

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/06/2023.



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

Giovana Cavenaghi Guimarães

**Caracterização biofísico-química da proteína de matriz do Vírus
Sincicial Respiratório Humano**

São José do Rio Preto
2021

Giovana Cavenaghi Guimarães

Caracterização biofísico-química da proteína de matriz do vírus sincicial respiratório humano

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

Financiadora: FAPESP – Proc. 2019/08739-1
CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
Coorientador: Dr. Ícaro Putinhon Caruso

São José do Rio Preto
2021

G963c Guimarães, Giovana Cavenaghi

Caracterização biofísico-química da proteína de matriz do Vírus Sincicial Respiratório Humano / Giovana Cavenaghi Guimarães. -- São José do Rio Preto, 2021

42 f. : il.

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

Orientadora: Fátima Pereira de Souza

Coorientador: Ícaro Putinhon Caruso

1. Vírus Sincicial Respiratório Humano. 2. Proteínas recombinantes. I. Título.

Giovana Cavenaghi Guimarães

**Caracterização biofísico-química da proteína de matriz do Vírus
Sincicial Respiratório Humano**

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

Financiadora: FAPESP – Proc. 2019/08739-1
CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

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

Prof. Dr. Luiz Gustavo Araujo Gardinassi
Universidade Federal de Goiás (UFG)

São José do Rio Preto
16 de junho de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dra. Fátima Pereira de Souza pela orientação, pela confiança depositada, pelos anos de convivência e por sempre respeitar e apoiar minhas decisões.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Ícaro Putinhon Caruso pelos ensinamentos, pela orientação e auxílio ao resolver problemas, tratar e interpretar os resultados obtidos, por sempre ouvir minhas opiniões e apoiar meus sonhos.

Agradeço a todos os colegas de trabalho, mas especialmente agradeço aos meus companheirxs Vitor Brassolatti, Jéssica Marostica, Artemiza Miranda por me apoiar e tornar esta jornada mais leve.

Agradeço a todo o corpo docente do departamento de biologia pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do IBILCE pelos conhecimentos transmitidos e pelos recursos concedidos para participação em eventos importantes para meu aprimoramento acadêmico.

Agradeço a todo o corpo docente do departamento de física por disponibilizar os equipamentos necessários ao desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos funcionários do IBILCE por auxiliar na manutenção dos laboratórios.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2019/08739-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

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

De maneira geral, agradeço ao IBILCE, que mesmo em momentos de dificuldade consegue ser capaz de acolher e suprir seus cursos e laboratórios com uma excelente infraestrutura.

Por fim, agradeço à minha família por me incentivar e apoiar sempre.

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz
somente até onde os outros já foram. ”

Alexander Graham Bell (Inventor, 1847-1922)

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) é o principal agente causador de infecções no trato respiratório inferior em crianças e idosos por todo o mundo. A proteína de matriz (M) é essencial para o ciclo viral, uma vez que atua no processo de replicação, interagindo com proteínas do complexo ribonucleoproteico (RNPs). Posteriormente, a proteína M atua coordenando a transferência dos RNPs para locais de jangadas lipídicas, a partir da interação com o citoesqueleto celular, auxiliando assim no brotamento e liberação de vírions. Sabe-se então, que a proteína atua na célula hospedeira e tem grande importância na replicação viral, desta forma, o objetivo do presente trabalho foi compreender as mudanças conformacionais que podem ocorrer na proteína em diferentes condições de pH, temperatura e salinidade. Utilizando a proteína de matriz recombinante, foram realizados experimentos de fluorescência, dicroísmo circular e calorimetria de varredura diferencial. Os resultados do presente trabalho demonstraram que o processo de desnaturação térmica da proteína é irreversível e apresenta temperatura de desenovelamento de aproximadamente 44 °C. Além disso, sua estrutura secundária é influenciada pelo pH. Porém, mesmo em condição extremamente ácida, a proteína ainda possui parte de sua estrutura preservada. Por fim, o aumento da concentração iônica leva a uma desestabilização da proteína, resultando em diminuição da sua temperatura de desenovelamento. Desta forma os resultados do presente estudo auxiliaram para uma melhor compreensão de características conformacionais da proteína de matriz do hRSV.

Palavras-chave: Proteína M. hRSV. Temperatura. pH. Salinidade.

