



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

DERIANE ELIAS GOMES

Estudo das interações entre a proteína NS1 do hRSV e flavonóides utilizando métodos biofísicos.

São José do Rio Preto
2014

DERIANE ELIAS GOMES

Estudo das interações entre a proteína NS1 do hRSV e flavonóides utilizando métodos biofísicos.

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

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey

São José do Rio Preto
2014

Gomes, Deriane Elias.

Estudo das interações entre a proteína NS1 do hRSV e flavonóides utilizando métodos biofísicos / Deriane Elias Gomes. -- São José do Rio Preto, 2014

106 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Fátima Pereira de Souza

Coorientador: Marcelo Andrés Fossey

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Virologia molecular. 4. Vírus sincicial respiratório humano. 5. Proteínas não estruturais virais. 6. Flavonóides. I. Souza, Fátima Pereira de. II. Fossey, Marcelo Andrés. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

DERIANE ELIAS GOMES

Estudo das interações entre proteína NS1 do hRSV e flavonóides utilizando métodos biofísicos.

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

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas - UEM

Profa. Dra. Fernanda Canduri - USP - São Carlos

Profa. Dra. Karina Alves de Toledo - UNESP - Assis

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

São José do Rio Preto
28 de março de 2014.

Dedico aos meus amores, Adrieene L. Elias e
Ademir B. de Oliveira.

Agradecimentos

Em especial dedico a minha gratidão:

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza, pela coragem de aceitar o desafio de orientar-me neste doutorado, por toda a atenção e dedicação a mim prestada, por todo o companheirismo durante os bons e maus momentos e pela preocupação com minha formação e meu futuro.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey, esta pessoa que me guiou pelo mundo da física com paciência, me estimulando a aprender e me dando forças para superar os desafios.

Agradeço à minha mãe, Adrieene L. Elias, pela luta incessante, incansável e imensurável pelo meu bem-estar, sacrificando-se, muitas vezes, para assegurar que minha formação não fosse interrompida, nunca. Agradeço os ensinamentos, o zelo, o pulso firme, a presença, o carinho e o amor.

Agradeço ao meu namorado, Ademir B. de Oliveira, por compartilhar comigo todos os momentos do meu doutorado. Obrigada por ser meu auxiliar quando eu precisei de ajudante, por ficar comigo nos experimentos que acabaram em horários tardios, por reler meus relatórios, por discutir minhas ideias, por reestabelecer meu equilíbrio quando as dificuldades apareciam, por seu carinho e amor.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Alves de Melo pela ajuda com a purificação no cromatógrafo líquido ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) e com a correção do manuscrito.

Agradeço ao Prof. Dr. Hamilton Cabral por ter me recebido de forma tão atenciosa em seu laboratório e por sua ajuda no processo de remoção de DNA da amostra de NS1.

Agradeço ao Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio pelo acolhimento em seu laboratório permitindo assim que este projeto fosse executado.

Agradeço aos professores que colaboraram com este projeto, cedendo o uso de equipamentos ou reagentes de seus laboratórios, são eles: Prof. Dr. Márcio Colombo, Profa. Dra. Márcia C. Bisinoti e Prof. Dr. Altair B. Moreira, Prof. Dr. Raghuvir K. Arni, Prof. Dr. João Ruggiero Neto, Profa. Dra. Paula Rahal.

Aos pós-graduandos Mariana Pela Sabbag, Haroldo Lima Pimentel Cravo, Gabriela Campos de Araújo, Thiago Salem Pançonato Teixeira, Fernanda Paulin Benzatti, Cintia Ramos Camargo, Pedro Henrique Garcia Sobrinho, Danúbia Batista e às estagiárias de treinamento técnico Luciana Cristina de Carvalho, Juliana Flores e Priscila Mata Camargo, pelo companheirismo, o espírito de equipe e a amizade que nos une.

Aos pós-graduandos Ícaro Putinhon Caruso e Dayane dos Santos Álvares pelo auxílio com as disciplinas e experimentos biofísicos.

A todos os estagiários que passaram pelo Laboratório de Biologia Molecular, Laíz André Luis Lira da Silva, Suzy Meire Faustino, Larissa Antunes Muniz Ferreira, Geovânia Marquini Laurentino Pereira, José Eduardo Gonçalves Sbroggio Pereira e Carlos Henrique Lima Imperador.

Agradeço aos técnicos do Departamento de Física, Antonio Aparecido Barbosa, Bruno Rogério Fernandes, Marcelino Belusi e Paulo Roberto Salinas por todo o suporte que me deram nestes quatro anos.

Agradeço à secretária do Departamento de Física, Ilva Cecilio Bernardes, por toda a atenção e o auxílio a mim prestados.

A todos meus professores pela dedicação e ensinamentos, os quais colaboraram para minha formação profissional e pessoal.

A todos os funcionários da seção de Pós-Graduação por toda dúvida esclarecida e pelo auxílio, sempre que necessário, prestado com muito empenho.

A FAPESP (Processo 2010/50211-0) e CAPES, pela concessão da Bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro (Processo FAPESP 2010/52266-6), essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas aqui não mencionadas, mas que de alguma forma colaboraram na execução deste trabalho ou que participaram da minha vida. A todos vocês deixo o meu "**Muito Obrigada!**".

“Chegará o dia em que todo homem conhecerá o íntimo dos animais. Nesse dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra a própria humanidade.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (hRSV) é a principal causa de infecções respiratórias agudas em crianças, como bronquiolite e pneumonia. Este *Paramyxovirus* tem um RNA de fita simples, com 10 genes que codificam 11 proteínas. Um fator importante que contribui para o sucesso da replicação do hRSV é a evasão do sistema imune, processo no qual a proteína não estrutural 1 (NS1) está envolvida. Esta proteína pode atuar por meio da inibição ou neutralização das etapas da cascata do interferon do tipo I, bem como, pelo silenciamento do complexo ribonucleoproteico do hRSV. O conhecimento da interação da proteína NS1 com ligantes é importante na busca de moléculas que possam interferir na função da proteína e conseqüentemente resultar na redução da replicação do hRSV dentre os quais os flavonóides têm sido descritos como sendo supressores eficazes da replicação viral. Os objetivos deste estudo incluíram a expressão e purificação da proteína NS1, a caracterização da estrutura secundária e estabilidade térmica por dicróismo circular e a realização do estudo de interação entre NS1 e quercetina por espectroscopia de fluorescência. Foi realizada a purificação da proteína NS1 em resina de afinidade utilizando cromatógrafo líquido ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES). As medidas de dicróismo circular (CD) permitiram calcular a porcentagem de estruturas secundárias e a temperatura de *melting* da NS1. A partir das análises das titulações por fluorescência foram calculados a constante de Stern Volmer (K_{sv}), a constante de ligação (K_b) e o número de ligantes por sítio (n). Os resultados de CD mostraram que a composição da estrutura secundária de NS1 é de 75 % de alfa-hélice, 3% de folha-beta, 10% de voltas e 12% de outras estruturas e a temperatura de *melting* da NS1 é de cerca de 65°C. Os resultados de fluorescência mostraram que K_{sv} e K_b foram da ordem de 10^4 e 10^5 - $10^6 M^{-1}$, respectivamente. A dependência de

K_{sv} com a temperatura indica que a interação entre NS1 e quercetina é dinâmica. Os resultados sugerem que essa interação pode contribuir para bloquear a função da proteína e, assim, a quercetina pode ser indicada a ser utilizada em estudos como potencial inibidora da atividade da proteína NS1.

Palavras chaves: Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV), Proteína Não estrutural 1 (NS1), Flavonóides, Quercetina, Espectroscopia de Fluorescência.

ABSTRACT

Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is the major cause of acute respiratory infections in children, like bronchiolitis and pneumonia. This Paramyxovirus has a single strand RNA with 10 genes that codify 11 proteins. An important factor that contributes for the success hRSV replication is the immune system evasion, process with Non-Structural Protein 1 (NS1) is involved. This protein can act by inhibiting or neutralizing steps of interferon type I pathway, as well as, by silencing the ribonucleoproteic complex of hRSV. The knowledge of NS1 protein interaction with ligands is important in the search for molecules that could interfere with protein function and hence result in a reduction of hRSV replication among them the flavonoids have been reported to be effective in suppressing viral replication. The aim of this study includes expression and purification of NS1 protein, characterization of its secondary structure and thermal stability through circular dichroism and perform fluorescence spectroscopy interaction study between NS1 and Quercetin. NS1 purification was performed using affinity resin coupled to a liquid chromatograph ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES). Circular dichroism spectra and thermal denaturation were carried out to investigate NS1 secondary structure and stability. Through fluorescence spectroscopy titration results it has been calculated the Stern Volmer constant (K_{sv}), the binding (K_b) constant and number of ligands per site (n). CD analysis shown that secondary structure composition of NS1 is 75% alpha-helix; 3% beta-sheet; 10% turn and 12% others and, melting temperature of NS1 is around 65°C. Fluorescence results shown that K_{sv} and K_b were in order of 10^4 and 10^5 - $10^6 M^{-1}$, respectively. K_{sv} dependence with temperature indicates that the interaction between NS1 and quercetin is dynamic. The results suggest that this interaction may potentially contribute to block the

protein function and thus quercetin may be indicated to be used in studies as a potential candidate inhibitor for NS1 protein activity.

Key Words: *Human Syncytial Respiratory Virus (hRSV), Nonstructural Protein 1 (NS1), Flavonoids, Quercetin, Fluorescence Spectroscopy.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da organização genômica do hRSV..	3
Figura 2. Ciclo replicativo do hRSV.	6
Figura 3. Adesão e desencadeamento de respostas celulares pelo hRSV.	10
Figura 4. Modelo de ativação mediada pelo hRSV.....	13
Figura 5. Estrutura básica dos flavonóides.	18
Figura 6. (A) Diagrama de ligação peptídica mostrando a orientação das transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$	22
Figura 7. Fluxograma dos experimentos realizados neste trabalho.....	33
Figura 8. Mapa do plasmídeo pJexpress401-NS1.....	35
Figura 9. Etapas de purificação da proteína NS1.....	39
Figura 10. Estrutura dos flavonóides.	41
Figura 11. Gel SDS-PAGE corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 referente ao teste de indução da expressão de NS1.....	54
Figura 12. Western Blotting da proteína NS1.....	55
Figura 13. SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 referente purificação da proteína NS1.....	56
Figura 14. Espectros da absorvância molar pelo comprimento de onda, mostrando os espectros de UV-Vis dos flavonóides utilizados.....	58
Figura 15. Espectros de emissão de fluorescência do sistema NS1- Quercetina.....	59
Figura 16. Fração de variação da fluorescência observada (f_{obs}) em função da razão (r) entre as concentrações de flavonóides e da NS1.....	60
Figura 17. Gráfico de Stern-Volmer da supressão da fluorescência da proteína NS1 pelos diferentes ligantes utilizados.....	62
Figura 18. Gráficos $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log(1/[Ligante]-[NS1] [(F_0-F)/F_0])$ a 298K.....	64
Figura 19. Cromatograma da purificação da NS1 em sistema ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES).....	68

Figura 20. Gel SDS-PAGE corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 mostrando a proteína purificada.	69
Figura 21. Espectro de emissão do complexo NS1-Quercetina.	70
Figura 22. Gráfico de Stern-Volmer da supressão da fluorescência da proteína NS1 pela quercetina.	71
Figura 23. Gráfico $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log(1/[Quercetin]-[NS1] [(F_0-F)/F_0])$ a 298K para interação entre NS1 e quercetina.	73
Figura 24. Gráfico de Van't Hoff ($\ln K$ vs $1/T$) para a interação entre NS1 e quercetina nas temperaturas de 298K, 304K e 310K.	75
Figura 25. Espectro de dicroísmo circular de NS1 (preto) e da interação NS1-quercetina (vermelho) realizado na razão de 2 ligantes por proteína.	78
Figura 26. Desnaturação térmica por CD da proteína NS1 (preto) e NS1-Quercetina (vermelho) entre 20°C e 80°C	78
Figura 1. Gráfico de $\ln(KD)$ versus temperatura. Proteína NS1 (preto) e NS1-Quercetina (vermelho)	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais funções das proteínas NS1 e NS2 do hRSV ligadas ao sistema imune.....	15
Tabela 2. Significado das contribuições de ΔH e ΔS	26
Tabela 3. Características da proteína NS1 geradas pelo programa ProtParam.....	52
Tabela 4. Valores de K_{SV} obtidos nas diferentes interações realizadas entre a proteína NS1 e os flavonóides. T=298K.	62
Tabela 5. Constantes de ligação K_b e número de sítios de ligação n para a reação de NS1 com flavonóides. Temperatura 298K.	65
Tabela 6. Valores de K_{SV} obtidos na interação entre NS1 e quercetina. .	72
Tabela 7. Valores das constantes de associação aparente (K_b), constantes de dissociação (K_D) e número de sítios de interação (n).	73
Tabela 8. Valores de ΔH , ΔG e ΔS	75

Lista de Abreviaturas e Siglas

aMPV	<i>Metapneumovirus Aviário</i>
ARI	Doenças Respiratórias Agudas Severas
BDNG	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BMe	β -mercaptoetanol
BRSV	<i>Vírus Sincicial Respiratório Bovino</i>
CBP	Co-ativador de IRF-3
CD	Dicroísmo circular
CX3CR1	Receptor de adesão para proteína G
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
dsRNAs	RNA de fita dupla
GTP	Guanosina Trifosfato
HCl	Ácido Clorídrico
hMPV	<i>Metapneumovirus Humano</i>
hRSV	<i>Vírus Sincicial Respiratório Humano</i>
HSA	Soro Albumina Humana
IFN	Interferon
IKK ϵ	Subunidade Epsilon da I-kappa-B Cinase
I κ B	Inibidor de kappa B
IMP	Desidrogenase do Ácido Inosínico
IPS 1	Estimulador do Promotor de Interferon Beta do Tipo1
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
IRF-3	Fator 3 Regulatório de Interferon
IL-9	Interleucina 9
JAK-STAT	Complexo composto por: 1) receptor; 2) Janus Cinase (JAK) e 3) Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição (STAT)
K _b	Constante de Afinidade

K _D	Constante de Dissociação
Kaempferol3BD	Kaempferol-3-β-D-glicopiranosídeo
K _{sv}	Constante de Stern Volmer
Let-7b	Micro RNA que regula a expressão do gene <i>let-7</i> (letal-7), o qual está envolvido na diferenciação terminal durante o desenvolvimento e supressão tumoral.
Let-7i	Micro RNA que regula a expressão do gene <i>let-7</i>
MAP1B	Proteína Associada ao Microtúbulo 1B
miR-30b	Micro RNA que regula a expressão do gene <i>let-7</i>
mRNA	RNA Mensageiro
MyD88	Gene de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide (88)
n	Número de sítios de ligação
NF-κB	Fator Nuclear Kappa b
NGF	Fator de Crescimento Neural
NS1	Proteína Não Estrutural 1
NS2	Proteína Não Estrutural 2
ORF	Região de Leitura Aberta
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIV	<i>Parainfluenza Virus</i>
PVM	<i>Vírus da Pneumonia dos Camundongos</i>
P50-p65	Subunidades de NF-κB
p300	Co-ativador de IRF-3
RANTES	Regulador da Ativação, Expressão e Secreção em Células T Normais
RIG-I	Gene Induzível pelo Ácido Retinóico 1
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
STAT1	Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição 1
STAT2	Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição 2
STAT3	Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição 3
TRAF3	Fator 3 Associado ao Receptor de Necrose Tumoral
TRAF6	Fator 6 Associado ao Receptor de Necrose Tumoral
TLR4	Receptor do Tipo Ferramenta 4
TRIF	Domínio de TIR Contendo o Adaptador da Indução de Interferon β
TRIS	N-tris[hidroximetil]aminoetano
trkA	Receptor de Tropomiosina Cinase A
UV	Ultra-Violeta
Vis	Visível

