

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 09/05/2027

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Ibilce - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio
Preto

THAINÁ DOS SANTOS RODRIGUES

Estudo das interações da proteína M do Vírus Sincial Respiratório humano com
moléculas de origem natural

São José do Rio Preto
2025

A decorative graphic in the bottom right corner of the page, depicting a virus particle. It features a light blue, semi-transparent, faceted geometric shape, possibly representing a capsid, with a pattern of small white dots. Overlaid on this shape are several thick, white, curved lines that intersect to form a star-like or web-like pattern, suggesting the structure of viral proteins or membranes.

THAINÁ DOS SANTOS RODRIGUES

Estudo das interações da proteína M do Vírus Sincicial Respiratório humano com moléculas de origem natural

Tese de Doutorado apresentada para obtenção do título de Doutora, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Área de Concentração: Biofísica Molecular

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

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey

Coorientador: Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso

São José do Rio Preto

2025

R696e Rodrigues, Thainá

 Estudo das interações da proteína M do Vírus Sincicial Respiratório humano com
moléculas de origem natural / Thainá Rodrigues. -- São José do Rio Preto, 2025

 81 p. : il., tabs.

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

 Orientadora: Fátima Pereira de Souza

 Coorientadora: Marcelo Andres Fossey

 1. Biofísica Molecular. 2. Virologia. 3. Proteína recombinante. 4. Técnicas
espectroscópicas. 5. Compostos naturais. I. Título.

THAINÁ DOS SANTOS RODRIGUES

**Estudo das interações da proteína M do Vírus Sincicial Respiratório humano com
moléculas de origem natural**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Ibilce - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas.

Área de Concentração: Biofísica Molecular

Data da defesa: 09/05/2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos A. H. Fernandes
UNESP – Câmpus Botucatu

Prof. Dr. Luís Gustavo Gardinassi
Universidade de São Paulo - USP

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ribeiro Povinelli
UNESP – Câmpus São José do Rio Preto

Prof^a.Dr^a. Gabriela Campus de Araújo
Universidade dos Grandes Lagos - SJRP

“O importante não é onde você começa, mas sim as decisões que toma sobre o lugar a que está determinado a alcançar.”
— Tony Robbins

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo aporte financeiro (Processo: 2019/04646-9).

A minha orientadora, Prof^a Fátima Pereira de Souza que sempre me incentivou, corrigiu e acrescentou para que eu crescesse como profissional e pesquisadora.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey por todo apoio e discussões enriquecedoras durante minha trajetória além dos conselhos profissionais que levarei comigo. Ao meu co-orientador Ícaro Putinhon Caruso que me auxiliou em todo tratamento de dados de RMN e contribuiu com ideias para realização desse projeto.

Aos professores Dr. Fernando Alves de Melo e Dr. Raghuvir K. Arni pela ajuda prestada disponibilizando o uso de equipamentos de seus laboratórios para a realização deste projeto.

Aos meus colegas de laboratório os quais passei anos trabalhando juntos, auxiliando e sendo auxiliada, ensinando e aprendendo.

Ao Raphael Vinicius Rodrigues Dias pela profunda troca de conhecimento e apoio na construção dos resultados computacionais aqui apresentados.

As minhas amigas Caroline Gismene, Ingrid Bernardes Guimãres e Clara Garcia Leal que sempre me apoiaram e incentivaram durante toda trajetória e ao meu amigo Jefferson de Souza Busso por todas as contribuições acadêmicas e pessoais durante esses anos.

A minha família e amigos por todo apoio incondicional durante todos esses anos e etapas da minha carreira.

Agradeço a disposição da Comissão examinadora e dos suplentes por toda contribuição a esse trabalho.

Agradeço a Unesp (IBILCE) e ao laboratório CMIB por toda recepção e acolhimento durante esses 6 anos.

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (VSR) é a principal causa de interações por doenças respiratórias em crianças menores de 5 anos, especialmente na primeira infecção, podendo causar pneumonia ou bronquiolite. Ainda não existe tratamento eficaz contra o VSR. A proteína de Matriz (M), composta por 256 aminoácidos, é fosforilada, não glicosilada, e essencial para o brotamento e disseminação viral, situando-se entre o complexo ribonucleoproteico e a bicamada lipídica do vírus. Tendo em vista a importância da proteína M e sua função primordial no brotamento de partículas virais eficientes, o objetivo do trabalho foi mapear a interação dos compostos naturais Chalcona, Cumarina, Quercetina e Kaempferol através das técnicas de STD-RMN, Dicroísmo Circular e Espectroscopia de fluorescência e para abordagem computacional, simulações de *Docking* Molecular e Dinâmica Molecular foram realizados a fim de caracterizar o ambiente químico por trás da interação entre a proteína M e ligantes. A proteína M foi obtida de forma recombinante, expressa a partir de *E.coli* RIL DE3 e purificada através de cromatografia de afinidade e exclusão molecular. Em suma, os resultados mostram que o mecanismo de interação entre os compostos e a proteína M são dirigidos principalmente pelo efeito hidrofóbico que direciona as moléculas no sítio de interação, efeito esse dominado pelo aumento da entropia e entalpia vistos pela espectroscopia de fluorescência, sem promover o desenovelamento da proteína visto por Dicroísmo Circular. As maiores constantes de associação obtidas foram para o composto Chalcona e Cumarina, em seguida dos compostos Kaempferol e Quercetina ($5,7 \times 10^4$; $5,7 \times 10^4$; $3,4 \times 10^4$ e $3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ respectivamente). De maneira geral, nenhum dos ligantes afetou a estrutura da proteína, aumentando e diminuindo a flexibilidade de pequenos resíduos locais devido a sua interação, mantendo as estruturas secundárias e terciárias. Outro aspecto importante foi o estudo do número de contatos e interações de hidrogênios entre os átomos de cada ligante e a proteína M que mostraram uma mesma faixa de número de contatos (600-900) que evidencia que o sítio em questão não se altera conformacionalmente devido a presença dos compostos, estabilizando o complexo e flutuando pouco a diferença desses contatos entre as moléculas. Ambas as interações acontecem na interface dimérica da proteína e apesar de não haver a associação das unidades monoméricas, a interação dos compostos pode ser promissora para impedir a ligação de M com outras proteínas celulares e virais durante o curso da infecção.

Palavras-chave: proteína de matriz (m); vírus sincicial respiratório; flavonóides e compostos cumarínicos; espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular; std-rmn; docking e dinâmica molecular.

ABSTRACT

The Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the leading cause of hospitalizations due to respiratory diseases in children under five years old, especially during the first infection, which can lead to pneumonia or bronchiolitis. There is still no effective treatment against RSV. The Matrix (M) protein, composed of 256 amino acids, is phosphorylated, non-glycosylated, and essential for viral budding and dissemination. It is located between the ribonucleoprotein complex and the viral lipid bilayer. Given the importance of the M protein and its critical role in the budding of efficient viral particles, the objective of this study was to map the interaction of the natural compounds Chalcone, Coumarin, Quercetin, and Kaempferol using STD-RMN, Circular Dichroism, and Fluorescence Spectroscopy. Additionally, computational approaches such as Molecular Docking and Molecular Dynamics simulations were performed to characterize the chemical environment underlying the interaction between the M protein and the ligands. The M protein was recombinantly obtained, expressed in *E. coli* RIL DE3, and purified using affinity and size-exclusion chromatography. In summary, the results show that the interaction mechanism between the compounds and the M protein is mainly driven by hydrophobic effects, which guide the molecules to the interaction site—an effect dominated by entropy and enthalpy gains as observed by fluorescence spectroscopy—without causing protein unfolding, as shown by Circular Dichroism. The highest dissociation constants were observed for Chalcone and Coumarin, followed by Kaempferol and Quercetin (5.7×10^4 ; 5.7×10^4 ; 3.4×10^4 and 3.1×10^4 M⁻¹, respectively). Overall, none of the ligands significantly altered the protein structure. Instead, they modulated the flexibility of specific local residues through their interaction, while preserving the secondary and tertiary structures. Another important finding was the analysis of the number of hydrogen bonds and contact points between each ligand and the M protein, which revealed a consistent range of contact numbers (600–900). This indicates that the binding site does not undergo conformational changes in the presence of the compounds, contributing to complex stabilization with minimal fluctuations in interaction patterns. All interactions occurred at the dimeric interface of the protein. Although there was no dissociation of the monomeric units, the compound interactions may represent a promising strategy to prevent M from binding to other cellular and viral proteins during infection.

Keywords: matrix protein (m); respiratory syncytial virus; flavonoids and coumarin compounds; fluorescence spectroscopy and circular dichroism; std-rmn; molecular docking and dynamics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Comparação global de casos de SRAG no Brasil em 2023 de acordo com os vírus detectados nas amostras de casos positivos. 18
- Figura 2.** Mecanismo imuno modulatório dos fatores super expressos (seta vermelha) e hipo expressos (seta azul) no curso da infecção pulmonar pelo Vírus Sincicial Respiratório. 20
- Figura 3.** Estrutura da partícula viral evidenciando as proteínas que compõe o Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV). No envelope viral estão presentes as proteínas G, F e SH responsáveis pelas etapas de adsorção, fusão do envelope viral à bicamada lipídica do hospedeiro e mediação da permeabilidade da membrana através dos canais iônicos, respectivamente. No interior da partícula viral estão presentes as proteínas N, L e P associadas ao RNA genômico para formação da partícula viral e ainda, as proteínas M2-1 que compõem um importante sistema de regulação do ciclo de replicação viral e a proteína M, responsável pela etapa de brotamento da partícula viral. 22
- Figura 4.** Esquema das etapas de replicação do Vírus Sincicial Respiratório (numerados esquematicamente de 1 a 5) e os respectivos agentes antivirais atualmente em fase de desenvolvimento de teste e alvos proteicos. 24
- Figura 5. Apresentação esquemática da proteína M.** (A) representação dos domínios funcionais da proteína. Foi utilizado o código de aminoácidos de uma única letra, onde os números se referem à posição do resíduo de aminoácido na proteína. As localizações do sinal de exportação nuclear (NES; resíduos hidrofóbicos em preto), a sequência de localização nuclear (NLS; resíduos básicos em preto), o domínio de ligação ao ácido nucleico (NBD; roxo) e as regiões hidrofóbicas (Hyd; em caixas amarelas) são indicadas. Os principais resíduos importantes para a ligação do RNA (240, 570) no ácido nucleico estão destacados em vermelho. Os locais de fosforilação da proteína quinase CK2 (S95, T205) que regulam o tráfego nucleocitoplasmático estão destacados (linhas verticais azuis). (B) Dímero RSV M mostrando os domínios estruturais e resíduos-chave usando o mesmo esquema de cores que em A. A região hidrofóbica e NBD são apresentados no monômero ciano; os resíduos de fosforilação NLS, NES e CK2 são destacados no monômero cinza. (C) Modelo dimérico da estrutura da proteína M evidenciando os aminoácidos essenciais para a dimerização da mesma. 26
- Figura 6. Estrutura química dos compostos naturais usados.** (a) Chalcona, classificada como cetona β -insaturada. (b) Cumarina (Ester cumarínico). (c) Esculetina, derivado cumarínico com adição do grupo fenólico. (d) Kaempferol, flavonoide com modificações em ambos os anéis (grupamento OH), sendo a adição de 2 grupos OH no anel A e 1 grupamento no anel B. Anel pirano da molécula com a presença de uma cetona e grupamento enol. (e) Quercetina, flavonoide semelhante ao Kaempferol mas com a presença de 2 grupos fenólicos em ambos os anéis. (f) Resveratrol na forma trans utilizado no estudo de mestrado. 30

Figura 7. Esquema do experimento de STD-RMN. A troca entre o ligante livre e 37
ligado permite a transferência intermolecular de magnetização do receptor para a
pequena molécula ligada.

