

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 25/02/2018.



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

THIAGO SALEM PANÇONATO TEIXEIRA

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO ENTRE A  
PROTEÍNA M2-1 DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO  
HUMANO (HRSV) COM QUERCETINA.

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP  
2016

Thiago Salem Pançonato Teixeira

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO ENTRE A  
PROTEÍNA M2-1 DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO  
HUMANO (HRSV) COM QUERCETINA.

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fátima Pereira de Souza

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP  
2016

Teixeira, Thiago Salem Pançonato.

Caracterização biofísica da interação entre a proteína M2-1 do Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) com quercetina / Thiago Salem Pançonato Teixeira. -- São José do Rio Preto, 2016  
98 f. : il., tabs.

Orientador: Fátima Pereira de Souza

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Vírus Sincicial Respiratório Humano. 3. Dinâmica molecular. 4. Biofísica. 5. Quercetina. I. Souza, Fátima Pereira de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.858

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

Thiago Salem Pançonato Teixeira

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO ENTRE A  
PROTEÍNA M2-1 DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO  
HUMANO (HRSV) COM QUERCETINA.

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

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima Pereira de Souza  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Vidotto  
FAMERP

Dr. Fábio Rogério de Moraes  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Natália Bueno Leite Slade  
UNILAGO – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Marcio José Tiera  
UNESP – São José do Rio Preto

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP  
2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de vivenciar a realidade do pesquisador, concedendo-me força, atenção e paciência, principalmente quando o cansaço e a saudade de casa sobrepunham meus ânimos.

À minha professora e orientadora Dr<sup>a</sup>. Fátima Pereira de Souza que acreditou em mim para desenvolver esse trabalho e, me ensinou a ser visionário e ter esperanças e forças ao visualizar o final e não o meio.

Ao professor Dr. Marcelo Andrés Fossey pelos ensinamentos, atenção e ajuda nos experimentos de fluorescência e nos tratamentos dos resultados dos mesmos.

Ao professor Dr. Mario Sérgio Palma por conceder a seu laboratório para a realização do sequenciamento e à sua orientanda Ma. Nathalia Baptista Dias por dispor do seu tempo para a realização do sequenciamento da proteína.

Ao professor Dr. Altair Benedito Moreira por ceder o espectrofluorímetro, essencial para a realização desse trabalho. Ao professor Dr. Márcio Francisco Colombo por ceder o sistema de purificação ÄKTA, sem o qual esse trabalho não teria o mesmo dinamismo.

À FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa, processo: 2013/2435502.

À minha mãe Maria Vitória por ser o sopro que me move, o coração a compartilhar a dor e a alegria. A amiga que esteve presente com todo amor, mesmo a quilômetros de distância.

Ao meu pai Antônio Pançonato que me ensinou a resignar e ser paciente diante às dificuldades que às vezes o destino impõe.

A minha tia Gabriela, minha segunda mãe, que com seu amor acompanhou meus primeiros passos me ensinando a rir das dificuldades.

Aos meus irmãos Henrique e Hamilton que são exemplos e reflexões que sempre me surpreendem. Mais que irmãos e amigos, são um destino a ser acompanhado.

Ao meu namorado Tiago que sempre me apoiou nessa jornada, tornando o retorno ao lar um momento de alegria.

À minha amiga Deriane que me acolheu em amor fraternal e me tutelou no início nessa nova jornada.

À minha amiga Gabriela que em sua mansuetude me acalentou em momentos turbulentos, além de dividir espaço de trabalho e conhecimentos comigo.

Aos demais amigos e colegas Ana Karla, Anwar, Carlos, Cíntia, Daiane, Danúbia, Fernanda, Hana, Hêmily, Ícaro, Isabella, Karoline, Luciana, Mariana, Mônica, Natalia, Paulo, Pedro, Raphael, Ricardo, Taísa, Vitor e Yuri que colaboraram ora no crescimento profissional ora no pessoal.

Aos funcionários do laboratório e do departamento, que cada qual com sua função, foi uma mão a mais nesse trabalho, seja na limpeza do chão, no preparo de uma solução ou no preparo do café.

## Sumário

1.Introdução .....	9
1.1. Morfologia .....	10
1.2. Função das proteínas do hRSV .....	10
1.2.1. Estrutura e função da proteína M2-1. ....	13
1.3. Terapêutica da infecção por hRSV .....	16
1.3.1. Quercetina. ....	18
2.Objetivos .....	20
3.Materiais e Métodos .....	21
3.1. Clonagem do gene M2-1 do hRSV com sítios de restrição para as enzimas EcoRI e BamHI. ....	21
3.1.1. Reação de PCR e eletroforese .....	22
3.2. Clonagem com o TOPO-XL PCR Cloning kit (Invitrogen®).....	23
3.2.1. Purificação dos produtos de PCR.....	23
3.2.2. Reação de ligação TOPO® .....	24
3.2.3. Transformação nas células competentes (transformação química)	24
3.2.4. Purificação dos plasmídeos para confirmação da clonagem.....	25
3.2.5. Confirmação da clonagem por co-digestão enzimática. ....	25
3.3. Subclonagem no vetor pGEX4T-1. ....	25
3.4. Transformação em E. coli linhagem BL21 Gold (DE3).....	28
3.5. Sequenciamento da proteína M2-1. ....	28
3.6. Indução da expressão da proteína M2-1.....	28
3.7. Purificação da proteína M2-1 fusionada com GST.....	28
3.8. Medida da concentração da proteína.....	29
3.9. Preparo das amostras. ....	29
3.10. Análise estrutura secundária por dicroísmo circular. ....	29
3.11. Supressão de fluorescência.....	30
3.11.1. Medidas espectrofotométricas e equipamentos .....	30
3.12. Análise de Bioinformática.....	33
3.12.1. Estrutura molecular.....	33
3.12.2. Dinâmica molecular. ....	33

3.12.3. Docking molecular.....	36
4.Resultados e Discussão.....	38
4.1. Dados da proteína M2-1 obtida pelo servidor ProtParam.....	38
4.2. Clonagem.....	38
4.2.1. Clonagem do gene M2-1 com sítio de restrição para EcoRI e BamHI. 38	
4.3. Expressão.....	39
4.4. Purificação.....	39
4.4.1. Purificação com o sistema ÄKTA da proteína M2-1 fusionada com GST. 39	
4.5. Sequenciamento da estrutura primária da proteína M2-1.....	41
4.6. Análise por espectroscopia de dicroísmo circular.....	41
4.7. Supressão de fluorescência.....	43
4.8. Bioinformática.....	50
4.8.1. Predição estrutural.....	50
4.8.2. Dinâmica molecular.....	55
4.8.3. Docking molecular.....	61
5.Conclusões.....	68
6.Referências.....	70
Anexo I.....	79
Anexo II.....	81
Anexo III.....	82
Anexo IV.....	83
Apêndice.....	84

## Lista de Figuras

Figura 1: Mapa gênico do hRSV. ....	10
Figura 2: Ciclo de infecção do hRSV.....	11
Figura 3: Estrutura cristalina da proteína M2-1 (PDB - 4C3B).....	15
Figura 4: Estrutura básica dos flavonoides (A) e da Quercetina (B).....	18
Figura 5: Mapa do vetor pCR-XL-TOPO (Invitrogen). ....	23
Figura 06: Mapa gênico do vetor pGEX-4T-1 (GE Healthcare Life Sciences)..	26
Figura 7: Reação de PCR do gene M2-1. ....	38
Figura 8: SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 referente ao teste de indução dos clones da <i>E. coli</i> BL21 God + pGEX4T-1 + M2-1.....	39
Figura 9: Cromatograma da purificação da proteína M2-1 no sistema ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) com a resina Superdex 200 10/300 GL.....	40
Figura 10: Resultado da purificação da proteína M2-1 em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue G-250.....	40
Figura 11: Sequenciamento da proteína M2-1. ....	41
Figura 12: Espectro de dicroísmo circular da proteína M2-1.....	42
Figura 13: Desnaturação térmica da proteína M2-1.....	43
Figura 14: Decaimento da fluorescência da proteína M2-1 com o aumento da temperatura.....	44
Figura 15: Espectros de emissão de fluorescência referente à titulação de M2-1 na concentração de 10 $\mu$ M.....	45
Figura 16: Fração de variação da fluorescência observada (fobs) em função da razão entre as concentrações de Quercetina e da M2-1.....	46
Figura 17: Gráfico de Scatchard relativo à interação da M2-1 com a Quercetina. ....	48
Figura 18: Gráfico de Van'Hoff referente à interação da proteína M2-1 com a Quercetina.....	49
Figura 19: Dependência de $\Delta G$ , $\Delta H$ e $T\Delta S$ com a temperatura, mostrando a diferença de interação entre a Quercetina e a M2-1 para os sítios do tipo 1 e tipo 2. ....	50
Figura 20: Modelos da proteína M2-1 gerado pelo servidor I-Tasser.....	52
Figura 21: Modelos dos oligômeros da proteína M2-1 geradas pelo servidor SymmDock.....	54

