



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

Thainá dos Santos Rodrigues

Estudo da interação da proteína de Matriz (M) do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) com Resveratrol: pesquisa de moléculas candidatas para o desenho de antivirais

São José do Rio Preto
2021

Thainá dos Santos Rodrigues

Estudo da interação da proteína de Matriz (M) do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) com Resveratrol: pesquisa de moléculas candidatas para o desenho de antivirais

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

Financiadoras: Processo CNPq 149659/2019-9

Orientador: Prof Dr Marcelo Andres Fossey

Coorientador(a): Prof^a Dr^a Fátima Pereira de Souza

Prof Dr Ícaro Putinhon Caruso

São José do Rio Preto

2021

R696e

Rodrigues, Thainá dos Santos

Estudo da interação da proteína de Matriz (M) do Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) com Resveratrol: pesquisa de moléculas candidatas para o desenho de antivirais / Thainá dos Santos Rodrigues. -- São José do Rio Preto, 2021

59 f.

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

Orientador: Marcelo Andres Fossey

Coorientadora: Fátima Pereira de Souza

1. Bifísica Molecular. 2. Virologia. 3. Agentes antivirais. 4. Vírus Sincicial Respiratório Humano. 5. Resveratrol. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Thainá dos Santos Rodrigues

Estudo da interação da proteína de Matriz (M) do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) com Resveratrol: pesquisa de moléculas candidatas para o desenho de antivirais

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

Financiadoras: Processo CNPq 149659/2019-9

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Luiz Gustavo Araujo Gardinassi
Universidade Federal de Goiás

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

São José do Rio Preto
18 de Março de 2021

Dedico este trabalho a minha família e amigos
que me deram apoio para perseguir todos os
meus sonhos dos quais esse é o primeiro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador e co-orientadora, Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey e Prof.^a Dr.^a Fátima Pereira de Souza, por todo apoio, suporte e atenção para meu aprendizado e amadurecimento profissional. Tenho a certeza de que todo conhecimento adquirido levarei comigo por toda minha carreira. Sem vocês, esse trabalho não teria sido possível e sou grata por tudo que aprendi diariamente na rotina laboratorial e no Mestrado.

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

Agradeço ao Dr. Ícaro Putinhon Caruso pelos conhecimentos, ajuda e profissionalismo que permitiram longas discussões e contribuições para o crescimento do trabalho.

Agradeço a Ms. Isabela Otenio de Lourenço por toda a amizade ao longo dos anos, compreensão e conhecimento que me auxiliaram a entender o universo físico, além de não medir esforços para me auxiliar dia e noite e até mesmo em pandemia para que esse projeto fosse concluído.

Agradeço a minha família e amigos por todos os esforços para não me deixar desistir no caminho nos momentos difíceis.

Agradeço as minhas amigas de laboratório Giovana Cavenaghi, Jéssica Maróstica, Artemiza Miranda e Maria Fernanda por todo companheirismo e grande ajuda durante essa jornada. Agradeço também a todos os outros alunos e alunas que tive o privilégio de conhecer e contribuir na rotina do laboratório.

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

Agradeço ao Cnpq (processo 149659/2019-9) pelo apoio no desenvolvimento de pesquisa, proporcionando infraestrutura. A PROPG pelo apoio na divulgação do trabalho em congressos e todo suporte.

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório Humano é a principal causa de internação por doenças respiratórias entre menores de 5 anos de idade, mais comumente durante a primeira infecção, sendo responsáveis por quadros de pneumonia ou bronquiolite. Atualmente, não há vacinas ou tratamento eficazes contra a doença. Dentre as proteínas codificadas por esse vírus, a proteína de Matriz faz parte da estrutura interna do *vírião* e é composta por 256 resíduos de aminoácidos e trata-se de uma proteína fosforilada e não glicosilada que envolve todo o complexo ribonucleoproteico (RNP, composto pelas proteínas L, N e P), localizando-se entre este complexo e a bicamada lipídica viral com função primordial no brotamento da partícula viral e disseminação do vírus. O Resveratrol (trans-3,40,5-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina encontrado naturalmente em muitas fontes alimentares comuns, incluindo uvas, amoras e amendoins e possui inúmeras vantagens e efeitos na saúde humana, incluindo a propriedade antiviral. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a interação da proteína de matriz (M) e o Resveratrol. Então, a proteína foi obtida de forma recombinante, purificada através de cromatografia de afinidade e exclusão molecular, verificada por eletroforese SDS-PAGE e a análise da estrutura secundária e de interação da proteína com o ligante foram realizadas respectivamente por dicróismo circular e espectroscopia de fluorescência. A proteína purificada com massa molecular (30 kDa). Os espectros de dicróismo circular (CD) mostraram que a proteína M é composta majoritariamente de estruturas em folha β , sendo 44% de estruturas beta, 23% de estruturas alfa hélice, e 33% de estruturas *random coil*. Os resultados de interação proteína/ligante mostraram uma interação do tipo hidrofóbica onde a K_b do complexo aumenta proporcionalmente com aumento da temperatura $5,2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ evidenciando uma interação média/alta sendo $n=1$, ou seja, 1 ligante para 1 proteína. O presente trabalho sugere a interação do Resveratrol com a proteína M, corroborando dados que indicam que esse antioxidante interfere na montagem viral e na formação de vírus maduros, etapa mediada pela proteína M. Pela escassez de novos fármacos com ação antiviral, o Resveratrol poderá ser uma alternativa para o tratamento de infecção pelo HRSV.

Palavras-chaves: Proteína de Matriz (M). HRSV. Resveratrol. Interação proteína-ligante. Espectroscopia de fluorescência.

ABSTRACT

Human Respiratory Syncytial Virus is the main cause of hospitalization for respiratory diseases among children under 5 years of age, most commonly during the first infection, being responsible for pneumonia or bronchiolitis. Currently, there are no effective vaccines or treatments against the disease. Among the proteins encoded by this virus, the Matrix protein is part of the internal structure of the *vírión* and is composed of 256 amino acid residues and is a phosphorylated and non-glycosylated protein that involves the entire ribonucleoprotein complex (RNP, composed of proteins L, N and P), located between this complex and the viral lipid bilayer with primary function in the sprouting of the viral particle and spread of the virus. Resveratrol (trans-3,40,5-trihydroxystylbene) is a phytoalexin found naturally in many common food sources, including grapes, blackberries and peanuts and has numerous benefits and effects on human health, including antiviral property. The objective of this work was to characterize the interaction of matrix protein (M) and Resveratrol. Then, the protein was obtained recombinantly, purified through affinity chromatography and molecular exclusion, verified by SDS-PAGE electrophoresis and the analysis of the secondary structure and interaction of the protein in the ligand were performed respectively by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. The purified protein with molecular weight (30 kDa). The circular dichroism (CD) spectra showed that the M protein is mainly composed of β -leaf structures, with 44% beta structures, 23% alpha helix structures, and 33% random coil structures. The results of protein/ligand interaction showed a hydrophobic type interaction where the K_b of the complex increases proportionally with an increase in temperature of $5,2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$, showing a medium/high interaction being $n = 1$, that is, 1 ligand for 1 protein. The present work suggests the interaction of Resveratrol with protein M, corroborating data that indicate that this antioxidant interferes with viral assembly and the formation of mature viruses, a step mediated by protein M. Due to the scarcity of new drugs with antiviral action, Resveratrol may be an alternative for the treatment of HRSV infection.

Keywords: Matrix Protein (M). HRSV. Resveratrol. Protein-ligand interaction. Fluorescence spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Distribuição dos vírus respiratórios identificados nas unidades sentinelas de Síndrome Gripal, por semana epidemiológica (SE) de inícios dos sintomas, SEs 1 a 32, Brasil, 2017 e por semana epidemiológica (SE) de inícios dos sintomas, SEs 1 a 32, Brasil, 2019..... 17
- Figura 2-** Ciclo replicativo do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) evidenciando as etapas de adsorção, replicação e brotamento do *vírião* maduro..... 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..... 21
- Figura 4-** Representação da forma monomérica da proteína de matriz do Vírus Sincicial Respiratório Humano depositado no PDBid: 4V23, colorida de acordo com sua estrutura secundária. Esta proteína possui 47 resíduos formando α -hélices (laranja), 91 resíduos formando folhas- β (lilás) e 118 resíduos na forma de *random coil* (cinza)..... 23
- Figura 5-** Representação da estrutura química da molécula de *trans*-resveratrol evidenciando sua estrutura química..... 27
- Figura 6-** Espectros de referência de estruturas secundárias de proteínas. As linhas vermelhas, azul e verde representam espectros compostos majoritariamente de estruturas alfa hélice, estrutura beta e *random coil*, respectivamente..... 29
- Figura 7-** Gel SDS-PAGE 15% com a visualização dos gradientes de concentração de Imidazol, sendo: Flow, 5mM de Imidazol com a presença de muitos contaminantes, 20 mM de Imidazol, 30 mM de Imidazol, 60 mM de Imidazol onde a proteína já começa a ser eluída, marcador de peso molecular, 100 mM de Imidazol, 200 mM, 500 mM de Imidazol de Imidazol e 1 M, respectivamente, onde a proteína M aparece com um maior grau de pureza..... 38
- Figura 8-** (A) Cromatograma correspondente ao processo de purificação por exclusão molecular. O pico representado próximo de 12 ml corresponde a eluição da proteína M. (B) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE evidenciando dentro do retângulo vermelho a eluição da proteína M em quatro eluições seguidas do marcador de massa molecular e outras três eluições da proteína M com massa molecular de ~30 kDa..... 39
- Figura 9-** Espectro de CD-UV *far* da proteína M (5,0 μ M, círculos pretos não preenchidos) a 25

°C (298 K) em solução tampão (150 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,0 mM BME). A linha vermelha representa o melhor resultado para a curva ajustada realizado pelo programa CONTINLL. A caixa a direita representa a porcentagem de cada estrutura secundária encontradas, sendo 23% de estruturas alfa hélice, 44% de estruturas beta e 33% de estruturas *randoim coil*..... 40

Figura 10 - Espectro de CD-UV *far* da proteína M [5,0 µM] (preto) em solução tampão (150 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,0 mM BME) com a adição de *trans*-resveratrol variando a concentração [20 µM] (Rosa) a [50 µM] (laranja) solubilizado em etanol 100%..... 42

Figura 11- Espectro de emissão de fluorescência da proteína M [5µM] na presença do *trans*-resveratrol a 288 K. Com a adição de Resveratrol (0 µM à 50 µM) houve o fenômeno de supressão da intensidade da fluorescência, sugerindo interação entre a proteína M e o Resveratrol..... 43

Figura 12- Espectro de emissão de fluorescência da proteína M [5µM] na presença do *trans*-resveratrol a 298 K. Com a adição *trans*-resveratrol (0 µM à 50 µM) houve o fenômeno de supressão da intensidade da fluorescência, sugerindo interação entre a proteína M e o *trans*-resveratrol..... 44

Figura 13- Espectro de emissão de fluorescência da proteína M [5µM] na presença do *trans*-resveratrol a 308 K. Com a adição de *trans*-resveratrol (0 µM à 50 µM) houve o fenômeno de supressão da intensidade da fluorescência, sugerindo interação entre a proteína M e o *trans*-resveratrol..... 45

Figura 14- Gráfico de Stern-Volmer: Supressão de Fluorescência da proteína M nas temperaturas de 288 K (azul), 298 K (vermelho) e 308 K (verde). Este gráfico indica uma supressão dinâmica, onde K_{SV} aumenta com a temperatura devido ao aumento no número de colisões do Resveratrol com os fluoróforos..... 46

Figura 15- Gráfico de Duplo-Log para a supressão de fluorescência da proteína M pelo *trans*-resveratrol nas três temperaturas. Com base neste gráfico é possível determinar o número de sítios de ligação (*n*) e a constante de associação K_b das interações..... 47

Figura 16- Gráfico de *van't Hoff*: Análise termodinâmica do complexo proteína M/*trans*-resveratrol nas temperaturas de 288, 298 e 308 K. O gráfico de van't Hoff relaciona a constante de associação com a temperatura. A partir dele é possível calcular os parâmetros termodinâmicos e com os valores de ΔG em cada temperatura e o valor de ΔH, obtem-se os valores de ΔS..... 49

Figura 17- Perfil termodinâmico do complexo proteína-M/*trans*-resveratrol 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 (TΔS)..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação do resultado experimental da análise das estruturas secundárias da proteína M com melhor resultado para a curva ajustada, realizado pelo programa CONTINLL e dados na literatura de Foster e colaboradores (2015) e Money e Colaboradores (2012).....	41
Tabela 2. Constante de Stern-Volmer (K_{SV}) nas três temperaturas (288, 298 e 308 K) obtidas através do ajuste linear da reta.....	46
Tabela 3. Constante de associação K_b e sítios de ligação (n): Valores referentes ao complexo proteína M/ <i>trans</i> -resveratrol nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K.....	48
Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos de ΔG em cada temperatura e o valor de ΔH para obtenção dos valores de ΔS	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

θ - elipticidade

ΔG^D - energia livre de Gibbs de desnaturação

ΔH_{vH} - 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.....	14
1.1 Infecção viral pelo Vírus Sincicial Respiratório Humano.....	14
1.2 Classificação viral e Ciclo de replicação viral.....	18
1.3 Proteína M e papel na infectividade e replicação viral.....	20
1.4 Tratamentos e terapias disponíveis.....	23
1.5 Resveratrol.....	25
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	28
2.1 Dicroísmo Circular.....	28
2.2 Espectroscopia e Supressão de Fluorescência.....	30
3 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS.....	34
4METODOLOGIA.....	35
4.1 Clonagem e expressão de proteínas.....	35
4.2 Espectroscopia de UV-Vis.....	36
4.3Dicroísmo circular.....	36
4.4Espectroscopia de Fluorescência.....	37
5RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1Expressão e purificação.....	38
5.2Dicroísmo Circular.....	39
5.3Espectroscopia de Fluorescência.....	43
6.CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	52
REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecção viral pelo Vírus Sincicial Respiratório Humano

O vírus sincicial respiratório humano (hRSV) foi descoberto na década de 1950 e desde então é apontado como o principal agente causador de infecções respiratórias agudas (IRA) por todo o mundo, especialmente em recém nascidos (PARROTT *et al.*, 1973; BLOUNT *et al.*, 1956).

O comportamento de alguns vírus como o *influenza* e o HRSV dependem de fatores sazonais. Por outro lado, a circulação de outros vírus, como o adenovírus, não tem relação significativa com fatores climáticos. Dentre os vírus respiratórios atualmente considera-se que o *influenza* e o *vírus sincicial respiratório* são os que mais impactam na saúde das populações tanto em necessidade de suporte ambulatorial e hospitalar como, na mortalidade (FREITAS *et al.*, 2014).

O hRSV é a principal causa de internação por doenças respiratórias entre menores de 5 anos de idade, mais comumente durante a primeira infecção, sendo responsáveis por quadros de pneumonia ou bronquiolite. As reinfecções são comuns ao longo da vida e geralmente se manifestam por quadros de síndrome gripal. Crianças de maior idade, adultos, principalmente em pacientes idosos, imuno-comprometidos ou com doença respiratória prévia podem também apresentar doença grave envolvendo o trato respiratório inferior. Entre os menores de 5 anos, os principais fatores associados à gravidade são: a prematuridade, as cardiopatias congênicas e a doença pulmonar crônica da prematuridade (Committee on Infectious Disease - AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2009; Sociedade Brasileira de Pediatria, 2011).

