

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/03/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Evelyn Pedroso Toscano Quintino

**Estudo da interação da Crisina e seu derivado
monoacetilado com a proteína NS1 do Vírus Sincicial
Respiratório humano (hRSV) por Espectroscopia de
Fluorescência e *Docking* Molecular**

São José do Rio Preto

2019

Evelyn Pedroso Toscano Quintino

**Estudo da interação da Crisina e seu derivado
monoacetilado com a proteína NS1 do Vírus Sincicial
Respiratório humano (hRSV) por Espectroscopia de
Fluorescência e *Docking* Molecular**

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

Financiadora: CAPES

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

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey

São José do Rio Preto

2019

Q7e

Quintino, Evelyn Pedroso Toscano

Estudo da interação da crisina e seu derivado monoacetilado com a proteína NS1 do Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) por espectroscopia de fluorescência e docking molecular / Evelyn Pedroso Toscano Quintino. -- São José do Rio Preto, 2019

70 p. : il., tabs.

- Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Fátima Pereira de Souza

Coorientador: Marcelo Andrés Fossey

1. hRSV. 2. Proteína NS1. 3. Crisina. 4. Espectroscopia de fluorescência. 5. Docking Molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Evelyn Pedroso Toscano Quintino

**Estudo da interação da Crisina e seu derivado
monoacetilado com a proteína NS1 do Vírus Sincicial
Respiratório humano (hRSV) por Espectroscopia de
Fluorescência e *Docking* Molecular**

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Alessandra Vidotto
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Fernando Alves de Melo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
28 de março de 2019

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** pela vida, por me guiar até aqui, por me conceder paz nos momentos difíceis, pelas conquistas diárias, por me capacitar a cada dia e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

Agradeço aos meus pais, **Márcia Regina Pedroso e Edson Wander da Silva** que sempre me incentivaram a estudar, não mediando esforços para que eu tivesse um ensino de qualidade, por acreditarem em mim e por me proporcionarem todo o suporte emocional e financeiro para que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao meu esposo **Breno Quintino da Silva**, pelo companheirismo, por me incentivar e ser meu ponto de equilíbrio diário ao longo desses anos.

Agradeço à minha orientadora **Fátima Pereira de Souza** por ser meu exemplo, minha inspiração de todos os dias, por exigir cada vez mais de mim e mostrar que sou capaz, por me acolher nos momentos difíceis, por me proporcionar tantos momentos de aprendizado, por acreditar e ver meu potencial mesmo quando eu mesma não via, pelo amadurecimento profissional, pelo amor e dedicação que sempre demonstrou não somente a mim, mas a todo o grupo.

Agradeço ao meu coorientador **Marcelo Andres Fossey** pela paciência, dedicação, amor, por vibrar comigo a cada conquista, pelos aconselhamentos e por ensinar física a uma bióloga com tanto empenho e carinho.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, amigos esses que quero levar para a vida, por cada dia que passei com vocês, por cada café, cada risada, cada choro também, por me auxiliarem diariamente e até por me ajudarem a realizar meu maior sonho, uma festa de casamento. Agradeço especialmente a **Artemiza, Jéssica, Giovana, Amanda, Thainá, Vitor, Gabriela, Hêmily, Maria Fernanda e Raquel**.

À **Isabella**, que além de amiga, sempre me auxiliou nos experimentos e foi responsável pela realização da parte computacional deste trabalho.

Agradeço também ao **Ícaro** por ser nosso suporte diário no laboratório e por ter contribuído grandemente com este trabalho.

Agradeço à minha amiga de graduação **Gabrielle**, pela amizade e companheirismo que tem se sustentado desde o início da graduação, por me ouvir e me incentivar diariamente.

Ao professor **Luís Octávio Regasini** do Laboratório de Química Verde e Medicinal por fornecer os flavonoides usados nos experimentos.

Ao **Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular** e ao **departamento de física** no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP/São José do Rio Preto onde realizei os experimentos com toda a infraestrutura necessária.

Ao **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP)** por ter sido minha casa durante seis anos, pelo acolhimento, pela oportunidade de estudar em uma universidade maravilhosa com docentes excelentes e comprometidos com a formação dos alunos e por fornecer todo o suporte para a realização dos meus estudos, dos prédios aos livros.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Microbiologia** pelo suporte financeiro e de formação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, ao **CNPq** e à **FINEP** pelo apoio financeiro.

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

Agradeço à **Banca Examinadora**, pela disponibilidade e contribuição com este trabalho.

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) é um dos principais causadores de infecções respiratórias agudas (IRA), do trato inferior, em crianças menores de cinco anos de idade. O hRSV, membro da família Pneumoviridae, sintetiza a proteína NS1 que promove ao vírus evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Diante dos efeitos colaterais, alto custo e baixa eficácia dos tratamentos disponíveis, buscam-se tratamentos alternativos para hRSV com melhor eficácia, baixo custo e menos efeitos colaterais. A crisina, um flavonóide proveniente de produtos naturais, dentre suas atividades farmacológicas, apresenta atividade antiviral em estudos *in vitro* contra HSV-I e Influenza. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi estudar se há interação entre a proteína NS1 do hRSV e os flavonóides crisina e derivado monoacetilado de crisina, utilizando espectroscopia de fluorescência e *docking* molecular. Para isso, foi realizada a clonagem, expressão e purificação da proteína NS1 e caracterização dos ligantes. Os resultados da supressão de fluorescência da NS1 com ambos os ligantes apontam que o mecanismo de interação é do tipo dinâmico, já que as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) é diretamente proporcional ao aumento da temperatura. A partir da análise do duplo log determinou-se a ordem da constante de ligação (K_b) da ordem de 10^5 M^{-1} , entretanto a interação NS1-crisina apresentou maior afinidade do que na interação NS1-derivado monoacetilado de crisina. Os parâmetros termodinâmicos indicaram que a reação de ligação é favorável, entropicamente dirigida e predominantemente hidrofóbica. Esses resultados, juntamente com estudos de *Docking* molecular, nos sugerem que apesar da diminuição na afinidade da proteína pelo derivado monoacetilado de crisina, a modificação não resultou em maior probabilidade de afinidade do ligante por outro sítio que não o mesmo da NS1-crisina. A acetilação, em sistemas mais complexos, poderá resultar em um aumento na sua absorção intestinal, biodisponibilidade e acesso ao seu alvo por facilitar sua passagem pela membrana citoplasmática.

