

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ELCANA WERNECK PADUA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXIDADE E DA ATIVIDADE VIRUCIDA DE
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE VENENO DE ESCORPIÃO**

PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2019

ELCANA WERNECK PADUA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXIDADE E DA ATIVIDADE VIRUCIDA DE
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE VENENO DE ESCORPIÃO**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme R. O. e Freitas

PATOS DE MINAS – MG

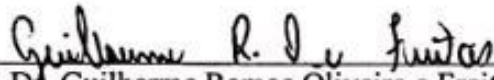
DEZEMBRO DE 2019

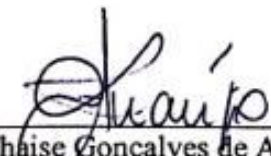
ELCANA WERNECK PADUA DE SOUSA

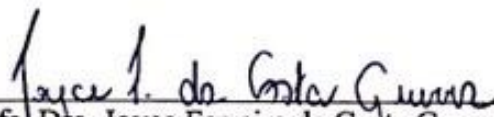
**Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e da atividade virucida de peptídeos sintéticos
derivados de veneno de escorpião**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:


Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – IBTEC
Presidente


Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – IBTEC
Membro


Profa. Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra – IBTEC
Membro

Patos de Minas – MG, 09 de dezembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, a meus pais, meu irmão, meus avós e meus amigos. Todos aqueles que depositaram confiança e esperança em mim por todo esse processo.

*“Tudo que vier a mão para
fazer, faze-o conforme as tuas
forças;”*

Eclesiastes 9.10a – Bíblia Sagrada

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus** por ter estado comigo em todos momentos da minha. Desde o dia do meu nascimento até nesse momento. Agradeço por Ele ter me dado essa oportunidade e poder realizar um sonho. Obrigado Deus!

Agradeço aos meus pais, **Antônio** e **Adriana**, por todo o apoio que me deram, que mesmo eu estando longe jamais me deixaram, sempre se importaram, se preocuparam e sempre confiaram que eu conseguiria. Amo vocês!

Ao meu irmão, **Eliada**, pelo apoio e por sempre confiar em mim, por saber que posso sempre contar com ele, nas horas difíceis e nas quase impossíveis. Te amo irmão!

Ao meu irmão, **Thiago**, por sempre me ligar preocupado e perguntando quando iria acabar o curso, por sempre me responder com um sorriso no rosto e sempre me chamar a atenção que era preciso. Te amo irmão!

Aos meus avós, **Joaquim** e **Nazaré**, que sempre me cobriram com orações e pedidos à Deus para me Ele me guardar e me ajudar nessa cidade. Pelo amor deles por mim que é incondicional. Amo vocês!

Aos meus **amigos** da região de Divinópolis/Marilândia que sei que torceram por mim, que oraram e que não deixaram de serem meus amigos por causa de distância.

Aos **irmãos** da Igreja Assembleia de Deus Missão – Aurélio Caixeta, que me acolheram e se tornaram minha família. Em especial a todos os **jovens** da igreja, que me ajudaram muito desde o início do ano. Muito obrigado, amo cada um de vocês!

Ao meu trio indiscutível, formado por mim, **Bruna** e **Luisa**. Obrigado por sempre me encherem de esperança e me ensinarem que eu poderia ser melhor e ser capaz de realizar todos os meus sonhos. Obrigado por mostrarem o que realmente é uma amizade verdadeira. Amos vocês meus bebês!

A todos **alunos** e **professores** incríveis da UFU – Patos de Minas que não desistiram da ciência brasileira apesar dos muitos problemas. Muito obrigado!

A todos os membros do **LACCA**, da **MICRO** e **técnicos da UFU** por todo auxílio nessa difícil tarefa de cultivar células e vírus e por sempre estar dispostos a ajudar.

A todas **amizades** que consegui aqui na cidade de Patos de Minas, o meu muito obrigado por tudo, todo carinho e companheirismo.

Não há palavras que caibam nesta simples página, que demonstre minha total gratidão a todos. Porém peço à Deus que recompense cada um, por tudo que fizeram por mim.

Muito obrigado!

RESUMO

O vírus respiratório sincicial (VRS) é o principal responsável por infecções respiratórias agudas (IRAs) contribuindo assim para o aumento da morbidade e da mortalidade infantil em todo o mundo. Até o momento, apenas um fármaco, o Palivizumab, é utilizado contra as infecções provocadas por esse patógeno. Entretanto, o uso deste medicamento é recomendado apenas para crianças de alto risco para infecção por VRS devido ao seu elevado custo e risco de ocorrência de reações adversas. Sendo assim, a pesquisa por compostos biologicamente ativos contra o vírus é necessária, para que futuramente novos fármacos possam ser utilizados como alternativa para o tratamento dessa infecção viral. Vários peptídeos, incluindo aqueles com atividade antiviral (AVPs), já foram encontrados como componentes do veneno de escorpiões, os quais são estudados para o desenvolvimento de moléculas de caráter terapêutico. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a citotoxicidade *in vitro* de dois peptídeos sintéticos, Pep-1 e Pep-2, derivados de veneno de escorpião em células HEP-2 e, posteriormente, avaliar a atividade virucida do Pep-2 contra o VRS cepa A2. Células HEP-2 foram tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos (de 0,8 a 100 µg/mL), incubadas por 24, 48 e 72 horas, e a viabilidade celular foi determinada por meio de ensaio de MTT. Os resultados demonstraram que ambos os peptídeos não apresentam citotoxicidade contra HEP-2. Nos resultados da atividade virucida do Pep-2, demonstraram uma baixa atividade variando de 10% (100 µg/mL) a 30% (3,1 µg/mL), aproximadamente. Esses resultados sugerem que o peptídeo pesquisado apresenta atividade antiviral relevante principalmente contra as etapas posteriores à entrada do vírus na célula hospedeira, podendo inibir as etapas de síntese de proteínas e material genético, montagem ou liberação do ciclo de replicação viral. Entretanto, novos estudos que demonstrem a interação desse peptídeo com proteínas virais envolvidas diretamente nessas etapas de replicação devem ser realizados para que se possa comprovar seu mecanismo de atuação.

Palavras-chave: Vírus respiratório sincicial. Infecções respiratórias agudas. Peptídeos com atividade antiviral. Viabilidade celular. Célula HEP-2.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is primarily responsible for acute respiratory infections (ARIs) thus contributing to the increase in child morbidity and mortality worldwide. So far, only one drug, Palivizumab, is used against infections caused by this pathogen. However, the use of this medicine is recommended only for children at high risk for RSV infection because of its high cost and risk of adverse reactions. Therefore, research for biologically active compounds against the virus is necessary so that in the future new drugs can be used as an alternative for the treatment of this viral infection. Several peptides, including those with antiviral activity (AVPs), have already been found as components of scorpion venom, which are studies for the development of therapeutic molecules. Thus, the objective of this work was to evaluate the in vitro cytotoxicity of two synthetic peptides, Pep-1 and Pep-2, derived from scorpion venom in HEp-2 cells and, subsequently, to evaluate the virucidal activity of Pep-2 against VRS strain A2. HEp-2 cells were treated with different peptide concentrations (from 0.8 to 100 µg / mL), incubated for 24, 48 and 72 hours, and cell viability was determined by MTT assay. The results showed that both peptides do not present cytotoxicity against HEp-2. In the results of Pep-2 virucidal activity, they demonstrated a low activity ranging from approximately 10% (100 µg / mL) to approximately 30% (3.1 µg / mL). These results suggest that the researched peptide presents relevant antiviral activity mainly against the steps after virus entry into the host cell, and may inhibit the steps of protein and genetic material synthesis, assembly or release of the viral replication cycle. However, further studies demonstrating the interaction of this peptide with viral proteins directly involved in these replication steps should be performed to prove its mechanism of action.

Keywords: Respiratory syncytial virus. Acute respiratory infections. Peptides with antiviral activity. Cell viability. HEp-2 cell.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: micrograma
µL: microlitro
µm: micrometro
AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida
AMPs: peptídeos antimicrobianos
AVPs: peptídeos com atividade antiviral
cm²: centímetro(s) quadrado
CO₂: gás carbônico/dióxido de carbono
DMEM: Meio *Dulbecco's Modified Eagles*
DMSO: dimetilsulfóxido
DBP: displasia broncopulmonar
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ERD: enhanced respiratory disease
g: gramas
h: horas
HEp-2: células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana
HSV-1: vírus herpes simples tipo 1
HCV: vírus da hepatite C
IBTEC: Instituto de Biotecnologia
IRAs: infecções respiratórias agudas
LACCA: Laboratório de Cultura de Células Animas
MS: Ministério da Saúde
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
mL: mililitro(s)
Nº: número
O₂: gás oxigênio
PBS: tampão fosfato-salino
Pep-1: Peptídeo 1
Pep-2: Peptídeo 2
pH: potencial hidrogeniônico
RNA: ácido ribonucleico
SARS-CoV: coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave
SFB: soro fetal bovino
UFP: unidade formadora de placa
VERO: linhagem de células derivada de rim de macaco verde africano
VRS: vírus respiratório sincicial
ZIKV: zika vírus
°C: graus Celsius
%: por cento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Vírus Respiratório Sincicial (VRS).....	12
2.2 Peptídeos com atividade antiviral	17
2.3 Atividades citotóxica e antiviral <i>in vitro</i>	18
3. OBJETIVO.....	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Cultivo de células animais	20
4.2 Avaliação da citotoxicidade celular.....	20
4.3 Atividade virucida	22
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais patógenos causadores de infecções respiratórias agudas (IRAs) é o vírus respiratório sincicial (VRS), sendo o responsável por surtos anuais de bronquite, bronquiolite e pneumonia principalmente em crianças, idosos e pessoas com o sistema imunológico comprometido. As taxas de morbidade e mortalidade provocadas pelo VRS tem se tornado um grande problema de saúde pública com grandes consequências econômicas. Até o momento, existe apenas um fármaco utilizado para o tratamento das infecções pelo VRS, o Palivizumab, utilizado somente em casos com alto risco para o paciente, uma vez que se trata de um medicamento de alto custo e que causa efeitos adversos.