Figura 8. Espectros de referência de estruturas secundárias de proteínas. As 39
linhas vermelhas, azul e verde representam espectros compostos majoritariamente de
estruturas alfa hélice, estrutura beta e *random coil*, respectivamente.

Figura 9: Purificação da proteína M. **A)** SDS-PAGE 15% corado com azul 52
brilhante *coomassie*[®] referente à purificação por afinidade ao níquel. MM) Marcador
Molecular; 1) Extrato bruto (flow); 2) 20 mM; 3) 30 mM; 4) 60 mM; 5) 100 mM; 6)
200 mM; 7) 500 mM a seta preta indica a banda correspondente a eluição proteína M
em 30 kDa. **B)** Cromatograma referente à purificação por exclusão molecular em
ÅKTA Purifier utilizando a coluna *Superdex 75* (*GE Life Science*[®]).

Figura 10. Espectro de CD-UV *far* da proteína M (2 µM, linha preta contínua) a 54
25 °C (298 K) em solução tampão (150 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0, 50 mM
NaCl, 1,0 mM BME). Os círculos pretos vazios representam o melhor resultado para
a curva ajustada realizado pelo programa CONTINLL e a linha vermelha representa
o espectro do tampão em solução. A caixa a direita representa a percentagem de cada
estrutura secundária encontradas, sendo 19% de estruturas alfa hélice, 44% de fita
beta e 37% de estruturas *random coil*.

Figura 11. Espectro de referência da interação da Chalcona (200 µM) com a proteína 55
M (20 µM) representado pela linha roxa. O espectro de STD-RMN é apresentado logo
abaixo, destacado pela caixa preta tracejada, e os picos representados nas regiões
7.94, 7.70, 7.45 e 6.8 ppm, são dos hidrogênios da molécula que receberam maior
magnetização proveniente da proteína. A porcentagem dos epitopos de interação da
Chalcona com a proteína M estão destacadas em vermelho.

Figura 12. (A) Espectro de referência da interação da Cumarina (200 µM) com a 56
proteína M (20 µM) representado pela linha rosa. O espectro de STD-RMN é
representado pela inserção da caixa preta tracejada, e os pico em 7.41 ppm é
proveniente do hidrogênio da molécula que recebeu magnetização. **(B)** Espectro de
referência da interação da Esculetina (200 µM) com a proteína M (20 µM)
representado pela linha azul com o assinalamento do ¹H-4 e ¹H-5 da molécula. O
espectro de STD-RMN é representado com uma linha azul contínua já que não houve
transferência de magnetização da proteína M para Esculetina.

Figura 13. (A) Espectro de referência da interação do Kaempferol (200 µM) com a 57
proteína M (20 µM) representado pela linha verde. O espectro de STD-RMN
evidencia os picos em 7.91, 7.23, 6.36 e 6.15 ppm provenientes dos hidrogênios da
molécula que receberam magnetização. **(B)** Espectro de referência da interação da
Quercetina (200 µM) com a proteína M (20 µM) representado pela linha laranja. STD-
RMN evidencia os picos em 7.94, 7.64, 7.59, 6.90, 6.49 e 6.25 ppm provenientes dos
hidrogênios da molécula que receberam magnetização.

Figura 14. Espectro de CD-UV *far* da proteína M (2 µM) representado pela linha 59
contínua preta em tampão fosfato (150 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0, 50 mM NaCl,

1,0 mM β ME) e na presença de 20 μ M de Cumarina (A), Chalcona (B), Kaempferol (C) e Quercetina (D).

Figura 15. Espectro de supressão de fluorescência da proteína M [5 μ M] à 288 (A), 298 (B) e 308 K (C) em tampão fosfato (150 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,0 mM β ME) na presença de diferentes concentrações de Chalcona. A concentração final do composto foi de 50 μ M. 60

Figura 16. Parâmetros termodinâmicos da interação da Chalcona com a proteína M. (A) Gráfico de Stern-Volmer: Supressão de Fluorescência da proteína M nas temperaturas de 288 (verde), 298 (azul) e 308 K (vermelho). (B) Gráfico de Duplo-Log para a supressão de fluorescência da proteína M pela Chalcona nas três temperaturas, esquematicamente coloridas iguais para todos os gráficos. O inserto corresponde ao Gráfico de *van't Hoff* e relaciona a constante de associação com a temperatura. A partir dele foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos do complexo. (C) Perfil termodinâmico do complexo proteína-M/chalcona nas temperaturas 288, 298 e 308 K. Em vermelho é representado a variação da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde é representado a variação da entalpia (ΔH) e em azul é representado a variação da entropia ($T\Delta S$). 62

Figura 17. Espectro de supressão de fluorescência da proteína M [5 μ M] à 288 (A), 298 (B) e 308 K (C) em tampão fosfato (150 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,0 mM β ME) na presença de diferentes concentrações de Cumarina. A concentração final do composto foi de 50 μ M. 63

Figura 18. Parâmetros termodinâmicos da interação da Cumarina com a proteína M. (A) Gráfico de Stern-Volmer: Supressão de Fluorescência da proteína M nas temperaturas de 288 (verde), 298 (azul) e 308 K (vermelho). (B) Gráfico de Duplo-Log para a supressão de fluorescência da proteína M pela Cumarina nas três temperaturas, esquematicamente coloridas iguais para todos os gráficos. O inserto corresponde ao Gráfico de *van't Hoff* e relaciona a constante de associação com a temperatura. A partir dele foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos do complexo. (C) Perfil termodinâmico do complexo proteína-M/cumarina nas temperaturas 288, 298 e 308 K. Em vermelho é representado a variação da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde é representado a variação da entalpia (ΔH) e em azul é representado a variação da entropia ($T\Delta S$). 64

Figura 19. Espectro de supressão de fluorescência da proteína M [5 μ M] à 288 (A), 298 (B) e 308 K (C) em tampão fosfato (150 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,0 mM β ME) na presença de diferentes concentrações de Kaempferol. A concentração final do composto foi de 50 μ M. 65

Figura 20. Parâmetros termodinâmicos da interação do Kaempferol com a proteína M. (A) Gráfico de Stern-Volmer: Supressão de Fluorescência da proteína M nas temperaturas de 288 (verde), 298 (azul) e 308 K (vermelho). (B) Gráfico de Duplo-Log para a supressão de fluorescência da proteína M pelo Kaempferol nas três temperaturas, esquematicamente coloridas iguais para todos os gráficos. O inserto corresponde ao Gráfico de *van't Hoff* e relaciona a constante de associação com a temperatura. A partir dele foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos do complexo. (C) Perfil termodinâmico do complexo proteína-M/Kaempferol nas 66

temperaturas 288, 298 e 308 K. Em vermelho é representado a variação da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde é representado a variação da entalpia (ΔH) e em azul é representado a variação da entropia ($T\Delta S$).

Figura 21. Espectro de supressão de fluorescência da proteína M [5 μ M] à 288 (A), 298 (B) e 308 K (C) em tampão fosfato (150 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,0 mM β ME) na presença de diferentes concentrações de Quercetina. A concentração final do composto foi de 25 μ M. 67

Figura 22. Parâmetros termodinâmicos da interação da Quercetina com a proteína M. (A) Gráfico de Stern-Volmer: Supressão de Fluorescência da proteína M nas temperaturas de 288 (verde), 298 (azul) e 308 K (vermelho). (B) Gráfico de Duplo-Log para a supressão de fluorescência da proteína M pela Quercetina nas 3 temperaturas, esquematicamente coloridas iguais para todos os gráficos. O inserto corresponde ao Gráfico de *van't Hoff* e relaciona a constante de associação com a temperatura. A partir dele foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos do complexo. (C) Perfil termodinâmico do complexo proteína-M/Quercetina nas temperaturas 288, 298 e 308 K. Em vermelho é representado a variação da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde é representado a variação da entalpia (ΔH) e em azul é representado a variação da entropia ($T\Delta S$). 68

Figura 23: Estabilidade estrutural da proteína M ao longo da simulação. (A) Gráfico de RMSD (Å) e Rg (Å) em 300 ns. (B) Estrutura tridimensional representativa do dímero da proteína M via dinâmica molecular (PDB: 4v23) colorida de acordo com a estrutura secundária da proteína. Em laranja temos as estruturas em α -hélice, em azul as estruturas em folhas- β e em cinza, as estruturas em Random-coil. A estrutura subsequente está colorida a fim de esquematizar o monômero da cadeia A (azul ciano) e cadeia B (cinza). 70

Figura 24. Busca por sítios de interação com refinamento experimental. (A) Dímero da proteína M, em representação de superfície (cinza) e clusters destacados em formatos de esferas e diferenciados por cores (B). No total, 93 clusters foram selecionados, e a triagem com os resultados experimentais refinou para duas possíveis regiões. Essa triagem levou em consideração a hidrofobicidade dos sítios (C), presença do triptofano, restrição estéricas e região de interface. 72

Figura 25. Docking Molecular dos compostos. Representação dimérica da proteína M em cartoon com os ligantes acoplados na configuração de menor energia calculada via AmberScore. Ao lado, foram representadas as cadeias A e B em superfície, evidenciando o encaixe na interface dimérica. (B) Mapa do microambiente dos resíduos de aminoácidos da proteína M envolvidos na interação com os compostos, o Trp236 está destacado uma vez que esses resíduos foram utilizados como sonda nos experimentos. Vale ressaltar que o composto Quercetina encontra-se no sítio espelhado, e a análise de contatos mostra os mesmos que os destacados em B. 74

