PAULO GUILHERME GUIMARÃES RIBEIRO

**Caracterização Funcional e Antigênica da
Proteína de Matriz do Vírus Respiratório
Sincicial Humano**

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

São Paulo
2012

PAULO GUILHERME GUIMARÃES RIBEIRO

**Caracterização Funcional e Antigênica da
Proteína de Matriz do Vírus Respiratório
Sincicial Humano**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Armando Morais Ventura

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ribeiro, Paulo Guilherme Guimarães.

Caracterização funcional e antigênica da proteína de matriz do vírus respiratório sincicial humano / Paulo Guilherme Guimarães Ribeiro -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Armando Morais Ventura.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Virologia Molecular.

Versão do título para o inglês: Functional and antigenic characterization of human respiratory syncytial virus matrix protein.

1. Virologia 2. Vírus RNA 3. Vírus Respiratório Sincicial Humano
4. Proteína de Matriz I. Ventura, Prof. Dr. Armando Morais II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0155/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Paulo Guilherme Guimarães Ribeiro.

Título da Dissertação: Caracterização funcional e antigênica da proteína de matriz do vírus respiratório sincicial humano.

Orientador(a): Prof. Dr. Armando Morais Ventura.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **40** nas fls. **85** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Armando Morais Ventura, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Caracterização funcional da proteína de matriz do vírus respiratório sincicial humano** do qual participou(aram) o(s) **Paulo Guilherme Guimarães Ribeiro**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **21.06.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 21 de junho de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Ao meu pai e minha mãe, por todo
amor, compreensão e força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família que sempre esta ao meu lado a qual tem ate hoje fundamental influencia na pessoa que sou hoje.

Quero agradecer ao professor Armando Morais Ventura, por ter me aceito em seu laboratório, por ter me guiado nesse trabalho e por ter se tornado mais que um professor, mas um amigo durante o tempo no laboratório.

Ao Prof. Carlos Frederico Menck e todos de seu laboratório em especial a doutora Veri.

Aos Profs. Luis Carlos de Souza Ferreira e Rita de Cássia Ferreira, ao professor Carlos Pelleschi Taborda e a profa. Roxane Maria Fontes Piazza.

As agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPESP.

Ao pessoal da biblioteca e da secretaria, aos seguranças e o pessoal da limpeza obrigado.

Aos colegas que trabalham ou trabalharam no laboratório e que na verdade não são apenas colegas, mas sim amigos que levarei para toda vida: Rodrigo Tamura, Luis Farinha, Yordanka Medina, Lucas Moretti, Fabiana Ferreira, Valdino Souza, Cassiano Carromeu, Fernando Simabuco, Angel Centurion e Marcelo Amaral.

Aos amigos que fiz nos laboratórios vizinhos: Dani, Cariri, Caio, Alex, Vitor e outros, todos são muito especiais.

A todos os amigos da minha cidade natal Garça e todos os amigos que fiz durante minha graduação em Uberlândia, abraço especial para todos.

Um agradecimento especial a alguém que não só é integrante desse trabalho comigo mas também alguém que já se tornou parte da minha vida, Andressa Peres de Oliveira obrigado pela ajuda, experiência e paciência durante esses anos. "May the Force Be with you"

Um beijo especial ao meu primo Renato Vaz e ao meu tio Di Mantovani que faleceram, mas continuam em meu coração, vocês me acolheram me ensinaram e são parte do que eu sou hoje.

Minhas irmãs Laura Carolina (Laka) e Maria Julia (Gugu) obrigado por tudo.

Jose João Marques Ribeiro (papai) e Maria Auxiliadora de Toledo Guimaraes Ribeiro (mamãe) vocês foram e são tudo na minha vida amo vocês, obrigado de coração.

“Somente se aproxima da perfeição quem a procura com
constância, sabedoria e, sobretudo humildade.”

Jigoro Kano

RESUMO

Ribeiro GGP. Caracterização funcional e antigênica da proteína de matriz do vírus respiratório sincicial humano. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

O Vírus Respiratório Sincicial humano (hRSV – *human Respiratory Syncytial Virus*) está entre os principais causadores de doenças do trato respiratório. Dentre os grupos de maior risco a complicações por este vírus estão: crianças, recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos. O hRSV pertence à família *Paramyxoviridae*, possui como material genético RNA fita simples de polaridade negativa que codifica onze proteínas. Os sintomas da infecção podem variar de simples estado gripal a doença respiratória grave, e eventualmente levar a óbito. Atualmente não há vacina licenciada ou droga eficaz contra esse vírus. Anteriormente foram obtidos, em nosso laboratório, vetores com genes otimizados para expressão da proteína de Matriz (M) do hRSV em bactérias e em células eucariontes. Com essas ferramentas a proteína M foi produzida e purificada tendo sido possível obter anticorpos policlonais específicos e eficientes na sua detecção. Com esses anticorpos confirmamos a interação da proteína M com as proteínas celulares tropomiosina e nucleofosmina. Nos experimentos iniciais havia suspeita de alteração na expressão de tropomiosina presente em células que expressavam a proteína M, porém não confirmamos esse dado. Também foi demonstrado por imunofluorescência e por *western blot* que a proteína M quando expressa fora do contexto de infecção apresenta localização nuclear e citoplasmática. Foram feitos testes de imunização com a proteína M purificada ou com um vetor eucariótico que a expressa (DNA). A imunização com proteína M resultou apenas em resposta humoral, enquanto com a vacina de DNA obtivemos apenas resposta celular. Nenhum desses imunógenos, entretanto, foi capaz de conferir proteção, medida pela capacidade de reduzir a carga viral ou a patogenicidade em camundongos Balb/C imunizados, após serem submetidos a teste de desafio com hRSV.

Palavras-chave: Virologia. Virus RNA. Virus Respiratório Sincicial Humano Proteína de Matriz

ABSTRACT

Ribeiro GGP. Functional and antigenic characterization of human Respiratory Syncytial Virus Matrix protein. [Masters thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012

The human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is among the main causes of respiratory tract diseases. The groups at risk of complications by this virus are: children, infants, elderly and the immunocompromised. hRSV belongs to the Paramyxoviridae family, and has as its genetic material single stranded RNA with negative polarity that encodes eleven proteins. The symptoms of the infection can range from simple flulike state to severe respiratory disease eventually leading to death. Currently there is no licensed vaccine or effective drug against this virus. Vectors with genes optimized for of the hRSV Matrix protein (M) expression in bacteria and in eukaryotic cells were previously obtained in our laboratory. With these tools the M protein was produced and purified. Specific and efficient polyclonal antibodies could then be obtained and used for its detection. Using these antibodies we confirmed M interaction with cellular proteins tropomyosin and nucleophosmin. The initial results indicated a change in expression of tropomyosin present in cells that express the M protein, but that information was not confirmed. It was also demonstrated by immunofluorescence and western blotting that protein M when expressed out of viral infection context, presents cytoplasmic and nuclear localization. Immunization tests were made with the purified M protein or with a eukaryotic vector that expresses it (DNA). Immunization with M protein resulted only in humoral response, while with the DNA vaccine only cellular response was obtained. None of these antigens, however, was able to confer protection to immunized Balb/C mice, measured by the ability to reduce the viral load or pathogenicity after challenge with hRSV.

Keywords: Virology. RNA Virus. Human Respiratory Syncytial Virus. Matrix Protein

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – Aminoácido

CAI - *Codon Adaptation Index*

Crm-1 - *chromosome region maintenance 1*

DAPI - dihydrochloride

DEPC - dietilpirocarbonato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGFP - *Enhanced Green Fluorescent Protein*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ELISPOT - *Enzyme-linked immunosorbent spot*

HAT - hipoxantina, aminopterina e timidina

hRSV – Vírus Respiratório Sincicial humano (*human Respiratory Syncytial Virus*)

IPTG - isopropil- β -D-tiogalactosideo

LB - Luria-Bertani (meio)

M.O.I – multiplicidade de infecção

NPM – nucleofosmina

OPD - O-Phenylenediamine

PBS – Tampão *fosfato*-salino

PEI - polietilenimina

Pfu – unidade formadora de placa

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

RNP - ribonucleoproteico

T.A. – temperatura ambiente

TPM - tromopiosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Histórico e classificação	15
1.2 Epidemiologia, patologia, prevenção e tratamento	16
1.3 Estrutura do hRSV	17
1.4 Replicação do hRSV	18
1.5 Proteína de Matriz	20
1.6 Dados anteriores do laboratório	21
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAIS E METODOS	24
3.1 Células e vírus	24
3.2 Plasmídeos	24
3.3 Transformação de bactérias por eletroporação e plaqueamento	25
3.4 Extração de DNA plasmidial	25
3.5 Transfecção de células humanas	25
3.5.1 Transfecção com PEI	25
3.5.2 Transfecção com Lipofectamina Plus	26
3.6 Purificação da proteína M	26
3.7 SDS-PAGE	27
3.8 Western Blot	27
3.9 Imunização	27
3.9.1 Imunização com proteína M	28
3.9.2 Imunização com DNA (pShuttle ou pShuttle-Mopt)	28
3.10 Produção de anticorpos monoclonais	29
3.11 Imunoprecipitação	29
3.11.1 Co-Imunoprecipitação após transfecção dos plasmídeos, pcDNA-Flag-M e pcDNA-Flag	29
3.11.2 Co-Imunoprecipitação após infecção com hRSV adaptado a células HEK293T	30
3.12 Separação das frações nuclear e citoplasmática	30
3.13 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	31
3.14 Enzyme-linked immunosorbent spot assay (ELISPOT)	32

3.15 Produção e titulação de hRSV.....	32
3.16 Ensaio de desafio	33
3.17 Extração de RNA com Trizol LS Reagent.....	33
3.18 Transcrição Reversa.....	34
3.19 Imunofluorescência.....	34
3.20 Imunofluorescência Confocal	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Produção e purificação da proteína M.....	36
4.2 Imunização com a proteína M para produção de anticorpos policlonais.....	37
4.3 Imunizações com a proteína M para produção de anticorpos monoclonais.....	38
4.4 Interações da proteína M com proteínas celulares.....	39
4.4.1 <i>Imunoprecipitação</i>	39
4.4.2 <i>Deteção com anti-Nucleofosmina</i>	40
4.4.3 <i>Deteção com anti-Tropomiosina</i>	40
4.4.4 <i>Co-Imunoprecipitação Reversa com anti-Tropomiosina</i>	41
4.4.5 <i>Imunoprecipitação com anti-tropomiosina em células infectadas</i>	42
4.4.6 <i>Co-imunoprecipitação reversa com anti-Nucleofosmina</i>	42
4.4.7 <i>Imunoprecipitação com anti-nucleofosmina em células infectadas</i>	43
4.5 Localização intracelular da proteína M.....	43
4.5.1 <i>Padronização de transfecção com lipofectamina</i>	43
4.5.2 <i>Padronização da separação núcleo/citoplasma</i>	44
4.5.3 <i>Localização da proteína M em células infectadas com hRSV</i>	45
4.5.4 <i>Localização por western blotting da proteína M em células fora do contexto de infecção com hRSV</i>	46
4.5.5 <i>Localização por microscopia da proteína M em células fora do contexto de infecção com hRSV</i>	48
4.6 Interação da proteína M com Tropomiosina.....	51
4.7 Padrão de localização da nucleofosmina em células transfectadas.....	51
4.8 Imunizações para estudo de resposta humoral e celular.....	52
4.8.1 <i>ELISA</i>	53
4.8.2 <i>ELISPOT</i>	53
4.8.3 <i>PCR em tempo real e cortes histológicos</i>	54

5 DISCUSSÃO.....	56
5.1 Produção da proteína M e de anticorpos específicos anti-M.....	56
5.2 Interação da proteína M com proteína celulares.....	56
5.3 Localização intracelular da proteína M fora do contexto de infecção.....	58
5.4 Resposta imune gerada pela proteína M.....	59
6 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO A - Curriculum Vitae – Resumido.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e classificação

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (hRSV de *human Respiratory Syncytial Virus*) é um vírus pertencente à ordem *Mononegavirales*, que engloba vírus com genoma de RNA de fita simples não segmentado com polaridade negativa. O hRSV encontra-se dentro da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus* (segundo as normas do *International Committee on Taxonomy of Viruses*). Foi inicialmente isolado em 1956 de chimpanzés que apresentavam coriza (BLOUNT et al., 1956). O nome “vírus respiratório sincicial” foi dado a este vírus por Chanock em 1957 quando demonstrou que em células infectadas por hRSV apareciam células gigantes com vários núcleos circunscritos em um grande sincício (GROOTHUIS et al., 2011) (figura 1). Membros desta ordem compartilham características como: (1) genoma intimamente associado a nucleoproteínas para a formação de nucleocapsídeos resistentes a RNase, (2) processo de transcrição a partir do final 3' do RNA viral e terminando e reiniciando a cada junção gênica, (3) a replicação genômica envolve um RNA complementar, (4) presença de membrana bilipídica que é fusionada à célula durante a infecção. O hRSV é subdividido em subtipos A e B.