A taxa de internação no Sistema Único de Saúde por doenças do aparelho respiratório em menores de 5 anos foi 3.184,4 casos/100.000 habitantes por ano em média no Brasil, no período entre 2005 e 2012. Neste período, 38,9% do total de internações em menores de 5 anos (4.136.957) foram devido a doenças do aparelho respiratório, correspondendo a 7,2% dos óbitos nesta faixa etária (dados do Sistema de Informações de Mortalidade – SIM). A infecção pelo HRSV tem sido associada à exacerbação da asma, responsável por 16,8% das internações e 3,6% dos óbitos das doenças respiratórias (dados do Sistema de Informações de Mortalidade – SIM).

O Brasil é um dos 15 países com maior número de casos anuais de pneumonia clínica em menores de 5 anos (1,8 milhão), com incidência estimada de 0,11 episódio/criança-ano. Nesse grupo, 30 a 50% das consultas ambulatoriais, mais de 50% das hospitalizações e 10 a 15% dos óbitos são atribuídos às IRAs, sendo 80% destes por pneumonia. Os custos com as hospitalizações

cresceram, atingindo R\$ 189 milhões e 20,5% dos gastos com hospitalização em menores de 5 anos. (CARDOSO *et al.*, 2010). Atualmente o hRSV (Vírus sincicial Respiratório) também é descrito como importante patógeno em pacientes idosos e imunocomprometidos, com elevado índice de mortalidade em pacientes transplantados. (ISON *et al.*, 2002; COLLINS *et al.*, 2013).

Estudos realizados no Brasil confirmam a presença de hRSV em 23,1 a 42,2% das crianças internadas por infecção de vias aéreas inferiores (JUNIOR *et al.*, 2011; LAMARÃO *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2001). A participação do hRSV é ainda maior nos casos de bronquiolite, os quais 60 e 75% do total de casos internados são causados por este vírus (JUNIOR *et al.*, 2011).

A bronquiolite aguda ocasionada pelo hRSV (Vírus Sincicial Respiratório Humano) é o resultado da infecção e da inflamação da mucosa respiratória. Os sintomas clínicos de obstrução do sistema ventilatório inferior são consequências da oclusão parcial das vias aéreas distais. O exame histológico revela: necrose do epitélio respiratório, inflamação monocitária com edema dos tecidos peribrônquios e obstrução das vias aéreas distais com muco e fibrina.

A replicação viral induz a produção de mediadores inflamatórios pelas células epiteliais respiratória, contribuindo com a patogênese da doença. A descamação das células epiteliais respiratórias, o edema da superfície mucosa e o aumento da reatividade da musculatura lisa das vias aéreas ocasionam os sintomas respiratórios da bronquiolite aguda (CARVALHO *et al.*, 2007).

As infecções por hRSV durante a infância foram associadas a doenças crônicas e asma tardia. Isso se deve, principalmente, a imaturidade do sistema imunológico em combater a infecção. Durante o ciclo viral, acontece a produção de citocinas pró inflamatórias da família do interferon tipo II (IFN). O papel do IFN- γ na hiperresponsividade das vias aéreas foi amplamente estudado. Yang e colaboradores (2010) relataram anteriormente que IFN- γ contribuiu para o prolongamento da hiperresponsividade das vias aéreas (AHR) em um modelo de asma de camundongo BALB/c demonstrando desempenhar um papel importante na inflamação das vias aéreas associada à infecção por hRSV (ZANG *et al.*, 2011).

A imunidade adquirida após a primeira infecção pelo hRSV não é suficiente para prevenir uma infecção subsequente, e reinfecções pelo vírus podem ocorrer ao longo da vida. Estudos realizados em Houston no Texas demonstraram que 83% das crianças infectadas durante o primeiro ano de vida, foram re-infectadas no segundo ano e 46% foram re-infectadas no terceiro ano. (NASCIMENTO 2006).

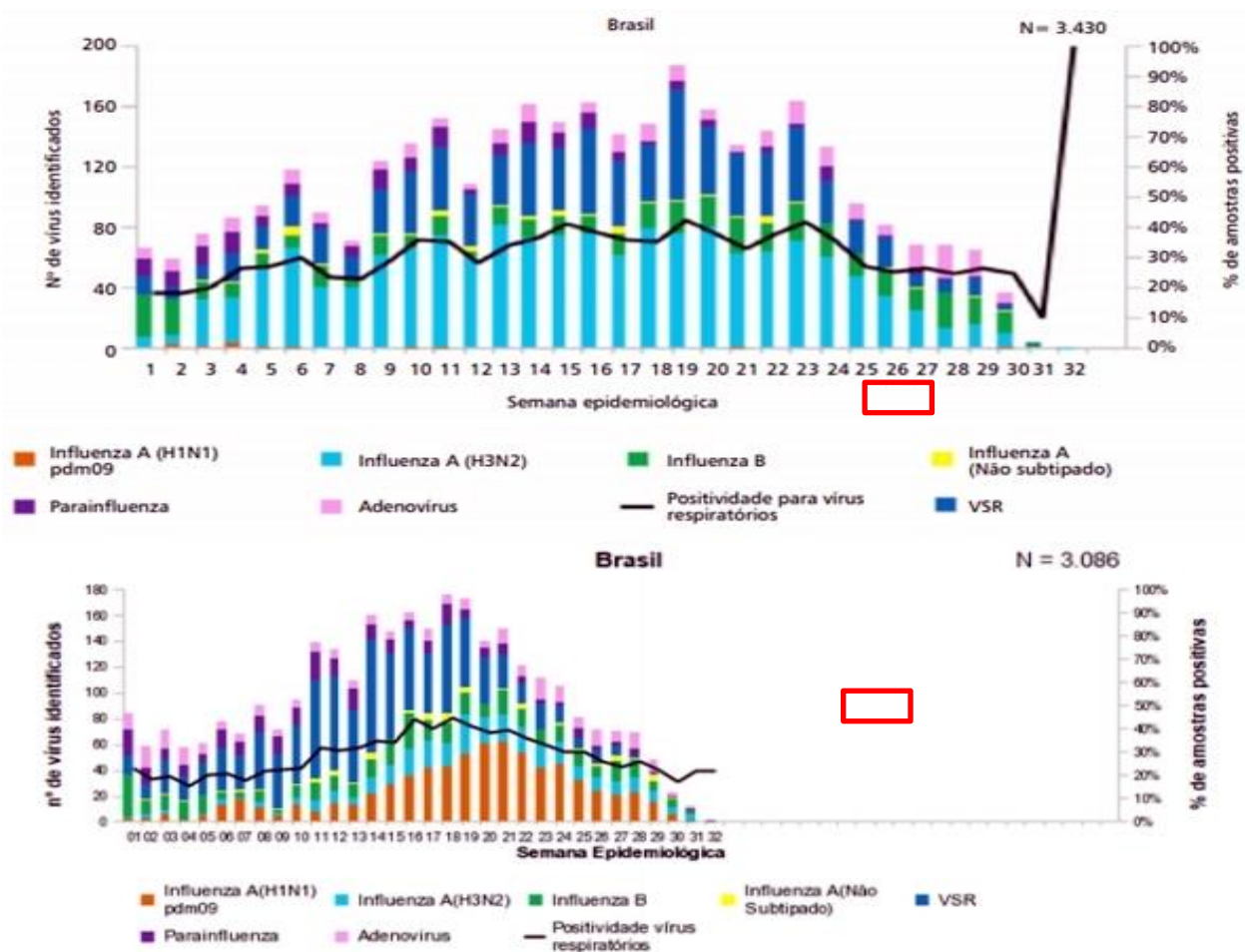
Existem fatores de risco bem definidos para complicações da infecção por hRSV: prematuridade, doença pulmonar crônica (DPC), doença cardíaca congênita (DCC), trissomia 21,

doenças neuromusculares, imunocomprometimento e lactentes, devido ao pequeno calibre das vias aéreas distais e pela ausência de imunidade ativa contra o hRSV e outros vírus respiratórios. Além disso, outras doenças são associadas a um aumento no risco para doença grave por hRSV, como anormalidades cromossômicas ou malformações das vias aéreas superiores. Entretanto, estudos recentes feitos nos Estados Unidos de ampla escala - um retrospectivo e de base hospitalar e outro prospectivo e de base populacional - mostraram que 73% a 79% das crianças com menos de dois anos de idade que precisam ser internadas por complicações da infecção pelo vírus, nunca apresentaram problemas de saúde anteriormente, e não apresentaram fatores de risco para doença grave (MEJIAS *et al.*, 2013).

Fatores como a umidade são importantes para a disseminação do vírus, principalmente em regiões tropicais. Mas, de maneira geral, os picos no número de casos ocorrem em meses de inverno, nos quais a temperatura é mais amena e as pessoas tendem a se aglomerar em suas casas, facilitando a transmissão intrafamiliar, onde o contágio geralmente ocorre dos indivíduos adultos para as crianças (YANG *et al.*, 2015; TERHOHEIKKINEN *et al.*, 2015). Apesar de existirem dois subtipos virais (RSVA e RSVB), não existe distinção geral clara entre a sazonalidade de ambos.

Segundo Freitas (2014), foi possível identificar através do banco de dados da vigilância sentinela de síndromes gripais (SIVEP-GRIPE), uma forte tendência de ciclos anuais de ocorrência do hRSV em todas as regiões do país. Uma comparação feita a partir do banco de dados mostra o perfil de distribuição dos vírus respiratórios identificados nos anos de 2017 e 2019, onde o hRSV se destaca como o segundo patógeno mais circulante, perdendo apenas para o vírus *Influenza* (Figura 1).

Figura 1. Distribuição dos vírus respiratórios identificados nas unidades sentinelas de Síndrome Gripal, por semana epidemiológica (SE) de inícios dos sintomas, SEs 1 a 32, Brasil, 2017 e por semana epidemiológica (SE) de inícios dos sintomas, SEs 1 a 32, Brasil, 2019.



Fonte: Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Gripe/Sivep-Gripe. Dados atualizados em 12/8/2019, sujeitos a alterações. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/20/Informe-Epidemiol--gico-Influenza-2017-SE-45.pdf>

A transmissão ocorre após contato ocular ou nasal com secreção contaminada, via aërosóis, e mais frequentemente por mãos e objetos contaminados quando aplicados diretamente em mucosas como olhos ou nariz, podendo permanecer viável por 6h em diferentes superfícies. (NASCIMENTO *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2007).

Os sintomas importantes causados pela infecção por hRSV nos pacientes são originados por dois componentes: o título viral e a exacerbação da resposta imunológica do hospedeiro, sendo geralmente brandos ou inexistentes em indivíduos adultos saudáveis e frequentes e

acentuados em indivíduos dos grupos de risco, requerendo hospitalização (DEVINCENZO *et al.*, 2010; UTOKAPARCH *et al.*, 2010).

1.2 Classificação viral e Ciclo de replicação viral

O hRSV 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; LOURENÇO *et al.*, 2009). O vírion do RSV 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 *large* polimerase (L), e a fosfoproteína (P) presentes no envelope viral.

Por não ser um vírus segmentado, o hRSV não possui a mesma capacidade de recombinação e rearranjos dos segmentos genômicos como o vírus *Influenza*, no qual ocorrem *shifts* antigénicos, responsáveis por pandemias ao longo dos anos. Contudo, como todos os vírus de RNAs, a capacidade de mutação do hRSV reside na dependência de uma RNA polimerase própria e que não possui capacidade de correção e edição de erros na incorporação de nucleotídeos no processo replicativo do genoma (ZUKUROV *et al.*, 2010). O hRSV replica-se nas células do trato respiratório humano. A infecção na célula hospedeira começa com a adsorção do hRSV pela ligação da proteína G às proteínas de superfície celular. Após a adsorção do viron a 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 dissociação 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).

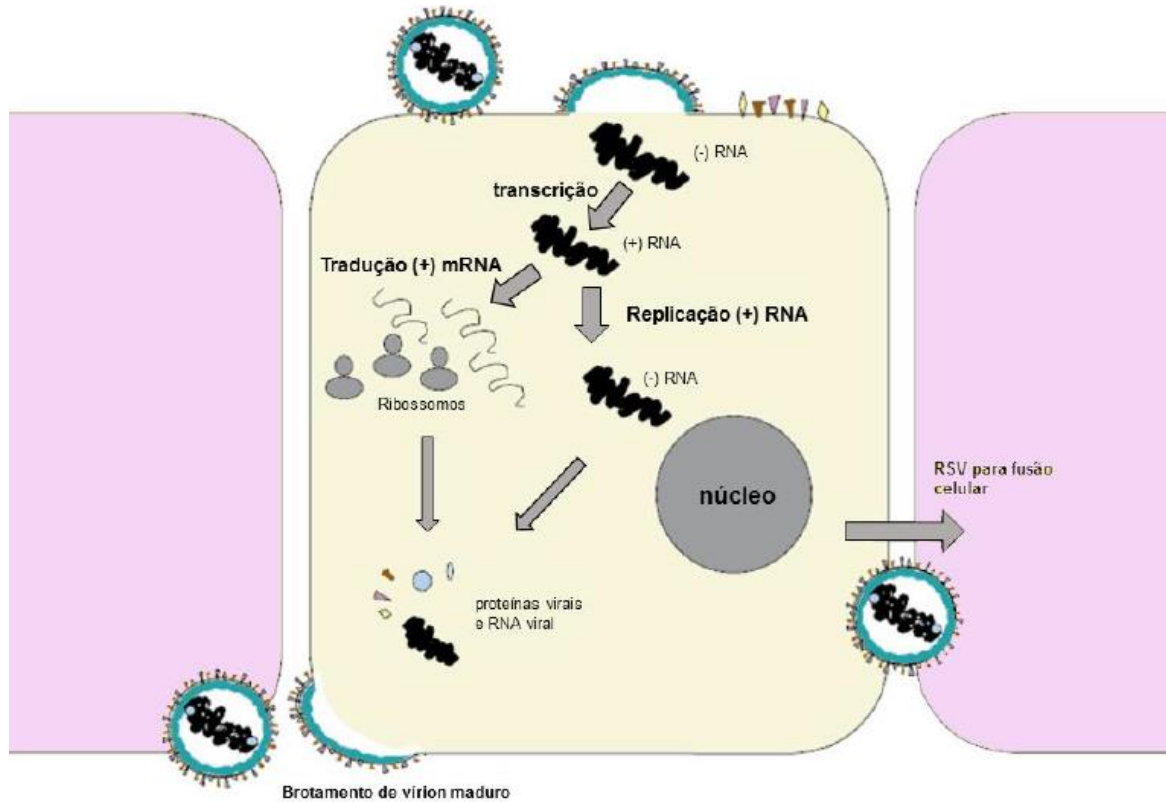
Após a síntese das proteínas e a replicação do material genético, a montagem e brotamento dos vírions maduros de hRSV ocorrem na membrana plasmática, onde contém bolsas lipídicas modificadas pelo vírus envolvendo todas as proteínas de superfície virais e a proteína de matriz (M). Dentro do vírion, a 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.*, 2013) (Figura 2).

O sistema imune tem papel fundamental para impedir a replicação viral. Ele responsável pela identificação material genético invasor e, assim, inicia cascatas de respostas imunológicas. Os receptores têm como função reconhecer qualquer RNA de cadeia dupla e são chamados de *Toll like* (TLRs), sendo o TLR3 e TLR4 os mais abundantes (COLLINS *et al.*, 2001; COLLINS *et al.*, 2013; LAY *et al.*, 2013).