Dessa forma, a busca por novas drogas que sejam eficientes contra o VRS tem sido recorrente. Uma alternativa eficiente são os peptídeos com atividade antiviral (AVPs), que podem ser obtidos sinteticamente, através de processos químicos, ou isolados a partir de produtos naturais. Das várias fontes disponíveis de AVPs, destacam-se os venenos ou as peçonhas de animais como serpentes, sapos e escorpiões, encontrados por todo mundo, inclusive no Brasil.

Por ser uma área abrangente, a biotecnologia se mostra como uma importante ferramenta no auxílio à saúde, pois permite a aplicação de técnicas de avaliação *in vitro* das atividades biológicas de peptídeos, além de possibilitar que pequenas modificações nas sequências dessas moléculas possam melhorar sua eficácia e segurança, tornando-os excelentes candidatos para uso terapêutico. Além disso, a possibilidade de produção em larga escala e geração de patente aumenta ainda mais o interesse por essas moléculas. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou a avaliação *in vitro* das atividades citotóxica e antiviral de dois peptídeos sintéticos derivados de veneno de escorpião.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

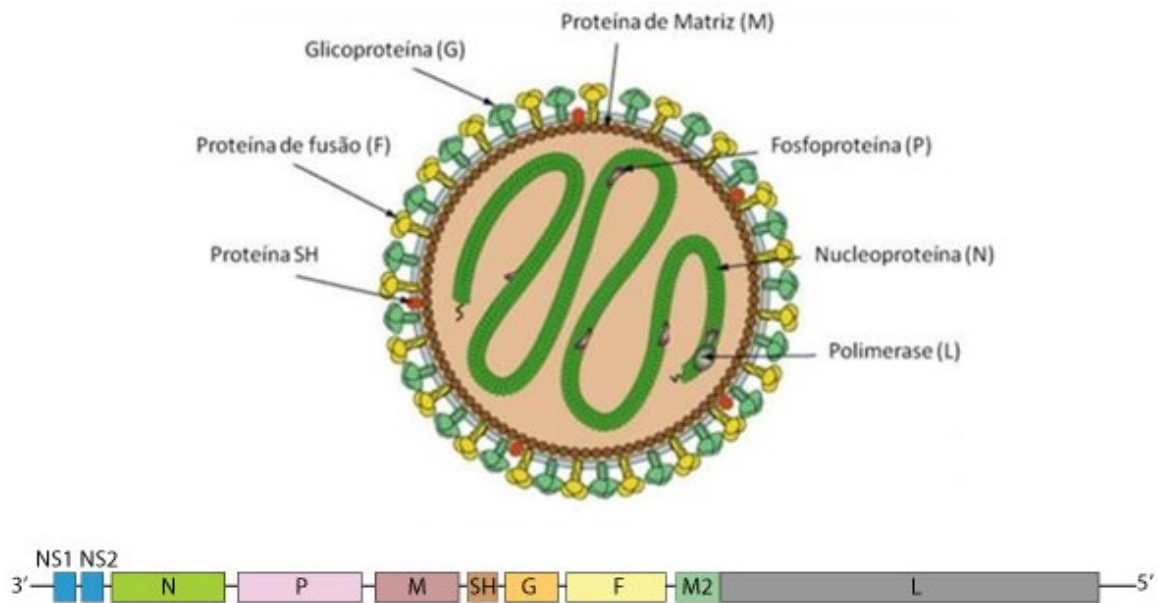
2.1 Vírus Respiratório Sincicial (VRS)

As infecções respiratórias agudas (IRAs) são em parte responsáveis pela morbidade e mortalidade infantil e, infelizmente, sua ocorrência tem aumentado de ano em ano, colocando em risco e prejudicando pessoas mundialmente. Em 2005, foi estimado que cerca de mais de 30 milhões de casos de IRAs ocorreram em todo o mundo, e 10% foram considerados graves necessitando de internação hospitalar (SHI et al., 2017). As estimativas mostram que as IRAs representam entre 30 e 50% das visitas de crianças às unidades de saúde e, entre 20 e 40% das hospitalizações pediátricas na maioria dos países em desenvolvimento (QUEVEDO LORENZO et al., 2019). No Brasil, as doenças respiratórias, especialmente a pneumonia, são responsáveis por aproximadamente 22% de todas as mortes entre crianças de 1 a 4 anos, sendo a principal causa de óbito para esta faixa etária (PASSOS et al., 2019).

Um dos principais causadores de IRAs é o vírus respiratório sincicial (VRS) que infecta principalmente crianças menores de 2 anos, idosos e pessoas que possuem o sistema imune comprometido (SANTOS et al., 2018). Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), o VRS pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae* e, ao gênero *Orthopneumovirus*, além de ser dividido entre dois subgrupos antigênicos, A e B devido a uma diferença antigênica da principal glicoproteína (G) (ANDERSON et al., 1985).

De acordo com Griffiths (2017), o VRS é um vírus esférico, envelopado, com um diâmetro de aproximadamente 150 nm. Possui RNA de fita simples como genoma, que é empacotado na partícula viral como uma molécula não-segmentada de sentido negativo, e que codifica proteínas estruturais internas chave (matriz proteica [M] e nucleoproteína [N]), proteínas do complexo polimerase funcional (fosfoproteína [P] e polimerase [L]), proteínas não estruturais envolvidas na evasão da resposta imune inata (NS-1 e NS-2), glicoproteínas transmembrana expostas externamente (pequena proteína hidrofóbica [SH], glicoproteína [G] e proteína de fusão [F]), e as proteínas reguladoras do M2 (proteína antiterminação M2-1 e M2-2), envolvidas na regulação da transcrição e replicação (Figura 1).

Figura 1: Modelo representativo da partícula do vírus respiratório sincicial (VRS) e de seu genoma.



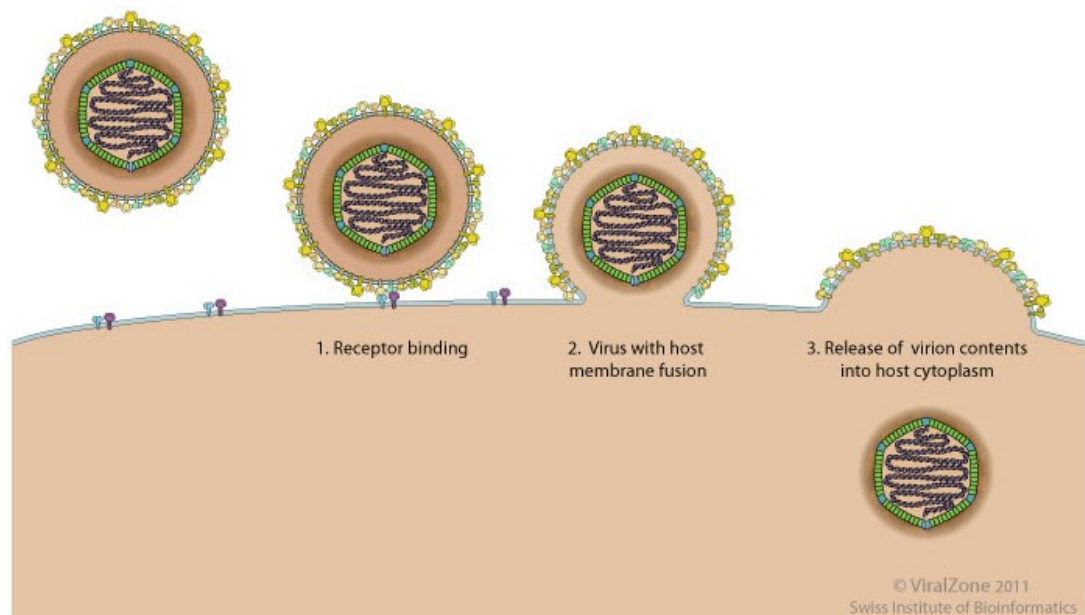
Fonte: Adaptado de *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB), 2011.