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Ciclo Replicativo.....	5
1.2. Epidemiologia.....	6
1.3. Patogenia e diagnóstico.....	9
1.4. O papel da proteína NS1 na resposta a infecção viral.....	10
1.5. Flavonóides.....	17
1.6. Medidas de espectroscopia de fluorescência: Titulações fluorimétricas para verificação da interação entre Proteína e ligantes .	20
1.7. Medidas de espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	21
1.8. Análise físico-química de complexos macromoleculares.....	23
1.9. Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	25
1.10. Justificativa.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivos Gerais:.....	30
2.2. Objetivos específicos:.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Fluxograma dos experimentos realizados.....	33
3.2. Expressão da proteína NS1 utilizando o plasmídio pJexpress401- NS1.....	34
3.2.1. pJexpress401-NS1.....	34
3.2.2. Análise por bioinformática de pJexpress401-NS1.....	35
3.2.3. Testes de indução de expressão.....	36
3.2.4. Western Blotting.....	37

3.2.5. Indução de expressão de BI-21(DE3)-pJexpress401-NS1	37
3.2.6. Purificação da proteína NS1 por afinidade	38
3.2.6.1. Lise e sonicação da amostra	38
3.2.6.2. Purificação não automatizada com resina de afinidade	38
3.2.6.3. Troca de tampão da NS1 purificada com 500mM de imidazol	39
3.3. Interação entre NS1 e flavonóides por espectroscopia de fluorescência	40
3.3.1. Preparo das soluções de flavonóides e de proteínas	41
3.3.2. Medidas espectrofotométricas e equipamentos	42
3.3.3. Titulações espectrofluorimétricas para verificação da interação entre a NS1 com os ligantes	43
3.3.4. Cálculo dos parâmetros de interação	45
3.4. Estudos de interação entre a proteína NS1 e o flavonóide quercetina.....	47
3.5.1. Purificação da proteína NS1 em resina de afinidade em sistema ÄKTA.....	47
3.5.2. Titulação espectrofluorimétrica da proteína NS1 com o flavonóide quercetina.....	48
3.6. Dicroísmo circular e desnaturação térmica	49
3.7. Determinação da composição de estruturas secundárias por deconvolução espectral das medidas de CD e dos parâmetros termodinâmicos do sistema proteína e proteína/ligante através de Desnaturação Térmica	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Dados fornecidos pela ferramenta ProtParam	52
4.2. Indução da expressão e purificação da proteína NS1	53

4.3. Interação entre NS1 e flavonóides por análises espectroscópicas	57
4.3.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis	57
4.3.2. Titulações Espectrofluorimétricas.....	58
4.3.3. Cálculo dos parâmetros de interação	63
4.4. Estudo das interações entre NS1 e quercetina	66
4.5. Purificação em sistema ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES).....	67
4.6. Titulações espectrofluorimétricas	69
4.7. Cálculo dos parâmetros de interação	72
5. CONCLUSÕES.....	82
6. REFERÊNCIAS	85
7 - ANEXOS.....	102
Anexo 01: Protocolo de transformação	102
Anexo 02: Protocolo de purificação de plasmídios com QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen®).....	103
Anexo 03: Sequenciamento do gene NS1	104
Anexo 04: Meio Sólido LB pH=7,0 (p/ cultivo bacteriano)	105
Anexo 05: Protocolo de dessalinização utilizando as colunas PD-10 Desalting Columns - GE®	106

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV – Human Respiratory Syncytial Virus) é o principal agente causador de doenças respiratórias agudas severas (ARI) como pneumonia e bronquiolite em crianças no mundo todo (SWEDAN et al., 2009; NAKAMURA et al., 2009; OLSZEWSKA & OPENSHAW, 2009; MORRIS et al., 2009; OTHUMPANGAT et al., 2009; GIAS et al., 2008; LO et al., 2005). Também é responsável por morbidade respiratória em idosos (ZLATEVA et al., 2007; PAVLOVA et al., 2009; OTHUMPANGAT et al., 2009; BATONICK et al., 2008; SASTRE et al., 2008), imunocomprometidos e pessoas com doença cardiorespiratória (ZLATEVA et al., 2007; PAVLOVA et al., 2009; SASTRE et al., 2008; MARTÍNEZ et al., 2007). Crianças com imunodeficiência congênita, displasia bronquiopulmonar e doença cardíaca (OLSZEWSKA & OPENSHAW, 2009; MORRIS et al., 2009; PAVLOVA et al., 2009; RICCETTO et al., 2009; VAZ-DE-LIMA et al., 2008), hipertensão, prematuridade e baixo peso ao nascimento representam o principal grupo de risco (OLSZEWSKA & OPENSHAW, 2009).

O hRSV está classificado na família *Paramyxoviridae*, ordem *Mononegavirales*, subfamília *Pneumovirinae*. Esta subfamília possui dois gêneros, sendo *Pneumovirus*, onde se classifica o hRSV, juntamente com o Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV) e o Vírus da Pneumonia dos Camundongos (PVM) e o *Metapneumovirus* que inclui o *Metapneumovirus humano* (hMPV) e *Metapneumovirus Aviário* (aMPV) (COLLINS & CROWE JR, 2007).

Trata-se de um vírus de simetria helicoidal acondicionado em um envelope lipídico, oriundo do processo de brotamento após a replicação na célula hospedeira. Possui em seu genoma RNA de fita simples, não segmentado, de polaridade negativa (GIAS et al., 2008; BATONICK et al.,

2008; ZLATEVA et al., 2007). Seu genoma é composto por 15.222 nucleotídeos, organizados em 10 genes, os quais codificam 11 produtos gênicos (BATONICK et al., 2008). O esquema da organização genômica é mostrado na Figura 2.



Figura 2. Esquema da organização genômica do hRSV, mostrando a sequência dos genes responsáveis pela codificação dos proteínas virais. Adaptado de Collins & Crowe Jr, (2007).

As proteínas não estruturais NS1 e NS2 interferem na indução e sinalização do interferon do tipo I (IFN) (COLLINS & CROWE JR, 2007), o qual representa o principal mecanismo da imunidade inata no combate a infecções virais. O hRSV, através das proteínas NS1 e NS2, pode agir inibindo ou neutralizando várias etapas da via dos interferons do tipo I (IFN), o que favorece o maior sucesso da progênie viral (SWEDAN et al., 2009; LO et al., 2005). Também não apresentam nenhuma homologia com outras proteínas (SWEDAN et al., 2009, LING et al., 2009). A NS1 possui 139 aminoácidos e uma série de funções tem sido atribuída a ela durante as infecções, tais como: (1) a regulação da síntese de RNA do hRSV por meio de um sistema de *minireplicon*; (2) interferência na ação do interferon tipo I, como já descrito e; (3) compõe um complexo ubiquitina ligase para degradação proteossomal de STAT2. Também é responsável, juntamente com NS2 por inibir a apoptose precoce durante a infecção por hRSV (LING et al., 2009).

O gene N codifica a proteína do nucleocapsídeo, a qual encontra-se ligada completamente ao genoma, a fosfoproteína (P) associa-se ao nucleocapsídeo e compõe um mediador para a polimerase. A proteína de matriz (M) compõe um importante componente da morfogênese viral.

A SH, G e F representam as glicoproteínas de superfície do vírus e estão envolvidas na adsorção, fusão e imunogênese. A proteína SH (*Small hydrophobic* - pequena e hidrofóbica) é uma proteína transmembrana pequena que possui 64 aminoácidos no subgrupo A e 65 aminoácidos no subgrupo B (GAN et al., 2008). Sua função específica ainda é desconhecida (GIAS et al., 2008; GAN et al., 2008) e não é necessária à replicação, porém acredita-se que ela possa ser uma porina viral, um grupo de pequenas proteínas virais altamente hidrofóbicas, que podem oligomerizar-se e formar poros na membrana celular (GAN et al., 2008). A proteína G é responsável pela adsorção e é necessária para a infectividade *in vivo* e em culturas celulares (BATONICK et al., 2008). É também um importante alvo para anticorpos neutralizantes (BOTOSSO et al., 2009; ZLATEVA et al., 2007). As mais extensivas diferenças genéticas e antigênicas entre os subgrupos A e B estão localizados nesta glicoproteína (ZLATEVA et al., 2007). A maior parte das mutações na glicoproteína G estão localizadas no ectodomínio que contém dois segmentos hipervariáveis, separados por uma região conservada que representa um sítio de ligação de receptor (BOTOSSO et al., 2009). A proteína F é responsável pela fusão, sendo requerida para a entrada na célula hospedeira (BOTOSSO et al., 2009). Representa o principal antígeno conservado entre os grupos A e B, ao qual anticorpos neutralizantes são direcionados (GIAS et al., 2008; LIU et al., 2007).

A proteína M2 ORF 1 (região de leitura aberta) é essencial para a transcrição, alongação e antiterminação, M2 ORF 2 é responsável pela substituição da transcrição do RNA pela replicação genômica. Ambas têm suas funções principais desconhecidas. Por fim, a proteína L (Large) que compõe o maior componente da RNA polimerase dependente de RNA (TREMAGLIO et al., 2013; COLLINS & CROWE JR, 2007), responsável pela replicação do genoma viral.

1.1. Ciclo Replicativo

O processo infeccioso inicia-se com a ligação do vírus à célula através da proteína G. O envelope viral se funde com a membrana plasmática da célula hospedeira por meio da proteína F, sendo este um passo necessário para a transferência da ribonucleoproteína viral para o interior da célula. Após a penetração, o nucleocapsídeo do vírus é liberado no citoplasma celular, onde inicia a transcrição de seu material genético. O RNA viral é usado como molde para síntese do RNA mensageiro (mRNA). O mRNA, por sua vez, é usado como molde para tradução das proteínas virais e transcrição do RNA do vírion (OGRA, 2004). Após a síntese de suas proteínas e montagem dos vírions, as partículas virais são liberadas das células infectadas por brotamento, causando a ruptura das mesmas e fusão com as células adjacentes (HACKING et. al., 2002), conforme mostrado na Figura 3.

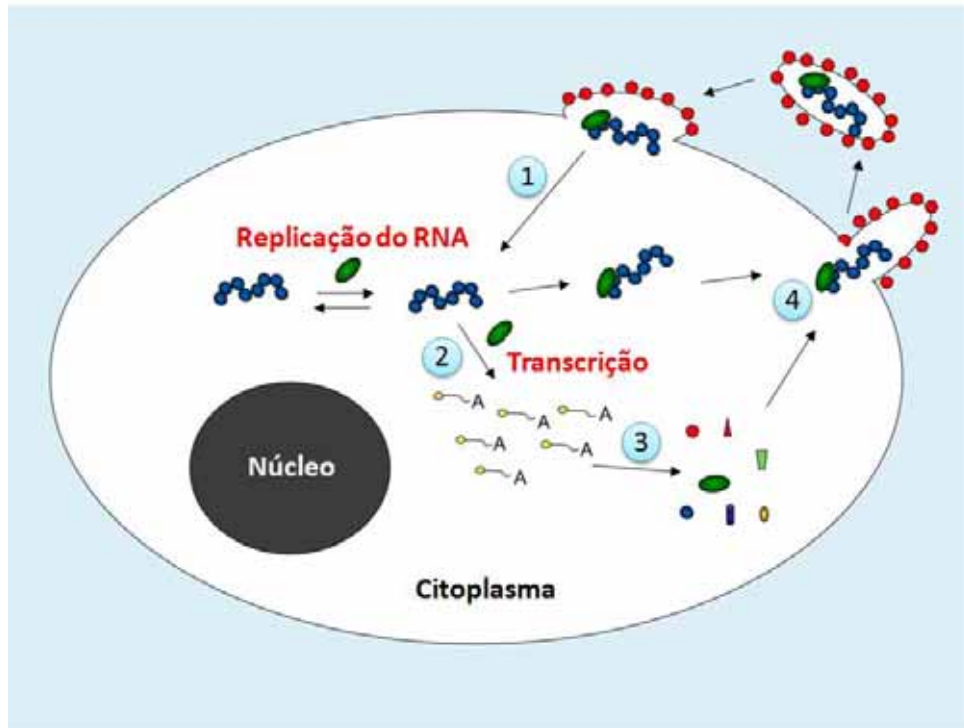


Figura 3. Ciclo replicativo do hRSV. 1) O vírus entra por fusão direta com a membrana plasmática, liberando o RNA genômico encapsulado (azul) e a RNA polimerase dependente de RNA (verde) para o citoplasma. 2) A polimerase usa o genoma como um molde para produzir mRNAs, que são traduzidos em proteínas virais (3). 4) Os genomas encapsidados resultantes são montados com as proteínas virais e saem da célula hospedeira por brotamento pela membrana plasmática para produzir as partículas virais descendentes. Fonte: adaptado de FEARNNS (2013).

1.2. Epidemiologia

O hRSV é dividido em dois grupos (A e B), baseado inicialmente em estudos com anticorpos monoclonais direcionados às proteínas F e G. Posteriormente estes estudos passaram a ser baseados no sequenciamento do gene G para classificação genotípica e, consequentes estudos epidemiológicos (BOTOSSO et al., 2009). Ensaio epidemiológicos demonstram que é possível a circulação de estirpes dos dois subgrupos dentro de uma mesma comunidade durante os surtos. Entretanto, suas proporções relativas podem diferir entre uma epidemia e

outra (MORRIS et al., 2009; ZLATEVA et al., 2007).

Sabe-se que o homem é o único reservatório conhecido para a doença e sua transmissão se dá por via direta ou por contato com secreções contaminadas (MORRIS et al., 2009).

Em países desenvolvidos, pneumonia e bronquiolite resultam na hospitalização de 2,5% de todas as crianças, indicando que a infecção viral representa a causa mais comum de hospitalização infantil no primeiro ano de vida. Em países em desenvolvimento, a morbidade e mortalidade associada ao hRSV é muito superior a este dado (SEMPLE et al., 2007).

Os vírus são responsáveis por 50-90% das ARI em crianças. Dentre os principais agentes encontram-se o hRSV, *Parainfluenza Virus* (PIV), *Influenza Virus* tipos A e B, *Metapneumovirus Humano* (hMPV) e *Adenovirus* (BHARAJ et al., 2009; PAVLOVA et al., 2009; THOMAZELLI et al., 2007). Estes vírus são responsáveis pela morte de aproximadamente quatro milhões de pessoas por ano e pela hospitalização de 40-60% das crianças com ARI (MARINHEIRO et al., 2009). Geralmente os casos estão associados a sintomas brandos como rinorréia, tosse e febre, muitas vezes culminando em cura até a segunda semana de infecção, entretanto, em 25-40% das crianças há evolução para sintomas graves como pneumonia e bronquiolite (OLSZEWSKA & OPENSHAW, 2009). No Brasil, região de São José do Rio Preto (SP), Simas et al. (2012) detectaram 7,7% de positividade para o hRSV em crianças apresentando ARI. Observaram ainda que o hRSV apresentou um padrão de distribuição sazonal de modo que a incidência do vírus aumenta com as diminuições de temperatura e umidade do ar.

Segundo dados apresentados no relatório de estatísticas mundiais de saúde da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013), em 2010, 50% das crianças brasileiras com até 5 anos foram levadas a uma unidade de saúde por conta de sintomas de ARI. Destas, 7000 crianças morreram em virtude de pneumonia.

Reinfecções são muito comuns ao longo da vida (ZLATEVA et al., 2007). Sabe-se que 50% das crianças hospitalizadas por bronquiolite sofrerão recidivas posteriores (SEMPLE et al., 2007). Em crianças mais velhas e adultos normalmente está associado à doença branda, indicando que o hRSV induz apenas imunidade parcial (ZLATEVA et al., 2007). Até o momento não há nenhuma vacina eficaz para a prevenção da doença. (TREMAGLIO et al., 2013; BATONICK et al., 2008; LIU et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2007). A dificuldade na obtenção de uma vacina contra hRSV é devida à instabilidade da partícula viral madura, que pode ser um obstáculo crítico na distribuição e estocagem de futuras vacinas vivas atenuadas (SASTRE et al., 2007).