Com a identificação do RNA viral, iniciam-se as cascatas de sinalização que ativam os fatores de transcrição nuclear *Factor-k β* (NF- κ B) e fatores reguladores de interferon 3 (IRF-3) que são translocados para o núcleo para promover a transcrição de genes pró-inflamatórios no pulmão. Os IFNs do tipo I são moduladores importantes na resposta imune adaptativa, especialmente por ativar a resposta de células Nk (*natural killer*) e de células T citotóxicas (LAY *et al.*, 2013). Uma vez que TLRs ativam caminhos que negligenciam uma infecção viral em desenvolvimento, o hRSV possui mecanismos moleculares que suprimem a imunidade inata sem afetar a resposta inflamatória do hospedeiro. (COLLINS *et al.*, 2013; LAY *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 hRSV (SCHMIDT & VARGA *et al.*, 2017).

Figura 2. Ciclo replicativo do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) evidenciando as etapas de adsorção, replicação e brotamento do vírion maduro.



Fonte: adaptado de HACKING *et al.* (2002).

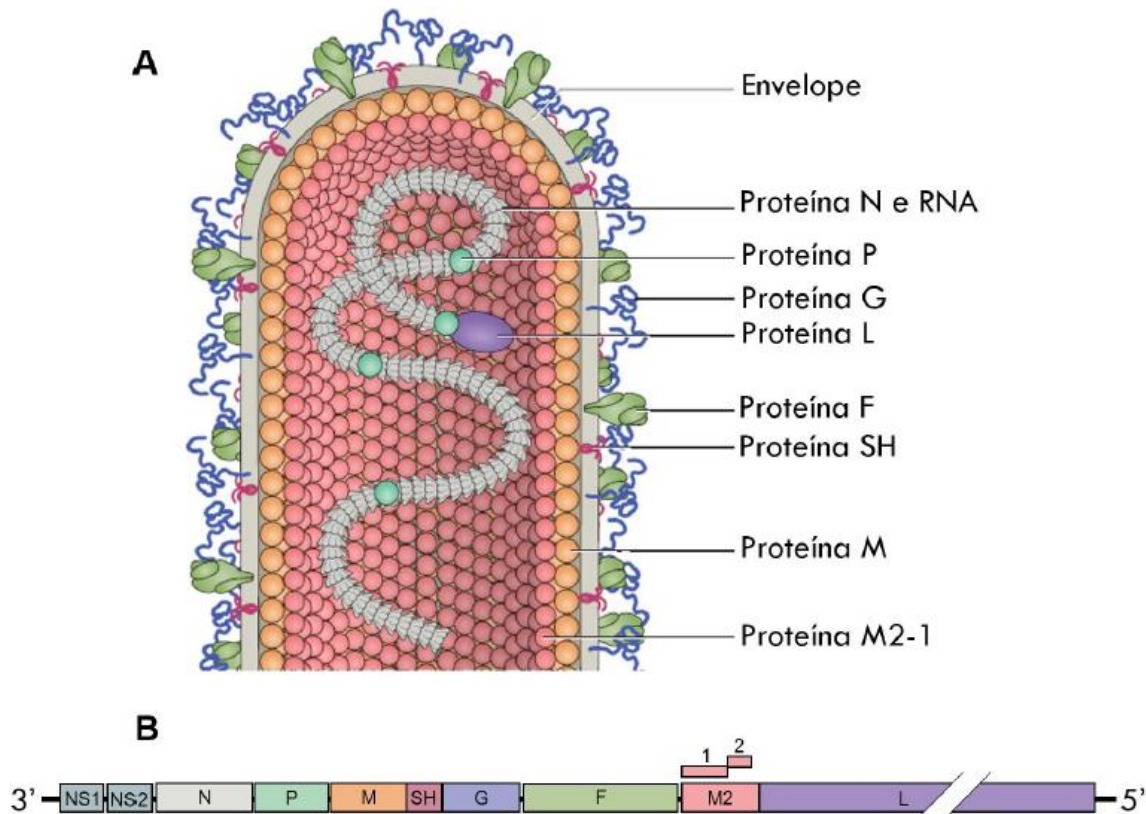
1.3 Proteína M e papel na infectividade e replicação viral

O genoma do hRSV codifica 10 mRNAs distintos e 11 proteínas: duas proteínas não estruturais denominadas NS1 e NS2; dentre as proteínas estruturais apresenta 3 proteínas transmembrânicas denominadas de G, SH e F; duas proteínas presentes na matriz do vírus conhecidas como M e M2 e por fim, três proteínas estão associadas ao RNA genômico para formar a partícula viral, sendo elas as proteínas L, P e N como descrito na Figura 3.

A proteína de Matriz faz parte da estrutura interna do *vírion* e é menor que outras proteínas de matriz da família *Paramyxoviridae*. É composta por 256 resíduos de aminoácidos, 29kDa (Figura 4) e trata-se de uma proteína fosforilada e não glicosilada que envolve todo o complexo ribonucleoproteico (RNP, composto pelas proteínas L, N e P) e localiza-se entre este complexo e a bicamada lipídica viral, possuindo função primordial na disseminação do vírus. Apresenta um domínio hidrofóbico em sua porção C-terminal que pode mediar interação com a membrana, (COLLINS, *et al.*, 2001) promovendo a interação do envelope da bicamada lipídica com o

nucleocapsídeo. Embora seja muito importante para formação de *vírions* maduros, a proteína M não é necessária para iniciar a formação de partículas virais. No entanto, na sua ausência, as partículas permanecem atrofiadas e imaturas, isso porque a proteína M desempenha um papel fundamental na montagem e brotamento dos *vírions* maduros (COLLINS *et al.*, 2013).

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.



Fonte: Adaptado BATTLE *et. al.* (2019)

O domínio N-terminal possui formato de ferradura enquanto o C-terminal apresenta a configuração de barril achatado, ambos contendo, majoritariamente, estruturas secundárias em folhas β (Figura 4). Para que a proteína M permaneça estável, é necessário a oligomerização e interações com outras proteínas já que entre os domínios ocorre uma baixa afinidade de ligação. A carga residual positiva sobre os domínios de M pode possibilitar a interação desta com a membrana

plasmática de pneumócitos, cuja carga residual é negativa, deixando algumas regiões hidrofóbicas expostas, as quais provavelmente serviriam para interagir com outras proteínas (MONEY *et al.*, 2009).

No início da infecção viral, a proteína M é direcionada ao núcleo da célula hospedeira por meio de proteínas de transporte nuclear, como a Importina-1. 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 seu material genético (IMANI *et al.*, 2012). Em seguida, através de proteínas de transporte nuclear diferentes, como a CRM-1, a proteína de matriz 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 a de empacotamento, terminando a transcrição e iniciando a coordenação da etapa de brotamento viral (IMANI *et al.*, 2012)

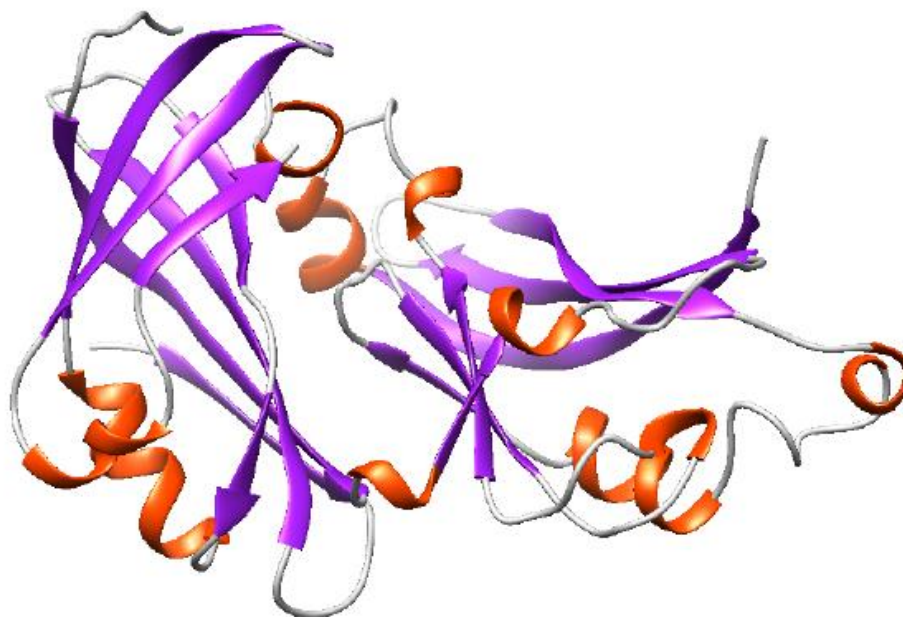
Ainda no início da montagem do hRSV, a proteína M localiza-se em corpúsculos de inclusão citoplasmáticos (GHILDYAL *et al.*, 2003) desencadeando assim a formação de filamentos virais ao interagir com a proteína de fusão (F) (BAVISKAR *et al.*, 2013). A interação da proteína M com os corpos de inclusão, 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 *lipid rafts*, assim como as proteínas G e N. Assim, estas estruturas poderiam ser os locais de montagem e brotamento da partícula viral (MARTY, *et al.*, 2004).

Na etapa final do brotamento, 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 brotação e liberação viral (FOSTER *et al.*, 2015).

Segundo Ghildyal e colaboradores (2003), a proteína M pode apresentar atividade inibitória da transcrição, visto que, verificando um extrato de ribonucleoproteínas virais de células infectadas por hRSV, observou-se a capacidade de transcrição (*in vitro*) na presença de anticorpos monoclonais (GHILDYAL, *et al.*, 2003). Sua presença no núcleo durante o início da infecção sugere que essa proteína poderia não só inibir a transcrição viral antes da formação do capsídeo, mas também inibir

a expressão de genes celulares, possivelmente facilitando a replicação viral (GHILDYAL, *et al.*, 2003).

Figura 4. Representação da forma monomérica da proteína de Matrix do Vírus Sincicial Respiratório Humano depositado no PDB(4V23), colorida de acordo com sua estrutura secundária. Esta proteína possui 47 resíduos formando α -hélices (laranja), 91 resíduos formando folhas- β (lilás) e 118 resíduos na forma de random coils (cinza).



Fonte: PDB 4V23

1.4 Tratamentos e terapias disponíveis

O hRSV possui características que representam um desafio ao desenvolvimento de uma vacina. Uma dessas características é a possibilidade de reinfecção na presença de imunidade pré-existente, podendo acometer recém-nascidos com anticorpos adquiridos passivamente da mãe e de pessoas imunocompetentes. Ainda como fator agravante, o hRSV pode causar repetidas reinfecções pela falha imunológica em produzir uma resposta imune efetiva (GLEZEN *et al.*, 1981).

A primeira tentativa de se obter uma vacina foi feita a partir do vírus inativado por formalina na década de 1960. Durante os testes clínicos em seres humanos, resultados mostraram que apesar de induzir uma forte resposta imune, em contato com o vírus selvagem, pessoas imunizadas desenvolveram manifestações muito mais severas do que indivíduos não imunizados (KIM *et al.*, 1969). Isso aponta que, a memória imunológica adquirida na infecção por hRSV, não previne uma

segunda infecção, além das mutações nas proteínas de Fusão (F) e Glicoproteína (G) presentes no envelope viral prejudicarem a especificidade dos candidatos a antivirais (CULLEN *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 hRSV. No entanto, a recomendação foi revista em 1996. O uso de Ribavirina foi limitado a pacientes imunocomprometidos com hRSV 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 (MACHADO *et al.*, 2009).

Como possível terapia para o hRSV, foi desenvolvido uma imunoglobulina policlonal hiperimune combinada e purificada de doadores que possuíam altos títulos de anticorpos neutralizantes contra o hRSV (RSV-IVIG, RespiGam), para redução de hospitalizações de bebês com alto risco. O RSV-IVIG foi licenciado em 1996, mas retirado do mercado em 2004 porque seu uso estava associado a múltiplas desvantagens, como a necessidade de longas sessões de infusão intravenosa, supervisão em ambiente hospitalar, doses de alto volume resultando em sobrecarga de líquidos, e ainda, risco potencial já que as imunizações com vírus vivos atenuados, como a vacina contra sarampo/caxumba/rubéola (MMR), precisavam ser adiadas até nove meses após a infusão de RSV-IVIG (KOUL *et al.*, 2015).

Estudos recentes feitos com dois possíveis inibidores do hRSV, GS-5806 (Presatovir) e ALS-008176, demonstraram ser agentes antivirais promissores. GS-5806, uma pequena molécula oral, bloquearia a fusão viral, enquanto o ALS-008176, um pró-fármaco biodisponível por via oral de um análogo de nucleosídeo da citidina, resultaria em uma redução da carga viral sem eventos adversos graves. No entanto, neste estudo, a memória imune preexistente dos indivíduos não foi avaliada, o que poderia comprometer os resultados (VINCENZO *et al.*, 2016; VINCENZO *et al.*, 2015; VINCENZO *et al.*, 2014).

O Palavizumab (Synagis[®]), um anticorpo IgG1 monoclonal humanizado produzido para reconhecimento a proteína F do hRSV, foi desenvolvido em 1998, e permanece como a única estratégia de proteção aprovada para o mercado em bebês de alto risco para doença grave por hRSV. No entanto, seu uso é atualmente limitado a um subconjunto de bebês de alto risco devido aos altos custos. Atualmente, é aprovado para prematuros nascidos com menos de 29 semanas de gestação, 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 vacina candidata mais avançada, ResVax, é uma nanopartícula recombinante da proteína de Fusão (F) do hRSV com fosfato de alumínio como um adjuvante. A nova abordagem para desenvolver esta vacina é baseada em nanopartículas que carregam proteínas modificadas do hRSV. As nanopartículas sensibilizam o sistema imunológico ao vírus, de modo que o sistema imunológico forneça uma resposta frente a infecção. O ensaio clínico de Fase 3 incluiu mais de 4.600 mulheres grávidas examinando a eficácia da prevenção da doença por hVSR em bebês por meio da imunização materna. Embora o ensaio tenha falhado ele mostrou uma eficácia de vacina de 44% contra hospitalização por hVSR, 25% de eficácia contra todas as hospitalizações respiratórias e 39% de eficácia contra todas as causas de hipoxemia grave (MAMMAS *et al.*, 2020).

Embora diversas propostas de potenciais fármacos e vacinas sejam lançadas ao longo dos anos, eles esbarram em problemas comuns, mencionados em diversos estudos como alto custo, ausência da eficácia terapêutica, efeitos teratogênicos, citotóxicos, elevado número de hospitalizações e custos com a administração medicamentosa entre outros. Em contrapartida, diversos estudos têm sido desenvolvidos em torno da busca de moléculas que desempenhem um papel efetivo antiviral. Com base nisso, compostos bioativos do grupo dos polifenóis, têm sido amplamente estudados pelo seu baixo custo, fácil obtenção, serem compostos presentes em frutas e folhas e apresentar capacidade antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena e principalmente, antiviral (ALMEIDA *et al.*, 2004).

1.5 Resveratrol

O Resveratrol (trans-3,40,5-trihidroxiestilbeno) (Figura 5) é uma fitoalexina encontrado naturalmente em muitas fontes alimentares comuns, incluindo uvas, amoras e amendoins e possui inúmeras vantagens e efeitos na saúde humana. Além de suas propriedades anticancerígenas, o Resveratrol é anti-inflamatório, antienvelhecimento, antifúngico e antiviral. Enquanto o Resveratrol interage com muitas enzimas e receptores importantes em vias de sinalização, as propriedades antioxidantes desse composto são de interesse particular devido ao papel fundamental que o antioxidante desempenha em inúmeras condições patológicas (HOLTHOFF *et al.*, 2010).