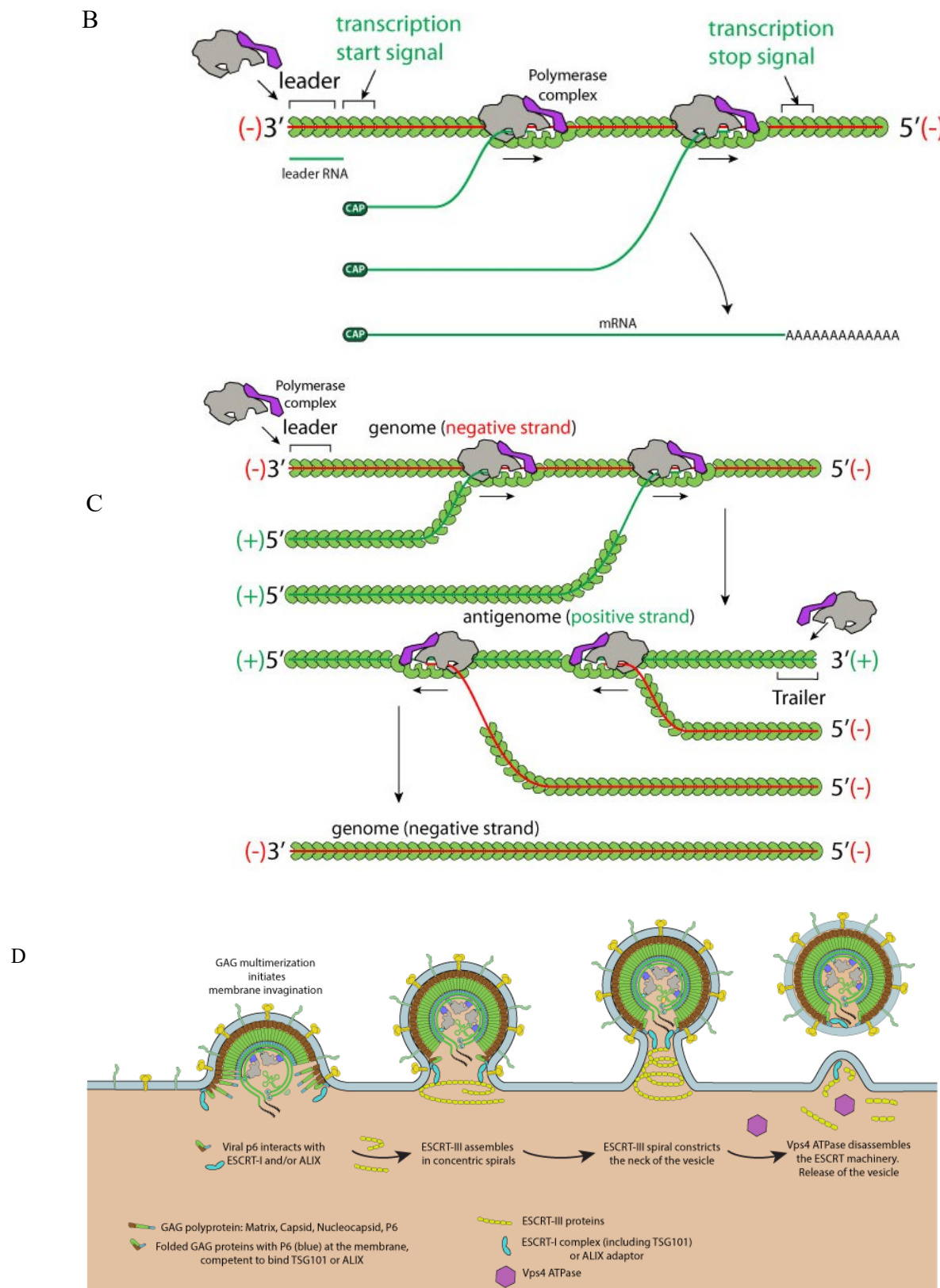
Partículas virais pertencentes a esse gênero *Orthopneumovirus*, são capazes de fundir diretamente sua membrana com a membrana plasmática celular sem serem internalizados por endocitose ou macropinocitose. Essa capacidade confere a eles geralmente a possibilidade de criar sincícios celulares, desencadeando a fusão entre a membrana viral e celular por proteínas de fusão. Todas as proteínas de fusão são ativas em uma conformação trimérica. Na forma nativa as proteínas de fusão são triméricas, porém algumas podem apresentar forma inicial de dímeros na superfície do virion, mas são convertidos em trímeros após a ativação. As proteínas de fusão devem ser produzidas em um estado inativo para evitar desencadear a fusão no Golgi ou em outros compartimentos após a síntese e o transporte para a superfície celular. Muitos são ativados na rede trans. Golgi ou na superfície celular por clivagem proteolítica que revela o peptídeo de fusão (**Figura 2A**). Como se trata de vírus com material genético de ssRNA sentido negativo, sua transcrição ocorre através do complexo RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que inicia a transcrição ligando-se à sequência líder em 3' do RNA da fita negativa genômica. O RdRp transcreve um RNA líder em trifosfato 5' e depois, para e reinicia em um sinal de iniciação da transcrição. O RNA iniciado neste sinal é limitado. No final dos genes virais, há um sinal de parada da transcrição no qual o RdRp produzirá um sinal de poliadenilação no trecho U antes de liberar o mRNA. Nos genomas policistrônicos, o RdRp pode digitalizar para a próxima iniciação da transcrição e retomar a

transcrição no próximo gene (**Figura 2B**). O complexo viral de RdRp é presumivelmente o mesmo para replicação e transcrição. Pode ser uma transcriptase por padrão e se transformar no modo replicase, dependendo da concentração de nucleocapsídeo. A proporção genoma / antígeno é de cerca de 10 para muitos vírus. Presumivelmente, a sequência do trailer é um promotor de replicação mais forte que a sequência líder. Após a ligação do RdRp se liga à sequência líder no genoma de RNA (-) encapsulado e dado início a replicação. O antígenoma é encapsidado concomitantemente durante a replicação. O RdRp ignora todos os sinais de transcrição quando no modo de replicação replicando o antígenoma sob o mesmo processo, promovendo a ligação primária do complexo da polimerase viral à sequência do trailer (**Figura 2C**). Muitos vírus envelopados recrutam componentes do sistema celular ESCRT (complexo de classificação endossômica necessário para o transporte) para mediar a brotação viral assistida por hospedeiro. Os complexos ESCRT são normalmente utilizados pela célula para funções biológicas que envolvem a remodelação da membrana, como formação de vesículas intraluminais, autofagia ou estágios terminais de citocinese. A família ESCRT consiste em ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, que estão envolvidas principalmente na classificação de carga e deformação da membrana, e ESCRT-III, que separa o pescoço da sua reverte a topologia quando comparada à maioria dos outros processos de brotamento na célula, como endocitose e formação de vesículas de transporte. O ribonucleocapsídeo interage com a proteína da matriz sob a membrana plasmática e brota através do complexo ESCRT, liberando o virion (**Figura 2D**) (VIRALZONE, 2019).

Figura 2: Modelo representativo do ciclo de replicação de vírus da partícula do vírus gênero Orthopneumovirus.

A





Grandes epidemias do VRS são observadas entre o outono e o inverno, fato relacionado à alteração no comportamento populacional. Por se tratar de uma época mais fria, os indivíduos passam mais tempo em ambientes fechados, favorecendo a transmissão e a infecção por este patógeno (BORCHERS, 2013; AVENDANO et al., 2003). O VRS possui manifestações clínicas semelhantes às de outros patógenos virais respiratórios que incluem tosse, congestão nasal, dor de garganta e dispneia (BRANCHE; FALSEY, 2015), podendo levar o paciente ao desenvolvimento de bronquiolite, pneumonia e complicações severas como falha respiratória (STEIN et al., 2017). De todas as manifestações clínicas provocadas pelo VRS, a bronquiolite viral aguda (BVA) é a doença de maior relevância, em virtude da morbidade elevada, podendo apresentar-se com maior gravidade, maior taxa de internação e, em casos de paciente lactentes menores de três meses que apresentam comorbidades como a cardiopatia congênita e a displasia broncopulmonar (DBP), evoluir para falência respiratória (FONTES; FERREIRA, 2018).

Na década de 60, os Estados Unidos realizaram estudos com o intuito de imunizar lactentes e crianças de até 5 anos contra o VRS, utilizando uma vacina inativada por formalina. Entretanto, devido a precariedade tecnológica, falta de informações e métodos de avaliação de eficácia do processo de vacinação, não foi possível obter uma proteção contra uma infecção subsequente provocada pelo VRS selvagem. As crianças imunizadas desenvolveram uma forma mais grave da IRA causada pelo VRS, conhecida como doença respiratória exacerbada (ERD, do inglês *enhanced respiratory disease*) (FULGINITI et al., 1969). Cerca de 80% das crianças que tiveram infecção pelo VRS após a vacinação precisaram ser hospitalizadas, apresentando um aumento significativo na frequência e na gravidade da doença, caracterizada por broncopneumonia, febre alta e chiado no peito. Como trágico resultado, dois bebês que foram imunizados acabaram morrendo por consequência da infecção subsequente pelo VRS (ACOSTA et al., 2016). Ainda hoje, diferentes grupos de pesquisa realizam estudos com candidatas a vacinas contra o VRS (BOYOGLU-BARNUM et al., 2017; McFARLAND et al., 2018), entretanto, nenhuma encontra-se disponível para a prevenção de infecções provocadas por este patógeno.