O principal tratamento oferecido está relacionado aos cuidados paliativos dos sintomas apresentados (TREMAGLIO et al., 2013). Um dos tratamentos oferecidos contra a infecção é o anticorpo monoclonal direcionado à proteína F, palivizumab, que é administrado às crianças de alto risco (MORRIS et al., 2009; BATONICK et al., 2008; LIU et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2007). Palivizumab é administrado via intramuscular em crianças do grupo de risco durante a estação de maior incidência de infecções por hRSV e reduz significativamente a ocorrência da forma mais severa da doença e, conseqüentes hospitalizações em crianças. No entanto, tem apresentado reações adversas como hipersensibilidade e anafilaxia após sua administração (MORRIS et al., 2009). O outro tratamento oferecido é a utilização da ribavirina (1-p-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), um análogo sintético da guanosina, não tóxico, inibidor de amplo espectro de vírus de RNA e DNA que é licenciado para o tratamento de doença grave causada por hRSV, bem como da gripe e Hepatite C crônica. Embora o seu principal mecanismo de ação não seja claro, a ribavirina acumula intracelularmente como intermediários mono e trifosfato. O monofosfato de ribavirina, um inibidor competitivo da IMP desidrogenase, esgota GTP celular, interferindo com as reações de formação do CAP do RNA viral, enquanto o trifosfato de ribavirina é

incorporado pela polimerase viral em transcritos genômicos do hRSV, forçando, assim, erros genômicos e extinção viral. Apesar do seu potente efeito anti-viral *in vitro*, a ribavirina tem tido apenas um sucesso clínico modesto no tratamento da infecção causada pelo hRSV, com efeitos mínimos ou insignificantes sobre a mortalidade ou a duração da hospitalização (ZHANG et al., 2003).

1.3. Patogenia e diagnóstico

A histopatologia de bronquiólite severa caracteriza-se por obstrução das vias aéreas devido à destruição tecidual ocasionada pela atividade citopática do vírus, infiltrado inflamatório no parênquima, migração neutrofílica luminal e aumento da produção de muco. Os mecanismos recentemente propostos para explicar o aparecimento da bronquite severa incluem atividade imunológica antiviral reduzida (redução da produção de IFN), aumento da replicação viral, excessiva inflamação neurogênica e elevada secreção de muco induzida por interleucina 9 (IL-9) (SEMPLE et al., 2007). Ainda vale ressaltar que a imunopatologia da doença possivelmente inclui a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais infectadas e células do sistema imune, deposição de complexos antígeno-anticorpo que ocasionam a ativação do sistema complemento e demais fatores da resposta imune (MARTÍNEZ et al., 2007). Segundo Othumpangat et al. (2009), a infecção por hRSV aumenta a expressão de fatores de crescimento neurotróficos nos pulmões como o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o receptor de tropomiosina cinase A (trkA), o que pode desempenhar um papel importante na fisiologia da inflamação aérea durante a infecção aguda (OTHUMPANGAT et al., 2009).

Segundo Openshaw & Tregoning (2005), acredita-se cada vez mais que os sinais e sintomas de muitas doenças virais são causadas

mais pela resposta do hospedeiro à infecção do que pelos efeitos citopáticos virais. O pico de infecção viral geralmente precede o período de doença máxima, o que coincide com infiltração celular de tecidos infectados e liberação de mediadores inflamatórios. O resumo das etapas de adesão e desencadeamento de respostas celulares durante a infecção por hRSV é mostrado na Figura 4.

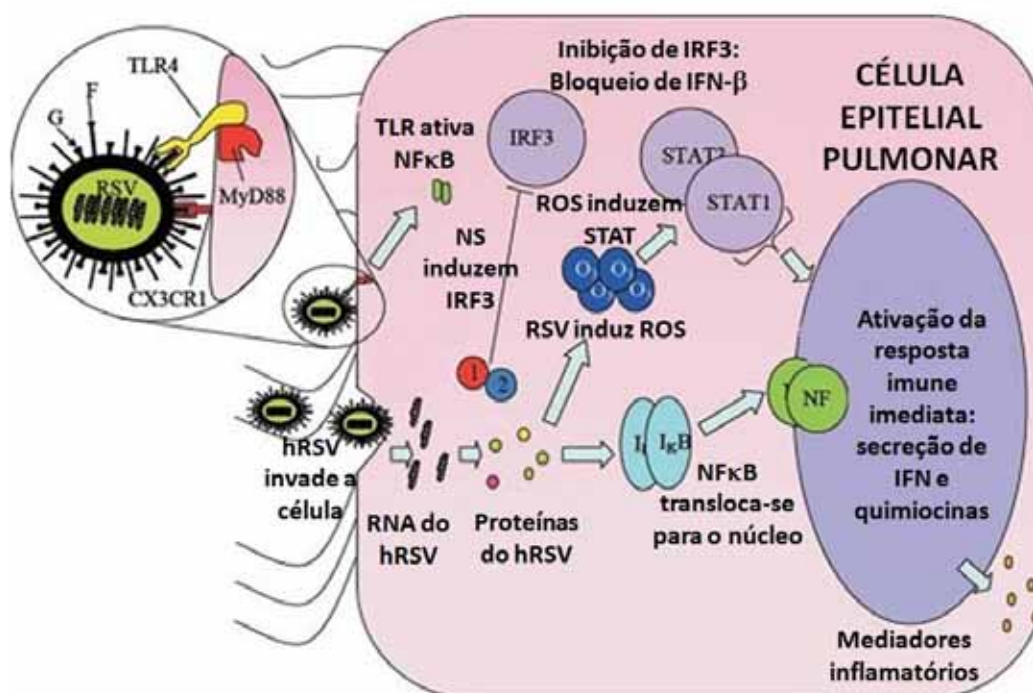


Figura 4. Adesão e desencadeamento de respostas celulares pelo hRSV. O hRSV liga-se por glicosaminoglicanas de superfície à célula alvo, sendo que a proteína F se liga ao TLR4, enquanto a glicoproteína G se liga o receptor CX3CR1. A interação com TLR4 leva ao aumento da expressão de NF- κ B. O hRSV aumenta a expressão de NF- κ B via I κ B e STAT1 e o aumento da expressão de STAT3 ocorre via espécies reativas de oxigênio (ROS). As Proteínas Não Estruturais (NS) virais inibem a via do fator regulatório de interferon 3 (IRF3). NF- κ B quando não inibido transloca-se para o núcleo celular e ativa a resposta imune imediata resultando em secreção de interferon e quimiocinas. Fonte: Adaptado de OPENSHAW & TREGONING, 2005.

1.4. O papel da proteína NS1 na resposta a infecção viral

Os Pneumovirus expressam a proteína não estrutural NS1

codificada pelo primeiro gene na organização do genoma viral. Os hRSVs recombinantes em que o gene NS1 é deletado exibem replicação reduzida em cultura de células que são competentes para produzir IFN. As proteínas NS1 e NS2 de RSV bovino também têm mostrado suprimir a indução de IFN e o estado antiviral mediado pela via do IFN (SPANN et al., 2005; SPANN et al., 2004).

Os vírus exibem mecanismos que lhes permitem interferir na resposta mediada pelo interferon ($I\alpha$ e $I\beta$) do hospedeiro. Alguns vírus, em especial os pertencentes à família *Paramyxoviridae*, podem interferir na indução do gene IFN por agir nas etapas de ativação, estabilidade e translocação nuclear do fator 3 regulatório de IFN (IRF-3). O Vírus Sincicial Respiratório Humano e o Vírus Sincicial Respiratório Bovino codificam a proteína NS1, que pode agir na ativação de IRF-3 e no bloqueio da sinalização da via JAK-STAT (KOTELKIN et al., 2006), ambas constituem componentes importantes da cascata do interferon, o principal agente indutor de estado antiviral nas células.

A proteína IRF-3 é expressa constitutivamente no citoplasma e é ativada por fosforilação dos resíduos de serina e treonina na região C-terminal mediada por quinases que são ativadas em resposta aos dsRNAs e proteínas do nucleocapsídeo ou estruturas semelhantes aos nucleocapsídeos virais. Isto resulta na formação de dímeros de IRF-3 que se associam com co-ativadores p300 e CBP e são translocados ao núcleo, enquanto eles se ligam ao promotor do IFN. A IRF-3 ativada também pode diretamente regular a transcrição de genes adicionais, bem como as quimiocinas pró-inflamatórias RANTES (reguladas sobre ativação normal de células T expressas e secretadas). Um grande número de vírus tem mostrado codificar proteínas que interferem com a ativação de IRF-3, incluindo o vírus Bunyamwera, vírus da influenza A, e vírus Ebola. Recentemente, as proteínas NS1 e NS2 de BRSV foram descritas por estarem envolvida na fosforilação de IRF-3 (SPANN et al., 2005).

A proteína não estrutural do hRSV, NS1, é codificada por uma unidade de transcrição com promotor próximo, fazendo com que seu gene seja transcrito inicialmente e em maior abundância. Esta pequena proteína (139 aa) não apresenta homologia significativa de seqüência com outras proteínas. A NS1 antagoniza ambas as respostas antivirais bem como a indução na produção de IFN. Este antagonismo comumente requer o acúmulo de NS1 na célula uma vez que o hRSV induz a fosforilação de STAT1 nos primeiros estágios pós-infecção, entretanto, o mecanismo para este antagonismo é desconhecido. Na infecção tardia, o hRSV parece causar a degradação de STAT2, embora este efeito possa ser dependente do tipo celular. Evidências recentes sugerem que a NS1 é importante para degradação de STAT2 pelo hRSV. A atenuação de hRSV recombinantes sem NS1 pode ser devida em parte ao déficit do antagonismo de interferon tipo I destes vírus. Entretanto, mesmo em células deficientes de interferon, o crescimento de hRSV recombinantes sem NS1 é atenuado. Isso mostra que os genes das proteínas não estruturais comumente têm funções requeridas para a replicação ótima do hRSV em adição ao antagonismo do IFN (LING e al., 2009). A Figura 5 sumariza as atividades das proteínas não estruturais NS1 e NS2 durante o bloqueio das atividades do interferon.

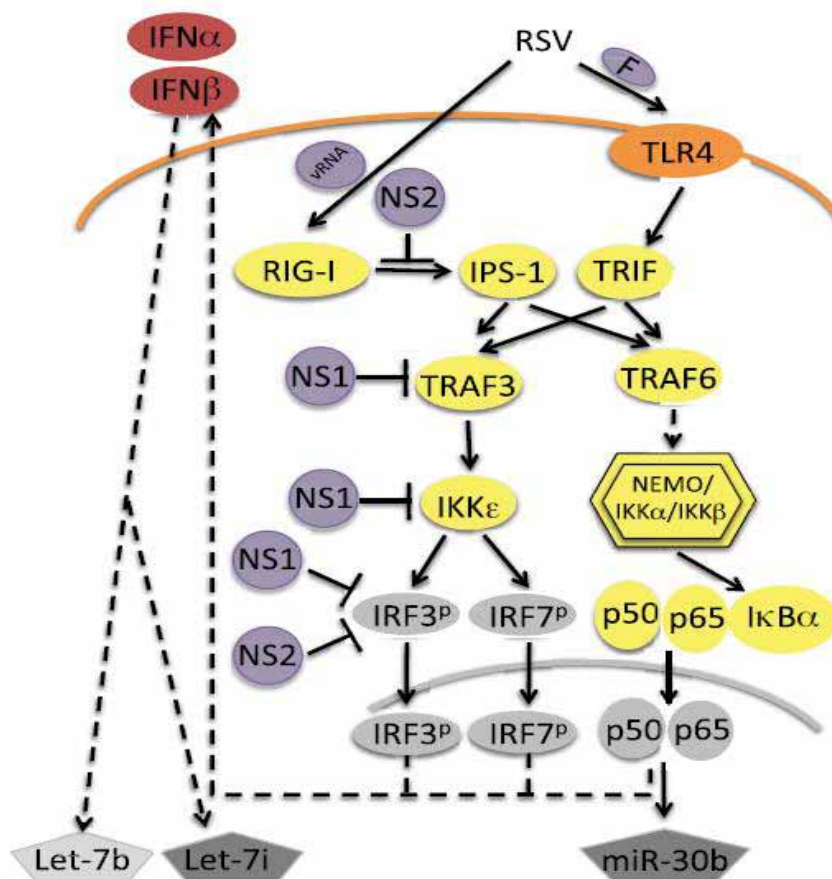


Figura 5. Modelo de ativação mediada pelo hRSV de Let-7b, Let-7i e miR-30b. O hRSV ativa RIG-I através de uma interação do RNA viral e TLR4 através da ligação da proteína viral F. RIG-I liga-se à proteína adaptadora celular IPS 1, a qual é antagonizada por NS2. O TLR4 interage com a proteína adaptadora celular TRIF. Ambas, IPS-1 e TRIF interagem com proteínas adaptadoras celulares TRAF3 e TRAF6. NS1 bloqueia a interação de TRAF3 com IPS-1. A ligação entre TRAF3 e IPS-1 leva à ativação de IKK ϵ , que fosforila o IRF-3 e IRF-7. A NS1 bloqueia a ativação de IKK ϵ , e ambas, NS1 e NS2, bloqueiam a fosforilação das IRFs. Os IRFs iniciam a expressão do tipo I de IFN- α e IFN- β , o que conduz à ativação de jusante de Let-7b, Let-7i. A interação de TRAF6 com IPS-1 ou TRIF leva à ativação do complexo de quinases NEMO-IKK α -IKK β que fosforila a I κ B α ligada ao heterodímero citosólica p50-p65 de NF- κ B. A I κ B α é degradada pelo proteassoma o que leva à liberação do heterodímero p50-p65 e expõe as suas sequências de localização nuclear. O heterodímero é transportado para o núcleo e iniciam a ativação transcricional do genes alvo de NF- κ B, que incluem o miR-30b, bem como os IFNs do tipo I. Fonte: Adaptado de THORNBURG et al., 2012.

Três proteínas celulares, incluindo *cullin-2-elongin* (ELLIOTT et al., 2007), proteína associada ao microtúbulo 1B, (MAP1B), tem sido identificadas por interagir diretamente com a NS1, e duas outras proteínas incluindo RIG-I e MAP1B foram identificadas por se ligar a NS2. A NS1 interage também com outras proteínas do hRSV tais como proteína NS2, proteína M e a proteína P.

Wu et al. (2012) identificaram 67 tipos de enzimas, 35 proteínas transportadoras, 21 reguladores de transcrição, 8 peptidases, 6 quinases, 4 fosfatases, 3 receptores de membrana, 2 reguladores de translocação, 1 proteína de canal iônico, 1 ligante de receptor nuclear, e outras 73 que apresentaram interação com NS1. Destas proteínas 125 são encontradas no citoplasma celular, 65 no núcleo, 19 na membrana plasmática e 12 em outros locais. Os vírus de RNA têm a capacidade codificadora limitada e suas proteínas frequentemente possuem múltiplos domínios funcionais e habilidade para interagir com proteínas virais e celulares. Muitas das proteínas celulares podem se agrupar em complexos funcionais, e assim é improvável que a NS1 possa interagir com as 221 proteínas individualmente. O mais provável é que a NS1 forme uma interação com as proteínas da célula que então resulta na associação com outras proteínas por interação indireta. Uma compilação das funções que têm sido descritas para as proteínas não estruturais de hRSV é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Principais funções das proteínas NS1 e NS2 do hRSV ligadas ao sistema imune.