Figura 22: RMSD (A) e raio de giro (B) do <i>backbone</i> da proteína M2-1 monomérica em função do tempo à 313K.....	55
Figura 23: RMSD (A) e raio de giro (B) do <i>backbone</i> da proteína M2-1 dimérica em função do tempo à 313K. ....	56
Figura 24: RMSD (A) e raio de giro (B) do <i>backbone</i> da proteína M2-1 trimérica em função do tempo à 313K. ....	57
Figura 25: RMSD (A) e raio de giro (B) do <i>backbone</i> da proteína M2-1 tetramérica em função do tempo à 313K. ....	57
Figura 26: RMSF da proteína M2-1 monomérica (A), dimérica (B), trimérica (C) e tetramérica (D) em função do tempo à 313K.....	58
Figura 27: Gráfico padrão da estrutura secundária da proteína M2-1 monomérica (A) e, cadeias A da proteína dimérica (B), trimérica (C) e tetramérica (D).dimérica no solvente água.....	60
Figura 28: Sobreposição da estrutura obtida pela dinâmica molecular com a estrutura cristalina da proteína M2-1.....	61
Figura 29: Domínios da proteína M2-1.....	62
Figura 30: Docking molecular da Quercetina na proteína M2-1 monomérica. Quercetina foi docada no sítio 1 (A) (domínio de ligação ao RNA e à proteína P e resíduo N-terminal) e no sítio 2 (B) (domínio dedo de zinco e de oligomerização).....	63
Figura 31: <i>Docking</i> molecular da Quercetina na proteína M2-1 tetramérica. ...	65

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Sequências utilizadas para alinhamento e desenho de <i>primers</i> do gene M2-1 .....	21
Tabela 2: Enzimas de restrição e seus respectivos sítios de reconhecimento. 21	
Tabela 3: Primers para os genes RSV tipo A.....	22
Tabela 4: Reação de co-digestão do plasmídeo pCR-XL-TOPO + M2-1 com as enzimas BamHI e EcoRI. ....	25
Tabela 5: Protocolo de reação de ligação do plasmídeo pGEX-4T-1 com o inseto M2-1 na razão 3:1.....	27
Tabela 6: Protocolo de reação de ligação do plasmídeo pGEX-4T-1 com o inseto M2-1 na razão 3:1.....	27
Tabela 7: Valores de K1, constante de associação do sítio do tipo 1 e K2, constante de associação do sítio do tipo 2, nas três temperaturas estudadas. 48	
Tabela 8: Valores de $\Delta G$ , $\Delta H$ e $T\Delta S$ referentes à interação da proteína M2-1 com a Quercetina para os dois tipos de sítios.....	50
Tabela 9: Valores da energia de interação (kcal/mol) da Quercetina nos sítios 1, 2 e 3 do monômero e do tetrâmero. ....	66

## Lista de abreviações

Å	Angström ( $1 \times 10^{-10} \text{m}$ )
CCA	Agente da coriza de chimpanzé (do inglês: chimpanzee coryza agent)
CD	Dicroísmo Circular
DSSP	Biblioteca de estrutura secundária (do inglês: database secondary structure assignments)
$\epsilon$	Coefficiente de extinção molar
GE	gene de parada (do inglês: gene end)
GS	gene de iniciação (do inglês; gene start)
GST	Glutathione-S-transferase
HBeAG	Antígeno e do vírus da hepatite B
HBsAG	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
hRSV	Vírus sincicial respiratório humano (do inglês: human respiratory syncytial vírus)
INF	Interferon
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
kDA	Kilo daltons
Ksv	Constante de Stern-Volmer
m.A.U.	Mili unidades de absorvância
MD	Dinâmica Molecular
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetro ( $1 \times 10^{-9} \text{m}$ )
pb	Pares de bases
PDB	Protein Data Bank
PME	Particle Mesh Ewald
RMSD	Desvio Quadrático Médio
RMSF	Flutuação média quadrática
STAT2	Sinal de tradução e ativador da transcrição 2 (do inglês: signal transducer and activator of transcription 2)

## Resumo

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) é o principal agente causador de doenças respiratórias agudas severas, como pneumonia e bronquiolite. Trata-se de um vírus da família *Paramyxoviridae*, com simetria helicoidal e envelope lipídico. Possui um genoma de RNA fita simples, não segmentado, com 10 genes codificantes. Um dos fatores que contribuem para o sucesso na replicação viral é a interação da proteína M2-1 com as proteínas P, M e com o RNA. Tal proteína age através da interação com RNA, e assim, participa efetivamente no processo de replicação viral, apresentando atividade anti-parada da replicação sendo ativa quando na forma tetramérica. Deste modo, o ligante que realizar interação com a M2-1 é um potencial candidato a prevenir as interações M2-1 com RNA e demais proteínas, impedindo deste modo o sucesso da replicação viral. Flavonoides são compostos naturais com várias atividades como antioxidante, anticancerígena, cardio protetora, antibacteriana e antiviral. Quercetina é um flavonoide que apresenta atividade antiviral, inibindo o complexo de replicação. Com a finalidade de investigar a interação de um potencial candidato a inibição da atividade da M2-1, clonamos, expressamos e purificamos a proteína M2-1 do hRSV e, determinamos sua característica físico-química de interação com quercetina em diferentes condições de temperatura. Para clonagem e expressão do gene M2-1 foram escolhidos o vetor pGEX-4T-1 e a bactéria *Escherichia coli* da linhagem BL21 Gold (DE3). A proteína expressa foi purificada em cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular. As análises de composição de estrutura secundária e estabilidade térmica foram realizadas por espectroscopia de dicroísmo circular e, a interação com Quercetina com espectroscopia de fluorescência. Para o mapeamento da interação com a Quercetina foram realizadas *docking molecular* e dinâmica molecular. A proteína M2-1 purificada apresenta 40%  $\alpha$ -hélice, 10% folhas  $\beta$  e 19% alças e 31% *random coils*, sendo a temperatura de *melting* de 55,6°C. O teste de titulação com o flavonoide Quercetina mostrou que ela interage em dois pontos, no sítio 1 (constante de afinidade  $\sim 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) estabelece uma interação do tipo iônica e no sítio 2 ( $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) estabelece uma interação do tipo hidrofóbica. Uma molécula de Quercetina interage no sítio 1 (formada pelo tetrâmero) e quatro moléculas interagem no sítio 2 (uma por unidade proteica). O estudo de dinâmica molecular mostra que o domínio central (composto

de  $\alpha$ -hélice) é estável e, a extremidade N-terminal adquire maior estabilidade quando a proteína está na forma tetramérica. O *docking* do ligante Quercetina mostra que ela pode interagir na face N-terminal com interação do tipo iônica e entre cadeias próxima aos domínios de oligomerização e ligação ao RNA e proteína P, com tipo de interação hidrofóbica. Os dados teóricos reforçam os dados experimentais, mostrando que a quercetina interage com a proteína M2-1, principalmente no poro central da proteína.

Palavra-chave: hRSV, M2-1, Quercetina, dinâmica molecular.

## Abstract

Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is the major causative agent of acute respiratory infections such as pneumonia and bronchiolitis. This is a virus of the *Paramyxoviridae* family with helical symmetry and lipid envelope. It has a single strand RNA genome, not segmented, with 10 coding genes. One of the factors that contribute to success in viral replication is the interaction of M2-1 protein with P, M protein and RNA viral. Such protein acts through the interaction with RNA, hence, participating in the viral replication process, having anti-stop activity in the replication process and, the protein is active only as a tetramer. Thus, a ligand that interacts with M2-1 is a potential candidate to prevent interaction of M2-1 with other proteins, thereby preventing the success of viral replication. The aim of the research is to clone, express and purify the M2-1 protein of hRSV and then determine its physicochemical characteristics of the interaction with Quercetin in different temperatures to investigate the interaction of a potential candidate to inhibit the activity of the M2-1. The M2-1 gene was cloned in vector pGEX-4T-1 and expressed in *Escherichia coli* strain BL21 Gold (DE3). The expressed protein was purified on affinity chromatography molecular exclusion chromatography, thermal stability and secondary structure were analyzed by circular dichroism and the interaction with Quercetin was analyzed by fluorescence spectroscopy. To understand the interaction mechanism was performed molecular dynamics and molecular docking. The purified protein has 40%  $\alpha$ -helix, 10%  $\beta$ -sheet, 19% turns and 31% random coils, being the melting temperature of 55,6°C. The titration of M2-1 with Quercetin showed that it interacts in two points, on site 1 (the binding affinity is  $\sim 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) and establishes an ionic interaction and, on site 2 ( $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) establishes a hydrophobic interaction. One Quercetin molecule interacts on site 1 (formed by the tetramer) and four Quercetins interacts on site 2 (one per protein unity). The molecular dynamics study shows that the central domain (composed mainly by  $\alpha$ -helix) is stable and, the N-terminal extremity gets more stabilization when the protein is in the tetrameric form. The molecular docking of Quercetin shows that it can interact on N-terminus face with ionic interaction pattern and between chains close to oligomerization and RNA and P protein interaction domains with a hydrophobic interaction pattern. Hence, this ligand could be inhibiting the protein activity by disrupting it.

Key-words: hRSV, M2-1, Quercetin, molecular dynamics.