A busca por um tratamento eficaz, que consiga combater a doença grave provocada pelo VRS, teve início no final da década de 1990. Um estudo randômico foi realizado nos Estados Unidos, Reino Unido e Canadá, após os surtos de VRS de 1996 e 1997. Nesta pesquisa, mais de 1000 crianças foram selecionadas para inoculação de um anticorpo monoclonal humanizado, contendo 95% de sequências de aminoácidos humanos e apenas 5% de aminoácidos murinos. O acompanhamento dos pacientes após a última dose demonstrou que o tratamento resultou em uma redução de 55% no número de hospitalizações de crianças infectadas pelo VRS, além de

reduzir em 78% as hospitalizações de crianças prematuras sem DBP e 39% com DBP. Esses dados apontam a eficácia e a segurança da administração do anticorpo monoclonal humanizado para a prevenção de doenças graves causadas pelo VRS, o qual foi nomeado de Palivizumab (TOUCH; SPITZER, 1999).

A principal desvantagem apresentada pelo Palivizumab é o seu alto custo de produção, limitando seu uso apenas para alguns grupos de risco para a infecção pelo VRS. Cada dose do fármaco custa aproximadamente R\$ 5.000,00 e, em média, cada criança do grupo de risco deve tomar 6 doses (TOMA et al., 2013). De acordo com a Portaria nº 522 de 2013 do Ministério da Saúde (MS), o medicamento é liberado pelo SUS em casos de crianças menores de 1 ano de idade, que nasceram prematuras, com idade gestacional ≤ 28 semanas e para crianças com até 2 anos de idade com doença pulmonar crônica ou doença cardíaca congênita com repercussão hemodinâmica demonstrada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Sendo assim, a necessidade de novos medicamentos, que possam ser administrados de forma mais ampla em toda a população, tem impulsionado grupos de pesquisa na busca por compostos capazes de combater a infecção pelo VRS e, que ao mesmo tempo apresentem um baixo custo de produção.

2.2 Peptídeos com atividade antiviral

Os peptídeos com atividade antiviral (AVPs), demonstram grande potencial no combate às infecções virais. A falta de fármacos antivirais, associada à identificação de cepas resistentes aos quimioterápicos utilizados atualmente, torna importante o desenvolvimento de novos compostos para combater infecções emergentes (SHARTOUNY; JACOB, 2018). Os AVPs são peptídeos capazes de inibir ou destruir as partículas virais, impedindo assim a infecção das células hospedeiras. Esses peptídeos podem ser encontrados no meio ambiente, em diferentes formas de vida, como animais, vegetais e até em microrganismos, uma vez que fazem parte dos seus mecanismos de defesa (AHMED et al., 2019; AVILA, 2017).

No estudo realizado por Martins e colaboradores (2009), os pesquisadores testaram amostras de extratos de *Musa acuminata*, popularmente conhecida como banana ouro, contra cepas do vírus herpes simplex tipos 1 e 2 que já apresentavam resistência ao fármaco aciclovir. Observaram que a *M. acuminata* apresentou inibição viral superior a 80%, na maior concentração empregada e sem apresentar toxicidade para as células utilizadas no cultivo viral.

Como a maioria dos AVPs faz parte do sistema imunológico dos seres vivos, é possível encontrar antivirais em alguns animais peçonhentos como cobras, sapos e escorpiões, pois estes possuem em seus venenos/peçonhas peptídeos que são analisados quanto às suas atividades

antimicrobianas (ZENG, 2018). Muller (2011), avaliou a atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpiões contra o vírus da dengue (DENV) e da febre amarela (YF), demonstrando que as peçonhas de algumas espécies de serpentes apresentam atividade contra diferentes etapas do ciclo de replicação viral. Já Yan e colaboradores (2011) realizaram análises no veneno do escorpião *Heterometrus petersii*, e demonstraram que o peptídeo Hp1090 inibiu as etapas iniciais da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e também a sua replicação.

2.3 Atividades citotóxica e antiviral *in vitro*

A biotecnologia dispõe da área de cultura de células vivas em condições *in vitro*, permitindo a sua manutenção em recipientes estéreis, como frascos e placas descartáveis (MIGITA, 2012). Com o avanço das técnicas de cultura de células e tecidos em laboratório obteve-se uma revolução, principalmente na área da saúde (PHELAN, 2015). A maior vantagem em conduzir experimentos com cultura de células *in vitro* é o baixo custo quando comparadas com os animais vivos, além de permitir a padronização de experimentos com o controle preciso de pH, temperatura, pressão osmótica, tensões de gás carbônico (CO₂) e oxigênio (O₂). Além disso, não apresentam um custo tão elevado em virtude da pequena quantidade de material necessário comparado a estudos *in vivo* (ALVES, 2015). Contudo, para esse tipo de pesquisa são necessárias condições totalmente livres de contaminação, além de um conhecimento do pesquisador que realiza os experimentos sobre morfologia celular, procedimentos básicos de cultivo celular e técnicas assépticas rigorosas (FRESHNEY, 1994).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*, ISO 10993), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em procedimentos biomédicos. Depois de comprovada a sua não toxicidade, estudo da atividade biológica do composto, realizando-se os ensaios posteriores necessários (ROGERO et al, 2003). A avaliação de citotoxicidade pode ser realizada por ensaios colorimétricos, como por exemplo utilizando o brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio, ou MTT. Este ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzir o MTT, convertendo os sais de amarelo de tetrazólio em cristais de formazana púrpura e, portanto, a capacidade das células viáveis de clivar o anel de tetrazol presente no MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes em mitocôndrias (MOSMANN, 1983). O valor de absorbância, portanto, é diretamente proporcional a viabilidade celular.

Como os vírus respiratórios tem tropismo por células do trato respiratório, em muitos

estudos a linhagem escolhida são de células derivadas de carcinoma de laringe humana, denominada HEP-2 (PERINI et al., 2007). Uma das características dessa linhagem é ser morfológicamente indistinguível da linhagem HeLa. Um dos fatores mais importantes para a utilização da linhagem HEP-2 em estudos com vírus é a sua baixa taxa de variabilidade, resultando em células filhas idênticas a célula mãe, característica que também foi herdada da linhagem HeLa (SOUZA, 2018).

No caso de possíveis AVPs, além do ensaio de citotoxicidade, é necessário realizar testes para a avaliação da atividade antiviral, para que possa ser observada a capacidade de interação dos compostos com as partículas virais. Uma das metodologias empregadas é o chamado ensaio virucida, que consiste no tratamento prévio do vírus com os compostos estudados, em um período pré-determinado, e posterior infecção das células hospedeiras. Subsequentemente, a progressão da infecção é acompanhada por meio da viabilidade celular, e analisado indiretamente o efeito do composto sobre as partículas (DIAS, 2019). Dessa forma, o intuito de se utilizar AVPs que possam combater a infecção de patógenos que não possuem nenhuma contramedida tem sido recorrente por vários grupos de pesquisas.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade de dois peptídeos sintéticos, Pep-1 e Pep-2, derivados de veneno de escorpião, em células HEP-2 e atividade virucida do Pep-2 contra o VRS cepa A2;

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a citotoxicidade de dois peptídeos sintéticos, Pep-1 e Pep-2, identificados em veneno de escorpião, em diferentes concentrações e intervalo de tempo, contra células HEP-2;
2. Avaliar a atividade virucida de diferentes concentrações do Pep-2 contra o VRS, cepa A2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo de células animais

Para a realização dos experimentos foi utilizada a linhagem celular HEp-2 (células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana, ATCC[®] CCL-23), utilizada no isolamento e replicação do VRS. Essas células foram mantidas criopreservadas, com meio de congelamento composto por 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Isofar Ltda.), diluído em soro fetal bovino (SFB, *Hyclone*TM, Gibco®, EUA), em um reservatório de nitrogênio líquido no Laboratório de Cultura de Células Animais (LACCA) do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Patos de Minas.

No processo de retirada das células do reservatório, foi realizado o protocolo de descongelamento das células descrito por Candeias (2018) com modificação. As células foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C, e em seguida transportadas para a câmara de fluxo laminar previamente descontaminada. Depois, foram transferidas para um tubo cônico, contendo 5 mL de meio *Dulbecco's Modified Eagles* (DMEM GlutaMAXTM, Gibco®, EUA), tamponado com bicarbonato de sódio, pH 7,4, com SFB (5%) e os antibióticos penicilina (10.000 µg/mL, *Hyclone*TM, *GE Healthcare Life Sciences*, EUA) e estreptomicina (10.000 U/mL, *Hyclone*TM). Em seguida, as células foram submetidas à centrifugação (500 *xg*, por 3 minutos), o sobrenadante foi descartado e, ao precipitado de células foram adicionados 5 mL de DMEM suplementado com SFB e antibióticos. Posteriormente, as células foram ressuspensas, todo o conteúdo do tubo foi transferido para uma garrafa de cultura de células estéril, de 25 cm² de área, e foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

As células foram observadas a nível macroscópico e microscópico diariamente, com troca do meio de cultivo em dias alternados, até que atingissem a confluência mínima de 80% para a realização do repique para uma garrafa de 75 cm². Novamente foram realizadas observações a nível macroscópico e microscópico diariamente, com troca do meio de cultivo em dias alternados, até que atingissem a confluência mínima de 90% para prosseguimento dos experimentos.

