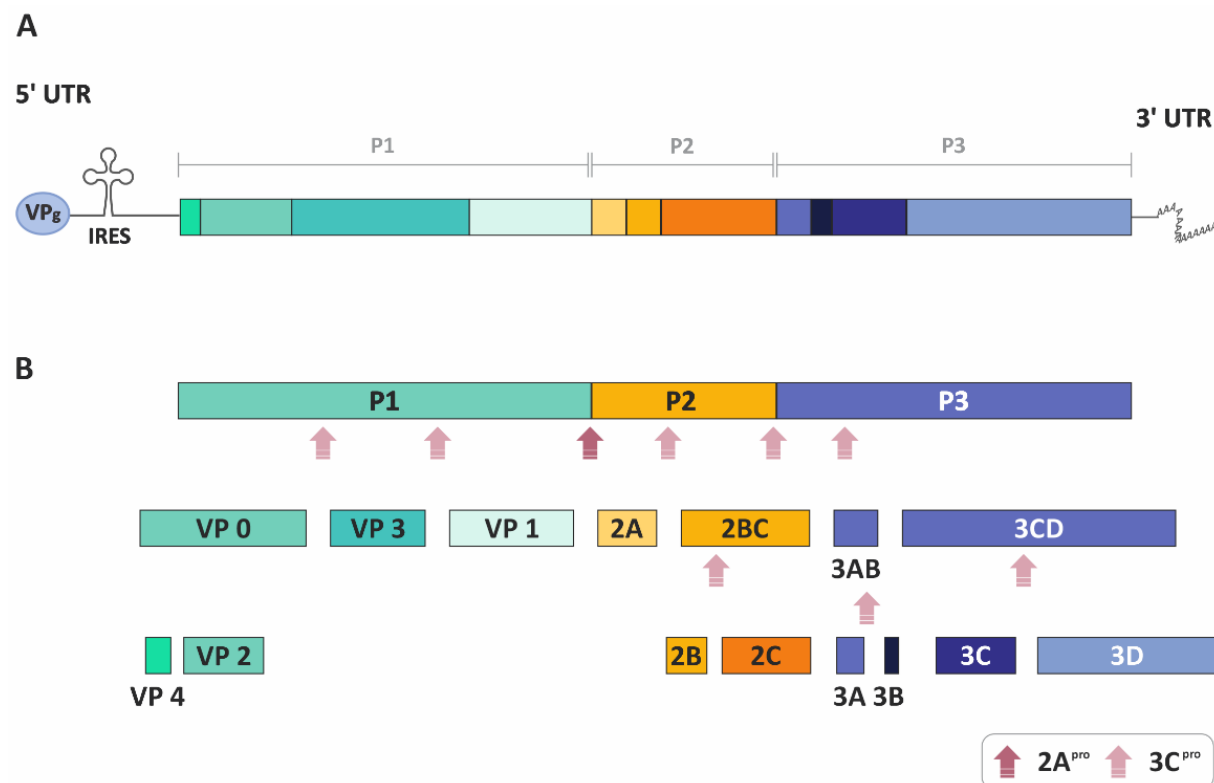
Figura 1. Partícula viral do Enterovírus A-71. (A) Estrutura do vírion. (B) Reconstrução tridimensional colorida do conjunto icosaédrico viral, destacando VP1, VP2 e VP3 em verde, roxo e laranja, respectivamente. (C) Modelo pentamérico e sua posição de acordo com toda a estrutura do vírion. VP1, VP2 e VP3 também são identificados em verde, roxo e laranja.



Fonte: Shiraz et. al, em preparação.

O genoma do EV-A71 possui uma única região aberta de leitura (ORF, *open reading frame*), a qual codifica uma poliproteína de aproximadamente 2100 aminoácidos, que é processada em três proteínas precursoras: P1, P2 e P3 (**Figura 2**). A P1 é clivada em quatro proteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4, sendo que as proteínas VP1-3 formam um trímero disposto na parte externa/superior do capsídeo, e VP4 interage com o trímero na parte interna do capsídeo (**Figuras 1 e 2**). As proteínas P2 e P3, por outro lado, codificam sete proteínas não estruturais, apresentadas como P2-2A, 2B, 2C, P3-3A, 3B, 3C e 3D (TAN et al., 2014; YUAN et al., 2018) (**Figura 2**).

Figura 2. Genoma do Enterovírus A-71. (A) Representação esquemática do genoma do enterovírus. **(B)** Esquema do processamento da poliproteína precursora nas proteínas estruturais e não estruturais.

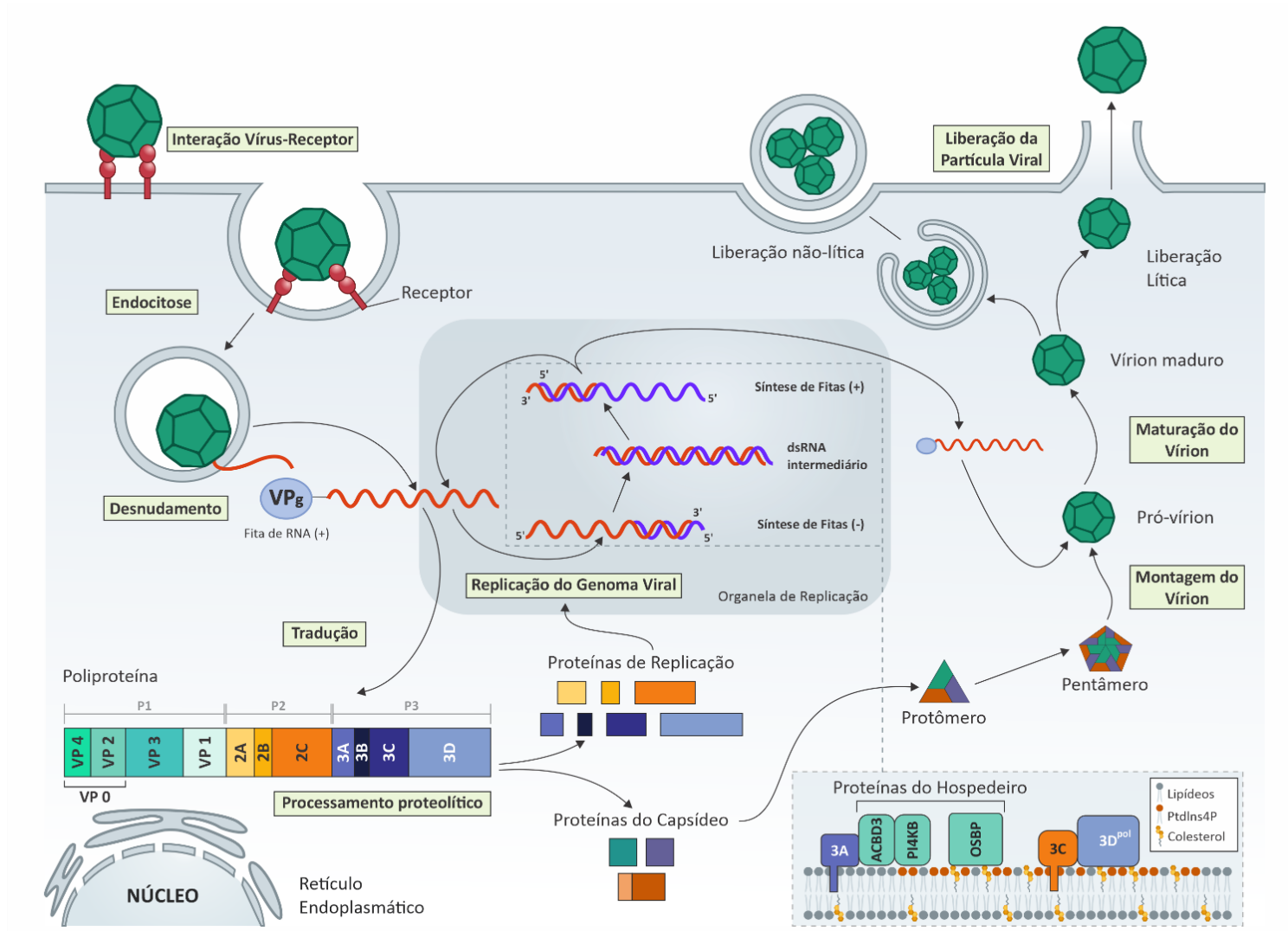


Fonte: Shiraz et. al, em preparação.

O ciclo replicativo viral se inicia a partir da ligação do EV-A71 com os receptores de superfície das células hospedeiras (**Figura 3**). A interação é mediada principalmente pelo receptor *Scavenger B2* (SCARB2; endocitose dependente de clatrina), no entanto, os receptores Proteína de Membrana Sialomucina Leucocitária 1 (PSGL-1; endocitose dependente de caveolina), proteína da família Anexina 2 (Anx2), glicanos sialilados e sulfato de heparano, também são conhecidos por mediar a entrada viral no hospedeiro (DANG et al., 2014; NISHIMURA et al., 2009; YAMAYOSHI et al., 2009; YAMAYOSHI; FUJII; KOIKE, 2014). O desnudamento do vírus é descrito por uma alteração conformacional induzida por alterações de pH no endossomo, culminando na liberação do genoma viral no citoplasma através de um poro endossomal (DANTHI et al., 2003). O RNA viral é traduzido em uma poliproteína precursora, processada pelas proteinases virais 2A^{pro}, 3C^{pro} e 3CD^{pro}, resultando nas proteínas estruturais e não estruturais (NG; HE; KWANG, 2015). A partir de estruturas membranosas induzidas pela replicação viral, geradas a partir de membranas hospedeiras e remodeladas para acumularem na área citoplasmática da célula, a replicação do genoma é iniciada pela atividade da enzima RNA polimerase dependente de RNA viral (RdRp - 3Dpol), que produz uma fita de RNA negativa como molde para síntese de novas fitas de RNA com

polaridade positivas (BAGGEN et al., 2018; VAN DER SCHAAR et al., 2016). Nas organelas, há um ambiente lipídico favorável criado pelas proteínas virais 2BC e 3A, com a contribuição das proteínas hospedeiras Domínio de Ligação Acil-coA contendo 3 (*Acyl-CoA Binding Domain Containing 3* - ACBD3), Fosfatidilinositol 4-quinase Beta (*Phosphatidylinositol 4-Kinase Beta* - PI4KB) e Proteína de Ligação de Oxisterol (*Oxysterol Binding Protein* - OSBP) (VAN DER LINDEN; WOLTHERS; VAN KUPPEVELD, 2015). O processo de replicação é seguido pela organização das proteínas do capsídeo em protômeros, e posteriormente em pentâmeros. Juntamente com uma cópia do RNA viral recém-sintetizado, os pentâmeros se agrupam e se organizam em um províron, que se torna maduro quando a proteína VP0 (precursora) é clivada em VP2 e VP4, dando origem ao vírus infeccioso. Por fim, a liberação da partícula viral pode ocorrer por duas vias: um processo não lítico de vesículas extracelulares ou por lise celular em estágio avançado de infecção (BAGGEN et al., 2018).