Palavras-chave: hRSV, proteína NS1, crisina, derivado monoacetilado de crisina, espectroscopia de fluorescência, *docking* molecular.

ABSTRACT

Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is a major cause of acute lower respiratory tract infections (ALRIs) in children under 5 years of age. HRSV, a member of the Pneumoviridae family, synthesizes the NS1 protein that promotes virus evasion of the host's immune system. In view of the collateral effects, high cost and low efficacy of available treatments, alternative treatments for hRSV was sought with better efficiency, low cost and fewer side effects. Chrysin, flavonoid from natural products, among its pharmacological activities, has antiviral activity in in vitro studies. Therefore, the aim of this work was to study the interaction between hRSV-NS1 and chrysin flavonoids and monoacetylated chrysin derivative using fluorescence spectroscopy and molecular docking. For this, cloning, expression and purification of the NS1 protein and characterization of the ligands were performed. The results of hRSV-NS1 fluorescence suppression with both ligands indicate that the interaction mechanism is of the collisional type, since the Stern-Volmer (K_{sv}) constants increase with increasing temperature. From the double log analysis, the order of the binding constant (K_b) of 10^5 M^{-1} was determined, however, the NS1-chrysin interaction showed higher affinity in comparison to the NS1-monoacetylated derivative of chrysin interaction. The thermodynamic parameters indicated that the binding reaction is favorable, entropically directed. These results, together with molecular docking studies, suggest us that despite the decrease in protein affinity for the monoacetylated derivative of chrysin, the modification did not result in a greater likelihood of affinity for the linker at a site other than that of NS1-chrysin. Chrysin acetylation, in more complex systems, may result in an increase in its intestinal absorption, bioavailability and access to its target by facilitating its passage through the cytoplasmic membrane.

Keywords: hRSV, hRSV-NS1, chrysin, monoacetylated derivative of chrysin, fluorescence spectroscopy, molecular docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Mapa global do tempo de pico de infecção por RSV e duração da epidemia (n = 96 locais). As cores ilustram o tempo da atividade de pico de RSV, com base na legenda inferior esquerda, enquanto o tamanho dos círculos é proporcional à duração da epidemia. Observações independentes para o mesmo local foram calculadas uma média. Para estudos que não forneceram informações suficientes para estimar a duração, um triângulo é mostrado. Círculos preenchidos com mais de uma cor representam locais que experimentam picos semestrais de atividade de vírus. 16

Figura 2. Representação da estrutura do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) e das suas proteínas. A. O hRSV possui proteínas estruturais e não estruturais. Dentre as proteínas estruturais, três compõem o envelope viral, a proteína de fusão F (verde), a glicoproteína G (amarelo) e a proteína hidrofóbica pequena SH (púrpura); quatro compõem o nucleocapsídeo, a proteína de matriz M (bege), a nucleoproteína N (azul), a fosfoproteína P (verde claro), a RNA polimerase dependente de RNA L (roxo). B Genoma do hRSV composto por 10 genes, sentido 3'-5', que codificam 11 proteínas. A cor representativa para cada gene corresponde à proteína que é produzida a partir do mesmo..... 19

Figura 3 Replicação do hRSV (Pneumoviridae). A replicação se inicia pela adsorção e fusão do vírus à célula hospedeira por meio da interação das proteínas G e F do vírus com receptores da célula hospedeira que resultam na fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática promovendo a internalização do material genético viral. O genoma viral internalizado é, em seguida, transcrito e traduzido. Tanto a replicação como a transcrição são dependentes da RNA polimerase dependente de RNA, que sintetiza antígeno de sentido positivo que servirá como molde para síntese de antígeno de sentido negativo e também será traduzido em proteínas virais. Após a síntese das proteínas e da replicação do genoma viral, a estrutura do vírion se reorganiza e sai da célula por brotamento dando origem ao vírion maduro.21

Figura 4 Atuação das proteínas virais na modulação da resposta imunológica do hospedeiro. 1. NS1 inibe a ligação de RIG-I à proteína mitocondrial de sinalização antiviral (MAVS) impedindo a interação MAVS-RIG-I necessárias para a produção de

IFN; 2. NS1 pode ligar-se diretamente ao IRF-3, ativador de transcrição do sistema IFN tipo I; 3. As proteínas NS1 e NS2 induzem a degradação proteossômica da STAT2 que, quando ativados, associam-se ao fator 9 regulador de interferon (IRF-9) para formar o complexo ativador transcricional fator 3 (ISGF-3). Esse complexo é translocado para o núcleo e ativa a transcrição dos ISG. 4. Interação da proteína F do hRSV com receptores *Toll-like* 4 (TLR-4) importantes na ativação da resposta imune inata.26