ABSTRACT

The human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is the main cause of infections in the lower respiratory tract in children and elderly all over the world. The matrix protein (M) is essential for the viral cycle once it acts on the replication process interacting with the ribonucleoprotein complex (RNPs). Posteriorly, the M protein interacts with the cellular cytoskeleton coordinating the RNPs transference to lipid rafts aiding the viral budding process and virion release. It is known that the protein acts in the host cell and has a great importance in the viral replication, thus, the objective of this work was to understand the conformational changes that can occur in the protein structure at different conditions of pH, temperature and salinity. Using the recombinant matrix protein, fluorescence, CD and DSC experiments were performed. The results of the present work demonstrates that the denaturation process is irreversible, with a melting temperature of about 44 °C. In addition, the secondary structure of the protein is influenced by the pH, but, even in extremely acid conditions, there is still some conserved secondary structure of the protein. Lastly, the increase of the ionic concentration leads to protein destabilization, resulting in a decrease of the melting temperature. Thus the results of the present work helped to better understand the conformational characteristics of the hRSV matrix protein.

Keywords: M protein. hRSV. Temperature. pH. Salinity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema da organização do RNA do Vírus Sincicial Respiratório (RSV).	14
Figura 2 Estrutura da proteína M.	16
Figura 3 Modelo dimérico da estrutura da proteína M.	17
Figura 4 SDS-Page da purificação por afinidade a níquel.	26
Figura 5 <i>Western Blot</i> da amostra de proteína M	27
Figura 6 SDS-Page da clivagem da proteína M com TEV protease.	27
Figura 7 Cromatograma de exclusão molecular da proteína M.	28
Figura 8 SDS-Page da cromatografia de exclusão molecular da proteína M.	28
Figura 9 Espectro de UV da proteína M.	29
Figura 10 Espectros de desnaturação térmica acompanhada por Dicroísmo Circular e Fluorescência da proteína M.	29
Figura 11 Desnaturação térmica acompanhada pelo espectro de dicroísmo circular da proteína.	30
Figura 12 Espectro de fluorescência e de dicroísmo circular da proteína M em diferentes condições de pH.	31
Figura 13 Centro de massa espectral e variação da elipticidade molar da proteína M em diferentes condições de pH.	31
Figura 14 Termogramas de desnaturação da proteína de matriz em diferentes concentrações salinas.	32
Figura 15 Temperatura de desenovelamento da proteína M em diferentes concentrações salinas.	33
Figura 16 Visão ampliada da interface de dimerização da proteína de matriz do hRSV	34
Figura 17 Entalpia calorimétrica do processo de desnaturação da proteína M em diferentes concentrações salinas.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC: Antes da clivagem

CD: *Circular Dichroism* (Dicroísmo Circular)

CMIB: Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular

DC: Depois da clivagem

DLS: *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento de luz dinâmico)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade Óptica

DSC: *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria Diferencial de Varredura)

DTT: Ditionotreitól

EDTA: *Ethylenediaminetetra acetic acid* (ácido Etilenodiamino tetracético)

ELU: Eluição

FT: *Flow-through*

HCl: Ácido Clorídrico

HRSV: *Human Respiratory Syncytial Virus*

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB: *Luria-Bertani broth*

LRTI: Infecções do rato respiratório inferior

M: Marcador de massa molecular

NaCl: Cloreto de Sódio

NaF: Fluoreto de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

Ni-NTA: *Nickel Nitrilotriacetic Acid* (Ácido Nitrilotriacético)

pH: Potencial hidrogeniônico

PI: Ponto isoelétrico

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetilsulfonila)

RNA: Ácido Ribonucleico

RNP: Ribonucleoproteico

RPM: Rotações por minuto

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
(Eletroforese em Gel de Poliacrilamida desnaturante)

TEVP: *Tobacco Etch Virus Protease*

UA: Unidades de absorbância

URTI: Infecções do trato respiratório superior

UV/Vis: Espectro de luz na região do ultravioleta ao visível

VSR: Vírus Sincicial Respiratório

β ME: *β -mercaptoetanol* (2-mercaptoetanol)