Várias infecções virais, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV), rinovírus, influenza e hRSV, mostraram induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em uma variedade de tipos de células sendo elas responsáveis por desempenhar um papel importante na

sinalização celular, levando à expressão de mediadores pró-inflamatórios. A geração descontrolada de ROS está associada a danos celulares, uma condição conhecida como estresse oxidativo (CIENCEWICKI *et al.*, 2008). Muitas características da doença pulmonar mediada por influenza e hRSV, incluindo inflamação, hiper-reatividade das vias aéreas e dano às células epiteliais, são devidas ao estresse oxidativo (VLAHOS *et al.*, 2011).

Segundo ZANG e colaboradores (2011), um estudo avaliando efeito do tratamento com moléculas descritas com ação antioxidante e capazes de induzir a diminuição do estresse oxidativo celular foi realizado usando uma fitoalexina (Resveratrol) e um flavonoide (Quercetina). As células A549 (linha celular cancerosa alveolar tipo II) foram infectadas com hMPV, na presença ou ausência de várias doses de Resveratrol (10–50 μ M em DMSO) ou quercetina (1–10 μ M em DMSO). O sobrenadante da cultura foi colhido 24h pós-infecção (pi) para medir o marcador de dano por estresse oxidativo F₂8-isoprostano, usando um imunoensaio enzimático, e marcadores pró-inflamatórios CXCL8 (IL-8) e CCL5 (RANTES). A infecção por hMPV foi associada a dano oxidativo significativo em células A549, conforme evidente pelo aumento da liberação de 8-isoprostano, e com um aumento significativo na secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e RANTES. Tanto o tratamento com Resveratrol quanto com quercetina reduziram significativamente a geração de 8-isoprostano induzida por hMPV para níveis comparáveis às células falsamente infectadas.

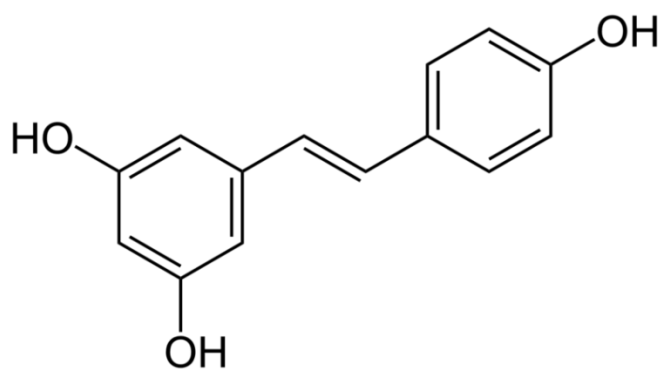
Para investigar o efeito antioxidantes na replicação viral, as células A549 foram infectadas com hMPV e analisadas pelo número absoluto de cópias do gene N do hMPV por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Nem o Resveratrol nem o tratamento com quercetina tiveram efeito sobre a transcrição do gene hMPV N que decodifica a proteína N, responsável pela replicação viral. Já seu efeito na expressão da proteína hMPV foi realizado *Western blot* (técnica usada para detectar proteínas numa amostra de homogenato de tecidos biológicos ou estratos) usando um anticorpo policlonal de coelho anti-hMPV e novamente, não houve mudança significativa na quantidade de expressão da proteína total de hMPV no Resveratrol ou quercetina tratada em comparação com as células infectadas não tratadas (ZANG N *et al.*, 2011).

Para determinar se o tratamento com antioxidantes na dieta afetaria as etapas posteriores da replicação viral, a produção de partículas de infecção viral foi determinada por imunoensaio de placa, sendo o tratamento com Resveratrol e quercetina de células A549 durante a infecção por hMPV associado a um título viral muito mais baixo, em comparação com células infectadas não tratadas. Os resultados então sugerem que esses antioxidantes interferem na montagem viral e na

formação de vírus maduros, sendo a proteína M no hRSV responsável por essa etapa de montagem e liberação de *vírions* maduros (ZANG N *et al.*,2011).

O Resveratrol ocorre nas isoformas *trans* e *cis*, que podem têm efeitos biológicos diferentes. Devido à sua estabilidade, o *trans*-resveratrol é a isoforma mais usada. O *cis*-resveratrol tem relatado como instável e, portanto, não está disponível comercialmente. Por se tratar de uma biomolécula relativamente pequena, o *trans*-resveratrol pode possuir a capacidade de interagir com superfícies expostas ao solvente da proteína M em solução, assim como outros flavonoides já estudados pelo grupo em diferentes proteínas do hRSV. Isso aumenta o interesse em verificar a interação e quais mecanismos biofísicos no processo para que isso de fato ocorra.

Figura 5. Representação da estrutura química da molécula de *trans*-resveratrol



Fonte: LEAL *et al.*,2017, adaptado.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dicroísmo Circular

A técnica de Dicroísmo Circular (CD) é um método utilizado para avaliar a estrutura secundária de proteínas e outras macromoléculas em solução. Ela consiste em mensurar a diferença de absorção de luz circularmente polarizada entre duas componentes com igual magnitude, uma com rotação à direita (R) e outra a esquerda (L). O sinal de CD pode ser observado em moléculas quirais (moléculas que apresentam em sua estrutura quatro carbonos com quatro substituintes diferentes). Os instrumentos de CD são conhecidos como espectropolarímetros e reportam a diferença de absorção de luz polarizada a esquerda e a direita ($\Delta A = A_L - A_R$); entretanto, essa diferença é reportada em termos de elipticidade (θ medida em graus). O espectro de CD é coletado em função de comprimentos de onda (GREENFIELD *et al.*, 2007). A luz polarizada passa por um meio circularmente dicróico, onde a absorção diferencial das duas componentes circulares converte a luz plana polarizada em luz elipticamente polarizada, o vetor elétrico traça uma elipse ao invés de oscilar em um plano ou formar um círculo. Quando os vetores elétricos dos dois componentes circulares estão na mesma direção, a soma de suas magnitudes origina o eixo maior da elipse, e quando eles estão em direções opostas, a diferença de suas magnitudes origina o eixo menor da elipse. O sinal de CD é caracterizado pela razão dos eixos menor e maior da elipse, que é a tangente de um ângulo θ , chamado de elipticidade expresso pela relação:

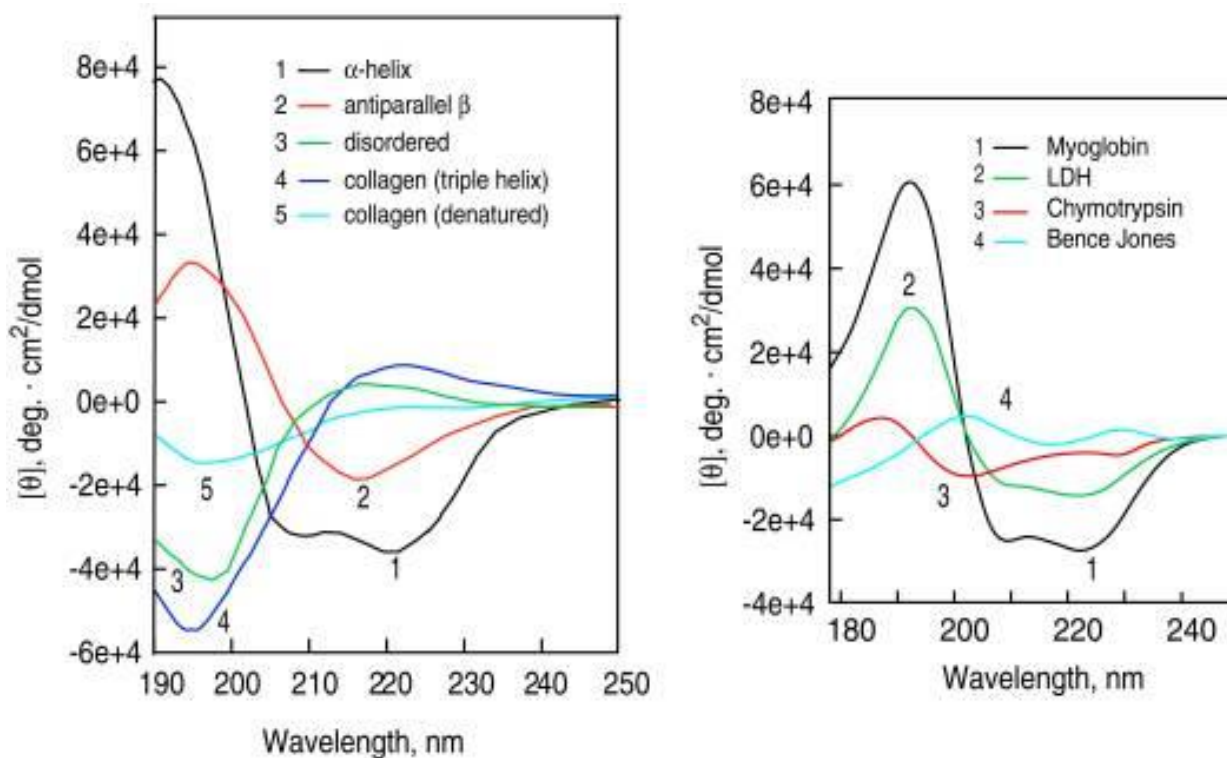
$$\theta = \tan^{-1} \left(\frac{\text{eixo maior}}{\text{eixo menor}} \right) \quad (1)$$

O sinal de CD, origina-se da interação da radiação eletromagnética com a molécula em estudo. As diferentes bandas espectrais de absorção das moléculas são atributos intrínsecos das características estruturais das mesmas. Por exemplo, em proteínas os cromóforos de interesse são as ligações peptídicas, as quais absorvem luz com comprimentos de onda menores do que 240 nm (KELLY *et al.*, 2005).

As proteínas apresentam espectros característicos para cada tipo de estrutura secundária que as compõem; como por exemplo, as proteínas α -helicoidais têm bandas com elipticidade negativa em 222 e 208 nm e uma banda positiva em 193 nm. As proteínas com majoritária estrutura β (fitas e/ou folhas- β) exibem bandas de elipticidade negativa em 215 nm e banda positiva em 195 nm. As

estruturas proteicas desordenadas ou irregulares (*randoim coil*) têm elipticidade positiva por volta de 210 nm e uma banda negativa perto de 195 nm (Figura 6) (GREENFIELD, 2007).

Figura 6. Espectros de referência de estruturas secundárias de proteínas. As linhas vermelhas, azul e verde representam espectros compostos majoritariamente de estruturas alfa hélice, estrutura beta e *randoim coil*, respectivamente.



Fonte: GREENFIELD (2007)

Com base nos perfis espectrais de dados de CD de estruturas secundárias de proteínas conhecidas, há algoritmos que utilizam os espectros de CD-UV para fornecer uma estimativa das estruturas secundárias de proteínas de interesse. Em geral, os procedimentos utilizam como base de dados, uma biblioteca de estruturas de proteínas determinadas por cristalografia de raios-X (KELLY *et al.*, 2005), as quais são comparadas com as amostras analisadas e, por fim, é feita uma estimativa da porcentagem das estruturas secundárias (α -hélice, estrutura- β , *randoim coil*) da proteína de interesse. Para essas análises de deconvolução espectral dos dados CD são comumente utilizados os programas: CONTIL, SELCON3 e CDSSTR, os quais se encontram presentes no pacote CDpro (MATSUO *et al.*, 2007; KELLY *et al.*, 2005).

2.2 Espectroscopia e supressão de Fluorescência

Pensando na relação entre λF (comprimento de onda da fluorescência) e λA (comprimento de onda da absorbância) sabe-se que as proteínas não possuem um alto rendimento quântico, definido como o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. Entretanto o estudo de fluorescência tem tido um papel importante nas pesquisas atuais. Os resíduos de aminoácidos não apresentam uma absorção da radiação na região do visível, sendo que apenas três absorvem radiação na região do ultravioleta, sendo eles: Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr) e Fenilalanina (Phe). Esses resíduos de aminoácidos são conhecidos como fluoróforos e possuem a capacidade de absorver fótons nos comprimentos de onda $\lambda_{\text{Trp}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Tyr}} = 274 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{Phe}} = 257 \text{ nm}$, sendo que essa absorção faz com que os elétrons da molécula saiam do estado fundamental partindo para um estado excitado, e quando eles retornam para o estado fundamental ocorre a perda de energia do elétron fazendo com que ele emita um fóton de comprimento de onda maior (LACOWICZ *et al* 2011).

O Triptofano presente nas proteínas servem como uma sonda fluorescente eficiente para monitorar mudanças físico-químicas ocasionadas pela interação de algum ligante de interesse devido ao fato do espectro emitido seja suprimido quando ocorre a interação. A supressão de fluorescência está relacionada com qualquer processo que diminua a intensidade do espectro de emissão da amostra conforme se adiciona moléculas supressoras (LACOWICZ *et al* 2011).

Podem ocorrer duas formas de supressão: dinâmica e estática. A supressão estática irá ocorrer quando há a formação de um complexo não fluorescente com um supressor no estado fundamental. Quando este complexo absorve radiação ele retorna ao estado fundamental sem emitir fótons, sendo o sinal de fluorescência observado oriundos dos fluoróforos não complexados. Já a supressão dinâmica acontece quando o complexo é formado durante o estado excitado. Pela a equação de Stern-Volmer, a supressão de fluorescência pode ser definida pela Equação 05, sendo que F e F_0 são as intensidades de fluorescência no estado estacionário na presença e na ausência de supressor $[Q]$, respectivamente; K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, K_q é a constante de supressão e τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência de supressor.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad [2]$$

A equação acima F_0/F demonstra uma dependência linear entre a razão F_0/F e a constante K_{sv} do supressor. Caso exista mais de uma classe de fluoróforos possuindo acessibilidades distintas, poderá ocorrer contribuições supressoras estáticos e dinâmicos, fazendo a equação de Stern-Volmer

adquira um comportamento não-linear (LACOWICZ *et al* 2011). Observando a Equação 05 e sabendo sua dependência linear, a constante de Stern-Volmer será o coeficiente angular desta reta, mostrando a efetividade da supressão causada pelo supressor.

O equilíbrio da reação é dado por:



sendo $[M]$ a concentração de proteína, n o número de sítios de ligação, $[L]$ a concentração de ligante e $[L_nM]$ é o complexo proteína/ligante. Através da equação de equilíbrio, temos a constante de associação K_n calculada por:

$$K^n = \frac{(L_nM)}{M_f L_f^n} \quad [4]$$

Considerando que a proteína pode se encontrar complexada ou livre, segue a relação:

$$[M_t] = [L_nM] + [M_f] \quad [5]$$

sendo que $[M_T]$ e $[M_F]$ são as concentrações de proteína total e livres, respectivamente. A razão de proteína total no sistema por proteína livre é igual a razão entre a intensidade de supressão na ausência de ligante por intensidade suprimida:

$$\frac{[M_t]}{[M_f]} = \frac{F_0}{F} \quad [6]$$

E substituindo as equações (07) e (08) e fazendo algumas manipulações matemáticas é obtido:

$$\frac{(M_0 - M_F)}{M_F} = K_b (L_0 - [L_nM])^n \quad [7]$$

Admitindo que a concentração de ligante livre $[L_n]$ seja muito maior que a concentração de ligante ligado, então a concentração total de ligante pode ser aproximada a concentração de ligante livre de tal forma que $[L_0] [L_n]$, a equação de supressão no equilíbrio se torna:

$$\log\left(\frac{M_0 - M_F}{M_F}\right) = n \cdot \log K_b + n \log[L_0 - (L_n M)] \quad [8]$$

onde se observa uma dependência linear, podendo obter os valores relativos ao número n de sítios de ligação por proteína e a constante de associação K_b relativa a interação do ligante com a proteína. Variando a temperatura, a técnica de fluorescência permite fazer um estudo termodinâmico da interação proteína/ligante.