Figura 26. Análise dinâmica dos compostos dockados na proteína M. (A) As dinâmicas foram analisadas separadamente, todavia como o conjunto dos ligantes mostraram-se com o mesmo comportamento, utilizamos a médias das medidas para gerar os parâmetros, sendo esses: (A) RMSD (B) Número de contatos (C) Raio de Giro e (D) Pontos de hidrogênio. Todas as dinâmicas foram realizadas em triplicatas 76

de 100ns. De maneira geral, o resultado indica que o sítio testado é uma região estável, com os parâmetros experimentais respeitados, sendo uma boa hipótese da interação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coeficiente de extinção molar e sua máxima absorção no UV-Vis para cada composto testado.	51
Tabela 2. Comparação dos perfis de estruturas secundárias obtidas para proteína M na ausência e presença da Chalcona, Cumarina, Kaempferol e Quercetina pela análise e deconvolução dos espectros de CD-UV <i>far</i> pelo programa CONTILL.	63
Tabela 3. Perfil termodinâmico do complexo proteína M/chalcona nas 3 diferentes temperaturas.	67
Tabela 4. Perfil termodinâmico do complexo proteína M/Cumarina nas 3 diferentes temperaturas.	70
Tabela 5. Perfil termodinâmico do complexo proteína M/Kaempferol nas 3 diferentes temperaturas.	71
Tabela 6. Perfil termodinâmico do complexo proteína M/Quercetina nas 3 diferentes temperaturas.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

θ - elipticidade

ΔG^D - energia livre de Gibbs de desnaturação

ΔH - variação de entalpia de desnaturação de van't Hoff

ΔS - variação de entropia de desnaturação

K_{sv} Constante de *Stern-Volmer*

K_b Constante de ligação

BME β -mercaptoetanol

CD- dicroísmo circular

D.O Densidade óptica

DMSO Dimetilsulfóxido

DTT- ditioneitol

hMPV Metapneumovírus humano

hRSV- Vírus Sincicial Respiratório Humano

IFN- γ Interferon gama

IRAs Infecções respiratórias agudas

NS1- proteína não estrutural 1 do hRSV

NS2- proteína não estrutural 2 do hRSV

RNP- complexo ribonucleoproteico

n Número de ligantes por sítios de ligação

OMS Organização Mundial da Saúde

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de Sódio

TLRs Receptores *Toll like*

UV Ultravioleta

Vis Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR): HISTÓRICO, FISIOPATOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA	17
1.3 CLASSIFICAÇÃO, CICLO REPLICATIVO E TRATAMENTOS DISPONÍVEIS ..	21
1.6 COMPOSTOS NATURAIS COMO CANDIDATOS ANTIVIRAIS À PROTEÍNA DE M E BROTOAMENTO VIRAL.....	28
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	31
2.1. DOCKING MOLECULAR.....	31
2.2. DINÂMICA MOLECULAR.....	35
2.3 STD-RMN	36
2.4 Dicroísmo Circular	37
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4. METODOLOGIA	46
4.1 DOCKING MOLECULAR.....	46
4.2 DINÂMICA MOLECULAR	46
4.3 CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA M EM <i>E.COLI</i> EM LINHAGEM RIL DE3	47
4.4 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS NATURAIS.....	48
4.5 ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS.....	48
4.6 DICROÍSMO CIRCULAR.....	49
4.7 STD-RMN PARA TRIAGEM INICIAL DE COMPOSTOS	50
4.8 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE INTERAÇÃO.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA M	52
5.3 ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA M POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	52
5.4 ANÁLISE DOS ESPECTROS DE STD-RMN ENTRE A PROTEÍNA M E COMPOSTOS	54
5.5 ANÁLISE DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DA PROTEÍNA M NA PRESENÇA DOS COMPOSTOS VIA DICROÍSMO CIRCULAR.....	57

5.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E ANÁLISE TERMODINÂMICA DAS INTERAÇÕES.....	60
5.6.1 Chalcona	60
5.6.2 Cumarina.....	62
5.6.3 Kaemferol	65
5.6.4 Quercetina	67
5.7 ANÁLISES COMPUTACIONAIS DO COMPLEXO PROTEÍNA/COMPOSTOS VIA DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR	70
5.7.1 REFINAMENTO ESTRUTURAL E ESTABILIDADE DA PROTEÍNA M POR DINÂMICA MOLECULAR	70
5.7.2 DOCKING MOLECULAR;.....	71
5.7.3 DINÂMICA MOLECULAR.....	75
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	77
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICE 1	86

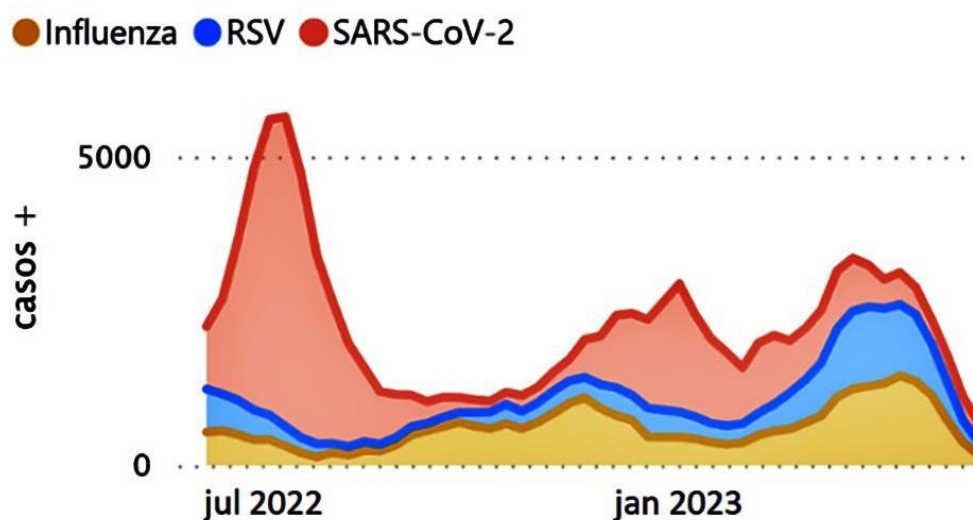
1. INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR): HISTÓRICO, FISIOPATOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

As infecções respiratórias agudas são descritas desde a antiguidade por egípcios, chineses e gregos e os vírus respiratórios ocupam um papel de destaque dentre as possíveis etiologias para essas infecções. Atualmente, o Vírus Sincicial Respiratório (VSR) é o patógeno mais comumente identificado em recém-nascidos e crianças acometidas por infecções respiratórias agudas (COLLINS et al., 2007; LI Y et al., 2022). Embora a maioria dos casos fatais ocorra entre crianças que vivem em países em desenvolvimento, a mortalidade e o impacto econômico substanciais a curto prazo resultam num fardo igualmente elevado nos países desenvolvidos. As infecções por VSR no início da vida, estão associadas à disfunção respiratória de longo prazo (COLLINS et al., 2007) e, estima-se, que das 101.400 mortes globais secundárias ao VSR em 2019, 97% ocorreram em países em desenvolvimento (BRUNWASSER et al., 2020).

No Brasil, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), em 2023 até a semana epidemiológica 52 (SE52), foram detectados níveis epidêmicos para síndromes respiratórias agudas graves (SRAG), com elevada atividade do VSR. Mesmo com o aumento da circulação de outros vírus como SARS-Cov-2, o número de hospitalizações de crianças <5 anos por SARS-CoV-2 permaneceu em 6.022 casos enquanto para o VSR foi registrado 24.349 casos com SRAG. Já no panorama global das infecções respiratórias, isto é, o número de casos no Brasil sem levar em conta os grupos, idades ou etnias até o início de 2023, houve a co circulação de Influenza, Covid-19 e VSR, como mostra a figura abaixo.

Figura 1. Comparação global de casos de SRAG no Brasil entre julho de 2022 e janeiro de 2023 de acordo com os vírus detectados nas amostras de casos positivos.



Fonte: adaptado OPAS (2023).

Em 1956, o vírus foi isolado pela primeira vez a partir de chimpanzés com sintomas clínicos comuns às doenças respiratórias: coriza, tosse e espirros. Foi constatado que 100% das colônias de chimpanzés estavam infectadas e o agente patogênico foi denominado agente de coriza em chimpanzés (chimpanzee coryza agent - CCA). O material isolado foi inoculado em diversos animais de laboratório, porém somente os primatas desenvolveram os sinais da doença (BLOUNT et al., 1956). Posteriormente, um vírus similar ao CCA foi isolado de duas crianças hospitalizadas nos Estados Unidos, sendo que uma apresentava pneumonia e a outra laringobronquite (crupe). Sendo assim, devido à sua afinidade pelo aparelho respiratório e à sua capacidade de formar sincícios em culturas celulares, o nome do vírus foi substituído por Vírus Sincicial Respiratório (CHANOCK et al., 1957).

As manifestações clínicas incluem bronquiolite e pneumonia (infecção e inflamação das vias aéreas bronquiolares distais e regiões pulmonares alveolares), acompanhadas de sintomas como sibilos, tosse e desconforto respiratório (CERVANTES et al., 2016). A bronquiolite pode causar obstrução dos lúmens já estreitados das vias aéreas bronquiolares, restringindo o fluxo de ar normal através dos bronquíolos e, subsequentemente, levando ao aprisionamento de gases pulmonares, taquipneia grave, hiper expansão torácica, aumento da frequência respiratória e insuficiência pulmonar (MUNDAY et al., 2015; OLCCHANSKI et al., 2018). O VSR também pode causar pneumonia em bebês, seja diretamente pela infecção do epitélio alveolar, disseminação da inflamação das vias aéreas distais para o alvéolo, (YANG et al., 2015;

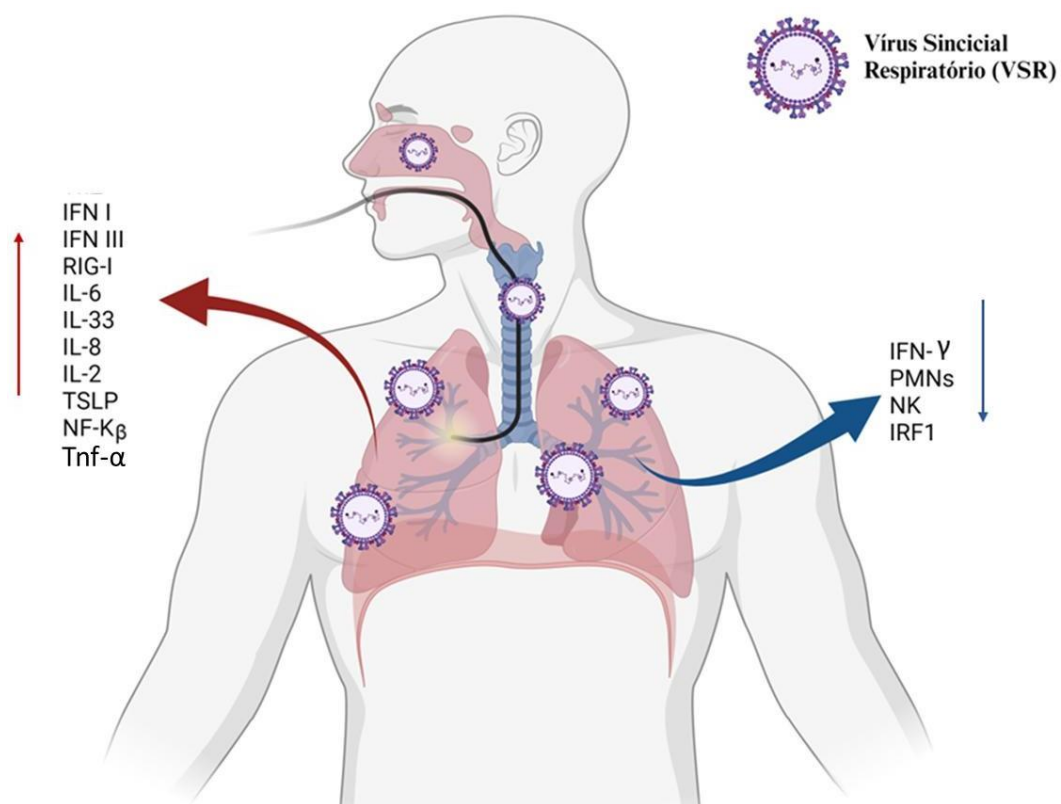
TERHOHEIKKINEN *et al.*, 2015) deficiência respiratória e morte (LAMARÃO *et al.*, 2012). Além disso, a infecção por VSR na infância tem sido associada à reinfeção, que pode levar a sequelas crônicas, como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) tardiamente (YANG *et al.*, 2015).