Figura 5 Esquema da estrutura molecular da crisina (5,7-di-OH-flavona) e derivado monoacetilado de crisina evidenciando o local onde foi realizada a modificação30

Figura 6 Mapa do plasmídeo pJexpress 401-NS1. O plasmídeo contém uma região marcadora para resistência a canamicina, o gene *lacI*, origem de replicação de alta cópia bacteriana, promotor de transcrição T5, a região do operador *lac* (*lacO*), o gene da NS1 e o gene para a cauda com 6 Histidinas.31

Figura 7 Espectro de absorção da crisina e seu derivado com os pontos utilizados. Coeficientes de extinção molar (ϵ) de 240 a 500 dos flavonoides A. crisina e B. Derivado monoacetilado de crisina em DMSO.....40

Figura 8 SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie brilliant blue* R-250 evidenciando o teste de expressão para averiguar o melhor tempo de indução da proteína NS1 em *Rosetta-gami* 2 (DE3). M. Marcador de massa molecular. Foram selecionados os tempos de 3, 4 e 17 horas após indução em três clones diferentes (C1, C2 e C3). Determinou-se a melhor condição de expressão após 4 horas de indução do clone 1. A proteína NS1 apresenta aproximadamente 16 kDa.41

Figura 9. SDS-PAGE 15% corado com *coomansie brilliant blue* R-250 evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade. A. M. Marcador de massa molecular, Al antes de induzir, DI depois da indução, Flow through 1 e 2, passos de lavagem de 5 a 40 mM de Imidazol. B. Passos de eluição de 60 a 500 mM de Imidazol. A proteína NS1 foi eluída no passo de 80 mM de Imidazol.43

Figura 10 Cromatograma referente a cromatografia de exclusão molecular. Em azul está representado a absorbância no UV em mAU, em vermelho são as frações coletadas de 0,5 mL em cada fração e em preto o volume coletado em mL. Quatro picos foram observados, de B2 a B8, de B9 a C2, de C9 a C11 e o último pico em D1.

A proteína NS1 foi eluída nas frações B10 a C2, que apresentou pico de 110 mAU em um volume de 12 e 13 mL.....	45
Figura 11 Gel SDS-PAGE 15% evidenciando as frações coletadas após a cromatografia de exclusão molecular. A. A1 (amostra antes de injetar), M (marcador de massa molecular), B2 a B8 frações coletadas referentes ao primeiro pico do cromatograma de 38 mAU. B. Frações de B9 a C2 referente ao segundo pico de 110 mAU (eluição da proteína NS1), C11 referente ao terceiro pico de 8 mAU e D1 referentes ao pico aproximadamente 2 mAU.	46
Figura 12 Espectro Absorbância da proteína NS1 em tampão PBS 1X, pH 7,4. A. Absorbância da proteína NS1 na concentração de 34,14 μ M. B. Absorbância da proteína NS1 na concentração de 2 μ M.....	47
Figura 13 Espectro de dicroísmo circular e estrutura da proteína NS1 (tampão PBS 1x, pH 7,4). (a) O espectro de CD da proteína obtido experimentalmente está representado pelos círculos pretos e o ajuste da curva utilizando programa CONTIN/LL.(b) Diagrama de topografia da proteína NS1.....	48
Figura 14 Espectros de supressão da fluorescência da proteína NS1 pela presença dos flavonoides. A. Crisina. B. Derivado mono acetilado de crisina. Ambos na temperatura de 19 °C. A concentração dos ligantes variaram de 0 a 4 μ M. Proteína NS1 em Tampão PBS 1X em uma concentração de 2 μ M.	49
Figura 15. Gráficos de Stern-Volmer e ajuste linear dos pontos nas temperaturas de 19 e 37 oC. A. complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina.....	50
Figura 16 Gráficos de duplo log e ajuste linear dos pontos nas temperaturas de 19 e 37 °C	50
Figura 17 Gráficos de Van't Hoff. A. complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina.....	52
Figura 18. Gráficos em barras dos parâmetros termodinâmicos dos complexos NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina em duas temperaturas, 19 e 37 °C. A complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina. Variação da energia livre de Gibbs (ΔG), variação da entalpia (ΔH) e variação da entropia ($T\Delta S$).....	52

Figura 19 Localização das moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina na cavidade de interação da proteína NS1 por docking molecular e mapa de interação. A. Localização da molécula crisina na proteína. B. Detalhe estrutural da interação entre NS1-crisina obtida pelo método de modelagem molecular. C. mapa de interação entre NS1 crisina obtida a partir do PayMol evidenciando as distâncias, linha tracejada verde, entre a crisina e os resíduos Lys-115 e Pro-67. D. Localização da molécula derivado monoacetilado de crisina na proteína. E. Detalhe estrutural da interação entre NS1-derivado monoacetilado de crisina obtida pelo método de modelagem molecular. F. mapa de interação entre NS1 e o derivado monoacetilado de crisina obtida a partir do PayMol. As moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina são representadas utilizando o modelo stick-balls, os resíduos de aminoácidos são denotados usando o modelo sticks (C, cinza; O, vermelho; N, azul; S, amarelo; H, branco) e as pontes de hidrogênio representadas por linhas tracejadas amarelas...54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Constantes de Stern-Volmer resultantes da interação do complexo NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina. R = coeficiente de correlação.....49
- Tabela 2.** Constantes de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação nas temperaturas de 19 e 37 °C para a interação entre NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina. Os coeficientes de correlação (R) são > 0,995.....51
- Tabela 3.** Parâmetros termodinâmicos dos complexos NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina em duas temperaturas, 19 e 37 °C. A complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina. Variação da energia livre de Gibbs (ΔG), variação da entalpia (ΔH) e variação da entropia ($T\Delta S$).....53