Autores e Ano	Principais conclusões
SPANN et al., 2005	NS1 e NS2 agem de forma cooperativa para suprimir a ativação e translocação nuclear de IRF- 3.
ZHANG et al., 2005	Células dendríticas humanas transfectadas com siNS1, após infecção por hRSV, produziram quantidades elevadas de IFN tipo-1 e induziram a diferenciação de células T CD4+ naive em T auxiliares de tipo 1 (TH1).
ELLIOTT et al., 2007	<p>NS1 contém sequências ligadoras de elongin C e Cullin 2 e pode interagir com elongin C e cullin 2 <i>in vitro</i>, por isso, NS1 tem o potencial para atuar como uma ligase E3;</p> <p>A atividade de NS1 como ligase E3 é crucial para a capacidade de hRSV de degradar STAT2.</p>
MUNIR et al, 2008	A supressão de IFN tipo I mediada pelas proteínas de NS do hRSV suprime a maturação de células dendríticas, e pode ser um fator de supressão da resposta imune adaptativa de modo a propiciar re-infecções ao longo da vida
SWEEDAN et al., 2009	<p>Tanto NS1 quanto NS2 diminuem os níveis de TRAF3, um integrador estratégico de múltiplos sinais indutores de IFN. NS1 foi mais eficiente;</p> <p>NS1 reduz IKKϵ, uma proteína quinase chave que fosforila e ativa especificamente IRF- 3;</p> <p>NS2 aumenta moderadamente os níveis IKKϵ;</p> <p>NS2 diminui os níveis de STAT2, um factor essencial para a transcrição de genes antivirais de indutíveis por IFN;</p> <p>NS1 e NS2 reduzem níveis celulares de TRAF3.</p>
LING et al, 2009	<p>NS2 é necessária para inibir o início da transcrição de IFN;</p> <p>NS2 inibe a transcrição de IFN induzida por ambas as</p>

	<p>vias de RIG-I e TLR3;</p> <p>NS2 inibe a ativação do promotor de IFN mediada por RIG-I impedindo sua interação com o Mavs.</p>
REN et al., 2011	<p>NS1 inibe a transcrição do gene IRF-3;</p> <p>NS1 associa a IRF-3 e seu co-ativador transcricional CBP, interrompendo a ligação entre IRF-3 e CBP e, conseqüentemente, reduzindo a ligação de IRF-3 ao promotor de IFN-β.</p> <p>A região N-terminal de NS1 é importante para a redução IKKϵ;</p>
SWEDAN et al., 2011	<p>Ambas, NS1 e NS2, interagem especificamente com a proteína associada a microtúbulos 1B (MAP1B);</p> <p>A interação entre MAP1B e NS2 é essencial para a destruição STAT2.</p>
STRAUB et al., 2011	<p>A região de ligação do elongin C, presente na proteína NS1 é crucial para a sobrevivência da proteína e a perturbação desta região resulta na degradação de NS1 e a restrição de replicação de hRSV.</p>
BOYAPALLE et al., 2012	<p>NS1 liga-se a MAVS e esta ligação inibe a interação MAVS-RIG-I necessária para a produção de IFN.</p>
TAN et al., 2013	<p>NS1 induz a expressão do gene HOX, através de ubiquitinação de histonas na linhagem celular BEC.</p> <p>Bronquites infantis induzidas por hRSV não são responsivas ao tratamento com corticóides porque o hRSV inibe a função do receptor de corticóide;</p>
MARKETON et al., 2014	<p>As proteínas não estruturais do hRSV mediam a repressão da transativação induzida pelo receptor de glicocorticóides, o que não ocorre quando estas proteínas são deletadas, o que indica que a inibição das proteínas não estruturais podem ser um alvo viável para a terapia contra as doenças relacionadas com o hRSV.</p>

No entanto, os mecanismos pelos quais NS1 executa estas funções não estão elucidados. Não foram realizados ainda estudos

bioquímicos e biofísicos que permitam uma caracterização efetiva destas proteínas. Análise do espalhamento dinâmico de luz (DLS) mostra que a proteína está monodispersa em solução, cromatografia de filtração em gel e ultra-centrifugação analítica mostram que a proteína está principalmente na forma de monômero em solução (LING et al., 2008).

1.5. Flavonóides

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os diversos sistemas biológicos. Eles são encontrados em frutas, vegetais, nozes, sementes, bem como em bebidas como o vinho tinto, chá, café e cerveja. O termo flavonóide deriva do latim “flavus”, que significa amarelo, e define uma classe de substâncias que durante muito tempo foi conhecida como “pigmento das flores”. São considerados pigmentos responsáveis pela tonalidade das flores e folhas no outono, nas cores amarelo, laranja e vermelho (ALMEIDA et al., 2004).

Os flavonóides são substâncias de baixo peso molecular e, estruturalmente, consistem de um esqueleto de difenil propano (C₆C₃C₆) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (BEHLING et al., 2004) conforme apresentado na Figura 6.

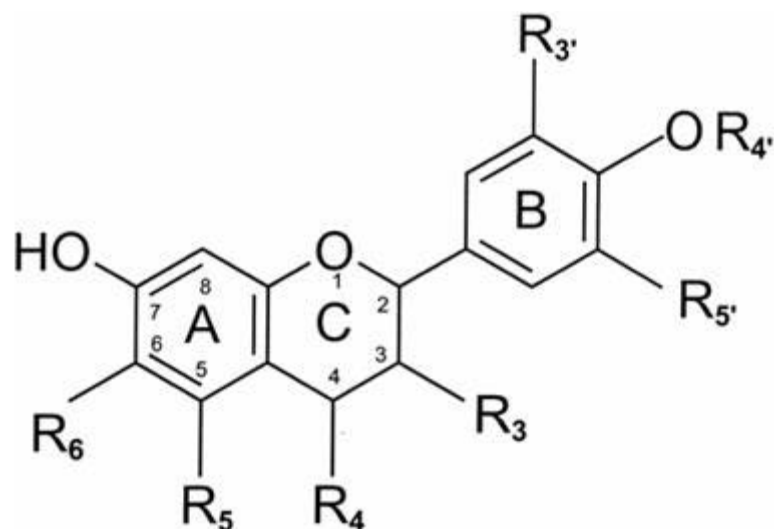


Figura 6. Estrutura básica dos flavonóides. Os anéis A e B são anéis benzênicos e C anel pirano. Fonte: PATEL et al., 2008.

As várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e no modelo de substituição da cadeia heterocíclica C (Figura 6). Algumas classes de flavonóides de interesse são (1) flavonas, (2) flavonóis, (3) flavanonas, (4) flavan-3-ol, (5) isoflavonas, (6) antocianidinas e (7) flavanolol (AGUIAR, et al., 2007). A explicação para a existência de uma grande diversidade estrutural dos flavonóides é explicada pelas modificações que tais compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (ALMEIDA et al., 2004).

Os alimentos ricos em flavonóides e em outras classes de substâncias (vitaminas, minerais, proteínas, carboidratos, aminoácidos, etc.) são chamados, atualmente, de alimentos funcionais ou nutracêuticos, e tem encontrado uma procura muito grande por parte da população, principalmente em substituição a medicamentos no combate e prevenção de doenças, visto que eles exercem seus efeitos em uma grande variedade de estados patológicos, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, processos inflamatórios, etc. Destacam-se, dentre outras, a capacidade antioxidativa, esta constitui a atividade mais elucidada pelos estudos até agora desenvolvidos. Vários

estudos demonstraram que estes compostos possuem elevada ação antioxidante por reagirem com muitos radicais livres formando complexos estáveis pela conjugação das ligações duplas de suas cadeias carbônicas. Estes radicais livres estão envolvidos na etiologia de várias doenças, e, através da nutrição preventiva, com a ingestão de alimentos ricos em flavonóides pode-se prevenir o stress oxidativo do organismo, envelhecimento precoce, câncer, danos cardiovasculares, diabetes, etc. Os flavonóides também possuem atividade antiinflamatória, vasodilatadora, analgésica, atividade contra o desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica, agentes antiagregação plaquetária, bem como atividade antimicrobiana e antiviral. (ALMEIDA et al., 2004).

A análise das atividades antimicrobianas de fármacos, como atividade antifúngica, antiviral e antibacteriana, será aplicada cada vez mais com ênfase particular para os flavonóides (TIM CUSHINE & LANB, 2005). Diversos estudos têm demonstrado as atividades antivirais de flavonóides (ZANDI et al., 2011; BACHMETOV et al., 2011; CHOI et al., 2009), com destaque para a quercetina, a qual já foi relatada, inclusive, como redutora da infecção e replicação do hRSV (KAUL et al., 1985).

Em relação à absorção dos flavonóides, alguns estudos mostraram que o flavonóide mais intensamente estudado, a quercetina, é absorvido em quantidades significativas por meio da dieta (NIJVELDT et al., 2001).

Os flavonóides são um modelo útil de substâncias para estudos espectroscópicos de suas interações com proteínas-alvo devido à transferência intramolecular de elétrons em estado excitado e seu comportamento de dupla fluorescência e alta intensidade de fluorescência em solventes pouco polares (GUTZEIT et al., 2005). As propriedades biofísicas de ligação têm sido exploradas com algum detalhe usando a Soro Albumina Humana (HSA) e quercetina como parceiros de ligação (GUTZEIT et al., 2005). Tais características permitem a utilização de flavonóides em ensaios espectroscópicos para o estudo das interações destas moléculas com proteínas virais como, por exemplo, a NS1.

1.6. Medidas de espectroscopia de fluorescência: Titulações fluorimétricas para verificação da interação entre Proteína e ligantes

A intensidade de fluorescência de uma macromolécula pode diminuir devido a uma variedade de interações com outros compostos moleculares: rearranjo molecular, transferência de energia, supressão devido a colisões, dentre outros (LAKOWICZ, 1999). Tal decréscimo da fluorescência é denominado supressão ou “*quenching*” e é descrita pela relação de Stern–Volmer, através da seguinte equação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[L] = 1 + k_q \tau_0 [L] \quad (1)$$

onde F_0 e F são respectivamente as intensidades de fluorescência antes e após a adição de ligante. k_q , K_{SV} , τ_0 , e $[L]$ são a constante de supressão da biomolécula, a qual reflete a eficiência de supressão ou a acessibilidade dos fluoróforos ao supressor; a constante de Stern–Volmer que representa a constante dinâmica de supressão; o tempo de vida média de emissão da fluorescência da biomolécula na ausência de ligante (da ordem de $\tau_0 = 10^{-8}$ s) e a concentração de ligante (supressor), respectivamente (LAKOWICZ, 1999). Neste modelo (Eq. 2') a concentração de supressor (ligante total) é admitida como sendo igual à concentração de supressor livre, pois esta não é conhecida no experimento.

Quando for observada relação linear entre a razão de fluorescências F_0/F e a concentração de ligante $[L]$, é um forte indício de que a interação entre a proteína e o ligante é uma ligação estática, não colisional, pois, neste tipo, o gráfico de Stern-Volmer apresentaria uma concavidade positiva, pois, a concentração de ligantes está relacionada à razão F_0/F pela seguinte relação (LAKOWICZ, 1999):

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[L])(1 + K_S[L]) \quad (2)$$

ou seja:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[L] + K_D K_S [L]^2 \quad (2')$$

onde K_D e K_S são as constantes dinâmicas e estáticas respectivamente sendo prevista uma dependência quadrática com a concentração de ligante, resultando numa curva com concavidade positiva no gráfico F_0/F versus $[L]$.

1.7. Medidas de espectroscopia de Dicroísmo Circular

A espectroscopia de luz polarizada ou dicroísmo circular (CD) é um método analítico amplamente utilizado para auxiliar a biologia estrutural na determinação da composição de estruturas secundárias de proteínas e peptídeos. A origem dos espectros destas macromoléculas na região do ultravioleta próximo (180 a 250 nm) são predominantemente por transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos amida, cujos níveis de energia são influenciados pela geometria da cadeia peptídica, sendo os espectros reflexos dos diferentes tipos de estruturas secundárias descritas pelos ângulos diedros ϕ e ψ (Figura 7A e 6B). Quando uma molécula é opticamente ativa, ela absorve luz circularmente polarizada à direita e à esquerda com intensidades diferentes. Este efeito é denominado de Dicroísmo Circular (CD). Isto se deve à diferença de índices de refração das duas formas de luz, o que resulta na rotação do plano de polarização da luz. A intensidade e energia dessas transições dependem dos ângulos diedros ϕ e ψ (i.e., da estrutura secundária) (Figura 7A) (FASMAN, 1996).

O espectro de CD de uma proteína com estrutura em hélice alfa, o acoplamento de éxitons das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ produzem uma banda positiva em 192 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), negativa em 209 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e negativa em 222 nm deslocada para o vermelho (red shifted) ($n \rightarrow \pi^*$). Quando a

estrutura secundária é aleatória ou random coil (RC) o espectro de CD apresenta banda positiva em 212 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), banda negativa em 195 nm ($n \rightarrow \pi^*$). Já no caso da estrutura ser folha beta o espectro de CD apresenta banda negativa em 218 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) positiva em 196 nm ($n \rightarrow \pi^*$) (Figura 7B) (FASMAN, 1996).

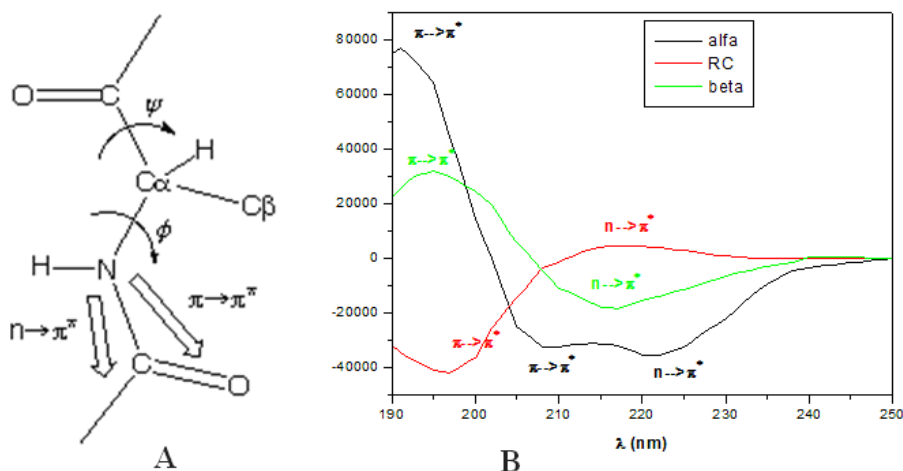


Figura 7. (A) Diagrama de ligação peptídica mostrando a orientação das transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (setas) (Fasman, 1996).

Como consequência destas propriedades dos espectros foram desenvolvidos métodos de análises dos espectros de CD levando em consideração as contribuições espectrais dos diferentes tipos de estruturas secundárias presentes nas proteínas, fornecendo desta forma informações sobre a estrutura secundária das mesmas.

Os espectros de referência utilizados correspondem aos espectros de proteínas com estruturas puramente compostas de alfa hélice, ou folha beta ou estrutura aleatória que são baseadas em derivados de proteínas de estrutura conhecida (proteínas cujas estruturas cristalinas foram determinadas) e um banco de estruturas de proteínas bem conhecidas. Estas análises foram desenvolvidas através de um grande número de

algoritmos empíricos que assumem a independência linear na aditividade dos espectros primários de estruturas secundárias no espectro final da proteína (GREENFIELD e FASMAN, 1969; BRAHMS e BRAHMS, 1980; JOHNSON, 1999; SREERAMA e WOODY, 2000; LEES et al., 2006).

1.8. Análise físico-química de complexos macromoleculares

O reconhecimento molecular é um dos principais eventos para a realização de diversas funções biológicas.

Em nível molecular, a atividade biológica de ligantes como drogas corresponde à interação de moléculas pequenas a receptores macromoleculares, que geralmente são proteínas (CREIGHTON, 1990; 1993). Este processo de ligação é considerado como uma condição de equilíbrio, que resulta de um balanço entre a associação e dissociação de ligante. As bases quantitativas farmacológicas são modelos matemáticos que descrevem estes processos, e, por conseguinte, a atividade biológica é expressa como a afinidade entre parceiros de um para o outro como uma quantidade em equilíbrio termodinâmico (CAMPBELL e DWEK, 1984). As afinidades de ligação são geralmente determinadas em ensaio de ligação. Uma grande variedade de métodos físico-químicos foi estabelecida para a determinação quantitativa de constantes de dissociação do ligante-proteína.