A manifestação da infecção pelo VSR segue um padrão semelhante na maioria dos bebês, embora a gravidade da doença varie dramaticamente. A maioria dos bebês e crianças geralmente desenvolvem sintomas 4 a 6 dias após a primeira exposição ao VSR (PERSSON *et al.*, 2014). Os sintomas incluem congestão nasal com secreção de muco e febre baixa, seguida de tosse e sintomas respiratórios como retrações torácicas e chiado no peito, a marca registrada de bronquiolite (JHA *et al.*, 2016). Os achados radiográficos de tórax são variáveis, com anormalidades leves revelando infiltrados alveolares, sugestivos de atelectasia obstrutiva ou pneumonia viral (KALER *et al.*, 2023). Além disso, idosos e imuno comprometidos também são alvos de infecção por VSR e podem desenvolver sintomas graves da doença (PIEDIMONTE *et al.*, 2015).

A replicação viral induz a produção de mediadores inflamatórios pelas células epiteliais respiratórias, contribuindo com a patogênese da doença. A descamação das células epiteliais, o edema da superfície mucosa e o aumento da reatividade da musculatura lisa das vias aéreas ocasionam os sintomas respiratórios da bronquiolite aguda (GRIFFITHS *et al.*, 2017).

Dentre os mediadores inflamatórios que contribuem para patogênese da doença, as ILC2 são ativadas diretamente pelas citocinas associadas ao epitélio IL-25, IL-33 e TSLP, que são fortes promotores de respostas imunes Th2 (MESEV *et al.*, 2019; HIJANO *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2019). Também foi demonstrado que a IL-1 β é um ativador crítico dos ILC2, uma vez que pode regular a expressão dos receptores de citocinas epiteliais, promover a proliferação e a produção de citocinas (IMANI *et al.*, 2012; VAN *et al.*, 2022). A infecção por VSR em camundongos e bebês promoveu a ativação da via da IL-1 β , o que levou à indução de citocinas participantes da resposta inata (CCL2, TSLP e IL-33) pelo epitélio das vias aéreas, e a inibição da via da IL-1 β com antagonista do receptor de IL-1 durante a infecção por VSR (HUANG *et al.*, 2016). Além disso, um conjunto de mecanismos e cascatas de sinalizações são hiper expressos no curso da infecção e diversos outros fatores e citocinas são suprimidos (Figura 2), permitindo o aumento da infecção viral (SUN *et al.*, 2017; SOKOL *et al.*, 2015).

Figura 2. Mecanismo imuno modulatório dos fatores super expressos (seta vermelha) e hipo expressos (seta azul) no curso da infecção pulmonar pelo Vírus Sincicial Respiratório.



Fonte: autoria própria.

1.3 CLASSIFICAÇÃO, CICLO REPLICATIVO E TRATAMENTOS DISPONÍVEIS

O VSR é classificado na família Pneumoviridae na ordem Mononegavirales (ESNEAU et al., 2019) e existe como dois subgrupos antigénicos, tipo A e tipo B, que podem ser diferenciados pelo sequenciamento de nucleotídeos e pelo padrão de reação de anticorpos monoclonais à Glicoproteína (G) e a proteína de Fusão (F) (HOGAN et al., 2018). O vírion consiste em partículas esféricas de 100 a 350 nm formadas por nucleocapsídeo envolto num envelope lipídico derivado da membrana plasmática da célula hospedeira (COLLINS et al., 2013).

Apresenta-se como um vírus de RNA de cadeia simples senso negativo, envelopado que codifica 11 proteínas, sendo a nucleoproteína de ligação ao RNA (N) a glicoproteína (G) e uma pequena proteína hidrofóbica (SH), a larte polimerase (L), e a fosfoproteína (P) presentes no envelope viral.

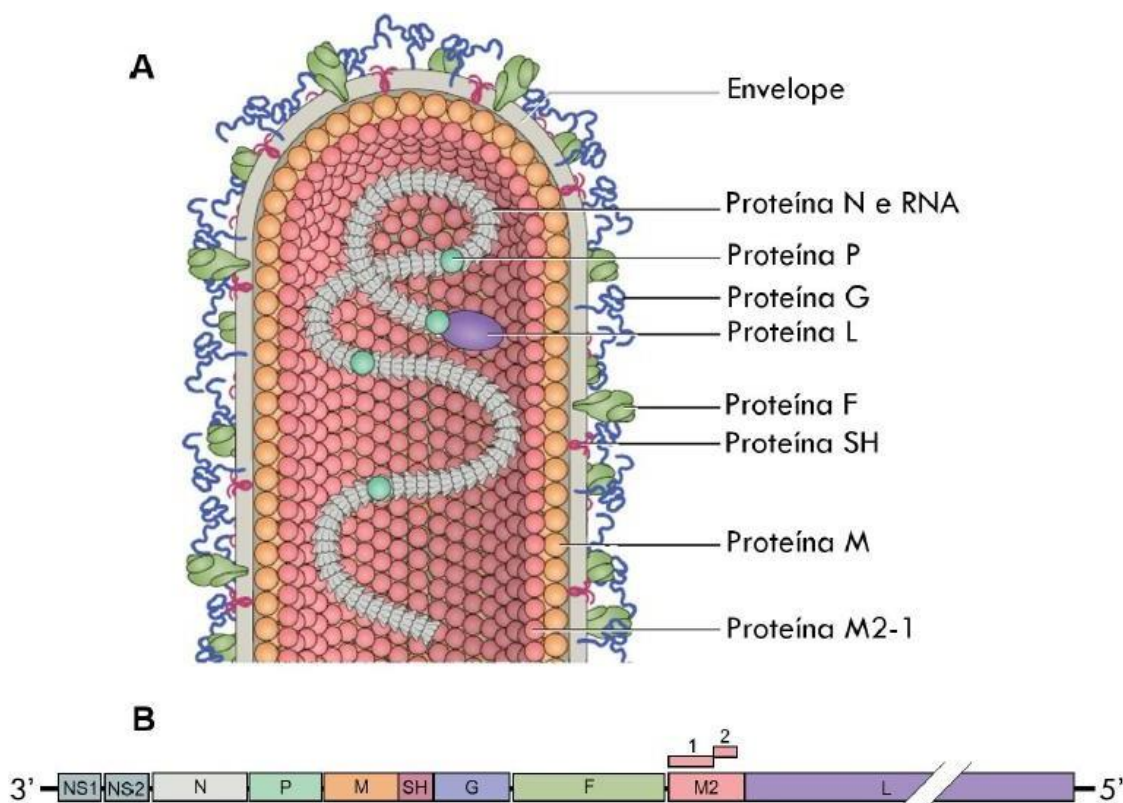
A infecção na célula hospedeira começa com a adsorção do VSR pela ligação da proteína G às proteínas de superfície celular. Após a adsorção do viron à célula hospedeira, ocorre a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular em um processo conhecido como desnudamento mediado pela proteína F que se liga a receptores do tipo Toll like 4 (TLR4), desencadeando a ativação de quinases que potencializam a entrada de partículas virais (COLLINS et al., 2013). Durante ou após a ligação ao receptor, o envelope viral se funde à membrana da célula hospedeira liberando o conteúdo da partícula viral infectante e, em seguida, ocorre a associação do complexo RNP da proteína de Matriz pela fosforilação da proteína P.

Com a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma e a ligação ao receptor, inicia-se o processo de transcrição do genoma viral. Uma vez dentro do citoplasma, o RNA de fita simples sentido negativo é transcrito pela RNA polimerase RNA dependente aderindo-se a região leader no extremo 3' do genoma que não apresenta função decodificadora. A transcrição é iniciada no primeiro nucleotídeo, tendo como produto mRNAs para a tradução das proteínas estruturais do vírus e ainda, servindo de molde para a replicação do genoma simultaneamente. (COLLINS et al., 2013).

As proteínas NS1 e NS2 são responsáveis pela inibição dos IFNs do tipo I, IFN- α e IFN- β presentes nas células epiteliais das vias respiratórias, bloqueando uma resposta imunológica efetiva contra o VSR (SCHMIDT & VARGA et al., 2017; THRONHILL et al., 2020). Após a síntese das proteínas e a replicação do material genético, a montagem e brotamento dos vírions maduros de VSR ocorrem na membrana plasmática, onde contém bolsas lipídicas modificadas pelo vírus envolvendo todas as proteínas de superfície virais e a proteína de matriz (M). Dentro

do vírion, a proteína M se liga à proteína M2-1 do complexo RNP e recruta esta estrutura para a membrana celular para a montagem do vírus e a ruptura das células infectadas para a fusão do vírus com células adjacentes (COLLINS et al., 2013; LAY et al., 2019).

Figura 3. Estrutura da partícula viral evidenciando as proteínas que compõe o Vírus Sincicial Respiratório Humano (VSR). No envelope viral estão presentes as proteínas G, F e SH responsáveis pelas etapas de adsorção, fusão do envelope viral à bicamada lipídica do hospedeiro e mediação da permeabilidade da membrana através dos canais iônicos, respectivamente. No interior da partícula viral estão presentes as proteínas N, L e P associadas ao RNA genômico para formação da partícula viral e ainda, as proteínas M2-1 que compõem um importante sistema de regulação do ciclo de replicação viral e a proteína M, responsável pela etapa de brotamento da partícula viral.



Fonte: Adaptado Battle et. al. (2019)

Dentre as terapias mais utilizadas para o VSR estão a ribavirina e o anticorpo monoclonal Palivizumab. O Palivizumab (Synagis®), um anticorpo IgG1 monoclonal humanizado produzido para reconhecimento a proteína F do hRSV, foi desenvolvido em 1998 e seu uso é atualmente limitado a prematuros com doença pulmonar crônica (DLC) de prematuridade definida como idade gestacional <32 semanas de gestação e necessidade de oxigênio suplementar nos primeiros 28 dias de vida (HOGAN et al., 2018; XIE et al., 2019).

