

TÁBATA DI LENARDO DIAS

**Ações da proteína M do vírus respiratório sincicial humano na célula
hospedeira**

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Armando Morais Ventura

São Paulo

2023

RESUMO

DIAS, Tábata di Lenardo. **Ações da proteína M do vírus respiratório sincicial humano na célula hospedeira.** 107 folhas. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) é um dos patógenos mais importantes do trato respiratório, causando doença respiratória principalmente em recém-nascidos e bebês. O genoma do HRSV codifica onze proteínas, sendo fundamental para entender a sua relação com o hospedeiro, caracterizar as interações entre essas proteínas e os componentes celulares. Em nosso laboratório têm sido acumulados dados sobre a interação desse vírus com células em cultura. Esses dados indicam que ocorre interação entre a proteína de Matriz (M) e Tropomiosina 3 (TPM 3), e estudos utilizando microscopias de imunofluorescência e confocal, mostraram que o vírus modifica o padrão de localização de TPM 3. O objetivo deste projeto foi estudar o efeito que a proteína de Matriz exerce na célula hospedeira, através de: novas análises de interação entre M e TPM 3, estudo de expressão gênica realizado por sequenciamento de nova geração, e análise de danos ao DNA relacionados a ações da proteína M. Quanto à expressão genica, já foi demonstrado que a proteína M se encontra no núcleo no início da infecção e lá ela interfere na transcrição das células infectadas no hospedeiro, mas esse mecanismo e suas vias são incertos. Quanto aos danos no DNA, a hipótese é que M pode estar envolvida, tendo como base estudos que já demonstraram que o HRSV induz quebras de fita dupla. Durante o desenvolvimento do trabalho, conseguimos demonstrar a importância da proteína Tropomiosina 3 para a viabilidade do vírus, através de ensaios de superexpressão da Tropomiosina, que levaram a um desarranjo dos corpúsculos de inclusão do vírus. Também verificamos que uma droga que desestabiliza a Tropomiosina 3 (TR100) faz com que a produção de proteínas virais seja reduzida, além de mudar a morfologia dos corpúsculos de inclusão. Finalmente, fizemos um ensaio de transcriptoma em células que expressam apenas a proteína M. Esses dados indicam que ocorre um efeito de repressão da expressão de diversos conjuntos de genes, notadamente os relacionados à resposta imune inata.

Palavras-chave: Vírus Respiratório Sincicial Humano, Matriz, Tropomiosina 3, danos no DNA, Transcriptoma.

ABSTRACT

DIAS, Tábata di Lenardo. Actions of the Matrix Protein M of Human Respiratory Syncytial Virus on the Host Cell. 107 pages. Thesis (Ph.D. in Microbiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is one of the most important pathogens in the respiratory tract, causing respiratory illness primarily in newborns and infants. The HRSV genome encodes eleven proteins, and understanding its relationship with the host is crucial for characterizing interactions between these proteins and cellular components. Our laboratory has accumulated data on the virus's interaction with cultured cells. These data indicate an interaction between Matrix protein (M) and Tropomyosin 3 (TPM 3), and studies using immunofluorescence and confocal microscopy have shown that the virus modifies the localization pattern of TPM 3. The aim of this project was to study the effect that the Matrix protein has on the host cell through new analyses of the interaction between M and TPM 3, gene expression study conducted by next-generation sequencing, and analysis of DNA damage related to the actions of the M protein. Regarding gene expression, it has been demonstrated that the M protein is initially located in the nucleus during infection, where it interferes with the transcription of infected cells in the host, but the mechanism and pathways are uncertain. Regarding DNA damage, the hypothesis is that M may be involved, based on studies that have shown that HRSV induces double-strand breaks. During the work, we demonstrated the importance of Tropomyosin 3 for the virus's viability through Tropomyosin overexpression assays, leading to a disarrangement of viral inclusion bodies. We also found that a drug destabilizing Tropomyosin 3 (TR100) reduces viral protein production and alters the morphology of inclusion bodies. Finally, we conducted a transcriptome assay in cells expressing only the M protein. These data indicate a repression effect on the expression of various gene sets, notably those related to the innate immune response.

Keywords: Human Respiratory Syncytial Virus, Matrix, Tropomyosin 3, DNA damage, Transcriptome.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais

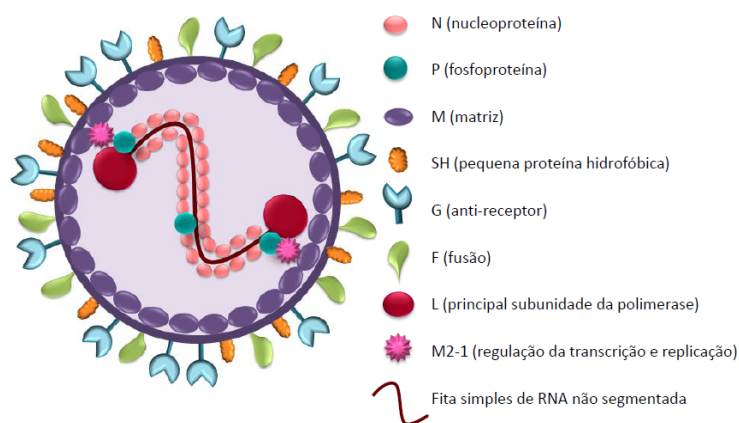
O Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV, sigla do inglês) foi isolado em humanos em 1956 (CHANOCK et al., 1957). O HRSV pertence à ordem Mononegavirales, família Pneumovirinae, gênero Orthopneumovirus, de acordo com as normas do International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) (AMARASINGHE et al., 2019).

O HRSV é o agente patogênico mais importante causador de doença respiratória severa em recém-nascidos, bebês e crianças, além de pacientes imunocomprometidos e idosos (FALSEY, WALSH, 2000). A sintomatologia da doença durante a infecção primária pelo HRSV pode variar muito, como manifestações clínicas típicas de um resfriado comum, incluindo congestão nasal, tosse, falta de ar, febre, bronquiolite e pneumonia (COLLINS, GRAHAM, 2008).

Devido ao impacto socioeconômico mundial do HRSV, torna-se fundamental seu estudo visando à prevenção da infecção.

O HRSV esquematizado à Figura 1 é um vírus envelopado cujo genoma consiste em uma fita simples de RNA não segmentada e com polaridade negativa.

Figura 1 - Esquema da partícula viral do HRSV.



Fonte: Produção própria; Dias, 2017.

1.2 Estrutura e Genoma Viral

O vírion contém um genoma viral de RNA único de sentido negativo e não segmentado com cerca de 15,2 kb. O genoma completo possui 10 genes que codificam 2 proteínas não estruturais e 9 proteínas estruturais (um total de 11 proteínas): a NS1 e NS2 (não

estruturais), N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (matriz), SH (pequena proteína hidrofóbica), G (anti-receptor), F (fusão), M2-1 e M2-2 (regulação da transcrição e replicação) e L (principal subunidade da polimerase) (COLLINS et al., 2001). O genoma está esquematizado à Figura 2.