## 1. Introdução

Em 1955, foi isolado de chimpanzés um vírus presente em secreções nasais mucopurulentas, que foi denominado agente da coriza do chimpanzé (Chimpazee coryza agent - CCA) (Blount et al., 1956). Posteriormente Robert J. Chanock isolou o CCA de dois bebês prematuros com bronquiolite e pneumonia. Esses vírus foram isolados em cultura de células e produziram características peculiares como células gigantes multinucleadas com grande sincício e, assim, o vírus passou a ser denominado vírus sincicial respiratório (respiratory syncytial virus – RSV) (Chanock et al., 1957, 1957b).

A transmissão do RSV ocorre primariamente pelo contato direto de secreções respiratórias com a mucosa da nasofaringe ou pela entrada de grandes gotículas respiratórias no nariz ou olho (Hall et al, 1975, 1981, 1981b). O vírus pode permanecer viável em superfícies sólidas por até 6 horas, em luvas de borracha por 90 minutos e na pele por 20 minutos (Hall et al., 1980). A constante higienização das mãos é necessária quando se está em contato com pacientes contaminados.

Após o contágio, a replicação começa no epitélio nasofaríngeo, mas se propaga para o epitélio bronquiolar onde a replicação é mais eficiente (Othumpangat et al., 2009). A replicação viral é seguida por necrose e edema da submucosa. A secreção de muco aumenta em quantidade e viscosidade. O resultado final é o bloqueio parcial das vias respiratórias e aumento da resistência respiratória causando o aprisionamento do ar (Aherne et al., 1970).

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o hRSV é responsável por mais de 160.000 mortes por ano. Só nos Estados Unidos da América, de 85.000 a 144.000 crianças são hospitalizadas anualmente com infecção por hRSV (Shay et al., 1999). No Brasil, no ano de 2005 na cidade de Ribeirão Preto, a prevalência de crianças infectadas com hRSV foi de 42% (Gagliardi, et al., 2013) e, no ano de 2004 a 2008 em Fortaleza – CE, a prevalência foi de 15,8% (Moura et al., 2013).

Infecções prévias com hRSV não garantem imunidade permanente (Walsh et al., 2004; Hall et al., 1991). O primeiro e segundo episódio da infecção

ocorre nos dois primeiros anos de vida e tendem ser mais severos (Glezen et al., 1986). A maioria das infecções subsequentes ocorre no trato respiratório superior e tem um curso moderado, embora a doença possa progredir para infecção do trato respiratório inferior com sintomas mais severos (Henderon et al., 1979; Hall et al., 2001).

## 1.1. Morfologia

O hRSV é classificado na ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Pneumovirus*. São vírus envelopados com nucleocapsídeo helicoidal (Santos et al., 2008). O genoma viral é constituído de RNA fita simples, linear, de polaridade negativa, não segmentado de aproximadamente 15kb, que contém 10 genes na seguinte ordem 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5', mas produz onze proteínas devido à presença de duas sequências de leitura aberta do gene da proteína de matriz M-2 (M2) que produz as proteínas M2-1 e M2-2 (Figura 1). Dessas, duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2) são responsáveis pela evasão da resposta imune; das oito proteínas estruturais, cinco (N, P, L, M2-1 e M2-2) formam o complexo nucleocapsídeo envolvido na replicação e transcrição viral e, quatro (SH, M, G e F) estão associadas à membrana, sendo que as proteínas G e F são glicoproteínas envolvidas na adesão e fusão do vírus com a célula hospedeira (Peter et al., 2008).

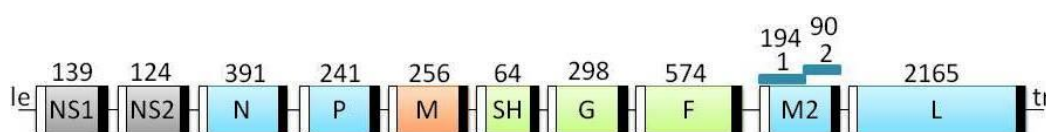


Figura 1: Mapa gênico do hRSV. O genoma sentido negativo é representado fora de escala. Os genes que codificam as proteínas responsáveis pela evasão imune estão em cinza, as proteínas do complexo polimerase em azul, as proteínas de superfície em verde e a proteína do capsídeo em laranja. Os códons de iniciação (GS) estão representados pelas caixas brancas e os códons de parada (GS) em preto. Na extremidade 3' temos a sequência líder (le) e na região 5' a sequência trailer (tr). Acima dos genes está representado o comprimento de aminoácidos da proteína. Acima da sequência do gene M2 está representado a sequência de leitura aberta (ORF) da proteína M2. (Adaptado de Collins e Melero, 2011).

## 1.2. Função das proteínas do hRSV

As proteínas NS1 e NS2 são as primeiras decodificadas e expressas em grande quantidade e são duas proteínas pequenas (NS1 – 139 resíduos; NS2 – 124 resíduos) sem homologia significativa entre si e com outras proteínas

celulares. Elas antagonizam a resposta antiviral celular e a indução de produção de interferon (INF) (Schlender et al., 2000; Bossert e Conzelmann, 2002; Bossert et al., 2003; Spann et al., 2004). IFN- $\alpha/\beta$  são secretados pela maioria de células eucarióticas como primeira linha de defesa contra infecção viral. O interferon ativa as células vizinhas pela via Jak-Stat, levando as células a um estado de resistência à infecção viral. Há evidências que as proteínas NS1 e NS2 são importantes para degradação de STAT2 (Lo et al., 2005; Ramaswamy et al., 2004, 2005) e inibição do Fator-3 Regulador de Interferon (IRF-3) (Spann et al., 2005).

No processo de ancoramento e adsorção do vírus, duas proteínas em particular são importantes: proteína de fusão (F) e proteína G de ancoramento; essas duas proteínas são os alvos primários dos anticorpos do hospedeiro. A glicoproteína G medeia o ancoramento do vírus na célula do hospedeiro (Figura 2), em seguida a proteína F promove a fusão do vírus com a célula do hospedeiro e também promove a agregação de células multinucleadas (produzindo o sincício pela qual são conhecidos (Peter et al., 2008) permitindo a transmissão de vírus de célula a célula.

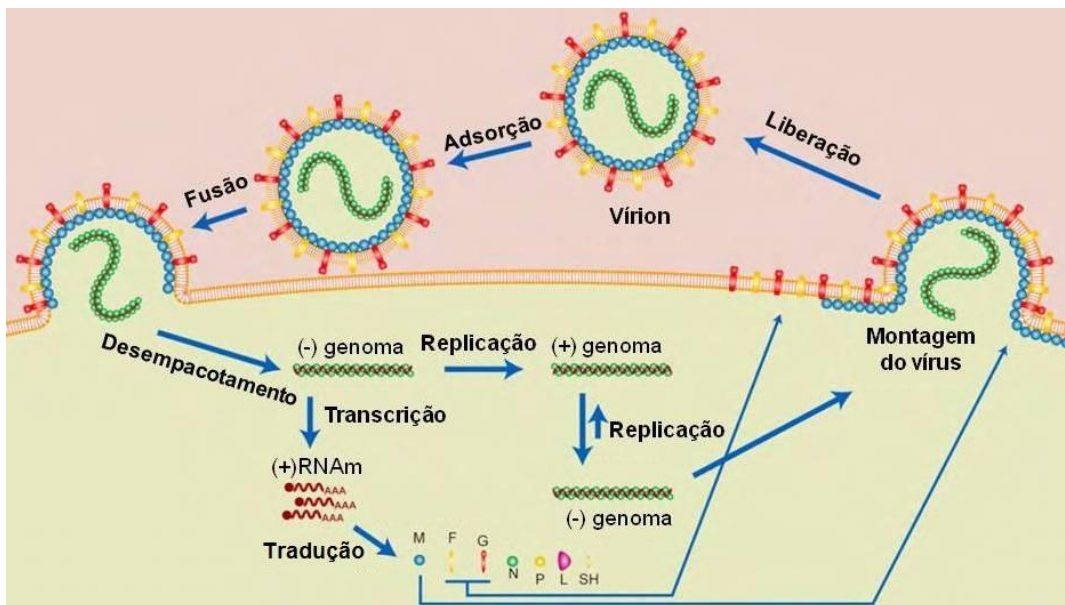


Figura 2: Ciclo de infecção do hRSV. Ao se aproximar da célula do hospedeiro, a proteína G ancora nos receptores e a proteína F promove a fusão do vírus com a célula. Há o desempacotamento com a liberação do gene viral. O genoma com sentido negativo é replicado para genoma com sentido positivo e é transcrito os RNAs e tradução das proteínas. Então a proteína M junto à proteína M2-1 promove a formação do capsídeo e há a liberação de novos vírus (Adaptado de (Harrison, Sakaguchi, & Schmitt, 2010)).

A proteína SH (small hydrophobic protein) é descrita como não essencial para a replicação viral, embora na sua ausência a replicação diminua (Whitehead et al., 1999; Jin et al., 2000), mas é importante para a virulência, pois altera a permeabilidade da membrana celular (Perez et al., 1997). É uma proteína multimérica, formando pentâmeros ou hexômeros com um poro central de 1,9nm e 2,6nm, respectivamente, permitindo a passagem de pequenas moléculas (Carter et al., 2010).