A Ribavirina, é um análogo de nucleosídeo sintético com ampla atividade in vitro contra uma variedade de vírus de RNA e DNA. Em 1993, o Comitê de Doenças Infecciosas da Academia Americana de Pediatria (AAP) apoiou o uso da Ribavirina, que permaneceu como único agente antiviral licenciado para o tratamento de infecções graves por VSR, por um fármaco de amplo espectro. No entanto, a recomendação foi revista em 1996. O uso de Ribavirina foi limitado a pacientes imunocomprometidos com VSR por requerer administração prolongada de aerossol, riscos de potencial toxicidade, efeitos teratogênicos durante a gravidez, altos gastos para terapia e necessidade de internação e manutenção hospitalar (COLLINS et al., 2013).

Durante décadas, vários compostos foram testados contra o VSR e esbarraram em aspectos clínicos como baixa eficácia, baixa segurança de administração, efeitos colaterais graves, reações clínicas exacerbadas como na tentativa de inativação viral por Formalina, dentre outros aspectos que levaram o uso de terapias como a Ribavirina e o Palivizumab até os dias atuais (GOMEZ et al., 2014; HAMMIT et al., 2022).

Em agosto de 2023, a Food and Drug Administration (FDA) nos EUA aprovou a primeira vacina que protege os recém-nascidos de infecções por VSR. A vacina, produzida pela Pfizer, é administrada às mães no final da gravidez e oferece proteção aos bebês durante os primeiros seis meses de vida. Ainda assim, a vacina, aplicada de 32 a 36 semanas de idade gestacional, não confere proteção a longo prazo. Nos primeiros três meses após o nascimento, a vacina foi 82% eficaz na prevenção de doenças graves e após 6 meses foi tão eficaz quanto um placebo (FLEMING-DUTRA et al., 2023).

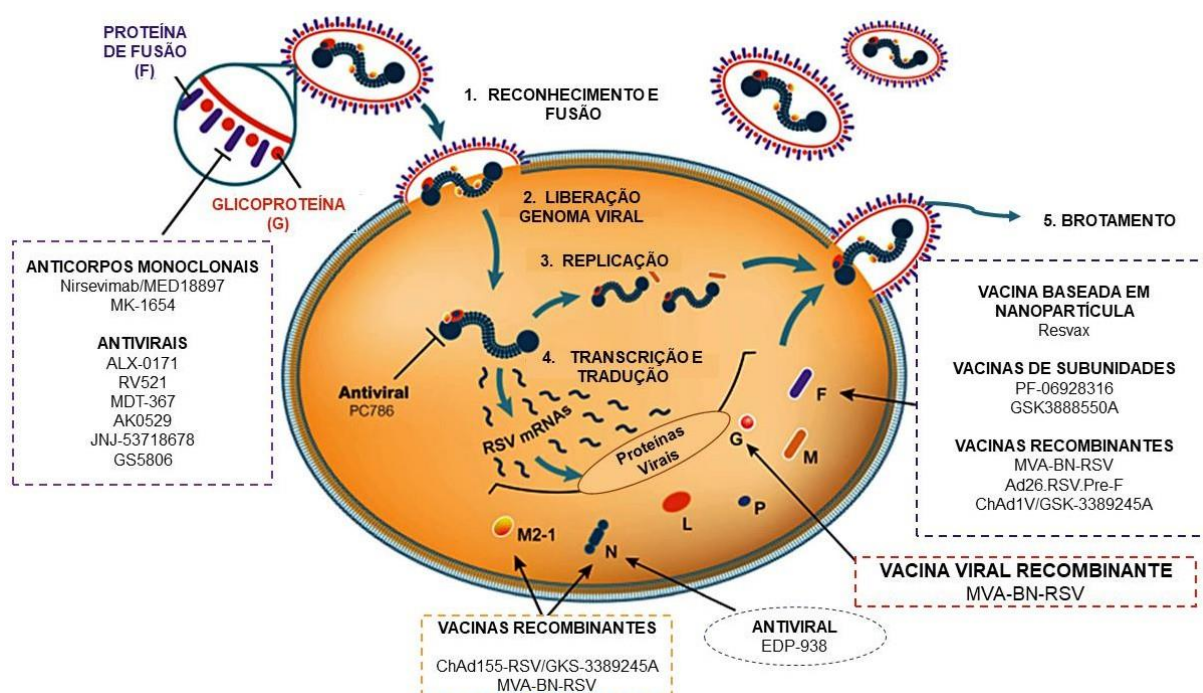
Uma análise da agência descobriu que havia uma proporção ligeiramente maior de parto prematuro em bebês cujas mães receberam a vacina em comparação com aqueles que receberam placebo: 5,7% contra 4,7%, respectivamente. A diferença não foi considerada estatisticamente significativa. A Pfizer planeja um grande estudo de segurança pós-mercado que usará grandes bancos de dados de reivindicações comerciais, para ajudar a avaliar os pontos finais de segurança – incluindo nascimento prematuro – em todos que recebem a vacina (FLEMING-DUTRA et al., 2023).

Em dezembro de 2023, foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) o registro da primeira vacina contra o vírus sincicial respiratório (RSV), voltada para idosos. A liberação foi concedida ao imunizante Arexvy, da farmacêutica GSK, que demonstrou eficácia de 94,1% e está indicada para pessoas com idade superior ou igual a 60 anos (AREXVY 2023).

Os agentes antivirais experimentais para VSR em testes, podem ser classificados em inibidores de fusão, com objetivo de bloquear a entrada do vírus na célula hospedeira e inibidores de replicação, que interferem multiplicação ou montagem de vírus. No entanto, não há ainda agentes antivirais em estudo até o presente momento para a proteína de Matriz (M), responsável pelo processo de montagem e brotamento da partícula viral como evidenciado na

Figura 4.

Figura 4. Esquema das etapas de replicação do Vírus Sincicial Respiratório (numerados esquematicamente de 1 a 5) e os respectivos agentes antivirais atualmente em fase de desenvolvimento de teste e alvos proteicos.



Fonte: adaptado Domachowske (2021).

1.4 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA M E SUA IMPORTÂNCIA NA INFECÇÃO

A proteína de Matriz (M) é uma proteína fosforilada, não glicosilada que contém 256 resíduos de aminoácidos e faz parte da estrutura do virion. Seu perfil estrutural é semelhante à de outras proteínas M de outros Mononegavírus, com uma região de baixa hidrofobicidade na porção NH₂ seguido por um aumento na hidrofobicidade em direção ao terminal COOH que contém regiões predominantemente hidrofóbicas (GHILDYAL et al., 2009).

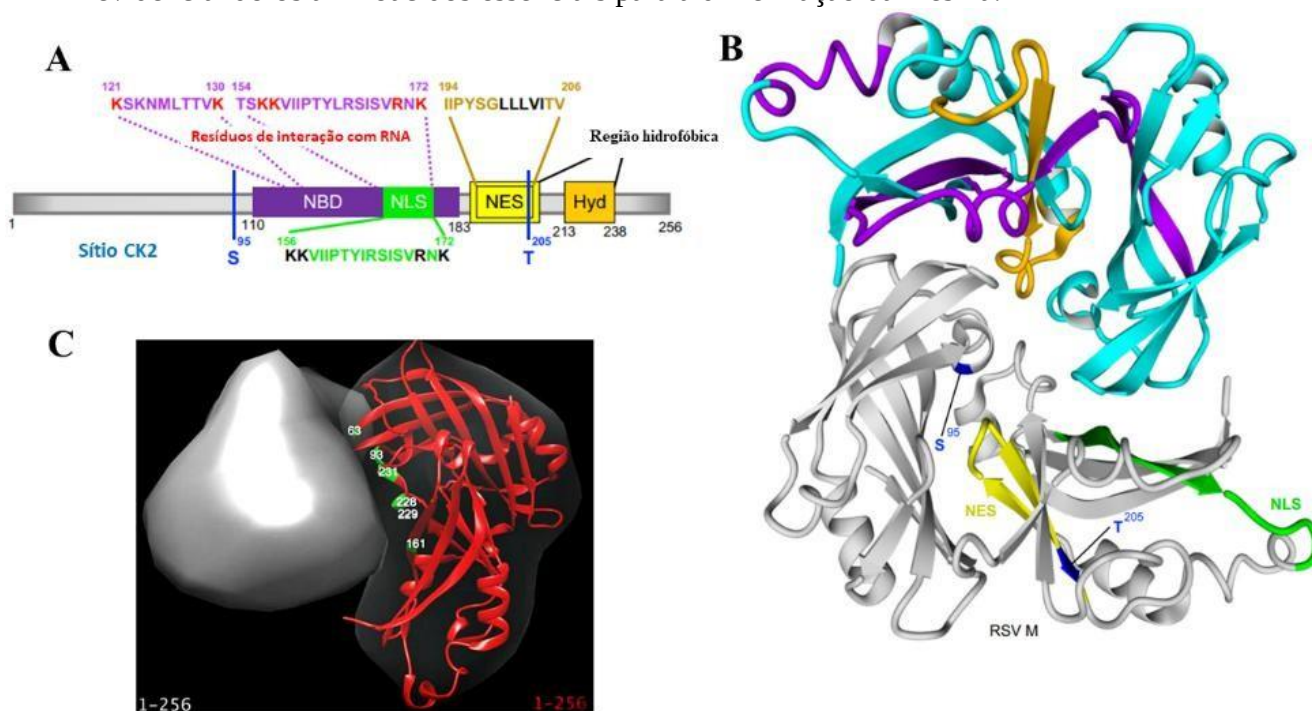
A porção hidrofóbica C-terminal da proteína apresenta curtas regiões (110-183 resíduos) para atuarem como domínios intrínsecos, mas permitem ligação a membrana plasmática dos pneumócitos da célula hospedeira cuja carga residual é negativa, (COLLINS, et al., 2013) promovendo assim a interação da porção do envelope da bicamada lipídica com o nucleocapsídeo.

A Figura 5a representa a estruturação dos resíduos de aminoácidos do domínio da proteína M, destacando o sinal de localização nuclear (NLS) dentro do domínio central de ligação aos ácidos nucleicos, que também inclui dois grupos de resíduos críticos para a ligação do RNA (resíduos 121-130 e 154-172) (RODRIGUEZ et al., 2004), bem como o sinal de -exportação nuclear (NES) em direção ao terminal COOH. Esses sinais de direcionamento nuclear conferem reconhecimento pela maquinaria de transporte da célula hospedeira, permitindo que M transite entre o núcleo e o citoplasma (SHAHRARI et al., 2016; GHILDYAL et al., 2003; GHILDYAL et al., 2009) de vários locais de fosforilação conhecidos, Ser95 e Thr205 (dentro do NES) capazes de ser fosforiladas pela proteína quinase CK2 (CK2) e regular o tráfego nucleocitoplasmático da proteína M, bem como a oligomerização da proteína mediada pela fosforilação dos resíduos de Ser95 e Thr205 (GHILDYAL et al., 2022).