Figura 2 - Proteínas e genoma do HRSV, cepa A2.



Esquema do genoma. Fonte: Battles; McLellan, (2019).

F, G e SH são glicoproteínas transmembrânicas do envelope (PRETEL et al., 2013). A proteína G conecta os vírions às células-alvo interagindo com moléculas na superfície das células hospedeiras (BOHMWALD et al., 2016) enquanto F medeia a penetração viral bem como a fusão entre células infectadas e seus vizinhos (COLLINS; MELERO, 2011a), além disso, a proteína F é essencial para a fusão de células infectadas com células vizinhas, levando à formação de sincícios (SHANG; TAN; MA, 2021). Enquanto a proteína G é antigenicamente variável, a proteína F é altamente conservada, mas possui estruturas conformacionais pré e pós-fusão diferentes (TALEB et al., 2018). É principalmente por causa dessas diferenças na proteína G que o HRSV é classificado em dois grupos antigênicos, A e B (COLLINS; MELERO, 2011a).

A proteína SH (*small hydrophobic protein*), é uma proteína com 64-65 aminoácidos e está localizada na superfície do vírus. Pertence à família de proteínas virais pequenas altamente hidrofóbicas que são capazes de formar canais iônicos em membranas celulares (GAN et al., 2008), outra característica descrita para a SH é um efeito anti-apoptótico que promove a replicação viral (FUENTES et al., 2007). A deleção do gene SH é frequentemente usada para atenuar cepas candidatas de vacinas vivas contra o HRSV (BOYOGLU-BARNUM; CHIRKOVA; ANDERSON, 2019).

Na superfície interna da membrana está a proteína de matriz que desempenha um papel fundamental na montagem de partículas de vírus. Os papéis de M no processo de montagem viral incluem uma função de reunir o complexo ribonucleoprotéico (RNP) e o envelope viral (MITRA et al., 2012a).

O complexo ribonucleoprotéico (RNP), ou nucleocapsídeo, é um complexo formado pela molécula de RNA associada com as proteínas N, P, L e M2-1 que juntos regulam a transcrição e replicação do RNA viral. A nucleoproteína (N) é a mais abundante, interage fortemente com o RNA e tem a função de o proteger de clivagem por componentes do hospedeiro (COLLINS et al., 2001). Outra proteína que constitui o nucleocapsídeo é a fosfoproteína (P) que é um co-fator essencial da polimerase, a proteína “*large*” (L) que contém o sítio ativo de polimerização, sendo que P age como uma espécie de fator de transcrição (STEC et al., 1991). A L é a proteína viral menos expressa de todas nas células hospedeiras infectadas, ela contém três domínios enzimáticos conservados: um domínio de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), um domínio de polirribonucleotídeo transferase (PRNTase) e um domínio de metiltransferase (MTase), que catalisa a metilação do cap (SHANG; TAN; MA, 2021). Os papéis principais desta proteína são a replicação e a transcrição do genoma viral, regulados e suportados pelo complexo RNP (GROSFELD et al., 1995). O gene M2 tem duas ORFs sobrepostas que produzem as proteínas M2-1 e M2-2. A proteína M2-1 como parte do complexo RNP também está envolvida no processo de transcrição e atua como um fator de anti-terminação que promove a transcrição dos genes do HRSV, ajudando a proteína L a prosseguir com a transcrição de genes virais (BOHMWALD et al., 2016). Já M2-2 é uma proteína que regula a transição da transcrição para a replicação do genoma (SHANG; TAN; MA, 2021).

A proteína NS1 consiste em 139 aminoácidos, enquanto a NS2 é ligeiramente menor, com 124 aminoácidos (THORNHILL; VERHOEVEN, 2020). As proteínas NS1 e NS2 não estão presentes no vírion maduro e ambas desempenham um papel importante na fuga da resposta imune inata (TALEB et al., 2018). A região estrutural de NS1 está envolvida na regulação da resposta do hospedeiro, incluindo a inibição da resposta de interferon tipo I (IFN), inibição da maturação das células dendríticas e promoção da resposta inflamatória já NS2 pode se ligar e inibir a ubiquitinação das formas inativas do receptor retinoico ácido-induzível gene-I (RIG-I) e proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (MDA5) e prevenir a produção de sinais *downstream* e IFN tipo I (SHANG; TAN; MA, 2021).

1.3 Ciclo replicativo

Assim como para os demais membros da família Pneumovirinae, tanto a transcrição quanto a replicação, ocorrem por inteiro no citoplasma da célula alvo. O ciclo replicativo do HRSV envolve várias etapas que são cruciais para a sua propagação no hospedeiro humano.

O ciclo se inicia com a adsorção e ligação do vírus à célula hospedeira, isso ocorre através da interação entre proteínas virais, como a proteína G e a proteína F, e receptores específicos nas células hospedeiras (COLLINS; MELERO, 2011a). A infecção se inicia com a ligação da glicoproteína G que interage com proteoglicanos de heparan sulfato e glicosaminoglicanos condroitina sulfato B (GAG)(LAMBERT, 1988). Após a ligação inicial da proteína G, a proteína F viral é ativada. A proteína F desempenha um papel crucial na fusão das membranas virais com as membranas celulares. Ela entra em contato com seu receptor nucleolina (TAYYARI et al., 2011) e passa por uma mudança conformacional que permite a fusão das duas membranas, permitindo assim que o genoma viral seja liberado na célula hospedeira (BATTLES; MCLELLAN, 2019).