Figura 3. Representação esquemática do ciclo replicativo do Enterovírus A-71.



Fonte: Shiraz et. al, em preparação

1.3. Prevenção e tratamento contra o EV-A71

Até o momento, estão em fase de desenvolvimento e aprovação vacinas de: i) cepas atenuadas, que devem ser analisadas com cautela devido a possibilidade de reversão e desencadeamento de sintomas neurológicos; ii) vírus inativado com formalina, sendo a mais priorizada por induzir altos níveis de anticorpos específicos contra o EV-A71; iii) vetor viral, com a utilização de adenovírus como vetor; iv) partículas tipo-vírus (VLP, *virus like-particles*), que têm se mostrado altamente imunogênicas e com efeito protetor em camundongos recém-nascidos que receberam uma dose letal do vírus; v) proteína recombinante VP1, expressa em *Escherichia coli*, levedura ou sistema de baculovírus; e vi) peptídeos SP70, um epítipo da proteína de capsídeo VP1 (LI et al., 2021; YI; SHIN, 2017). Todavia, somente vacinas do vírus inteiro inativado, do subgenótipo C4, possuem permissão para veicular comercialmente na China e alguns países próximos. Para que sejam utilizadas mundialmente, outros testes necessitam ser realizados com o objetivo de comprovar a eficácia diante a variedade de cepas do EV-A71 (HU et al., 2013; NG; HE; KWANG, 2015; ZHU et al., 2014).

Apesar de ser um patógeno endêmico, ainda não existem tratamentos antivirais direcionados contra o EV-A71, portanto, a terapia se baseia no controle de sintomas por meio de anti-inflamatórios e antitérmicos (CHENG et al., 2014; GANTT et al., 2013; MAO et al., 2016). Desta forma, compostos naturais podem fornecer uma fonte de recursos para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais contra o enterovírus-71.

1.4. Compostos naturais como recurso para a identificação de candidatos a fármacos

Historicamente, compostos naturais de diversas origens são utilizados como fonte de identificação de medicamentos, desde antimicrobianos a anti-neoplásicos (ATANASOV et al., 2021; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Em geral, o uso de compostos naturais apresenta baixo custo, conta com uma grande variedade de químicos, e promove poucos efeitos adversos em comparação aos tratamentos convencionais (KITAZATO; YIFEI; KOBAYASHI, 2007). Ademais, o Brasil é rico em sua fauna e flora e possui a maior biodiversidade do planeta, o que explica o interesse cada vez mais crescente em pesquisas que envolvam a utilização de substâncias naturais para terapias (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

Os compostos naturais já foram descritos com atividade antiviral, como por exemplo o galato de epigallocatequina (EGCG) contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (YAMAGUCHI et al., 2002), o EGCG e o galato de teaflavina (TF3) contra o vírus da Influenza (NAKAYAMA et al., 1994), as proteínas isoladas de algas vermelhas, o extrato metanólico de

Phyllanthus amarus e flavonoides de *Pterogyne nitens*, contra o Hepacivírus-C (HCV) (JARDIM et al., 2015, 2018; REDDY et al., 2018; SHIMIZU et al., 2017a), e os eugenóis originados de louro contra o vírus do Ebola (LANE et al., 2019).

1.5. Atividades biológicas de proteínas isoladas da peçonha de serpentes

Dentre os compostos naturais, as peçonhas de serpentes têm sido relacionadas com diversas atividades biológicas por serem ricas em proteínas, aminoácidos, lipídeos e polipeptídios (CLEYSE et al., 2017; VILLALTA-ROMERO et al., 2017). Bailey e Wilce demonstraram a ação anti-hipertensiva em princípios ativos isolados da peçonha de *Bothrops jararaca*, que inibem a ECA (Enzima Conversora de Angiotensina) (BAILEY; WILCE, 2001). Uzair e colaboradores avaliaram a atividade de peçonha contra o câncer colorretal (UZAIR et al., 2018) e, ainda, em outro estudo, foram validadas propriedades antimicrobianas da peçonha de serpentes (DE BARROS et al., 2019).

Além disso, as proteínas isoladas da peçonha de serpentes foram associadas à atividade antiviral contra o HIV e alguns vírus pertencentes à família Flaviviridae, como o vírus da dengue (DENV) e o vírus da febre amarela (YFV) (BRENES; LORÍA; LOMONTE, 2020; BUSHRA UZAIR, RABIA BUSHRA, BARKAT ALI KHAN, 2018; MULLER et al., 2012). A peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*, um tipo de cascavél, é constituída por diversas proteínas, dentre elas a crotoxina, uma proteína dimérica formada por um peptídeo inativo (crotapotina) e uma fosfolipase A2 (PLA_{2CB}), enzima vinculada no processo de intoxicação da presa (RUSSO et al., 2019). A crotoxina e a PLA_{2CB} apresentaram atividade antiviral contra os vírus da dengue, da febre amarela, HCV e o CHIKV (MULLER et al., 2012; SANTOS et al., 2021; SHIMIZU et al., 2017b), enquanto a crotamina apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (YAMANE et al., 2013; YOUNT et al., 2009).

De forma semelhante, a peçonha da *Bothrops moojeni*, designada popularmente como “jararaca”, também tem sido amplamente estudada por apresentar atividades biológicas, se sobressaindo pelos seus efeitos bactericidas, anticoagulantes, leishmanicidas e antitumorais (BARBOSA et al., 2010; CASTILHOS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2013; STÁBELI et al., 2006). Nesse contexto, as propriedades biológicas apresentadas pelos constituintes das peçonhas de serpente demonstram o grande potencial terapêutico contido nessa classe de moléculas, se apresentando como fontes promissoras para a identificação e desenvolvimento de fármacos contra microrganismos patogênicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral de proteínas isoladas da peçonha das serpentes *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* no ciclo replicativo do EV-A71 *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Produzir e titular partículas virais de EV-A71, a fim de infectar células para o tratamento com os compostos, e avaliação da atividade antiviral;
- Avaliar a citotoxicidade das proteínas isoladas das serpentes *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* em células Vero, por meio de ensaio de viabilidade celular (MTT) e determinação da concentração citotóxica de 50% (CC₅₀);
- Avaliar a atividade antiviral de 4 proteínas isoladas da peçonha das serpentes *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* em células infectadas com EV-A71, por meio do ensaio antiviral e determinação da concentração efetiva da inibição da replicação viral de 50% (EC₅₀), e cálculo do índice de seletividade (SI).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Proteínas isoladas da peçonha de serpentes

As peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops moojeni* foram obtidas no Centro de Extração de Toxina Animal (CETA), devidamente registrado e aprovado pelo Ministério do Meio Ambiente (processo número 3002678). A coleta foi realizada da coleção Morungaba-SP, sob autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) e dos Recursos Naturais Renováveis (35/1/1998/000846–1), e a extração foi realizada por Jairo Marques do Vale (CETA). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentos relevantes disponíveis nas universidades federais, IBAMA e Ministério do Meio Ambiente. O isolamento e a purificação das fosfolipases MjTX-I e MjTX-II, a partir da peçonha de *Bothrops moojeni*, e das proteínas crotamina e PLA2_{CB}, a partir da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, foram realizados no Laboratório de Toxinologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As proteínas liofilizadas foram dissolvidas em PBS (tampão fosfato salino), filtradas e armazenadas a -80°C. As concentrações de cada proteína isolada da peçonha de serpente após dissolução foi confirmada através da realização da quantificação por ensaio colorimétrico utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay (ThermoFisher). Diluições das soluções-estoque contendo as proteínas foram realizadas anteriormente aos experimentos.

3.2. Cultura de células Vero

Células epiteliais de rim de macaco verde africano (Vero) foram cultivadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO-BRL) e suplementado com 100 U de penicilina por mL, 100 µg de estreptomicina por mL, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (GIBCO-BRL), incubadas em estufa a 37°C a 5% CO₂.