Na face interna do envelope viral está associada à proteína de matriz M que se localiza no núcleo nos estágios iniciais da infecção e, é deslocada para o citoplasma nos estágios finais da infecção, onde se associa com as proteínas N, P e M2-1 (Ghildyal et al., 2002). A presença da proteína M nessas inclusões tem o papel de interromper a transcrição viral como um prelúdio para a montagem e liberação do vírus, associando o nucleocapsídeo com as glicoproteínas do envelope do RSV (Figura 2). Esta associação se dá através da porção N-terminal da proteína M com a proteína M2-1 (Ghildyal et al., 2005; Dongsheng et al., 2008).

A nucleoproteína N forma um complexo helicoidal que envolve o RNA viral (protegendo-o de ribonucleases), chamado nucleocapsídeo que se associa a outras proteínas (L, P e M2) para formar um complexo envolvido na replicação e transcrição (Blumberg et al., 1983; Meric et al., 1994; Lamb e Parks, 2006). Demonstrou-se que a região C-terminal da proteína N, essencial para a replicação, também é sítio de ligação à proteína P (Stokes et al., 2003). Diferentes trabalhos mostram que a fosforilação/desfosforilação da proteína P contribui para a interação com outras proteínas, auxiliando a transcrição: a fosforilação da Ser232 e Ser237 é essencial para ativar a transcrição viral (Barik et al., 1995); a interação da região central da proteína P com a proteína M2-1 é independente de fosforilação e, essa interação é importante para uma transcrição efetiva (Stephen et al., 2003); a presença de aminoácidos ácidos e hidrofóbicos na porção C-terminal da proteína P é crítico para a sua interação com a proteína N e não depende de fosforilação (Stephen et al., 2003; Tran et al., 2007); a fosforilação na Ser54 é crucial para o desnudamento da partícula viral no início da infecção para iniciar a transcrição e sua desfosforilação

promove associação com a proteína M, o que seria crucial para o processo de brotamento da partícula viral (Ansejo et al., 2005).

Acredita-se que em paramyxovirus a proteína P exerça duas principais funções: posicionar a proteína L no complexo N-RNA e, servir de chaperona para a proteína N recém-sintetizada (Curran et al., 1995). Há também um debate sobre a oligomerização da proteína P, o papel da fosforilação na oligomerização e qual a verdadeira função desses oligômeros. Castagne, et al. (2004), observou que a proteína P oligomeriza e essa associação é independente de fosforilação, sendo que a fosforilação é desnecessária para a interação P-P, P-N e P-M2-1. A região que compreende os resíduos 100-120 é importante para interagir com M2-1 e a região entre os resíduos 220-240 importante para a interação com a proteína N (Mason et al., 2003).

A proteína M2-1 é uma fosfoproteína básica que funciona na transcrição como um fator de processamento e antiparada (Collins et al., 1996; Hardy et al., 1998) e também auxilia na interação da proteína M com o nucleocapsídeo para a liberação da partícula viral (Li et al., 2008).

A proteína M2-2 é responsável pela mudança de fase da atividade viral e quando a concentração de mRNA atinge determinado nível, ela atua mudando a atividade do nucleocapsídeo para iniciar a replicação viral (Birmingham et al., 1999). A expressão elevada de M2-2 inibe completamente a replicação de RSV (Cheng et al., 2005).

#### 1.2.1. Estrutura e função da proteína M2-1.

Quatro das onze proteínas (N, P, L e M2-1) formam o complexo RNA-polimerase dependente de RNA (RpRn) que está envolvido na replicação e transcrição do genoma. A transcrição é iniciada em uma região promotora de transcrição de 9 a 10 nucleotídeos conservados (gene start – GS) (Figura 1) e termina em uma região sinalizadora para poliadenilação e liberação, de 12 a 13 nucleotídeos conservados (gene end – GE) (Kuo et al., 1996). Caso a polimerase dissocie-se do RNA molde prematuramente, a transcrição dos genes a jusante são interrompidos o que leva a uma redução na taxa de transcrição dos genes finais do genoma (Fearn e Collins, 1999).

A proteína M2-1 é um fator que evita a parada prematura da transcrição, sendo assim, importante para a transcrição de todos os mRNA (Collins et al., 1996). O mecanismo realizado para evitar a parada da transcrição não está elucidado ainda, mas algumas hipóteses têm sido postuladas.

A primeira hipótese é que a proteína M2-1 pode se ligar ao mRNA nascente facilitando a alongação do transcrito, talvez prevenindo que o mRNA de hibridizar com o molde ou formar estruturas secundárias que podem desestabilizar o complexo de transcrição. Essa hipótese é sustentada por achados de que o mRNA do RSV co-precipita com M2-1 de células infectadas com RSV (Cartee e Wertz, 2001).

A segunda hipótese seria que o efeito do aumento da processividade da M2-1 poderia ser devido ao aumento da afinidade da polimerase pelo RNA genômico molde de uma maneira não específica (Cartee e Wertz, 2001).

E a terceira hipótese é que a proteína M2-1 poderia reconhecer sequências GE(3'-UCA(A/U)U(-/U/G)(A/U)(A/U)(U/A)UUUU) tanto no mRNA como no molde e evitar a liberação do complexo polimerase do molde, favorecendo a reiniciação da sequência GS (3'-CCCCGUUUU/C) a jusante (Kuo Jearns e Collins, 1997).

Estruturalmente, a proteína M2-1 é composta em sua maioria por  $\alpha$ -hélice (Dubosclard et al., 2011; Tran et al., 2009) e possui quatro regiões distintas (Figura 3): os 32 resíduos iniciais da região N-terminal que se ligam ao zinco ("zinc finger") corroborando na transcrição (é indispensável para a função da proteína, mas sua função exata é desconhecida) (Hardy e Wertz, 2000; Tang et al., 2001; Zhou, Cheng e Jin, 2003); um domínio responsável pela oligomerização (formando tetrâmeros) situado entre os resíduos His33 e Gly62; um domínio globular composto por  $\alpha$ -hélices (resíduos 63 a 170) capaz de se ligar à proteína P e RNA; e uma região C-terminal com baixo grau de estruturação (Tran et al., 2009).

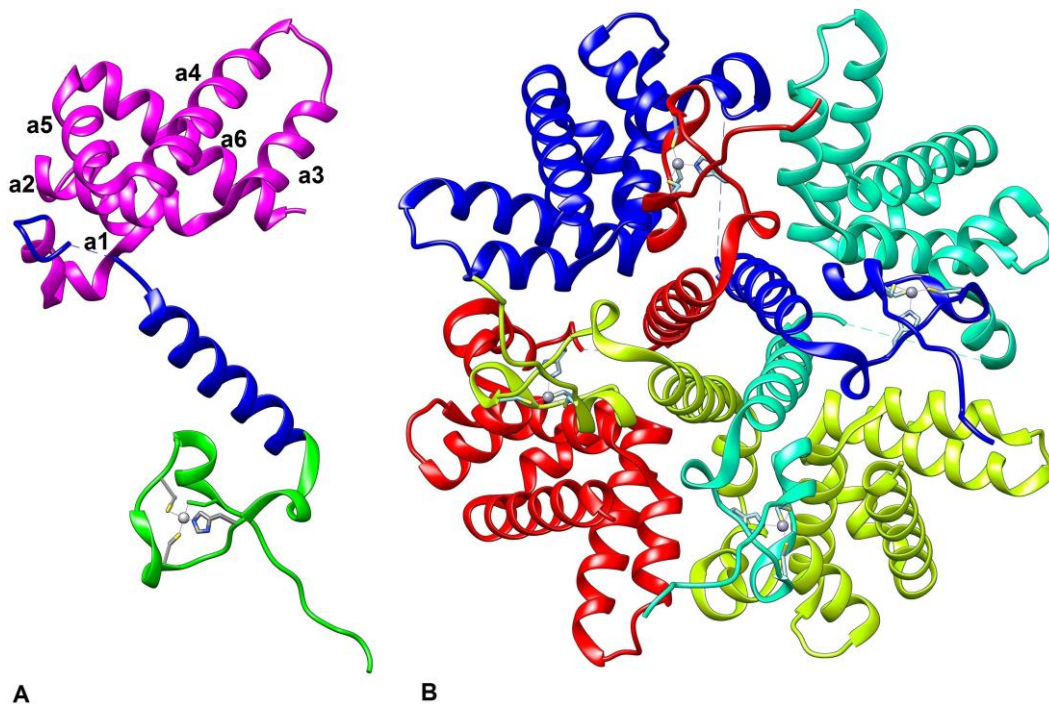


Figura 3: Estrutura cristalina da proteína M2-1 (PDB - 4C3B). Uma unidade monomérica da proteína (A) é composta por um domínio de ligação ao zinco (verde) um domínio de oligomerização (azul), um domínio de ligação à proteína P e ao RNA (magenta) e um domínio não estruturado (não mostrado). A forma ativa da proteína é na forma tetramérica (B) – cadeia A (vermelho), cadeia B (azul escuro), cadeia C (azul turquesa), cadeia D (amarela).

O domínio globular é formado por seis hélices:  $\alpha 1$  (Gly75-Gly85),  $\alpha 2$  (Lys92-Glu105),  $\alpha 3$ (Ser108-Asp117),  $\alpha 4$  (Lys124-Lys140),  $\alpha 5$  (Lys143-Arg151) e  $\alpha 6$  (Asp155-Ile171). Esse domínio apresenta duas faces carregadas e opostas. A face positiva contém um grande conjunto básico delimitado pelas hélices  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  que contribuem para a interação com RNA (Blondot et al., 2012).