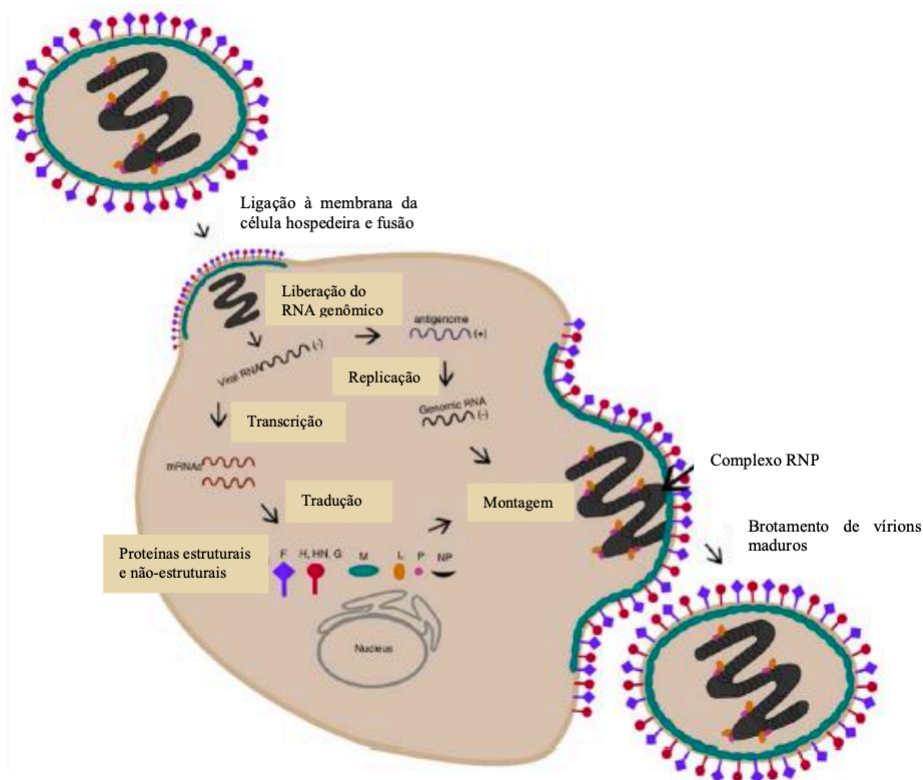
Após a fusão das membranas, o RNA negativo de fita simples do HRSV é liberado no citoplasma da célula hospedeira. Tanto a transcrição quanto a replicação são orquestradas por um único promotor localizado na região 3' líder (Le) do genoma. A transcrição é realizada pela RNA polimerase dependente de RNA, uma complexa enzima composta por duas subunidades, L e P. Esta enzima inicia a síntese de RNA diretamente a partir do genoma viral de sentido negativo (3' - 5'), gerando moléculas de mRNAs monocistrônicos que são marcadas com cap e poliadeniladas (COLLINS; MELERO, 2011b). A replicação viral envolve a formação de um antígenoma (5' - 3') intermediário, que serve como modelo para a síntese de RNA complementar positivo, que é utilizado para produzir novas cópias do genoma viral e proteínas virais (SWANSON et al., 2011). O complexo de proteínas L-P desempenha um papel essencial no processamento desse RNA positivo, pois é ele que é responsável pelo *capping*, metilação da extremidade 5' dos mRNAs, e a poliadenilação da região 3' (COLLINS; MELERO, 2011). Os recém-formados RNAs genômicos são encapsulados com a nucleoproteína do (N) à medida que são sintetizados (COWTON; MCGIVERN; FEARN, 2006).

Células infectadas pelo HRSV desenvolvem corpúsculos de inclusão citoplasmáticos esféricos (IBs). Esses corpúsculos contêm as proteínas virais do

complexo da polimerase N, P, M2-1 e L, bem como o RNA viral. Os corpúsculos de inclusão são os locais de síntese de RNA viral, ou seja, replicação e transcrição, além de também reterem componentes-chave de sinalização celular e, assim, inibem as respostas celulares à infecção (COLLINS; MELERO, 2011, GALLOUX et al., 2020).

A montagem do vírus, após transcrição e replicação do RNA viral, depende da localização da proteína M e ocorre na membrana plasmática em domínios ricos em colesterol (BOHMWALD et al., 2016). Essas regiões contêm microdomínios lipídicos modificados pelo vírus que envolvem as três proteínas de superfície viral e a proteína M (COLLINS; MELERO, 2011). A proteína M se associa com o complexo ribonucleoproteico através da proteína M2-1, e se liga à parte interna do envelope através da cauda citoplasmática da proteína G para fazer a montagem do vírus (MITRA et al., 2012b). A figura 3 mostra um esquema do ciclo de replicação do HRSV.

Figura 3 - Ciclo de replicação do HRSV.



Fonte: Shahriari et al. (2016), modificado.

1.4 Patogênese e Epidemiologia

A infecção por HRSV, normalmente imita a de uma constipação comum, com sintomas que lembram a gripe, mas pode ficar mais severa e é frequentemente mais

grave em bebês e idosos (RSV Sintomas Care, 2018). As características clínicas da infecção podem ser difíceis de distinguir das da gripe, mas incluem congestão nasal, tosse, respiração ofegante e febre baixa. Um dos sintomas para os casos mais graves é a bronquiolite, que é a inflamação dos bronquíolos no pulmão e é a principal razão pela qual as crianças precisam de hospitalização (THORNHILL; VERHOEVEN, 2020).

O HRSV é transmitido principalmente por contato direto com as secreções de um indivíduo infectado através das membranas nasofaríngeas ou oculares. Partículas em aerossol também são uma possível via de transmissão. O HRSV normalmente ocorre sazonalmente nos meses de outono e inverno (BOURASSA; LANDS, 2023).

As infecções pelo HRSV têm distribuição mundial e ocorrem anualmente, estima-se que ocorra uma incidência anual de aproximadamente 34 milhões de casos de infecção respiratória inferior aguda associada com infecção por HRSV em crianças menores de 5 anos. Pouco mais de 3 milhões de episódios resultam em hospitalização e entre 66.000 e 199.000 episódios resultaram em morte (NOLAN et al., 2015).

Dentre os vírus que causam doenças respiratórias inferiores graves, o HRSV foi o vírus mais importante, principalmente em crianças desfavorecidas socioeconomicamente, em São Paulo (DI PAOLA et al., 2018). Normalmente o surto anual ocorre entre os meses de que compreendem o outono e inverno (VIEIRA et al., 2001). No Brasil, o HRSV foi detectado em 41,8% dos pacientes menores de 2 anos com infecção do trato respiratório inferior (DI PAOLA et al., 2018).

Mundialmente, o HRSV é responsável por cerca de 60.000 mortes hospitalares anualmente em crianças com menos de 5 anos de idade (BATTLES; MCLELLAN, 2019). Só nos Estados Unidos, a taxa de pessoas infectadas por HRSV, resulta em mais de 57.000 hospitalizações e 2 milhões de consultas ambulatoriais a cada ano entre crianças com idade menor de 5 anos (ROSE et al., 2018). De 1993 a 2008, a taxa de hospitalização de pessoas de todas as faixas etárias, foi de 55 a 100.000 pessoas por ano, o que é ligeiramente menor do que a taxa de pessoas infectadas por influenza, de 64 a 100.000 pessoas (MENG et al., 2014).

Já a taxa de hospitalização em bebês é de 1–2% de todas as causas, isso representa 2.345 - 100.000 bebês por ano, sendo que a taxa para a gripe é de 150 bebês (MENG et al., 2014). Uma em cada 13 crianças com menos de cinco anos de idade nos EUA necessitou de cuidados médicos para o HRSV todos os anos, e 60% das visitas ao consultório eram para crianças entre os 2 e os 5 anos de idade (MENG et al., 2014).

Para os idosos, que também são comumente mais afetados pela doença, as evidências epidemiológicas indicam que o impacto do HRSV pode ser semelhante ao da gripe não pandêmica (FALSEY; WALSH, 2005). Em lares para idosos as taxas de infecção são de 5–10% ao ano, com taxas significativas de pneumonia (10–20%) e morte (2–5%). Idosos imunocomprometidos ou com doenças cardíacas e pulmonares subjacentes correm maior risco de pneumonia e morte relacionadas à infecção por HRSV.