Uma proteína e um ligante em equilíbrio termodinâmico são caracterizados pela constante de dissociação K_D , que para o caso mais simples de uma proteína com um único local de ligação é definido como:

$$K_D = [P] [L] / [PL], \quad (3)$$

onde [P], [L] e [PL] são as concentrações no equilíbrio da proteína, do ligante e do estado complexado, respectivamente. [P] e [L] são

também referidos como os estados livres ou não ligados, por exemplo, ligante "livre", "proteína não ligada", e [PL] é frequentemente referido como "ligante ligado" ou "receptor saturado" dependendo do contexto experimental. K_D tem as unidades de concentração. Portanto, um valor de K_D na faixa de mM implica uma relação de aproximadamente 1:1.000 de livre para estados ligados em uma mistura equimolar de P e L e um K_D na faixa μ M implica uma relação de cerca de 1:1.000.000 desses estados, ou seja, um complexo muito mais estável, com menos espécies "livres" presentes.

Uma compreensão detalhada das interações macromoleculares, tais como aquelas que envolvem proteínas e ligantes, requer informação sobre a energética (termodinâmica) e a cinética das moléculas que interagem, bem como as respectivas estruturas. Em particular, os estudos termodinâmicos fornecem as informações necessárias para determinar e quantificar as forças que estabilizam estas interações e compreender qualquer mudança estrutural relevante que ocorrem durante e no interior do complexo. Um estudo quantitativo do equilíbrio de ligação de uma proteína a um ligante (por exemplo, uma droga) é normalmente concebido para determinar as seguintes informações: (1) a estequiometria da interação, (2) a existência e grau de cooperatividade (positiva ou negativa) e (3) a dependência da constante de equilíbrio com os parâmetros variáveis da solução (por exemplo, temperatura, pH e concentração de sal), que podem fornecer informação sobre as forças moleculares envolvidas na interação.

1.9. Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Desde que a biofísica molecular começou a enfatizar reações realizadas em solução, os três parâmetros termodinâmicos de maior interesse são muitas vezes a energia livre de Gibbs, entalpia e entropia. Quando ocorre uma reação química, o calor liberado ou absorvido corresponde à diferença de entalpia de produtos e reagentes. A diferença na entropia de produtos e reagentes corresponde à variação da entropia da reação. A alteração na energia livre de Gibbs (ΔG) na reação está relacionada com as alterações na entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) (ALLEWELL et al., 2013).

As forças que agem entre pequenos ligantes e uma macromolécula biológica incluem forças hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e forças eletrostáticas. Parâmetros termodinâmicos são importantes para confirmar as forças atuantes não covalentes. Pode-se resumir as leis termodinâmicas para determinar os tipos de forças que estão atuando sobre uma interação. Se $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$, interações hidrofóbicas desempenham o papel principal na reação de ligação, se $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$, o efeito eletrostático é dominante, se $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, as forças principais que estão atuando na interação são van der Waals e ligações de hidrogênio (TENG et al., 2011). A variação de entalpia (ΔH), variação de energia livre (ΔG) e a variação de entropia (ΔS) para a interação entre NS1 e flavonóides foram calculadas com base na equação de van't Hoff (4), e equações termodinâmicas (5) e (6):

$$\ln\left(\frac{K_{b2}}{K_{b1}}\right) = \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \left(\frac{\Delta H}{R}\right) \quad (4)$$

onde K_{b1} e K_{b2} são os valores das constantes de ligação às temperaturas

T_1 e T_2 e R é a constante universal dos gases. Esta equação é a base do gráfico de van't Hoff, o qual relaciona a variação de temperatura (T) em Kelvin com o inverso das constantes de associação (K_b) e o coeficiente angular da reta originada fornece a variação da entalpia (ΔH) da reação.

A energia livre de Gibbs é obtida por meio da equação (5) para cada temperatura, levando-se em consideração os valores das constantes de associação (K_b).

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (5)$$

onde ΔG é a energia livre de Gibbs, R é a constante dos gases nobres, T representa a temperatura em Kelvin e K_b , a constante de associação.

Uma vez obtidos os valores de ΔH e ΔG , utiliza-se a equação (6) para a obtenção dos valores da variação da entropia (ΔS) para as reações em cada temperatura.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

Os tipos de forças atuantes nas interações das macromoléculas afetam os valores de ΔH e ΔS conforme mostrado na Tabela 2:

Tabela 2. Significado das contribuições de ΔH e ΔS

Processo	ΔH	ΔS
Associação hidrofóbica	Positiva ou ligeiramente positiva	Positiva
Van der Waals	Negativa	Negativa
Ligações de Hidrogênio	Negativa	Negativa
Iônica	ligeiramente positiva ou ligeiramente negativa	Positiva
Protonação	Negativa	Negativa

ΔH : entalpia, ΔS : entropia. Fonte: Adaptado de Ross & Subramanian (1981).

1.10. Justificativa

Nos últimos anos tem sido feito um esforço considerável para o desenvolvimento de uma vacina para o combate do hRSV. Diante da dificuldade de obtenção de uma vacina eficaz, o bloqueio ou a interferência na atividade de uma proteína como a NS1 pode ser a melhor estratégia, uma vez que a deleção desta proteína resulta em elevação da resposta antiviral mediada por IFN.

A proteína NS1 pode ser um bom alvo para terapia antiviral devido ao seu potencial de interação com diversas proteínas celulares e virais de forma direta ou indireta. Uma forma eficiente de afetar a função da proteína é por meio do uso de moléculas que, uma vez interagindo com a NS1 possam interferir na atividade desta proteína e, assim resultar na redução das interações desta com os mediadores da cascata do interferon do tipo I. Diante deste quadro espera-se como resultado a redução da replicação viral e consequentemente a redução da severidade dos sintomas causados pela infecção por hRSV.

Uma classe de moléculas promissoras na busca de ligantes que possam interagir com NS1 são os flavonóides. Os flavonóides são substâncias naturais amplamente encontradas nos vegetais e em seus subprodutos. São moléculas de fácil obtenção, baixo custo, alta absorção e baixa toxicidade, o que torna seu uso preferencial em relação às moléculas sintéticas que apresentam alto custo e grande percentual de efeitos colaterais. Também deve-se levar em consideração que existem poucos fármacos antivirais quando comparados ao número de antibacterianos disponíveis e tem sido cada vez mais relatado que os flavonóides apresentam atividade antiviral contra diversos vírus como Dengue Vírus do tipo 2 (ZANDI et al., 2011), Vírus da Hepatite C (BACHMETOV et al., 2011), Vírus da Influenza A (CHOI et al., 2009) e principalmente Vírus Sincicial Respiratório Humano (KAUL et al., 1985).

Assim a proposta deste trabalho consiste na identificação do flavonóide que apresente a melhor interação com NS1, de modo que esta interação possa interferir na atividade da proteína de bloquear mediadores do interferon e assim, resultar na redução da eficiência de replicação do vírus.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais:

A proteína NS1 é importante na infecção pelo hRSV, por intermediar a interação das proteínas envolvidas na replicação e transcrição viral, bem como inibir a via de produção do interferon tipo I. Assim, moléculas que apresentem interação com a proteína NS1 poderiam interferir na ligação da NS1 com proteínas parceiras e, desta forma, estariam representando um obstáculo à eficiência de replicação do hRSV.

Devido a sua importância para a replicação viral e interações vírus-hospedeiro e o fato de que é altamente conservada entre as estirpes do Vírus Sincicial Respiratório, é necessária a investigação da interação com ligantes no intuito de buscar uma molécula que interfira na função da NS1, uma vez que se considera esta proteína um importante alvo para bloquear o processo de replicação e infectividade do vírus. Baseando-se no fato dos flavonóides serem substâncias naturais, com características farmacológicas bem descritas, com alta absorção e poucos efeitos adversos, associado ao fato de existirem trabalhos comprovando suas atividades antivirais, esta classe de moléculas foi escolhida para a identificação de ligantes que interajam com a proteína NS1.

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo identificar o flavonóide que apresente a melhor interação com NS1, de modo que esta molécula possa ser investigada posteriormente em estudos para avaliar sua capacidade terapêutica anti-hRSV.

2.2. Objetivos específicos:

Para identificar o flavonóide que apresente a melhor interação com NS1, pretende-se:

1. Expressar a proteína NS1 do hRSV do tipo A em linhagem de bactéria *Escherichia coli*;
2. Purificar a proteína NS1;
3. Quantificar a estrutura secundária e estabilidade térmica da NS1 na presença e ausência dos flavonoides;
4. Analisar a interação proteína-flavonóides por métodos espectroscópicos de forma a identificar o flavonóide mais eficiente na ligação da NS1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fluxograma dos experimentos realizados

A Figura 8 mostra o fluxograma das principais etapas realizadas neste trabalho. Na primeira etapa, foram realizados experimentos de interação entre a proteína NS1 e os flavonóides quercetina, miricetina, kaempferol e kaempferol-3BD. Na segunda etapa, foram realizados experimentos mais detalhados da interação entre NS1 e quercetina.

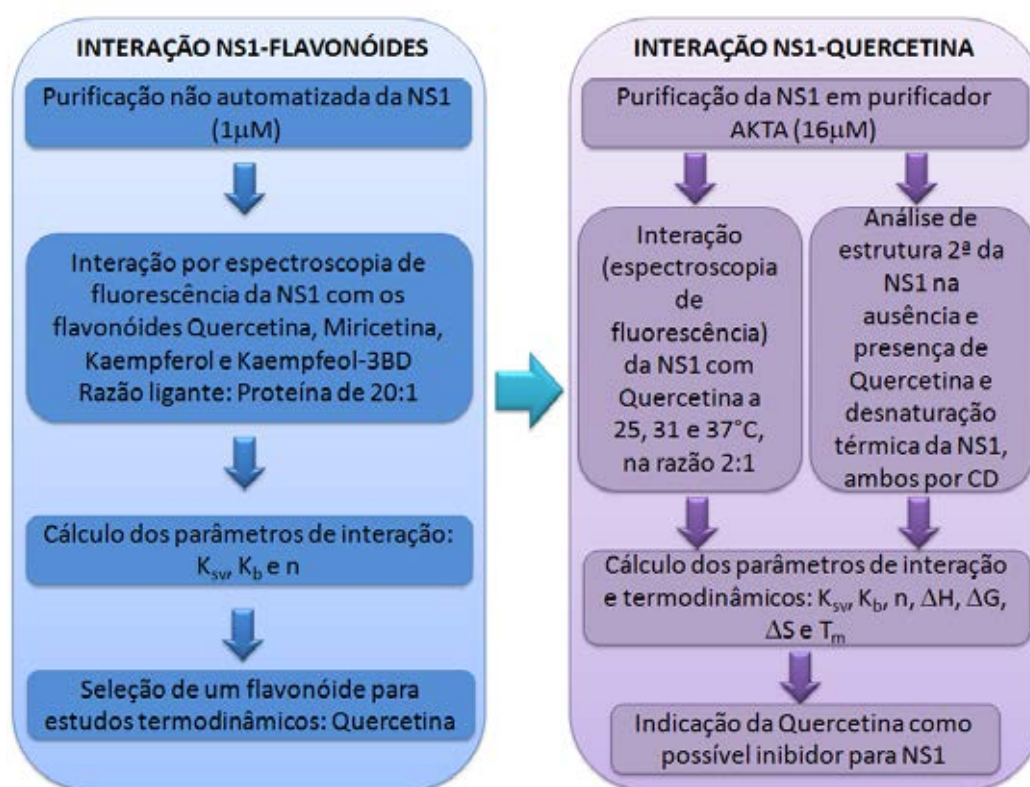


Figura 8. Fluxograma dos experimentos realizados neste trabalho.

3.2. Expressão da proteína NS1 utilizando o plasmídio pJexpress401-NS1

A otimização de códons do gene NS1 e construção do plasmídio pJexpress401-NS1 foi realizada junto à empresa DNA2.0 (WELCH et al., 2009). O plasmídio adquirido foi transformado em bactéria *E. coli* linhagem DH5 α para propagação (protocolo disponível no anexo 1), o plasmídio purificado utilizando o Spin Miniprep Kit (Qiagen[®]) (protocolo disponível no anexo 2), sendo, em seguida, transformado na linhagem de expressão BL-21(DE3).

3.2.1. pJexpress401-NS1

O plasmídio pJexpress-401 possui promotor T5 e gene de resistência à kanamicina e apresenta um rendimento de expressão 20% superior aos demais plasmídios. O mapa do gene é mostrado na Figura 9. O sequenciamento completo do gene é mostrado no anexo 03.

3.2.3. Testes de indução de expressão

O clone contendo o plasmídeo pJexpress401-NS1 em BL-21 DE3 foi inoculado em 5mL de meio líquido LB (protocolo disponível no anexo 4) acrescido de 25µg/mL de kanamicina e 34µg/mL de cloranfenicol. O inóculo foi incubado por 16 horas a 37°C, sob agitação de 100rpm.

O inóculo foi, então, diluído em meio LB acrescido de antibióticos na proporção de 1:10 para o rejuvenescimento das células. O inóculo, foi incubado à 37°C até atingir a D.O. de 0,6. Neste momento, foi adicionado 0,5mM de IPTG ao inóculo e a cultura permaneceu sendo incubada a 37°C sob agitação de 100rpm.

Foram coletadas alíquotas de 1mL nos tempos

T0 – antes da adição de IPTG;

T3 – 3 horas após a adição de IPTG;

As alíquotas foram imediatamente centrifugadas a 13.400rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante descartado. O pellet foi eluído em 50µL de tampão de amostra (Tris-HCl pH6,8 60mM; glicerol 25%; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 14,4mM; azul de Bromofenol 1%). As amostras eluídas foram então submetidas à uma temperatura de 96°C por 12 minutos em termomixer para assegurar uma desnaturação proteica completa. Em seguida foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para visualização das bandas de proteínas obtidas durante os testes de expressão.

3.2.4. Western Blotting

O gel SDS-PAGE contendo amostras obtidas na indução da expressão de NS1 foram transferidas para a membrana de nitrocelulose durante 1h a 25mAmp. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio Superblock (Thermo Scientific) em PBS. A membrana foi, então incubada com anticorpo primário Tetra-His (Qiagen) na diluição 1:1000 durante 1h. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-Tween e incubada com o anticorpo secundário Goat Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase Conjugated (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:10.000. A membrana foi lavada com PBS-Tween e revelada com 1-Step TMB blotting substrate solution (Thermo Scientific). A técnica de *western blotting* foi realizada pela empresa DNA2.0.

3.2.5. Indução de expressão de BI-21(DE3)-pJexpress401-NS1

As culturas de BI-21(DE3)-pJexpress401-NS1 foram rejuvenescidas até atingirem o volume de 1,5L. Neste momento foram incubadas a 37°C, com agitação de 100rpm até atingirem a DO=0,6 (600nm). Adicionou-se IPTG 0,5mM e incubou-se por mais 3 horas a 37°C com agitação de 100rpm. Após três horas a amostra foi centrifugada a 7000rpm 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet foi armazenado em freezer -80°C.

3.2.6. Purificação da proteína NS1 por afinidade

3.2.6.1. Lise e sonicação da amostra

Foram utilizados os pellets congelados em freezer -80°C obtidos a partir de 1,5L de cultura. Os pellets foram ressuspensos em 5mL tampão de lise (NaCl 0,6M; NaH_2PO_4 0,05mM; Glicerol 10% e Imidazol 40mM; pH7,4). A solução foi submetida a 8 pulsos de 15 segundos em sonicador com intervalos de 15 segundos. A amostra foi, então, centrifugada a 7.000rpm por 30 minutos a 4°C . Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em filtro de $0,22\mu\text{m}$.