LISTA DE SÍMBOLOS

m	Metro
cm	Centímetro
nm	Nanômetro
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
g	Grama
mg	Miligrama
ng	Nanograma
µg	Micrograma
s	Segundo
min	Minuto
° C	Graus Celcius
K	Kelvin
mol	Mol
M	Molar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
Cal	Calorias
kCal	Quilocalorias
ua	Unidades de Absorbância
J	Joule
kJ	Quilojoule
kb	Quilobases
×g	Veze Constante Gravitacional Universal
rpm	Rotações por minuto
ε	Coeficiente de Extinção Molar
ΔH	Variação de entalpia
ΔG	Variação de energia livre de Gibbs
T	Temperatura
R	Constante universal dos gases

θ	Sinal de CD registrado como miligraus
mdeg	Miligraus
l	Comprimento do caminho óptico
Da	Dalton
kDa	Quilodalton
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Vírus Sincicial Respiratório Humano	13
1.2 Importância da proteína M na infecção viral	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Clonagem e expressão da proteína	20
3.2 Extração e purificação das proteínas	21
3.3 Preparo das amostras para os experimentos	22
3.3.1 Preparo das amostras para desnaturação térmica	22
3.3.2 Preparo das amostras para variação de pH	22
3.3.3 Preparo das amostras para desnaturação com variação de sal	23
3.4 Medidas espectrofluorimétricas	23
3.4.1 Cálculo do centro de massa do espectro	23
3.5 Medidas de dicroísmo circular	24
3.6 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Produção e purificação da proteína	26
4.2 Desnaturação térmica da proteína	29
4.3 Variação de pH	30
4.4 Variação da concentração iônica	32
5. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

1. Introdução

1.1 Vírus Sincicial Respiratório Humano

O vírus sincicial respiratório humano (hRSV) é responsável por mais de 60% das infecções do trato respiratório inferior em crianças no mundo todo e mais de 80% em crianças com menos de um ano (HALL et al., 2009, SHAY et al., 1999). Desta forma, até os dois anos de idade, muitas crianças já apresentaram uma ou duas infecções por RSV, onde, 40% apresentam infecção do trato respiratório inferior (JEANNE et al., 2009), sendo estas, infecções mais graves que podem agravar a clínica da doença. No grupo dos idosos, os dados apresentam um número total de hospitalizações maior que do vírus influenza. Estima-se que 78% das mortes causadas por hRSV sejam de adultos acima de 65 anos de idade, um número que tende a aumentar devido ao envelhecimento das populações, refletindo as mudanças nas estruturas sociais globais (THOMPSON et al., 2003, FALSEY et al., 2005).

O RSV pode ocasionar infecções tanto no trato respiratório superior (URTI), quanto no inferior (LRTI) (WU et al., 2007). A etiologia das URTI é caracterizada por tosse, dificuldade respiratória, coriza, dispneia e febre (KIM et al., 2007). As LRTI geralmente apresentam quadro clínico mais grave, sendo bronquiolite e pneumonia as doenças mais comumente associadas, principalmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (WU et al., 2007). A primeira infecção por RSV é geralmente mais grave, e ocorre durante os dois primeiros anos de vida (ZHAN et al., 2007). No entanto, infecções por RSV não proporcionam uma resposta imune efetiva no hospedeiro, de modo que a recidiva da infecção é comum, porém os sintomas são geralmente menos severos.

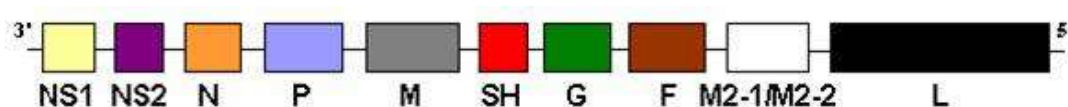
O vírus é dispersado por gotículas de muco ou saliva no momento que um indivíduo tosse, espirra ou fala. O contágio pode ser direto ou indireto, uma vez que indivíduos sadios entram em contato com secreções depositadas em um objeto ou superfícies e as conduz para mucosas orais, nasais ou oculares. Ao alcançar as células epiteliais ciliadas, do trato nasofaríngeo do futuro hospedeiro, o hRSV inicia sua replicação. Mas, ele também pode se propagar pelo epitélio bronquiolar e alveolar, onde ocorrem os sintomas característicos da infecção aguda do trato respiratório inferior (COLLINS et al., 2008, HALL et al., 1981, HALL et al., 1980).