1.5 Prevenção e Tratamento

Devido ao impacto socioeconômico mundial do HRSV, torna-se fundamental seu estudo visando à prevenção da infecção. Desde a sua identificação, há 60 anos, o HRSV tem sido uma prioridade na pesquisa de vacinas, e o seu desenvolvimento foi sido dificultado por vários fatores como a alta taxa de reinfeção (RAMEIX-WELTI et al., 2014).

A primeira vacina contra HRSV testada em ensaio clínico, em 1966, teve um resultado fora do esperado. Ela consistia em um vírus inativado por formalina (FI-RSV), e os testes pré-clínicos foram realizados em diversos animais com resultados satisfatórios. Foi administrada em 23 crianças com idade entre 2 e 7 meses. Contudo, a FI-RSV não induziu uma resposta adequada de anticorpos neutralizantes e resistência à infecção nas crianças, além de levar ao desenvolvimento de doença pulmonar mais grave e infiltração peribronquiolar de eosinófilos, levando à morte de dois bebês de 14 e 16 meses, após infecção natural pelo HRSV (CLARK; GUERRERO-PLATA, 2017)

Já existem duas vacinas recentemente aprovadas para adultos com mais de 60 anos. Essas vacinas são subunidades bivalentes baseadas na proteína F e estabilizada, para ambos os grupos A e B. As vacinas foram aprovadas nos Estados Unidos, Europa e Canadá em 2023 (BOURASSA; LANDS, 2023). Os ensaios clínicos demonstraram a eficácia na prevenção de doenças sintomáticas do trato respiratório inferior associadas ao HRSV em adultos com idade acima de 60 anos (MELGAR et al., 2023).

Além disso, com os avanços em pesquisas com RNA mensageiro (mRNA), principalmente na batalha global contra a pandemia da COVID-19, vacinas de mRNA se demonstraram altamente eficazes e foram aprovadas e utilizadas a nível mundial (LI et al., 2023). Com isso, esforços mais recentes têm tentado desenvolver esse tipo

de vacina para o HRSV. Utilizando tecnologia proprietária de mRNA modificado da Moderna Inc, um novo estudo desenvolveu uma vacina que consiste em quatro lipídios e mRNA que codifica uma forma projetada da proteína F do HRSV estabilizada em sua conformação de pré-fusão. Os lipídios protegem o mRNA da degradação o que permite que o mRNA seja entregue nas células. Uma vez inserido nas células hospedeiras, o RNA mensageiro pode ser traduzido na proteína F e estimular respostas imunitárias humorais e celulares. Os resultados dos ensaios clínicos pré-clínicos e de Fase I indicam que esta vacina é uma abordagem promissora da vacina contra o HRSV (LI et al., 2023).

Por enquanto, a forma de tratamento mais efetiva na infecção pelo HRSV é o uso de um anticorpo monoclonal humanizado do isotipo IgG1 contra a proteína F, o Palivizumab (Synagis™; MedImmune), que é a única terapia profilática aprovada e utilizada em populações de alto risco para tratar e prevenir infecções por HRSV. Ele é um neutralizador do vírus pois inibe a entrada do vírus na célula impedindo a fusão entre a partícula viral e a membrana da célula hospedeira (SOTO et al., 2020). Esse produto não impede necessariamente a infecção por HRSV, mas pode restringir a replicação o suficiente para reduzir a doença (COLLINS; MELERO, 2011a). Os anticorpos são explorados como uma estratégia para prevenir a infecção por HRSV em populações de alto risco. Vários estudos, porém, mostram que o custo do Palivizumab é muito alto em relação aos benefícios que ele gera, restringindo seu uso em larga escala (SIDWELL; BARNARD, 2006). Por esta razão, ainda é essencial explorar novas opções que possam proporcionar melhores relações custo/benefício, até que uma vacina esteja disponível.

Mais recentemente, temos um novo anticorpo monoclonal, o nirsevimab, que foi aprovado para comercialização no Reino Unido em novembro de 2022 e, mais recentemente, na América do Norte, para prevenir o HRSV em neonatos e lactentes. Em contraste com o pavalizumab, o nirsevimab tem como alvo específico a proteína pré-F e tem uma meia-vida prolongada devido a substituições triplas de aminoácidos na região cristalizável do fragmento da proteína. O estudo mostrou proteção em bebês saudáveis e prematuros contra infecções do trato respiratório inferior, bem como em internações hospitalares associadas ao HRSV grave, após receberem uma dose de nirsevimabe com base no peso (BOURASSA; LANDS, 2023).

Além dos anticorpos monoclonais temos também a ribavirina, que foi a primeira droga licenciada para o tratamento da infecção por HRSV em humanos. Ela é um

análogo da guanosina com uma ampla gama de atividade antiviral, incluindo o HRSV. Ela interfere com a replicação tanto de vírus com genoma de RNA como de DNA. Para o vírus da influenza, foi caracterizada sua facilidade em ser rapidamente fosforilada por enzimas intracelulares e de sua forma trifosfatada inibir a atividade da RNA polimerase do vírus, além do *capping* 5' do mRNA viral (ISON, 2017). No entanto, o seu uso na clínica é muito limitado pois sua eficácia é controversa e não é recomendada para uso rotineiro por sua alta toxicidade (COLLINS; MELERO, 2011).

1.6 Dados anteriores do laboratório

A caracterização de interações entre as proteínas virais e componentes celulares é de extrema importância para o entendimento da relação entre o HRSV e seu hospedeiro.

No laboratório o HRSV é o modelo de estudo para responder perguntas visando contribuir para o entendimento da interação vírus-célula, o que pode levar à caracterização de novos alvos terapêuticos. A clonagem dos genes virais para a expressão em células eucariotas foi o ponto de partida para essas abordagens experimentais. Em trabalhos iniciais as tentativas de expressar os genes de HRSV em células de mamíferos foram frustrantes. Dados da literatura indicaram que pelo fato dos genes desses vírus não sofrerem pressão evolutiva para serem expressos a partir no núcleo, muitas vezes possuem em sua sequência motivos de instabilidade de RNA, baixo conteúdo CG, sinais de poliadenilação e processamento espúrios, além de um baixo *codon adaptation index* (TERNETE et al., 2007).

A partir disso encomendou-se a síntese dos genes de N, P e M com a sequência nucleotídica otimizada para a expressão eficiente em células de mamífero, estes foram sub-clonados de modo a ter essas proteínas expressas em fusão com o peptídeo FLAG (SIMABUCO et al, 2009, SIMABUCO, 2009, TAMURA 2009). Isso possibilitou utilizar a técnica de co-imunoprecipitação das proteínas celulares associadas a essas proteínas virais utilizando anticorpo anti-FLAG, seguida de espectrometria de massas. Foram selecionadas as proteínas identificadas que tiveram maior porcentagem de cobertura, para análises confirmatórias por co-imunoprecipitação seguida de *western blotting* com anticorpos específicos. As interações foram primeiro confirmadas utilizando transfecção com os vetores de expressão dos genes virais otimizados para expressão em células humanas, seguidas de imunoprecipitação com anti-FLAG, e detecção com anticorpos contra as proteínas

celulares. A segunda abordagem foi imunoprecipitar extratos de células infectadas pelo vírus com os anticorpos contra as proteínas celulares identificadas, seguindo-se a detecção com anticorpos contra as proteínas virais. As interações confirmadas mostraram que a proteína N interage com a proteína do choque térmico Hsp70 e com as proteínas do metilossomo WDR77 e PRMT5; P interage com Hsp70 e com Tropomiosina (isoforma 3); e M com as proteínas Nucleofosmina e Tropomiosina (OLIVEIRA et al., 2013).