Sabe-se que a estabilização do complexo proteína-ligante é dada por ligação de hidrogênio, interação de *van der Waals*, interações eletrostáticas e contatos hidrofóbicos no sítio de ligação. Através dos parâmetros termodinâmicos pode se entender o tipo de interação predominante para a formação do complexo por meio da análise das contribuições energéticas da entalpia, entropia e energia livre de Gibbs. Sabe-se que tanto contribuições entálpica quanto entrópica estão relacionadas com mudanças conformacionais na estrutura da proteína. Mudanças na entalpia sugerem quebra ou formação de interações não covalentes entre átomos da proteína, e entre solvente e proteína. Já mudanças na entropia estão relacionadas a alterações dinâmicas da cadeia principal e lateral da proteína, além de organização do solvente, principalmente em regiões hidrofóbicas. A equação de *van't Hoff* (Equação 13) permite entender melhor cada contribuição, fornecendo o perfil termodinâmico da interação. Se ΔH e $\Delta S > 0$ o sistema é dominado por interações hidrofóbicas se ΔH e $\Delta S < 0$ o sistema é dominado por ligações de hidrogênio ou *van der Waals*, e se $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ o sistema é dominado por interações eletrostáticas (LACOWICZ *et al.*, 2011).

A energia livre de Gibbs está relacionada com a constante de associação K_b através da relação:

$$\Delta G = -RT \ln(K_b) \quad [9]$$

onde $R=1,98 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ é a constante universal dos gases e K_b é a constante de associação referente a temperatura utilizada no experimento. A energia livre de Gibbs é dada por:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad [10]$$

substituindo eq. [9] na eq. [10], temos:

$$-RT\ln(K_b) = \Delta H - T\Delta S \quad [11]$$

Ou seja:

$$-R\ln(K_b) = \Delta S - \frac{\Delta H}{T}$$

A partir de um gráfico $-R\ln(K_b)$ em função de $(1/T)$ obtemo da declividade o valor de ΔH , e com os valores de ΔG em cada temperatura e o valor de ΔH , obtem-se os valores de ΔS .

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

A proteína M é uma proteína importante na infecção pelo hRSV, responsável pelo processo de brotamento da partícula viral com eficiência na propagação da infecção. Assim, potenciais inibidores da proteína M poderiam inibir a produção de partícula viral viável e consequentemente o bloqueio de uma infecção em curso. Devido a sua importância para o sucesso de infecção viral do Vírus Sincicial Respiratório, a investigação da interação com ligantes que interferem no seu mecanismo de ação e interação com as proteínas virais e do hospedeiro é importante e permitirá responder questões relevantes sobre o processo de infecção viral. Assim os objetivos do presente projeto são:

1. Transformar, expressar e purificar a proteína M em *E.Coli* Ril DE3;
2. Verificar a estrutura secundária da proteína M através do Dicroísmo Circular (CD);
3. Caracterizar as interações entre a Proteína M e ligantes através de Espectroscopia de Fluorescência;
4. Calcular os parâmetros de interação entre proteína-ligante.

4. METODOLOGIA

4.1 Clonagem e expressão das proteínas

Para a expressão das proteínas de interesse foi utilizada a tecnologia de DNA recombinante, sendo *Escherichia coli* o modelo de estudo. O gene da proteína M foi clonado em vetor de expressão pD441-NHT:M obtido da empresa DNA 2.0 transformado em *E. coli* da linhagem Ril DE3, com o gene de resistência ao sulfato de canamicina, por serviço de terceiros (ATUM).

As bactérias foram crescidas a 37 °C em meio LB contendo 50 μ l /mL de Canamicina e 50 mL de meio LB. Após crescimento bacteriano das colônias selecionadas, 25 mL de meio de cultura foi transferido para 1L de um meio novo e cresceu a 37 °C até atingir a densidade óptica em 600 nm (DO_{600}) desejada de 0,6, quando foi induzida a expressão utilizando 0,4 mM de IPTG durante 16 horas a 28 °C. Após expressão da proteína, as culturas foram centrifugadas em 5.000 xg por 30 minutos a 4 °C e foram ressuspensas utilizando o tampão de lise (20 mM de TRIS pH 7.5, 500 mM de NaCl, 1 mg/mL Lisozima, 0,5 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, 5% Glicerol, 1 mM 2-Mercaptoetanol). Depois de uma hora de incubação no gelo, as células foram lisadas por sonicação. O extrato celular bruto foi subsequentemente centrifugado a 40.000xg por uma hora a 4 °C.

O sobrenadante foi transferido para uma coluna de cromatografia de afinidade contendo a resina Ni-NTA, pré-equilibrada com o Tampão de Equilíbrio (20 mM de TRIS pH 8.0, 500 mM de NaCl, 5 mM de Imidazol e 1 mM de β ME). Inicialmente, a resina foi lavada com concentrações de imidazol de 5 a 30 mM para remoção dos contaminantes e, em seguida, a proteína de interesse foi eluída em concentrações de imidazol de 60 mM a 1 M. As frações de eluição contendo a proteína M foram concentradas e injetadas na coluna de exclusão molecular (Superdex 75), pré-equilibrada com o tampão fosfato (50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7,5, 50 mM NaCl, 1,0 mM β ME).

A pureza das amostras foi verificada a cada passo do processo de purificação utilizando géis de SDS-PAGE 15% corado com azul de *coomassie* brilhante R. As frações contendo a proteína purificada foram agrupadas e concentradas. A concentração da proteína M foi determinada espectroscopicamente por medidas de absorção UV-Vis (Cary-3E, Varian, Palo Alto, CA) utilizando o valor do coeficiente de extinção molar calculado pela ferramenta ProtParam *webserver* (ExPASy)¹. O flavonoide utilizado, *trans*-resveratrol- foi adquirido pela empresa Sigma Aldric. A concentração do estoque do flavonoide foi determinada espectroscopicamente por medidas de absorção UV-Vis (Cary-3E, Varian, Palo Alto, CA).

4.2 Espectroscopia de UV-Vis

Com a finalidade de determinar a concentração da proteína M e dos ligantes Resveratrol-*trans* efetuaram-se medidas de absorção UV-Vis em espectrofotômetro UV-Vis (Cary-3E, Varian, Palo Alto, CA). As medidas foram realizadas utilizando uma faixa de leitura de 200 a 500 nm em temperatura ambiente com cubeta de quartzo de um centímetro óptico. Para o cálculo da concentração foi coletado um espectro da linha de base, em seguida foi realizado a medida da proteína M e o Resveratrol. Para o cálculo da concentração foi utilizado coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280} = 27.390 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a proteína M (calculados pelo *ProtParam*) e o *trans*-resveratrol foi preparado em etanol e a concentração foi determinada utilizando $\epsilon_{304} = 30.335 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como já descrito na literatura (CAMONT *et al.*, 2009).

4.3 Dicroísmo circular

Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-710 (Jasco, USA), sendo utilizada cubeta de quartzo de caminho de 0,5 mm. Os espectros de CD-UV *far* da proteína foram coletados no intervalo de 260–197 nm com velocidade de varredura de 50 nm/min, tempo de resposta de 1,0 segundo, largura de banda espectral de 1,0 nm, resolução espectral de 0,2 nm e número de acumulações igual a 10. A contribuição do espectro de CD do 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 BME) foi subtraída do espectro da proteína M. Todos os espectros de CD foram registrados como miligraus (θ) e, em seguida, foram expressos em termos de elipticidade molar $[\Theta]$ em unidades de $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ a seguinte expressão:

$$[\Theta] = \frac{\theta}{10 \cdot c \cdot n \cdot l} \quad (12)$$

sendo que (c) é a concentração molar (mol/L) de proteína M para análise da estrutura secundária foi de 3 μM , enquanto o experimento com a titulação de *trans*-resveratrol foi de 5 μM , n é o número de resíduos de aminoácidos (256) e l é o caminho óptico da cubeta (cm).

A porcentagem de estruturas secundárias da proteína M foi estimada com o *software* CONTINLL do pacote de programas CDPPro, usando o conjunto de referência de proteínas SMP56 (SREERAMA & WOODY, 2000). Foram realizados também, experimentos de dicroísmo circular

(CD) com a proteína M e resveratrol, a fim de examinar a contribuição do ligante na estrutura secundária da proteína M.

4.4 Espectroscopia de Fluorescência

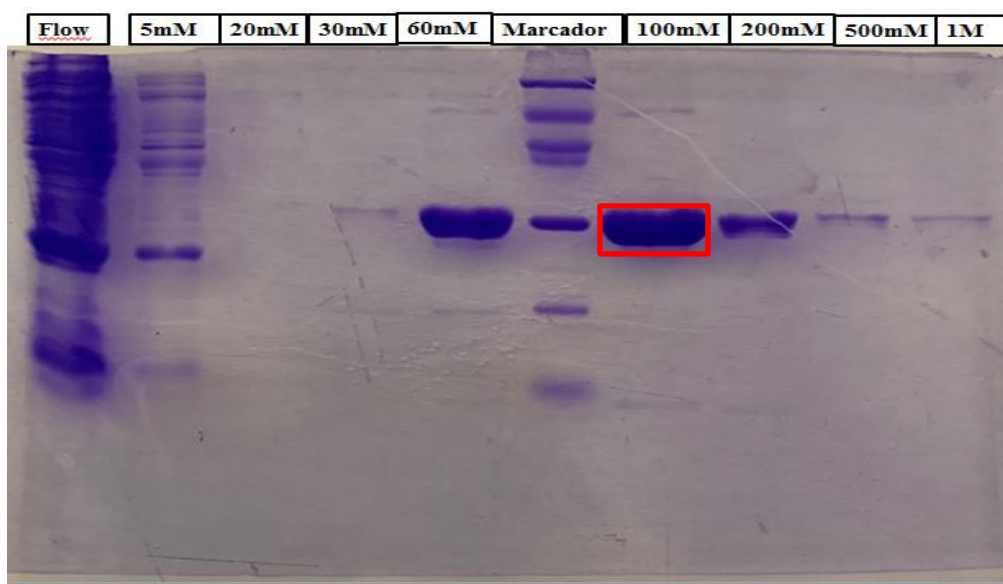
As medidas de espectroscopia de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro ISS PC1 (*Champaign, IL, USA*) equipado com banho térmico Neslab RTE-221 (*Thermo Electron Corporation, USA*). Utilizou uma cubeta de quartzo com caminho óptico de um centímetro. O comprimento de onda para excitação dos triptofanos da proteína M foram de 295nm e a faixa de comprimento de onda para coleta dos espectros de 300 nm à 500 nm. As medidas foram realizadas nas temperaturas de 288, 298 e 308 K, utilizando uma concentração de M 5 μ M em 1200 μ L, realizando 15 titulações com incrementos de volume ΔV de 0,5 μ l e a concentração variando de 0 até 50 μ M de *trans*-resveratrol.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Expressão e purificação

A proteína M fusionada com cauda de Histidina expressa a partir do plasmídeo pD441-NHT-M realizada em linhagem Ril (DE3), e após as etapas de cromatografia apresentou massa molecular de aproximadamente 30 kDa.. Na cromatografia por afinidade ao níquel, a resina foi lavada com concentrações de imidazol de 5 a 30 mM para remoção dos contaminantes e, em seguida, a proteína de interesse foi eluída em concentrações de imidazol de 60 mM a 1 M (Figura 7). O SDS-PAGE da cromatografia por afinidade com resina de Ni- NTA, mostra a proteína M sendo eluída a partir da fração de 60 mM de Imidazol juntamente com contaminantes. As frações selecionadas para a etapa de cromatografia de exclusão molecular por tamanho foram de 100, 200, 500 mM e 1 M de Imidazol por apresentarem um maior grau de pureza e menor número de contaminantes na amostra, sendo então usadas para dar seguimento aos experimentos.

Figura 7. Gel SDS-PAGE 15% com a visualização dos gradientes de concentração de Imidazol, sendo: Flow, 5mM de Imidazol com a presença de muitos contaminantes, 20mM de Imidazol, 30mM de Imidazol, 60mM de Imidazol onde a proteína já começa a ser eluída, marcador de massa molecular (97kDa, 66,0kDa, 45,0kDa, 30,0kDa, 21,1 kDa, 14,4kDa respectivamente), 100mM de Imidazol, 200mM, 500mM de Imidazol de Imidazol e 1M, respectivamente, onde a proteína M aparece com um maior grau de pureza.

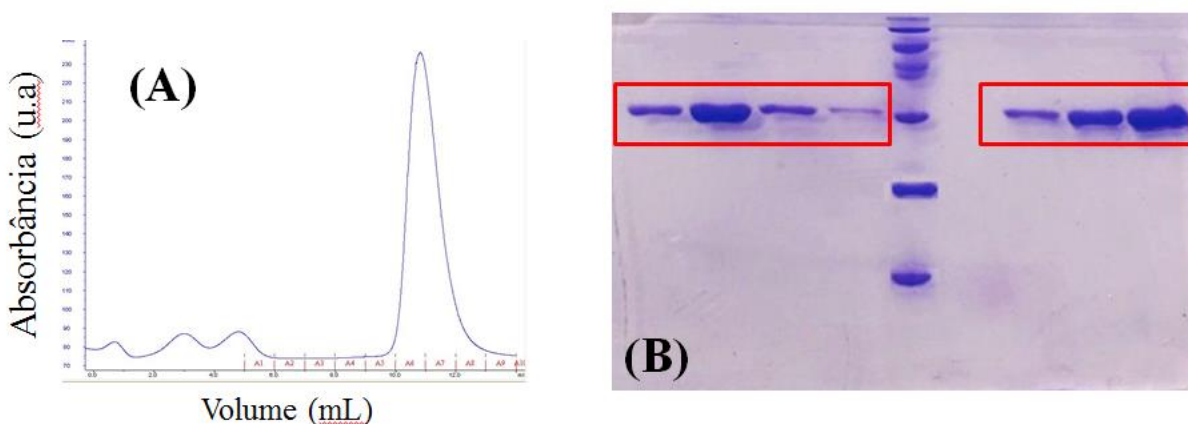


Fonte: Autoria própria

Após o processo de purificação por afinidade, as frações de 100 mM, 200 mM, 500 mM e 1

M contendo a proteína de interesse foram concentradas para 1 mL para uma nova etapa de purificação para remover contaminantes (não visíveis no gel) e para troca do tampão. O segundo processo de purificação foi executado por cromatografia de exclusão molecular por tamanho, observado na Figura 8. Podendo ser observado a eluição da proteína pura, e em seguida as frações da proteína M foram centrifugadas e concentradas para 1 mL, onde foram obtidas por volta de 400 μ M de proteína M.

Figura 8. (A) Cromatograma no comprimento de onda 280 nm, correspondente ao processo de purificação por exclusão molecular. O pico representado próximo de 12 ml corresponde a eluição da proteína M. (B) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE evidenciando dentro do retângulo vermelho a eluição da proteína M em quatro eluições seguidas do marcador de massa molecular ((97kDa, 66,0kDa, 45,0kDa, 30,0kDa, 21,1 kDa, 14,4kDa respectivamente) e outras três eluições da proteína M com massa molecular de ~30 kDa.



Fonte: Autoria própria.