3.3. Ensaio de viabilidade celular e determinação de CC₅₀

Para estabelecer a concentração não tóxica das proteínas, uma suspensão de células Vero foi plaqueada em microplacas de 96 poços a uma concentração de 1x10⁴ células/poço e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Os compostos MjTX-I, MjTX-II, crotamina e PLA2_{CB} foram diluídos em meio de cultura DMEM 2% nas concentrações de 50, 25, 10 e 1 µg/ml, e posteriormente adicionadas às células por 72h. Em seguida, o sobrenadante foi

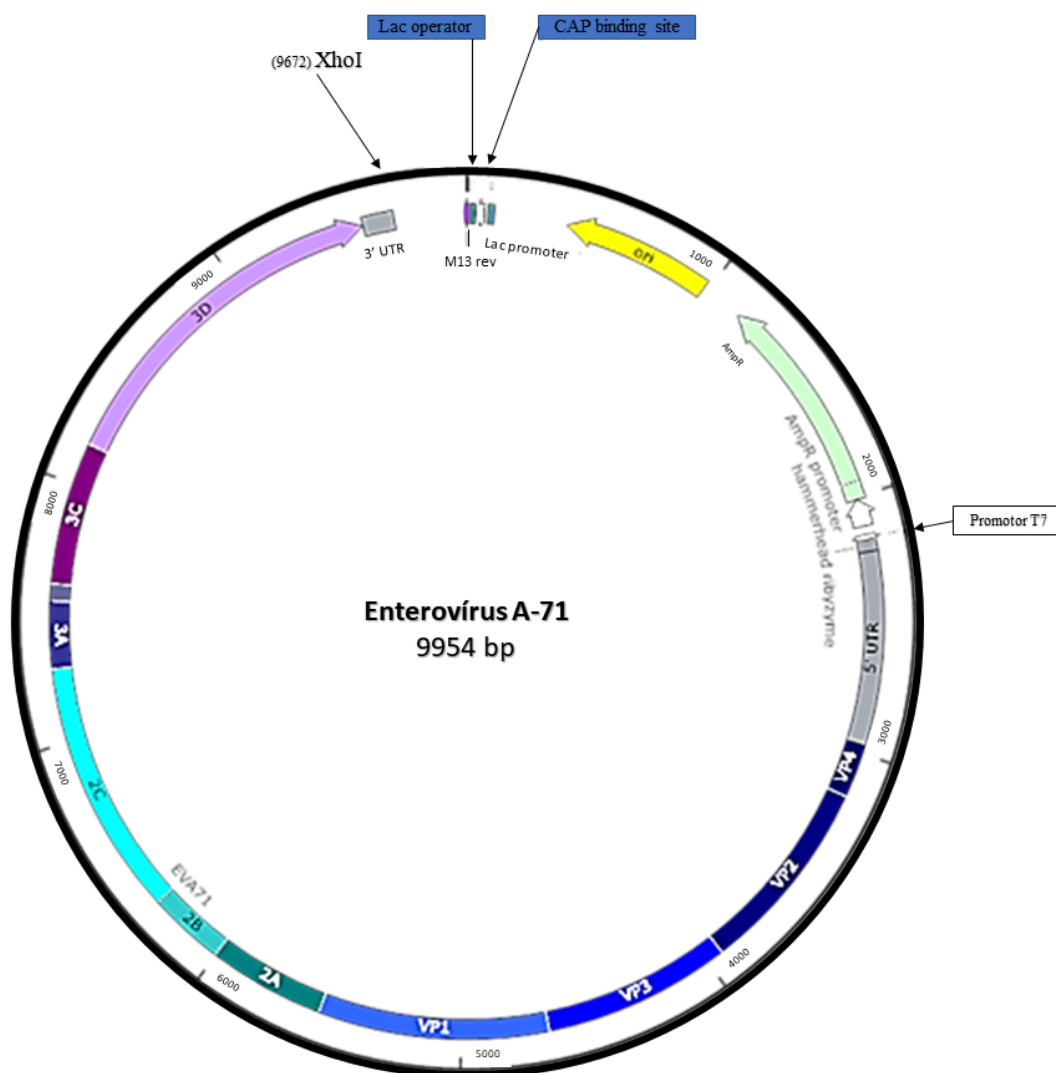
removido e 100 µL de uma solução contendo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) (Sigma-Aldrich) a 1 mg/mL de meio de cultura foi adicionada às células, que foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A solução de MTT foi removida, substituída pelo mesmo volume de DMSO, e submetida à leitura de comprimento de onda de 490 nm no leitor de placa GloMax (PROMEGA-BRL). PBS foi utilizado como controle não tratado, e a porcentagem da viabilidade celular foi determinada pela média dos poços tratados x 100/ média dos poços controle.

Para determinar a CC₅₀, as proteínas MjTX-I, MjTX-II, crotamina e PLA_{2CB} foram diluídas em meio de cultura DMEM 2%, por meio de uma diluição seriada 1:2, com as concentrações variando entre 1,2 e 150 µg/mL para as proteínas MjTX-I, MjTX-II e crotamina, e entre 0,4 e 50 µg/mL para a PLA_{2CB}, em seguida foram adicionadas às células para realização de ensaios de viabilidade celular, como descrito acima.

3.4. Produção de partículas virais do EV-A71

O plasmídeo referente à construção p-EVA71-B2 do vírus completo de EV-A71 foi sintetizado com base na sequência genética do vírus isolado da cepa Enterovírus A-71 B2 (**Figura 4**), cedido pela Prof^a Dr^a Nicola Stonehouse, da Universidade de Leeds, Reino Unido, para o Laboratório de Pesquisa em Antivirais (LAPAV) da UFU. O plasmídeo foi linearizado utilizando a reação de restrição pela enzima XhoI (ThermoFisher Scientific), purificado empregando o kit Wizard® DNA Clean-Up System (Promega), e transcrito em RNA utilizando o kit T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega), seguindo as instruções dos fabricantes para todos os protocolos. Células Vero foram eletroporadas com o RNA produzido, usando voltagem de 450V e 25 µF, e incubadas a 37°C a 5% de CO₂. Após formação do efeito citopático (lise celular), o sobrenadante foi coletado e congelado a -80 C°.

Figura 4. Esquema representativo do plasmídeo referente à construção p-EVA71-B2 do vírus completo de EV-A71.



3.5. Titulação viral

Para quantificar as partículas virais de EV-A71 produzidas, células Vero foram plaqueadas em uma placa de 96 poços a 1×10^4 células/poço e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em base 10 (1:10) do sobrenadante do vírus em DMEM incompleto e adicionados 50µL por poço de cada diluição, em sextuplicata. Após pipetagem das diluições na placa, as células foram adicionadas de 50µL de meio DMEM 2%, e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 72h o meio foi removido, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, incubando-se durante 30 minutos, e posteriormente coradas com cristal violeta 0.5%. O cálculo de TCID₅₀ foi realizado utilizando o método Reed–Muench (RAMAKRISHNAN, 1909).

3.6. Ensaio antiviral e determinação de EC₅₀

Para avaliar a atividade anti-EV-A71 das proteínas isoladas de peçonha de serpente, uma suspensão de células Vero foi plaqueada em microplacas de 96 poços a uma concentração de 1×10^4 células/poço e incubada em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Os compostos foram diluídos em meio de cultura contendo o EV-A71 a 100TCID₅₀ na sua maior concentração viável, e posteriormente adicionadas às células por 72h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e 100 µL de uma solução contendo MTT (Sigma-Aldrich) a 1mg/mL de meio de cultura foi adicionada às células, que foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A solução de MTT foi removida, substituída pelo mesmo volume de DMSO, e submetida à leitura de comprimento de onda de 490 nm no leitor de placa GloMax (PROMEGA). Foi utilizado PBS como controle não tratado. Os resultados foram então transformados em porcentagem, sendo calculada a inibição da replicação do EV-A71 nas células por cada proteína usando a seguinte fórmula $[(OD_t)EVA71 - (OD_c)EVA71] / [(OD_c)célula - (OD_c)EVA71] \times 100 (\%)$, onde (OD_t)EVA71 é a densidade óptica medida do tratamento em células infectadas com EV-A71; (OD_c)EVA71 é a densidade óptica medida para as células infectadas com EV-A71 do controle não tratado; e (OD_c)célula é a densidade óptica medida do controle de células não infectadas (SONG et al., 2014). A atividade antiviral foi apresentada como % da inibição da replicação do EV-A71.

Para determinar a EC₅₀, MjTX-I, MjTX-II, crotamina, e PLA-2_{CB} foram diluídas em meio de cultura contendo o EV-A71 a 100TCID₅₀, por meio de uma diluição seriada 1:2, e o ensaio antiviral foi realizado como descrito acima.

3.7. Análise estatística

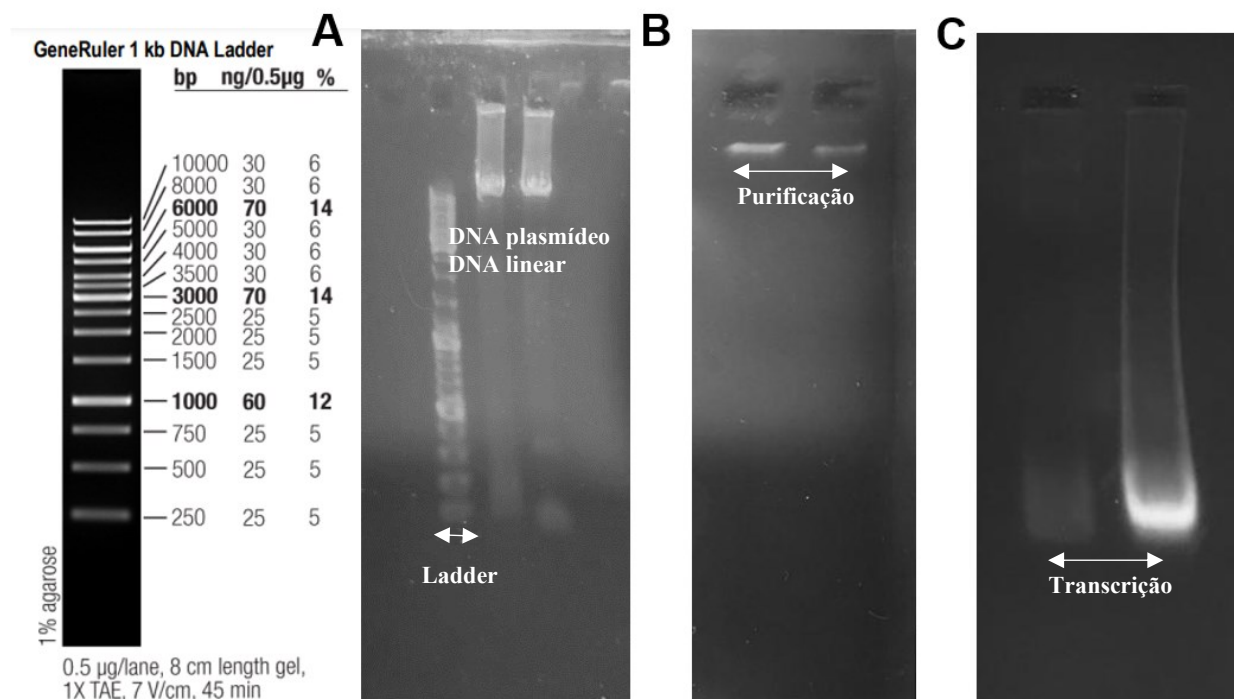
Todos os dados foram expressos através de média e desvio padrão. A análise estatística das diferenças foi determinada por meio de teste estatístico de análise de variância (*one-way* e *two-way* ANOVA) ou *t-Student*, onde valores de $p < 0.05$ são considerados significantes. Para estabelecimento dos valores de EC₅₀ e CC₅₀, os dados foram transformados em Log da concentração e submetidos a uma regressão não linear, com *slope* variável de quatro parâmetros.