Figura 1 - Sincício formado por RSV em cultura de células.

Fonte: University of Cape Town, SA, USA

1.2 Epidemiologia, patologia, prevenção e tratamento

O hRSV é atualmente o maior causador de hospitalização de crianças menores de 1 ano, e está entre os principais causadores de consultas médicas em crianças menores de 5 anos. No mundo estima-se que o hRSV responda por 30 milhões de infecções do trato respiratório todo ano sendo e que 3 milhões destas necessitam de internação hospitalar (NAIR et al., 2010).

A infecção por hRSV acontece cedo, cerca de 60% das crianças são infectadas no primeiro ano de vida, sendo que virtualmente até o terceiro ano de vida todas as crianças já foram infectadas ao menos uma vez (GLEZEN et al., 1986). Para o paciente combater a infecção por hRSV uma resposta imune, mediada por células T, é indispensável porem esta resposta é incompleta e leva a constantes reinfecções que podem ocorrer durante toda vida (COLLINS; GRAHAM, 2008; HYNICKA; ENSOR, 2012).

Na população o hRSV causa apenas sintomas de resfriados (congestão nasal, tosse, falta de ar e febre) sem comprometimento do trato respiratório inferior. Para o grupo de risco o hRSV pode causar quadros clínicos mais graves com o comprometimento do trato respiratório inferior (HOLBERG, 1991). O grupo de risco para o hRSV compreende prematuros, imunocomprometidos, idosos, pessoas com defeitos congênitos, doença cardíaca ou displasia pulmonar.

Em pacientes prematuros, imunocomprometidos ou com defeitos congênitos e o hRSV pode produzir lesões crônicas; (2) pacientes com doença cardíaca ou com displasia pulmonar a infecção por hRSV podem atingir uma letalidade de até 35% (HALL et al., 1986). Estudos mostram também que a infecção por hRSV pode ainda estar associada a asma (LEMANSKE, 2004) e à co-infecção bacteriana do trato respiratório (THORBURN et al., 2006).

Atualmente não há uma vacina licenciada contra este vírus, e mesmo uma infecção inicial por hRSV não protege contra infecções subseqüentes, mesmo se tratando do mesmo subtipo (BEEM, 1967). Existem dois tratamentos usados em infecção por hRSV: (1) o uso de ribavirina, porem não é recomendado em muitos dos casos, (2) o tratamento apenas profilático com anticorpos monoclonais, que são somente usados em neonatos

com grande risco para hRSV (GRAHAM, 2011). A criação de uma vacina para o hRSV vem sendo uma difícil tarefa desde 1965, quando foi desenvolvida e testada uma vacina usando vírus inativado por formalina. Esse teste teve resultados catastróficos, pois os anticorpos produzidos não foram neutralizantes ou anti fusogenicos para hRSV, e a maioria das crianças que foram infectadas pelo hRSV na temporada de 1966 tiveram agravamento da doença, se comparadas ao grupo controle (GROOTHUIS et al., 2011). Em um dos levantamentos realizados no Brasil, verificou-se que 41,8% das crianças hospitalizadas com doença no trato respiratório inferior apresentavam o hRSV (VIEIRA et al., 2001). As dificuldades no tratamento, somadas a ausência de uma vacina licenciada e ao grande número de infectados todos os anos, justificam a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre o hRSV.

1.3 Estrutura do hRSV

O hRSV é um vírus envelopado cujo genoma (esquematizado na figura 2) contém 15.225 nucleotídeos (cepa A2) e 10 genes que codificam 11 proteínas: NS1 e NS2 (não-estruturais), N (nucleocapsídeo), 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). Em 1985 o hRSV foi subdividido em dois grandes grupos antigênicos A e B (ANDERSON et al., 1985; MUFSON et al., 1985). O subgrupo A é o mais prevalente e o de maior preocupação para saúde humana, porem ambos circulam simultaneamente.

Figura 2 - Esquema do genoma do HRSV linhagem A2.

Fonte: National Center for biotechnology information, USA

A partícula do hRSV consiste de uma material nucleico de RNA fita simples de polaridade negativa, associadas a ele encontram-se as proteínas do complexo ribonucleoproteico (RPN) P, N e L (polimerase viral), no qual esta presente também a proteína M2-1 (principal fator de anti-terminação). Este complexo é envolto pela proteína viral de matriz (proteína M), e protegido por um envelope derivado da membrana plasmática da célula hospedeira, no qual estão ancoradas as proteínas F, G e SH (figura 3).

Figura 3 - Esquema do hRSV

1.4 Replicação do hRSV

O ciclo de replicação do hRSV se inicia pelo reconhecimento da célula alvo através da proteína de superfície G que reconhece principalmente os glicosaminoglicanos presentes na superfície celular (FELDMAN et al., 1999). A proteína G apesar de importante nesta etapa não é a única proteína de reconhecimento e estudos demonstraram que mesmo sem a proteína G o hRSV ainda é capaz de se replicar *in vitro* (TENG; WHITEHEAD; COLLINS, 2001). Após o reconhecimento da célula pelo vírus inicia-se então a fusão das membranas mediada pela proteína de superfície F. Depois de internalizado o nucleocapsídeo dá-se início a transcrição seqüencial do genoma viral para formação de mRNAs e posterior produção de proteínas virais (MELERO, 2007).

As proteínas de superfície F, G e SH são produzidas e ficam ancoradas na membrana celular. As proteínas não estruturais NS1 e NS2 permanecem no citoplasma e praticamente não são encontradas em vírus purificados (por isso o nome não estrutural). Seu papel não é totalmente definido porém se sabe que possuem uma ação inibitória na transcrição e replicação do RNA viral e na resposta de interferon (ATREYA; PEEPLES; COLLINS, 1998).

Durante a replicação viral são formados os complexos RNP, em que ocorre a transcrição e replicação do material genético (LIUZZI; MASON E CARTIER, 2005). Após a produção das proteínas virais, inicia-se a fase da replicação do genoma viral com inibição da transcrição. A mudança do estado de transcrição para o estado de replicação do material genético provavelmente é sinalizado por um acúmulo da proteína M2-2, pois foi visto que mutantes que não produziam a proteína M2-2 possuíam altas taxas de transcrição e baixas taxas de replicação (COLLINS et al., 2001).

Eventualmente os complexos RNP juntamente com a proteína M (que possui importante papel na montagem viral e será discutida no tópico seguinte) são encaminhados para a face interna da membrana citoplasmática para iniciar o brotamento viral (figura 4).

Figura 4 - Esquema do ciclo replicativo do hRSV

1.5 Proteína de Matriz

A proteína M do hRSV é uma proteína não glicosilada integrante da parte interna do virion é o principal foco de estudo deste trabalho. Se comparada com as proteínas matriz dos outros paramixovirus ela tem o menor tamanho (256 versus 335 a 375 aa). Podemos observar na figura 5 a estrutura que na proteína M do hRSV, nela existem regiões negativamente carregadas próximas ao N-terminal e uma região positivamente carregada na região do C-terminal que poderia mediar sua ligação com a membrana citoplasmática (MONEY et al., 2009).

Figura 5 - Estrutura tridimensional da proteína M do RSV

Fonte: (MONEY et al., 2009)

Na ordem dos Mononegavirus a proteína M geralmente desempenha dois grandes papéis: (1) interromper a transcrição no nucleocapsídeo para posterior empacotamento, (2) mediar a interação do nucleocapsídeo com o envelope viral (KAPTUR et al., 1991; LENARD, 1996), porem suas funções não se limitam a apenas estas duas citadas. Foi demonstrado recentemente que a ausência da proteína M durante a replicação viral impede a formação da forma filamentosa do hRSV além de tornar inviável a produção de novos vírions (MITRA et al., 2012). A proteína M do hRSV ainda necessita estudos uma vez

que grande parte do que se sabe deriva da comparação com a proteína M de outros vírus como o vírus da estomatite vesicular ou vírus Sendai.

Estudo com o vírus Sendai mostrou que células persistentemente infectadas com o vírus Sendai cuja proteína M continha uma mutação, conferindo sensibilidade a temperatura, somente tinham sua produção restaurada com uma mudança na temperatura ou pela suplementação com a proteína M não mutada (KONDO et al., 1993). Foi constatado também que células transfectadas com vetores de expressão da proteína M juntamente com a nucleoproteína, ambas do vírus parainfluenza, são capazes de liberar vesículas similares a nucleocapsídeos (CORONEL et al., 1999).

Foi evidenciado que extratos de ribonucleoproteínas do hRSV apresentavam capacidade de transcrição *in vitro* aumentada na presença de anticorpos monoclonais contra a proteína M, de forma a sugerir que a proteína M teria um efeito inibitório na transcrição do hRSV (GHILDYAL et al., 2002). O mesmo grupo posteriormente também demonstrou que a proteína M do hRSV possui duas fases durante o ciclo replicativo. Inicialmente é transportada para o núcleo por intermédio da importina $\beta 1$, onde poderia desempenhar papel inibitório da transcrição celular. Durante o final da replicação a proteína M é exportada do núcleo (utilizando um caminho dependente de Crm-1) para o citoplasma (GHILDYAL et al., 2005), sendo usada na montagem da partícula viral.

1.6 Dados anteriores do laboratório

A experiência do laboratório com as tentativas de expressar os genes de hRSV em células de mamíferos vinha sendo frustrante até o final de 2007. Foram clonados os genes F, G, SH, M, N, e P do hRSV cepa A2, em vetores de expressão eucariótica, tanto plasmídeos quanto adenovirais, e pouco sucesso foi obtido em demonstrar sua efetiva expressão em culturas celulares ou imunizando camundongos. Surgiu então a hipótese levantada por Ternette e colaboradores (TERNETTE et al., 2007) de 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 CAI (*codon adaptation index*) baixo.

Naquele momento os trabalhos em desenvolvimento no laboratório abordavam os genes M, N e P, cujas seqüências foram analisadas confirmando a existência de impedimentos para expressão a partir de transcrição pela RNAPol II no núcleo. A síntese desses genes com a seqüência nucleotídica otimizada foi encomendada, e sua expressão eficaz em células transfectadas passou a ser obtida. A expressão efetiva dessas proteínas possibilitou um estudo mais detalhado de seu comportamento e localização intracelular, quando expressas fora do contexto da infecção viral. Uma parte dos dados para os genes N e P foi publicada anteriormente (SIMABUCO et al., 2009).

Com a expressão altamente eficiente do gene M, após a otimização das seqüências nucleotídicas, foi construído o vetor de expressão pFLAG-M em que o peptídeo FLAG foi fusionado a essa proteína. A expressão a partir desse vetor mostrou-se muito eficiente (TAMURA, 2009, dados não publicados).

O primeiro passo foi a transfecção dos vetores em células humanas em cultura. Anticorpos altamente eficientes contra FLAG, ligados a esferas de agarose (Sigma), foram utilizados para fazer a imunoprecipitação. A partir de SDS-PAGE foram selecionadas bandas correspondentes aos pesos moleculares esperados das proteínas P, N e M para confirmar que a imunoprecipitação foi bem-sucedida. Os fragmentos de gel com as bandas selecionadas foram submetidos aos procedimentos de análise por espectrometria de massa confirmando a identidade das três proteínas (resultados não apresentados, obtidos em colaboração com os Drs. Zerbini e Libermann no centro de proteômica do Harvard Institutes of Medicine, Boston).

Da mesma forma foram identificadas proteínas co-imunoprecipitadas com M-Flag, N-Flag e P-Flag e nos reportaremos aqui apenas a M, tema deste projeto. Para M-Flag, além da própria M-Flag, foi possível identificar duas proteínas celulares, a tropomiosina e a nucleofosmina (TAMURA, 2009, dados não publicados). Para confirmar a identidade dessas proteínas, no entanto, faz-se necessário detectá-las por *Western blot* com anticorpo específico.

O comportamento bifásico da proteína M descrito durante a infecção viral também foi visto para células transfectadas com pcDNA3-Flag M (TAMURA, 2009, dados não publicados). Estes dados, no entanto, precisam ser reproduzidos e acompanhados com mais detalhes em microscopia confocal e por *Western Blot*.