5.2 Dicroísmo Circular

O resultado da Figura 9, mostra que o espectro de CD-UV *far* da proteína M a 25 °C. Para a confirmação da estrutura secundária, uma deconvolução espectral dos dados de CD da proteína M foi realizada utilizando o software CONTINLL do pacote de programas CDpro (linha vermelha, Figura 11) (SREERAMA & WOODY, 2000). A partir dos resultados da deconvolução, foi estimada uma porcentagem de 23% de α -hélice, 44% de estruturas- β , e 33% de *randoim coil* para o proteína M do hRSV, o que é consistente com a estrutura cristalográfica publicada na literatura (código de PDB 4DAT) (FOSTER *et al.*, 2015), mostrando que a proteína purificada estava bem estruturada para que os experimentos reproduzissem o comportamento da proteína M em solução.

As análises dos espectros de CD-UV *far* da proteína M do hRSV revelaram uma contribuição majoritária das estruturas secundárias em folha- β ($\sim 44\%$), o que corrobora com a estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raio-X descrita por Foster e colaboradores (2015) e semelhante ao dado apontado no estudo de Money e colaboradores (2008) (Tabela 1).

Figura 9. Espectro de CD-UV *far* da proteína M (3 μ M, círculos pretos vazios) a 25 °C (298 K) em solução tampão (150 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,0 mM BME). A linha vermelha representa o melhor resultado para a curva ajustada realizado pelo programa CONTINLL. A caixa a direita representa a porcentagem de cada estrutura secundária encontradas, sendo 23% de estruturas alfa hélice, 44% de fita beta e 33% de estruturas *random coil*.

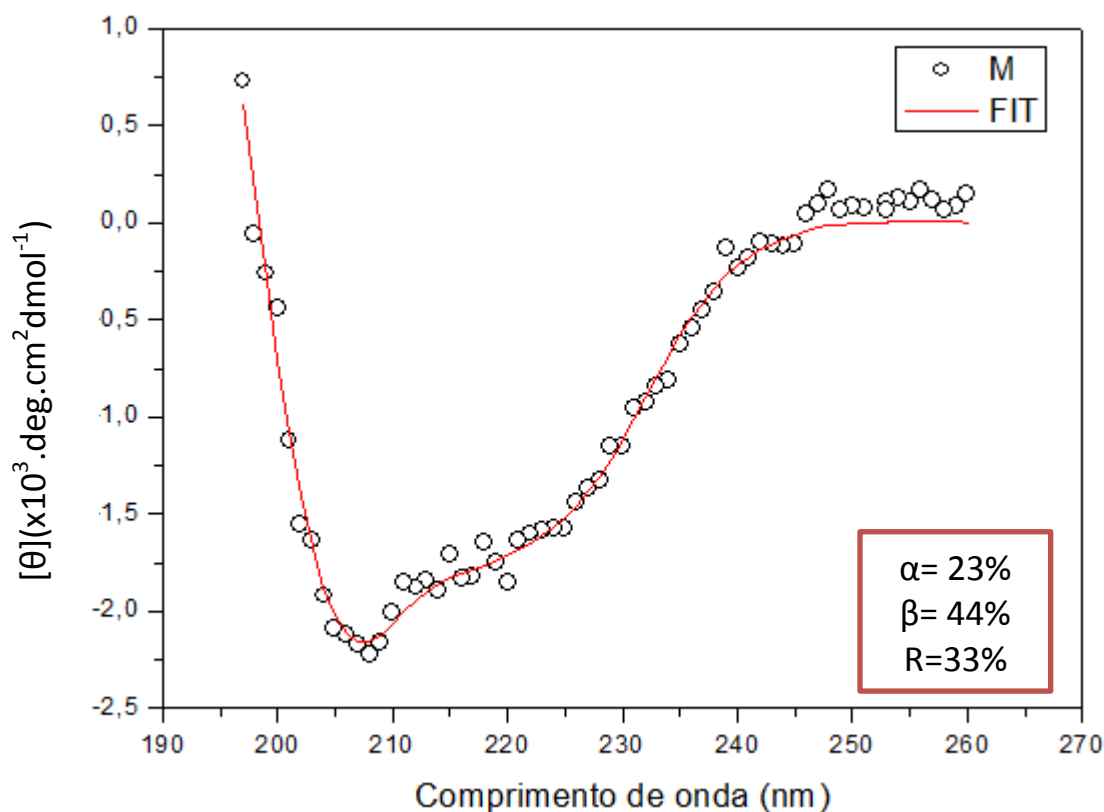


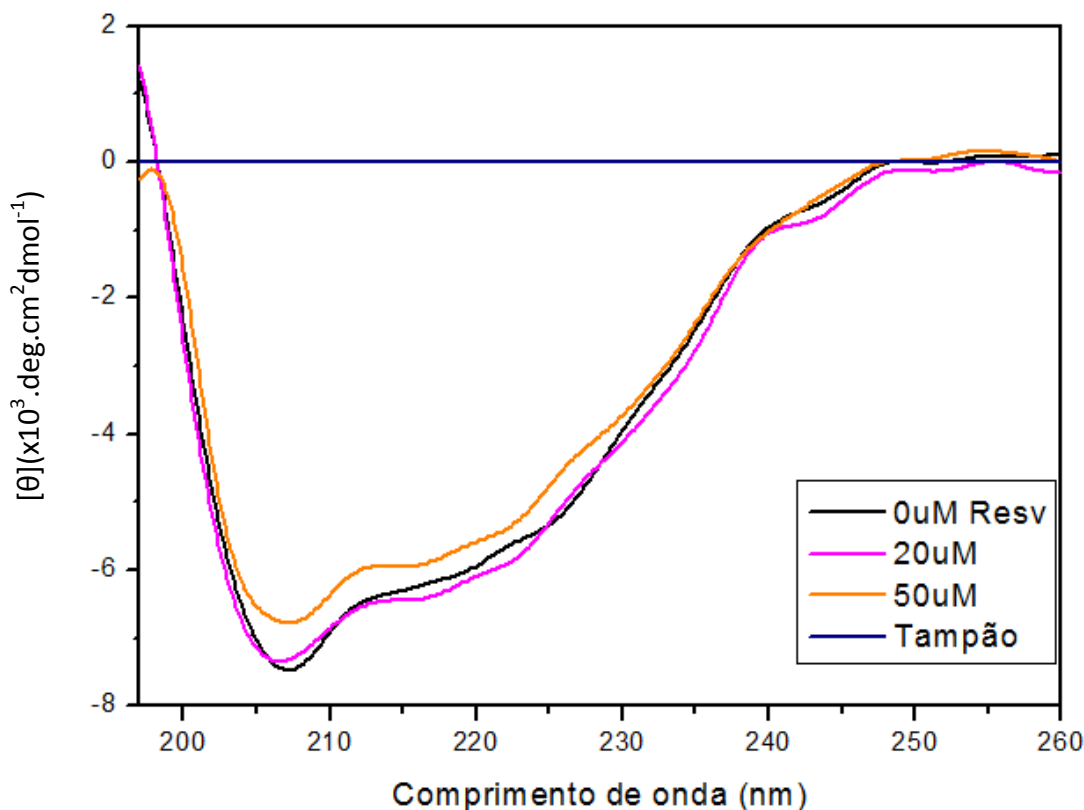
Tabela 1. Comparação do resultado experimental da análise das estruturas secundárias da proteína M com melhor resultado para a curva ajustada, realizado pelo programa CONTINLL e dados na literatura de Foster e colaboradores e Money e Colaboradores.

Estudo	% α-hélice	% Folha-β	% <i>Randoim coil</i>
Dado obtido	23	44	33
Money <i>et al.</i>, 2008.	20	47	33
Foster <i>et al.</i>, 2015.	18	35	46

Fonte: autoria própria

A fim de elucidar a contribuição do Resveratrol na estrutura secundária da proteína M, espectros de CD-UV *far* da proteína a 25°C (298 K) foram coletados no intervalo de 260–197 nm. Abaixo (Figura 10), é possível visualizar o espectro de CD-UV *far* de 5,0 μ M da proteína M e adição do Resveratrol, na concentração de 20 μ M e 50 μ M em uma razão experimental da concentração final de 1:10.

Figura 10. Espectro de CD-UV *far* da proteína M na concentração de 5,0 μM (preto) 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 BME) com a adição de Resveratrol variando na concentração de 20 μM (rosa) a 50 μM (laranja) solubilizado em etanol 100%.



Fonte: autoria própria

A comparação entre a estrutura secundária da proteína M com a adição do Resveratrol em solução mostra uma pequena diferença no perfil espectral da proteína na concentração de 5 μM ao complexo proteína-ligante na concentração de 20 μM . Embora o perfil espectral do Resveratrol em solução na concentração de 50 μM apresente uma pequena variação, não houve indícios de mudança na estrutura secundária da proteína que permaneceu com 22% de estruturas alfa hélice, 44% de estrutura beta e 34% de estruturas *randoim coil* em comparação com a Figura 10, que mostra um perfil de 23% de estruturas alfa hélice, 44% de estrutura beta e 33% de *randoim coil*.

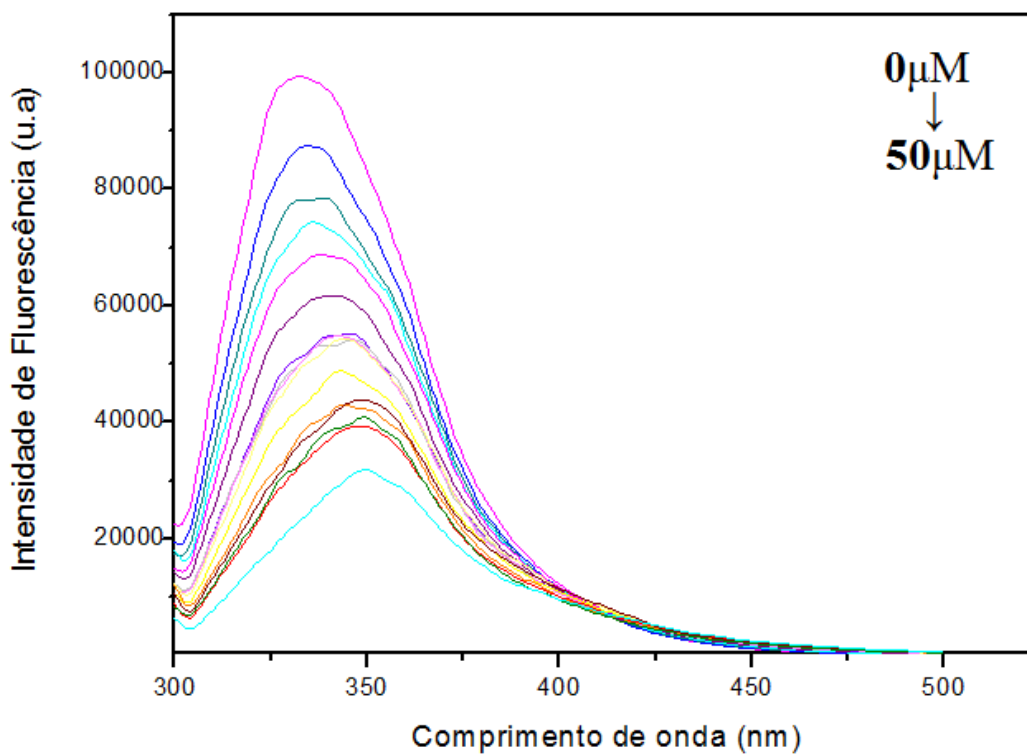
A interação do complexo *trans*-resveratrol/proteína M evidencia que o mecanismo no qual o *trans*-resveratrol se liga na proteína M para exercer atividade anti-viral não envolve a inativação da proteína M por desenovelamento/enovelamento, como fazem alguns inibidores irreversíveis no

design de fármacos e drogas onde o aumento da concentração do ligante em solução afeta a estabilidade de proteínas e receptores no sistema biológico (GONDIM *et al.*, 2015).

5.3 Espectroscopia de Fluorescência

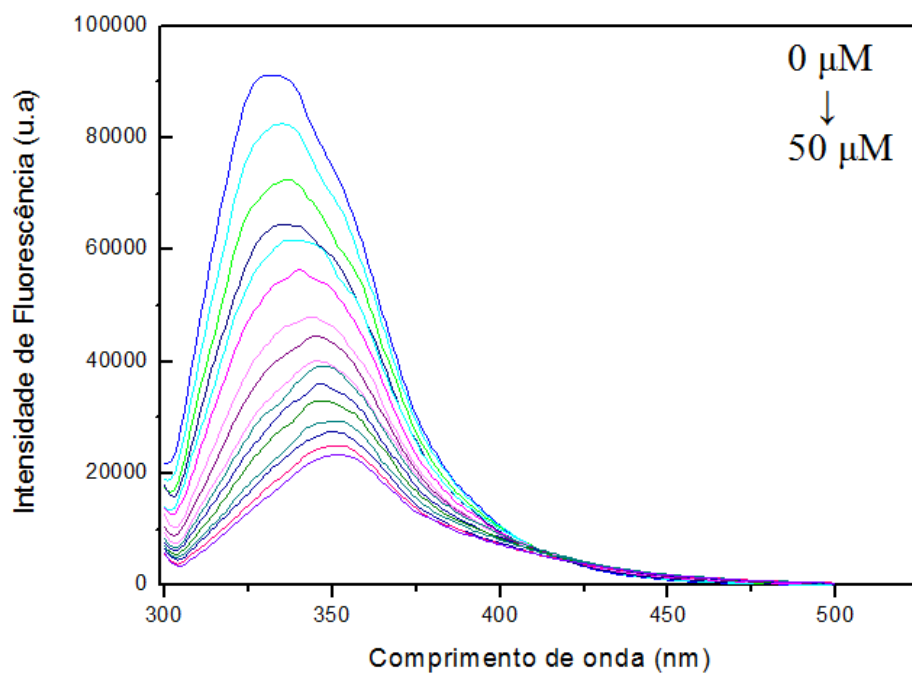
Através do espectro de emissão de fluorescência da proteína M (figura 11) é possível visualizar a supressão na intensidade do sinal conforme a adição da titulação do *trans*-resveratrol. Foi utilizado 5 μM da proteína M e a concentração de *trans*-resveratrol variou de 0 à 50 μM em 15 titulações. Através do espectro da fluorescência, observa-se o deslocamento do pico de emissão máxima conforme o *trans*-resveratrol é titulado nas três diferentes temperaturas 288 (15 °C), 298 (25 °C) e 308 K (35 °C) indicando que um ou mais resíduos de triptofano estão se tornando mais acessíveis ao solvente, conforme o aumento da concentração de *trans*-resveratrol no meio.

Figura 11. Espectro de emissão de fluorescência da proteína M [5 μM] na presença do *trans*-resveratrol a 288 K (15°C). Com a adição de *trans*-resveratrol (0 μM à 50 μM) houve o fenômeno de supressão da intensidade da fluorescência, sugerindo interação entre a proteína M e o *trans*-resveratrol.