Outra abordagem foi clonar esses genes em vetores para expressão bacteriana, o que permite o estudo das interações entre proteínas purificadas *in vitro*. Dos dados de espectrometria de massas das imunoprecipitações das proteínas celulares interagentes mencionadas acima, foram obtidos os números de acesso do Uniprot (SIMABUCO, 2009; TAMURA, 2009). De posse das sequências de aminoácidos, foram encomendados genes sintéticos com *codon usage* otimizado para expressão em bactérias. Esses genes foram subclonados nos vetores de expressão bacteriana pET28a (Novagen) e pGex-4T-3 (GE Healthcare), em que os peptídeos têm adicionados cauda His ou GST ao amino terminal, respectivamente. A expressão das construções em pGex foi testada e em todas foi possível ver a expressão dos peptídeos (Oliveira, Eleouet, Fix, Galloux e Ventura, dados não publicados). As interações *in vitro* recentemente abordadas em outros trabalhos no laboratório foram de Hsp70 com N e P (OLIVEIRA, 2013), do metilossomo com N (OGAWA, 2016), da Tropomiosina 3 com M (DIAS, 2017) e da Nucleofosmina com M (BARBOSA, 2022), sendo que ambas revelaram potenciais alvos terapêuticos testados com inibidores tanto da Hsp70 (MUNDAY et al., 2015a), da metil-transferase presente no metilossomo (OGAWA, 2016), e da Tropomiosina 3 (DIAS, 2017).

1.7 Proteína viral e celular abordadas neste estudo

- Proteína de Matriz

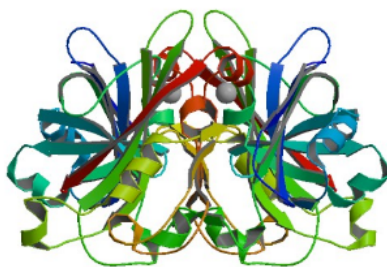
A proteína de matriz (M) é uma proteína do HRSV não glicosilada e faz parte da estrutura interna, desempenhando um papel central na infecção. Ela é menor do que as M de outros paramyxovírus (256 aa em comparação com 335-375 aa) (GHILDYAL; HO; JANS, 2006b). Entre as propriedades da proteína podemos destacar uma região comum de baixa hidrofobicidade no N terminal, seguida de um aumento gradual no valor da hidrofobicidade em direção ao C terminal, que inclui uma região altamente hidrofóbica. As regiões hidrofóbicas são menores do que o mínimo necessário para

um domínio transmembrana, mas podem mediar a ligação periférica à membrana da célula hospedeira (COLLINS et al., 2001).

A proteína M está relacionada com a maturação dos filamentos virais e é importante para a organização dos componentes do virion na membrana plasmática e para o tráfico de proteínas virais para o local de brotamento sendo essencial para a montagem das partículas virais na replicação do HRSV (MITRA et al., 2012a). M também pode silenciar a síntese de RNA viral em preparação para o empacotamento da partícula viral (COLLINS; MELERO, 2011a; FIELDS, 2013). Alguns estudos mostram que a proteína M interage com a proteína M2-1, mediando a ligação com o complexo RNP, além de interagir com as proteínas G e F para sinalizar a montagem dos virions (BOHMWALD et al., 2016).

A proteína M em solução e em cristais forma dímeros sugerindo que sua unidade de montagem biologicamente relevante é dimérica (Figura 4). A dimerização e oligomerização adequadas de M são críticas para o brotamento viral. Estudos com mutações de M na interface de dimerização demonstram uma interrupção na formação de filamentos semelhantes a vírus na superfície de células transfectadas, abolindo a liberação de partículas semelhantes a vírus (VLPs) (FÖRSTER et al., 2015).

Figura 4 - Dímero da proteína de matriz



Representação estrutural da proteína de matriz dimérica baseado em dados de cristalografia com o PDB 4V23 (FÖRSTER et al., 2015).

O HRSV é um vírus citoplasmático, porém, a proteína M localiza-se no núcleo das células infectadas no início da infecção (GHILDYAL; MILLS; MEANGER, 2003), onde ela está inibindo a transcrição da célula hospedeira (LI et al., 2021a). M utiliza a via de importação nuclear convencional dependente do receptor de importação nuclear importina β 1 (IMP β 1) e a proteína de ligação de nucleotídeo de guanina Ran para se localizar no núcleo, e sai do núcleo por meio de uma via dependente de sequência de exportação nuclear (GHILDYAL et al., 2022). Mais tarde na infecção, M está localizada nas inclusões citoplasmáticas e desempenha um papel essencial na

montagem do HRSV (GHILDYAL; HO; JANS, 2006a).

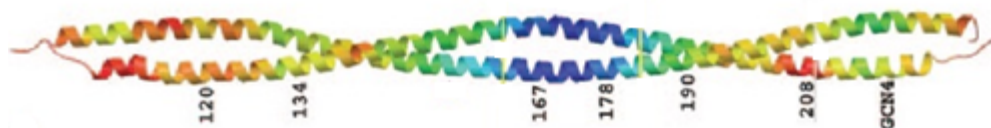
A localização da proteína M no núcleo nas fases iniciais da infecção coincide com a diminuição da transcrição da célula hospedeira, correlacionando-se fortemente com a associação da M com a cromatina do hospedeiro (LI et al., 2021a). As proteínas de matriz de outros vírus pertencentes à família Paramyxoviridae (Sendai, NDV e VSV), também foram detectadas nos núcleos das células infectadas. Em todos os casos, a proteína M foi observada no núcleo no início da infecção, antes de qualquer citopatologia (YOSHIDA et al., 1976; PEEPLES, 1991; LYLES; MCKENZIE, 1998).

- Tropomiosina celular

A tropomiosina (TPM) pertence à família de ligantes de actina e desempenha um papel fundamental na regulação dos filamentos de actina nas células musculares e não musculares (GUNNING; O'NEILL; HARDEMAN, 2008). A montagem, alongamento e desmontagem de F-actina dependem de TPM (CHENG et al., 2018). TPMs são expressas em todos os animais e fungos, e em mamíferos, TPMs são expressas a partir de quatro genes com *splicing* alternativo que produz mais de 40 variantes em diferentes tecidos (CHENG et al., 2018). As quatro TPMs α , β , γ e δ , também são referidas como TPM1, TPM2, TPM3 e TPM4, respectivamente. Além do processamento alternativo, o uso de múltiplos promotores e a escolha do local de poliadenilação levam à expressão de todas as isoformas de TPMs (WANG; COLUCCIO, 2010).