2 OBJETIVOS

Neste projeto buscamos consolidar as evidências das interações entre a proteína M e proteínas celulares, sua localização intracelular quando expressa fora do contexto da infecção viral, analisar as propriedades de imunização da proteína M do hRSV A2, e de vetores que a expressam a partir de seu gene otimizado, além de caracterizar a proteção frente ao desafio com hRSV após imunização.

Objetivos específicos:

- expressar a proteína M em bactérias, purificá-la, produzir anticorpos específicos anti-M em camundongos;
- verificar a localização da proteína M fora do contexto da infecção viral, expressando-a em células humanas em cultura pela transfecção de vetores eucarióticos.
- realizar ensaios de imunofluorescência e *Western Blot* das frações citoplasmática e nuclear;
- estudar a interação da proteína M do hRSV com as proteínas celulares tropomiosina e nucleofosmina através de experimentos de imunoprecipitação;
- caracterizar o efeito de M sobre a expressão de tropomiosina em células humanas;
- fazer ensaios de imunização em camundongos com pMopt e a proteína M purificada de bactérias, e caracterizar as respostas humoral e celular;
- fazer ensaios de desafio com hRSV em camundongos pré-imunizados com pMopt e M.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As técnicas de biologia molecular utilizadas nesse projeto foram baseadas em protocolos descritos em Ausubel et al. (1994), Bollag et al. (1996) ou Sambrook et al. (1989). As técnicas de imunologia estão descritas em Harlow e Lane (1988).

3.1 Células e vírus

HEK293T: Células provenientes de rim humano, que crescem em monocamadas, não apresentam junções *tight*, e não expressam as claudinas 1, 3 e 4, conseqüentemente elas apresentam um fenótipo indiferenciado, sendo células altamente transfectáveis. Essas células expressam o antígeno T do vírus SV40.

HEp-2: São células humanas, isoladas originalmente de carcinoma epitelial de laringe contaminadas com células HeLa, o que gerou a linhagem atual. A infecção e o efeito citopático do hRSV A2 são muito bem caracterizados nessa célula.

As duas linhagens são cultivadas a 37 °C com concentração 5% de CO₂ e em meio *Modified Eagle Medium* (MEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB, Vitrocell) (10%) e antibióticos.

Foi utilizado o protótipo A do hRSV (cepa A2), gentilmente cedido pela Dra. Marilda Siqueira (Departamento de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil).

SP2/0: Linhagem celular formada pela fusão de células do baço de Balb/c (de camundongos imunizados com RBCs de ovelhas) com linhagem celular de mieloma. Estas células não secretam imunoglobulina, são resistentes a 8-azaguanina a uma concentração de 20 µg/ml e são sensíveis a HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Células SP2/0 foram fusionadas com células B para a produção de hibridomas.

3.2 Plasmídeos

Os plasmídeos pMopt (vetor de expressão pShuttle da Clontech, para expressão em células eucarióticas, com o gene de matriz de hRSV A2 otimizado, sob controle do promotor de CMVie); pFLAG-M (vetor baseado no vetor de expressão em células

eucarióticas pcDNA3-Flag, contém o gene de matriz otimizado fusionado à sequência Flag, pcDNA3 é um vetor da Invitrogen); e pET-Mopt (vetor de expressão bacteriano vetor pET28b da Novagen com o gene de matriz de hRSV A2 otimizado, clonado entre os sítios NcoI do sítio de clonagem múltipla, em que a proteína M é expressa com uma cauda His fusionada ao carboxi-terminal), foram anteriormente construídos no laboratório (TAMURA, 2009). Foram utilizadas bactérias DH5 α : *supE44 Δ alcU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyra96 thi-1 relA1* (SAMBROOK et al., 1989).

3.3 Transformação de bactérias por eletroporação e plaqueamento

Para a transformação em bactérias, foram eletroporados 10 ng de DNA em 50 μ l de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes a 2,5 kV, e a recuperação foi feita em meio SOC a 37 °C por 1 hora. O produto da eletroporação foi plaqueado e incubado por 16 horas a 37 °C em LB ágar contendo antibiótico para seleção. Uma colônia foi utilizada para fazer um pré-inóculo em 1 ml. Esse pré-inóculo foi utilizado para inocular 500 ml de LB líquido/antibiótico a 37 °C por cerca de 16 horas.

3.4 Extração de DNA plasmidial

Após o crescimento em meio líquido, a suspensão bacteriana foi coletada por centrifugação a 12.000 g por 10 minutos e o DNA plasmidial extraído seguindo a metodologia de lise alcalina (AUSUBEL et al., 1994). Para experimentos de transfecção, que exigem maior grau de purificação, utilizamos o PureLink^{TM} HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante.

3.5 Transfecção de células humanas

3.5.1 Transfecção com PEI

Foi utilizada a metodologia com o reagente PEI (polyethyleneimine, Sigma). Para 6 $\times$ 10⁴ células, 3 μ l de PEI a 1 mg/ml foram adicionados a cada μ g de DNA em uma solução de NaCl 150 mM. A mistura foi incubada por 20 min e adicionada à monocamada de

células recoberta por MEM com 10% de SFB. Após 3 horas, o meio foi trocado por meio fresco e as células incubadas por 24 a 72 horas.

3.5.2 Transfecção com Lipofectamina Plus

Células a 70% a confluência, foram transfectadas com o vetor pFlagMotimizado, ou pcDNA3-Flag, usando lipofectamina Plus (Invitrogen®) seguindo instrução do fabricante. Resumidamente para cada placa 8 µg de DNA foram adicionados a 20 µL de reagente Plus em meio MEM sem soro fetal bovino q.s.p. 750 µL. Concomitantemente 30 µL de lipofectamina foram adicionados a 720 µL de meio MEM sem soro fetal bovino. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente as duas soluções foram misturadas e deixadas por mais 15 minutos à temperatura ambiente. Enquanto isso as células foram lavadas com PBS e deixadas em 5 mL de meio MEM sem soro fetal bovino e passado os 15 minutos a solução de transfecção foi adicionada às células, finalmente após 6 horas de incubação a 37 °C foi adicionado 1x de meio MEM com 20% de soro fetal bovino.

3.6 Purificação da proteína M

E. coli BL21 foram transformadas com os plasmídeos pET-Mopt e crescidas em meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/ml). Quando a cultura atingiu uma D.O. 600 de 0,5 foi feita a indução a expressão adicionando IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo) 0,3 mM. As culturas foram incubadas ou por 4 h a 37 °C ou 16 h à T.A e posteriormente centrifugadas 10.000 x g por 45 minutos.

O *precipitado* contendo as bactérias foi ressuspendido em tampão A (0,1 M Tris-HCl pH 7,4, 0,5 M NaCl e 0,02 M de imidazol) e foram lisadas usando *French Press* (Arte Peças). Após a lise foi feita centrifugação a 10.000 x g, e o precipitado foi resuspendido em tampão A contendo 8 M de ureia e homogeneizado por 16 horas a T.A. Foi feita nova centrifugação e com o sobrenadante contendo a proteína M desnaturada e solúvel foi feita renaturação. Para tanto, foi feita diluição a uma velocidade de 0,25 ml/minuto em grande volume de tampão A livre de ureia.

A purificação foi feita passando o tampão A contendo a proteína M por coluna his60 Ni Superflow Resin (Clontech). A eluição da proteína presa à coluna foi feita passando 25 ml de tampão A a uma velocidade de 1,5 ml/minuto, sendo os primeiros 10 ml com tampão A com imidazol 0,5 M, seguidos de 15 ml de tampão A com imidazol 1 M. A proteína eluída foi visualizada em SDS-PAGE e quantificada pelo kit Quick Start Bradford Dye Reagent (BIO-RAD) seguindo instruções do fabricante.

3.7 SDS-PAGE

A análise da expressão de proteínas foi feita por SDS-PAGE. As amostras foram ressuspendidas em 1 X tampão de amostra (50 mM Tris-Cl, pH 6,8, 100 mM *dithiothreitol*, 2% SDS, 0,1% *bromophenol blue*, 10% glicerol). A concentração do gel separador foi 12%, e a corrida foi a 10 mA. A coloração dos géis foi feita com uma preparação de *Coomassie Brilliant Blue R – 250*, da Invitrogen™, utilizando-se protocolos comumente usados na literatura (SAMBROOK et al., 1989).

3.8 Western blot

Após a corrida em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham Biosciences®) que foi incubada com solução de bloqueio (Tween 20 0,1 %, leite em pó desnatado 5 % em PBS) por 16 h a 4 °C. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário por 1 h, 37 °C a T.A. A membrana foi lavada 3x com solução de lavagem (0,1 % Tween 20 em PBS) a T.A. por 10 min, e incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 h a 37 °C, e repetidos os procedimentos de lavagem por 3x. Essa membrana foi então tratada com SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce ®) por 5 min., exposta a Hyperfilm (Amersham Biosciences ®) por 15 min e revelada em câmara escura.

3.9 Imunização

Foram utilizados camundongos BALB/c machos ou fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, obtidos junto ao biotério de animais isogênicos do ICB-USP. O experimento seguiu

um protocolo para imunização com DNA similar ao descrito por Boyer e colaboradores (BOYER et al., 1999), e adaptado anteriormente à rotina do laboratório (SIMABUCO et al., 2009). As normas de manipulação de animais, estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal do ICB foram seguidas rigorosamente.

3.9.1 Imunização com proteína M

A administração se deu via intraperitoneal. Um total de 20 µg de proteína por dose foi administrado por animal. Esta proteína encontrava-se emulsificada na proporção de 1:1 (proteína em PBS:Adjuvante) com Adjuvante de Freund. A primeira dose foi dada com o Adjuvante Completo de Freund e os três reforços foram dados utilizando-se o Adjuvante Incompleto de Freund. O calendário de imunização foi de 14 dias entre as doses (num total de 4 doses totais por animal). No início e a cada manipulação com os animais, foi coletado sangue via retro-orbital, a fim de se testar o soro quanto à produção dos anticorpos policlonais desejados. A obtenção do soro se deu da seguinte forma: o sangue foi incubado a 37 °C por 1 h, seguido de incubação a 4 °C por 1 h. Logo após o mesmo foi centrifugado a 10.000 g por 10 min e o soro (sobrenadante) separado para um novo tubo e estocado a -20 °C.

3.9.2 Imunização com DNA (*pShuttle* ou *pShuttle-Mopt*)

A administração se deu via intramuscular na região da face anterolateral da coxa. Um total de 100 µl (contendo 100 µg de DNA misturado com o adjuvante de fosfato de alumínio na concentração de 450 µg/ml) foi administrado por animal (as doses foram divididas igualmente, 50 µl, em cada coxa) (ULMER et al., 1999). O calendário de imunização foi de 14 dias entre as doses, num total de 4 doses por animal. No início e a cada manipulação com os animais, foi coletado sangue via retro-orbital, a fim de se testar o soro quanto à produção dos anticorpos policlonais desejados. A obtenção do soro foi como descrito na seção anterior.

3.10 Produção de anticorpos monoclonais

Esplenócitos foram coletados de camundongos BALB/c imunizados intraperitonealmente com a proteína M purificada (seção 3.9.1). Foi feita a fusão com células SP2/0 na razão 1:2 (SP2-0/esplenócitos) na presença de 50% polietilenoglicol 1500 (Sigma®). As células fusionadas foram suspensas em meio RPMI 1640 (Vitrocell) contendo 1x hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT, Invitrogen) e incubadas a 37 °C 5% CO₂. Os sobrenadantes dos hibridomas foram testados por ELISA com a proteína M purificada. Os clones positivos seriam reclonados quatro vezes por diluição limitante, e posteriormente expandidos.

Foram testados três 3 protocolos: (1) protocolo usado no laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan (descrito resumidamente acima), (2) protocolo da escola de medicina da universidade de Washington (EUA), (3) protocolo do centro de pesquisa de toxinas da universidade A&M Kingsvill do Texas (TAMUK), os dois últimos protocolos foram obtidos online no site <http://www.protocol-online.org> e possuem apenas pequenas variações com relação ao protocolo descrito acima.

3.11 Imunoprecipitação

Para as imunoprecipitações foram utilizados os plasmídeos contendo genes das proteínas em fusão com Flag. O peptídeo Flag é hidrofílico, composto por 8 aminoácidos e pode ser fusionado a uma proteína de interesse permitindo, entre outras aplicações, a detecção eficiente da proteína a ele fusionada quando utilizamos anticorpos monoclonais específicos contra o peptídeo Flag.