3.2.6.2. Purificação não automatizada com resina de afinidade

Foi empacotado aproximadamente 1mL de resina de níquel His60 Ni Superflow (Clontech[®]) em coluna PD-10 da (GE) com capacidade para 10mL. Adicionou-se 10mL de Tampão (NaCl 0,6M; NaH_2PO_4 0,05mM; Glicerol 10%; pH7,4) acrescido de 40mM de imidazol para equilibrar a resina. Homogeneizou-se com a resina e incubou-se por 30 minutos para ativação da resina;

Adicionou-se o sobrenadante. Homogeneizou-se com a resina e aguardando-se por 2 horas, coletando-se o lavado, em seguida. Adicionou-se 2mL de (NaCl 0,6M; NaH_2PO_4 0,05mM; Glicerol 10%; pH7,4) acrescido de 40mM de imidazol. Homogeneizou-se com a resina e após a resina empacotar coletou-se o tampão. Esta etapa foi repetida com tampões contendo concentrações crescentes imidazol (50mM, 60mM, 70mM, 80mM e 90mM) conforme mostrado na Figura 10.

Adicionou-se 2mL de (NaCl 0,6M; NaH_2PO_4 0,05mM; Glicerol 10%; pH7,4) acrescido de 500mM de imidazol. Homogeneizou-se com a resina

e após a resina empacotar, incubou-se por 30 minutos, coletando-se o tampão, em seguida.

Alíquotas de 25 μ L foram acrescidas de 5 μ L de tampão de amostra 6X (Tris-HCl pH6,8 60mM; glicerol 25%; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 14,4mM; azul de Bromofenol 1%). As amostras eluídas foram então submetidas à uma temperatura de 96°C por 12 minutos em termomixer para assegurar uma desnaturação proteica completa. Em seguida foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% para visualização das bandas de proteínas obtidas durante os testes de purificação. A cauda de histidina não foi removida.



Figura 10. Etapas de purificação da proteína NS1.

3.2.6.3. Troca de tampão da NS1 purificada com 500mM de imidazol

Após a purificação, foram utilizadas as colunas PD-10 Desalting Columns - GE®, seguindo as recomendações do fabricante (O protocolo é mostrado no anexo 05) para substituir o tampão da proteína NS1. O tampão empregado foi preparado com NaCl 300mM; Na₂HPO₄ 50mM; pH7,4.

3.3. Interação entre NS1 e flavonóides por espectroscopia de fluorescência

Com base nos estudos realizados no grupo de pesquisa, foram selecionados quatro flavonóides, cujos valores de capacidade de absorção, valores de constante de interação com a proteína NS1 por *docking* molecular e baixa taxa de toxicidade celular foram significativos (Araújo, G. C., dados em elaboração). Os quatro flavonóides selecionados foram: Quercetina (Q4951 - Sigma Aldrich[®]), Miricetina (M6760 - Sigma Aldrich[®]), Kaempferol (K0133 - Sigma Aldrich[®]) e Kaempferol-3- β -D-glicopiranosídeo (Kaempferol 3BD) (79851 - Sigma Aldrich[®]). As estruturas dos flavonóides selecionados para o ensaio de interação por espectroscopia de fluorescência com a proteína NS1 são mostradas na Figura 11. Comparando-se as estruturas dos flavonóides abaixo observa-se que a miricetina apresenta um radical hidroxila a mais que a quercetina, na posição 3' do anel benzênico B, enquanto o Kaempferol difere da quercetina pela ausência de um radical hidroxila na posição 5' do anel benzênico B. O Kaempferol-3- β -D-glicopiranosídeo apresenta uma glicosilação na posição 3 do anel pirano central.

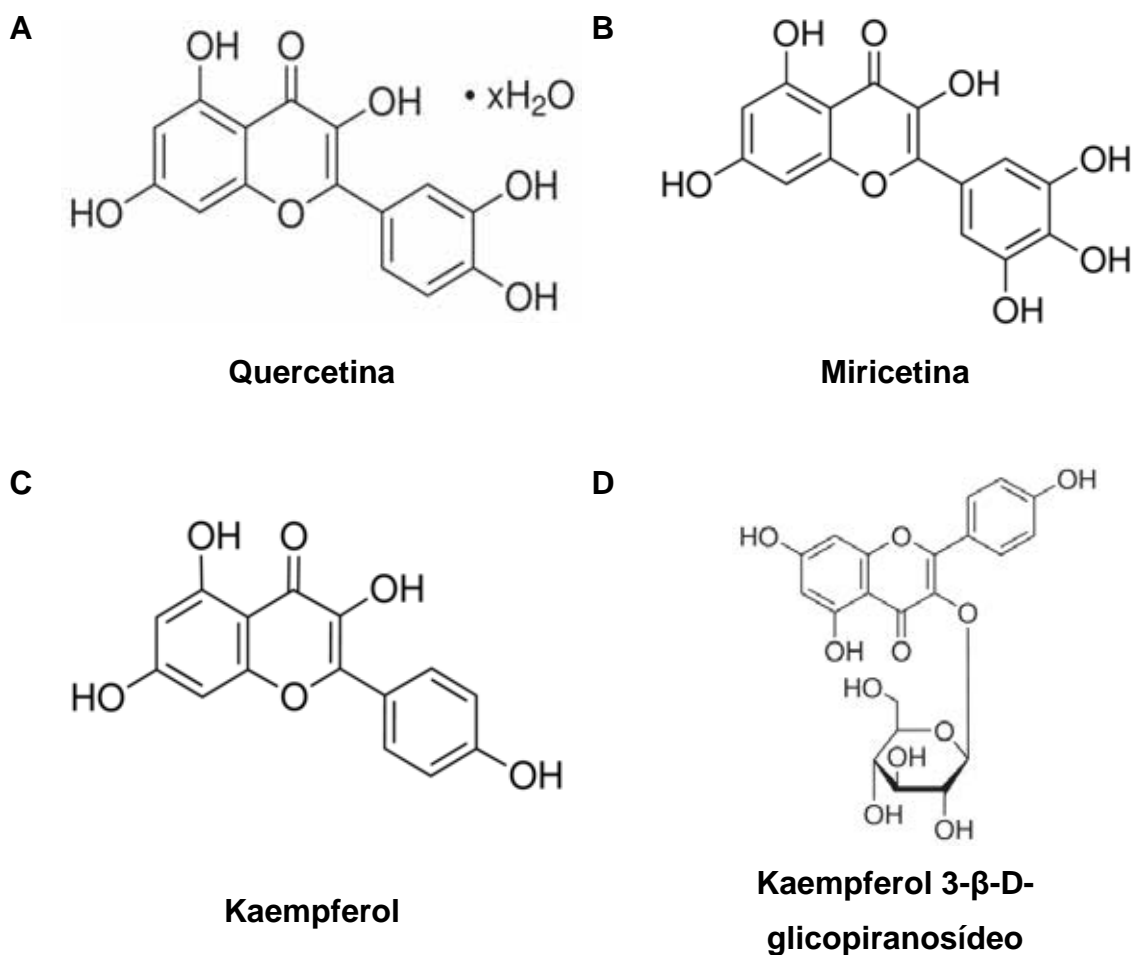


Figura 11. Estrutura dos flavonóides. A) Querceina; B) Miricetina; C) Kaempferol e D) Kaempferol 3-β-D-glicopiranosídeo.

3.3.1. Preparo das soluções de flavonóides e de proteínas

A amostra de proteína purificada foi mantida em tampão NaCl 300mM; Na₂HPO₄ 50mM, pH7,4, em gelo. As soluções estoque dos flavonóides Quercetina (coeficiente de partição água/octanol - logP = 1,48), Miricetina (logP = 1,42), Kaempferol (logP = 2,0) e Kaempferol-3-β-D-glicopiranosídeo (logP = 1,1) (Sigma Aldrich®) foram preparados em

etanol 90%, em virtude da solubilidades destes compostos.

3.3.2. Medidas espectrofotométricas e equipamentos

Os espectros de absorção dos ligantes nas faixas ultravioleta e visível (UV/Vis) foram obtidos com espectrofotômetro Cary-3E (Varian, Palo Alto, CA) em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico em temperatura ambiente, nas seguintes condições: velocidade de varredura 600 nm/min, intervalo de 1 nm, abertura de fenda 2,0 nm.

As medidas de UV/Vis foram utilizadas para se determinar as concentrações estoque das amostras da proteína NS1 e os ligantes Quercetina, Miricetina, Kaempferol e Kaempferol 3- β -D-glucopyranoside (Kaempferol 3BD). As soluções estoque de quercetina (MM=338,3g/mol) Miricetina (MM=318,24g/mol), Kaempferol (MM= 286,23g/mol) e Kaempferol 3BD (MM=448,38g/mol) foram preparadas em 10% de água Milli-Q e 90% de etanol PA. A solução estoque de proteína NS1 foi preparada em solução tampão 300mM de NaCl; 50mM de Na₂HPO₄, pH7,4. Na determinação da concentração da solução estoque dos flavonóides foram utilizados os seguintes coeficientes de extinção molar: quercetina $\epsilon_{375}=21.880 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 375nm (Merck); miricetina $\epsilon_{378}=20.400 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ em 378nm, kaempferol $\epsilon_{368}=17.680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, kaempferol 3BD $\epsilon_{351}=38.720 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e no cálculo da concentração da proteína NS1 foi utilizado o valor do coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280}=10.220\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ em 280nm (estimado pela ferramenta Expasy-ProtParam - GASTEIGER et al., 2005).

3.3.3. Titulações espectrofluorimétricas para verificação da interação entre a NS1 com os ligantes

As medidas de fluorescência foram realizadas com espectrofluorímetro *Cary Eclipse*, Varian®, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, em temperatura de 25°C. A abertura das fendas de excitação e de emissão foi ajustada em 0,5 nm, com excitação em 280nm e emissão entre 290 e 500nm. Tais medidas foram realizadas de maneira a auxiliar na escolha de um flavonóide promissor na interação com a proteína NS1, para posteriormente realizar estudos termodinâmicos com o mesmo.

As medidas da interação da proteína com os flavonóides foram realizadas coletando-se os espectros de fluorescência da proteína e acompanhando-se a diminuição (supressão) da intensidade dos mesmos após a adição de ligante na solução.

Embora experimentos de supressão sejam simples, há vários problemas que podem ocorrer. Deve-se examinar sempre o espectro de emissão em condições de máxima supressão. À medida que a intensidade diminui a contribuição da fluorescência de fundo pode tornar-se significativa. Supressores são muitas vezes utilizados em altas concentrações, e os supressores em si podem conter impurezas fluorescentes. Além disso, a intensidade dos picos de espalhamento Raman e Rayleigh de água é independente da concentração do agente supressor. Assim a contribuição relativa do espalhamento da luz aumenta sempre com o aumento da supressão. O efeito de filtro interno, devido à absorção, pode diminuir a intensidade de fluorescência aparente, e, assim, distorcer os dados de supressão. Independentemente do agente supressor a ser usado, é importante para determinar se os efeitos do filtro

interno são significativos. Se os efeitos de filtro interno estão presentes as intensidades de fluorescência observadas devem ser corrigidas (LAKOWICZ, 1999). Borissevitch, em 1999, descreveu a necessidade de correção pelo filtro interno, uma vez que a não utilização deste pode resultar em alterações nos valores das constantes de Stern Volmer. O fator de correção (filtro interno) é determinado pela equação:

$$\eta = \frac{A_{x_0} A_{y_0} (1 - 10^{-A_{x_i}}) (1 - 10^{-A_{y_i}})}{A_{x_i} A_{y_i} (1 - 10^{-A_{x_0}}) (1 - 10^{-A_{y_0}})} \quad (7)$$

onde η é o fator de correção do filtro interno; A_{x_0} e A_{y_0} representam, respectivamente, a absorção do fluoróforo (NS1) nos comprimentos de onda de excitação e emissão; A_{x_i} e A_{y_i} representam, respectivamente, a absorção total do fluoróforo (NS1) e do supressor (flavonóides) nos comprimentos de onda de excitação e emissão.

Substituindo-se A pela relação:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (8)$$

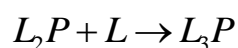
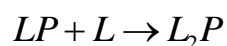
onde A representa a absorção dada pela relação entre ε , c e l, os quais representam, respectivamente, o coeficiente de extinção molar, a concentração da solução estudada e o caminho óptico utilizado na medida. Assim, teremos para o caso da interação NS1-flavonóides:

$$\eta = \frac{(NS1 \varepsilon_{\lambda_{em}} x [NS1]) (NS1 \varepsilon_{\lambda_{em}} x [NS1] + Lig \varepsilon_{\lambda_{em}} x [Lig]) (1 - 10^{-(NS1 \varepsilon_{\lambda_{ex}} x [NS1])}) (1 - 10^{-(NS1 \varepsilon_{\lambda_{ex}} x [NS1] + Lig \varepsilon_{\lambda_{ex}} x [Lig])})}{(NS1 \varepsilon_{\lambda_{ex}} x [NS1]) (NS1 \varepsilon_{\lambda_{ex}} x [NS1] + Lig \varepsilon_{\lambda_{ex}} x [Lig]) (1 - 10^{-(NS1 \varepsilon_{\lambda_{em}} x [NS1])}) (1 - 10^{-(NS1 \varepsilon_{\lambda_{em}} x [NS1] + Lig \varepsilon_{\lambda_{em}} x [Lig])})} \quad (9)$$

onde, $NS1_{\varepsilon_{\lambda,em}}$ representa o coeficiente de extinção molar da proteína NS1 no comprimento de onda de emissão, $NS1_{\varepsilon_{\lambda,ex}}$, o coeficiente de extinção molar da proteína NS1 no comprimento de onda de excitação, $Lig_{\varepsilon_{\lambda,em}}$, o coeficiente de extinção molar do ligante no comprimento de onda de emissão, $Lig_{\varepsilon_{\lambda,ex}}$, o coeficiente de extinção molar do ligante no comprimento de onda de excitação e, $[NS1]$ e $[Lig]$ representam a concentração da proteína NS1 e do ligante (flavonóide), respectivamente.

3.3.4. Cálculo dos parâmetros de interação

No caso do mecanismo de supressão estática, onde o ligante ligado suprime totalmente a fluorescência da proteína, a suposição adotada é que os sítios de ligação na proteína são iguais e independentes. Este modelo permite escrever a equação de equilíbrio de reação, como:



Admitindo que os sítios de ligação na proteína são iguais e independentes, ou seja:

$$K_{b1} = K_{b2} = \dots = K_{bn} = [L_nP] / [L]^n [P_f]$$

e

$$K_{b1} = K_{b2} = \dots = K_{bn} = K_b$$

$$K_b^n = \frac{[L_nP]}{[L]^n[P]} \quad (11)$$

onde [P] é a concentração de proteína livre, [L] é a concentração de ligante livre e [L_nP] é a concentração de complexo Proteína-ligante com constante de ligação K_b.

Assumindo um modelo de dois estados no qual a proteína na solução encontra-se complexada com o ligante ou livre, ou seja, [P_t] = [L_nP] + [P_f], onde [P_f] é a concentração de proteína não complexada com ligante ou proteína livre, de tal forma que a razão entre a intensidade de fluorescência da solução que contém proteína livre (sem a presença de ligante) F₀ e a intensidade de fluorescência após a adição de ligante na solução F é igual à razão entre a concentração de proteína livre e proteína ligada:

$$\frac{[P_t]}{[P]} = \frac{F_0}{F} \quad (12)$$

A relação entre a concentração de ligante total, ligante livre e variação de fluorescência pode ser descrita pela relação:

$$[L] = [L_t] - \left(\frac{F_0 - F}{F_0}\right)[P_t]$$

$$[L_t] - [L] = [L_b] = [L_nP]$$

$$[L_nP] = \left(\frac{F_0 - F}{F_0}\right)[P_t]$$

$$K_b^n = \left(\frac{F_0 - F}{F}\right) \left(\frac{1}{[L_t] - \left(\frac{F_0 - F}{F_0}\right)[P_t]}\right)^n$$

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = n \log(K_b) + n \log\left[L_t - \left(\frac{F_0 - F}{F_0}\right)P_t\right] \quad (13)$$

onde, F_0 e F são as fluorescências antes e após a adição de ligante [L] (quercetina, mericetina, kaempferol e kaempferol 3BD com a proteína NS1).