Os surtos de hRSV apresentam sazonalidade regional, assim como ocorre com o vírus *Influenza*, porém nem sempre os ciclos de ambos os vírus coincidem. 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, em que o contágio geralmente ocorre dos indivíduos adultos para as crianças (HEIKKINEN et al., 2015, PAYNTER S., 2015, YANG et al., 2015). Apesar de existirem dois subtipos virais (RSVA e RSVB), não existe distinção geral clara entre a sazonalidade de ambos. O que se sabe até o momento é que os subtipos alternam surtos e que RSVA gera títulos virais mais altos, provavelmente facilitando sua dispersão nos momentos de aglomeração familiar. Reservatórios para o vírus ainda não foram encontrados, possivelmente este continue se replicando de forma mais amena em hospedeiros adultos ou em crianças durante o verão (KIM et al., 2015, AUSAR et al., 2005).

O hRSV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae*, gênero *Orthopneumovirus* (ADAMS et al., 2016), com nucleocapsídeo helicoidal circundado por um envelope lipídico externo onde se encontram as glicoproteínas de membrana. O genoma do RSV é constituído por RNA fita simples de polaridade negativa, não segmentada, composta por aproximadamente 15.200 nucleotídeos e 10 genes, que codificam 11 proteínas, devido a duas regiões de leitura aberta sobrepostas localizadas no gene M2, produzindo as proteínas M2-1 e M2-2 (COLLINS et al., 1991) (Figura 1).

Figura 1. Esquema da organização do RNA do Vírus Sincicial Respiratório (RSV).



Fonte: Modificada a partir de www.micro.msb.le.ac.uk.

Dentre as proteínas, duas não estruturais (NS1 e NS2) são responsáveis pela evasão da resposta imune; das oito proteínas estruturais, cinco (N, P, L, M2-1 e M2-2) formam o complexo nucleocapsídeo envolvido na replicação e transcrição viral e quatro (SH, M, G e F) estão associadas à membrana, sendo que as proteínas G e F são glicoproteínas com função de adesão e fusão do vírus com a célula hospedeira (JIN et al., 2000, WHITEHEAD et al., 1999). Assim, o processo de infecção viral ocorre

devido à ligação e fusão do vírus à célula, com duas proteínas em particular sendo importantes: proteína de ligação (G) e proteína de fusão (F), que são os alvos primários dos anticorpos do hospedeiro. A glicoproteína G medeia a ligação do vírus à célula do hospedeiro, em seguida a proteína F promove a fusão do vírus com a célula do hospedeiro e também promove a agregação de múltiplas células, dando origem a grandes células multinucleadas (produzindo o sincício, estrutura que dá nome ao vírus) (PETERS et al., 2008), permitindo a transmissão do vírus de célula a célula.

1.2 Importância da proteína M na infecção viral

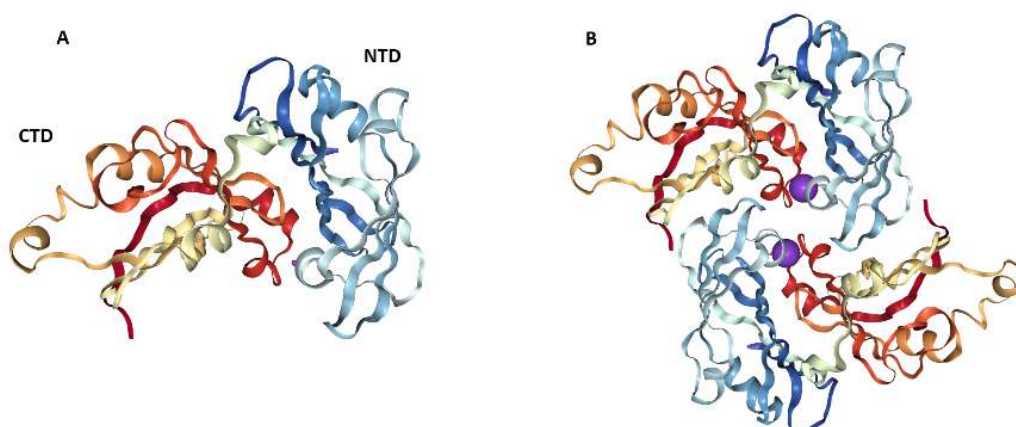
A proteína de matriz (M) do vírus sincicial respiratório humano é uma proteína estrutural não glicosilada composta por 256 aminoácidos. Esta envolve todo o complexo ribonucleoproteico (RNP, composto pelas proteínas L, N e P), localizando-se entre a proteína M2-1 e a bicamada lipídica viral (MARTY et al., 2004, KISS et al., 2014). 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 (KIPPER et al., 2015). Estudos indicam estreita relação entre a proteína M e a expressão do gene p53, que codifica um fator supressor de tumores que, por meio de uma cascata de ativação gênica, desencadeia a pausa no ciclo celular, quando expresso em grande quantidade. Portanto, a proteína M pode interromper a transcrição na célula infectada, enquanto o vírus replica seu material genético (IMANI, F., 2012). Em seguida, através de uma proteína de transporte nuclear diferente, como a CRM-1, a proteína de matriz viral migra do núcleo para o citoplasma, interage com M2-1, e juntas adentram corpos de inclusão, onde se encontram os complexos RNPs. Nesta etapa, ocorre a passagem da fase de transcrição viral para a de empacotamento, pois cessa-se a transcrição e a proteína M inicia a coordenação da etapa de brotamento viral (IMANI, F., 2012, MITRA et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2013).