4.2 Avaliação da citotoxicidade celular

Quando a monocamada celular apresentou uma confluência entre 90 e 100%, as células foram repicadas e cultivadas em placas de 96 poços, a uma concentração de 2×10^6 células/mL, em meio DMEM completo com 10% de SFB, e sem antibióticos (CANDEIAS, 2018). Em seguida, as células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C, por 24 horas, para atingir uma confluência de 95 a 100%.

Os peptídeos 1 e 2 (Pep-1 e Pep-2) foram reidratados em meio DMEM, na concentração de 250 µg/mL e esterilizados com o auxílio de um filtro de 0,22 µm de porosidade. Em seguida, foram feitas diluições duplo-seriadas (de 100 µg/mL a 0,8 µg/mL) dos peptídeos, em meio DMEM, sem SFB e antibióticos. Após a lavagem da monocamada celular, um volume de 100 µL de cada concentração dos peptídeos foi adicionado a cinco poços de uma placa. Como controle de tratamento foram utilizados 5 poços com células não tratadas com os peptídeos, nos quais foram adicionados apenas o meio DMEM, sem SFB e antibióticos. As placas foram incubadas em estufa, a 37°C e 5% de CO₂, por 24, 48 ou 72 horas.

Após o período de tratamento com os peptídeos, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL, Sigma® Life Science, EUA) a cada poço, e posteriormente as placas foram incubadas por mais 4 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, o sobrenadante de cada poço foi removido, foram adicionados 150 µL de DMSO, e a placa foi submetida a uma agitação suave por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância de cada poço da placa em um espectrofotômetro, a 560 nm de comprimento de onda. A absorbância obtida é diretamente proporcional a viabilidade celular, a qual foi calculada utilizando-se os valores das monocamadas tratadas com as diferentes concentrações de peptídeos, e os valores das monocamadas não tratadas (controle de tratamento), utilizando a seguinte fórmula (SOUSA):

$$V (\%) = \frac{DO_{pep}}{DO_{ct}} \times 100$$

Onde:

V (%) = Viabilidade celular em porcentagem;

DO_{pep} = Densidade óptica média do tratamento com as diferentes concentrações de peptídeos;

DO_{ct} = Densidade óptica média do controle de tratamento.

Os valores finais de viabilidade celular para cada uma das concentrações testadas e tempo de tratamento, representam os valores médios de três ensaios independentes.

4.3 Atividade virucida

Devido à indisponibilidade de material, foi possível avaliar apenas a atividade virucida do Pep-2 contra a cepa A2 do VRS. O cultivo celular e a diluição do peptídeo foram realizadas conforme os protocolos descritos nas seções 4.1 e 4.2. Entretanto, às diluições do peptídeo, foi adicionada uma suspensão viral contendo 10^5 unidades formadoras de placas (UFP) por mL do VRS, e as misturas resultantes foram incubadas por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, após a lavagem da monocamada celular, 100 μ L das diferentes concentrações das misturas vírus/peptídeo foram adicionados a cinco poços de uma placa.

Como controle viral foram utilizados 5 poços com células infectadas com uma suspensão viral (10^5 UFP/mL) não tratada com os peptídeos, e como controle celular negativo foram utilizados 5 poços com células não infectadas e não tratadas com os peptídeos (CN) e para controle positivo foram utilizados 5 poços com células infectadas e não tratadas com os peptídeo (CP). As placas foram incubadas em estufa, a 37°C e 5% de CO₂, até que vírus lisasse por completo todas as células do CP ou por no máximo 48 horas.

Após esse período, foi realizado o ensaio de MTT conforme descrito previamente na seção 4.2. A atividade virucida foi calculada utilizando-se os valores das DOs das monocamadas tratadas com as diferentes concentrações da mistura vírus/peptídeo, e do controle viral, utilizando a seguinte fórmula (CANDEIAS, 2018):

$$AV (\%) = \left[\frac{DO_{pep}}{DO_{cv}} - 1 \right] \times 100$$

Onde:

AV (%) = Atividade virucida em porcentagem;

DO_{pep} = Densidade óptica média do tratamento com as diferentes concentrações de peptídeos;

DO_{cv} = Densidade óptica média do controle viral;

Os valores finais de atividade antiviral para cada uma das concentrações testadas, representam os valores médios de dois ensaios independentes

4.4 Análise estatística

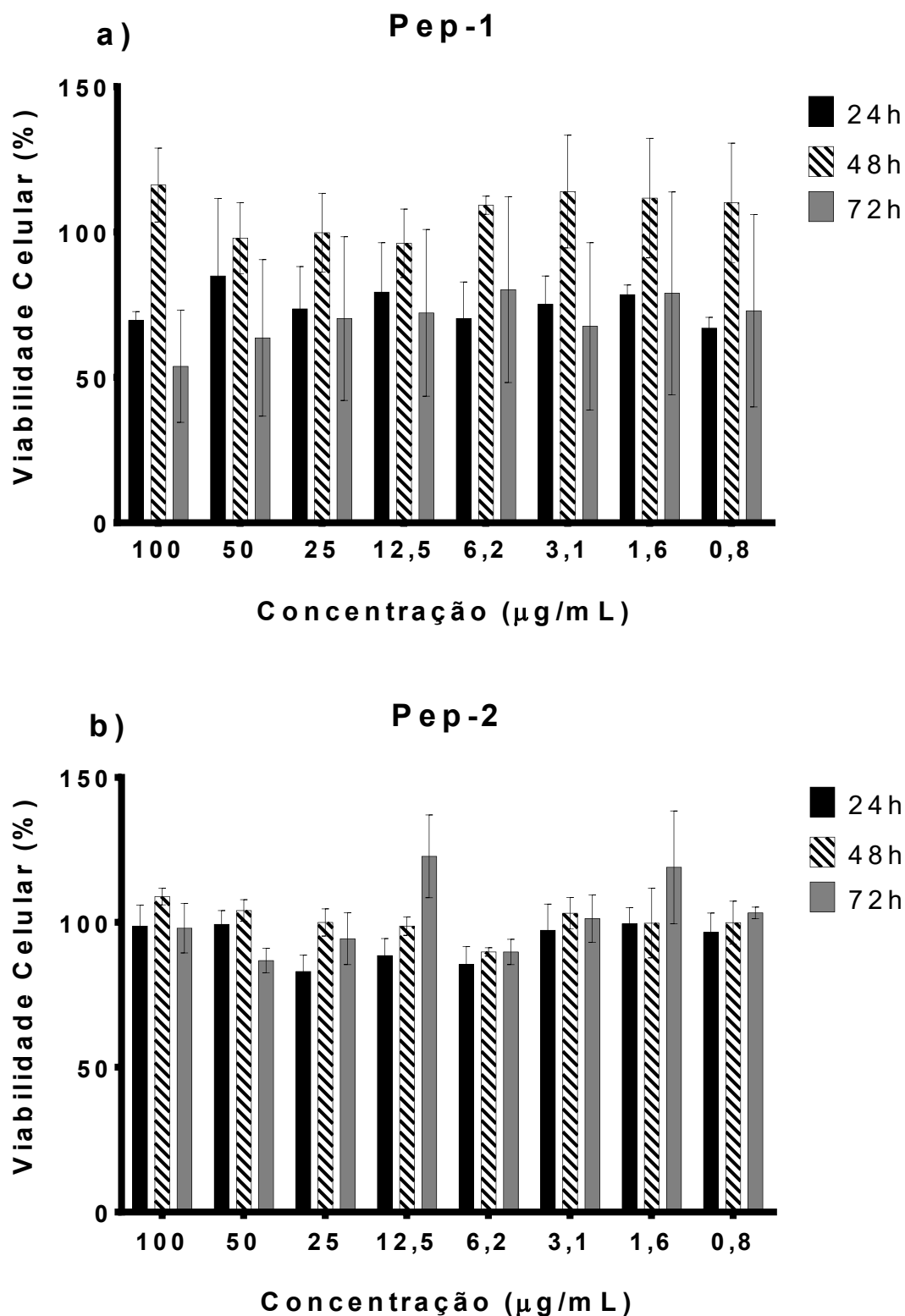
Foi utilizado o software Graph Pad Prism (v.6) para a análise dos resultados. As médias e os desvios-padrão foram calculados para cada um dos tratamentos. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e a comparação entre os grupos realizada por meio do pós teste de TUKEY para múltiplas comparações. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Primeiramente, a citotoxicidade dos peptídeos estudados, frente às células HEP-2, utilizando concentrações que variaram de 0,8 µg/mL a 100 µg/mL, em diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72h) foi avaliada por ensaio de MTT. A capacidade das células para reduzir o MTT fornece uma indicação de sua integridade e viabilidade (GILBERTO et al, 2012) e, uma vez que no ensaio a absorbância obtida é diretamente proporcional à viabilidade celular, a porcentagem da viabilidade celular foi calculada por comparação das absorbâncias das células tratadas com as células não tratadas (controle de tratamento).