Através do gráfico $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log(1/[Quercetin] - [NS1] [(F_0 - F)/F_0])$ onde se observa dependência linear, pode-se obter os valores relativos ao número n de sítios de ligação da proteína e a constante de associação K_b relativa à interação dos ligantes com a proteína.

3.4. Estudos de interação entre a proteína NS1 e o flavonóide quercetina

A partir dos resultados de interação por titulações fluorimétricas entre NS1 e flavonóides, a quercetina foi selecionada para a realização de estudos mais detalhados de interação. Para tal, foi padronizada a purificação da proteína NS1 por meio de purificador ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES), no intuito de aumentar a concentração da amostra de proteína.

3.5.1. Purificação da proteína NS1 em resina de afinidade em sistema ÄKTA

O pellet (proveniente de cultura de 1,5L obtida nas condições descritas no item 3.1.5) foi eluído em 40mL de tampão de lise (TRIS 50mM; NaCl 100mM; β Me 5mM; pH 8,0) e 0,5mL de inibidor de protease Sigma Protease Inhibitor Cocktail, Animal Component Free (I3911-1BO).

As amostras foram submetidas a 20 pulsos de sonicação na potência 5 com duração de 10 segundos de sonicação e intervalos de descanso de 50 segundos para não superaquecer a amostra. O processo foi realizado em banho de gelo. As amostras foram, então, centrifugadas por 60 minutos a 28.000 x g, a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em filtro 0,22µm. Em seguida, o lisado foi aplicado a um fluxo constante de 0,5mL/min à resina de níquel His60 Ni Superflow (Clontech®) previamente equilibrada com o tampão de purificação (50mM TRIS, 100mM NaCl, 1mM βMe; pH 8,0) e acoplada ao purificador ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) Purifier (GE®). A coluna foi, então lavada com tampão de purificação contendo 40mM de imidazol até que a linha de base fosse atingida para remoção de contaminantes. A eluição da NS1 foi realizada com tampão de purificação contendo 200mM de imidazol e as frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE. A troca de tampão das frações puras foi realizada como descrito no ítem 3.2.6.3, utilizando-se tampão NaCl 150mM; Na₂HPO₄ 50mM; pH7,4 e estocadas a 4°C.

3.5.2. Titulação espectrofluorimétrica da proteína NS1 com o flavonóide quercetina

As medidas de espectroscopia de fluorescência foram realizadas em espectrofotômetro PC1 Photon Counting¹, utilizando cubetas de quartzo com 1cm de caminho óptico. As medidas foram realizadas nas temperaturas de 25°C, 31°C e 37°C nas seguintes condições: excitação em 280nm, emissão entre 290-500nm e abertura de fenda de 1mm.

¹ Para as titulações com os quatro flavonóides foi utilizado o espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian) e para os estudos mais detalhados com quercetina foi utilizado o espectrofluorímetro PC1 Photon Counting.

A interação entre NS1 e quercetina foi realizada por meio de adição de quantidades crescentes de ligante à cubeta contendo 16,3 μ M de NS1 até a razão molar de 2 ligantes por proteína. A emissão da proteína foi acompanhada em 336nm. Os dados foram posteriormente analisados pela relação de Stern Volmer (LAKOWICZ, 1999) e, pelo método descrito por Bi et al. (2004) do ítem 3.2.4.

3.6. Dicroísmo circular e desnaturação térmica

As medidas de CD foram realizadas em espectropolarímetro Jasco J-810, a temperatura ambiente, em cubeta de 0,5cm de caminho óptico. O espectro entre 200 e 260nm foi acumulado a uma velocidade de 20nm/min, com resposta de 2s e abertura de fenda de 1,0nm, realizando-se 10 acumulações.

As medidas de desnaturação térmica foram realizadas em espectropolarímetro Jasco J-810 acoplado a um sistema peltier, no intervalo de temperatura de 20°C a 80°C, com velocidade de aquecimento de 1°C/min e leituras a cada 5°C. Foi utilizada cubeta de 0,5cm de caminho óptico, com leitura em 222nm, com resposta de 2s e abertura de fenda de 1,0nm, realizando-se 3 acumulações. Tais experimentos foram realizados para a proteína NS1 sem adição de ligantes e para a proteína acrescida do ligante quercetina na razão molar de 5 ligantes por proteína.

3.7. Determinação da composição de estruturas secundárias por deconvolução espectral das medidas de CD e dos parâmetros termodinâmicos do sistema proteína e proteína/ligante através de Desnaturação Térmica

O princípio básico envolvido na análise dos espectros de CD de proteínas e utilizado no cálculo da fração de estruturas secundárias é que o espectro de CD da proteína, θ_λ , pode ser expresso como uma combinação linear de espectros puros de estruturas secundárias:

$$\theta_\lambda = \sum f_k \Theta_{k,\lambda} \quad (14)$$

onde f_k é a fração de estrutura secundária e $\Theta_{k,\lambda}$ é o espectro padrão da estrutura secundária k .

A fração de estruturas secundárias foi calculada utilizando-se o programa de deconvolução espectral CDPPro (Sreerama & Woody, 2000). Com estes dados foi possível verificar a integridade da proteína alvo assim como possíveis alterações nas proporções de frações de estruturas secundárias induzidas na formação do complexo da proteína com o ligante.

As curvas de desnaturação térmica foram obtidas através do monitoramento das mudanças de elipticidade em 222nm com o aumento da temperatura a uma taxa constante de 1°C/min na faixa de temperatura a de 20°C a 80°C, com medidas dos espectros a cada 5°C.

Num processo de desnaturação térmica, assumindo um processo de dois estados $N \leftrightarrow D$, a constante de equilíbrio do processo de desnaturação K_D é dada por:

$$K_D = \frac{f_D}{f_N} \quad (15)$$

Onde f_D é a fração de proteína desnaturada e f_N é a fração de proteína no estado nativo, ou seja, $f_N = 1 - f_D$

Na temperatura de *melting*, T_m $f_N = f_D$, portanto $K_D = 1$, logo $\ln(K_D) = 0$. Portanto num gráfico de $\ln(K_D)$ vs Temperatura, a temperatura de *melting* é obtida quando $\ln(K_D) = 0$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Dados fornecidos pela ferramenta ProtParam

Utilizando a sequência nucleotídica do gene NS1, o programa ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) forneceu dados inerentes a proteína NS1 produzida após a otimização de códons do gene. NS1 apresenta 145 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 16kDa, coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280\text{nm}}=10.220 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, utilizado no cálculo da concentração das amostras da proteína e ponto isoelétrico teórico de 6,33, utilizado para a escolha do pH dos tampões para purificação e titulações (dados mostrados na Tabela 3).

Tabela 3. Características da proteína NS1 geradas pelo programa ProtParam.

Número de aminoácidos	145
Massa Molecular	16kDa
PI teórico	6,3
Fórmula	$\text{C}_{721}\text{H}_{1141}\text{N}_{197}\text{O}_{215}\text{S}_{11}$
Número total de átomos	2285
Coeficiente de Extinção Molar	$10.220\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

4.2. Indução da expressão e purificação da proteína NS1

A Figura 12 mostra os resultados do gel da indução da expressão de NS1 utilizando o plasmídio pJexpress401-NS1, no qual observa-se na segunda, terceira e quarta colunas, amostras coletadas antes da indução, 1 hora após a indução e três horas após a indução, respectivamente. A proteína expressa com aproximadamente 16kDa é mostrada na coluna 3, utilizando-se as seguintes condições: 0,5mM de IPTG, 3 horas após a indução, à 37°C. A expressão foi confirmada pelo *western blotting*² (Figura 13), no qual se observa a proteína NS1 presente no lisado total da amostra induzida (terceira coluna) e no sobrenadante da amostra induzida após sonicação (quinta coluna).

² *Western blotting* realizado pela empresa DNA2.0.

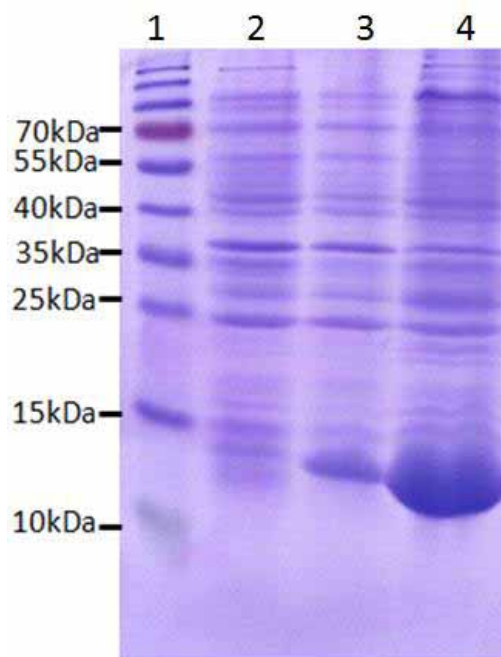


Figura 12. Gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 referente ao teste de indução da expressão de NS1. Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder; Coluna 2: Lisado total antes da adição de IPTG; Coluna 3: Lisado total 1 hora após da adição de IPTG a Coluna 4: Lisado total após 3 horas da adição de IPTG.

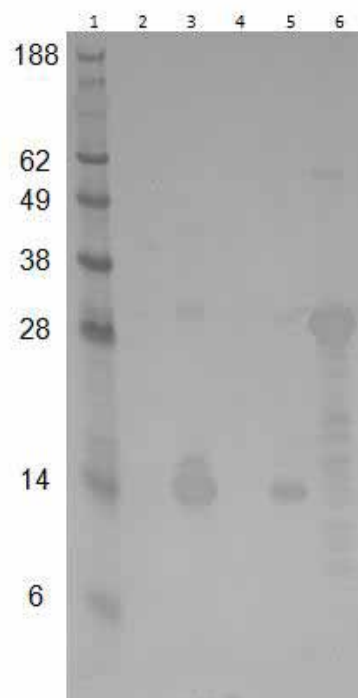


Figura 13. Western Blotting da proteína NS1. Coluna 1: Marcador de massa molar, Coluna 2: Lisado total não induzido; Coluna 3: Lisado total da indução com 0,5mM de IPTG; Coluna 4 Sobrenadante após sonicação da amostra não induzida; Coluna 5: Sobrenadante após sonicação da amostra induzida com 0,5mM de IPTG; Coluna 6: Lisado total do controle positivo.

Para a purificação não automatizada da NS1 por afinidade, a melhor condição encontrada foi a realização de um gradiente não linear de imidazol, com o qual se obteve a proteína NS1 pura, 16kDa, como pode ser observado na Figura 14. A coluna 2 mostra o *flow through* da purificação, as colunas 3 a 8 mostram as lavagens de 40 a 90mM de imidazol e a coluna 9 mostra a proteína pura obtida com 500mM de imidazol.

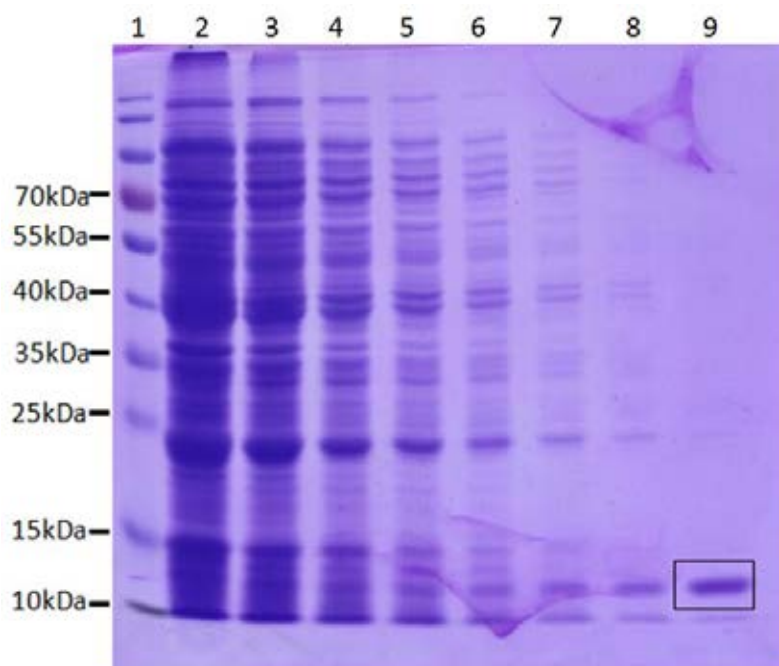


Figura 14. SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 referente purificação da proteína NS1. Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder; Coluna 2: *Flow through* da amostra. Colunas 3 a 8: Lavagens com 40mM, 50mM, 60mM, 70mM, 80mM e 90mM de imidazol respectivamente. Coluna 9: Eluição da proteína NS1 com 500mM de imidazol.

Os resultados mostraram que a proteína pode ser purificada por método não automatizado, entretanto a concentração de proteína obtida por este método é baixa (aproximadamente $1\mu\text{M}$). Também é possível observar que a proteína está localizada nos géis (Figura 12 a Figura 14) ligeiramente abaixo do marcador de massa molar de 15kDa. Supõe-se que tal fato tenha ocorrido em decorrência de que a massa molar destes marcadores é estimada e sua migração é influenciada pela composição do tampão escolhido para a corrida de eletroforese e pela matriz do gel.

4.3. Interação entre NS1 e flavonóides por análises espectroscópicas

4.3.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis

Os espectros de absorção dos flavonóides estão mostrados na Figura 15, tendo os mesmos apresentado dois picos de absorção característicos, um na imediação do comprimento de onda de 260nm e outro em 375nm, exceto para o kaempferol que está em torno de 350nm. Estas características são importantes para o cálculo das concentrações das soluções utilizadas nos experimentos. A concentração dos estoques das soluções utilizadas, as quais foram determinadas por meio dos espectros de UV-Vis foram: [NS1]= $1,05\mu\text{M}$; [Quercitina]= $0,85\text{mM}$; [Miricetina]= $1,33\text{mM}$; [Kaempferol]= $1,03\text{mM}$ e [Kaempferol3BD]= $0,51\text{mM}$.

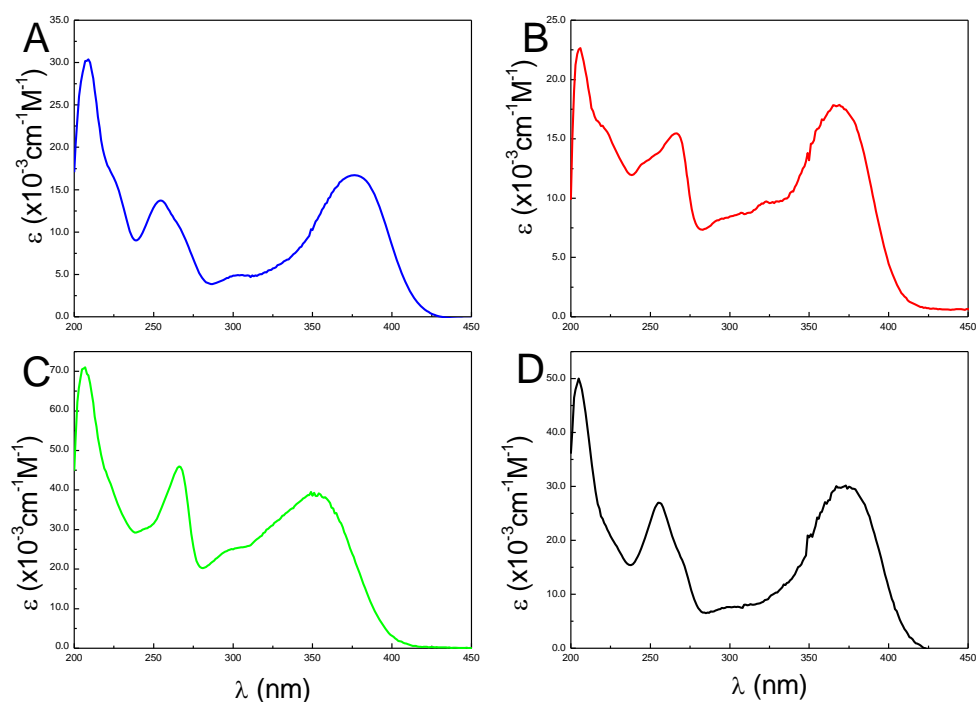


Figura 15. Espectros da absorvância molar pelo comprimento de onda, mostrando os espectros de UV-Vis dos flavonóides utilizados. A) Miricetina; B) Kaempferol; C) Kaempferol-3- β -D-Glicopiranosídeo e; D) Quercetina.