Duas estruturas cristalográficas depositadas no Protein Data Bank (PDB) por Foster et al. (2015), mostraram que a proteína M necessita do processo de dimerização para desempenhar sua atividade biológica (Figura 5b). Ambas as estruturas indicam que o monômero da proteína compreende dois domínios compactos e ricos em folhas beta (~14 kDa cada) separados por uma região curta e não estruturada, com uma área de ~600 Å² de carga superficial positiva abrangendo ambos os domínios, provavelmente conferindo interação com superfícies de membrana carregadas negativamente ou regiões de alta hidrofobicidade (FOSTER et al., 2015).

A interface dos dímeros é compreendida pelos resíduos 63 a 68, 92 a 105, 129 a 134, 144, 163, 225 a 235 e foi demonstrado que todos os resíduos são necessários para a formação de um dímero estável (Figura 5c) (FOSTER et al., 2015; TREVISAN et al., 2018). Ainda, os sinais de direcionamento nuclear, bem como locais de fosforilação que podem regular sua atividade e oligomerização, são acessíveis na superfície do dímero.

Figura 5. Apresentação esquemática da proteína M. (A) representação dos domínios funcionais da proteína. Foi utilizado o código de aminoácidos de uma única letra, onde os números se referem à posição do resíduo de aminoácido na proteína. As localizações do sinal de exportação nuclear (NES; resíduos hidrofóbicos em preto), a sequência de localização nuclear (NLS; resíduos básicos em preto), o domínio de ligação ao ácido nucleico (NBD; roxo) e as regiões hidrofóbicas (Hyd; em caixas amarelas) são indicadas. Os principais resíduos importantes para a ligação do RNA (240, 570) no ácido nucleico estão destacados em vermelho. Os locais de fosforilação da proteína quinase CK2 (S95, T205) que regulam o tráfego nucleocitoplasmático estão destacados (linhas verticais azuis). (B) Dímero RSV M mostrando os domínios estruturais e resíduos-chave usando o mesmo esquema de cores que em A. A região hidrofóbica e NBD são apresentados no monômero ciano; os resíduos de fosforilação NLS, NES e CK2 são destacados no monômero cinza. (C) Modelo dimérico da estrutura da proteína M evidenciando os aminoácidos essenciais para a dimerização da mesma.



Fonte: Adaptado Hu et al., (2020); Trevisan et al., (2018); Foster et al., (2015).

A dimerização da proteína é baseada nas ligações de hidrogênio através de resíduos polares/carregados e interações hidrofóbicas. O processo de dimerização, é a chave para o oligomerização e desempenho da atividade biológica, necessária para produção de novas partículas virais, bem como associação de filamentos virais (GHILDYAL et al., 2002). Esses filamentos virais são essenciais para a montagem do vírion e são mediados pela interação da M com o esqueleto de actina da célula hospedeira, formando assim a curvatura ideal da membrana para o processo efetivo de brotamento (GHILDYAL et al., 2009).

Na ausência da proteína M as partículas permanecem atrofiadas e imaturas, isso porque a mesma desempenha um papel fundamental na montagem e brotamento dos vírions maduros (COLLINS et al., 2013).

No início da infecção viral, a proteína M é direcionada ao núcleo da célula hospedeira por meio de proteínas de transporte nuclear, como a α -importina. Neste local, ela desempenha um papel regulatório na parada do ciclo celular da célula hospedeira (KIPPER et al., 2015). Estudos indicam estreita relação entre a proteína M e a expressão do gene p53, o qual codifica um fator supressor de tumores que desencadeia a pausa no ciclo celular quando expresso em grande quantidade. Portanto, a proteína M causa a interrupção da transcrição da célula hospedada pelo vírus enquanto este replica (IMANI et al., 2012). Em seguida, através de proteínas de transporte nuclear diferentes, como a CRM-1, a proteína de M viral migra do núcleo para o citoplasma, interage com M2-1, estas, então, adentram corpos de inclusão, onde se encontra o complexo RNP. Nesta etapa, ocorre a passagem da fase de transcrição viral para o empacotamento, terminando a transcrição e iniciando a coordenação da etapa de brotamento viral (IMANI et al., 2012)

Ainda no início da montagem do hRSV, a proteína M localiza-se em corpúsculos de inclusão citoplasmáticos (GHILDYAL et al., 2003) desencadeando assim a formação de filamentos virais ao interagir com a proteína de fusão (F) (BAVISKAR et al., 2013). A interação da proteína M com os corpos de inclusão, formados essencialmente pelo genoma viral e as proteínas N, P, L e M2-1, e mediada pela interação da sua extremidade N-terminal com a proteína M2-1 (LI et al., 2008). Outros pesquisadores também verificaram que a proteína M de hRSV, encontra-se no lado citoplasmático da membrana plasmática em associação a balsa lipídica assim como a proteína N. Assim, estas estruturas poderiam ser os locais de montagem e brotamento da partícula viral (FOSTER et al., 2015).

Na etapa final do brotamento, a proteína M é crucial para a maturação e alongamento do filamento viral (MITRA et al., 2012) sendo a dimerização e oligomerização adequadas da proteína M, críticas para a brotamento e liberação do vírion (FOSTER et al., 2015). Desta forma, a proteína de matriz (M) tem importância no processo de infecção viral, interagindo com proteínas virais e direcionando o conteúdo do vírion para o brotamento de uma nova partícula capaz de infectar células adjacentes.

1.6 COMPOSTOS NATURAIS COMO CANDIDATOS ANTIVIRAIS À PROTEÍNA DE M E BROTAMENTO VIRAL

Os compostos naturais têm sido uma importante fonte de medicamentos há milhares de anos. Desde a antiguidade, as plantas têm sido utilizadas como fontes de medicamentos e muitos compostos naturais foram isolados de plantas, animais e microrganismos para uso na medicina moderna. Na verdade, mais da metade dos medicamentos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) nos últimos 30 anos são derivados de compostos naturais ou inspirados neles. Além disso, muitos compostos naturais têm um espectro de atividade mais amplo, o que significa que podem ter múltiplos efeitos terapêuticos em vez de apenas um. (NEWMAN et al., 2010). Existem descritos na literatura diversas classes de moléculas com função antiviral. Especificamente, contra vírus respiratórios e com potencial terapêutico, encontramos flavonóides como Kaempferol, Quercetina (ZHANG et al., 2017; QIN et al., 2022; LOPES et al., 2020; LI et al., 2021), Chalconas (ELKHALIFA et al., 2021) e Cumarinas e seus derivados (MISRHA et al., 2020; DIKDIK et al., 2023).

A família dos flavonóides é um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis, naturalmente presentes nas plantas. Kaempferol e Quercetina são flavonóides naturais que existem amplamente em muitas frutas, vegetais e fitoterápicos (ZHANG et al., 2017; QIN et al., 2022; LOPES et al., 2020; LI et al., 2021).

O Kaempferol pode ser encontrado em frutas como maçãs, morangos, uvas, ameixas e cerejas, bem como em vegetais como brócolis, couve-flor e espinafre. Este flavonoide demonstrou atividade antiviral contra vírus como Epstein-Barr (EBV), enterovírus 71 (EV71), vírus da gripe (influenza), HIV e vírus da encefalite japonesa, atuando na inibição da replicação viral, modulação de vias de sinalização celular e redução da produção de espécies reativas de oxigênio (KIM et al., 2021; DONG et al., 2023).

A Quercetina, por sua vez, está presente em frutas como maçãs (principalmente com casca), amoras, mirtilos, framboesas, uvas, pêsegos, ameixas e figos, além de vegetais como cebola roxa, brócolis, couve e alface. Essa substância também possui ampla atividade antiviral, sendo eficaz contra vírus como influenza, herpes simples (HSV-1), HIV e enterovírus. Sua ação se dá pela inibição da replicação viral e modulação da resposta imune e inflamatória (PÉREZ-VIZCAÍNO; DUARTE, 2020).

As chalconas são consideradas os principais precursores da biossíntese de flavonóides e isoflavonóides nas plantas. Eles são encontrados em várias espécies de plantas, incluindo frutas e vegetais. Especificamente, chalconas são encontradas em alimentos como maçãs, peras, uvas, morangos e vegetais crucíferos como brócolis e couve. Estudos apontam sua atividade

antiviral contra diversos vírus, como HIV, vírus da gripe e coronavírus, com mecanismos de ação que incluem a inibição da entrada viral nas células, da replicação e da síntese de proteínas virais, além de efeitos imunomoduladores (ELKHALIFA et al., 2021; ABDULLAH et al., 2023).

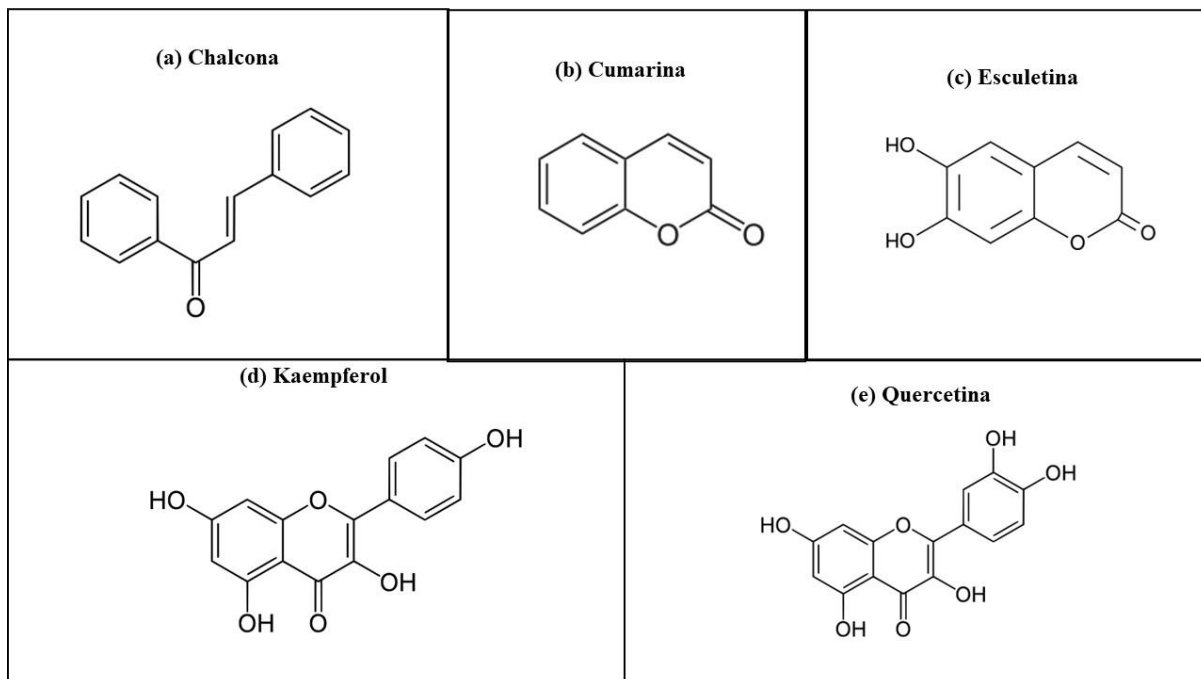
Uma revisão mostrou as atividades antivirais das chalconas e seus derivados em um conjunto de infecções virais humanas e seu potencial para a doença COVID-19 (ELKHALIFA et al., 2021).