Para o brotamento, a proteína M atua no empacotamento e transferência dos complexos RNPs, localizados dentro de corpos de inclusão, para regiões dejangadas lipídicas, onde ocorrerá a liberação dos novos vírions. Sendo assim, M é imprescindível para o brotamento viral, estimulando a curvatura ideal da membrana para o surgimento das partículas virais (RAY et al., 2016, SHAHRIARI et al., 2016).

Existem evidências na literatura que sugerem que a proteína M interage com o citoesqueleto da célula hospedeira, como a actina, para efetuar a condução do complexo formado entre RNP-M (SHAHRIARI et al., 2016, SHAHRIARI et al., 2018). A proteína M pode ainda interagir tanto com as glicoproteínas virais quanto com as do hospedeiro (CAV1, por exemplo) (KIPPER et al., 2015) e as conduzir conjuntamente à formação de um complexo. Para que o processo de endereçamento e brotamento seja bem-sucedido, a proteína M deve interagir não apenas com F, G e M2-1, mas também com N e P e outros fatores celulares. Esta interação possibilita sua oligomerização, assim como ocorre em proteínas de matriz dos demais *paramyxovirus*, conferindo à partícula viral um formato filamentosso típico quando próxima a membrana celular (MITRA et al., 2012, SHAHRIARI et al., 2016).

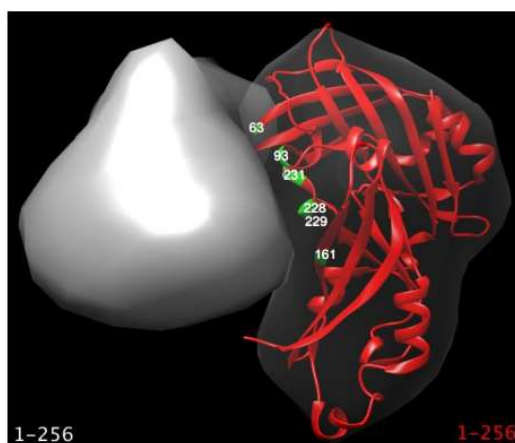
Estruturalmente, a proteína M é constituída por dois domínios distintos que são o N e C terminais, conectados por uma alça de 13 resíduos de aminoácidos (Figura 2). O domínio N-terminal possui formato de ferradura enquanto o C-terminal apresenta a configuração de um barril achatado, ambos contendo, majoritariamente, folhas β , com aparente sítio de ligação a metais bivalentes. Estudos mostraram que a proteína M pode interagir consigo mesma e realizar uma auto-oligomerização, possibilitando a formação de oligômeros pela interação entre a região N-terminal de uma proteína com a C-terminal de outra (BAJOREK et al., 2014, TREVISAN et al., 2018).

Figura 2 Estrutura da proteína M (PDB: 4V23) sendo que, (A) é a representação da estrutura monomérica da proteína com seus domínios CTD (domínio C-terminal) e NTD (domínio N-terminal) e (B) é a representação da proteína M dimérica, onde as esferas roxas indicam o local de co-cristalização do potássio.