4. RESULTADOS

4.1. Produção e titulação de partículas virais do EV-A71

Para obtenção do vírus EV-A71, o DNA plasmidial (**Figura 5A**) foi linearizado, a partir da reação da enzima XhoI, sendo possível a visualização da banda de aproximadamente 11kb, após eletroforese em gel de agarose (**Figura 5A**). O produto da linearização foi purificado usando o kit Wizard® DNA Clean-Up System (Promega), e visualizado em gel de agarose (**Figura 5B**), bem como o transcrito de RNA, produzido a partir do DNA linear, utilizando a enzima T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega) (**Figura 5C**). As etapas de purificação e transcrição foram realizadas duas vezes para garantir a concentração de 1µg de material genético.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de linearização plasmídeo, purificação do DNA linear e transcrição de RNA. (A) Resultado da linearização do plasmídeo. (B) Produtos da purificação do DNA linear. (C) Produtos das reações de transcrição de RNA, a partir do DNA linear.



Células Vero foram então transfectadas por eletroporação com o RNA do EV-A71 recém sintetizado, e após 48h de incubação foi possível a visualização de efeito citopático (morte celular). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. A titulação do sobrenadante foi realizada por meio de diluição seriada em base 10, incubadas por 72h, fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com cristal violeta 0,5%. A presença ou ausência de lise celular nos poços de cada diluição foi anotada e transposta na tabela do método de Reed–Muench, resultando em um título viral de 2.1×10^6 TCID₅₀/mL (**Figura 6 e7**).

Figura 6. Visualização do ensaio de titulação do EV-A71 em placa de 96 poços.

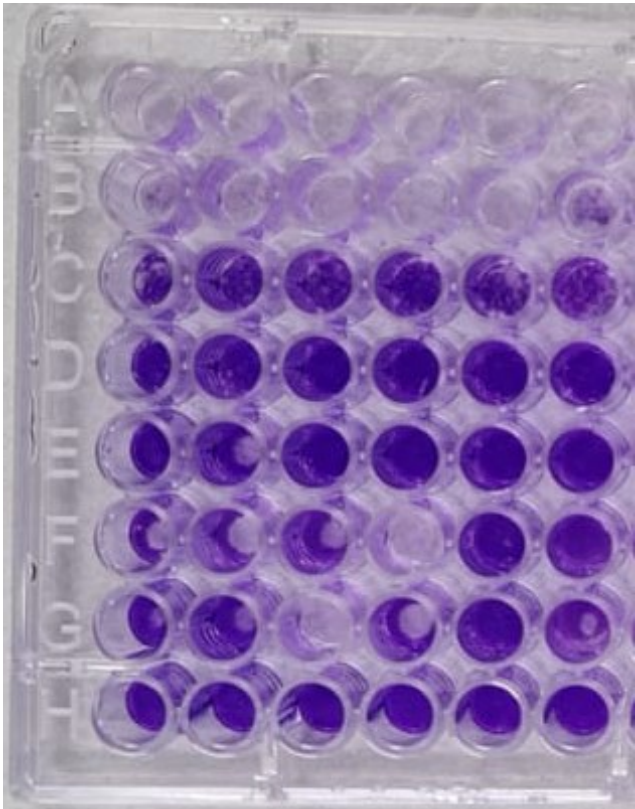


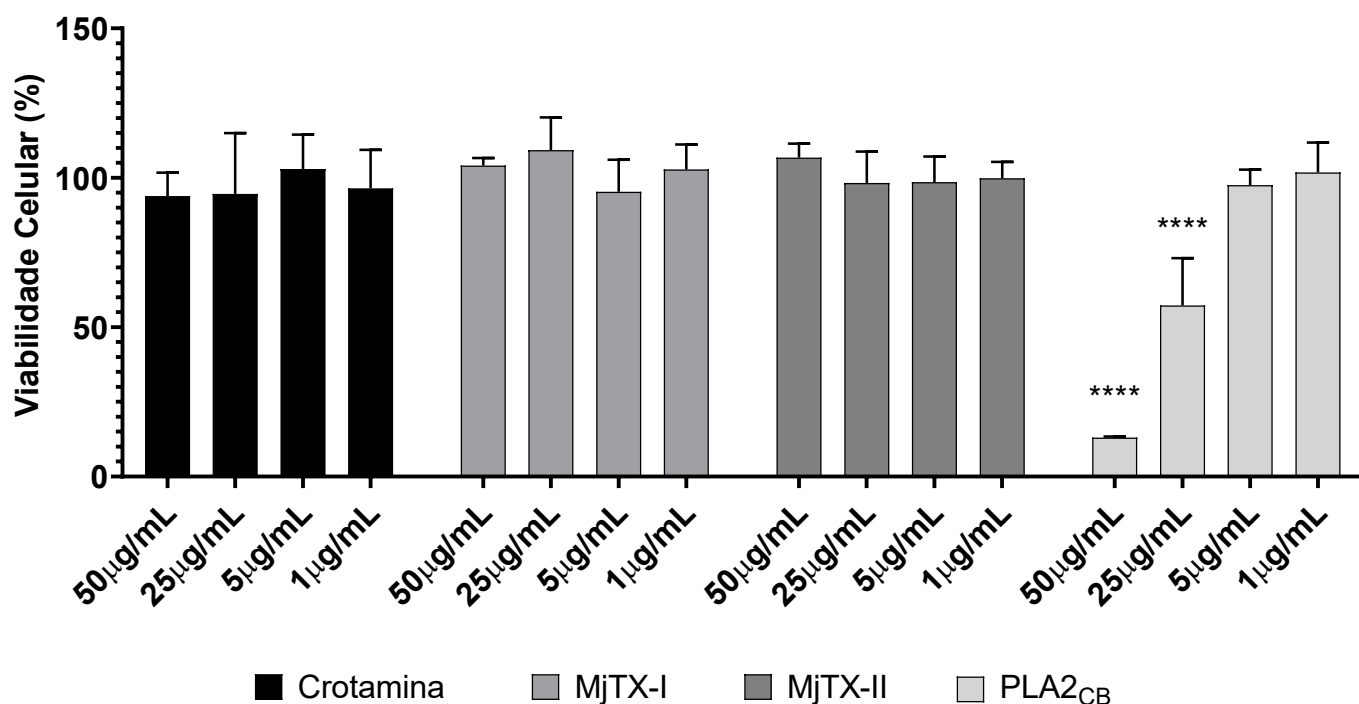
Figura 7. Calculadora de TCID₅₀.

volume por poço:			100 µl
poços de replicata por diluição:			6
fator de diluição:			1: 10
diluição do primeiro poço:			1: 10
<u>Diluição</u>	<u>número de poços positivos</u>	<u>número de poços negativos</u>	
1:10 (10 ⁻¹)	6	0	
1:100 (10 ⁻²)	6	0	
1:1000 (10 ⁻³)	6	0	
1:10000 (10 ⁻⁴)	5	1	
1:100000 (10 ⁻⁵)	3	3	
1:1000000 (10 ⁻⁶)	2	4	
1:10000000 (10 ⁻⁷)	1	5	
1:100000000 (10 ⁻⁸)	0	6	
1:1000000000 (10 ⁻⁹)	0	6	
1:10000000000 (10 ⁻¹⁰)	0	6	
1:100000000000 (10 ⁻¹¹)	0	6	
1:1000000000000 (10 ⁻¹²)	0	6	

4.2. Análise da viabilidade celular sob o tratamento com as proteínas isoladas de serpente

As proteínas isoladas de serpente foram avaliadas em relação à sua citotoxicidade por meio do tratamento de células Vero com compostos nas concentrações de 50, 25, 5 e 1 µg/mL. Como resultado, em todas as concentrações, as proteínas MjTX-I, MjTX-II e crotamina demonstraram uma viabilidade celular acima de 90% (**Figura 8**). Alternativamente, a PLA2_{CB} se apresentou citotóxica nas concentrações de 50 e 25 µg/mL, apresentando as melhores taxas de viabilidade celular a 5 µg/mL (**Figura 8**).

Figura 8. Viabilidade celular das proteínas isoladas de peçonha de serpentes nas concentrações de 50, 25, 5 e 1 µg/mL em células Vero. PBS foi utilizado como controle não tratado. Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em quadruplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados. P < 0,001 foi considerado significativo (****).