Observou-se que o domínio M2-1<sub>158-177</sub> interage com a proteína P na proporção 1:1 com Kd de  $\approx 3\mu\text{M}$ . A proteína P se liga numa região próxima à região de ancoramento de RNA. As hélices  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  podem interagir tanto com a proteína P como com RNA. Já  $\alpha 4$  e  $\alpha 2$  parecem estar envolvidas na ligação específica da proteína P e RNA, respectivamente (Blondot et al., 2012).

Análise de mutação sítio dirigida mostra que a substituição de Lys92 (hélice  $\alpha 2$  – ligação com RNA) e Arg126 e Thr130 ( $\alpha 4$  – ligação com P) por aspartato, diminuem a transcrição. Similarmente, mutações nos resíduos Lys150, Arg151, Thr160 e Asn163 nas hélices  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  que pertencem à ligação de RNA/P, tiveram o mesmo efeito (Blondot et al., 2012).

O estudo do domínio globular que compreende os resíduos Ser58-Lys177 apresenta alta afinidade por fitas RNA sentido negativo rica em uracila (Blondot

et al., 2012) e por RNA sentido positivo, ricas em purina, especialmente adenina, cuja constante de dissociação dessa interação é de 19,1nM (Tanner et al., 2014).

A análise de raio-X da proteína M2-1, mostrou que ela tetrameriza (Tanner et al., 2014), e que essa forma é a mais estável (Krissinel e Henrick, 2007). A tetramerização é principalmente mediada pela hélice  $\alpha 1$ , mas também é formada pelo domínio ‘dedo de zinco’ e a face N-terminal do domínio central. Essa superfície de contato extensa do tetrâmero ( $14.369\text{\AA}^2$ ) provê uma mudança da energia livre de solvatação de  $-44\text{kcal/mol}$ , sugerindo um tetrâmero altamente estável (Tanner et al., 2014).

A face N-terminal do tetrâmero é altamente positiva, enquanto a face C-terminal também apresenta alta positividade, mas com quatro pontos de carga negativa. Entre a hélice de tetramerização e o núcleo, há uma região (resíduos Lys52-Asp67) na qual se encontra os resíduos Ser58 e Ser61 que são sítios de fosforilação (Tanner et al., 2014).

O grau de fosforilação da proteína M2-1 afeta sua atividade como pode ser observado para outras proteínas. A fosforilação do resíduo Thr108 evita a associação da proteína M2-1 ao complexo do nucleocapsídeo e este passa a ter atividade replicativa do RNA viral. Por outro lado, a desfosforilação do resíduo Thr108 leva a associação da proteína M2-1 ao nucleocapsídeo conferindo atividade transcricional (Ansejo et al., 2006). Ainda, foi observado que a fosforilação dos resíduos Ser58 e Ser61 e, a desfosforilação dos resíduos Thr56 e Ser58, reduzem a afinidade da proteína ao RNA, o que afeta a sua função (Cuesta et al, 2000; Tanner et al., 2014).

A análise de mutação sítio dirigida, mostra que os resíduos Ser58, Ser61, Lys92, Lys92, Lys150, Arg151, Arg151, Lys150, Arg151 e Lys159, exercem papel fundamental na interação do RNA à proteína e, que os resíduos Arg3, Arg4, Ser58, Ser61, Lys150, Arg151 e Lys159 são importantes para a atividade antiterminação da proteína (Tanner et al., 2014).

### 1.3. Terapêutica da infecção por hRSV

O tratamento primário para a infecção por hRSV é sintomático, exceto em pacientes imunocomprometidos. A administração de oxigênio para manter uma

saturação  $\geq 93\%$  e a reposição de líquidos é suficiente na maioria dos casos de infecção em crianças. Mesmo assim, a mortalidade pelo vírus é alta e, estima-se que mesmo em países com baixa taxa de mortalidade, o custo anual devido à hospitalização de crianças com infecção por hRSV é em torno de US\$500 milhões (Pelletier et al., 2006).

A administração de corticosteroides, broncodilatadores e outros medicamentos são ineficientes em reduzir a taxa de hospitalização de crianças com infecção por hRSV e diminuir o período de internação desses pacientes (Flores et al., 1997; Dobson et al., 1998; American Academic 2006; Corneli et al., 2007). Uma das terapias disponíveis é o anticorpo monoclonal humanizado Synagis® (palivizumab) que se liga à proteína F facilitando a opsonização, neutralização e *clearance* do vírus. Estudos clínicos mostraram que essa terapia é eficiente em reduzir a admissão hospitalar de crianças infectadas por hRSV. O seu principal problema é o custo elevado, o que tem desencorajado o seu uso (Frenton et al., 2004; Wu et al., 2005; American Academy, 2009).

Outro fármaco licenciado, Virazole® (ribavirina) tem ampla ação antiviral, pois reduz a formação de mRNA e a polimerase viral (Sidwell et al., 2006). Mas testes mostram que não há melhora dos pacientes em relação aos pacientes do grupo controle. É uma antiviral de custo elevado e já foi demonstrado o surgimento de mutantes resistente à droga (Marquardt et al., 1995; Crotty et al., 2002a, 2002b). Inibidores da proteína F estão em desenvolvimento, mas apresentam efeitos adversos como inibição da síntese de interleucinas e baixa segurança (Andries et al., 2003; Wyde et al., 2003; Luttick et al., 2007).

As proteínas G e F são os principais alvos de estudo da inibição da infecção viral. Alguns fármacos pesquisados interagem com domínios dessas proteínas inibindo ligação do vírus à célula e a sua fusão. Um grupo de compostos tem ação semelhante, ligando à Tyr198 da proteína F, e inibindo a fusão vírus-célula. Esses compostos são: BMS-433771 (Cianci, Meanwell e Krystal, 2005), VP-14637 (Douglas et al., 2005), TMC353121 (Bonfanti et al., 2008).

O inibidor da proteína G MBX-300 apresenta potente inibição do RSV e é menos tóxico que a ribavirina, e está em fase clínica de estudo (Kimura et al., 2000; Douglas et al., 2004). RSV-604 é um inibidor da proteína N que se

mostrou ter boa absorção e atividade em faixas submicromolares (Henderson et al., 2007; Chapman et al., 2007) e, na fase 2 de estudos clínicos, mostrou diminuir a infectividade e sintomas clínicos da infecção por hRSV (Marty et al., 2007). Este composto se liga à proteína N inibindo a síntese do RNA, mas não altera a localização da proteína N na célula (Challa, Scott e Yuzhakov, 2015).

### 1.3.1. Quercetina.

Muitos compostos antivirais são derivados de compostos naturais (Butler et al., 2005; Harvey et al., 2008). Alguns estudos mostram que produtos naturais têm propriedades farmacológicas melhores que compostos gerados por química combinatorial (Feher et al., 2003; Koch et al., 2005; Wetzell et al., 2007). Os flavonoides, são metabólitos secundários, amplamente distribuído entre os produtos naturais (Simões et al., 2004) que apresentam atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória (Simões et al., 2004; Cazarolli et al., 2008).

Os flavonoides são substâncias de baixo peso molecular e, estruturalmente, consistem de um esqueleto de difenil-propano ( $C_6C_3C_6$ ) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (BEHLING et al., 2004) conforme apresentado na Figura 4-A. As várias classes de flavonoides se devem às modificações que o composto pode sofrer como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (Almeida, et al., 2004).

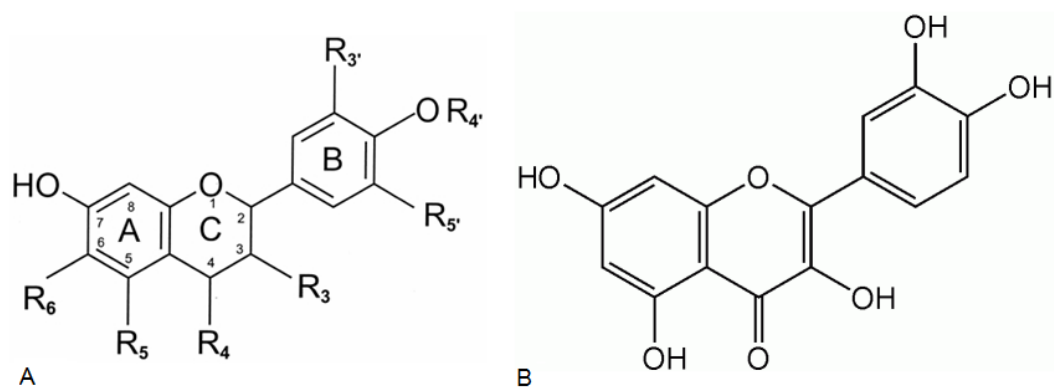


Figura 4: Estrutura básica dos flavonoides (A) e da Quercetina (B) Na estrutura básica, os anéis A e B são anéis benzênicos e C anel pirano e, as várias classes de flavonoides originam da modificação nos grupos "Rs". (Fonte: Patel et al., 2008)

O flavonol Quercetina (Figura 4-B) é um flavonoide antioxidante que é encontrado em uma grande variedade de plantas. É um excelente acceptor de

radicais e, quelante de metais. É um dos mais potentes bioflavonoides estudado e possui uma variedade de atividades farmacológicas incluindo anti-inflamatória, antineoplásica, cardio protetora e atividade anticancerígena (Wiegand, et al., 2009; Binsack et al., 2001). Tem uma biodisponibilidade alta e, é estimado que a ingestão diária de Quercetina numa dieta é de 5 a 40mg/dia (Hertog et al., 1995), mas esses valores podem aumentar até 200 a 500mg/dia em indivíduos que consomem alta quantidade de frutas e vegetais ricos em flavonoides (maçã, cebola, tomates, etc.) (Harwood et al., 2007).