A interface dos dímeros é compreendida pelos resíduos 63 a 68, 92 a 105, 129 a 134, 144, 163, 225 a 235. Já a treonina 205, modula a oligomerização da proteína M a partir de fosforilação mediada pela proteína P. Foi demonstrado, ainda, que todos os resíduos são necessários para a formação de um dímero estável (Figura 3) (FORSTER et al., 2015, TREVISAN et al., 2018). A carga residual positiva sobre os domínios de M pode possibilitar a sua interação com a membrana plasmática de pneumócitos, cuja carga residual é negativa, deixando algumas regiões hidrofóbicas expostas, que provavelmente servem para interagir com outras proteínas (MONEY et al., 2009a), corroborando com os dados da literatura a respeito das interações entre os monômeros da M, com outras proteínas virais e do hospedeiro.

Figura 3 Modelo dimérico da estrutura da proteína M evidenciando os aminoácidos essenciais para a dimerização da mesma.



Fonte: Adaptado de Trevisan, et al. (TREVISAN et al., 2018).

Desta forma, a proteína de matriz (M) tem grande importância no processo de infecção viral, no qual interage com diversas proteínas virais e celulares. Conhecer as características estruturais e conformacionais da proteína M em diversas condições físico-químicas é importante para o conhecimento dos estados oligoméricos e dinâmica que essa biomolécula apresenta em solução. Desta forma, o conhecimento deste comportamento pode elucidar a incongruência evidenciada quanto a cristalização da proteína em conformação monomérica (MONEY et al., 2009b) e dimérica (FORSTER et al., 2015). São reportados na literatura estudos do mesmo tipo realizados com a proteína M2-1 do HRSV, que demonstraram que variações de temperatura e pH podem induzir alterações em sua conformação, mudando assim seu

estado oligomérico (LEYRAT et al., 2014, ESPERANTE et al., 2011). O mesmo já foi realizado para a proteína não estrutural NS1, demonstrando mudanças conformacionais dependentes do pH (PRETEL et al., 2013).

5. Conclusões

Desta forma, conclui-se que a proteína foi produzida em quantidade e pureza satisfatória. Os experimentos permitiram compreender que a desnaturação térmica da proteína M, acompanhada pelo espectro de CD, é irreversível, provavelmente devido a formação de agregados, e possui temperatura de *melting* de aproximadamente 44 °C. Já nos experimentos com variação do pH, na faixa analisada, a proteína não apresenta desnaturação total, apenas parcial com duas transições, uma próxima ao pH 5,5 e 6 e outra próximo ao pH 8, sendo a segunda provavelmente devido ao ponto isoelétrico da proteína. Quanto a variação iônica acompanhada por DSC, a temperatura de *melting* encontrada foi de aproximadamente 50 °C. Com o aumento da concentração de sal, houve uma queda na temperatura de *melting*. Tal fenômeno pode se dar devido a duas hipóteses: a primeira pode ser devido a uma ligação sítio específica na interface entre os domínios da proteína e a segunda devido a uma ação global do sal na interface entre os monômeros, o que poderia desestabilizar o dímero. Os valores encontrados de variação de entalpia calorimétrica corroboram com as hipóteses dos valores encontrados de T_m.

Nota-se ainda que a proteína apresenta diversos comportamentos que até o momento, permanecem sem explicação. São estes: i) a dependência de concentração da proteína para apresentar certas características conformacionais, como persistência em aparecimento de dímeros quando em alta concentração mesmo após processo de desnaturação para SDS-PAGE e aparecimento de sinais indicativos de arranjo organizado em experimentos de DSC, que podem estar diretamente relacionados a oligomerização da proteína para a formação do capsídeo viral; ii) o fato de o aumento na concentração iônica desestabilizar a proteína, que acaba sendo uma exceção da regra, já que normalmente as proteínas são estabilizadas pela presença de sal, o que poderia estar intimamente ligado a maior estabilidade da proteína em sua forma dimérica. Por fim, são necessários mais estudos para que as hipóteses levantadas neste trabalho possam ser confirmadas e elucidadas, para então poder estabelecer uma correlação de como estes fatores podem influenciar o ciclo viral.

Referências

ADAMS; M. J.; LEFKOWITZ, E. J.; KING, A. M. Q.; et al. **Arch Virol.** 161: 2921. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2977-6>, 2016.