3.11.1 Co-Imunoprecipitação após transfecção dos plasmídeos, pcDNA-Flag-M e pcDNA-Flag

Para a co-imunoprecipitação foram utilizadas 40 placas de 10 mm com células HEK293T. Estas foram transfectadas com os vetores pcDNA-Flag-M e pcDNA-Flag (obtidos anteriormente no laboratório (SIMABUCO, 2009; TAMURA, 2009), cada placa recebeu 20 µg de DNA plasmidial. Dois dias após a transfecção, as células foram lavadas com PBS e

lisadas com tampão de lise celular (Cell Signaling®) contendo inibidores de protease e inibidores de fosfatase. Primeiramente os lisados foram tratados com G-Sepharose sob agitação a 4 °C por 1 h (pré *cleaning*), seguindo-se centrifugação a 8000 rpm a 4 °C por 10 min. O precipitado foi descartado e em seguida ao sobrenadante foi adicionado o anticorpo diluído a 1:2.000 (anti-Flag, TPM ou NPM, Santa Cruz Biotechnology) e deixado por 1 h no agitador a 4 °C. Em seguida foi adicionada G-Sepharose e novamente deixado por 1 h no agitador a 4 °C. Após esse procedimento, os complexos G-Sepharose-Ac-proteínas foram obtidos por centrifugação e lavados com PBS. As proteínas foram eluídas e analisadas por SDS-PAGE e *Western blot*.

3.11.2 Co-Imunoprecipitação após infecção com hRSV adaptado a células HEK293T

Para essa co-imunoprecipitação foram utilizadas garrafas de cultura celular T-75 de células HEK293T, com confluência entre 50-70%. As células foram infectadas ou não com o hRSV (controle negativo). Dois dias após a infecção as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise celular (Cell Signaling®) contendo inibidores de protease e fosfatase. Primeiramente os lisados foram tratados com G-Sepharose sob agitação a 4 °C por 1h, seguindo-se centrifugação a 8000 rpm a 4°C por 10 min. O precipitado foi descartado e em seguida ao sobrenadante foram adicionados os anticorpos anti-TPM ou anti-NPM diluídos a 1:2.000. Para cada anticorpo foi utilizado o lisado de células infectadas ou não e deixado por 1 h no agitador a 4 °C. Em seguida foi adicionada G-Sepharose e novamente deixado por 1 h no agitador a 4 °C. Após esse procedimento, os complexos G-Sepharose-Ac-proteínas foram obtidos por centrifugação e lavados com PBS. As proteínas foram eluídas e analisadas por SDS-PAGE e *Western blot*.

3.12 Separação das frações nuclear e citoplasmática

Para averiguarmos o comportamento da proteína M, células transfectadas ou infectadas tiveram suas frações, nuclear e citoplasmática, separadas e posteriormente submetidas a análise por *Western blot*. Células Hep-2 foram infectadas com hRSV (MOI de 3) ou transfectadas com plasmídeos pcDNA-FLAG-M, pcDNA-FLAG, pShuttle-Mopt ou M pShuttle, e tempos após conforme especificado em resultados foram lavadas com PBS. A

seguir foi adicionado tampão de lise citoplasmática (0,5% Triton-X, EDTA 10 mM e NaCl 0,1 M), sendo a dissolução da membrana citoplasmática acompanhada ao microscópio. O tampão contendo a fração citoplasmática foi coletado e os núcleos que ficaram aderidos na garrafa foram diluídos em PBS, raspados e coletados. As frações nuclear e citoplasmática foram centrifugadas a 2.000 g (este passo foi feito 3 vezes para uma maior pureza das amostras), sendo que para a fração nuclear o precipitado era recolhido e novamente diluído em PBS, e para a fração citoplasmática o sobrenadante era recolhido. As amostras contendo as frações nuclear e citoplasmática foram tratadas com tampão de amostra para aplicação em gel de eletroforese. Para confirmação de uma separação eficiente foram utilizados 2 anticorpos monoclonais: anticorpo VDAC1 que reconhece uma proteína de membrana de mitocôndria e o anticorpo TFIID que reconhece um fator de transcrição da polimerase 2, ambos comprados da empresa Santa Cruz Biotechnology. Para análise da presença da proteína M, foram utilizados os anticorpos policlonais que obtivemos ou anti-FLAG para a transfecção com pcDNA-FLAG-M.

3.13 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Visando se testar o soro dos animais imunizados quanto à presença de anticorpos contra a proteína M, efetuamos ensaios de ELISA. Placas de 96 *wells* foram sensibilizadas durante 4 horas a 4 °C com uma solução contendo proteína M (50µL/poço, 20 ng/µL). Desprezou-se então a solução dos poços e adicionou-se 300 µL de PBS/Tween 0,05%/Leite 10%. Segue-se então incubação a 4 °C por 16 h. Após este tempo os poços foram lavados 3 x com PBS/Tween 0,05%. Adicionou-se então os soros diluídos dos animais. Incubou-se em ambiente úmido a 37 °C por 1 h. Novamente os poços foram lavados 3 x com PBS/Tween 0,05%. Adicionou-se então o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (KPL), numa concentração de 0,2 µg/mL diluído em PBS/Tween 0,05% (100 µL/poço), e a placa foi incubada por 1 h a 37 °C. Ao final da incubação a placa foi lavada 3 x com PBS/Tween 0,05%. Adicionou-se, então, 200 µL da solução de *orto-fenil-diamine diidrochloride*, ou OPD (Sigma-Aldrich), (0,1 M de ácido cítrico, 0,2 M de Na₂HPO₄, OPD a uma concentração final de 0,4 mg/mL e 40 µL de uma solução de peróxido de hidrogênio 30% por 100 mL de solução preparada). Ao final de 10 min de incubação em câmara escura com a solução de OPD, adicionou-se 25 µL de H₂SO₄

2 M para parar a reação. A leitura da placa foi feita no aparelho *Multiskan EX*, da Thermo Electron Corporation, utilizando-se o comprimento de onda de 492 nm.

3.14 Enzyme-linked immunosorbent spot assay (ELISPOT)

A resposta imune celular contra a proteína M e a vacina de DNA foram avaliadas por meio de ensaio ELISPOT de liberação de IFN- γ . Sete a doze dias após a última inoculação, os baços dos animais imunizados foram coletados e foi obtida uma suspensão de células. Placas de ELISPOT pré-sensibilizadas com anticorpo de captura anti-IFN- γ (60 μ l/poço, 10 μ g/mL) foram semeadas com 5×10^5 células/poço. As células foram re-estimuladas *ex vivo* com a proteína M purificada (250 ng/poço), sendo incubadas por 24-30 horas a 37°C. Em seguida, foram adicionados 75 μ g/poço de um segundo anticorpo anti-IFN- γ biotinilado (2 μ g/ml, BD Bioscience ©), incubado-se a 4 °C *over night*. O anticorpo foi reconhecido mediante a aplicação do conjugado streptavidina-peroxidase (100 μ l/poço a 2 μ g/ml, Sigma) e incubação por 3 horas a temperatura ambiente. A detecção das células secretoras de IFN- γ foi feita por meio da adição de 100 μ L da solução de revelação: 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5 contendo H₂O₂ (0.03%) e o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (1mg/ml, Sigma) para desenvolver a coloração e formação de *spots* correspondentes a células secretoras de IFN- γ . A frequência de células formadoras de *spots* foi calculada como o número de *spots* na presença da proteína M menos o número de *spots* dos grupos controles.

3.15 Produção e titulação de hRSV

Células Hep-2 foram infectadas com hRSV A2 com M.O.I. de 0,1 com meio MEM 2% de soro fetal bovino. Com o aparecimento dos sincícios, as células foram lavadas e acrescentados 2 ml de PBS EDTA 10 mM, seguindo incubação a 37 °C por 10 min. As células foram raspadas e centrifugadas a 4000 g a 4 °C por 10 min. O precipitado foi ressuspendido em PBS com sacarose 30% e essa suspensão passada 12 vezes em Dounce para quebra da membrana citoplasmática. Após esse procedimento a suspensão foi centrifugada a 4.000 g 4 °C por 10 min e o sobrenadante transferido para tubos eppendorf e armazenado a -80 °C. A purificação foi feita por ultracentrifugação

(Ultracentrífuga Sorvall®) a 36.000 g por 3 horas a 4 °C. O *pellet* então foi ressuspendido em PBS com sacarose 30% e armazenado em alíquotas a -80 °C.

A titulação viral foi feita por ensaio de placa com diluições seriadas. Foram utilizadas placas de 5 cm de diâmetro com 80% de confluência celular. Primeiramente o meio foi retirado e adicionado 1 ml de meio 2% soro fetal bovino contendo o vírus. Após 2 horas o meio foi retirado e adicionados 5 ml da mistura de meio MEM 2% de soro fetal bovino com agarose 5% fundida (mistura mantida em banho Maria a 40 °C até o uso). As células então foram colocadas na geladeira por 15 min., e retornadas à estufa. Após 5 dias as células foram fixadas pela adição de 5 ml 4% de formalina em NaCl 150mM por 15 min. A agarose então foi retirada e as células coradas com cristal violeta 0,1%. Para o cálculo final do título foi observado o número de placas produzidas em cada diluição.

3.16 Ensaio de desafio

Os animais imunizados com pShuttle, pShuttleMopt, com PBS ou com a proteína M receberam 20 µl de uma suspensão 10^8 pfu/ml de HRSV pela via intranasal. Cinco dias pós-infecção os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os pulmões de cada animal foram retirados, sendo um utilizado para histologia e o outro para extração de RNA.

3.17 Extração de RNA com Trizol LS Reagent

Para a extração de RNA total dos pulmões, foi utilizado 1 ml de Trizol LS reagent Invitrogen® por 100 mg de tecido. A trituração dos tecidos foi realizada por maceração em cadinhos sob baixa temperatura com uso de nitrogênio líquido, e transferência para tubos eppendorf, adição de 200 µl de clorofórmio e agitação vigorosa por 15 segundos no vortex. Após incubação por 3 min a temperatura ambiente o macerado foi centrifugado a 12.000 g por 15 min 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a essa foram adicionados 500 µl de isopropanol, seguindo-se agitação por inversão, incubação por 10 min. a temperatura ambiente, e centrifugação a 11.000 g por 10 min. a 4 °C. O sobrenadante foi removido por inversão e o *pellet* lavado com etanol 75% em água-DEPC.

O sobrenadante foi retirado por inversão, e após a secagem do *pellet* esse foi ressuspendido em 15 a 20 µl de água +DEPC e armazenado a -20 °C.

3.18 Transcrição Reversa

Para cada reação de transcriptase reversa para a obtenção do cDNA, foram utilizados 5 µg do RNA total obtido pela extração com trizol. O procedimento foi segundo as especificações do fabricante do kit utilizado (SuperScript III Reverse Transcriptase Invitrogen®): 2 pmol do oligonucleotídeo específico para o gene, 5 µg de RNA total, 1 µl de 10 mM de dNTP e o volume completado para 13 µl com água-DEPC. A mistura foi aquecida durante 5 min a 65 °C e incubada no gelo por 1 min. Após a incubação foram adicionados 4 µl de tampão 5x First Strand Buffer, 1 µl de 0.1 M de DTT e 1 µl de Super Script, para cada reação. A mistura foi incubada a 55 °C por 60 min e a reação inativada a 70 °C por 15 min.

Foi escolhido um oligonucleotídeo dentro do genoma do HRSV para a realização da transcrição reversa, o *foward* (RSVF-gene N) na posição 747 do gene N (AGGATTGTTTATGAATGCCTATGGT). Antes de ser realizada a transcrição reversa o oligonucleotídeo foi analisado juntamente com a sequência do gene N pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor © 1999-2011 (HALL, 1999).

3.19 Imunofluorescência

Para a Imunofluorescência, células HEp-2 foram cultivadas em placas de 96 poços e transfectadas com lipofectamina (seção 3.5.2). Diferentes tempos após transfecção, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com metanol por 2 minutos a temperatura ambiente. As células fixadas foram lavadas 2 vezes com 100 µl de PBS e bloqueadas com 100 µl de PBS-tween 0,2%/leite 10%, por 20 minutos a 37 °C. Foram então adicionados 70 µl de PBS-tween 0,2%/leite 10% contendo o anticorpo primário e feita incubação por 1 hora a 37 °C. Os poços foram lavados 3 vezes com 100 µl de PBS-tween 0,2% e adicionados 70 µl de PBS-tween 0,2%/leite 10% contendo anticorpo

secundário e DAPI, e feita incubação por 1 hora a 37 °C. Foi feita lavagem com PBS-tween 0,2% e observação ao microscópio.