As TPMs são classificadas como de alto peso molecular (HMW) ou de baixo peso molecular (LMW), correspondendo a aproximadamente 284 aminoácidos e 248 aminoácidos de comprimento respectivamente (GUNNING; O'NEILL; HARDEMAN, 2008).

Figura 5 - Dímero de Tropomiosina.



Está apresentada representação da interação entre duas moléculas de tropomiosina baseado em dados de cristalografia. Fonte: Brown et al. (2005).

A tropomiosina forma um dímero de alfa-hélices com estrutura *coiled-coil* (Figura 5), associando-se ao longo dos filamentos de actina e proporcionando estabilidade,

modulando e organizando os microfilamentos do citoesqueleto (LIN et al., 2008).

1.8 O vírus e seus efeitos no DNA

Trabalhos recentes descrevem que o HRSV é capaz de desencadear a senescência prematura de suas células-alvo. A formação de danos no DNA, incluindo quebras de fita dupla (DSB, sigla em inglês), em células infectadas, foi observada e ligada à entrada de células na senescência. O dano observado está associado ao acúmulo de células exibindo um fenótipo senescente canônico nas células mononucleares e nos sincícios. Além disso, um aumento acentuado na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla em inglês) é registrado nas células infectadas e constitui o gatilho para a formação de danos no DNA e a indução de senescência (DUMONT, 2016).

Esses resultados mostram que o HRSV desencadeia a senescência celular mediada por danos no DNA, provavelmente resultante de estresse oxidativo. Os resultados também sugerem que este mecanismo pode contribuir para a fisiopatologia da infecção, e pode estar associado a consequências a longo prazo das infecções por HRSV (MARTÍNEZ et al., 2016a).

Além disso, foi demonstrado a presença da proteína M no núcleo no início da infecção (GHILDYAL et al., 2022), e também que M se associa com a cromatina da célula, levando a diminuição nos níveis de transcrição do mRNA e alterações concomitantes em grande escala no proteoma da célula hospedeira (LI et al., 2021a). Já foi comprovada uma redução nos níveis de mRNA para genes mitocondriais suficiente para a base da função mitocondrial ser prejudicada no início da infecção por HRSV (LI et al., 2021a).

Mesmo assim, ainda não existem muitos estudos sobre os danos no DNA causados pelo HRSV, o que torna esse campo importante e com potencial para melhor entendimento da biologia desse vírus.

1.9 Justificativa e problema tratado no projeto

O objetivo geral do laboratório é o de aprofundar o entendimento da relação do HRSV com a célula hospedeira. Isso, do ponto de vista aplicado, pode levar à identificação de novos alvos para terapia antiviral.

Uma abordagem para buscar esse objetivo é de caracterizar as interações entre as proteínas codificadas pelo genoma viral e os diversos componentes celulares,

sendo dessa estratégia que trataremos no projeto. Essa abordagem, como já mencionado, vem sendo aplicada no laboratório, tendo sido acumulados resultados já publicados e não publicados, preliminares a este projeto.

Dentro do contexto dos dados já obtidos e das propostas do laboratório, propusemos entender em maior detalhe as interações entre a proteína matriz do vírus com a célula hospedeira. Como mencionado acima, já foi descrita a presença da proteína M no núcleo, porém ainda não estão completamente esclarecidos qual a sua função lá e por quais mecanismos ela atua. Para buscar esclarecer esses mecanismos, é importante ressaltar que fizemos uma colaboração com o laboratório de Reparo de DNA, dirigido pelo Prof. Carlos Menck, que tem vasta experiência na análise de danos ao genoma, bem como utilizamos ferramentas de sequenciamento de nova geração.

6 CONCLUSÕES

- Em estudos de co-imunoprecipitação, não observamos interação entre a proteína M e TPM 3, em células expressando M por transfecção quanto no contexto de infecção viral;
- Em estudos de super-expressão de TPM 3 foi observado que houve uma alteração dos corpúsculos de inclusão em células infectadas. Os corpúsculos observados são menores e em menor número;
- Em estudos de desacoplamento de TPM 3 com a droga TR100 foi confirmado que houve efeito de inibição da síntese das proteínas virais para tratamentos em que a droga esteve presente durante todo o experimento, porém para tratamentos em que a droga não esteve presente por todo o período não vemos indicação de alteração na produção de proteínas virais. Nesses estudos também não conseguimos verificar uma alteração na produção de partículas virais, monitorada por ensaio placas, em células tratadas com a droga;
- Em estudos do efeito de TR100 nos corpúsculos de inclusão, observamos que a droga afeta a estrutura dos corpúsculos de inclusão tanto quanto das estruturas semelhantes a corpúsculos de inclusão. As estruturas ficam menores e em menor número;
- Em estudos para utilização do sistema de Minigenoma, não tivemos sucesso em reproduzir a técnica. Quando tentamos criar nossa própria metodologia em que o sistema seria independente da polimerase T7, também não obtivemos sucesso, mesmo com a efetiva clonagem e expressão do gene da proteína L;
- Em estudos de dano no DNA, não vimos efeito na alteração da expressão da histona fosforilada H2Ax em células que expressam a proteína M. Porém conseguimos confirmar os dados da literatura de que células infectadas por HRSV apresentam maior expressão de γ H2Ax, significando dano ao DNA;
- No estudo de transcriptoma, conseguimos ver alguns genes que estão diferencialmente expressos, principalmente estando negativamente regulados, em células que expressam a proteína M. Genes esses que estão em sua maioria relacionados com o sistema de defesa da célula.