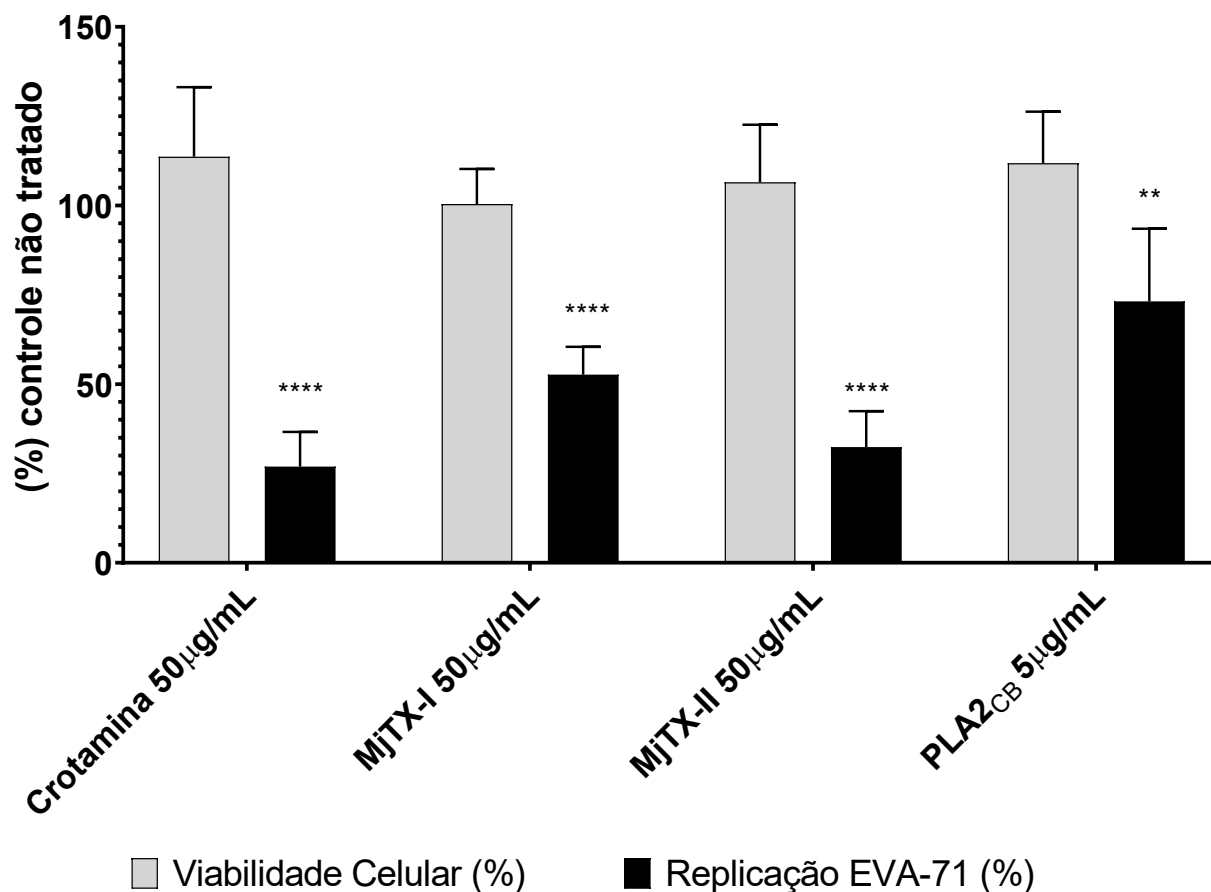


4.3. Proteínas isoladas de serpente inibem a replicação do EV-A71 *in vitro*

Após a triagem do perfil de citotoxicidade das proteínas isoladas de serpente, as maiores concentrações não citotóxicas foram selecionadas para avaliar a atividade antiviral, e o ensaio de viabilidade celular foi realizado paralelamente. As proteínas MjTX-I, MjTX-II e crotamina foram testadas a 50 µg/mL, e a PLA2_{CB} a 5 µg/mL. Nestas concentrações, todas as proteínas apresentaram viabilidade celular próxima ou de 100% (**Figura 9**). As proteínas crotamina e MjTX-II inibiram a replicação viral em 73% e 68%, respectivamente (**Figura 9**). Diferentemente, as proteínas MjTX-I e PLA2_{CB} inibiram a replicação do EV-A71 em 48% e

27%, nesta ordem (**Figura 9**).

Figura 9. Efeito das proteínas isoladas de serpente na viabilidade celular e replicação do EV-A71. Células Vero foram tratadas com os compostos MjTX-I, MjTX-II e crotamina a 50 µg/ml, e PLA2_{CB} a 5 µg/ml, na presença e ausência do EV-A71 (100TCID₅₀), e posteriormente adicionadas às células por 72h. A leitura foi realizada utilizando o ensaio de MTT. Barras cinza apresentam resultados da viabilidade celular (%) e, em preto, a replicação do EV-A71 (%). Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em triplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados. P < 0,01 foi considerado significativo. (****) P < 0.0001, (**) P < 0.0023. As imagens foram geradas utilizando o GraphPad Prism 8.



4.4. Proteínas isoladas de serpentes apresentam alto índice de seletividade

Para avaliar o potencial inibitório das proteínas isoladas da peçonha de serpente, um ensaio de dose-resposta foi realizado, por meio da diluição seriada dos compostos, com as concentrações variando entre 1,2 a 150 µg/mL para as proteínas MjTX-I, MjTX-II e crotamina, e entre 0,4 a 50 µg/mL para a PLA2_{CB}, na presença ou ausência do EV-A71 a 100TCID₅₀. Como resultado, as proteínas MjTX-I, MjTX-II, crotamina e PLA2_{CB} obtiveram um EC₅₀ de 5.9, 6.3, 8.3 e 4,2 µg/mL, respectivamente (**Figura 10, Tabela 1**). Adicionalmente, os compostos MjTX-I, MjTX-II, crotamina e PLA2_{CB} apresentaram um CC₅₀ >1000, 427.6, >1000 e 52.3 µg/mL, respectivamente (**Tabela 1**). Nesse sentido, as proteínas MjTX-I e a crotamina exibiram

SI >170.8 e >120.4, respectivamente, representando os maiores valores de SI entre as proteínas avaliadas. A MjTX-II apresentou um SI de 67.4, enquanto a PLA2_{CB} demonstrou o menor valor entre todas, de 12.5 (**Tabela 1**).

Figura 10. Concentração efetiva de 50% (EC₅₀) das proteínas de peçonha de serpentes. (A) Dados da proteína MjTX-I. **(B)** Dados da proteína MjTX-II. **(C)** Dados da proteína crotamina. **(D)** Dados da proteína PLA2_{CB}. Células Vero foram tratadas com MjTX-I, MjTX-II e crotamina, com as concentrações variando entre 1,2 a 150 µg/mL, e a PLA2_{CB} entre 0,4 a 50 µg/mL, na presença do EV-A71 (100TCID₅₀), e posteriormente adicionadas às células por 72h. A leitura foi realizada utilizando o ensaio de MTT. Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em triplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados.

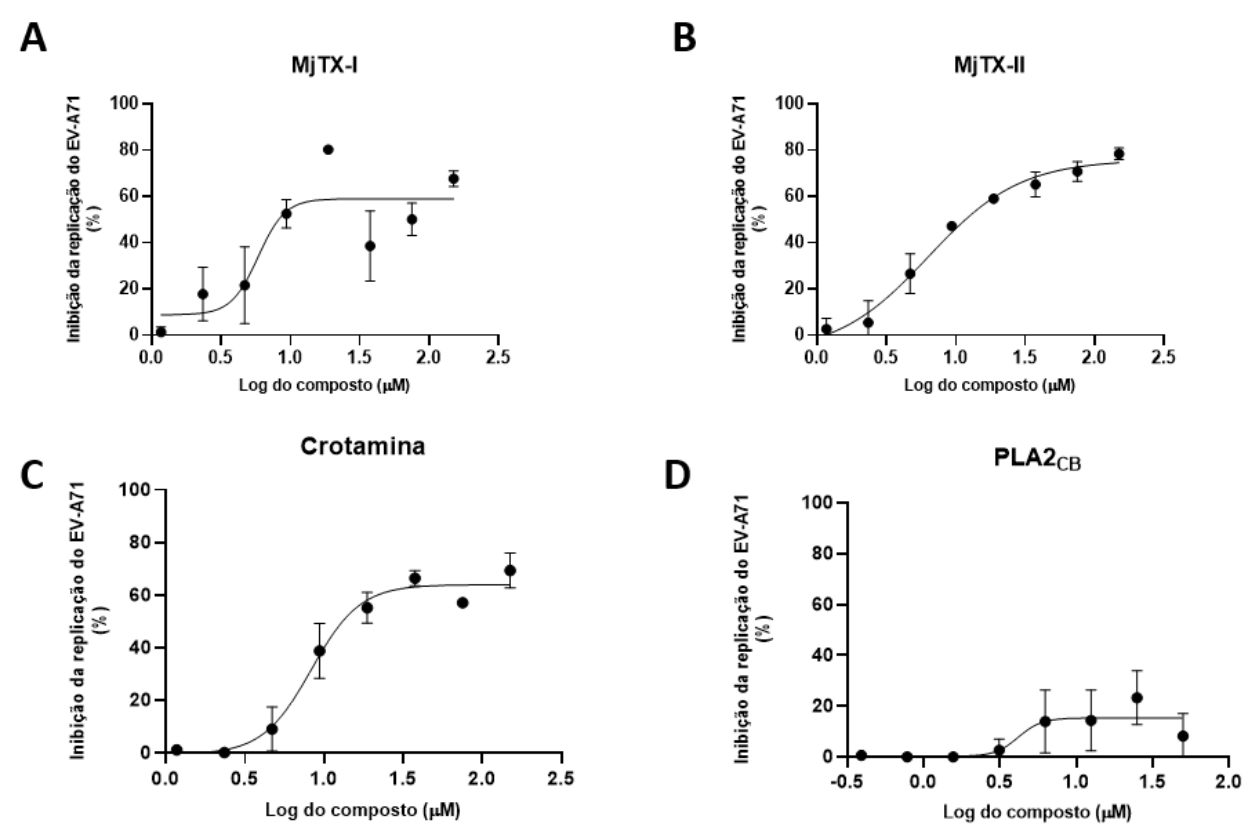


Tabela 1. Dados comparativos de CC₅₀, EC₅₀ e SI, entre as proteínas isoladas de serpente avaliadas neste estudo.