Apesar da descrição da Quercetina ter atividade anticâncer (Murakami, Ashida, Terao, 2008; Xavier et al., 2011; Dajas, 2012; Murphy et al., 2011), acredita-se que esse efeito é devido ao efeito protetor antioxidante. Por outro lado, Quercetina tem uma boa atividade antiviral. Observou-se que ela inibe a secreção de HBsAg e HBeAg em células infectadas com HBV (Wu et al., 2007); inibe a replicação de HCV (Pisonero-Vaquero et al., 2014); inibe a HIV-1 transcriptase reversa (Yu et al., 2007); e inibe a transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária, vírus-2 associado a Rous e vírus da leucemia murina de Maloney (Spedding, Ratty e Middleton, 2009).

Ahmed-Belkacem e colaboradores (2014) mostraram que flavonas, especialmente a Quercetina, são capazes de inibir aproximadamente 80% da RNA-polimerase-RNA-dependente (RpRd) de HCV. Esta atividade se deve à ligação dos flavonoides ao túnel de entrada do RNA molde. Em 1985, Kaul et al., observaram que a Quercetina era capaz de inibir a infecção e replicação de RSV. Então, provavelmente, Quercetina se liga à alguma proteína do complexo RpRd do RSV evitando a replicação ou transcrição.

## 5. Conclusões

A proteína M2-1 é uma proteína chave no processo de replicação do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) por é responsável pela completa transcrição dos genes a jusante, promove a interação com a proteína P que está envolvida na formação do complexo polimerase e, na montagem da partícula viral, ela auxilia a migração da proteína M na migração para a membrana e liberação do vírus. Assim, moléculas que interajam com essa proteína e bloqueiem a sua atividade é de grande utilidade para tratar infecções que já estão em curso. Os flavonoides são compostos aromáticos encontrados em plantas e frutas cítricas que já mostraram ter atividade antimicrobiana, antiviral e antifúngica. O estudo da interação do flavonoide Quercetina com a proteína M2-1 mostra resultados promissores para esse composto. Com esse trabalho podemos concluir:

- i. A proteína M2-1 é composta por sua maioria de  $\alpha$ -hélice, sendo uma proteína bem estruturada com temperatura de *melting* de aproximadamente 55°C.
- ii. Os resultados mostram dois tipos de sítios de ligação independentes, sendo um com constante de associação forte ( $\sim 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) e outro tipo de sítio com constante de associação fraco ( $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ).
- iii. Por se tratar de um tetrâmero, segundo dados de cristalografia, nossos resultados sugerem a existência de um sítio de ligação forte formado pelas quatro unidades do tetrâmero e que é ocupado por um ligante (0,25 ligante/proteína=1 ligante/tetrâmero), e o segundo sítio de ligação é ocupado por um ligante (1 ligante/proteína=4 ligantes/tetrâmero);
- iv. A interação da Quercetina é não cooperativa o que significa que a ligação de uma Quercetina é independente da ligação das demais, não há aumento de afinidade após a primeira Quercetina se ligar, ou seja, a interação nos diferentes sítios é independente;
- v. Esses resultados mostram que os valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  referentes à interação da Quercetina com os dois tipos de sítio, indicam que o sítio forte

(sítio 1) estabelece uma interação do tipo iônica ( $\Delta H < 0$  e  $\Delta S > 0$ ) e o sítio fraco (sítio 2) estabelece uma interação do tipo hidrofóbica entre o ligante e a proteína ( $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ ).

- vi. Sabe-se que a proteína M2-1 exerce a sua função quando na forma tetramérica. Pela análise da dinâmica molecular do monômero, dímero, trímero e tetrâmero, observamos que independente da forma monomérica ou oligomérica o domínio de ligação ao RNA e à proteína P é estável e sua estrutura secundária e terciária não varia com o tempo. Já o domínio de oligomerização tende a se empacotar quando na forma monomérica, porém quando a proteína forma oligômeros, esse domínio mantém a sua forma. Também, a região N-terminal apresenta alta variação estrutural e conforme a proteína migra para a forma de tetrâmero, a mobilidade dessa região diminui. Embora não se saiba a função exata e o mecanismo de ação da região N-terminal (onde está localizado o “dedo de zinco”), a estruturação dessa região é vital para a eficiência da proteína.
- vii. O *docking* molecular da Quercetina na proteína monomérica mostra que a interação ocorre em cavidades superficiais entre a porção C-terminal da proteína e o domínio de interação ao RNA e à proteína P. Essa interação está em uma cavidade polar estabilizada por ligações de hidrogênio. No entanto, o *docking* com a forma tetramérica ocorre em dois pontos, na face N-terminal próximo à hélice  $\alpha 2$  e entre cadeias na interface de oligomerização e o domínio de interação à proteína P e ao RNA. No primeiro caso, a interação é em uma cavidade com perfil iônico estabilizada por ligações de hidrogênio e emparelhamento do tipo pi-pi/pi-cátion. No segundo caso, a Quercetina interage em uma cavidade mais hidrofóbica estabilizada por ligação de hidrogênio e emparelhamento pi-pi. Então, a Quercetina pode interagir com a proteína em formação evitando sua tetramerização e interagir com a M2-1 tetramérica, assim, evitando a replicação e liberação do vírus.
- viii. Pela análise do docking propomos que um ligante com um núcleo formado por dois anéis e grupos polares são essenciais para a estabilização hidrofóbica e iônica, respectivamente.

## Referências

AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; TSAI, S. M.; PARK, Y. K. Transformações Enzimáticas de Flavonóides. *B.CEPPA*, 25, 2007, 61-76.

AHERNE W, BIRD T, COURT SD, et al., Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol.*, 1970, 23, 7–18.

ALCALA, J. R., GRATTON, E., & PRENDERGAST, F. G. Fluorescence lifetime distributions in proteins. *Biophysical Journal*, 51, 1987a, 597–604.

ALCALA, J. R., GRATTON, E., & PRENDERGAST, F. G. Interpretation of fluorescence decays in proteins using continuous lifetime distributions. *Biophysical Journal*, 51, 1987b, 925–936.

ALMEIDA, J. R. G. S., LIMA, J. T., NUNES, X. P., CERQUEIRA, G. S., FIGUEIREDO, C. S. Flavonóides da dieta e sua importância para a saúde humana. *Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança.* , v.2, 2004, 65 - 76.

American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis: Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics* 118, 2006, 1774-1793. A current statement on the management of bronchiolitis: what works and what is not recommended.

American Academy of Pediatrics: respiratory syncytial virus. In *Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases*. Edited by Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS. Elk Grove Village, IL. American Academy of Pediatrics; 2009; 560–568.

ANDRIES, K., MOEREMANS, M., GEVERS, T., et al., Substituted enzimidazoles with nanomolar activity against respiratory syncytial virus. *Antiviral Res* 60, 2003, 209-219.

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

ASENJO, A., CALVO, E., VILLANUEVA, N. Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein at threonine 108 controls its interaction with the M2-1 protein in the viral RNA polymerase complex, *J. Gen. Virol.*, 87, 2006, 3637–3642.

BARIK, S., MCLEAN, T., DUPY, L.C. Phosphorylation of Ser232 Directly Regulates the Transcriptional Activity of the P Protein of Human Respiratory Syncytial Virus: Phosphorylation of Ser237 May Play an Accessory Role., *Virol.*, 213, 1995, 405–412.

BEHLING, E.B., SENDÃO, M.C., FRANCESCATO, H.D.C., ANTUNES, L.M.G., BIANCHI, M.L.P. FLAVONÓIDE QUERCETINA: ASPECTOS GERAIS E AÇÕES BIOLÓGICAS. *Alim. Nutr.*, 5, 2004, 285-292.

BERENDSEN, H.J.C., VAN DER SPOEL, D., VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 91, 1995, 43-56.

BERMINGHAM, A., COLLINS, P.L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, 1999, 11259–11264.

BLONDOT, M.L., DUBOSCLARD, V., FIX, J., LASSOUED, S., AUMONT-NICAISE, M., BONTEMS, F., SIZUN, C. Structure and functional analysis of the RNA- and viral phosphoprotein-binding domain of respiratory syncytial virus M2-1 protein. PLoS Pathogens, 8, 2012, 1002734.

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

BLUMBERG, B.M., GIORGI, C., KOLAKOFSKY, D. N protein of vesicular stomatitis virus selectively encapsidates leader RNA in vitro. Cell, 32, 1983, 559–567.