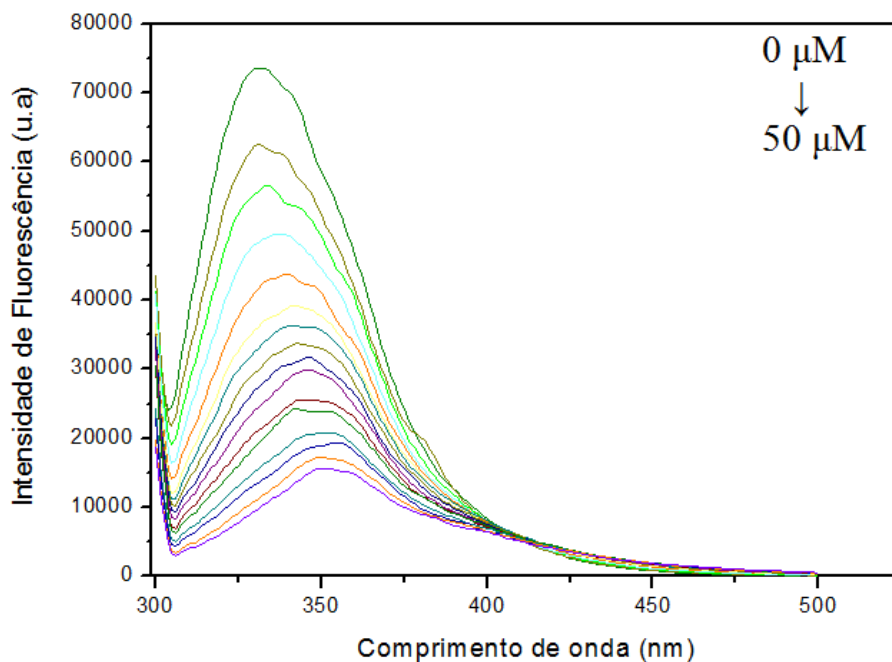
Fonte: Autoria própria

Figura 12. Espectro de emissão de fluorescência da proteína M na presença do *trans*-resveratrol a 298 K (25°C). Com a adição de *trans*-resveratrol (0 μ M à 50 μ M) houve o fenômeno de supressão da intensidade da fluorescência, sugerindo interação entre a proteína M e o *trans*-resveratrol.



Fonte: Autoria Própria

Figura 13. Espectro de emissão de fluorescência da proteína M na presença do *trans*-resveratrol a 308 K (35 °C). Com a adição de *trans*-resveratrol (0 μ M à 50 μ M) houve o fenômeno de supressão da intensidade da fluorescência, sugerindo interação entre a proteína M e o *trans*-resveratrol.



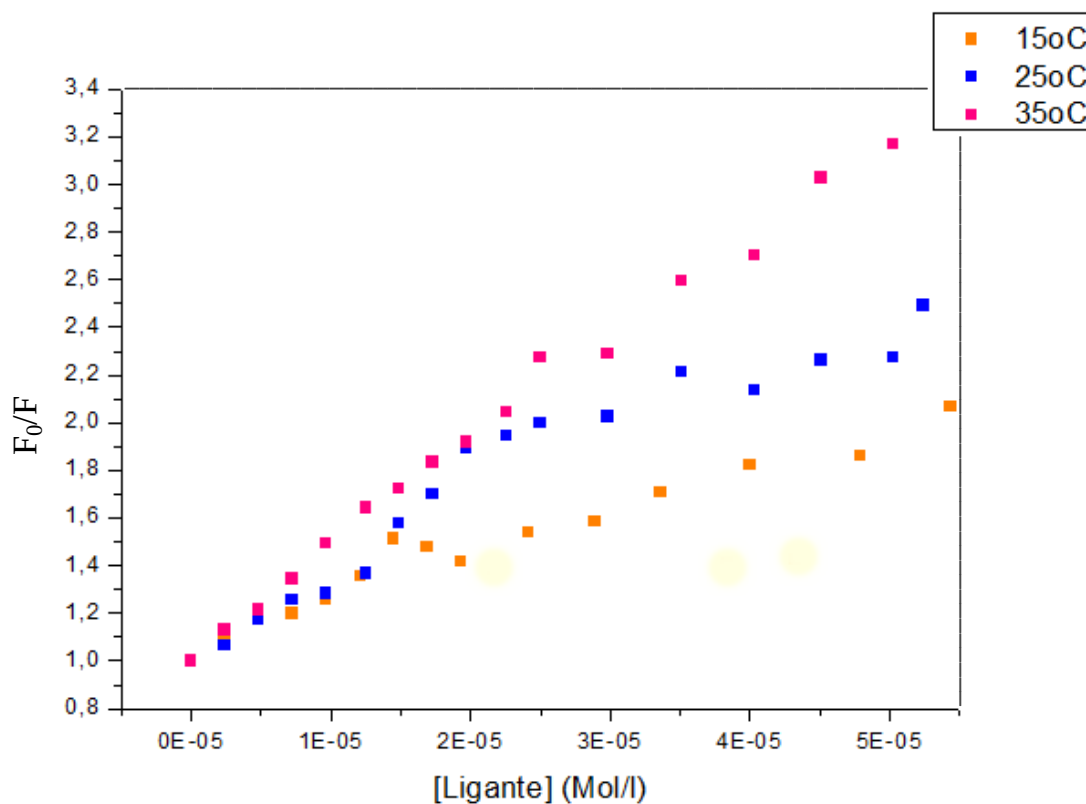
Fonte: Autoria Própria

Os experimentos de supressão de Fluorescência revelam (Figura 11, 12 e 13) a diminuição da intensidade máxima do sinal de fluorescência da proteína M a medida em que o ligante é titulado. Já o deslocamento do pico da intensidade de fluorescência está relacionado com o deslocamento químico no ambiente do Trp mais exposto ao solvente.

O trabalho realizado por Money e colaboradores (2008) revela que a interface dimérica e união dos domínios da proteína M são compostos com as principais interações entre eles, sendo hidrofóbico por natureza, suportado por um pequeno número de ligações de hidrogênio.

A partir das figuras 11, 12 e 13 foi possível obter o gráfico de Stern-Volmer que apresentou um aumento do K_{SV} com o aumento da temperatura. Isso se deve ao aumento do número de colisões do *trans*-resveratrol com os fluoróforos em solução, sendo a temperatura de 308 K evidenciada com o maior aumento do K_{SV} em $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Figura 14. Gráfico de Stern-Volmer: Supressão de Fluorescência da proteína M nas temperaturas de 288 K (laranja), 298 K (azul) e 308 K (rosa). Este gráfico indica uma supressão dinâmica, onde K_{SV} aumenta com a temperatura devido ao aumento no número de colisões do trans-resveratrol com os fluoróforos.



Fonte: Autoria própria.

As constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) nas três temperaturas foram obtidas através do ajuste linear (**Tabela 2**), os valores encontrados são diretamente proporcionais ao aumento de temperatura, indicando uma ocorrência de supressão dinâmica.

Tabela 2. Constante de Stern-Volmer (K_{SV}) nas três temperaturas (288K, 298K e 308K) obtidas através do ajuste linear da reta.

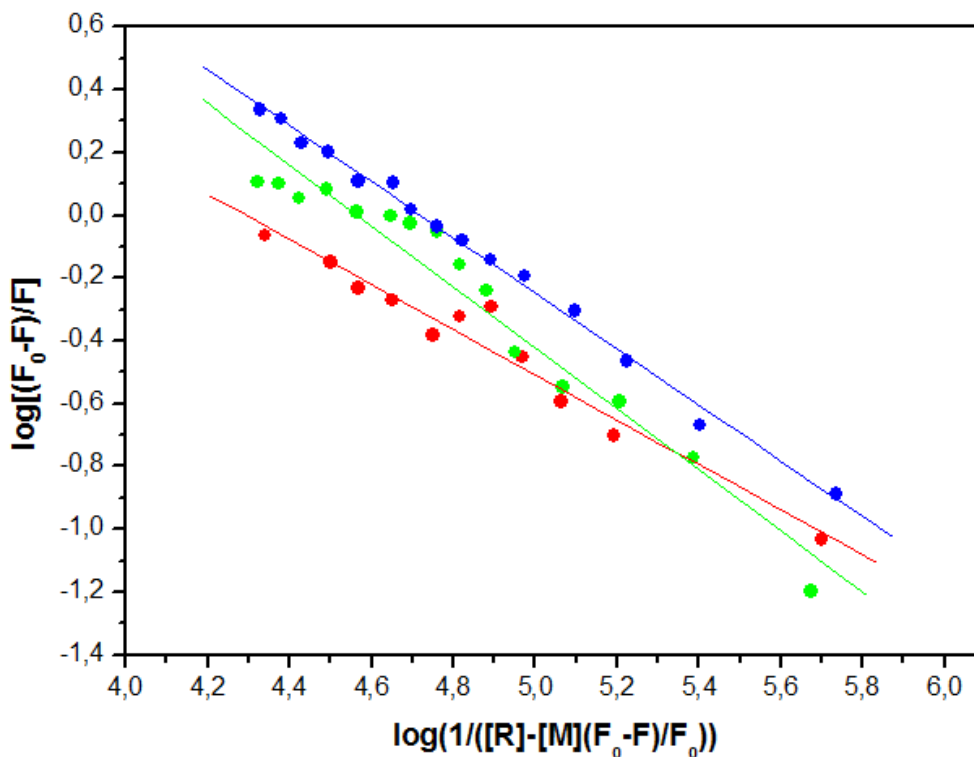
Resveratrol/Proteína M	
T (K)	$K_{SV} (10^4 M^{-1})$
288	$1,8 \pm 0,1$
298	$2,8 \pm 0,2$
308	$4,3 \pm 0,2$

Fonte: Autoria própria

Conforme há um aumento de temperatura e a diminuição da viscosidade do meio, há então um aumento nas colisões dos ligantes na solução com a proteína M, resultando em um aumento da constante de supressão K_{SV} .

Com os resultados obtidos a partir da supressão de fluorescência da proteína M com o resveratrol, as constantes de ligação K_b e o número de sítios de ligação (n) podem ser previsto pela equação (12). Essa equação fornece uma relação entre a razão da diferença entre a fração de proteína M livre pela fração de *trans*-resveratrol ligada com o resveratrol em função da concentração de resveratrol no meio. A Figura 15 mostra o gráfico de duplo-log da proteína M e resveratrol nas temperaturas de 288, 298 e 308 K ajustados pela equação (11).

Figura 15: Gráfico de Duplo-Log para a supressão de fluorescência da proteína M pelo *trans*-resveratrol nas três temperaturas. Com base neste gráfico é possível determinar o número de sítios de ligação (n) e a constante de associação K_b das interações.



Fonte: Autoria própria

As constantes de associação (K_b) e os sítios de ligação (n) nas temperaturas de 288, 298 e 308 K foram obtidos através do ajuste linear, esses valores se encontram Tabela 3.

Tabela 3. Constante de associação K_b e sítios de ligação (n): Valores referentes ao complexo proteína M/*trans*-resveratrol nas temperaturas de 288, 298 e 308 K.

Resveratrol/Proteína M		
T (K)	n	K_b ($\times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$)
288	0,9	0,18 ($\pm 0,01$)
298	0,8	4 (± 1)
308	0,9	5,2($\pm 0,6$)

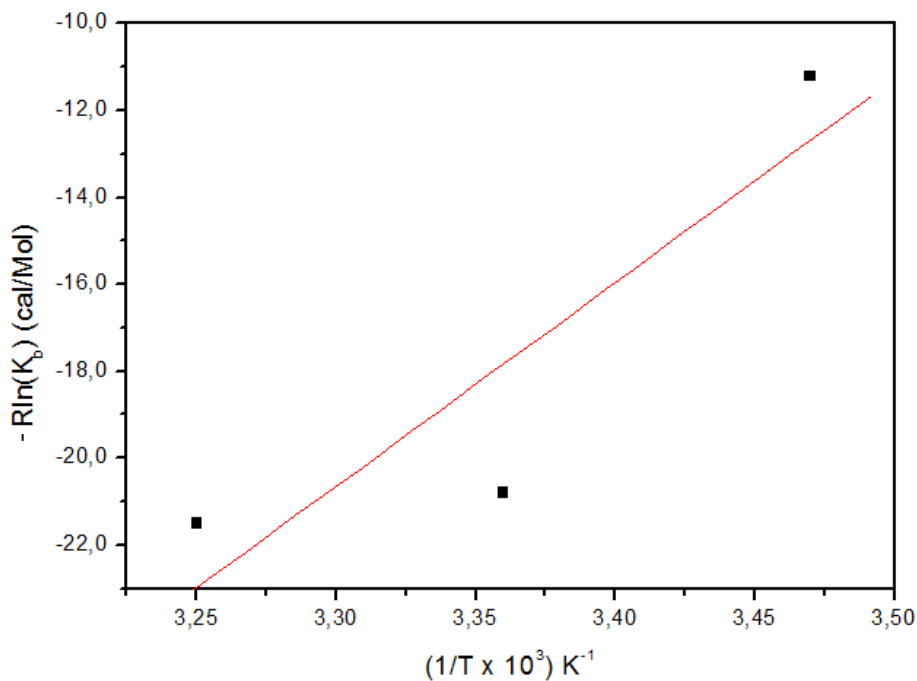
Fonte: Autoria própria

É possível perceber através dos resultados encontrados (Tabela 3) que nas três temperaturas estudadas o sítio de ligação (n) é aproximadamente 1, enquanto que os valores da constante de associação sofreu um aumento conforme o aumento de temperatura. Esses resultados mostram que a temperatura favorece a formação do complexo M/*trans*-resveratrol.

As constantes de ligação K_b mostram o aumento do K_b do complexo com aumento da temperatura, evidenciando uma interação média/alta sendo 1 ligante para 1 proteína.

A Figura 16 mostra o gráfico de *van 't Hoff* para o sistema nas três temperaturas estudadas. A partir dele é possível calcular os parâmetros termodinâmicos e com os valores de ΔG em cada temperatura e o valor de ΔH , obtém-se os valores de ΔS .

Figura 16. Gráfico de *van't Hoff*: Análise termodinâmica do complexo proteína M/*trans*-resveratrol nas temperaturas de 288, 298 e 308 K. O gráfico de *van't Hoff* relaciona a constante de associação com a temperatura. A partir dele é possível calcular os parâmetros termodinâmicos e com os valores de ΔG em cada temperatura e o valor de ΔH , obtem-se os valores de ΔS .



Fonte: Autoria própria

Na tabela 04 é possível encontrar os valores do gráfico de *van't Hoff* que relaciona a constante de associação com a temperatura. A partir dele é possível calcular os parâmetros termodinâmicos e com os valores de ΔG em cada temperatura e o valor de ΔH , obtem-se os valores de ΔS .

Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos de ΔG em cada temperatura e o valor de ΔH para obtenção dos valores de ΔS .

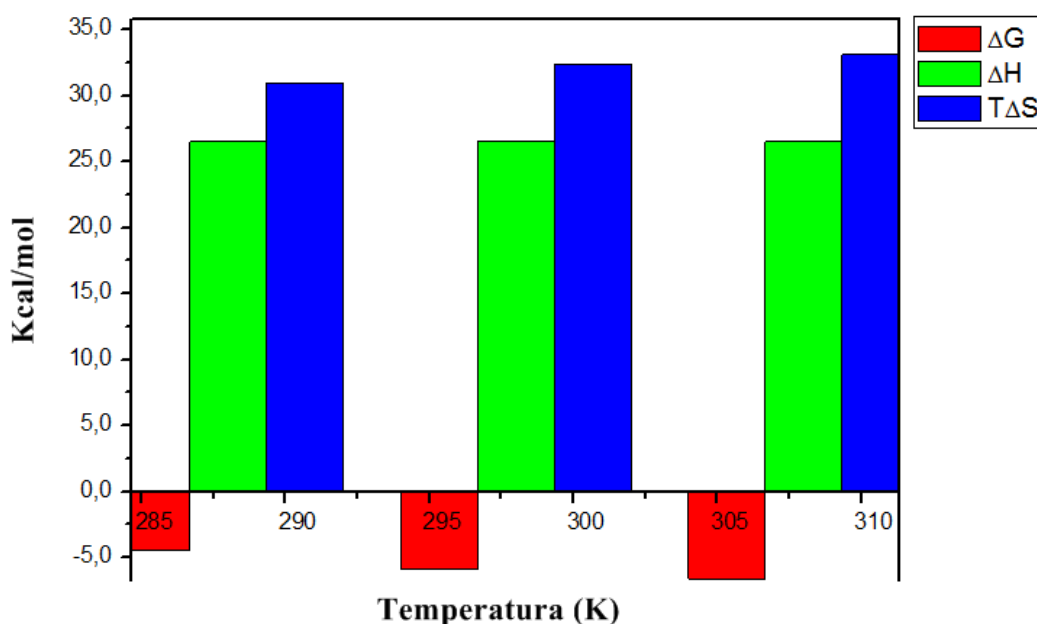
T(K)	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta H(\text{kcal/mol})$	T $\Delta S(\text{kcal/mol})$
288	-4,5	26,5	31,1
298	-5,9	26,5	32,4
308	-6,6	26,5	33,1
pH 7.5			

Fonte: autoria própria

Nas análises termodinâmicas (*van't Hoff*) encontram-se os valores de ΔH , $T\Delta S$ e ΔG bem como os padrões termodinâmicos referentes ao complexo *trans*-resveratrol/M nas temperaturas de 288, 298 e 308 K, indicando uma interação do tipo hidrofóbica. Isso corrobora com os dados sugeridos por Money e Colaboradores (2009) de que a interface dimérica da proteína M, que predominantemente apresenta uma região hidrofóbica que poderia ser um bolsão de ancoragem para pequenos ligantes.