3.20 Imunofluorescência Confocal

Para a imunofluorescência confocal, seguiu-se o mesmo protocolo que no seção anterior, no entanto, as células foram cultivadas em câmaras (Tek Chamber Slide w/Cover – NUNC^{tm}). As laminas foram preparadas com lamínulas Knittel Gläser (Alemanha) e esmalte incolor. O Microscópio confocal de varredura a laser usado foi da marca Zeiss no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo.

4 RESULTADOS

4.1 Produção e purificação da proteína M

Para um melhor entendimento da ação da proteína viral de matriz (M) do hRSV foi necessário a sua produção, purificação e obtenção de anticorpos eficientes no seu reconhecimento. Anteriormente no laboratório foi obtido um plasmídeo com a sequência do gene da proteína M otimizada para o códon *usage* humano. Esse gene foi sub-clonado em fusão a uma cauda de histidinas no vetor bacteriano pET, gerando pET-Mopt o que possibilitou a produção da proteína M de forma eficiente também em bactérias. Com este plasmídeo a produção da proteína M foi feita em bactérias BL21, tendo sido sua purificação feita em colunas de resina contendo níquel (ver seção 3.6). A indução e purificação foram analisadas em géis de poliacrilamida (figura 6), sendo que a produção da proteína purificada foi superior a 2mg por litro de cultura bacteriana induzida considerada eficiente. Essa proteína, apesar de ser produzida insolúvel, foi eficientemente renaturada em forma solúvel (ver seção 3.6), tornando-a mais apropriada para experimentos de imunização.

Figura 6 - SDS-PAGE de Indução e purificação da proteína M de bactérias BL21 transformadas com pET-Mopt.

Nas colunas 1, 2, 3 estão apresentadas amostras de três colônias transformadas porém sem a indução por IPTG, colunas 5, 6, 7 são as mesmas 3 colônias após indução por IPTG, coluna 4 e 8 marcador de massa, na coluna 9 está apresentada a purificação da proteína M por coluna de Ni da colônia 7 pós indução por IPTG.

4.2 Imunização com a proteína M para produção de anticorpos policlonais

Com a proteína M purificada em mãos, foi dado início aos ensaios de imunização com a intenção de produzir anticorpos policlonais anti-M. Foram imunizados 20 camundongos Balb/c com a proteína M purificada e obtidas várias coletas de soro (ver seção 3.9.1). Os soros obtidos foram testados por ELISA contra a proteína purificada (0,5µg/poço) e contra a proteína viral ($8,3 \cdot 10^5$ vírus/poço) (figura 7). Os soros também foram testados por *Western blot* (figura 8). Os dados obtidos por ELISA e *Western blot* demonstraram que os anticorpos produzidos contra a proteína M, foram eficientes na detecção tanto da proteína M purificada, quanto na detecção da proteína M viral, e estes anticorpos foram usados nos demais experimentos.

Figura 7 – Elisa contra a proteína M

Placas sensibilizadas com a proteína M purificada (grupos 1 e 3), ou sensibilizadas com hRSV (grupos 2 e 4). Grupo 1 e 2 soro de animais imunizados com proteína M; Grupo 3 e 4 soro de animais imunizados com PBS.

Figura 8 - *Western blot* de amostras de proteína M purificadas.

Na coluna 1 foi usado anticorpo monoclonal anti-His, e na coluna 2 um dos soros anti-M obtidos. A seta mostra a altura esperada para proteína M.

4.3 Imunizações com a proteína M para produção de anticorpos monoclonais

Durante o trabalho no laboratório também foram feitas tentativas de se obter anticorpos monoclonais, pois estes são ferramentas de detecção mais específicas e de grande utilidade. As imunizações para produção de anticorpos monoclonais demoram em media 7 semanas e durante esse tempo coletas de sangue também foram feitas para testar a produção de anticorpos. Após a coleta do baço e fusão de células SP-2 com os

esplenócitos obtidos, usualmente espera-se em torno de 15 dias para observar o aparecimento de clones e testá-los por ELISA para averiguar a produção de anticorpos. Foram feitas seis tentativas de obter anticorpos monoclonais utilizando três diferentes protocolos, conforme metodologia descrita na seção 3.10, porém não obtivemos sucesso (dados não apresentados). Aparentemente poucos hibridomas foram formados (fusão não eficiente) e não geraram colônias que produtoras de anticorpos. Diante das dificuldades, resolvemos manter apenas a utilização dos anticorpos policlonais já obtidos.

4.4 Interações da proteína M com proteínas celulares

4.4.1 Imunoprecipitação

Como comentado na seção 1.6, anteriormente no laboratório foram feitos experimentos de transfecção do vetor que expressa M-Flag em células humanas em cultura. Anticorpos altamente eficientes contra FLAG, ligados a esferas de agarose (Sigma), foram utilizados para fazer a imunoprecipitação. A partir de SDS-PAGE foram selecionadas bandas correspondentes aos pesos moleculares esperados da proteína M. Os fragmentos de gel com as bandas selecionadas foram submetidos aos procedimentos de análise por espectrometria de massa confirmando a identidade da proteína M (resultados não apresentados, obtidos em colaboração com os Drs. Zerbini e Libermann no centro de proteômica do Harvard Institutes of Medicine, Boston).

Foram observadas proteínas co-imunoprecipitadas com M-Flag, tendo sido possível identificar duas proteínas celulares com melhor *score* de interação, a tropomiosina e a nucleofosmina (TAMURA, 2009). Para confirmar a identidade dessas proteínas, retomamos a tarefa de detectá-las por *Western blot* utilizando os anticorpos policlonais específicos que obtivemos.

Para esse experimento foram utilizadas garrafas com células HEK293T, que foram transfectadas com pcDNA-FLAG M ou pcDNA-FLAG usando-se o protocolo com PEI (descrito na seção 3.5.1), ou infectadas com hRSV. Com os lisados foram feitas co-imunoprecipitações conforme descrito em Material e Métodos. Nesses experimentos foi confirmada a interação da proteína M com as proteínas celulares identificadas por espectrometria de massa. A tropomiosina pertence à família das proteínas associadas a

actina, sendo importante para a estruturação do citoesqueleto (FREDERICK, 2000). A nucleofosmina é uma proteína multifuncional, trafega entre o núcleo e o citoplasma, liga-se a complexos RNA-proteína e apresenta atividade de chaperona (COLOMBO et al., 2011). Essas funções poderiam estar auxiliando na replicação do hRSV.

4.4.2 Detecção da nucleofosmina

A imunoprecipitação foi feita com o anticorpo anti-FLAG, e para a detecção da proteína celular nucleofosmina (NPM) foi utilizado anticorpo anti-NPM no *Western blot*. O resultado apresentado na figura abaixo (figura 9) indica que a proteína NPM foi co-imunoprecipitada com a proteína M.

Figura 9 - Co-imunoprecipitação da proteína NPM.

Está apresentado *Western blot* da imunoprecipitação com anti-FLAG e detecção com anticorpo monoclonal anti-NPM (Santa Cruz Biotechnology). Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos (1) pcDNA-FLAG M e (2) pcDNA-FLAG.

4.4.3 Detecção da tropomiosina

A imunoprecipitação foi feita com o anticorpo anti-FLAG, e para a detecção da proteína celular tropomiosina (TPM) foi utilizado anticorpo anti-TPM no *Western blot*. O resultado apresentado na figura abaixo (figura 10) indica que a proteína TPM foi co-imunoprecipitada com a proteína M.

Figura 10 - Co-imunoprecipitação da proteína TPM.

Está apresentado *Western Blotting* da imunoprecipitação com anti-FLAG e detecção com anticorpo monoclonal anti-TPM. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos: (1) pcDNA-FLAG ; (2) pcDNA-FLAG M.

4.4.4 Co-imunoprecipitação reversa com anticorpo anti-tropomiosina

Após ter sido confirmada a co-imunoprecipitação das proteínas TPM e NPM com M, foram feitos ensaios de co-imunoprecipitação reversa para ambas. Neste experimento foram precipitadas as proteínas celulares de células transfectadas ou infectadas com hRSV e foram identificadas as proteínas virais.

Para essa co-imunoprecipitação reversa da proteína celular tropomiosina (TPM) em células transfectadas foi utilizado o anticorpo anti-TPM na imunoprecipitação seguida de detecção com anticorpo anti-FLAG. Na figura (figura 11) está apresentada a detecção da proteína M através da técnica de *Western blot* com anticorpo anti-FLAG.

Figura 11 - Co-Imunoprecipitação da proteína M.

Western blot da imunoprecipitação com anti-TPM, analisado com o anticorpo anti-FLAG. (1) extrato celular da transfecção com pcDNA-FLAG M; (2) extrato celular da transfecção com pcDNA-FLAG.

4.4.5 Imunoprecipitação com anti-tropomiosina em células infectadas

Para a co-imunoprecipitação reversa da proteína celular TPM em situação infectante por hRSV foi utilizado o anticorpo anti-TPM na imunoprecipitação, seguida de detecção com anticorpo o policlonal anti-M. Na figura abaixo (figura 12) está apresentada a detecção da proteína M através da técnica de *Western blot* com anticorpo anti-M.

Figura 12 - Co-Imunoprecipitação da proteína M.

Western blot da imunoprecipitação com anti-TPM, analisado com o anticorpo policlonal anti-M. A – Infecção viral com hRSV adaptado em HEK293T. B – Extrato de células não infectadas.

4.4.6 Co-imunoprecipitação reversa com anti-nucleofosmina

Para a co-imunoprecipitação reversa da proteína celular NPM em células transfectadas, utilizamos o anticorpo anti-NPM na imunoprecipitação seguida de detecção com anticorpo policlonal anti-M. Na figura 13 está apresentada a detecção da proteína M através da técnica de *Western blot* com anticorpo policlonal anti-M.

Figura 13 - Co-Imunoprecipitação da proteína M.

Western blot da imunoprecipitação com anti-NPM, analisado com o anticorpo policlonal anti-M. 1 – extrato celular da transfecção com pcDNA-FLAG M. 2 – extrato celular da transfecção com pcDNA-FLAG.

4.4.7 Imunoprecipitação com anti-nucleofosmina em células infectadas

Para a co-imunoprecipitação reversa da proteína celular NPM em situação infectante, foi utilizado o anticorpo anti-NPM na imunoprecipitação seguida de detecção com anticorpo o policlonal anti-M. Na figura abaixo (figura 14) está apresentada a detecção da proteína M através da técnica de *Western blot* com anticorpo anti-M.

Figura 14 - Co-Imunoprecipitação da proteína M.

Western blot da imunoprecipitação com anti-NPM, analisado com o anticorpo policlonal anti-M. A – Infecção viral com hRSV adaptado em HEK293T. B – Extrato de células não infectadas.

4.5 Localização intracelular da proteína M

4.5.1 Padronização de transfecção com lipofectamina

Para um melhor entendimento da localização e possível interferência que a proteína M estaria tendo em células humanas passamos a usar nas transfecções a linhagem Hep-2, já que esta linhagem celular esta entre uma das melhores para replicação *in vitro* do hRSV. Infelizmente o método de transfecção com PEI não se mostrou eficiente para esta linhagem celular. Para as transfecções em linhagem Hep-2 foi utilizado o reagente lipofectamina que se mostrou bastante eficiente, essa eficiência foi demonstrada transfectando células Hep-2 com o plasmídeo piresEGFP para comparação dos dois reagentes (figuras 16 e 17) plasmídeo que quando expresso produz a proteína EGFP. A proteína verde fluorescente (GFP) é uma proteína produzida por um cnidário que emite fluorescência na zona verde do espectro visível, sua transfecção permite uma avaliação direta por microscopia de fluorescência da eficiência de transfecção, note que

EGFP é apenas uma variante mutante da GFP que emite uma taxa de fluorescência mais elevada que a GFP normal.

Figura 16 - Eficiência de transfecção com PEI.

Células Hep-2 transfectadas com PEI com 24 horas pós transfecção. (A) campo claro, (B) EGFP, (C) *merge* das imagens.

Figura 17 - Eficiência de transfecção com lipofectamina.

Células Hep-2 transfectadas com lipofectamina com 24 horas pós transfecção. (A) campo claro, (B) EGFP, (C) *merge* das imagens.