REFERÊNCIAS

- AMARASINGHE, G. K. et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. **Archives of Virology**, v. 164, n. 7, p. 1967–1980, 1 jul. 2019.
- ARAUJO, C. L.; **Identificação do conjunto de proteínas celulares que interagem com a proteína M2-1, e com o complexo M2-1, N e P do vírus Respiratório Sincicial Humano**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.
- AMPUERO, S. et al. Time-course of transcriptome response to respiratory syncytial virus infection in lung epithelium cells. **Acta Virologica**, v. 62, n. 3, p. 310–325, 2018.
- BARBOSA, A. B R.A. **Caracterização da interação entre a Nucleofosmina e a proteína de Matriz do Vírus Sincicial Respiratório Humano e suas implicações na replicação viral**. 2022. 114 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- BATTLES, M. B.; MCLELLAN, J. S. **Respiratory syncytial virus entry and how to block it**. **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, 1 abr. 2019.
- BIAESCH, K.; KNAPP, S.; KORN, P. **IFN-Induced PARPs—Sensors of Foreign Nucleic Acids?** **Pathogens** MDPI, , 1 mar. 2023.
- BITKO, V. et al. **Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/3/9>>.
- BOHMWALD, K. et al. Human Respiratory Syncytial Virus: Infection and Pathology. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 37, n. 04, p. 522–537, 2016.
- BONELLO, T. T. et al. A small molecule inhibitor of tropomyosin dissociates actin binding from tropomyosin-directed regulation of actin dynamics. **Scientific Reports**, v. 6, 25 jan. 2016.
- BOURASSA, M.-H.; LANDS, L. C. Preventative therapies for respiratory Syncytial virus (RSV) in children: Where are we now? **Paediatric Respiratory Reviews**, ago. 2023.
- BOYOGLU-BARNUM, S.; CHIRKOVA, T.; ANDERSON, L. J. **Biology of Infection and Disease Pathogenesis to Guide RSV Vaccine Development**. **Frontiers in immunology** NLM (Medline), , 2019.
- BURKE, E. et al. **Role of Cellular Actin in the Gene Expression and Morphogenesis of Human Respiratory Syncytial Virus**. [s.l.: s.n.].
- CARROMEU, C. et al. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. **Archives of Virology**, v. 152, n. 12, p. 2259–2263, dez. 2007.
- CHANOCK, R. et al. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (cca). I. Isolation properties and characterization. **Am J Hyg.** 1957; Nov; 66(3): 281-90.
- CHENG, C. et al. Tropomyosin 3.5 protects the F-actin networks required for tissue biomechanical properties. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 23, 1 dez. 2018.
- CHOI, U. Y. et al. **Oligoadenylate synthase-like (OASL) proteins: dual functions and associations with diseases**. **Experimental and Molecular Medicine** Springer Nature, , 2015.
- CLARK, C. M.; GUERRERO-PLATA, A. **Respiratory Syncytial Virus Vaccine Approaches: a Current Overview**. **Current Clinical Microbiology Reports** Springer, , 1 dez. 2017.
- CLEAVER, J. E. **γH2Ax: Biomarker of damage or functional participant in DNA repair “all that glitters is not gold!”** **Photochemistry and Photobiology**, nov. 2011.
- COLLINS, P.L.; GRAHAM, B.S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. **J Virol.** 2008; Mar;82(5):2040-55.
- COLLINS, P. L.; CHANOCK, R. M.; MURPHY, B. R. Respiratory Syncytial Virus. In: **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 2001.

COLLINS, P. L. et al. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995 Dec;92(25):11563-7.

COLLINS, P. L.; MELERO, J. A. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: Still crazy after all these years. **Virus Research**, v. 162, n. 1–2, p. 80–99, 2011a.

CORCHETE, L. A. et al. Systematic comparison and assessment of RNA-seq procedures for gene expression quantitative analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

COWTON, V. M.; MCGIVERN, D. R.; FEARN, R. **Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis**. **Journal of General Virology**, jul. 2006.

Cytoplasmic Inclusions bodies of Respiratory Syncytial Virus-Infected Cells - Formation of Inclusion Bodies in Transfected Cells That Coexpress the Nucleoprotein, the Phosphoprotein, and the 22K Protein. [s.d.].

DIAS, T. D. **Interação entre tropomiosina e as proteínas de matriz e fosfoproteína do vírus respiratório sincicial humano**. 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

DI PAOLA, N. et al. Complete genome sequences of five human respiratory syncytial virus isolates collected in Brazil. **Genome Announcements**, v. 6, n. 7, 1 fev. 2018.

DUMONT, P. Increasing the complexity of respiratory syncytial virus infection : Reactive oxygen species , DNA damage , and premature senescence. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 372–375, 2016.

FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. **Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly Adults** **Drugs Aging**. [s.l: s.n.].

FIELDS, B. N. **Fields Virology**. [s.l: s.n.].

FISH, I.; BOISSINOT, S. Functional evolution of the OAS1 viral sensor: Insights from old world primates. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 44, p. 341–350, 1 out. 2016.

FIX, J. et al. The insertion of fluorescent proteins in a variable region of respiratory syncytial virus L polymerase results in fluorescent and functional enzymes but with reduced activities. **Open Virol. J**. 2011, 5:103–108.

FÖRSTER, A. et al. Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. **Journal of virology**, v. 89, n. 8, p. 4624–35, 2015.

FUENTES, S. et al.. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 15, p. 8361–8366, 2007.

GALLOUX, M. et al. Minimal elements required for the formation of respiratory syncytial virus cytoplasmic inclusion bodies in vivo and in vitro. **mBio**, v. 11, n. 5, p. 1–16, 1 set. 2020b.

GAN, S.W. et al. Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain. **Protein Science**, v. 17, n.5, p. 813–820, 2008.

GARCÍA J, GARCÍA-BARRENO B, VIVO A, MELERO JA. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. **Virology**. 1993 Jul;195(1):243-7.

GHILDYAL, R. et al. The matrix protein of Human respiratory syncytial virus localises to the nucleus of infected cells and inhibits transcription. **Archives of Virology**, v. 148, n. 7, p. 1419–1429, 1 jul. 2003.

GHILDYAL, R. et al. Nuclear Transport of Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Regulated by Dual Phosphorylation Sites. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, 1 jul. 2022.

GHILDYAL, R.; HO, A.; JANS, D. A. **Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection**. **FEMS Microbiology Reviews**, set. 2006b.

GHILDYAL, R.; MILLS, J.; MEANGER, J. The matrix protein of Human respiratory syncytial virus localises to the nucleus of infected cells and inhibits transcription Brief Report. p. 1419–1429, 2003.

GROSFELD, H.; HILL, M.G.; COLLINS, P.L. RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV

superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. **Journal of Virology**, v. 69, n. 9, p. 5677–5686, 1995.

GUNNING, P.; O'NEILL, G.; HARDEMAN, E. **Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space**. **Physiological Reviews**, jan. 2008.

ISON, M. G. **Antiviral Treatments**. **Clinics in Chest Medicine** W.B. Saunders, , 1 mar. 2017.

JEFFREE, C. E. et al. Ultrastructural analysis of the interaction between F-actin and respiratory syncytial virus during virus assembly. **Virology**, v. 369, n. 2, p. 309–323, 20 dez. 2007.

JIANG, X.; SOBOLEVA, T. A.; TREMETHICK, D. J. **Short Histone H2A Variants: Small in Stature but not in Function**. **Cells** NLM (Medline), , 2 abr. 2020.

JUMAT, M. R. et al. Viperin protein expression inhibits the late stage of respiratory syncytial virus morphogenesis. **Antiviral Research**, v. 114, p. 11–20, 2015.

KALLEWAARD, N. L.; BOWEN, A. L.; CROWE, J. E. Cooperativity of actin and microtubule elements during replication of respiratory syncytial virus. **Virology**, v. 331, n. 1, p. 73–81, 5 jan. 2005.

LAMBERT, D. M. **Role of Oligosaccharides in the Structure and Function of Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins** **VIROLOGY**. [s.l.: s.n.].

LI, H. H. et al. Development and qualification of cell-based relative potency assay for a human respiratory syncytial virus (RSV) mRNA vaccine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 234, 20 set. 2023.