Finalmente, a cumarina é um composto natural que é um potencial candidato a medicamento devido às suas propriedades de estabilidade, solubilidade e baixa toxicidade. A cumarina e seus derivados podem ser encontrados em frutas como maçãs, peras e morangos, vegetais como cenouras e pepinos, além de especiarias como a canela e ervas como tomilho e orégano.

Existem inúmeras evidências que demonstram seu papel inibitório contra a infecção de diversos vírus como HIV, Influenza, Enterovírus, Coxsackievirus e ainda, estudos apontam a Esculetina, um derivado da cumarina, como promissora para inibição do MERS (MISRHA et al., 2020; HUANG et al., 2021). Essa atividade antiviral se manifesta por meio da inibição da replicação viral, expressão de proteínas virais, além de efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (WU et al., 2022).

Em nosso grupo, diversas moléculas de origem natural vêm sendo amplamente estudadas quanto a capacidade de interação com proteínas do ciclo infeccioso do VSR (LOURENÇO et al., 2022; PIVA et al., 2020; CARUSO et al., 2020; SÁ et al., 2020; TANIMOTO et al., 2019;), assim como estudos in vitro em cultura celular que mostram o efeito promissor de alguns compostos. Na figura 6 é possível observar a estrutura química dos compostos utilizados no presente estudo e algumas modificações estruturais em comparação com a estrutura básica de um flavonoide como nos compostos 6d e 6e.

Figura 6. Estrutura química dos compostos naturais usados. (a) Chalcona, classificada como cetona β -insaturada. (b) Cumarina (Ester cumarínico). (c) Esculetina, derivado cumarínico com adição do grupo fenólico. (d) Kaempferol, flavonoide com modificações em ambos os anéis (grupamento OH), sendo a adição de 2 grupos OH no anel A e 1 grupamento no anel B. Anel pirano da molécula com a presença de uma cetona e grupamento enol. (e) Quercetina, flavonoide semelhante ao Kaempferol mas com a presença de 2 grupos fenólicos em ambos os anéis.



Fonte: PubChem adaptado.

A medicina translacional cada vez mais vem se pautando em diferentes áreas do conhecimento para o refinamento das informações coletas e processadas para desenvolvimento de novas tecnologias e novos produtos. Assim, o presente trabalho, visando integrar os conhecimentos dos discentes e docentes presentes no grupo, se fundamentou em metodologias computacionais para predição de alvos (modelo de predição comumente utilizados na indústria farmacêutica) realizadas pelo Dr. Raphael Vinicius Rodrigues Dias, abordagens experimentais baseadas em modelos biofísicos para predição de um alvo farmacológico e composto através da análise dos parâmetros de interação.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A caracterização de interações proteínas-ligantes se faz importante no entendimento do mecanismo de atividade das proteínas, possuindo um valioso papel na criação e desenvolvimento de novos fármacos. Estes resultados ajudam a compreender, em uma resolução molecular, o microambiente onde ocorre a interação bem como esta interação afeta estruturalmente a proteína (GUIMARAES et al., 2012).

Como descrito, a proteína M apresenta um importante papel no ciclo replicativo do VSR através das interações com outras proteínas virais e do hospedeiro, além do direcionamento do conteúdo da partícula viral para o brotamento (KIPPER et al., 2015). Para isso, é necessário que a proteína M assuma o estado dimérico para interagir com receptores celulares localizados na membrana dos pneumócitos (FOSTER et al., 2015) e sendo a dimerização e oligomerização críticas para a brotação e liberação viral (MITRA et al., 2012).

A proteína M do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) foi expressa de forma recombinante e purificada por cromatografias de afinidade e exclusão molecular, garantindo qualidade estrutural para as análises subsequentes. A investigação da interação da proteína M com compostos naturais (Chalcona, Cumarina, Kaempferol e Quercetina) foi conduzida por meio de abordagens espectroscópicas (Dicroísmo Circular – CD, Fluorescência Intrínseca e STD-RMN) e simulações computacionais (Docking Molecular e Dinâmica Molecular), fornecendo uma compreensão integrada e aprofundada das interações moleculares envolvidas.

As análises de fluorescência revelaram uma perturbação nos microambientes da proteína, especialmente em torno de resíduos de triptofano, como evidenciado pela supressão da emissão de fluorescência e alteração do deslocamento espectral. Esse efeito indicou uma mudança no entorno químico desses resíduos, possivelmente associada ao contato direto com os ligantes. O estudo termodinâmico por espectroscopia de fluorescência, interpretado por meio dos gráficos de Stern-Volmer e van't Hoff, demonstrou que a interação é entropicamente e entalpicamente favorecida, refletindo a predominância de interações hidrofóbicas e van der Waals na estabilização do complexo proteína-ligante.

Apesar dessas perturbações locais, os espectros de dicroísmo circular no UV distante (CD-UV far) mostraram que a estrutura secundária da proteína M — composta por proporções de hélice α , folhas β e regiões desordenadas — foi amplamente preservada após a adição dos compostos, indicando que não houve desnaturação ou desenovelamento significativo da proteína, mesmo após a interação com os ligantes.

Para elucidar o sítio de ligação provável dos compostos e validar os dados espectroscópicos, foram empregadas ferramentas computacionais de Docking Molecular seguidas por simulações

de Dinâmica Molecular em triplicata. Os resultados computacionais apontaram de forma convergente que o sítio de ligação preferencial para todos os compostos encontra-se na interface dimérica da proteína M, uma região crítica para sua função biológica. A estabilidade do complexo foi confirmada pela análise dos parâmetros de RMSD, número de contatos hidrofóbicos, raio de giro e pontes de hidrogênio ao longo de 100 ns de simulação, demonstrando que a interação permanece energeticamente favorável e estruturalmente consistente com os dados experimentais.

Assim, a combinação de dados biofísicos e computacionais indicou que os compostos atuam sem comprometer a integridade estrutural da proteína M, mas afetam regiões funcionais específicas, como o entorno do triptofano e a interface de dimerização. Esses resultados reforçam o potencial dessas moléculas como inibidores da função da proteína M no ciclo viral, abrindo caminho para estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* futuros.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Anvisa aprova registro de primeira vacina para bronquiolite. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-registro-de-primeira-vacina-para-bronquiolite>. Acesso em: 20 maio 2024.

Arexvy: bula de medicamento. 2023. Disponível em: <https://br.gsk.com/media/8155/arexvy.pdf>. Acesso em: 20 maio 2024.

BAVISKAR, P. S. et al. The respiratory syncytial virus fusion protein targets to the perimeter of inclusion bodies and facilitates filament formation by a cytoplasmic tail-dependent mechanism. *Journal of Virology*, v. 87, p. 10730–10741, 2013. DOI: 10.1128/JVI.03086-12.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, v. 11, p. 127–152, 2005. DOI: 10.1016/s1387-2656(05)11004-7.

BRUNWASSER, S. M. et al. Assessing the strength of evidence for a causal effect of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections on subsequent wheezing illness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respiratory Medicine*, v. 8, p. 795–806, 2020.

CAO, F.; GUO, J.; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 31, p. 747-756, 2005.

CARUSO, I. P. et al. Biophysical and dynamic characterization of fine-tuned binding of the human respiratory syncytial virus M2-1 core domain to long RNAs. *Journal of Virology*, v. 94, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01505-20>.

CERVANTES-ORTIZ, S. L.; ZAMORANO CUERVO, N.; GRANDVAUX, N. Respiratory syncytial virus and cellular stress responses: impact on replication and physiopathology. *Viruses*, v. 8, e124, 2016. DOI:10.3390/v8050124

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. *American Journal of Hygiene*, v. 66, p. 281–290, 1957.

COLLINS, P. L.; KARRON, R. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (ed.). *Fields Virology*. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

COLLINS, P. L.; CROWE, J. E. J. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In: KNIPE, D. M. et al. (ed.). *Fields Virology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1601–1646.

KURNIA, D. et al. In silico study of antiviral activity of polyphenol compounds from *Ocimum basilicum* by molecular docking, ADMET, and drug-likeness analysis. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, p. 37–47, 2023. DOI: 10.2147/AABC.S403175.

ELKHALIFA, D. et al. A comprehensive review on the antiviral activities of chalcones. *Journal of Drug Targeting*, v. 29, p. 403–419, 2021. DOI: 10.1080/1061186X.2020.1853759.

ESNEAU, C. et al. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus N0-P complex in solution. *Journal of Biological Chemistry*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118>.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *FDA approves new drug to prevent RSV in babies and toddlers*. 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-drug-prevent-rsv-babies-and-toddlers>. Acesso em: 20 maio 2024.

FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI, A. J. Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de ^1H utilizando detecção do ligante. *Química Nova*, v. 30, n. 7, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000700019>.

FLEMING-DUTRA, K. E. et al. Use of the Pfizer respiratory syncytial virus vaccine during pregnancy for the prevention of respiratory syncytial virus–associated lower respiratory tract disease in infants: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices — United States, 2023. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 72, n. 41, 2023.

FLORIO, R. et al. Resveratrol derivative exhibits marked antiproliferative actions, affecting stemness in pancreatic cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 3, 2023.

FÖRSTER, A. et al. Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, v. 89, n. 8, p. 4624–4635, 2015. DOI: 10.1128/JVI.03500-14.

GARCIA-ZAPATA, M. T. A.; SOUZA-JUNIOR, E. S. Aspectos fisiopatológicos da febre nas doenças infecto-parasitárias. *Universitas: Ciências da Saúde*, v. 4, n. 1/2, p. 111–117, 2006.

GHILDYAL, R. et al. The respiratory syncytial virus matrix protein possesses a Crm1-mediated nuclear export mechanism. *Journal of Virology*, v. 83, p. 5353–5362, 2009. DOI: 10.1128/JVI.02374-08.

GHILDYAL, R. et al. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *Journal of General Virology*, v. 83, p. 753–757, 2002. DOI:10.1099/0022-1317-83-4-753.

GHILDYAL, R. et al. Nuclear import of the respiratory syncytial virus matrix protein is mediated by importin $\beta 1$ independent of importin α . *Biochemistry*, v. 44, n. 38, p. 12887–12895, 2005. DOI: 10.1021/bi050701e.

GHILDYAL, R. et al. Nuclear transport of respiratory syncytial virus matrix protein is regulated by dual phosphorylation sites. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, p. 7976, 2022. DOI: 10.3390/ijms23147976.

GHASEMI, M. et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, 2021. DOI: 10.3390/ijms222312827.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature Protocols*, v. 1, n. 6, 2006.