BONFANTI, J.F., MEYER, C., DOUBLET, F., FORTIN, J., MULLER, P., QUEGUINER, L., GEVERS, T., JANSSENS, P., SZEL, H., WILLEBRORDS, R., TIMMERMAN, P., WUYTS, K., VAN REMOORTERE, P., JANSSENS, F., WIGERINCK, P., ANDRIES, K. Selection of a respiratory syncytial virus fusion inhibitor clinical candidate. 2. Discovery of a morpholinopropylaminobenzimidazole derivative (TMC353121). J Med Chem. 51, 2008, 875–896.

BOSSERT, B., CONZELMANN, K.K. Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host rangedeterminants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferoncompetentbovine cells., J. Virol., 76, 2002, 4287–4293.

BOSSERT, B., MAROZIN, S., CONZELMANN, K.K. Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3., J. Virol., 77 (2003) 8661–8668.

BUTLER, M.S., Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials, Nat. Prod. Rep., 22, 2005, 162–195.

CARTEE, T.L., WERTZ, G.W. Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Requires Phosphorylation for Efficient Function and Binds Viral RNA during Infection, J. Virol., 75, 2001, 12188–12197.

CARTER, S.D., DENT, K.C., ATKINS, E., et al., Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability, FEBS Letters, 584, 2010, 2786–2790.

CASTAGNE, N., BARBIER, A., BERNARD, J., et al., Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain., J. Gen. Virol., 85, 2004, 1643–1653.

CAZAROLLI, L.H., ZANATTA, L., ALBERTON, E.H., et al., Flavonoids: prospective drug candidates. Med. Chem., 8, 2008, 1429-1440.

CHALLA, S., SCOTT, A.D., YUZHAKOV, O. ZHOU, Y., YIONG-YIP, C.L., GAO, N., THRESHER, J., YU, Q. Mechanism of Action for Respiratory Syncytial Virus Inhibitor RSV604. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 2015, 1080-1087.

CHANOCK, R., FINBERG, L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children., *Am. J. Hyg.*, 66, 1957b, 291–300.

CHANOCK, R., ROIZMAN, B., MYERS, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am. J. Hyg.*, 66, 1957, 281–290.

CHAPMAN, J., ABBOTT, E., ALBER, D.G., et al., RSV604, a novel inhibitor of respiratory syncytial virus replication. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 2007, 3346-3353.

CHENG, X., PARK, H., ZHOU, H., et al., Overexpression of the M2-2 Protein of Respiratory Syncytial Virus Inhibits Viral Replication, *J. Virol.*, 79, 2005, 13943–13952.

CIANCI, C., MEANWELL, N., KRYSTAL, M. Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother.* 55, 2005, 289–292.

COLLINS, P. L., MELERO, J. A. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus : Still crazy after all these years. *Virus Research*, 162, 2011, 80–99.

COLLINS, P.L., HILL, M.G., CRISTINA, J., et al., Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negativestrand RNA virus. *PNAS* 93, 1996, 81–85.

COLLINS, P.L., HILL, M.G., CRISTINA, J., GROSFELD, H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1996, 81–85.

CORNELI, H.M., ZORC, J.J., MAHAJAN, P., et al., A multicenter, randomized, controlled trial of dexamethasone for bronchiolitis. *N Engl J Med*, 357, 2007, 331-339.

CROTTY, S., ANDINO, R., Implications of high RNA virus mutation rates: lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin. *Microbes Infect.* 4, 2002a, 1301-1307.

CROTTY, S., CAMERON, C., ANDINO, R. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J Mol Med* 80, 2002b, 86-95.

CURRAN, J., BOECK, R., LIN-MARQ, N., et al., Paramyxovirus Phosphoproteins Form Homotrimers as Determined by an Epitope Dilution Assay, via Predicted Coiled Coils, *Virology*, 214, 1995, 139-149.

DOBSON, J.V., STEPHENS-GROFF, S.M., MCMAHON, S.R., et al., The use of albuterol in hospitalized infants with bronchiolitis. *Pediatrics* 101,1998, 1998, 361-368.

DONGSHENG L, JANS DA, BARDIN PG, et al., Association of Respiratory Syncytial Virus M Protein with Viral Nucleocapsids Is Mediated by the M2-1 Protein. *J Virol*, 82, 2008, 8863–8870.

DOUGLAS, J.L. In search of a small-molecule inhibitor for respiratory syncytial virus. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2, 2004, 625-639.

DOUGLAS, J.L., PANIS, M.L., HO, E., LIN, K.Y., KRAWCZYK, S.H., GRANT, D.M., CAI, R., SWAMINATHAN, S., CHEN, X., CIHLAR, T. Small molecules VP-14637 and JNJ-2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 2005, 2460–2466.

DUBOSCLARD, V., BLONDOT, M.L., ELÉOUËT, J.F., et al., <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N resonance assignment of the central domain of hRSV transcription antitermination factor M2-1, *Biomol NMR Assign*, 5, 2011, 237–239.

ESPERANTE, S.A, CHEMES, L.B., SÁNCHEZ, I.E., DE PRAT-GAY, G. The respiratory syncytial virus transcription antiterminator M(2-1) is a highly stable, zinc binding tetramer with strong pH-dependent dissociation and a monomeric unfolding intermediate. *Biochemistry*, 50, 2011, 8529–39.

ESPERANTE, S.A, NOVAL, M.G., ALTIERI, T.A, DE OLIVEIRA, G.A.P., SILVA, J.L., DE PRAT-GAY, G. Fine modulation of the respiratory syncytial virus m2-1 protein quaternary structure by reversible zinc removal from its cys3-his1 motif. *Biochemistry*, 52, 2013, 6779–89.

FEARNS, R., COLLINS, P.L. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 73, 1999, 5852–5864.

FEHER, M., SCHMIDT, J.M. Fuzzy clustering as a means of selecting representative conformers and molecular alignments, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 43, 2003, 218–227.

FENTON, C., SCOTT, L.J., PLOSKER, G.L. Palivizumab: a review of its use as prophylaxis for serious respiratory syncytial virus infection., *Paediatr Drugs*, 6, 2004, 177-197.

FLORES, G., HORWITZ, R.I. Efficacy of beta2-agonists in bronchiolitis: a reappraisal and meta-analysis., *Pediatrics*, 100, 1997, 233-239.

GAGLIARDI, T.B., PAULA, F.E., IWAMOTO, M.A., PROENÇA-MODENA, J.L., SANTOS, A.E., CAMARA, A.A., CERVI, M.C., CINTRA, O.A.L, ARRUDA, E. Concurrent Detection of Other Respiratory Viruses in Children Shedding Viable Human Respiratory Syncytial Virus, *Journal of Medical Virology*, 2013,85, 1852–1859.

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, 571-607

GHILDYAL R, LI D, PEROULIS I, et al., Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein., *J. Gen. Virol.*, 86, 2005, 1879–1884.

GHILDYAL R, MILLS J, MURRAY M, et al., Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells., *J. Gen. Virol.*, 83, 2002, 753–757.

GLEZEN WP, TABER LH, FRANK AL, et al., Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus., *Am. J. Dis. Child.*, 140, 1986, 543–546.

GUERRA, M.E.L. Prospecção de Novos Peptídeos com Ação Leishmanicida por Dinâmica Molecular, 2014, 93 f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular), IBILCE/UNESP.

HALL CB, DOUGLAS RG JR., GEIMAN JM, Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus., *J. Infect. Dis.* 141, 1980, 98–102.

HALL CB, DOUGLAS RG JR., GEIMAN JM, Quantitative shedding patterns of respiratory syncytial virus in infants., *J. Infect. Dis.* 132, 1975, 151–156.

HALL CB, DOUGLAS RG JR., SCHNABEL KC, et al., Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. *Infect. Immune.*, 33, 1981b, 779–783.

HALL CB, LONG CE, SCHNABEL KC, Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin. Infect. Dis.* 33, 2001, 792–796.

HALL CB, WALSH EE, LONG CE, et al., Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus., *J. Infect. Dis.*, 163, 1991, 693–698.

HALL T.A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 1999, 95-98.

HALLCB, DOUGLAS RG JR., Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* 99, 1981, 100–103.

HANSSON T, OOSTENBRINK C, VAN GUNSTEREN W. Molecular dynamics simulations. *Curr Opin Struct Biol* 12, 2002,190–196.

HARDY RW, WERTZ GW, The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J. Virol.* 72, 1998, 520–526.

HARDY RW, WERTZ GW. The Cys(3)-His(1) motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function. *J Virol* 74, 2000, 5880–5885.

HARRISON, M. S., SAKAGUCHI, T., & SCHMITT, A. P. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42, 2010, 1416–29.

HARVEY A.L.Natural products in drug discovery *Drug Discovery Today* 13, 2008, 894–901.

HENDERSON EA, ALBER DG, BAXTER RC, et al., 1,4-benzodiazepines as inhibitors of respiratory syncytial virus. The identification of a clinical candidate., *J. Med. Chem.* 50, 2007, 1685-1692.

HENDERSON FW, COLLIER AM, CLYDE WA JR., et al., Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children., *N. Engl. J. Med.*, 300,1979, 530–534.

JIN H, ZHOU H, CHENG X, et al., Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo., *Virol.*, 273, 2000, 210–218.

KAUL, T. N.; MIDDLETON JR, E.; OGRA, P. L. Antiviral Effect of Flavonoids on Human Viruses. *Journal of Medical Virology*, 15, 1985, 71-79.