<i>Composto</i>	CC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	SI
<i>MjTX-I</i>	>1000	5,9	>170,8
<i>MjTX-II</i>	427,6	6,3	67,4
<i>Crotamina</i>	>1000	8,3	>120,4
<i>PLA2_{CB}</i>	52,3	4,2	12,5

5. DISCUSSÃO

Apesar do caráter endêmico em todo o mundo, as doenças ocasionadas pelo EV-A71 ainda são negligenciadas, e se apresentam como um grande problema de saúde pública mundial, especialmente pelo tropismo neural do vírus (PUENPA et al., 2019). Nesse sentido, a busca por compostos com atividade anti-EV-A71 para realizar um tratamento seguro e eficiente, é fundamental.

No presente estudo, observamos a alta viabilidade celular no tratamento das células Vero com as proteínas MjTX-I, MjTX-II e crotamina em concentrações de 50 µg/mL, e com a PLA2_{CB} na concentração de 5 µg/mL. As toxinas, no geral, têm demonstrado um grande potencial terapêutico, pela baixa citotoxicidade, dentre outras propriedades, chegando a valores de EC₅₀ menores que 8 µg/mL, semelhante ao que foi descrito aqui, corroborando com os dados encontrados neste estudo (MULLER et al., 2012; SHIMIZU et al., 2017b). Entretanto, a PLA2_{CB} apresentou uma citotoxicidade elevada e um baixo valor de SI, quando comparado as outras proteínas avaliadas, o que difere de trabalhos como o de Santos e colaboradores, no qual demonstraram uma menor citotoxicidade para esses compostos (SANTOS et al., 2021). Portanto, é possível sugerir que a PLA2_{CB} tenha citotoxicidade seletiva, dependendo da linhagem celular avaliada. Outro ponto a ser abordado é o EC₅₀ (4,2 µM) observado em nossos dados, que está de acordo com os valores encontrados por Muller, 2012 e Santos, 2021 (MULLER et al., 2012; SANTOS et al., 2021). O SI da PLA2_{CB} ser mais baixo do que as outras proteínas avaliadas pode estar relacionado ao fato de que essa é uma proteína com atividade catalítica, sendo sua atividade dirigida à membranas, e, conseqüentemente, envelopes virais (TEIXEIRA et al., 2020). Nesse sentido, o EV-A71, por não possuir envelope, se torna um alvo menos favorável, como já demonstrado para outros vírus não-envelopados (MULLER et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2020).

A crotamina, isolada de *Crotalus durissus terrificus*, e as proteínas MjTX-I e MjTX-II isoladas da *Bothrops moojeni*, foram as proteínas isoladas de peçonha que apresentaram o maior potencial antiviral neste estudo, com os valores de SI >120.4, >170.8 e 67.4, respectivamente. As proteínas MjTX-I e MjTX-II são subclasses da PLA₂, denominadas de toxinas PLA₂-like, ambas miotoxinas encontradas na peçonha de *Bothrops moojeni* (SALVADOR et al., 2018). Entretanto, após uma extensa revisão da literatura publicada até o momento, não foi possível identificar a descrição da atividade antiviral dessas proteínas para nenhum vírus. Por conseguinte, esse estudo se torna relevante ao trazer dados válidos em uma área desconhecida,

em relação à sua atividade antiviral. Não obstante, é possível sugerir que os dados encontrados aqui vão de acordo com o esperado para as proteínas dessa classe, visto a descrição de atividades contra outros patógenos, tal qual a atividade antimicrobiana de crotamina contra cepas fúngicas, como a *Candida albicans* e *Candida glabrata* (YAMANE et al., 2013). Adicionalmente, a crotamina foi avaliada em relação à sua citotoxicidade em células de feocromocitoma de glândula adrenal (PC12), células de rim embrionário (HEK293) e astrócitos, demonstrando uma baixa citotoxicidade (YAMANE et al., 2013), o que está de acordo com os resultados aqui demonstrados em que a citotoxicidade em células Vero foram quase inexistentes, dado os altos valores de CC₅₀ (>1000).

A MjTX-I também foi avaliada em relação à sua citotoxicidade em linhagens celulares de leucemia, induzindo a apoptose através da ativação de caspases, *downregulation* de Linfoma de células B2 (*B-cell lymphoma 2* - BCL-2) e *upregulation* da expressão de Agonista Associado à Morte Celular BCL2 (*BCL2 Associated Agonist Of Cell Death* - BAD), demonstrando ser um potencial composto no tratamento de leucemia mieloide crônica (BENATI et al., 2017). A MjTX-II, na mesma perspectiva, demonstrou possuir atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Candida albicans*, além de demonstrar atividade antitumoral em linhagens celulares humanas (células de leucemia T humana – Jurkat; adenocarcinoma de mama humano - SK-BR-3) e de camundongos (tumor de Ascite de Ehrlich - EAT). Adicionalmente, a MjTX-II foi capaz de produzir efeitos parasiticidas contra *Schistosoma mansoni* e *Leishmania* spp. (STÁBELI et al., 2006).

Outras proteínas isoladas da peçonha da serpente *Bothrops sp* demonstraram relevante atividade contra o *Staphylococcus aureus*, inibindo seu crescimento (CISCOTTO et al., 2009). Ainda, glicoproteínas, como a lectina, possui caráter citotóxico à células cancerígenas renais e pancreáticas (MEHTA; SASHINDRAN, 2002). Barbosa e colaboradores também avaliaram os efeitos de proteínas oxidases contra *Leishmania* sp., que comprovaram serem tóxicas para os parasitas, sem demonstrar citotoxicidade (BARBOSA et al., 2021). Nesse sentido, a atividade biológica dessas proteínas era esperada, porém permaneciam inexploradas como potencial terapêutico antiviral. Os resultados aqui enfatizam a importância da avaliação biológica de compostos naturais, principalmente aqueles isolados de peçonha de animais, visto a diversidade e heterogeneidade de componentes, que permitiram a identificação de substâncias já aplicadas na clínica, assim como propicia o estudo de várias outras moléculas que permanecem pouco exploradas (CHAN et al., 2016).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, dentre as proteínas isoladas das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus terrificus*, a MjTX-I e a crotamina são os compostos com a melhor relação entre CC₅₀ e EC₅₀, com um valor de SI >170.8 e >120.4, respectivamente. A PLA2_{CB} foi a substância com a menor atividade antiviral e maior citotoxicidade. Outros estudos são necessários para avaliar os mecanismos de ação das proteínas MjTX-I, MjTX-II e crotamina. A partir de uma extensa revisão bibliográfica, é possível sugerir que este trabalho revela pela primeira vez a atividade da proteína MjTX-I, MjTX-II e crotamina no ciclo replicativo do EV-A71, assim como é a primeira descrição da atividade biológica dessas proteínas contra vírus, fornecendo dados úteis para pesquisas aplicadas ao desenvolvimento de terapias contra doenças causadas pelo enterovírus A-71.

7. REFERÊNCIAS

- ATANASOV, Atanas G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021. ISSN: 14741784. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- BAGGEN, Jim; THIBAUT, Hendrik Jan; STRATING, Jeroen R. P. M.; VAN KUPPEVELD, Frank J. M. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 368–381, 2018. ISSN: 17401534. ISBN: 4157901800. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0005-4>
- BAILEY, Paul; WILCE, Jacqueline. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emergency Medicine Australasia**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 28–36, 2001. ISSN: 1742-6731. <https://doi.org/10.1046/j.1442-2026.2001.00174.x>
- BARBOSA, Luana Gonçalves et al. A comparative study on the leishmanicidal activity of the L-amino acid oxidases BjussuLAAO-II and BmooLAAO-II isolated from Brazilian Bothrops snake venoms. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 167, p. 267–278, 2021. ISSN: 18790003. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.146>
- BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; TOYAMA, M. H.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. A. S. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from Bothrops moojeni. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 493–504, 2010. ISSN: 16789199. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000300016>
- BENATI, Rogério Bodini; COSTA, Tássia Rafaela; DA COSTA CACEMIRO, Maira; SAMPAIO, Suely Vilela; DE CASTRO, Fabíola Attié; BURIN, Sandra Mara. Cytotoxic and pro-apoptotic action of MjTX-I, a phospholipase A2 isolated from Bothrops moojeni snake venom, towards leukemic cells. **Journal of Venomous**

Animals and Toxins Including Tropical Diseases, [*S. l.*], v. 23, n. 1, p. 24–40, 2017. ISSN: 16789199.

<https://doi.org/10.1186/s40409-017-0104-0>

BESSAUD, Maël et al. Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity. **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 9, n. 3, p. 1–9, 2014. ISSN: 19326203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090624>

BRENES, Hebleen; LORÍA, Gilbert D.; LOMONTE, Bruno. Potent virucidal activity against Flaviviridae of a group IIA phospholipase A2 isolated from the venom of *Bothrops asper*. **Biologicals**, [*S. l.*], v. 63, p. 48–52, 2020. ISSN: 10451056. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.002>

BROWN, Betty A.; PALLANSCH, Mark A. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. **Virus Research**, [*S. l.*], v. 39, n. 2–3, p. 195–205, 1995. ISSN: 01681702. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)00087-9](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)00087-9)

BUSHRA UZAIR*, RABIA BUSHRA, BARKAT ALI KHAN, Sarwat Zareen and Fehmida Fasim. Potential Uses of Venom Proteins in Treatment of HIV. **Protein & Peptide Letters**, [*S. l.*], v. 25, n. 7, p. 619–625, 2018. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180628161107>

CARDOSA, Mary Jane; PERERA, David; BROWN, Betty A.; CHEON, Doosung; CHAN, Hung Ming; CHAN, Kwai Peng; CHO, Haewol; MCMINN, Peter. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: Comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. **Emerging Infectious Diseases**, [*S. l.*], v. 9, n. 4, p. 461–468, 2003. ISSN: 10806040. <https://doi.org/10.3201/eid0904.020395>

CASTILHOS, P.; PEREIRA, C. G.; SILVA, A. L. N.; NAPOLITANO, D. R.; OLIVEIRA, F.; SOUZA, M. A. Effects of *Bothrops moojeni* venom on *Leishmania amazonensis* promastigote forms. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [*S. l.*], v. 17, n. 2, p. 150–158, 2011. ISSN: 16789199. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000200005>