4.5.2 Padronização da separação núcleo/citoplasma

Para averiguar se o protocolo escolhido para a separação das frações do núcleo e do citoplasma (item 3.12) era eficiente, as amostras foram analisadas com anticorpos monoclonais contra proteínas específicas do núcleo ou do citoplasma. As figuras 18 e 19 representam a fração nuclear e citoplasmática quando analisadas com os anticorpos monoclonais contra as proteínas VDAC1 ou TFIID. O protocolo de separação se mostrou eficiente e com pouca contaminação das frações.

Figura 18 – Separação de núcleo e citoplasma.

Frações de núcleo (1) e citoplasma (2) utilizando o anticorpo contra proteína de superfície de mitocôndria (VDAC1).

Figura 19 - Separação de núcleo e citoplasma.

Frações de núcleo (esquerda) e citoplasma (direita) utilizando o anticorpo contra um dos fatores de transcrição da RNA polimerase II (TFIID).

4.5.3 Localização da proteína M em células infectadas com hRSV

Células Hep-2 foram infectadas com hRSV com MOI de 3, e após 12, 16, 20 ou 24 horas, foram colhidas as frações nucleares e citoplasmáticas. As quantidades de proteínas nos extratos foram medidas por Bradford para normalização da quantidade aplicada nos géis, e analisadas por *Western blot* com anticorpo policlonal anti-M (figura 20). Foi verificado que a quantidade de proteína M se concentra em mais no núcleo ate 16 horas porem ela ainda é encontrada em grande quantidade no núcleo e no citoplasma mesmo 24 horas pós infecção.

Figura 19 - Localização de M no contexto da infecção viral.

Frações nuclear (N) e citoplasmática (C) nos tempos 12, 16, 20 e 24 horas pós infecção. O anticorpo utilizado para detecção no *Western blot* foi o policlonal anti-M.

4.5.4 Localização intracelular da proteína M em células fora do contexto de infecção por hRSV

Padronizada a transfecção com lipofectamina em Hep-2, essas células foram transfectadas com os plasmídeos pcDNA-FLAG M ou pcDNA-FLAG. Após 16 ou 24 horas as frações nucleares e citoplasmáticas foram separadas (item 3.12) e analisadas quanto a presença da proteína M. Para as células transfectadas com pcDNA-FLAG M ficou clara a presença da proteína M na fração nuclear e na fração citoplasmática em ambos os tempos 16 e 24 horas, esse resultado foi observado tanto com o anticorpo monoclonal anti-FLAG quanto com os anticorpos policlonais anti-M (figuras 20 e 21, respectivamente).

Figura 20 – Localização intracelular de M utilizando anticorpo policlonal anti-M.

Está apresentado *Western blot* utilizando anticorpo policlonal anti-M em extratos de células Hep-2 transfectadas. (Coluna 1) controle negativo, extrato total 24 hs após transfecção com pcDNA-FLAG; (coluna 2) fração citoplasmática 16 hs após transfecção com pcDNA-FLAG M; (coluna 3) fração nuclear 16 horas após transfecção com pcDNA-FLAG M; (coluna 4) fração citoplasmática 24 horas após transfecção com pcDNA-FLAG M; (coluna 5) fração nuclear 24 horas após transfecção com pcDNA-FLAG M.

Figura 21 - Localização intracelular de M utilizando anticorpo monoclonal anti-FLAG.

Está apresentado *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-FLAG em extratos de células Hep-2 transfectadas. (Coluna 1) controle negativo, extrato total 24 horas após transfecção com pFlag-Vazio; (coluna 2) fração citoplasmática 16 horas após transfecção com pFlag-Mopt; (coluna 3) fração nuclear 16 horas após transfecção com pFlag-Mopt; (coluna 4) fração citoplasmática 24 horas após transfecção com pFlag-Mopt; (coluna 5) fração nuclear 24 horas após transfecção com pFlag-Mopt.

Também foi observado o mesmo padrão de localização da proteína M para células transfectadas com o plasmídeo pShuttle-Mopt que expressa a proteína M sem o peptídeo Flag (figura 22). Com esse plasmídeo a proteína M expressa é equivalente à proteína M viral.

Figura 22 - Localização intracelular de M sem FLAG utilizando anticorpo policlonal anti-M.

Está apresentado *Western blot* utilizando anticorpo policlonal anti-M em extratos de células Hep-2 transfectadas. (Coluna 1) controle negativo, extrato total 24 horas pós transfecção com pShuttle-Vazio; (coluna 2) fração citoplasmática 16 horas pós transfecção com pShuttle-Mopt; (coluna 3) fração nuclear 16 horas pós transfecção com pShuttle-Mopt; (coluna 4) fração citoplasmática 24 horas pós transfecção com pShuttle-Mopt; (coluna 5) fração nuclear 24 horas pós transfecção com pShuttle-Mopt; (coluna 6) controle positivo, extrato total de células 36 horas pós infecção com hRSV.

Os resultados obtidos com células transfectadas não podem ser usados de forma quantitativa, pois é impossível confirmar a mesma taxa de transfecção para todos os experimentos, também não foi possível detectar a proteína M em tempos menores do que 16 horas pós transfecção. Provavelmente isso se deve à não expressão de proteína M em quantidade suficiente para ser verificado em *Western blot* (dados não mostrados).

4.5.5 Localização por microscopia da proteína M em células fora do contexto de infecção com hRSV

Para confirmar os dados obtidos por *Western blot*, analisamos a expressão de M por imunofluorescência. Células Hep-2 foram transfectadas com plasmídeo pcDNA-FLAG M e a detecção foi feita com o anticorpo monoclonal anti-FLAG com tempos de 8, 12, 24 e 36 horas pós transfecção (figuras 23, 24, 25, 26 respectivamente). Verificamos que a proteína M fora do contexto de infecção tem localização nuclear e citoplasmática, sendo esse padrão aparentemente estável entre 8 e 36 horas após a transfecção.

Figura 23 - Imunofluorescência de células Hep-2 com 8 horas pós transfecção.

Foi utilizando o anticorpo primário anti-flag com anticorpos secundário texas red (vermelho) e foi utilizado corante DAPI para o núcleo (azul).

Figura 24 - Imunofluorescência de células Hep-2 com 12 horas pós transfecção.

Foi utilizando o anticorpo primário anti-flag com anticorpos secundário texas red (vermelho) e foi utilizado corante DAPI para o núcleo (azul).

Figura 25 - Imunofluorescência de células Hep-2 com 24 horas pós transfecção.

Foi utilizando o anticorpo primário anti-flag com anticorpos secundário texas red (vermelho) e foi utilizado corante DAPI para o núcleo (azul).

Figura 26 - Imunofluorescência de células Hep-2 com 36 horas pós transfecção.

Foi utilizando o anticorpo primário anti-flag com anticorpos secundário texas red (vermelho) e foi utilizado corante DAPI para o núcleo (azul).

Analizamos também por microscopia confocal, células 24 horas pós transfecção com pFlag-Mopt. O microscópio confocal permite a visualização de imagens em diferentes regiões da célula como esquematizado na figura 21. Na figura 22D e 22E é possível identificar a proteína M (em vermelho) no citoplasma, na figura 22B e 22C estão apresentados cortes que passam pelos núcleos (em azul). Podemos observar que os núcleos das células transfectadas apresentam uma cor roxa (união da cor azul do núcleo com o vermelho da proteína M), que confirma a localização da proteína M dentro do núcleo.

Figura 27 - Esquema que representa uma célula analisada ao microscópio confocal.

Linhas de foco representam as diferentes regiões da célula observadas.

Figura 28 - Microscopia confocal de células transfectadas com pFlag-Mopt.

Foi utilizando o anticorpo primário anti-flag com anticorpos secundário texas red (vermelho) e foi utilizado corante DAPI para o núcleo (azul). (A) corte superior da célula, (B e C) corte na região do núcleo, (D e E) corte da área mais citoplasmática, (F) corte na região inferior da célula.

Outro experimento foi feito para averiguar quais seriam os efeitos da proteína M em células humanas. Tentamos selecionar uma linhagem de células Hep-2 transfectadas com plasmídeo pFlag-Mopt usando geneticina, pelo fato desse vetor carregar essa marca de resistência. A seleção foi feita com sucesso e as células selecionadas foram testadas por *Western blot* e apresentavam altas taxas de produção de proteína M, porém com o passar do tempo essa produção foi diminuindo e ao final da segunda semana pós transfecção já não havia produção de proteína M pelas células, mesmo mantendo as células sob pressão seletiva com geneticina (dados não mostrados).

4.6 Interação da proteína M com Tropomiosina

Depois de confirmada a interação da proteína M com, TPM foi averiguado se a expressão de M poderia interferir com a produção da TPM, fora do contexto da infecção viral. Para isso, células Hep-2 foram transfectadas com os plasmídeos Flag-Mopt e pFlag e após 48 horas, analisadas por *Western blot*. Podemos observar que não houve diferença na quantidade de TPM comparando células transfectadas e não transfectadas (figura 23).

Figura 29 - Efeito de M na expressão de TPM em células Hep-2.

Células transfectadas utilizando lipofectamina e 48 horas pós transfecção com pFlag-Mopt (1) ou com pFlag (2), foram coletadas para análise por *Western blot*.

4.7 Padrão de localização da nucleofosmina em células transfectadas

Para determinarmos se a proteína M estaria interferindo com a localização da nucleofosmina, foram feitos ensaios de imunofluorescência com células transfectadas com plasmídeo pFLAG-M. Foi feita visualização 36 horas pós transfecção utilizando

anticorpo monoclonal anti-FLAG detectado com conjugado *texas red*, e anticorpo monoclonal anti-nucleofosmina detectado com conjugado isotiocianato de fluoresceína. Não foi possível identificar uma diferença grande na localização da proteína celular nucleofosmina quando células transfectadas com plasmídeo pFlag-M foram comparadas com células transfectadas com plasmídeo pFlag-vazio ou não transfectadas (figura 30).

Figura 30 - localização da nucleofosmina.

(A)

(B)

Microscopia de células transfectadas com pFlag-Mopt. Foi utilizando o anticorpo primário anti-flag com anticorpos secundário texas red (vermelho), o anticorpo primário anti-nucleofosmina com conjugado Fitc e foi utilizado corante DAPI para o núcleo (azul). As três imagens em A representam o mesmo campo com diferentes filtros e a imagem B representa o merge das imagens acima

4.8 Imunizações para estudo de resposta humoral e celular

Um dos fatores importantes na prevenção do hRSV é relacionado ao balanço da resposta imune (humoral e celular). Para o hRSV o ideal de uma vacina seria a indução de a produção de anticorpos neutralizantes aliados a uma resposta CD8+. No intuito de averiguar o potencial da proteína M como imunógeno, foram feitos ensaios descritos a

seguir. Utilizamos 4 grupos de 5 animais, sendo que 2 grupos foram imunizados com proteína M ou PBS como descrito no seção 3.9.1, e os outros 2 grupos foram imunizados com DNA, pShuttle-Mopt ou pShuttle, como descrito no seção 3.9.2. Para os testes celulares, uma semana após a ultima imunização os animais foram sacrificados e foram retirados dos baços.

4.8.1 ELISA

Foram feitos ensaios de ELISA com o soro dos animais imunizados, e apenas a imunização com a proteína M gerou anticorpos contra M. As imunizações com PBS, pShuttle e pShuttle-Mopt não geraram nenhuma produção de anticorpos contra a proteína M purificada (figura 24).

Figura 24 – ELISA do soro de animais contra a proteína M

Placa sensibilizada com proteína M purificada em que foram testados os soros dos animais imunizados: (PBS) animais imunizados com PBS, (Prot-M) animais imunizados com a proteína M, (pshuttle-vazio) animais imunizados com pShuttle, (pshuttle-Mopt) animais imunizados com pShuttle-Mopt.

4.8.2 ELISPOT

Os ensaios de ELISPOT para detectar a produção de *interferon-gamma* (IFN- γ) por células do baço dos animais imunizados, revelaram que apenas esplenócitos de animais imunizados com pShuttle-Mopt secretam IFN- γ quando estimulados com a proteína M purificada (figura 25).

Figura 25 - ELISPOT dos animais imunizados.

Ensaio de ELISPOT feito com células do baço de animais imunizados. (PBS) animais imunizados com PBS, (Prot-M) animais imunizados com a proteína M, (pshuttle-vazio) animais imunizados com pShuttle, (pshuttle-Mopt) animais imunizados com pShuttle-Mopt. *(o animal numero 5 imunizado com pShuttle-Mopt morreu antes do final do experimento)

4.8.3 PCR em tempo real e cortes histológicos

Para averiguar se a proteína M poderia ter algum papel protetor para o hRSV, novamente grupos de 5 animais foram imunizados, porem desta vez duas semanas após a última imunização estes animais foram desafiados com hRSV como descrito o seção 3.16.