Na **Figura 3** são apresentados os resultados da viabilidade de células HEP-2 após o tratamento com os Pep-1 (**a**) e Pep-2 (**b**) em intervalos de 24h, 48h e 72h. Para o Pep-1 os valores máximo e mínimo de viabilidade celular, respectivamente, foram: 84,9% e 70,0% para o tratamento de 24h; 116,5% e 96,2% para o tratamento de 48h; 80,2% e 53,8% para o tratamento de 72h. Além de não apresentar uma resposta dose dependente, evidencia-se uma tendência (não significativa estatisticamente) ao aumento da viabilidade celular para o tratamento de 48h, entretanto, esse fato não se repete para o tratamento de 72h, e os valores ficam próximos aos apresentados pelo tratamento de 24h. Para o Pep-2 os valores máximo e mínimo de viabilidade celular, respectivamente, foram: 99,2% e 83,0% para o tratamento de 24h; 108,9% e 89,8% para o tratamento de 48h; 122,8% e 86,8% para o tratamento de 72h. Sendo assim, no presente estudo, os resultados obtidos indicam que os peptídeos analisados não apresentam citotoxicidade contra as células HEP-2.

Figura 3. Viabilidade celular de células HEP-2, frente ao tratamento por 24, 48 ou 72h, com diferentes concentrações dos peptídeos 1 (a) e 2 (b). A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, por comparação dos resultados da absorbância (A560) das células tratadas com as células não tratadas determinado por MTT. Os valores finais de viabilidade celular para cada uma das concentrações testadas e tempo de tratamento, representam os valores médios de três ensaios.



Uma substância com potencial atividade antiviral, primeiramente deve ter sua não citotoxicidade demonstrada, uma vez que um agente antiviral ideal deve inibir o ciclo de replicação do vírus, interferindo o mínimo possível na estrutura ou no metabolismo da célula hospedeira (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986). A baixa citotoxicidade de peptídeos derivados de venenos de animais, corroboram com alguns resultados apresentados na literatura, demonstrando cada vez mais a importância da busca de AVPs. Um estudo realizado por Lai e colaboradores (2008), com objetivo de avaliar a inibição de VRS utilizando oligômeros morfolino de fosfordiamidato conjugado com peptídeo (PPMO), identificou perda mínima de viabilidade em HEp-2 em todas as concentrações testadas para a variante AUG-1. Células tratadas com as maiores concentrações exibiram uma perda de viabilidade de aproximadamente 10% a 15%.

Em outro estudo, Li e colaboradores (2011), verificaram que uma versão otimizada de um peptídeo obtido de veneno de escorpião (Mucroporin-M1), não apresentou alto grau de citotoxicidade em células epiteliais renais de macaco verde africano (Vero), mensurado através de CC₅₀ (70,46 µg/ml) ao ser comparado com o original. Também, Hong e colaboradores (2013), avaliando a atividade de um outro peptídeo (Ctry2459) e de suas variantes sintéticas (Ctry2459-H2 e Ctry2459-H3) em células tumorais derivadas de carcinoma de hepatócitos (Huh7.5.1), demonstrou uma redução significativa das atividades citotóxica e hemolítica das variantes sintéticas (>500 µg/ml) em relação ao peptídeo natural (79,8 µg/ml) mensurado por CC₅₀. Dessa forma, fica evidente que a possibilidade de alterações pontuais na estrutura dos peptídeos, realizadas visando diminuir ainda mais a sua citotoxicidade, torna atrativa investigação das aplicações biológicas desses compostos.

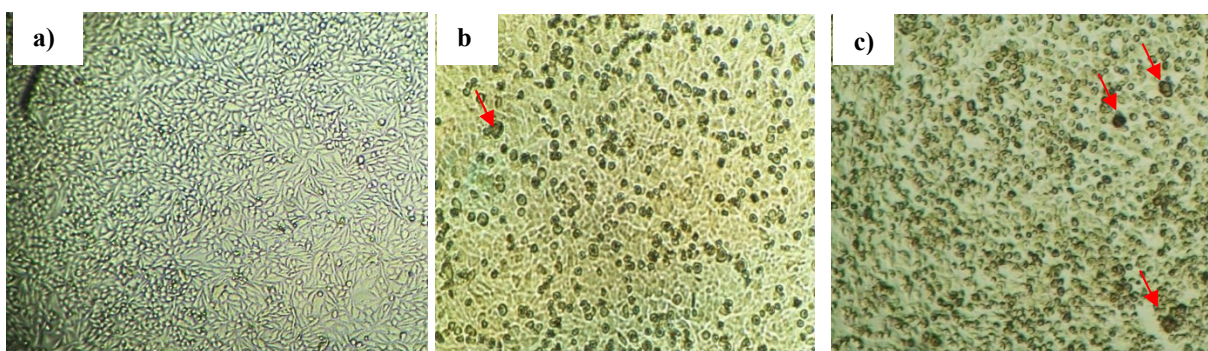
Um estudo feito por Hong e colaboradores (2013), avaliou a atividade de um outro peptídeo, também derivado de veneno de escorpião (Ctry2459), e de suas variantes sintéticas ricas em histidinas (Ctry2459-H2 e Ctry2459-H3) em células tumorais derivadas de carcinoma de hepatócitos. Em seus resultados, os autores conseguiram obter uma redução significativa da atividade citotóxica, determinada por CC₅₀, das variantes sintéticas (>500 µg/ml) quando comparada ao peptídeo original (79,8 µg/ml). Dessa maneira, o estudo demonstra que alterações pontuais na estrutura dos peptídeos, podem tornar mais atrativa a investigação das aplicações biológicas desses compostos.

Um outro estudo realizado por Hong e colaboradores (2014), a fim de avaliar a atividade de outros dois peptídeos de veneno de escorpião (Hp1036 e Hp1239), encontraram viabilidade celular superior a 80% para concentrações de até 20 µM em Vero. Apesar de não apresentarem

efeito citotóxico, esses peptídeos possuem aplicação farmacológica contra, por exemplo, o vírus do sarampo, coronavírus (SARS-CoV), vírus da influenza aviária A cepa H5N1 (LI et al., 2011), vírus da hepatite C (HONG et al., 2013) e vírus da herpes simples tipo I (HONG et al., 2014).

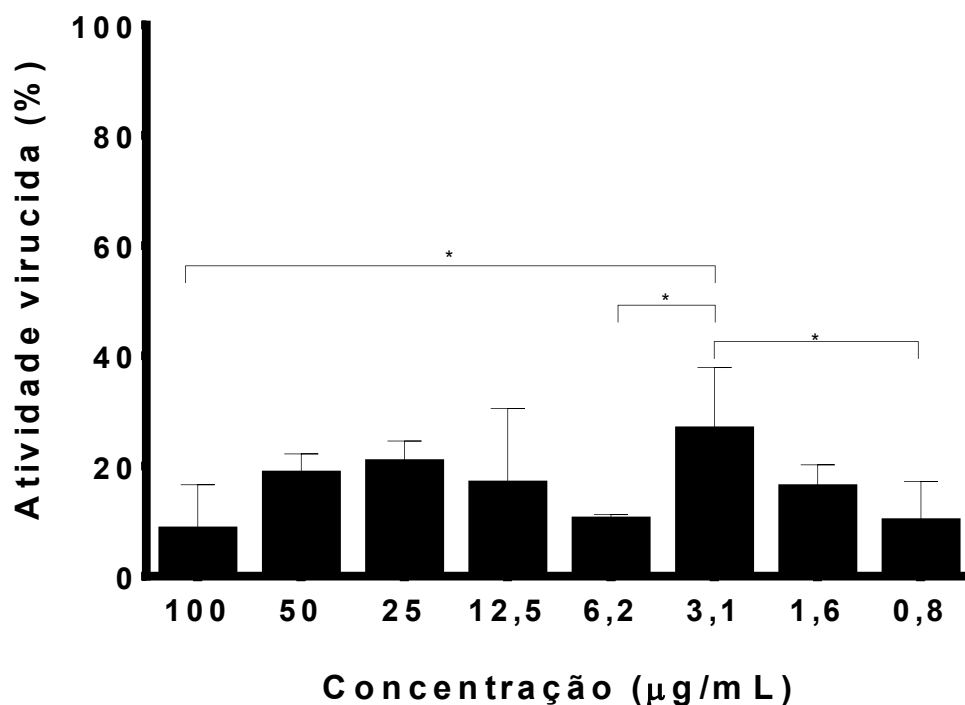
Uma vez que os peptídeos avaliados neste estudo não apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem HEp-2, seu potencial antiviral foi passível de investigação. Entretanto, a quantidade insuficiente de Pep-1, impossibilitou a análise deste composto, sendo analisada a atividade antiviral apenas do Pep-2. A atividade virucida é definida como a capacidade de interação física de um composto com as partículas virais, e assim interrompem o progresso da infecção (AOKI-UTSUBO; CHEN; HOTTA, 2018). Diferentes concentrações do Pep-2 (0,8 µg/mL a 100 µg/mL), foram administradas às suspensões de VRS (10^5 UFP/mL), e incubadas por 1h a temperatura ambiente, para posteriormente serem administradas em células HEp-2. A monocamada celular foi incubada por 48h, tempo suficiente para que células infectadas pelo VRS e não tratadas com o peptídeo fossem completamente lisadas (**Figura 4**). Novamente, foi utilizado o ensaio de MTT, porém, a atividade virucida é inversamente proporcional a viabilidade celular, sendo calculada por comparação das absorbâncias das células infectadas e tratadas com as células infectadas e não tratadas (controle viral) e, os resultados plotados em um gráfico (**Figura 5**).