CASTRO, Ceyla M. O.; CRUZ, Ana Cecilia R.; DA SILVA, Edson E.; GOMES, Maria De Lourdes C. Molecular and seroepidemiologic studies of enterovirus 71 infection in the state of Pará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [*S. l.*], v. 47, n. 2, p. 65–71, 2005. ISSN: 00364665. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652005000200002>

CHAN, Yau Sang; CHEUNG, Randy Chi Fai; XIA, Lixin; WONG, Jack Ho; NG, Tzi Bun; CHAN, Wai Yee. Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [*S. l.*], v. 100, n. 14, p. 6165–6181, 2016. ISSN: 14320614. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7610-9>

CHANG, Luan Yin. Enterovirus 71 in Taiwan. **Pediatrics and Neonatology**, [*S. l.*], v. 49, n. 4, p. 103–112, 2008. ISSN: 18759572. DOI: 10.1016/S1875-9572(08)60023-6. [https://doi.org/10.1016/S1875-9572\(08\)60023-6](https://doi.org/10.1016/S1875-9572(08)60023-6)

CHANG, Luan Yin; LIN, Hsiang Yuan; GAU, Susan Shur Fen; LU, Chin Yu; HSIA, Shao Hsuan; HUANG, Yhu Chering; HUANG, Li Min; LIN, Tzou Yien. Enterovirus A71 neurologic complications and long-term sequelae. **Journal of Biomedical Science**, [*S. l.*], v. 26, n. 1, p. 4–9, 2019. ISSN: 14230127. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0552-7>

- CHANG, Yu Kang; CHEN, Kou Huang; CHEN, Kow Tong. Hand, foot and mouth disease and herpangina caused by enterovirus a71 infections: A review of enterovirus a71 molecular epidemiology, pathogenesis, and current vaccine development. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [S. l.], v. 60, n. October, p. 1–8, 2018. ISSN: 16789946. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860070>
- CHEN, Kow Tong; CHANG, Hsiao Ling; WANG, Shan Tair; CHENG, Yan Tzong; YANG, Jyh Yuan. Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998–2005. **Pediatrics**, [S. l.], v. 120, n. 2, p. 1998–2005, 2007. ISSN: 00314005. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3331>
- CHENG, Hao Yuan; HUANG, Yi Chuan; YEN, Ting Yu; HSIA, Shao Hsuan; HSIEH, Yu Chia; LI, Chung Chen; CHANG, Luan Yin; HUANG, Li Min. The correlation between the presence of viremia and clinical severity in patients with enterovirus 71 infection: A multi-center cohort study. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–8, 2014. ISSN: 14712334. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-417>
- CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from Bothrops jararaca snake venom. **Toxicon**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 330–341, 2009. ISSN: 00410101. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.004>
- CLEYSE, Élida; DA MATA, Gomes; BARBOSA, Caroline; MOURÃO, Farias; RANGEL, Marisa; SCHWARTZ, Elisabeth Ferroni. Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. [S. l.], 2017. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0089-0>
- COX, Jonathan A.; HISCOX, Julian A.; SOLOMON, Tom; OOI, Mong How; NG, Lisa F. P. Immunopathogenesis and virus-host interactions of enterovirus 71 in patients with hand, foot and mouth disease. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. NOV, p. 1–14, 2017. ISSN: 1664302X. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02249>
- DA SILVA, EDSON E.; FILLIPIS, ANA M. B.; SCHATZMAYR, HERMANN G.; CORTES, Luzia C. Evidence of enterovirus 71 infections in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 85, p. 131–132, 1990. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761990000100025>
- DANG, Minghao et al. Molecular mechanism of SCARB2-mediated attachment and uncoating of EV71. **Protein & cell**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 692–703, 2014. ISSN: 16748018. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0087-3>
- DANTHI, Pranav; TOSTESON, Magdalena; LI, Qi-han; CHOW, Marie. Genome Delivery and Ion Channel Properties Are Altered in VP4 Mutants of Poliovirus. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 77, n. 9, p. 5266–5274, 2003. ISSN: 0022-538X. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.9.5266-5274.2003>
- DE BARROS, Elizângela; GONÇALVES, Regina M.; CARDOSO, Marlon H.; SANTOS, Nuno C.; FRANCO, Octávio L.; CÂNDIDO, Elizabete S. Snake venom cathelicidins as natural antimicrobial peptides. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 10, n. November, p. 1–13, 2019. ISSN: 16639812. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01415>
- GANTT, Soren; YAO, Lena; KOLLMANN, Tobias R.; CASPER, Corey; ZHANG, Jing; SELF, Steven G. Implications of age-dependent immune responses to enterovirus 71 infection for disease pathogenesis and

vaccine design. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 163–170, 2013. ISSN: 20487207. <https://doi.org/10.1093/jpids/pit017>

HARVEY, Alan L.; EDRADA-EBEL, Ruangelie; QUINN, Ronald J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015. ISSN: 14741784. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>

HU, Yue Mei et al. Immunogenicity, safety, and lot consistency of a novel inactivated enterovirus 71 vaccine in Chinese children aged 6 to 59 months. **Clinical and Vaccine Immunology**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 1805–1811, 2013. ISSN: 15566811. <https://doi.org/10.1128/CVI.00491-13>

HYYPÄÄ, Timo; HOVI, Tapani; KNOWLES, Nicholas J.; STANWAY, Glyn. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 1–11, 1997. ISSN: 00221317. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-1-1>

JARDIM, A. C. G. et al. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 115, p. 39–47, 2015. ISSN: 18729096. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.12.018. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.018>

JARDIM, Ana Carolina Gomes; SHIMIZU, Jacqueline Farinha; RAHAL, Paula; HARRIS, Mark. Plant-derived antivirals against hepatitis c virus infection. **Virology Journal**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–13, 2018. ISSN: 1743422X. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0945-3>

KAMAU, Everlyn; NGUYEN, Dung; CELMA, Cristina; BLOMQVIST, Soile; HORBY, Peter; SIMMONDS, Peter; HARVALA, Heli. Seroprevalence and virologic surveillance of enterovirus 71 and coxsackievirus A6, United Kingdom, 2006–2017. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 2261–2268, 2021. ISSN: 10806059. <https://doi.org/10.3201/eid2709.204915>

KITAZATO, Kaio; YIFEI, Wang; KOBAYASHI, Bonuyuki. DDT_07(1)14-22.indd. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. **Drug Discov Ther.**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 14–22, 2007. Disponível em: <papers://c33b182f-cf88-47e8-a9c5-ad67b5626483/Paper/p1713>.

LANE, Thomas; ANANTPADMA, Manu; FREUNDLICH, Joel S.; DAVEY, Robert A.; MADRID, Peter B.; EKINS, Sean. The Natural Product Eugenol Is an Inhibitor of the Ebola Virus In Vitro. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 2–7, 2019. ISSN: 1573904X. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2629-0>

LI, Mei Ling; SHIH, Shin Ru; TOLBERT, Blanton S.; BREWER, Gary. Enterovirus a71 vaccines. **Vaccines**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 1–10, 2021. ISSN: 2076393X. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030199>

MAO, Qunying; WANG, Yiping; BIAN, Lianlian; XU, Miao; LIANG, Zhenglun. EV-A71 vaccine licensure: a first step for multivalent enterovirus vaccine to control HFMD and other severe diseases. **Emerging Microbes and Infections**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–7, 2016. ISSN: 22221751. DOI: 10.1038/emi.2016.73. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.73>

MCMINN, Peter C. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 91–107, 2002. ISSN: 1574-6976.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00601.x>

MEHTA, S. R.; SASHINDRAN, V. K. Clinical features and management of snake bite. **Medical Journal Armed Forces India**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 247–249, 2002. ISSN: 03771237. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(02\)80140-X](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(02)80140-X)

MULLER, Vanessa Danielle Menjon; RUSSO, Raquel Rinaldi; OLIVEIRA CINTRA, Adelia Cristina; SARTIM, Marco Aurélio; DE MELO ALVES-PAIVA, Raquel; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes; SAMPAIO, Suely Vilela; AQUINO, Victor Hugo. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 507–515, 2012. ISSN: 0041-0101. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.05.021>

MULLER, Vanessa Danielle; SOARES, Ricardo Oliveira; SANTOS-JUNIOR, Nilton Nascimento Dos; TRABUCO, Ama Cristina; CINTRA, Adelia Cristina; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu; CALIRI, Antonio; SAMPAIO, Suely Vilela; AQUINO, Victor Hugo. Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 1–10, 2014. ISSN: 19326203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112351>

NAKAYAMA, M.; TODA, M.; OKUBO, S.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by black tea extract. **Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases**, [S. l.], v. 68, n. 7, p. 824–829, 1994. ISSN: 03875911. <https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi1970.68.824>

NG, Qingyong; HE, Fang; KWANG, Jimmy. Recent progress towards novel EV71 anti-therapeutics and vaccines. **Viruses**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. 6441–6457, 2015. ISSN: 19994915. <https://doi.org/10.3390/v7122949>

NISHIMURA, Yorihiro; SHIMOJIMA, Masayuki; TANO, Yoshio; MIYAMURA, Tatsuo; WAKITA, Takaji; SHIMIZU, Hiroyuki. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. **Nature Medicine**, [S. l.], 2009. ISSN: 10788956. <https://doi.org/10.1038/nm.1961>

NIU, Yan et al. Control measures during the COVID-19 outbreak reduced the transmission of hand, foot, and mouth disease. **Journal of Safety Science and Resilience**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 63–68, 2021. ISSN: 26664496. DOI: 10.1016/j.jnlssr.2021.06.002. <https://doi.org/10.1016/j.jnlssr.2021.06.002>

OOI, Mong How; WONG, See Chang; LEWTHWAITE, Penny; CARDOSA, Mary Jane; SOLOMON, Tom. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 1097–1105, 2010. ISSN: 14744422. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70209-X. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70209-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70209-X)

PUENPA, Jiratchaya; WANLAPAKORN, Nasamon; VONGPUNSAWAD, Sompong; POOVORAWAN, Yong. The History of Enterovirus A71 Outbreaks and Molecular Epidemiology in the Asia-Pacific Region. **Journal of Biomedical Science**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 1–11, 2019. ISSN: 14230127. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0573-2>

RAMAKRISHNAN, Muthannan Andavar. Review of The Method of “Right and Wrong Cases” (‘Constant Stimuli’) without Gauss’s Formula. **Psychological Bulletin**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 27–28, 1909. ISSN: 0033-2909.