KIMURA K, MORI S, TOMITA K, et al., Antiviral activity of NMSO3 against respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo., *Antiviral Res.*, 47, 2000, 41-51.

KOCH MA, SCHUFFENHAUER A, SCHECK M, et al., Charting biologically relevant chemical space: A structural classification of natural products (SCONP), *PNAS*, 102, 2005, 17272–17277.

KRISSINEL E, HENRICK K, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 2007, 774–797.

KUO L, GROSFELD H, CRISTINA J, HILL MG, COLLINS PL. Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol* 70, 1996, 6892–6901

KUO, L., FEARNES, R., COLLINS, P. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-template initiation at position 1 of the encoded mRNA. *J Virol*, 71, 1997, 4944-4953.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, 2nd ed., 1999.

LAMB RA, PARKS GD, Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2006. p. 1449–96.

LEACH A.R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. [S.I.]: Longman, 1996.

LI D, JANS DA, BARDIN PG, et al., Association of Respiratory Syncytial Virus M Protein with Viral Nucleocapsids Is Mediated by the M2-1 Protein *J Virol.*, 82, 2008, 8863–8870.

LINDAHL, E., HESS, B., VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Molecular modeling annual*. 7, 2001, 306-317.

LO MS, BRAZAS RM, HOLTZMAN MJ. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness., *J. Virol.*, 79, 2005, 9315–9319.

LUTTICK A, LIN B, MORTON C, et al., Characterization of a new class of polycyclic RSV inhibitors. *Antiviral Res.*, 74, 2007, A66.

MARQUARDT ED, Cost of ribavirin therapy for respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr.*, 126, 1995, 847.

MARTY, F.M, CHEMALY, R.F., LIAKOPOULOU, E., DENT, J.C., POWELL, K. A double-blind, randomised, placebo-controlled study to evaluate the safety and efficacy of RSV604 in adults with respiratory syncytial virus (RSV) infection following stem cell transplantation. IX International Symposium on Respiratory Viral Infections, Hong Kong, China, 2007.

MASON SW, ABERG E, LAWETZ C, et al., Interaction between Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) M2-1 and P Proteins Is Required for Reconstitution of M2-1-Dependent RSV Minigenome Activity, *J. Virol.*, 77, 2003, 10670–10676

MASON, S. W., ABERG, E., LAWETZ, C., DELONG, R., WHITEHEAD, P., & LIUZZI, M. Interaction between Human Respiratory Syncytial Virus ( RSV ) M2-1 and P Proteins Is Required for Reconstitution of M2-1-Dependent RSV Minigenome Activity. *Society*, 77, 2003, 10670–10676.

MERIC C, SPEHNER D, MAZARIN V, Respiratory syncytial virus nucleocapsid protein (N) expressed in insect cells forms nucleocapsid- like structures., *Virus. Res.*, 31, 1994, 187-201.

MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSSELL, D. S. AND OLSON, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry*, 16, 2009, 2785-91.

MOURA, F. E. A, PERDIGÃO, A. C. B., RIBEIRO, J. F., FLORÊNCIO, C. M. G. D., OLIVEIRA, F. M. S., PEREIRA, S. A R., ... DURIGON, E. L. Respiratory syncytial virus epidemic periods in an equatorial city of Brazil. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7, 2013, 1128–35.

Othumpangat S, Gibson L, Samsell L, et al., NGF is an essential survival factor for bronchial epithelial cells during respiratory syncytial virus infection., *PLoS ONE*, 4, 2009, e6444.

PATEL, J. M. A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids. *Lethbridge Undergraduate Research Journal*.3, 2008.

PELLETIER AJ, MANSBACH JM, CAMARGO CA Jr., Direct medical costs of bronchiolitis hospitalizations in the United States., *Pediatrics*, 118, 2006, 2418-2423.

PETERS TR, CROWE JE JR., Respiratory syncytial virus. In: Long SS, editor. *Principles and practice of pediatric infectious diseases*, 3rd edition. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; 2008. 1112–1117.

PETTERSEN EF, GODDARD TD, HUANG CC, COUCH GS, GREENBLATT DM, MENG EC, FERRIN TE. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 25, 2004, 1605-12.

RAMASWAMY M, SHI L, MONICK MM, et al., Specific inhibition of type I interferon signal transduction by respiratory syncytial virus., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 30, 2004, 893–900.

RAMASWAMY, SHI L, VARGA SM, et al., Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology*. 344, 2005 328-339.

ROY, A., KUCUKURAL, A., ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5, 2010, 725-738.

SANNER, M.F., *Python: A Programming Language for Software Integration and Development*. *J. Mol. Graphics Mod.*, 17, 1999, 57-61.

SANTOS NSO, ROMANOS MTRV, WIGG MD, *Introdução à Virologia Humana*, 2ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

SCHLENDER J, BOSSERT B, BUCHHOLZ U, et al., Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virology*, 74, 2000, 8234–8242.

SELWAY JTW, *Antiviral Activity of Flavones and Flavans*, V. Cody, E. Middleton, J.B. Harborne, Editors, *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*, Alan R. Liss, Inc., New York, London, 1986, 521–536.

SHAY DK, HOLMAN RC, NEWMAN RD, et al., Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*, 282, 1999, 1440-1446.

SIDWELL RW, BARNARD DL, Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. *Antiviral Res*, 71, 2006, 379-390.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, et al., *Farmacognosia - da Planta ao Medicamento*, 5ª ed., Editora da UFSC: Santa Catarina, 2004.

SINNOKROT, M.O., SHERRILL, D. Unexpected Substituent effects in face-to-face  $\pi$ -stacking interactions. *J of Physical Chemistry A*. 107, 2003, 8377-8379.

SPANN KM, SCHENKEL EP, GOSMANN G, et al., Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages., *J. Virol.* 78, 2004, 4363–4369.

SPANN KM, TRAN KC, COLLINS PL, Effects of Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus on Interferon Regulatory Factor 3, NF-kappaB, and Proinflammatory Cytokines, *J. Virol.*, 79, 2005, 5353–5362.

STOKES HL, EASTON AJ, MARRIOTT AC, Chimeric pneumovirus nucleocapsid (N) proteins allow identification of amino acids essential for the function of the respiratory syncytial virus N protein., *J. Gen. Virol.*, 84, 2003, 2679–2683.

TABOADA, P. BARBOSA, S., CASTRO, E. GUTIÉRREZ-PICHEL, M., MOSQUERA, V. Effect of solvation on the structure of human serum albumin in aqueous-alcohol mixed solvents. *Chemical Physics*, 340, 2007, 59-68.

TANG RS, NGUYEN N, CHENG X, JIN H. Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein function and virus viability. *J Virol* 75, 2001, 11328–11335.

TANNER, S. J., ARIZA, A., RICHARD, C.-A., KYLE, H. F., DODS, R. L., BLONDOT, M.-L., ... BARR, J.N. Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1 protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 2014, 1580–5.

TRAN T-L, CASTAGNE N, BHELLA D, et al., The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer., *J. Gen. Virol.*, 88, 2007, 196–206.

TRAN T-L, CASTAGNÉ N, DUBOSCLARD V, et al., The Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Forms Tetramers and Interacts with RNA and P in a Competitive Manner, *J. Virol.*, 83, 2009, 6363–6374.

TRAN, T.-L., CASTAGNÉ, N., DUBOSCLARD, V., NOINVILLE, S., KOCH, E., MOUDJOU, M., ... ELÉOUËT, J.-F. The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *Journal of Virology*, 83, 2009, 6363–74.

VISON JA, Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. *Flavonoids in the Living System*. Mantley and Buslig Plenum Press, New York, 1998.

WALSH EE, PETERSON DR, FALSEY AR, Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in elderly persons. *J Infect Dis*, 189, 2004, 233–238.

WETZEL S, SCHUFFENHAUER A, ROGGO S, et al., *Chimia* 61, 2007, 355–360.

WHITEHEAD SS, BUKREYEV A, TENG MN, et al., Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees., *J. Virol.*, 73, 1999, 3438–3442.

WU H, PFARR DS, TANG Y, et al., Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *J Mol Biol.*, 350, 2005, 126-144.

WYDE PR, CHETTY SN, TIMMERMAN P, et al., Short duration aerosols of JNJ 2408068 (R1170591) administered prophylactically or therapeutically protect cotton rats from experimental respiratory syncytial virus infection. *Antiviral Res*, 60, 2003, 221-231.

YANG J., YAN R., ROY, A., XU, D., POISSON, J., ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12, 2015, 7-8.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 2008, 40.

ZHOU H, CHENG X, JIN H. Identification of amino acids that are critical to the processivity function of respiratory syncytial virus M2-1 protein. *J Virol* 77, 2003, 5046–5053

ZSILA, F., BIKÁDI, Z., SIMONYI, M., et al. Probing the binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin by circular dichroism electronic absorption spectroscopy and molecular modeling methods. *Biochemical pharmacology*, 65, 2003, 447-56.

GILLET LC, NAVARRO P, TATE S, RÖST H, SELEVSEK N, REITER L, BONNER R, AEBERSOLD R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 2012, O111.016717–O111.016717.

YANG J, YAN R, ROY A, XU D, POISSON J, ZHANG Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 2015, 12, 7-8.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY D, INBAR Y, NUSSINOV R, WOLFSON HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *NAR*, 2005, 33, W363-W367.