ALEXANDER GRAHAM BELL. **Inventor**, 1847-1922

AUSAR SF; REXROAD J; FROLOV VG; LOOK JL; KONAR N; MIDDAUGH CR. Analysis of the thermal and pH stability of human respiratory syncytial virus. **Mol Pharm** 2:491–499. 10.1021/mp0500465, 2005.

BAJOREK, M.; CALY, L.; TRAN, K.C.; MAERTENS, G.N.; TRIPP, R.A.; BACHARACH, E.; TENG, M.N.; GHILDYAL, R.; JANS, D.A. The Thr205 phosphorylation site within respiratory syncytial virus matrix (M) protein modulates oligomerization and virus production. **J. Virol.** 88, 6380–6393, 2014.

COLLINS P. The molecular biology of human respiratory syncytial viruses (RSV) of the genus *Pneumovirus*, In D. W. Kingsbury (ed), The paramyxoviruses. **Plenum Publishing**, New York, N. Y. 103-162, 1991.

COLLINS, P. L.; B. S. GRAHAM. *Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis*. **J Virol.** 8. 82 (5): p. 2040-55, 2008.

CORONADO, M. A., I. P. CARUSO,, R. J. EBERLE. Cold shock pro-teín A from *Corynebacterium pseudotuberculosis*: role of electrostatic forces in the stability of the secondary structure. **Protein Pept. Lett.** 24:358–367, 2017.

ESPERANTE, S. A.; CHEMES, L. B.; SANCHEZ, I. E.; DE PRAT-GAY, G. The respiratory syncytial virus transcription antiterminator M(2-1) is a highly stable, zinc binding tetramer with strong pH-dependent dissociation and a monomeric unfolding intermediate. **Biochemistry**, 50, 8529–8539, 2011.

FALSEY A.R.; HENNESSEY P.A.; FORMICA M.A.; COX C.; WALSH E.E. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N. Engl. J. Med.* 352 (17):1749–59, 2005.

FORSTER, A.; MAERTENS, G.N.; FARRELL, P.J.; BAJOREK, M. Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. **J. Virol.** 89, 4624–4635, 2015.

FORSTER, A.; MAERTENS, G.N.; FARRELL, P.J.; BAJOREK, M. Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. **J. Virol.** 89, 4624–4635, 2015.

HALL C.B., WEINBERG G.A., IWANE M.K., BLUMKIN A.K., EDWARDS K.M., STAAT M.A., AUINGER P., GRIFFIN M.R., POEHLING K.A., ERDMAN D., GRIJALVA C.G., ZHU Y., SZILAGYI P. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 360:588–598. 10. 1056/NEJMoa0804877, 2009.

HALL, C. B. AND R. G. DOUGLAS, JR. *Modes of transmission of respiratory syncytial virus.* **J Pediatr**,. 99 (1): p. 100-3. 1981.

HALL, C. B.; R. G. DOUGLAS, JR.; GEIMAN J. M. *Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus.* **J Infect Dis.** 141 (1): p. 98-102,1980.

HEIKKINEN T.; VALKONEN H.; WARIS M.; RUUSKANEN O. Transmission of Respiratory Syncytial Virus Infection Within Families, **Open Forum Infectious Diseases**, Volume 2, Issue 1, 1 January, ofu118, <https://doi.org/10.1093/ofid/ofu118>, 2015.

IMANI, F.; Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Induces Lung Epithelial Cell Cycle Arrest through a p53 Dependent Pathway. v. 7, n. 5, p. 1–9, 2012.

JEANNE H.; SCHICKLI, F. D. Challenges in developing a pediatric RSV vaccine. **Human vaccines**, v. 5, n. 9, p. 582–91, 2009.

JIN, H.; ZHOU, H.; CHENG, X.; et al. Recombinant Respiratory Syncytial Viruses with Deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 Genes Are Attenuated in Vitro and in Vivo. **Virology**, v. 273, n. 1, p. 210–218. doi: 10.1006/viro.2000.0393, 2000.

KIM YI; MURPHY R; MAJUMDAR S; HARRISON LG; AITKEN J; DE VINCENZO JP. Relating plaque morphology to respiratory syncytial virus subgroup, viral load, and disease severity in children. **Pediatr Res** 78:380–388. 10. 1038/pr. 2015. 122, 2015.