Sumário

1-	INTRODUÇÃO	12
2-	REVISÃO DA LITERATURA	13
	2.1. Replicação viral e função das proteínas do hRSV no processo de infecção.....	20
	2.2. Resposta imunológica e o papel da proteína NS1 na infecção viral...23	
	2.3. Tratamento e busca de alvo para bloqueio da replicação viral.....26	
	2.4. Crisina: Potencial Terapêutico e Antiviral	27
	2.4.1. Estrutura química da crisina e derivado monoacetilado de crisina	28
3.	OBJETIVOS	30
	3.3. Objetivos Gerais.....	30
	3.4. Objetivos Específicos	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	30
	4.1. DNA recombinante pJexpress 401-NS1	31
	4.2. Parâmetros físico-químicos da proteína NS1 fornecidos pelo programa ProtParam	32
	4.3. Transformação e expressão da proteína NS1 em <i>Rosetta-Gami 2</i> (DE3)	32
	4.4. Purificação Proteína NS1 por Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados e Cromatografia de Exclusão Molecular	33
	4.5. Caracterização dos flavonoides Crisina e derivado monoacetilado de crisina.....	34
	4.6. Estrutura secundária por deconvolução espectral de CD.....	35
	4.7. Espetroscopia de fluorescência: medidas e análises	36
	4.8. Parâmetros Termodinâmicos.....	38
	4.9. Docking molecular e mapa de interação.....	39
5.	RESULTADOS	40
	5.1. Caracterização dos ligantes crisina e derivado monoacetilado de crisina	40
	5.2. Teste de indução da proteína	40
	5.3. Purificação da proteína NS1	41
	5.4. Dicroísmo Circular (CD).....	47
	5.5. Supressão da fluorescência da NS1 Crisina e seu derivado	48
6.	DISCUSSÃO	55
7.	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	60

1- INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que mais afetam as crianças nos primeiros anos de vida, encontram-se as infecções virais do trato respiratório inferior. O Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) é um dos principais causadores dessas infecções respiratórias agudas (IRA) graves como pneumonia e bronquiolite em crianças menores de 5 anos de idade, sendo o causador de milhões de hospitalizações e milhares de óbitos nessa faixa etária, afetando também imunodeficientes e idosos (NAIR et al., 2010; LAMBERT et al., 2014; GRIFFITHS et al., 2016).

A maioria das infecções por hRSV ocorrem em períodos específicos do ano, o que o caracteriza como sazonal. No hemisfério norte, entre outubro e maio e, no hemisfério sul, especialmente no Brasil, entre abril e julho, com pico no final do verão (CHECON et al., 2002; BLOOM-FESHACH et al., 2013; PAYNTER, 2015).

O hRSV é membro da família Pneumoviridae pertencente ao gênero *Orthopneumovirus*, sendo um vírus de RNA não segmentado de cadeia negativa. O genoma viral contém 10 genes responsáveis pela transcrição de 11 proteínas. Suas proteínas são: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, L, M2-1 e M2-2 (COLLINS et al., 2013; TAPIA et al., 2014; FREITAS et al., 2015).

A molécula alvo desse trabalho é a NS1, uma proteína não estrutural envolvida na inibição da produção de interferon, que juntamente com outros mediadores inatos das células epiteliais, têm um papel crucial no curso subsequente da infecção por RSV por induzir mecanismos de defesa contra a infecção viral. A inibição do interferon do tipo I parece ser um dos principais determinantes da suscetibilidade à reinfecção pelo RSV, com seus efeitos de longo alcance na imunidade inata e adaptativa (GARCÍA-SASTRE et al., 2006; MUNIR et al., 2011; PRETEL et al., 2013; OPENSHAW et al., 2017).

Até o momento, não existe vacina aprovada para a imunização contra a infecção por hRSV e o tratamento oferecido atualmente, como o palvizumab e a Ribavirina são de alto custo, causam efeitos colaterais, principalmente a Ribavirina, e não são efetivos no tratamento da doença (DE VINCENZO et al., 2008). Dessa forma, buscar tratamentos alternativos mais efetivos, de baixo

custo e com menos efeitos colaterais passou a ser o objetivo de muitos pesquisadores da área (HEYLEN et al., 2017).

A crisina, uma flavona oriunda de produtos naturais, dentre suas atividades farmacológicas, apresenta atividade antiviral em estudos *in vitro* contra o vírus do HSV-I e Influenza (SCHNITZLER et al., 2010 e HOUR et al., 2013). Modificações realizadas na estrutura desses flavonoides para facilitar sua entrada na célula por meio de difusão passiva e, portanto, melhorar sua absorção, são uma estratégia utilizada para melhorar a biodisponibilidade de um fármaco (PEREIRA, 2007).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi estudar e caracterizar por espectroscopia de fluorescência, aspectos da interação, como supressão de fluorescência, *Stern-Volmer*, duplo-log e parâmetros termodinâmicos. Além disso, estudos utilizando *docking* molecular e mapa de interação foram realizados a fim de analisar as principais interações intermoleculares entre a crisina e derivado monoacetilado de crisina e os resíduos de aminoácidos presentes na cavidade de interação do da proteína NS1.