<https://doi.org/10.1037/h0063767>

REDDY, B. Uma et al. A natural small molecule inhibitor corilagin blocks HCV replication and modulates oxidative stress to reduce liver damage. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 150, n. 2018, p. 47–59, 2018. ISSN: 18729096. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.12.004. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.12.004>

RUSSO, Raquel Rinaldi; DOS SANTOS JÚNIOR, Nilton Nascimento; CINTRA, Adélia Cristina Oliveira; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes; SAMPAIO, Suelly Vilela; AQUINO, Victor Hugo. Expression, purification and virucidal activity of two recombinant isoforms of phospholipase A 2 from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 164, n. 4, p. 1159–1171, 2019. ISSN: 03048608. ISBN: 0070501904. DOI: 10.1007/s00705-019-04172-6. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04172-6>

SALVADOR, Guilherme H. M.; DREYER, Thiago R.; GOMES, Antoniel A. S.; CAVALCANTE, Walter L. G.; DOS SANTOS, Juliana I.; GANDIN, César A.; DE OLIVEIRA NETO, Mário; GALLACCI, Márcia; FONTES, Marcos R. M. Structural and functional characterization of suramin-bound MjTX-I from *Bothrops moojeni* suggests a particular myotoxic mechanism. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018. ISSN: 20452322. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28584-7>

SANTOS, Igor Andrade et al. Chikungunya virus entry is strongly inhibited by phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021. ISSN: 20452322. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1038/s41598-021-88039-4. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88039-4>

SCHMIDT, N. J.; LENNETTE, E. H.; HO, H. H. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 129, n. 3, p. 304–309, 1974. ISSN: 00221899. <https://doi.org/10.1093/infdis/129.3.304>

SHIMIZU, Jacqueline Farinha et al. Flavonoids from *Pterogyne nitens* Inhibit Hepatitis C Virus Entry. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017 a. ISSN: 20452322. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16336-y>

SHIMIZU, Jacqueline Farinha et al. Multiple effects of toxins isolated from *Crotalus durissus terrificus* on the hepatitis C virus life cycle Multiple effects of toxins isolated from *Crotalus durissus terrificus* on the hepatitis C virus life cycle Jacqueline Farinha Shimizu 1, Mariana Nogu. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 1–19, 2017 b. ISSN: 1932-6203. ISBN: 1111111111. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187857>

SILVEIRA, Lucas B. et al. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from *Bothrops moojeni* snake venom. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 73, p. 35–43, 2013. ISSN: 07317085. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.04.008. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.04.008>

SOLOMON, Tom; LEWTHWAITE, Penny; PERERA, David; CARDOSA, Mary Jane; MCMINN, Peter; OOI, Mong How. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 778–790, 2010. ISSN: 14733099. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70194-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70194-8)

SONG, Jae Hyoung et al. Antiviral activity of hederasaponin B from *hedera helix* against enterovirus 71 subgenotypes c3 and C4a. **Biomolecules and Therapeutics**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 41–46, 2014. ISSN: 20054483. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.108>

STÁBELI, Rodrigo G. et al. Bothrops moojeni myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 142, n. 3- 4 SPEC. ISS., p. 371–381, 2006. ISSN: 15320456.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.020>

TAKIMOTO, Sueko et al. Enterovirus 71 infection and acute neurological disease among children in Brazil (1988-1990). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 92, n. 1, p. 25–28, 1998. ISSN: 00359203. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(98\)90939-7](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)90939-7)

TAN, Chee Wah; LAI, Jeffrey Kam Fatt; SAM, I. Ching; CHAN, Yoke Fun. Recent developments in antiviral agents against enterovirus 71 infection. **Journal of Biomedical Science**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 1–11, 2014. ISSN: 10217770. DOI: 10.1186/1423-0127-21-14. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-14>

TEIXEIRA, S. C. et al. Insights into the antiviral activity of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 164, p. 616–625, 2020. ISSN: 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.178. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.178>

UZAIR, BUSHRA; ATLAS, NAGINA; MALIK, SIDRA BATOOL; JAMIL, NAZIA; OJUOLAPE SALAAM TEMITOPE; REHMAN MUJADDAD UR; KHAN, Barkat Ali. Snake Venom as an Effective Tool Against Colorectal Cancer. **Protein & Peptide Letters**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 626–632, 2018. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180614112935>

VALLI, Marilia; RUSSO, Helena M.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 763–778, 2018. ISSN: 16782690. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>

VAN DER LINDEN, Lonneke; WOLTERS, Katja C.; VAN KUPPEVELD, Frank J. M. Replication and inhibitors of enteroviruses and parechoviruses. **Viruses**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. 4529–4562, 2015. ISSN: 19994915. <https://doi.org/10.3390/v7082832>

VAN DER SCHAAR, Hilde M.; DOROBANTU, Cristina M.; ALBULESCU, Lucian; STRATING, Jeroen R. P. M.; VAN KUPPEVELD, Frank J. M. Fat(al) attraction: Picornaviruses Usurp Lipid Transfer at Membrane Contact Sites to Create Replication Organelles. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 24, n. 7, p. 535–546, 2016. ISSN: 18784380. DOI: 10.1016/j.tim.2016.02.017. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.017>

VILLALTA-ROMERO, Fabian; BORRO, Luiz; MANDIC, Boris; ESCALANTE, Teresa; RUCAVADO, Alexandra; GUTIÉRREZ, Jose María; NESHICH, Goran; TASIC, Ljubica. Discovery of small molecule inhibitors for the snake venom metalloprotease BaP1 using in silico and in vitro tests. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 2018–2022, 2017. ISSN: 14643405. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.007>

WANG, Bin; LI, Jingliang; WANG, Yang; DU, Na; SUN, Luyao; XIAO, Huimin; ZHAO, Ying; BAO, Wanguo; ZHANG, Wenyan. Understanding the epidemiological characteristics of EV71 and CVA16 infection to aid the diagnosis and treatment of hand, foot, and mouth disease. **Journal of Medical Virology**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 201–207, 2019. ISSN: 10969071. <https://doi.org/10.1002/jmv.25282>

- WANG, Xiao Fang; LU, Jiao; LIU, Xiao Xia; DAI, Ting. Epidemiological features of hand, foot and mouth disease outbreaks among Chinese preschool children: A meta-analysis. **Iranian Journal of Public Health**, [S. l.], v. 47, n. 9, p. 1234–1243, 2018. ISSN: 22516093.
- XING, Weijia et al. Epidemiological characteristics of hand-foot-and-mouth disease in China, 2008-2012. [S. l.], v. 14, n. 155, p. 308–318, 2015. Epidemiological. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70342-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70342-6).
- XU, Jun; WANG, Fang; ZHAO, Desheng; LIU, Jiang; SU, Hong; WANG, Baolong. Sequence analysis-based characterization and identification of neurovirulence-associated variants of 36 EV71 strains from China. **Journal of Medical Virology**, [S. l.], v. 90, n. 8, p. 1310–1317, 2018. ISSN: 10969071. <https://doi.org/10.1002/jmv.25081>
- YAMAGUCHI, Koushi; HONDA, Mitsuo; IKIGAI, Hajime; HARA, Yukihiro; SHIMAMURA, Tadakatsu. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Antiviral Research**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 19–34, 2002. ISSN: 01663542. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(01\)00189-9](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(01)00189-9)
- YAMANE, Erica S. et al. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crostamine. **Biochimie**, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 231–240, 2013. ISSN: 03009084. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.019>
- YAMAYOSHI, Seiya; FUJII, Ken; KOIKE, Satoshi. Receptors for enterovirus 71. **Emerging Microbes and Infections**, [S. l.], v. 3, n. 000, p. 0, 2014. ISSN: 22221751. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.49>
- YAMAYOSHI, Seiya; YAMASHITA, Yasuko; LI, Jifen; HANAGATA, Nobutaka; MINOWA, Takashi; TAKEMURA, Taro; KOIKE, Satoshi. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. **Nature Medicine**, [S. l.], 2009. ISSN: 10788956. <https://doi.org/10.1038/nm.1992>
- YI, Eun-je; SHIN, Yun-ju. CLINICAL EXPERIMENTAL VACCINE Enterovirus 71 infection and vaccines. **Clin Exp Vaccine Res**, [S. l.], v. 6, p. 0–4, 2017. <https://doi.org/10.7774/cevr.2017.6.1.4>
- YOUNT, Nannette Y.; KUPFERWASSER, Deborah; SPISNI, Alberto; DUTZ, Stephen M.; RAMJAN, Zachary H.; SHARMA, Shantanu; WARING, Alan J.; YEAMAN, Michael R. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crostamine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 106, n. 35, p. 14972–14977, 2009. ISSN: 00278424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904465106>
- YUAN, Jingjing; SHEN, Li; WU, Jing; ZOU, Xinran; GU, Jiaqi; CHEN, Jianguo; MAO, Lingxiang. **Enterovirus A71 proteins: Structure and function**. **Frontiers in Microbiology** 2018. ISSN: 1664302X. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00286>
- ZHU, Fengcai et al. Efficacy, Safety, and Immunogenicity of an Enterovirus 71 Vaccine in China. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 370, n. 9, p. 818–828, 2014. ISSN: 0028-4793. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304923>
- ZHUANG, Zhi Chao et al. Epidemiological research on hand, foot, and mouth disease in Mainland China. **Viruses**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. 6400–6411, 2015. ISSN: 19994915. <https://doi.org/10.3390/v7122947>