Com o pulmão direito (pulmão de tamanho um pouco maior) foi quantificado a carga viral através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (figura 26). Os animais imunizados não tiveram diminuição significativa na carga viral quando comparados com os animais controle.

Figura 26 – Quantificação da carga viral após imunização, seguida de desafio.

O gráfico mostra a quantificação do genoma de HRSV nos grupos imunizados com pbs, proteína M purificada (protM), plasmídeo pShuttle M otimizado (Mopt) e pShuttle (pshut vazio).

Com o outro pulmão foi realizado o procedimento de fixação, sendo a realização dos cortes histológicos (o emblocamento e a microtomia) feitos por um técnico contratado. As lâminas foram enviadas para um serviço de análise de histopatologia. Nos resultados obtidos junto ao patologista, não foi evidenciado uma redução da doença no geral e principalmente a eosinofilia se manteve semelhante aos grupos controles (quadro 1). Neste experimento não foi observada nenhuma piora no quadro da doença dos animais imunizados.

Quadro 1 - Laudo referente ao pulmão de animais imunizados e posteriormente desafiados com hRSV

	PBS	Proteína M	pShuttle-Vazio	pShuttle-Mopt
Pneumonia (x)IN ( )AF ( )AD	1	1	1	1
Hiperplasia linfóide	0	0	0	0
Linfócitos	0,2	0,2	0,2	0
Macrófagos	1	1,2	1	1,2
Eosinófilos	1	1	1	1
Edema	0,2	0	0,2	0
Hemorragia	0,2	0,2	0,2	0,2

A cada animal foi dado um valor dependendo da intensidade dos dados. Os dados representam ao valor médio para cada grupo contendo cinco animais vacinados. Os animais foram vacinados com: PBS, Proteína M, pShuttle-Vazio e pShuttle-Mopt. *0= ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa. IN – intersticial; AF – alveolar focal; AD – alveolar difusa.

5 DISCUSSÃO

O hRSV é um vírus com alto impacto para o ser humano, e as informações a respeito deste patógeno ainda não são suficientes para o estabelecimento de um tratamento adequado, ou a produção de uma vacina eficiente. Neste trabalho buscamos gerar informações sobre as características de uma das proteínas indispensáveis para a replicação do hRSV, a proteína de matriz, visando contribuir para a solução desses problemas.

5.1 Produção da proteína M e de anticorpos específicos anti-M

Inicialmente produzimos e purificamos a proteína M utilizando o plasmídeo pET-Mopt. Essa proteína se mostrou similar no peso molecular em relação à proteína M viral. Anticorpos policlonais produzidos utilizando esta proteína como antígeno foram eficientes em identificar a proteína M viral. Esses anticorpos foram necessários ao desenvolvimento do trabalho, pois não existem até o momento anticorpos comerciais disponíveis contra M.

Em paralelo à produção dos anticorpos policlonais anti-M, tentamos sem sucesso produzir anticorpos monoclonais anti-M. A metodologia de produção de anticorpos monoclonais é considerada uma técnica que demanda um grande tempo para execução além de ser bastante complexa (BARTAL; HIRSHAUT, 1987). Nosso laboratório não tinha experiência na produção de anticorpos monoclonais e mesmo quando utilizei diferentes protocolos não fui capaz de produzir clones (hibridomas) secretores de anticorpos anti-M. Como os anticorpos policlonais obtidos foram suficientes para a obtenção dos demais resultados não houve a necessidade de continuar a investir na produção de anticorpos monoclonais até o momento.

5.2 Interação da proteína M com proteínas celulares

Com anticorpos eficientes na identificação da proteína M em mãos, foram feitos experimentos de imunoprecipitação para confirmar os dados obtidos anteriormente em nosso laboratório. Dados anteriores de imunoprecipitação da proteína M obtidos por

espectrometria de massa revelaram que juntamente com a proteína M, eram co-imunoprecipitadas as proteínas celulares tropomiosina e a nucleofosmina (TAMURA, 2009). Com anticorpos específicos contra a proteína viral M e anticorpos específicos contra as proteínas celulares tropomiosina e nucleofosmina foi possível confirmar os dados obtidos por espectrometria de massa, desta vez utilizando a técnica de *Western blot*.

Os resultados das imunoprecipitações confirmaram especificamente a interação da proteína M com a nucleofosmina. A nucleofosmina é uma proteína celular localizada principalmente no núcleo porém parte da nucleofosmina se localiza hora no núcleo hora no citoplasma, relacionada com as ribonucleoproteínas a nucleofosmina se liga a ácidos nucléicos de fita simples (ZHANG; THOMIS; SAMUEL, 1989). A proteína nucleofosmina é, bioquimicamente, como uma chaperona e alterações em sua função tem sido reportado no processo de transformação celular (COLOMBO et al., 2011). O motivo da interação da proteína M com a nucleofosmina não está elucidado, a proteína nucleofosmina agrega diferentes funções. Uma possibilidade é de que a proteína M possa estar desregulando algumas das funções da nucleofosmina levando ao bloqueio da morte celular por apoptose para manter a replicação viral. Outra, é de que esteja assessorando as interações RNA proteína no complexo ribonucleoproteico viral, como o faz na montagem dos ribossomos (COLOMBO et al., 2011).

Também foi possível confirmar através de imunoprecipitação a interação da proteína M com a proteína celular tropomiosina. A tropomiosina é uma proteína citoplasmática ligante de actina. Uma função fundamental da tropomiosina é proteger os filamentos de actina impedindo sua desestabilização e desfragmentação causada por fatores como gelsolina e cofilina (FREDERICK, 2000). A proteína M no final do ciclo replicativo do vírus hRSV interage com as outras proteínas virais e tem papel fundamental no processo de brotamento, a desestabilização do citoesqueleto, por uma desestabilização da tropomiosina, poderia estar possibilitando o brotamento viral. Recentemente em fevereiro de 2012 Mitra e colaboradores demonstraram quem sem a presença da proteína M não ocorre a maturação e manutenção dos filamentos virais e também não há produção e liberação de novas partículas virais infectantes, tais resultados reforçam a hipótese de que a proteína M além participar na montagem e

organização das proteínas na partícula viral também interfere com o citoesqueleto celular e possibilita o brotamento viral.

5.3 Localização intracelular da proteína M fora do contexto de infecção

Quanto a localização da proteína M, durante a infecção ela é produzida no citoplasma e segue para o núcleo, e durante o estagio final da replicação viral a proteína M se acumula no citoplasma (GHILDYAL et al., 2003). Em células transfectadas e produtoras de proteína M, foi possível verificar sua presença no citoplasma e no núcleo, mostrando que esse padrão de localização não depende de outras proteínas virais. No caso de células transfectadas a proteína M foi vista presente no núcleo e no citoplasma desde pouco tempo pós transfecção (8 horas) até tempos longos pós transfecção (36 horas). Esse padrão de localização provavelmente deve-se ao modo em que a proteína M é produzida. O pShuttle é um plasmídeo que expressa ininterruptamente a proteína M, deste modo a proteína M é produzida no citoplasma, vai para o núcleo e volta ao citoplasma. Isso é observado nos nossos dados de maneira que independente do tempo pós transfecção a proteína M é encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma.

Com as células transfectadas também tentamos produzir uma linhagem onde todas as células presentes produzissem a proteína M, essa linhagem seria importante para entender as mudanças que ocorrem com as células na presença da proteína M. Provavelmente as células que produziam a proteína M, com o tempo tornavam-se inviáveis. No trabalho de Mitra e colaboradores publicado em 2012, quando eles tentaram obter células que produziam a proteína M fusionada a GFP após certo tempo a expressão resultou em altas taxas de células não aderidas, arredondadas. Neste trabalho não averiguamos a viabilidade das células produtoras de proteína M, de maneira que não foi confirmado se a inviabilidade dessas células é devido a citotoxicidade da proteína M que eventualmente mataria as células ou se a presença de M alteraria o citoesqueleto dessas células impedindo que as mesmas se mantivessem presas ao fundo da garrafa.

Tanto a função da proteína M na replicação viral e as alterações sofridas pela célula na presença da proteína M ainda não estão completamente elucidadas. Ainda não se sabe qual o motivo da presença da proteína M no núcleo nos estágios iniciais de infecção viral. Algumas hipóteses seriam que a proteína M iria para o núcleo para não

interferir na replicação durante a fase inicial do genoma viral, ou que a proteína M estaria influenciando em outros mecanismos devido à regulação de alguns genes celulares. A continuidade deste projeto é importante para trazer novas informações quanto a função desta fundamental proteína viral.

5.4 Resposta imune gerada pela proteína M

Outro aspecto importante da proteína M averiguado neste trabalho foi a resposta imune *in vivo* produzida contra este antígeno. Duas estratégias de imunizações foram utilizadas: imunização intraperitoneal com a proteína M e a imunização intramuscular com um plasmídeo que codifica a proteína M. A resposta humoral associada com nenhuma resposta celular gerada pela imunização com a proteína M não é interessante, pois estamos lidando com uma proteína viral interna ao envelope.

Em humanos, Heidema e colaboradores em 2004, já haviam mostrado que havia células citotóxicas específicas para epitopos da proteína M no sangue de doadores saudáveis. Ainda não se sabe o quão relevantes poderiam ser estas células para a defesa do organismo frente à infecção viral. Os dados apresentados referentes a imunização com os plasmídeos expressando a proteína M também revelaram uma resposta celular de produção de *interferon-gamma* bastante significativa para Balb/c com ausência de resposta humoral. Estudos em modelos animais com hRSV mostraram que entre as células do sistema imune as células T citotóxicas são as mais importantes para a *clearance* de células epiteliais infectadas por hRSV (GRAHAM et al., 1991; GRAHAM, 1996). Porém o resultado de desafio não mostrou uma proteção contra a infecção pelo hRSV e os cortes histológicos não mostraram uma diferença de gravidade histopatológica entre os grupos.

Mesmo não obtendo um resultado positivo nos testes de desafio, para produção de uma vacina ideal para o hRSV sabe-se que é necessário um balanço na resposta de linfócitos CD4+ e CD8+ (GRAHAM, 2011). Os dados obtidos neste trabalho mostram que a vacina de DNA da proteína M poderia auxiliar na produção dessa vacina, podendo ser associada a outros iminógenos.

6 CONCLUSÕES

- A expressão utilizando o plasmídeo pET-Mopt da proteína M em bactérias e sua posterior purificação foi bastante eficiente;
- os anticorpos policlonais produzidos em Balb/C utilizando a proteína M purificada foram específicos para o reconhecimento da proteína M artificialmente produzida e também a proteína M viral;
- a imunoprecipitação em células Hek-293T confirmaram as interações da proteína M com as proteínas celulares TPM e NPM;
- a localização Nuclear e citoplasmática da proteína M, fora do contexto de infecção viral, em células Hep-2 foi confirmada;
- não foi encontrada diferença significativa na quantidade de TPM presente em células 48 horas pós transfecção com plasmídeo pFlagM;
- a imunização intraperitoneal com proteína M produziu resposta humoral robusta e não produziu resposta celular de produção de *interferon-gamma* significativa;
- a imunização intramuscular com o plasmídeo contendo proteína M produziu resposta celular de produção de *interferon-gamma* significativa e não produziu resposta humoral significativa;
- a imunização com proteína M purificada ou em forma de DNA não foi capaz de reduzir a carga viral ou os danos teciduais do pulmão em animais desafiados com hRSV.