2- REVISÃO DA LITERATURA

Infecções respiratórias agudas (IRAs) são consideradas a principal causa de morte infantil no mundo. Dentre os causadores desse tipo de infecção encontra-se o Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV), que acomete principalmente crianças com até 5 anos de idade. Até dois anos de idade, o risco de infecção por hRSV é maior e 40% delas desenvolvem as infecções respiratórias agudas. Destas, 0,5-2% necessitam de hospitalização tornando as IRAs de trato inferior associadas ao hRSV a principal causa de hospitalização em crianças durante o inverno (NAIR et al., 2010; LAMBERT et al., 2014; GRIFFITHS et al., 2016).

Em um levantamento global realizado por Shi e colaboradores (2017) as IRAs causadas por hRSV corresponderam, no ano de 2015, há 33,1 milhões de casos que resultaram em 3,2 milhões de internações hospitalares e 59,6 mil óbitos de crianças com menos de cinco anos de idade hospitalizadas (SHI et al., 2017; GRIFFITHS et al., 2016; NAIR et al., 2010). Sendo assim, as infecções por

7. CONCLUSÃO

A proteína NS1, utilizada nos experimentos, foi expressa com 0,3mM de IPTG e sua purificação se deu por meio de dois processos cromatográficos, cromatografia de afinidade, em que a proteína foi eluída com 80 mM de imidazol, e cromatografia de exclusão molecular, no qual foi eluída com aproximadamente 13 mL de tampão PBS.

A fluorescência do triptofano da proteína NS1 foi suprimida com a adição de ambos os ligantes, crisina e derivado monoacetilado de crisina. Entretanto, os resultados do atracamento molecular mostraram que a região mais provável onde ambos os ligantes interagiram com a proteína estão próximas, porém não na cavidade onde se encontra o resíduo de triptofano, o que mostra que, mesmo não interagindo no local onde se encontra o triptofano, podem de alguma forma exercer influência sobre o microambiente do mesmo, suprimindo a fluorescência.

Pelo método de espectroscopia de fluorescência obteve-se o gráfico de Stern-Volmer sugerindo que ambas as supressões se deram pelo mecanismo colisional, já que o valor de K_{sv} aumenta com a temperatura. A partir do gráfico do duplo log foi possível obter a constante de associação que foi da ordem de $10^5 M^{-1}$, bem como a estequiometria de ligante por proteína que foi de 1:1 para as interações NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina.

Os parâmetros termodinâmicos para as duas temperaturas, 19 e 37°C, revelaram que a ligação NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina ocorrem de forma espontânea e aumentam sua afinidade com o aumento da temperatura. O valor positivo de ΔH e o valor positivo de ΔS mostra que a interação é devida principalmente a fatores hidrofóbicos. Tal perfil termodinâmico indica uma interação predominantemente do tipo hidrofóbica e entropicamente dirigida provavelmente devido à influência das moléculas de hidratação que são expelidas com a entrada das moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina na cavidade proteica da NS1.

Esses resultados sugerem que a substituição de um grupo hidroxila no carbono 7 do anel A da crisina resultou em em uma diminuição na afinidade da proteína pelo ligante que pode ser observada nas constantes de Stern-Volmer, constantes de ligação (K_b) e nos parâmetros termodinâmicos. Entretanto, não foi

suficiente para que o derivado monoacetilado de crisina interagisse em outra região que não a mesma que a crisina.

Conclue-se, portanto, que a acetilação do grupo hidroxila de fato aumentou a hidrofobicidade da molécula, provavelmente aumentará sua absorção e biodisponibilidade. Entretanto, apesar de haver uma pequena diminuição da afinidade da proteína pelo ligante em relação à crisina, o sítio mais provável de interação se manteve o mesmo.

O local onde as moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina provavelmente interagiram estão próximas a uma região flexível da proteína, a alfa-hélice 3, que segundo Chatterjee e colaboradores (2017), é uma região importante para a função da proteína NS1. A interação das crisininas nessa região pode expor ou esconder resíduos de aminoácidos, dentre eles Y125 e L132 e L133 que segundo Chatterjee, podem ter um papel crítico no antagonismo de IFN mediado por NS1.

8. REFERÊNCIAS

AHAD, A., GANAI, A. A., MUJEEB, M., & SIDDIQUI, W. A.. Chrysin, an anti-inflammatory molecule, abrogates renal dysfunction in type 2 diabetic rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2014.

ALTIZER, S.; DOBSON, A.; HOSSEINI, P.; HUDSON, P.; PASCUAL, M.; ROHANI, P. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. **Ecology Letters**, 2006.

ATUM. Bacterial expression vectors. Disponível em: <https://www.atum.bio/products/expression-vectors/bacterial?hl=PJ401#pg29> Acesso em: 20 de outubro de 2018

ARAÚJO, M. E. M. B. Biossíntese de novos derivados acilados de flavonoidese avaliação in vitro de suabioatividade. Tese (Doutorado) apresentado ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Bragança Paulista, 2016.

BAE, Y., LEE, S., & KIM, S.-H. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: Involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2011.