KIM, Y.J.; BOECKH, M.; ENGLUND, J. A. Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 28, n. 2, p. 222–242. doi: 10.1055/s-2007-976494, 2007.

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

KISS, G.; ET AL. Structural analysis of respiratory syncytial virus reveals the position of M2-1 between the matrix protein and the ribonucleoprotein complex. **J. Virol.** 88, 7602–7617 (2014).

LEYRAT, C.; RENNER, M.; HARLOS, K.; HUISKONEN, J. T.; GRIMES, J. M. Drastic changes in conformational dynamics of the antiterminator M2-1 regulate transcription efficiency in Pneumovirinae. **eLife**, No. e02674, 2014.

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.** 149, 199–210, 2004.

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, 2009a.

MONEY, V.A.; MCPHEE, H.K.; MOSELY, J.A.; SANDERSON, J.M.; YEO, R.P. Surface features of a mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 4441–4446. 2009 b.

OLIVEIRA, A. P.; et al. Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in. **Virus Research**, *v.* 177, *n.* 1, p. 108–112, 2013.

OLSSON, U.; WOLF-WATZ, M. Overlap between folding and functional energy landscapes for adenylate kinase conformational change, **Nature Communications**, *v.* 16, p. 111–119, 2010.

PAYNTER S. 2015. Humidity and respiratory virus transmission in tropical and temperate settings. **Epidemiol Infect** 143:1110–1118. 10.1017/S0950268814002702. Department of Health. 11 October. Australian influenza surveillance report and activity updates. Department of Health, Australian Government, Canberra, Australia, 2016.

PETERS, T. R.; J. E. CROWE, JR. Respiratory syncytial virus. In *Principles and practice of pediatric infectious diseases*, eds. S. S. Long, L. K. Pickering, C. G. Prober, 1112-16. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2008.

PRETEL E.; CAMPOREALE G, DE PRAT-GAY G. The Non-Structural NS1 Protein Unique to Respiratory Syncytial Virus: A Two-State Folding Monomer in Quase Equilibrium with a Stable Spherical Oligomer. **PLoS**. September, Volume 8, Issue 9, e74338, 2013.

RAY, G.; SCHMITT, T.; SCHMITT, P. Nucleocapsid Proteins Determine Matrix Protein Compatibility and. v. 90, n. 7, p. 3650–3660, 2016.

SHAHRIARI, S.; GORDON, J.; GHILDYAL, R. Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding. **Virology Journal**, p. 1–11, 2016.

SHAHRIARI, S.; WEI, K. J.; GHILDYAL, R. Respiratory syncytial virus matrix (M) protein interacts with actin in vitro and in cell culture. **Viruses** 10:E535. doi: 10.3390/v10100535, 2018.

SHAY, D. K.; HOLMAN, R. C.; NEWMAN, R. D.; et al. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. **JAMA**, v. 282, n. 15, p. 1440–1446, 1999.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Analytical Biochemistry**, v. 282, p. 252-260, 2000.

THOMPSON WW; SHAY DK; WEINTRAUB E; BRAMMER L; COX N; et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. **JAMA** 289 (2):179–86, 2003.

TREVISAN, M.; DI ANTONIO, V.; RADEGHIERI, A.; PALÙ, G.; GHILDYAL, R.; ALVISI, G. Molecular requirements for self-interaction of the respiratory syncytial virus matrix protein in living mammalian cells. **Viruses**, 10, 109, 2018.

WHITEHEAD, S. S.; BUKREYEV, A.; TENG, M. N.; et al. Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 3438–3442, 1999.

WU, H.; PFARR, D. S.; JOHNSON, S.; et al. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, n. 3, p. 652–665. doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.024, 2007.

YANG L; CHAN KH; SUEN LK; CHAN KP; WANG X; CAO P; HE D; PEIRIS JS; WONG CM. Age-specific epidemic waves of influenza and respiratory syncytial virus in a subtropical city. **Sci Rep** 5:10390. 10. 1038/srep10390, 2015.

ZHAN, X.; HURWITZ, J. L.; KRISHNAMURTHY, S.; et al. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein expressed by recombinant Sendai virus elicits B-cell and T-cell responses in cotton rats and confers protection against RSV subtypes A and B. **Vaccine**, v. 25, n. 52, p. 8782–8793. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.10.038, 2007.