REFERÊNCIAS¹

- ANDERSON, L. J.; HIERHOLZER, J. C.; TSOU, C.; HENDRY, R. M.; FERNIE, B. F.; STONE, Y. Anti-genic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **J. Infect. Dis.**, v. 151, p. 626–659, 1985.
- ATREYA, P. L.; PEEPLES, M. E.; COLLINS, P. L. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. **J. Virol.**, v. 72, p. 1452-1461, 1998.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K.; ALBRIGHT, L. M.; COEN, D. M.; VARKI, A.; JANSSEN K. **Current protocols in molecular biology**. USA: John Wiley & Sons; 1994.
- BARTAL, A. H.; HIRSHAUT, Y. **Methods of hybridoma formation**. 7th ed. USA: Humana Press, 1987.
- BEEM, M. Repeated infections with respiratory syncytial virus. **J. Immunol.**, v. 98, p. 1115-1122, 1967.
- BERMINGHAM, A.; COLLINS, P. L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 11259–11264, 1999.
- BLOUNT Jr., R. E.; MORRIS, J. A.; SAVAGE, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 92, p. 544–549, 1956.
- BOLLAG, D. M.; ROZYCKI, M. D.; EDELSTEIN, S. J. **Protein methods**. 2nd ed. New York: Wiley-liss, 1996.
- BOYER, J. D.; KIM, J.; UGEN, K.; COHEN, A. D.; AHN, L.; SCHUMANN, K. HIV-1 DNA vaccines and chemokines. **Vaccine**, v. 17, p. 53-64, 1999.
- CARROMEU, C.; SIMABUCO, F. M.; TAMURA, R. E.; FARINHA ARCIERI, L. E.; VENTURA, A. M. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. **Arch. Virol.**, v. 152, p. 2259-2322, 2007.
- CARROLL, K. N.; GEBRETSADIK, T.; GRIFFIN, M. R.; WU, P.; DUPONT, W. D.; MITCHEL, E. F.; ENRIQUEZ, R.; HARTERT, T. V. Increasing burden and risk factors for bronchiolitis-related medical visits in infants enrolled in a state health care insurance plan. **Pediatrics**, v. 122, p. 58–64, 2008.
- CASTAGNÉ, N.; BARBIER, A.; BERNARD, J.; REZAEI, H.; HUET, J. C.; HENRY, C.; Da COSTA, B.; ELÉOUËT, J. F.; Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. **J. Gen. Virol.**, v. 85, p. 1643-1669, 2004.

---

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

COLOMBO, E.; ALCALAY, M.; PELICCI, P. G. Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. **Oncogene**, v. 30 p. 2595–2609, 2011.

COLLINS, C. L.; MCINTOSH, K.; CHANOCK, R. M.; Respiratory syncytial virus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUSS, S. E. (Ed.). **Fields virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Raven Publishers, 2001.

COLLINS P. L.; GRAHAM B. S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. **J. Virol.**, v. 82, p. 2040-2055, 2008.

CORONEL, E. C.; MURTI, K. G.; TAKIMOTO, T.; PORTNER, A. Human parainfluenza virus type 1 matrix and nucleoprotein genes transiently expressed in mammalian cells induce the release of virus-like particles containing nucleocapsid-like structures. **J. Virol.**, v. 73, p. 7035-7033, 1999.

EMPEY, K. M.; PEEBLES, R. S.; KOLLS, J. K. Pharmacologic advances in the Treatment and Prevention of Respiratory Syncytial Virus. **Reviews of Anti-infective Agents**, v. 50 p. 1258-1267, 2010.

FELDMAN, S. A.; HENDRY, R. M.; BEELER, J. A. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. **J. Virol.**, v. 73, p. 6610-6617, 1999.

FREDERICK, S. S. Gelsolin and ADF y cofilin enhance the actin dynamics of motile cells. **PNAS**, v. 97, p. 6936-6938, 2000.

GARCÍA, J.; GARCÍA-BARRENO, B.; VIVO, A.; MELERO, J. A. 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**, v. 95, p. 243-250, 1993.

GLEZEN, W. P.; TABER, L. H.; FRANK, A. L.; KASEL, J. A. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. **Am. J. Dis. Child.**, v. 140, p. 543-549, 1986.

GHILDYAL, R.; MILLS, J.; MURRAY, M.; VARDAXIS, N.; MEANGER, J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 753-760, 2002.

GHILDYAL, R.; HO, A.; WAGSTAFF, K. M.; DIAS, M. M.; BARTON, C. L.; JANS, P.; BARDIN, P.; JANS, D. A. Nuclear import of the respiratory syncytial virus matrix protein is mediated by importin beta1 independent of importin alpha. **Biochemistry**, v. 44, p. 12887-12895, 2005.

GHILDYAL, R.; HO, A.; JANS, D. A. Central role of the respiratory syncytial virus matrixprotein in Infection. **FEMS Microbiol.**, v. 30, p. 692–705, 2006.

GRAHAM, B. S.; BUNTON, L. A.; WRIGHT, P. F.; KARZON, D. T. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1026–1033, 1991.

GRAHAM, B. S. Immunological determinants of disease caused by respiratory syncytial virus. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 290–293, 1996.

GRAHAM, B. S. Biological challenges and technological opportunities for respiratory syncytial virus vaccine development. **Immunological Review**, v. 239, p. 149–166, 2011.

GROOTHUIS, J. R.; HOOPES, M.; HEMMING, V. G. Prevention of serious respiratory syncytial virus-related illness. I: Disease Pathogenesis and Early Attempts at Prevention. **Advances in Therapy**, v. 28, p. 91-109, 2011.

HALL, C. B.; POWELL, K. R.; MACDONALD, N. E.; GALA, C. L.; MENEGUS, M. E.; SUFFIN, S. C.; COHEN, H. J. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. **N. Engl. J. Med.**, v.315, p. 77-81, 1986.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

HENDERSON, G.; MURRAY, J.; YEO, R. P. Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins. **Virology**, v. 300, p. 244-254, 2002.

HOLBERG, C. J.; WRIGHT, A. L.; MARTINEZ, F. D.; RAY, C. G.; TAUSSIG, L. M.; LEBOWITZ, M. D. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. **Am. J. Epidemiol.**, v. 133, p. 1135-1151, 1991.

HYNICKA, L. M.; ENSOR, C. R. Prophylaxis and Treatment of Respiratory Syncytial Virus in Adult Immunocompromised Patients. **Infectious Diseases**, v. 46, p. 558-566, 2012.

KAPTUR, P. E. ; RHODES, R. B. ; LYLES, D. S. Sequences of the vesicular stomatitis virus matrix protein involved in binding to nucleocapsids. **J. Virol.**, v. 5, p. 1057–1065, 1991.

LEADER, S.; KOHLHASE, K. Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RSV) among US infants, 1997 to 2000. **J. Pediatr.**, v. 143, p. 127–132, 2003.

LEMANSKE, R. F. Viral infections and asthma inception. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 114, p. 1023-1026, 2004.

LENARD, J. Negative-strand virus M and retrovirus MA proteins: all in a family. **Virology**, v. 216, p. 289–298, 1996.

LIMA, H. N.; BOTOSSO, V. F.; LEAL OLIVEIRA, D. B.; DE ALMEIDA CAMPOS, A. C.; LEAL, A. L.; SILVA, T. S.; RAMOS BOSSO, P. A.; PEDROSO MORAES, C. T.; Da SILVA Filho, C. G.; VIEIRA, S. E.; GILIO, A. E.; STEWIEN, K. E.; DURIGON, E. L. Molecular epidemiology of the SH (small hydrophobic) gene of human respiratory syncytial virus (HRSV), over 2 consecutive years. **Virus Res.**, v. 163, p. 82-86, 2011.

LIUZZI, M.; MASON, S. W.; CARTIER, M.; LAWETZ, C.; MCCOLLUM, R. S.; DANSEREAU, N.; BOLGER, G.; LAPEYRE, N.; GAUDETTE, Y.; LAGACÉ, L.; MASSARIOL, M.; DÔ, F.; WHITEHEAD, P.; LAMARRE, L.; SCOUTEN, E.; BORDELEAU, J.; LANDRY, S.; RANCOURT, J.; FAZAL, G.; SIMONEAU, B. Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. **J. Virol.**, v. 79, p. 13105-13115, 2005.

KONDO, T.; YOSHIDA, T.; MIURA, N.; NAKANISHI, M. Temperature-sensitive phenotype of a mutant Sendai virus strain is caused by its insufficient accumulation of the M protein. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 924-930, 1993.

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.**, v. 149, p. 199-210, 2004.

MONEY, A. V.; MCPHEEC, H. K.; MOSELY, J. A.; SANDERSON, J. M.; YEOB, R. P. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. **PNAS**, v. 106, p. 4441-4446, 2008.

MUFSON, M. A.; ORVELL, C.; RAFNAR, B.; NORRBY, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.**, v. 66, p. 2111-2124, 1985.

NAIR, H.; NOKES, D. J.; GESSNER, B. D.; DHERANI, M.; MADHI, S. A.; SINGLETON, R. J.; O'BRIEN, K. L.; ROCA, A.; WRIGHT, P. F.; BRUCE, N.; CHANDRAN, A.; THEODORATOU, E.; SUTANTO, A.; SEDYANINGSIH, E. R.; NGAMA, M.; MUNYWOKI, P. K.; KARTASMITA, C.; SIMÕES, E. A. S.; RUDAN, I.; WEBER, M. W.; CAMPBELL, H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 375, p. 1545-1555, 2010.

MITRA, R.; BAVISKAR, P.; DUNCAN-DECOCQ, R. R.; PATEL, D.; OOMENS, A. G. The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. **J. Virol.**, v. 86, p. 4432-4443, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning a laboratory manual**. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SIMABUCO, F. M.; TAMURA, R. E.; CARROMEU, C.; FARINHA ARCIERI, L. E.; VENTURA, A. M. Gene optimization leads to robust expression of human respiratory syncytial virus nucleoprotein and phosphoprotein in human cells and induction of humoral immunity in mice. **J. Virol.**, v. 158, p. 93-99, 2009.

SIMABUCO, F. M. **Expressão das proteínas n e p do vírus respiratório sincicial humano: estudos funcionais e de imunização**. 2008. 149 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TAMURA, R. **Estudo dos domínios Funcionais da proteína de matriz do Virus Respiratório Sincicial Humano**. 2009. 128 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TENG, M. N.; WHITEHEAD, S. S.; COLLINS, P. L. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. **Virology**, v. 289, p. 283-296, 2001.

TERNETTE, N.; STEFANO, D.; KUATE, S.; UBERLA, K.; GRUNWALD, T. Expression of RNA virus proteins by RNA polymerase II dependent expression plasmids is hindered at multiple steps. **Virology**, v. 4, p. 1-10, 2007.

THORBURN, K.; HARIGOPAL, S.; REDDY, V.; TAYLOR, N.; VAN SAENE, H. K. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. **Thorax**, v. 61, p. 611-615, 2006.

ULMER, J. B.; DEWITT, C. M.; CHASTAIN, M.; FRIEDMAN, A.; DONNELLY, J. J.; MCCLEMENTS, W. L.; CAULFIELD, M. J.; BOHANNON, K. E.; VOLKIN, D. B.; EVAN, R. K. Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants. **Vaccine**, v. 18, p. 18-28, 2000.

VIEIRA, S. E.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; DURIGON, E. L.; TÖRÖK, T. J.; ANDERSON, L. J.; MIYAO, C. R.; HEIN, N.; BOTOSSO, V. F.; PAHL, M. M.; GILIO, A. E.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, p. 125-131, 2001.

ZHANG, X. X.; THOMIS, D. C.; SAMUEL, C. E. Isolation and characterization of a molecular cDNA clone of a human mRNA from interferon-treated cells encoding nucleolar protein B23, numatrin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 164, p. 176-184, 1989.

ANEXO A - Curriculum Vitae – Resumido

1. FORMAÇÃO

Graduação: Bacharelado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Uberlândia (UFU)- Minas Gerais – Período: 2004 a 2008

Iniciação Científica - Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – Laboratório de Virologia – Orientadora: Dr. Divina Aparecida Oliveira Queiróz – Título: Identificação de Subtipos AH1, AH3 e B dos Influenzavírus pela Técnica de RT-PCR em Amostras de Nasofaringe Coletadas de Crianças com Até Cinco Anos de Idade em Uberlândia MG. - Bolsa: CNPq – Período 2003-2004.

2. Trabalhos publicados em Periódicos

RIBEIRO, P. G. G. ; Tamura R.E. ; Oliveira A.P. ; Farinha-Arcieri, L.E. ; Simambuco, F.M. ; Medina-Armenteros, Y. ; Ventura, A.M. . Characterization of Humoral and Cellular Immune Responses Against the Matrix Protein of Human Respiratory Syncytial Virus. 2011.

OLIVEIRA, A. P. ; Ribeiro, P.G.G. ; Simabuco F.M. ; Tamura R.E. ; Ventura A.M. . Virus-Cell Protein Interactions in Human Respiratory Syncytial Virus Infected HEK-293T Cells. 2011

3. Estágios

I. Monitoria durante a graduação (UFU)

Período: segundo semestre de 2006 (204 horas)

Disciplina: Citologia e Histologia

Supervisão: Profa. Camilla Christian Gomes Moura

II. Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)

Período: primeiro semestre de 2011

Disciplina: Microbiologia Básica

Supervisão: DR. Carlos Pelleschi Taborda