Figura 4. Lise de células HEp-2 observada após a infecção pelo VRS, cepa A2 (10^5 UFP/mL). As setas indicam células mortas. (a) 0h após a infecção; (b) 24h após a infecção; (c) 48h após a infecção. Aumento de 100x;



Fonte: Próprio autor.

Figura 5. Atividade virucida de diferentes concentrações do peptídeo 2 (Pep-2) contra o vírus respiratório sincicial (VRS) cepa A2 determinado por MTT. A atividade virucida foi calculada em porcentagem, por comparação dos resultados da absorbância (A560) das células infectadas com VRS previamente tratado com o Pep-2 e das células infectadas com VRS não tratado (controle viral). Os asteriscos significam diferenças estatísticas (* $p < 0,05$).



Fonte: Próprio autor.

A atividade virucida do Pep-2 apresentou valores máximo e mínimo de 26,3% e 8,1% para as concentrações de 3,1 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente, evidenciando novamente que não houve um efeito dose dependente, mas que a concentração de 3,1 µg/mL foi a mais eficiente, com significância estatística em relação as concentrações de 100 µg/mL, 6,2 µg/mL e 0,8 µg/mL. Um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, realizado por Candeias (2018), avaliou a atividade antiviral do mesmo peptídeo contra o VRS cepa A2, em ensaios pré-tratamento (células tratadas com peptídeo antes da infecção) e pós-tratamento (células tratadas após a infecção), no qual o peptídeo apresentou atividade antiviral média de cerca de 40% e 80% para os ensaios pré e pós-tratamento, respectivamente. No ensaio pré-tratamento, é realizado a avaliação da capacidade dos peptídeos de conferirem resistência à linhagem celular estudada, no ensaio de pós-tratamento, é realizado a avaliação da atividade antiviral dos peptídeos após a infecção viral e no ensaio de avaliação virucida é avaliado a interação do peptídeo com a partícula viral antes da infecção (MULLER, 2011). Esses resultados, somados aos constatados no presente trabalho, no qual a atividade virucida máxima foi de apenas 26%,

sugerem que o peptídeo pesquisado apresenta atividade antiviral relevante principalmente contra as etapas posteriores à entrada do vírus na célula hospedeira, podendo inibir as etapas de síntese de proteínas e material genético, montagem ou liberação do ciclo de replicação viral. Entretanto, novos estudos que demonstrem a interação desse peptídeo com proteínas virais envolvidas diretamente nessas etapas de replicação devem ser realizados para que se possa comprovar seu mecanismo de atuação.

No trabalho já citado de Li e colaboradores (2011), com o teste da versão otimizada de um peptídeo obtido de veneno de escorpião (Mucroporin-M1) para bioatividades, incluindo como principal a antiviral contra o vírus do sarampo, SARS-CoV e vírus influenza H5N1, obtiveram que as atividades antivirais do Mucroporin-M1 contra vírus do sarampo, SARS-CoV e influenza H5N1 aumentaram notavelmente com um EC_{50} de 7,15 $\mu\text{g} / \text{ml}$ e um CC_{50} de 70,46 $\mu\text{g} / \text{ml}$ contra vírus do sarampo, um EC_{50} de 14,46 $\mu\text{g} / \text{ml}$ contra SARS-CoV e um EC_{50} de 2,10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ contra o H5N1, enquanto o peptídeo original Mucroporin não mostrou atividade antiviral contra nenhum desses três vírus.

Uddin e colaboradores (2016) analisaram o efeito inibitório do veneno de *Apis mellifera* L. contra vírus não-envelopados e envelopados. De acordo com os autores, o veneno de abelha já é utilizado como medicamento tradicional, devido aos seus efeitos antibacterianos, antivirais e anti-inflamatórios, além de possuir uma variedade de componentes como peptídeos, enzimas, aminas, carboidratos, lipídeos, entre outros. A partir de um ensaio virucida contra o VRS, utilizando células HEp-2, foi possível observar que o veneno de abelha, a uma concentração de 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inibiu a atividade viral 7 vezes mais que o controle experimental. O tempo de infecção utilizado pelos autores neste experimento foi de apenas 24h, metade do tempo que foi empregado para análise do peptídeo aqui investigado, que foi de 48h, e mesmo assim apresentou resultado satisfatório. É notável que ainda existem poucos estudos que trabalham com venenos brutos ou seus derivados diretamente contra o VRS, porém há trabalhos que utilizam outros grupos de substâncias naturais ou sintéticas com o objetivo de inibir a infecção causada por esse vírus, como por exemplo, flavonoides (PIVA, 2019), cetona aromática (LIMA et al., 2019), nanocorpo terapêutico (DETALLE et al., 2016) e nanopartículas de fusão (GILBERT et al., 2018; RANGHUNANDAN et al., 2014).

Apesar da quantidade de moléculas já testadas, e que demonstraram atividade antiviral *in vitro* contra o VRS, até o momento não existe tratamento acessível e eficaz disponível para toda população susceptível a este patógeno. Dessa forma, a pesquisa por novas moléculas candidatas à terapia anti-VRS, tem impulsionado pesquisas no mundo todo, sendo este trabalho, o terceiro do nosso grupo com essa linha de pesquisa. Os resultados obtidos aqui, confirmam a

não citotoxicidade de dois peptídeos derivados de veneno de escorpião, e ainda corroboram com resultados obtidos anteriormente, demonstrando a atividade antiviral de um desses peptídeos. Futuramente, novos ensaios poderão ser realizados na tentativa de demonstrar a interação entre o composto testado e as proteínas do VRS, e dessa forma, auxiliar na elucidação dos mecanismos utilizados para inibição da replicação viral.

6 CONCLUSÃO

1. Os peptídeos sintéticos de veneno de escorpião avaliados, Pep-1 e Pep-2, não apresentaram atividade citotóxica em as células HEP-2 nos tempos de 24h, 48h e 72h em nenhuma das concentrações utilizadas;
2. No ensaio virucida contra o VRS cepa A2, realizado apenas com o Pep-2, a atividade antiviral apresentou resultados entre 8% e 26%. Esses valores são inferiores aos apresentados em um estudo anterior, também desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, e pode estar relacionado a atividade antiviral relevante principalmente contra as etapas posteriores à entrada do vírus na célula hospedeira.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, P. L.; CABALLERO, M. T.; POLACK, F. P. Brief history and characterization of enhanced respiratory syncytial virus disease. **Clinical and Vaccine Immunology**. 23 (3), p. 189-195, Mar 2016.
- AHMED A., et al. Human Antimicrobial Peptides as Therapeutics for Viral Infections. **Viruses**, v. 11, n. 8, p. 704, 2019.
- AOKI-UTSUBO, C.; CHEN, M.; HOTTA, H. Virucidal and neutralizing test for antiviral substances and antibodies. **Bio-protocol**, v. 8, n. 10, e2855, 2018.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultura Celular. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (org.). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. v. 2, p. 216-252, 2015.
- ANDERSON L. J., et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 151, issue 4, p. 626–633, 1985.
- ARTIMO, P., et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**, Oxford University Press (OUP), [s.l.], v. 40, n. 1, p.597-603, 2012.
- AVENDANO, C. F. L., et al. Impacto en salud infantil del invierno 2002: disociación entre factores ambientales y virus respiratorio sincicial, en Santiago. **Rev. méd. Chile**, Santiago, v. 131, n. 8, p. 902-908, 2003.
- AVILA E. E. Functions of antimicrobial peptides in vertebrates. **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, p. 1098–1119, 2017.
- BORCHERS, A.T. et al. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. **Clínica Rev Allerg Immunol**, v. 45, p. 331, 2013.
- BOYOGLU-BARNUM S., et al. Mutating the CX3C Motif in the G Protein Should Make a Live Respiratory Syncytial Virus Vaccine Safer and More Effective. **Journal of Virology**, v. 91, n. 10, 2017.

BRANCHE, A. R.; FALSEY, A. R. Respiratory Syncytial Virus Infection in Older Adults: An Under-Recognized Problem. **Drugs & Aging**, v. 32, n. 4, p. 261–269, 1 abr. 2015.

CANDEIAS, W. M. Avaliação in vitro da atividade antiviral de um peptídeo sintético derivado de veneno de escorpião contra o vírus respiratório sincicial (VRS), cepa A2. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia)** – Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2018.

CHONG, H. et al. A Lipopeptide HIV-1/2 Fusion Inhibitor with Highly Potent In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Antiviral Activity. Ed. Frank Kirchhoff. **Journal of Virology**, e00288–17, PMC. Web. 22 Aug. 2018.

CROOKS, G. E.; et al. WebLogo: A Sequence Logo Generator. **Genome Research**, Berkeley, v. 14, n. 6, p.1188-1190, 12 maio 2004.

DIAS, E. H. V. Rastreamento em células in vitro de uma fosfolipase A2 da peçonha de *Bothrops alternatus* por meio de pontos quânticos de tamanhos mágicos. **Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica)** - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

DETALLE, L. et al. Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 6–13, 1 jan. 2016.

DUNCAN, R. B., Jr., POTGIETER, L. N. Antigenic diversity of respiratory syncytial viruses and its implication for immunoprphylaxis in ruminants. **Vet. Microbiol.**, v. 37, p. 319-341, 1993.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], Oxford University Press (OUP), v. 32, n. 5, p.1792-1797, 2004.