LI, H. M. et al. Respiratory syncytial virus matrix protein-chromatin association is key to transcriptional inhibition in infected cells. **Cells**, v. 10, n. 10, 1 out. 2021b.

LIN, J. J. C. et al. Human tropomyosin isoforms in the regulation of cytoskeleton functions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 644, p. 201–222, 2008.

LYLES D.S.; MCKENZIE M.O. Reversible and irreversible steps in assembly and disassembly of vesicular stomatitis virus: equilibria and kinetics of dissociation of nucleocapsid-Mprotein complexes assembled in vivo. **Biochemistry**, v. 37, p. 439–450, 1998

MARTÍNEZ, I. et al. Induction of DNA double-strand breaks and cellular senescence by human respiratory syncytial virus. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 427–442, 2016a.

MELGAR, M. et al. **Morbidity and Mortality Weekly Report Use of Respiratory Syncytial Virus Vaccines in Older Adults: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices-United States, 2023** **Centers for Disease Control and Prevention | MMWR**. [s.l.: s.n.].

MENG, J. et al. An Overview of Respiratory Syncytial Virus. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 1 mar. 2014.

MITRA, R. et al. The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments. **Journal of Virology**, v. 86, p. 4432–4443, 2012a.

MUNDAY, D. C. et al. Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human respiratory syncytial virus. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 9, n. 11, p. 2438–2459, nov. 2010.

MUNDAY, D. C. et al. Interactome Analysis of the Human Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex Identifies Protein Chaperones as Important Cofactors That Promote L-Protein Stability and RNA Synthesis. v. 89, n. 2, p. 917–930, 2015a.

MUNDAY, D. C. et al. Interactome Analysis of the Human Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex Identifies Protein Chaperones as Important Cofactors That Promote L-Protein Stability and RNA Synthesis. v. 89, 2015b.

NOLAN, T. et al. Prevalence and incidence of respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in children aged 6 months to 10 years with influenza-like illness enrolled in a randomized trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 11, p. e80–e89, 1 jun. 2015.

OGAWA, J. K. **Caracterização da interação entre o metilossomo e o nucleocapsídeo do vírus respiratório sincicial humano**. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

OLIVEIRA, A. P. et al. Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. **Virus Research**, v. 177, n. 1, p. 108–112, out. 2013.

- PEEPLES M. Paramyxovirus M proteins: Pulling it all together and taking it on the road. In: Kingsbury D (ed) The paramyxoviruses. **Plenum Press**, p. 427-456, 1991
- RAMEIX-WELTI, M. A. et al. Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- RAWLINSON, S. M. et al. Viral regulation of host cell biology by hijacking of the nucleolar DNA-damage response. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.
- RIBEIRO, P. G. G. **Caracterização funcional e antigênica da proteína de matriz do Vírus Respiratório Sincicial humano**. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- RINCHEVAL, V. et al. Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2017.
- ROSE, E. B. et al. **Morbidity and Mortality Weekly Report Respiratory Syncytial Virus Seasonality-United States, 2014-2017**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/surveillance/nrevss/rsv/state.html#HI>>.
- SANDRA ELISABETE VIEIRA, D. et al. **CLINICAL PATTERNS AND SEASONAL TRENDS IN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS HOSPITALIZATIONS IN SÃO PAULO, BRAZIL***Cristina R. MIYAO. [s.l.: s.n.].
- SHAIKH, F. Y. et al. Respiratory syncytial virus assembles into structured filamentous virion particles independently of host cytoskeleton and related proteins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 13 jul. 2012.
- SHANG, Z.; TAN, S.; MA, D. **Respiratory syncytial virus: From pathogenesis to potential therapeutic strategies**. **International Journal of Biological Sciences** / vrspring International Publisher, , 2021.
- SHENG, Q. et al. Multi-perspective quality control of Illumina RNA sequencing data analysis. **Briefings in Functional Genomics**, v. 16, n. 4, p. 194–204, 2017.
- SHI, H. et al. Baicalin from *Scutellaria baicalensis* blocks respiratory syncytial virus (RSV) infection and reduces inflammatory cell infiltration and lung injury in mice. **Scientific Reports**, v. 6, 21 out. 2016.
- SIMABUCO, F. Tese: **Expressão das proteínas N e P do Vírus Respiratório Sincicial Humano: Estudos funcionais e de imunização**. 2009.
- SIMABUCO, F.M. et al. Gene Optimization Leads to Robust Expression of Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein and Phosphoprotein in Human cells and Induction of Humoral Immunity in Mice. **Journal of Virological Methods**. 2009; v. 158, p. 93-99.
- SIDWELL, R. W.; BARNARD, D. L. Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. **Antiviral Research**, v. 71, n. 2-3, p. 379-90, 2006.
- SOTO, J. A. et al. **Antibody development for preventing the human respiratory syncytial virus pathology**. **Molecular Medicine** / BioMed Central Ltd., , 17 abr. 2020.
- STEHN, J. R. et al. A novel class of anticancer compounds targets the actin cytoskeleton in tumor cells. **Cancer Research**, v. 73, n. 16, p. 5169–5182, 2013a.
- STEC, D. S.; HILL, M. G.; COLLINS, P. L. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. **Virology**, v. 183, p. 273-287, 1991.
- SVETLOVA, M. P.; SOLOVJEVA, L. V.; TOMILIN, N. V. **Mechanism of elimination of phosphorylated histone H2AX from chromatin after repair of DNA double-strand breaks**. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 1 mar. 2010.
- SWANSON, K. A. et al. Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 23, p. 9619–9624, 7 jun. 2011.
- TALEB, S. A. et al. Human respiratory syncytial virus : pathogenesis , immune responses , and current vaccine approaches. p. 1817–1827, 2018.
- TAMURA, R. E. Tese: **Estudo dos domínios Funcionais da proteína de matriz do Vírus Respiratório Sincicial Humano**, 2009.

TAYYARI, F. et al. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. **Nature Medicine**, v. 17, n. 9, p. 1132–1135, set. 2011.

TERNETTE, N. et al. Immunogenicity and efficacy of codon optimized DNA vaccines encoding the F-protein of respiratory syncytial virus. **Vaccine**, v. 25, n. 41, p. 7271–7279, 10 out. 2007.

THORNHILL, E. M.; VERHOEVEN, D. **Respiratory Syncytial Virus's Non-structural Proteins: Masters of Interference. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** Frontiers Media S.A., , 19 maio 2020.

TRAN, TL. Et al. The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. **Journal of Virology**. 2009, 83:6363– 6374.

WANG, C. L.; COLUCCIO, L. M. New insights into the regulation of the actin cytoskeleton by tropomyosin. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 281, n. 10, p. 91–128, 2010.

YOSHIDA T.N.Y.; YOSHII S.; MAENO K.; MATSUMOTO T. Membrane (M) protein of HVJ (Sendai virus): its role in virus assembly. **Virology**, v. 71, p. 143-161, 1976

YU, X. et al. Measles virus matrix protein inhibits host cell transcription. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2016.