BARBARIĆ, M.; MIŠKOVIĆ, K.; BOJIĆ, M.; LONČAR, M. B.; SMOLČIĆ-BUBALO, A.; DEBELJAK, Ž.; MEDIĆ-ŠARIĆ, M. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. **Journal of Ethnopharmacology**, 2011

BLOOM-FESHBACH, K.; ALONSO, W. J.; CHARU, V.; TAMERIUS, J.; SIMONSEN, L.; MILLER, M. A.; VIBOUD, C. Latitudinal Variations in Seasonal Activity of Influenza and Respiratory Syncytial Virus (RSV): A Global Comparative Review. **Plos One**, 2013.

BOIVIN, G, CAOQUETTE, G.; FRENETTE, L.; CARBONNEAU, J. OUAKKI, M.; SERRES, G. Human respiratory syncytial virus and other viral infections in infants receiving palivizumab. **Journal of Clinical Virology**, 2008.

CANDIRACCI, M., CITTERIO, B., DIAMANTINI, G., BLASA, M., ACCORSI, A., & PIATTI, E. Honey Flavonoids, Natural Antifungal Agents Against *Candida Albicans*. **International Journal of Food Properties**, 2011.

CANE, P. A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial vírus. **Reviews in Medical Virology**, 2001.

CANEDO-MARROQUÍN, G. ACEVEDO-ACEVEDO, O.; REY-JURADO, E.; SAAVEDRA, J. M. LAY, K. M.; BUENO, S. M.; RIEDEL, C. A; KALERGIS, A. M. Modulation of Host Immunity by Human Respiratory Syncytial Virus Virulence Factors: A Synergic Inhibition of Both Innate and Adaptive Immunity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2017.

CARUSO, I. P. Estudo de interação dos flavonóides Isovitexina e 2-Fenilcromona com a Albumina do Soro Humano: abordagem experimental e computacional. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2016.

CERVANTES-ORTIZ, S. L.; CUERVO, N. V.; GRANDVAUX, N. Respiratory Syncytial Virus and Cellular Stress Responses: Impact on Replication and Physiopathology. **Viruses**, 2016.

CHATTERJEE S, LUTHRA P, ESAULOVA E, et al. Structural basis for human respiratory syncytial virus NS1-mediated modulation of host responses. **Nature Microbiol**, 2017.

CHAVES, O., AMORIM, A., CASTRO, L., SANT'ANNA, C., DE OLIVEIRA, M., CESARIN-SOBRINHO, D., ... FERREIRA, A. Fluorescence and Docking Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Pheophytin. **Molecules**, 2015.

[CHECON](#), R. E.; [SIQUEIRA](#), M. M.; [LUGON](#), A. K.; [PORTES](#), S.; [DIETZE](#), R. Short report: seasonal pattern of respiratory syncytial virus in a region with a tropical climate in southeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2002.

CHO, H.; YUN, C-W.; PARK, W-K.; KONG, J-Y; KIM, K. S.; PARK, Y.; LEE, S.; KIM, B-K. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. **Pharmacological Research**, 2004.

COLLINS, P.L.; FEARNES, R.; GRAHAM, B.S. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. **Curr Top Microbiol Immunol.**, 2013. 372:3-38.

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; POEL, B. V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. **Journal of Natural Products**, 1998.

DE VINCENZO, J.; CEHELKY, J. E.; ALVAREZ, R.; ELBASHIR, S.; HARBORTH, J.; TOUDJARSKA, I.; NECHEV, L.; MURUGAIAH, V.; ANDRE VAN VLIET, A. V.; VAISHNAW, A. K.; MEYERS, R. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). **Antiviral Research**, 2008.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific: Palo Alto, CA. Disponível em: <http://www.pymol.org>. Acesso em: 24 de Junho de 2019.

ELLIOTT, J.; LYNCH, O. T.; SUESSMUTH, Y.; QIAN, P.; BOYD, C. R. BURROWS, J. F.; BUICK, R.; STEVENSON, N. J.; TOUZELET, O.; GADINA, M.; POWER, U. F.; JOHNSTON, J. A. Respiratory syncytial virus ns1 protein degrades stat2 by using the elongin-cullin e3 ligase. **Journal of virology**, 2007.

FERNANDEZ-SESMA, A.; MARUKIAN, S.; EBERSOLE, B. J.; KAMINSKI, D.; PARK, M-S.; YUEN, T.; SEALFON, S. C.; GARCÌA-SASTRE, A.; MORAN, T. M. Influenza Virus Evades Innate and Adaptive Immunity via the NS1 Protein. **Journal of Virology**, 2006.

FREITAS, D. N. Avaliação de mecanismos relacionados com a diferenciação de células TCD8 de memória durante a infecção pelo vírus sincicial respiratório. Dissertação (Mestrado em saúde da criança). Universidade Católica do Rio Grande do Sul. **Porto Alegre**, 2015.

GARCÌA-SASTRE, A.; BIRON, C. A. Type 1 Interferons and the Virus-Host Relationship: A Lesson in Détente. **Science**, 2006.

GARDINASSI, L. G.; SIMAS, P. V. M.; SALOMÃO, J. B.; DURIGON, E. L.; TREVISAN, D. M. Z.; CORDEIRO, J. A.; LACERDA, M. N.; RAHAL, P.; SOUZA, F. P. Seasonality of viral respiratory infections in Southeast of Brazil: the influence of temperature and air humidity. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2012.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy

Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, **Humana Press**, 2005.