FONTES, L. A. X., FERREIRA, R. B. Análise das técnicas de fisioterapia respiratória em crianças com bronquiolitis aguda: Uma revisão da literatura. **REVISTA DA FAESF**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2018.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 4. ed. Nova York: Wiley-Liss, p. 397, 1994.

FULGINITI V. A., ELLER J. J., SIEBER O. F., JOYNER J. W., MINAMIITANI M., MEIKLEJOHN G. Imunização do vírus respiratório. **Am J Epidemiol**, n. 89, p. 435 – 448, 1969.

GARCÍA, C. JR, et al. Etiología viral de Infecciones respiratorias agudas en niños menores de 5 años en las provincias Comunera y García Rovira de Santander. **Rev UnivInd Santander Salud**, v. 48, n. 2, p. 240-45, 2016.

GILBERT, B. E. et al. Respiratory syncytial virus fusion nanoparticle vaccine immune responses target multiple neutralizing epitopes that contribute to protection against wild-type and palivizumab-resistant mutant virus challenge. **Vaccine**, v. 36, n. 52, p. 8069-8078, 2018.

GILBERTO C.; FRANCHI J. R.; CLEBER S.; MORAES V. C.; TORETI A.; DAUGSCH A.; NOWILL A. E.; PARK Y. K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT Assay. **J. Evid. Based Complement., Altern. Med.**, p. 303-309, 2012.

GOMES, M. C. C. **Triagem da potencial atividade antiviral de peptídeos antimicrobianos e da hemolinfa de ostras**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina. 2005.

GRIFFITHS, C.; DREWS, S. J.; MARCHANT, D. J. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, 30(1), 277–319, 2017.

HONG, Wei et al. Design of histidine-rich peptides with enhanced bioavailability and inhibitory activity against hepatitis C virus. **Biomaterials**, [S.L.], v. 34, n. 13, p.3511-3522, abr. 2013.

HONG, Wei et al. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 102, p.1-10, fev. 2014.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**, Washington, v. 9, n. , p.868-877, set. 1999.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.3, p.491-511, 2006.

KASHIWAGI T.; OKADA Y.; NOMOTO K. Palivizumab Prophylaxis Against Respiratory Syncytial Virus Infection in Children with Immunocompromised Conditions or Down Syndrome: A Multicenter. **Post-Marketing Surveillance in Japan**. Paediatric Drugs. v. 20, n.1, p. 97-104, 2018.

LAI, S.H. et al. Inhibition of respiratory syncytial virus infections with morpholino oligomers in cell cultures and in mice. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 6, p. 1120-1128, 2008.

LI, Q. et al. Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1518–1525, 2011.

LIMA, Â. M. A. et al. Síntese e avaliação das atividades fotoprotetora, citotóxica e antiviral contra o zika vírus de derivados triazólicos da benzofenona. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 473-484, May 2019.

MARTINS, F. O. et al. Atividade antiviral de *Musa acuminata* Colla, Musaceae. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, n. 3, p. 781-784, Sept. 2009.

MALINCZAD, C. A. et al. Upregulation of H3K27 Demethylase KDM6 During Respiratory Syncytial Virus Infection Enhances Proinflammatory Responses and Immunopathology. **Journal of Immunology**, v. 203, 2019.

McFARLAND E. J. et al. Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccine Candidate With Deletion of RNA Synthesis Regulatory Protein M2-2 is Highly Immunogenic in Children. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 9, p. 1347-1355, 2018.

MIGITA, N. A. Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. **Monografia (Especialização)** - Curso de Bacharel em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 522, de 13 de maio de 2013. Aprova o protocolo de uso do palivizumabe. **Diário Oficial da União**, 2013.

MORRIS, S. et al. Autophagy-mediated dendritic cell activation is essential for innate cytokine production and APC function with respiratory syncytial virus responses. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 8, p. 3953-61, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MULLER, V. D. M. Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela. 2011. 102 p. **Dissertação (mestrado)** - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.

NOKES D.J., OKIRO E.A., NGAMA M., et al. Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease in Infants and Young Children Studied from Birth in Kilifi District, Kenya. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 46.1: 50–57, 2008.

PASSOS, S. D. et al . DOENÇAS RESPIRATÓRIAS AGUDAS EM CRIANÇAS BRASILEIRAS: OS CUIDADORES SÃO CAPAZES DE DETECTAR OS PRIMEIROS SINAIS DE ALERTA?. **Rev. paul. pediatr.**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 3-9, mar. 2018.

PERINI, A. P., et al. Comparison of HeLa-I, HEp-2 and NCI-H292 cell lines for the isolation of human respiratory syncytial virus (HRSV). **Journal Of Virological Methods**, v. 146, n. 1-2, p.368-371, 7 set. 2007.

PHELAN, K.; MAY, K. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. **Current Protocols in Cell Biology**, 66, 1.1.1–1.1.22, 2015.

PIVA, H. M. R. Caracterização da interação dos flavonoides Hesperidina e Hesperetina com a proteína M2-1 do vírus sincicial respiratório humano. **Tese de Doutorado (Pós-graduação em Biofísica Molecular)** - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2019.

QUEVEDO LORENZO, I. et al. Factores de riesgo de infección respiratoria aguda en menores de un año. **Veguitas. Yara. Granma.**, v. 23, n. 5, p. 1000-1014, 2019.

QURESHI, A.; TANDON, H.; KUMAR, M. AVP-IC50Pred: Multiple machine learning techniques-based prediction of peptide antiviral activity in terms of half maximal inhibitory concentration (IC50). **Biopolymers**, v. 104, n. 6, p.753-763, 2015.

RANGHUNANDAN, R. et al. An insect cell derived respiratory syncytial virus (RSV) F nanoparticle vaccine induces antigenic site II antibodies and protects against RSV challenge in cotton rats by active and passive immunization. **Vaccine**, v. 32, n. 48, p. 6485-92, 2014.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p.320-324, 2014.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, vol.6 no.3 São Carlos Apr./June 2003.

SALOMÃO J. J. B., GARDINASSI L.G., et al. Human respiratory syncytial virus in children hospitalized for acute lower respiratory infection. **J Pediatr** (Rio J). 87(3):219-224, 2011.

SANTOS, D. F. S. et al. Análise do crescimento e viabilidade celular em membranas de poli (L-ácido láctico-CO-ácido glicólico): um estudo in vitro. **Rev. Gaúch. Odontol.**, 2019, vol.67, 2019.

SANTOS, V. M. et al. Circulação do vírus respiratório sincicial humano em cinco Estados da Região Amazônica brasileira: primeira descrição do genótipo ON1 no Pará. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 9, n. 3, p. 39-46, set. 2018.

SHARTOUNY, J. R; JACOB, J. Mining the tree of life : Host defense peptides as antiviral therapeutics. **Seminars in cell and developmental biology**, v. 17, p. 1–9, 2018.

SHI, T. et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. **Lancet (London, England)**, v. 390, n. 10098, p. 946–958, 2 set. 2017

SIEVERS, F.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.539-539, 16 abr. 2014.

SILVA, L. H. A. et al. Vírus respiratório sincicial humano e metapneumovírus humano. **Rev HCPA**, p. 139-146, 2009.

SIMOSSIS, V. A.; HERINGA, J. The PRALINE online server: optimising progressive multiple alignment on the web. **Computational Biology And Chemistry**, [s.l.], Elsevier BV., v. 27, n. 4-5, p.511-519, out. 2003.

SOUZA, F. B. J. Cultivo e titulação do vírus respiratório sincicial (VRS), cepa A2, em linhagem de células tumorais de carcinoma de laringe humana (hep-2). 2018. 31 f. **TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia**, Patos de Minas, 2018.

SOUZA, P. G. et al . INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA BAIXA EM CRIANÇAS INDÍGENAS GUARANI, BRASIL. **Rev. paul. pediatr.**, São Paulo , v. 36, n. 2, p. 123-131, jun. 2018.

STEIN, R. T. et al. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: Systematic review and meta-analysis. **Pediatric Pulmonology**, v. 52, n. 4, p. 556–569, abr. 2017.

THAKUR, N.; QURESHI, A.; KUMAR, M. AVPpred: collection and prediction of highly effective antiviral peptides. **Nucleic Acids Research**, Chandigarh, v. 40, n. 1, p.199-204, 25 may. 2012.

TOMA, T. S. et al . Uso profilático de palivizumabe na prevenção de infecção pelo vírus sincicial respiratório em crianças de alto risco. **BIS, Bol. Inst. Saúde (Impr.)**, São Paulo, v. 14, n. 2, maio 2013.

TOUCH S. M., SPITZER A. R. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. **Clinical Pediatrics**, n. 102, p. 531-537, 1999.

VIRALZONE. EXPAZY, 2019. Disponível em:
<https://viralzone.expasy.org/556?outline=all_by_species>. Acesso em: 10 dez. 2019.

YAN, Ran et al. A new natural α -helical peptide from the venom of the scorpion *Heterometrus petersii* kills HCV. **Peptides**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.11-19, jan. 2011.

ZENG, Z. et al. Histidine-rich Modification of a Scorpion-derived Peptide Improves Bioavailability and Inhibitory Activity against HSV-1. **Theranostics**, v. 8, n. 1, p. 199–211, 2018.