Na Figura 17 encontram-se os valores de ΔH , $T\Delta S$ e ΔG bem como os padrões termodinâmicos referentes ao complexo *trans*-resveratrol/M nas temperaturas de 288, 298 e 308 K.

Figura 17. Perfil termodinâmico do complexo proteína-M/*trans*-resveratrol 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 ($T\Delta S$).



Fonte: Autoria Própria

No complexo M/*trans*-resveratrol tanto a contribuição entálpica quanto a entrópica são positivas ($\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$), sendo assim a interação é entropicamente dirigida, dominada por efeitos hidrofóbicos. O alto custo entrópico se deve as moléculas de água que são retiradas da camada de solvatação da proteína quando o *trans*-resveratrol se aproxima do sítio de ligação. Como há a ocorrência de um grande número de subunidades hidrofóbicas em peptídeos e fármacos, as

interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento do ligante pelo receptor. No complexo proteína M/*trans*-resveratrol, a característica hidrofóbica do ligante pode ser crucial para a ancoragem no bolsão hidrofóbico da proteína M. No entanto, mais experimentos devem ser realizados para descrever a interação do *trans*-resveratrol e a proteína M visto que esta pequena molécula apresenta o coeficiente de absorvidade molar no comprimento de onda de 304 nm, podendo ter contribuição na região onde há a emissão de fluorescência da proteína.

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).

Desta forma, o presente trabalho sugere a interação do *trans*-resveratrol com a proteína M, corroborando dados que indicam que esse antioxidante poderá interferir na montagem viral e na formação de vírus maduros, etapa mediada pela proteína M (ZANG *et al.*, 2011). Pela escassez de novos fármacos com ação antiviral, o *trans*-resveratrol poderá se apresentar como uma alternativa para o tratamento de infecção pelo HRSV.

Como elucidado por Zang e Colaboradores (2011), o *trans*-resveratrol teria um importante papel na atividade antiviral, na etapa de brotamento da partícula viral madura. Esse mecanismo de interação foi estudado no presente trabalho. No entanto, a elucidação do complexo M-*trans*-resveratrol através de outras técnicas e ferramentas amplamente utilizadas no meio biológico, poderão auxiliar na descrição da interação proteína-ligante.

Experimentos que permitam análises dos parâmetros de interação do reconhecimento molecular do complexo ligante-receptor, são de grande importância para caracterização das interações. Conseqüentemente, a caracterização estrutural e energética dessas interações em nível molecular constitui uma faceta indispensável dessa atividade. Em particular, entre os métodos de espectroscopia de RMN observados por ligantes, as experiências de espectroscopia de diferença de transferência de saturação (STD) (ANGULO *et al.*, 2010).

Resumidamente, o método consiste em aplicar uma irradiação seletiva por radiofrequência para saturar apenas os sinais de RMN da macromolécula. A espectroscopia de diferença detecta a transferência dessa saturação pelo NOE intermolecular para qualquer molécula pequena que esteja ligada à macromolécula em condições de troca química rápida. A magnitude de qualquer saturação transferida está relacionada à proximidade do próton do ligante à superfície da proteína, de modo que é particularmente interessante sua capacidade de obter informações no nível atômico sobre o epítipo de ligação ao ligante, possibilitando o cálculo do epítipo de ligação do ligante e as constantes de dissociação dos complexos (ANGULO *et al.*, 2010).

Ainda, experimentos de Dinâmica Molecular (DM) realizados através de um estudo computacional, apresentam resultados versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas. No

planejamento racional de fármacos baseado em estrutura, as simulações de DM têm contribuído exhaustivamente em diversos estágios do processo (GUIMARÃES *et al.*, 2012). A metodologia da DM é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico do complexo bem como o ambiente químico cuja a interação acontece, flexibilidade conformacional de ligantes e regiões acessíveis para a interação além de fornecerem um baixo custo computacional (ROSA *et al.*, 2020).

Além disso, o potencial antiviral de outros polifenóis e flavonóides são amplamente relatados na literatura, como compostos antivirais como quercetina, rutina, luteolina, apigenina, caempferol, naringenina e seus derivados glicosídeos (REIS *et al.*, 2020).

Além da caracterização do complexo M-Resverarol, é possível fornecer através de estudos computacionais e experimentais qual ligante com melhor potencial de interação e quais são os parâmetros de interação existentes no complexo.

REFERÊNCIAS

- 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, p.65-76, 2004. antibody against respiratory syncytial virus fusion protein. *PloS one*. v. 14, n. 2, 2019.
- ANGULO, J., ENRÍQUEZ-NAVAS, P. AND NIETO, P. Ligand–Receptor Binding Affinities from Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy: The Binding Isotherm of STD Initial Growth Rates. *Chemistry – A European Journal*, 16: 7803-7812. 2010.
- BAVISKAR PS, HOTARD AL, MOORE ML, OOMENS AG. The respiratory syncytial virus fusion protein targets to the perimeter of inclusion bodies and facilitates filament formation by a cytoplasmic tail-dependent mechanism. *J Virol*. v 87. P 10730–10741. doi:10.1128/JVI.03086-12.2013.
- BLOUNT, R.E.; MORRIS, J.A.; SAVAGE, R.E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*. n 92. v 3. p 544–549. 1956.
- CAMONT L, COTTART C-H, RHAYEM Y, NIVET-ANTOINE V, DJELIDI R, COLLIN F, ET AL. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Anal Chim Acta*. Feb 16;634(1):121–8. 2009.
- CARDOSO, M. A. A persistência das infecções respiratórias agudas como problema de Saúde Pública. *Cad. Saúde Pública*. v 26. n 7. p 1270-1271. 2010.
- CARVALHO, W.B. Bronquiolite aguda, uma revisão atualizada. *Rev Assoc Med Bras*. v 53. n 2. p 182-8. 2007.
- CIENCEWICKI, J.; JASPERS, I. Air pollution and respiratory viral infection. *Inhal Toxicol*. v 19. n 14. p 1135-1146. 2008.
- COLLINS, P. L.; KARRON, R. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (Eds.), *Fields Virology*, 6ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- CULLEN, L.M., SCHMIDT, M.R., MORRISON, T.G. Effect of Previous Respiratory Syncytial Virus Infection on Murine Immune Responses to F and G Protein Containing Virus-like Particles. *Journal of virology*, p. JVI-00087. 2019.
- ESNEAU, C., RAYNAL, B., ROBLIN, P., BRÛLÉ, S., RICHARD, C.A., FIX, J., ELÉOUËT, J.F., GALLOUX, M. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus N0-P complex in solution. *Journal of Biological Chemistry*, p.jbc-RA118.2019.

- FLYER, D.; MASSARE, M.J. Structure basis of neutralization by a novel site II/IV
 Förster, A.; Maertens, G.N.; Farrell, P.J.; Bajorek, M. Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. *J Virol.* n 89. v 8. p 4624-4635. doi:10.1128/JVI.03500-14. 2015.
- FREITAS, A.R.R. Impactos dos vírus Influenza e Sincicial Respiratório na Mortalidade e Internações e suas Implicações para as Políticas Públicas no Brasil. Tese (Doutorado em Saúde coletiva) – UNICAMP. Campinas. p. 28. 2014.
- GHILDYAL, R.; HO, A.; WAGSTAFF, K. M.; et al. Nuclear Import of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Mediated By Importin β 1 Independent of Importin α . *Biochemistry*, v. 44, n. 38, p. 12887–12895. doi: 10.1021/bi050701e, 2003.
- 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.
- GUIMARÃES, CR. Recuperação de posições de encaixe. Descoberta e design computacional de drogas. Springer. 2012.
- H.-D. HÖLTJE, W. SIPPL, D. ROGNAN, G. FOLKERS, *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*, Wiley-VCH, Darmstadt, 2nd ed, 2003.
- HACKING D, HULL J. Respiratory syncytial virus--viral biology and the host response. *J Infect.* 2002;45(1):18-24. doi:10.1053/jinf.2002.1015
- 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*, 18(7), pp. 617–629. 2018.
- HOLTHOFF, T.E.; BURNS, S.T.; WOODLING, K.A. et al. The dietary antioxidant resveratrol is a functional scavenger of peroxynitrite in vitro. *Faseb Jornal.* v 24. p 321.1. doi: 10.1096/fasebj.24.1_supplement.321.1. 2010.
- IMANI, F.; ORVELL, C.; GIBBS, J.D.; BIAN, T. Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Induces Lung Epithelial Cell Cycle Arrest through a p53 Dependent Pathway. *Plos One*. DOI: 10.1371. 2012.
- ISON, M.G.; HAYDEN, F.G.; Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15: 355-367, 2002.
- J.P. DEVINCENZO et al. Oral GS-5806 activity in a respiratory syncytial virus challenge study *N. Engl J Med.* v 371. p 711-722. 2014.

J.P. DEVINCENZO, et al. Activity of oral ALS-008176 in a respiratory syncytial virus challenge study N. Engl. J. Med. v 373. p. 2048-2058. (2015),

J.P. DEVINCENZO. Fry ALS-008176 for respiratory syncytial virus infection N. Engl. J. Med. v 374. p. 1391-1392. 2016

JUNIOR, J. B. S. et al. Human respiratory syncytial virus in children hospitalized for acute lower respiratory infection. Jornal de Pediatria. v 87. n 3. p 219–224. doi:10.2223/JPED.2085. 2011.

KIPPER, S. et al. New Host Factors Important for Respiratory SyncytialVirus (RSV) Replication Revealed by a Novel Microfluidics Screen for Interactors of Matrix (M) Protein * □. p. 532–543, 2015.

KOUL, A.; ISPAS, G.; VERBEECK, J. et al. Antiviral Activity of TMC353121, a Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Inhibitor, in a Non-Human Primate Model. PLoS One. n 10. v 5. doi:10.1371/journal.pone.0126959. 2015.

LAKOWICZ J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Maryland. p.365. 2006.

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. doi:10.1186/1471-2334-12-119. 2012.

LAY, M. L.; GONZÁLEZ, P. A.; LEÓN, M. A.; CÉSPEDES, P. F.; BUENO, S. M.; RIEDEL, C. A.; KALERGIS, A. M. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. Microbes and Infection, v. 15, pp. 230-242, 2013.

LEAL, J.B.; CARVALHO, F.O.; GONSALVES, D.C.; et al. Resveratrol: composição química e seus benefícios à saúde. Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento, São Paulo. v.11. n.67. p.620-629. ISSN 1981-9919. 2017.

LI, D.; JANS, D. A.; BARDIN, P. G.; 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. doi: 10.1128/JVI.00343-08, 2008.

LOURENÇO, G.L. Infecções pelo vírus sincicial respiratório em crianças. Pulmão RJ. v 14. n 1. p 59-68. 2009.

MACHADO, C.M. Infecção pelo vírus sincicial respiratório e o diagnóstico das infecções virais pós-transplante de células-tronco hematopoéticas no Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 401-402, 2009.

MAMMAS I.N; DRYSDALE S.B; RATH B; THEODORIDOU M; PAPAIOANNOU G, et al: Update on current views and advances on RSV infection (Review). *Int J Mol Med* 46: 509-520, 2020

MARTY, A.; MEANGER, J.; MILLS, J.; SHIELDS, B.; GHILDYAL, R. Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells. *Arch Virol.* n 149. v 1. p 199-210. doi:10.1007/s00705-003-0183-9. 2004.

MEJIAS, A. RAMILO, O. Defining the burden of respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr.* v 89. n 6. p 517-519. 2013.

MITRA, R. et al. The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments. *n. M*, p. 4432–4443, 2012.

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

NASCIMENTO, C.A. Detecção do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – USP. São Paulo. p 32. 2006.

PARROT, R.H. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington DC II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *Am J Epidemiol* n 98. p 289-300. 1973. respiratory syncytial virus. *American Journal of Diseases of Children*, v. 140, n. 6, p. 543–546. doi:10.1001/archpedi.1986.02140200053026, 1986.

REIS, A.C.C. Atividade antiviral e caracterização química de extratos etanólicos de *Cissus erosa* (Vitaceae). *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 71, e00522019, 2020. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602020000100702&lng=en&nrm=iso>. acesso em 06 de fevereiro de 2021. Epub 20 de julho de 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202071052>.

ROSA, Ellen Cristine Araújo et al. DINÂMICA MOLECULAR REATIVA DA ABERTURA DO ANEL EPÓXI EM REAÇÕES COM POLIAMINA Ellen. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 528-533, May 2020. Epub June 29, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170512>.

SCHMIDT, M.E. & VARGA, S.M. Modulation of the host immune response by respiratory syncytial virus proteins. *Journal of Microbiology*, 55(3), pp.161-171. 2017.

TERHOHEIKKINEN N. et al. Transmission of Respiratory Syncytial Virus Infection Within Families. *Forum Infectious Diseases*. v 2. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofu118>.2015.

UTOKAPARCH S. et al. The relationship between respiratory viral loads and diagnosis in children presenting to a pediatric hospital emergency department. *Pediatr Infect Dis J*. v 30. p 18–e23. 10.1097/INF.0b013e3181ff2fac. 2011.

VIEIRA, S. E. et al. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Inst Med Trop S Paulo*. v 43. n 3. p 125–131. 2001.

VLACHOS, R.; STAMBAS, J.; BOZINOVSKI, S.; BROUGHTON, B. R.; DRUMMOND, G. R.; SELEMIDIS, S. Inhibition of Nox2 oxidase activity ameliorates influenza A virus-induced lung inflammation. *PLoS.Pathog.*, v. 7, n. 2, p. e1001271-2011.

XIE, Q.; WANG, Z.; NI, F.; CHEN, X.; MA, J.; PATEL, N.; LU, H.; LIU, Y.; TIAN, J.H.; FLYER, D.; MASSARE, M.J. 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.; ZHENG, J.; WANG, S.; LIU, P.; XIE, M.; ZHAO, D. 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, pp. 223-232. 2015.

ZANG N. et al. A redução do interferon gama mediada por resveratrol previne a inflamação das vias aéreas e a hiperresponsividade das vias aéreas em camundongos imunocomprometidos infectados pelo vírus sincicial respiratório. *J Virol*. v 24, p 85 13061-8. doi: 10.1128 / JVI.05869-11. 21937650; PMCID: PMC3233156. 2011.

ZUKUROV, J.P.L. Caracterização molecular de vírus sincicial respiratório humano (hRSV) isolados na cidade de São Paulo no período de 2007 a 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – USP. São Paulo. p 59. 2010.