GEETHANJALI, H. S.; NAGARAJA, D.; MELAVANKI, R. M. Exploring the mechanism of fluorescence quenching in two biologically active boronic acid derivatives using Stern-Volmer kinetics. **Journal of Molecular Liquids**, 2015

GOBRECHT, A.; BENDOULA, R.; ROGER, J.-M.; BELLON-MAUREL, V. Combining linear polarization spectroscopy and the Representative Layer Theory to measure the Beer–Lambert law absorbance of highly scattering materials. **Analytica Chimica Acta**, 2015.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, 2007.

GRIFFITHS, C.; DREWS, A. S. J.; MARCHANTA, D. J. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, 2017.

HEYLEN, E.; NEYTS, J.; JOCHMANS, D. Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus antiviral drug discovery. **Biochemical Pharmacology**, 2017.

HIGGINS, D.; TRUJILLO, C.; KEECH, C. Advances in RSV vaccine research and development – A global agenda. **Vaccine**, 2016.

HOUR, M.-J.; HUANG, S.-H.; CHANG, C.-Y.; LIN, Y.-K.; WANG, C.-Y.; CHANG, Y.-S.; LIN, C.-W. Baicalein, Ethyl Acetate, and Chloroform Extracts of *Scutellaria baicalensis* Inhibit the Neuraminidase Activity of Pandemic 2009 H1N1 and Seasonal Influenza A Viruses. **Hindawi Publishing Corporation**, 2013.

JOHN, D. M.; WEEKS, K. M. Van't Hoff enthalpies without baselines. **Protein Science**, 2000.

KEIZER, J. Nonlinear fluorescence quenching and the origin of positive curvature in Stern-Volmer plots. **Journal of the American Chemical Society**, 1983.

KYRIAKOU, E.; PRIMIKYRI, A.; CHARISIADIS, P.; KATSOURA, M.; GEROTHANASSIS, I. P.; STAMATIS, H.; TZAKOS, A. G. Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 2012

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, Ed. 3, 2006.

LAMBERT, L., SAGFORS, A. M., OPENSHAW, P. J., AND CULLEY, F. J. (2014). Immunity to RSV in Early-Life. **Frontiers in Immunology**, 2014.

MANI, R.; NATESAN, V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. **Phytochemistry**, 2018. .

MARCHANT D, SINGHERA GK, UTOKAPARCH S, HACKETT TL, BOYD JH, LUO Z, SI X, DORSCHIED DR, MCMANUS BM, HEGELE RG. Toll-like receptor 4-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase is a determinant of respiratory virus entry and tropism. **Journal of Virology**, 2010.

MEISSNER HC. Viral bronchiolitis in children. **The New England Journal of Medicine**, 2016.

MOREIRA, F. B.; ROSARIO, C. S.; SANTOS, J. S.; AVANZI, V. M.; NOGUEIRA, M. B.; LUINE R. VIDAL, L. R.; RABONI, S. M. Molecular characterization and clinical epidemiology of human respiratory syncytial virus (HRSV) A and B in hospitalized children, Southern Brazil. **Journal of Medical Virology**, 2017.

MORRIS, G. M., GOODSELL, D. S., HALLIDAY, R. S., HUEY, R., HART, W. E., BELEW, R. K., & OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, 1998.

MUNIR, *et al.* Respiratory syncytial virus interferon antagonist NS1 protein suppresses and skews the human T lymphocyte response. **PLoS Pathology**, 2011.

NABAVI, S. F., BRAIDY, N., HABTEMARIAM, S., ORHAN, I. E., DAGLIA, M., MANAYI, A., ... NABAVI, S. M. Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine. **Neurochemistry International**, 2015.

NAIR, H; NOKES, D.J.; GESSNER, B.D.; DHERANI, M.; MADHI, S.A.; SINGLETON, R.J.; O'BRIEN, K.L.; ROCA, A.; WRIGHT, P.F.; BRUCE, N.; CHANDRAN, A.; THEODORATOU, E.; SUTANTO, A.; SEDYANINGSIH, E. R.; NGAMA, M.; MUNYWOKI, P. K.; KARTASASMITA, C.; SIMOES, E. A.; RUDAN, I.; WEBER, M. W.; CAMPBELL, H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory

syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, 2010.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Chrysin, CID=5281607, Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chrysin>> Acesso em: 24 de Junho de 2019

OPENSHAW, P. J. M.; CHIU, C. CULLEY, F. J.; JOHANSSON, C. Protective and Harmful Immunity to RSV Infection. **Annual Review of Immunology**, 2017.

PANGESTI, K. N. A.; GHANY, M. A. E.; WALSH, M. G.; KESSON, A. M.; HILL-CAWTHONE, G. A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. **Wiley**, 2017.

PAYNTER S. Humidity and respiratory virus transmission in tropical and temperate settings. **Epidemiol. Infect.**, 2015.143:1110–1118.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, 2007.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, 2007.

PICA, N.; VERGOUWE, Y. Ambient Temperature and Respiratory Virus Infection. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, 2014.

PICKLES, R. J.; DEVINCENZO, J. P. Respiratory syncytial virus (RSV) and its propensity for causing bronchiolitis. **Journal of Pathology**, 2015.

PITTET, L. A.; HALL-STOODLEY, L.; RUTKOWSKI, M. R.; HARMSEN, A. G. Influenza Virus Infection Decreases Tracheal Mucociliary Velocity and Clearance of *Streptococcus pneumoniae*. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 2010.

PRETEL, E.; CAMPOREALE, G.; DE PRAT-GAY, G. The Non-Structural NS1 Protein Unique to Respiratory Syncytial Virus: A Two-State Folding Monomer in Quasi-Equilibrium with a Stable Spherical Oligomer. **Plos ONE**, 2013.