GOMEZ, R. S. et al. Respiratory syncytial virus: pathology, therapeutic drugs and prophylaxis. *Immunology Letters*, v. 162, n. 1 Pt A, p. 237–247, 2014.

GREEN, D. In Silico Drug Discovery and Design. In: CAVASOTTO, C. N. (ed.). *ChemMedChem*, v. 11, n. 6, p. 638, 2016.

GRIFFITHS, C.; DREWS, S. J.; MARCHANT, D. J. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, n. 1, p. 277–319, 2017. DOI: 10.1128/CMR.00010-16.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*, v. 6, n. 1, p. 75–87, 2014.

GUIMARÃES, G. C. et al. Binding investigation between M2-1 protein from hRSV and acetylated quercetin derivatives: ¹H RMN, fluorescence spectroscopy, and molecular docking. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 33–38, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.141

Nirsevimab for prevention of RSV in healthy late-preterm and term infants. New England Journal of Medicine, v. 386, n. 9, p. 837–846, 2022. DOI: 10.1056/NEJMoa2110275.

HIJANO, D. R. et al. Role of type I interferon (IFN) in the respiratory syncytial virus (RSV) immune response and disease severity. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 566, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00566.

HOGAN, C. A.; CAYA, C.; PAPENBURG, J. Rapid and simple molecular tests for the detection of respiratory syncytial virus: a review. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 18, n. 7, p. 617–629, 2018.

HUANG, A. X. et al. Plasma inflammatory cytokine IL-4, IL-8, IL-10, and TNF- α levels correlate with pulmonary function in patients with asthma-chronic obstructive pulmonary disease (COPD) overlap syndrome. *Medical Science Monitor*, v. 22, p. 2800, 2016. DOI: 10.12659/MSM.896458.

HUANG, S. X. et al. Anti-hepatitis B virus activity of esculetin from *Microsorium fortunei* in vitro and in vivo. *Molecules*, v. 24, n. 19, p. 3475, 2019. DOI: 10.3390/molecules24193475.

IMANI, F. et al. Respiratory syncytial virus matrix protein induces lung epithelial cell cycle arrest through a p53-dependent pathway. *PLoS ONE*, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0038072.

JESUS, M. B.; PINTO, L.; FRACETO, L. F. et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 1428, 2006.

JHA, A. et al. *SARS, MERS and other viral lung infections*. London: European Respiratory Society, 2016. p. 38.

KALER, J. et al. Respiratory syncytial virus: a comprehensive review of transmission, pathophysiology, and manifestation. *Cureus*, v. 15, n. 3, e36342, 2023. DOI: 10.7759/cureus.36342.

KIM, Y.; NARAYANAN, S.; CHANG, K. O. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral Research*, v. 88, p. 227–235, 2015.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 935–949, 2004.

KIPPER, S. et al. New host factors important for respiratory syncytial virus (RSV) replication revealed by a novel microfluidics screen for interactors of matrix (M) protein. *Journal of Virology*, p. 532–543, 2015.

KOMARAVELLI, N. et al. Role of dietary antioxidants in human metapneumovirus infection. *Virus Research*, v. 200, p. 19–23, 2015.

KUIKEN, T. et al. Emerging viral infections in a rapidly changing world. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, p. 641–646, 2003.

LA MONTAGNE, J. R. et al. Severe acute respiratory syndrome: developing a research response. *Journal of Infectious Diseases*, v. 189, p. 634–641, 2004.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Maryland: Springer, 2006. p. 365.

LAMARÃO, L. M. et al. Prevalence and clinical features of respiratory syncytial virus in children hospitalized for community-acquired pneumonia in northern Brazil. *BMC Infectious Diseases*, v. 12, p. 119, 2012. DOI: 10.1186/1471-2334-12-119.

LAW, L. W. et al. Electron microscope studies of a human carcinoma cell strain (H.Ep.2) derived from a primary culture. *Cancer Research*, v. 20, p. 1137–1150, 1960.

LAY, M. L. et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes and Infection*, v. 15, p. 230–242, 2019.

LEIMKUHLER, B.; MATTHEWS, C. *Molecular dynamics: with deterministic and stochastic numerical methods*. Cham: Springer International Publishing, 2015. 443 p.

LEPRE, C. A.; MOORE, J. M.; PENG, J. W. Theory and applications of RMN-based screening in pharmaceutical research. *Chemical Reviews*, v. 104, n. 8, p. 3641–3675, 2004.

LEAL, J. B. et al. Resveratrol: composição química e seus benefícios à saúde. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, v. 11, n. 67, p. 620–629, 2017. ISSN 1981-9919.

LI, Y. et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, v. 399, p. 2047–2064, 2022.

LI, D. et al. Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. *Journal of Virology*, v. 82, n. 17, p. 8863–8870, 2008. DOI: 10.1128/JVI.00343-08.

LI, L. et al. The antiviral activity of kaempferol against pseudorabies virus in mice. *BMC Veterinary Research*, v. 17, n. 1, p. 247, 2021. DOI: 10.1186/s12917-021-02953-3.

LIN, C. J. et al. *Polygonum cuspidatum* and its active components inhibit replication of the influenza virus through toll-like receptor 9-induced interferon beta expression. *PLoS ONE*, v. 10, e0117602, 2015.

LIU, T. et al. Resveratrol inhibits the TRIF-dependent pathway by upregulating sterile alpha and armadillo motif protein, contributing to anti-inflammatory effects after respiratory syncytial virus infection. *Journal of Virology*, v. 88, p. 4229–4236, 2014.

LOPES, B. R. P. et al. Quercetin pentaacetate inhibits in vitro human respiratory syncytial virus adhesion. *Virus Research*, v. 276, 197805, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197805>.

LOURENÇO, I. O. et al. Biophysical studies of the interaction of hRSV non-structural 1 protein with natural flavonoids and their acetylated derivatives by spectroscopic techniques and computational simulations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 283, 121751, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121751>.

MACKICHAN, J. J. Protein binding drug displacement interactions. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 16, p. 65–73, 2012. DOI: 10.2165/00003088-198916020-00001.

MENG, X. Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, v. 7, p. 146–157, 2011.

MESEV, E. V.; LEDESMA, R. A.; PLOSS, A. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nature Microbiology*, v. 4, p. 914–924, 2019.

MISRHA, S.; PANDEY, A.; MANVATI, S. Coumarin: an emerging antiviral agent. *Heliyon*, v. 6, n. 1, e03217, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03217>.

MITRA, R. et al. The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. *Journal of Virology*, v. 86, n. 8, p. 4432–4443, 2012.

MONEY, V. A. et al. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 11, p. 4441–4446, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MUNDAY, D. C. et al. Proteomic analysis of mitochondria in respiratory epithelial cells infected with human respiratory syncytial virus and functional implications for virus and cell biology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 67, p. 300–318, 2015. DOI: 10.1111/jphp.12349.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

OLCHANSKI, N. et al. Palivizumab prophylaxis for respiratory syncytial virus: examining the evidence around value. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 5, ofy031, 2018. DOI: 10.1093/ofid/ofy031.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). *Boletim SRAG 2023 - COVID-19*. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/brasil>. Acesso em: 19 mar. 2024.

PERSSON, B. D. et al. Respiratory syncytial virus can infect basal cells and alter human airway epithelial differentiation. *PLoS ONE*, v. 9, e102368, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0102368.

PIEDIMONTE, G. RSV infections: state of the art. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, v. 82, Suppl. 1, p. S13–S18, 2015. DOI: 10.3949/ccjm.82.s1.03.

PIVA, H. M. R. et al. Insights into interactions of flavanones with target human respiratory syncytial virus M2-1 protein from STD-RMN, fluorescence spectroscopy, and computational simulations. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 6, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21062241>.

RAY, M.; GAM, A.; BARNES, J. L. All about HEp-2 cells. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*, v. 24, p. 152–153, 2011. DOI: <10.1080/08998280.2011.11928730>.

RODRÍGUEZ, L. et al. Human respiratory syncytial virus matrix protein is an RNA-binding protein: binding properties, location and identity of the RNA contact residues. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 709–719, 2004. DOI: 10.1099/vir.0.19707-0.

ROY, K. (org.). *In silico drug design: repurposing techniques and methodologies*. London; San Diego, CA: Academic Press, 2019.

SÁ, J. M. et al. Hesperetin targets the hydrophobic pocket of the nucleoprotein/phosphoprotein binding site of human respiratory syncytial virus. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 00, p. 1–13, 2020.

SACK, U. et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1173, p. 166–173, 2009.

SCHMIDT, M. E.; VARGA, S. M. Modulation of the host immune response by respiratory syncytial virus proteins. *Journal of Microbiology*, v. 55, n. 3, p. 161–171, 2017.

SHAHRIARI, S.; GORDON, J.; GHILDYAL, R. Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding. *Virology Journal*, v. 13, p. 161, 2016.

SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, a016303, 2022.

SUN, Y.; LÓPEZ, C. B. The innate immune response to RSV: advances in our understanding of critical viral and host factors. *Vaccine*, v. 35, p. 481–488, 2017.

TANIMOTO, A. et al. 4-Methylesculetin, a natural coumarin with intestinal anti-inflammatory activity, elicits a glutathione antioxidant response by different mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108876>.

TERHOHEIKKINEN, N. et al. Transmission of respiratory syncytial virus infection within families. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 2, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofu118>.

THORNHILL, E. M.; VERHOEVEN, D. Respiratory syncytial virus's non-structural proteins: masters of interference. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 225, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00225.

TSENG, C. K. Overview of antiviral drug discovery and development. In: TORRENCE, P. F. (ed.). *Antiviral drug discovery for emerging diseases and bioterrorism threats*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. p. 31–82.

VAN ROYEN, T. et al. How RSV proteins join forces to overcome the host innate immune response. *Viruses*, v. 14, n. 2, p. 419, 2022. DOI: <10.3390/v14020419>.

WANG, L. *Molecular dynamics: studies of synthetic and biological macromolecules*. Norderstedt: BoD – Books on Demand, 2012. 448 p.

WANG, Y. S.; LIU, D. J.; WYSS, D. F. Competition STD RMN for the detection of high-affinity ligands and RMN-based screening. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 42, n. 6, p. 485–489, 2004.

XIE, Q. et al. Structure basis of neutralization by a novel site II/IV antibody against respiratory syncytial virus fusion protein. *PLoS ONE*, v. 14, n. 2, 2019.

YANG, P. et al. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2 are crucial pathogenic factors that modulate interferon signaling and Treg cell distribution in mice. *Virology*, v. 485, p. 223–232, 2015.

ZHANG, R. et al. Kaempferol ameliorates H9N2 swine influenza virus-induced acute lung injury by inactivation of TLR4/MyD88-mediated NF-κB and MAPK signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 89, p. 660–672, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.02.081.

ZHANG, W. (org.). *Computer-aided drug discovery*. New York: Springer, 2016. (Methods in Pharmacology and Toxicology).