PRETEL, M. E. La proteína no-estructural NS1 exclusiva del virus respiratorio sincicial: mecanismo de plegamiento y ensamblado cuasespontáneo de oligómeros esféricos

estables. Tese: Doutorado em Química Biológica. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina, 2014.

PUSHPAVALLI, G., KALAIARASI, P., VEERAMANI, C., & PUGALENDI, K. V. (2010). Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in d-galactosamine-induced hepatitis in rats. **European Journal of Pharmacology**, 2010.

RAMÍREZ-ESPINOSA, J., SALDAÑA-RÍOS, J., GARCÍA-JIMÉNEZ, S., VILLALOBOS-MOLINA, R., ÁVILA-VILLARREAL, G., RODRÍGUEZ-OCAMPO, A, et al. Estrada-Soto, S. Chrysin Induces Antidiabetic, Antidyslipidemic and Anti-Inflammatory Effects in Athymic Nude Diabetic Mice. **Molecules**, 2017.

SANDE, C.J.; MUTUNGA, M.N.; MEDLEY, G.F.; CANE, P.A.; NOKES, D.J. Group and Genotype-Specific Neutralizing Antibody Responses Against Respiratory Syncytial Virus in Infants and Young Children With Severe Pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**, 2013.

SANNER MF. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 1999.

SATHISHKUMAR, G., BHARTI, R., JHA, P. K., SELVAKUMAR, M., DEY, G., JHA, R., SIVARAMAKRISHNAN, S, et al. Dietary flavone chrysin (5,7-dihydroxyflavone ChR) functionalized highly-stable metal nanoformulations for improved anticancer applications. **RSC Advances**, 2015.

SCHNITZLER, P.; NEUNER, A.; NOLKEMPER, S.; ZUNDEL, C.; NOWACK, H.; SENSCH, K. H.; REICHLING, J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytotherapy Research**, 2010.

SHAHRIARI, S.; GORDON, J. GHILDYAL, R. Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding. **Virology Journal**, 2016

SHARMA, A.; WU, W.; SUNG, B.; HUANG, J.; TSAO, T.; LI, X.; GOMI, R.; TSUJI, M.; WORGALL, S. Respiratory Syncytial Virus (RSV) Pulmonary Infection in Humanized Mice Induces Human Anti-RSV. **Immune Responses and Pathology**, 2016.

SHI, T., MCALLISTER, D.A., O'BRIEN, KL, et al. Global, regional and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. **The Lancet**, 2017.

SITHISARN, P.; MICHAELIS, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; CINATL, J. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. **Antiviral Research**, 2013.

SOUZA, L. C.; ANTUNES, M. S.; FILHO, C. B.; FABBRO, L. D.; GOMES, M. G.; GOES, A. T. R.; DONATO, F.; PRIGOL, M.; BOEIRA, S. P.; JESSE, C. R. Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **Editora Elsevier**, 2015.

STOLEY, M. E.; KNUDSON, C. J.; PEWE, L. L.; MEYERHOLZ, D. K.; LANGLOIS, R. A.; TENEVER, B. R.; Harty, J. T.; Memory CD8 T cells in RSV infection: friend or foe?. **The Journal of Immunology**, 2016.

STROET, M., CARON, B., VISSCHER, K. M., GEERKE, D. P., MALDE, A. K., & MARK, A. E. The Automated Topology Builder Version 3.0 (ATB3.0): Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2018.

SUN, Y., López, C. B. The innate immune response to RSV: Advances in our understanding of critical viral and host factors. **Vaccine**, 2017.

SURESH BABU, K., HARI BABU, T., SRINIVAS, P. V., HARA KISHORE, K., MURTHY, U. S. N., & RAO, J. M. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006.

TAPIA L. I.; SHAW, C. A.; AIDEYAN, L. O.; JEWELL, A. M.; BRIAN C. DAWSON, B. C.; TAHA R. HAQ, T. R.; PIEDRA, P. A.. Gene Sequence Variability of the Three Surface Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in Texas. **PLoS ONE**, 2014.

TAPIA L. I.; SHAW, C. A.; AIDEYAN, L. O.; JEWELL, A. M.; BRIAN C. DAWSON, B. C.; TAHA R. HAQ, T. R.; PIEDRA, P. A.. Gene Sequence Variability of the Three Surface Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in Texas. **PLoS ONE**, 2014.

TSUJI, P. A., WINN, R. N., & WALLE, T. Accumulation and metabolism of the anticancer flavonoid 5,7-dimethoxyflavone compared to its unmethylated analog chrysin in the Atlantic killifish. **Chemico-Biological Interactions**, 2006.

WALLE, U. K.; GALIJATOVIC, A.; WALL, T. Transport of the Flavonoid Chrysin and Its Conjugated Metabolites by the Human Intestinal Cell Line Caco-2. **Biochemical Pharmacology**, 1999.

WANG, T-Y.; LI, Q.; BI, K-S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, 2018.

WEN, X.; WALLE, T. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. **Drug Metabolism & Disposition**, 2006.

WOLKOFF, P. Indoor air humidity, air quality, and health - An overview. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2018.

YANG, P.; ZHENG, J.; WANG, S.; LIU, P.; XIE, M.; IZHAO, D. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2 are crucial pathogenic factors that modulate interferon signaling and Treg cell distribution in mice. *Virology*. **Editora Elsevier**, 2015.