4.3.2. Titulações Espectrofluorimétricas

Quando se verifica os resultados dos espectros de titulação obtidos (Figura 16), estes indicam a supressão da fluorescência com a adição de ligante na solução. Espectros análogos são obtidos nos diferentes experimentos realizados neste trabalho para os demais flavonóides. Nesta figura, pode-se visualizar o decréscimo do espectro de fluorescência no sentido de 1 para 13. Também é possível observar que não há deslocamento do pico de fluorescência da proteína quando acrescida de ligantes, indicando que não há contribuição da fluorescência dos anéis aromáticos dos flavonóides neste comprimento de onda. A supressão de fluorescência é um indicativo de que o ambiente proteico

está sendo perturbado. Este efeito indica interação ente o ligante e a molécula proteica, porém não permite ainda caracterizar o tipo de interação.

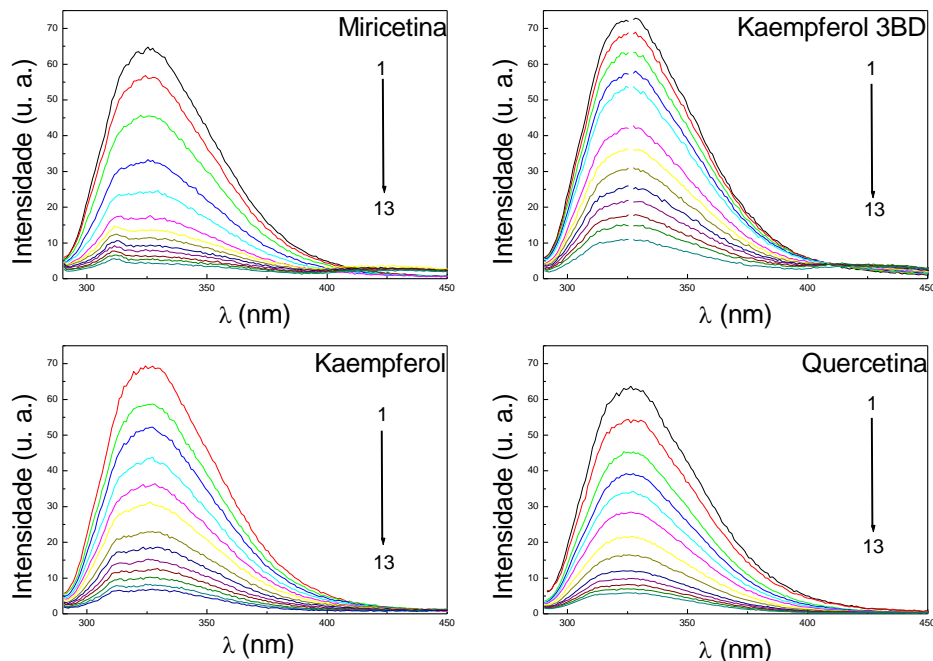


Figura 16. Espectros de emissão de fluorescência do sistema NS1-flavonóides. Concentração da [NS1]=1,05 μ M. T=298K. Razão Molar Ligante/Proteína = 0,0 (1); 0,25 (2); 0,49 (3); 0,99 (4); 1,48 (5); 2,47 (6); 3,46 (7); 4,94 (8); 6,42 (9); 8,40 (10); 10,38 (11); 12,85 (12) e 15,32 (13). A seta indica a direção da supressão de fluorescência com o aumento da concentração de flavonóides na solução de proteína. A) Miricetina; B) Kaempferol 3BD; C) Kaempferol e; D) Quercetina.

Inicialmente foram analisadas as variações de fluorescência da NS1 com o acréscimo de ligante na solução, de forma a se obter uma faixa de variação da razão Ligante/Proteína com valores inferiores até valores bem superiores à unidade de emissão da proteína. No caso estudado os valores da razão variaram de 0,0 até 20, como mostrado no gráfico da Figura 17. O gráfico da variação percentual da fluorescência observada em função da razão Ligante/Proteína permite observar que, em todos os experimentos realizados, foi atingida a região de saturação

com uma variação de aproximadamente 60% da fluorescência inicial observada para NS1. Verifica-se que este comportamento é semelhante para todos os flavonoides utilizados. A variação da fluorescência observada (f_{obs}) indica a fração da fluorescência inicial que foi acessível ao supressor e seu gráfico é uma modificação do gráfico de Stern Volmer (LAKOWICZ, 1999), sendo descrita por:

$$f_{\text{obs}} = \frac{F_0 - F}{F_0} \quad (16)$$

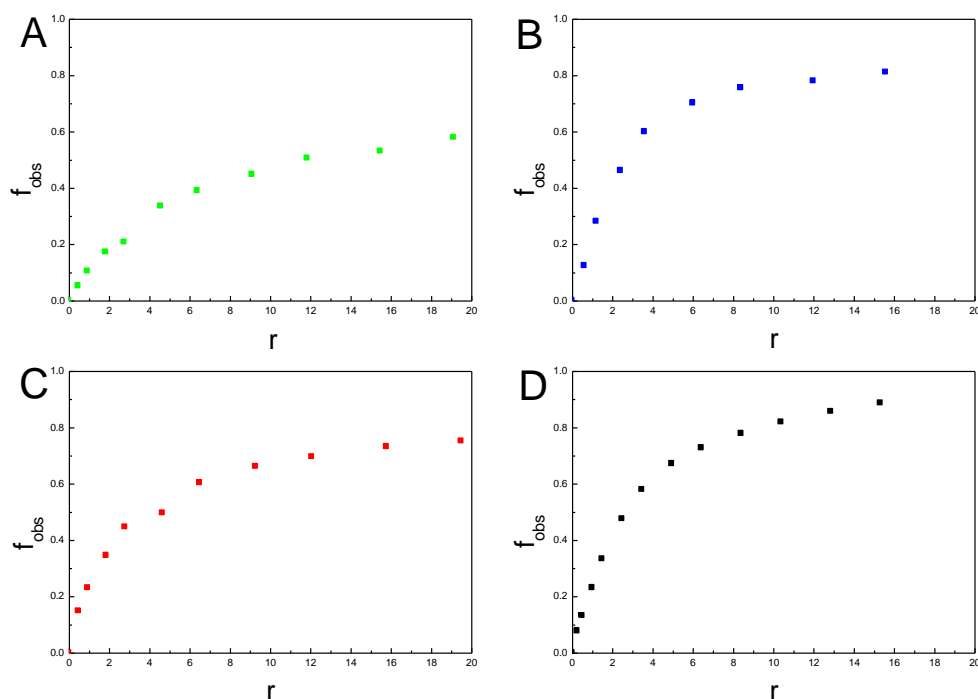


Figura 17. Fração de variação da fluorescência observada (f_{obs}) em função da razão (r) entre as concentrações de flavonóides e da NS1, onde se verifica a ampla faixa de valores de r utilizadas nos experimentos realizados de forma a garantir a validade dos modelos experimentais de tratamento dos dados. A) Kaempferol-3- β -D-Glicopiranosídeo (■); B) Miricetina (■); C) Kaempferol (■) e; D) Quercetina (■).

Nos experimentos realizados, embora os flavonóides tenham sido preparados em etanol 90%, o volume total de etanol na solução contendo a proteína e o ligante, após as titulações, não ultrapassou 2,7% do volume total da solução, não afetando desta forma a estrutura terciária da proteína, uma vez que concentrações acima de 10% de etanol são necessárias para causar discretas alterações na estrutura proteica (TABOADA et al., 2007).

Para verificar o tipo de supressão e, portanto o tipo de interação existente entre a NS1 e os flavonóides, os dados experimentais foram analisados para determinar a relação entre a variação da razão das fluorescências do estado livre com o ligado em função do acréscimo de ligante, gráfico F_0/F versus $[L]$, o qual nos fornece o valor da constante de Stern-Volmer K_{SV} (equação 1). Na Figura 18 são apresentados os gráficos de Stern-Volmer referentes aos experimentos realizados e na Tabela 4 os valores de K_{SV} obtidos por meio da declividade do gráfico. O software Origin 8.5.1 foi utilizado para a construção dos gráficos, bem como o cálculo do melhor ajuste linear para cada gráfico.

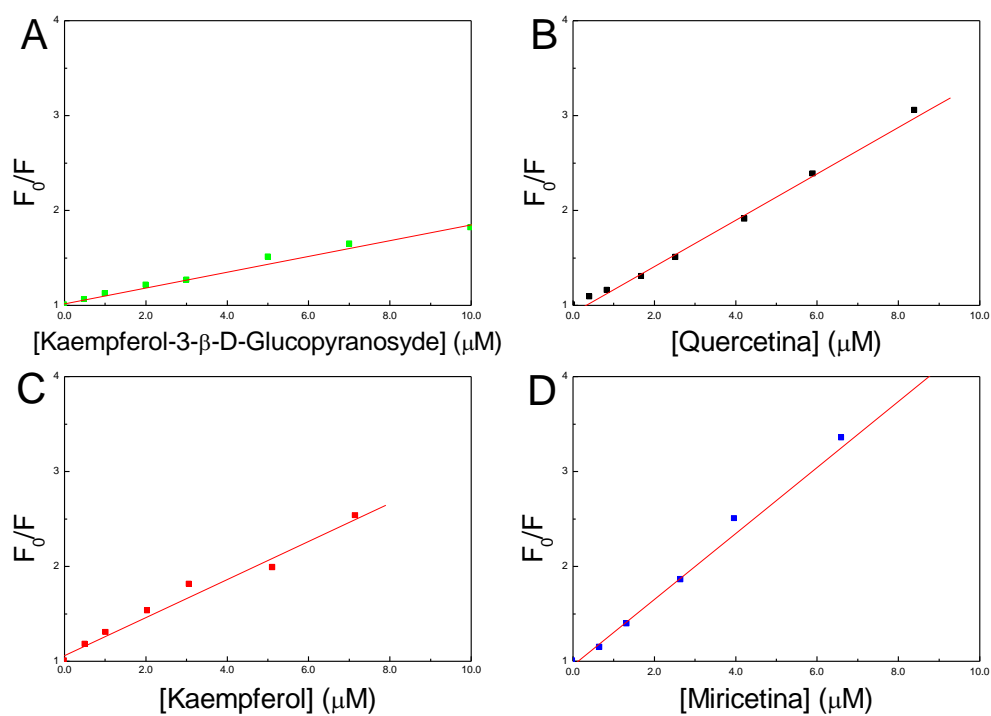


Figura 18. Gráfico de Stern-Volmer da supressão da fluorescência da proteína NS1 pelos diferentes ligantes utilizados. A) Kaempferol-3-β-D- Glicopiranosídeo (■); B) Quercetina; C) Kaempferol (■), e D) Miricitina (■). O coeficiente angular representa o valor da K_{SV} .

Tabela 4. Valores de K_{SV} obtidos nas diferentes interações realizadas entre a proteína NS1 e os flavonóides. T=298K.

Flavonóides	$K_{SV} \times 10^5 M^{-1}$
Miricitina	$3,1 \pm 0,7$
Quercetina	$3,0 \pm 0,5$
Kaempferol3BD	$2,9 \pm 0,5$
Kaempferol	$2,7 \pm 0,5$

K_{sv} : Constante de Stern Volmer

Nos resultados mostrados na Figura 18, a linearidade observada entre F_0/F e $[L]$, e os valores das constantes de Stern-Volmer para as interações entre os flavonóides e a proteína NS1 indicam interação entre a proteína e o ligante. No caso da NS1 este tipo de interação tem uma importância na proposta de bloquear a interação desta proteína com outras proteínas que são alvo de interação, pois a ligação do flavonoide na NS1 pode causar mudanças conformacionais locais, levando ao impedimento do acesso ao sítio de ligação e, por conseguinte, bloqueando a interação com as demais proteínas virais e celulares. Tais mudanças na estrutura terciária da proteína, não necessariamente alteram a porcentagem de componentes de estrutura secundária da mesma.

A evidência mostrada na Figura 18 é confirmada quando se analisa os valores das constantes de Stern-Wolmer (K_{sv}), a qual é da ordem de 10^5 , indicativa de ligação forte. Vale ressaltar ainda que a proteína NS1 apresenta um triptofano e a contribuição de suas três tirosinas é pequena, indicando que a supressão da fluorescência é devida à interação do ligante à uma região próxima ao triptofano de forma a permitir a supressão da fluorescência.

4.3.3. Cálculo dos parâmetros de interação

Nos resultados do gráfico $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log(1/[Ligante]-[NS1] [(F_0-F)/F_0])$ (Figura 19) gerados pelo software Origin 8.5.1, pode-se obter os valores relativos ao número de ligantes por proteína (n) e a constante de associação aparente K_b da interação dos ligantes quercetina; miricetina, kaempferol, kaempferol-3- β -D-Glucopyranosyde com a proteína NS1, conforme modelo descrito na equação 11. Na Figura 19 são apresentados os resultados referentes às titulações das proteínas

com os ligantes, sendo que os valores de K_b e n para cada interação são apresentados na Tabela 5.

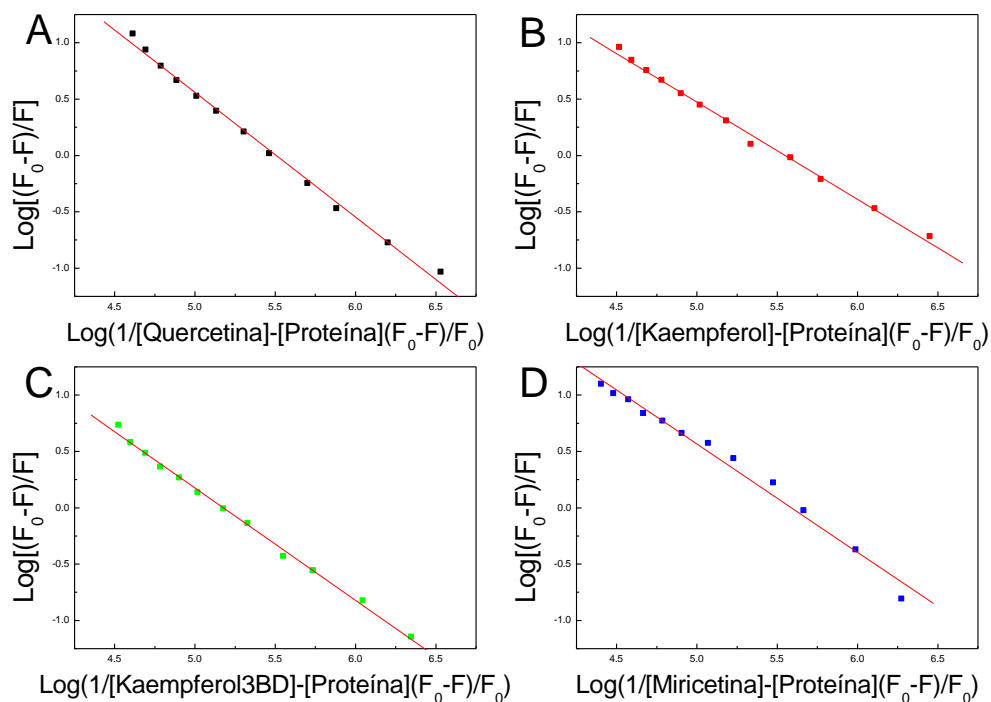


Figura 19. Gráficos $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log(1/[Ligante]-[NS1] [(F_0-F)/F_0])$ a 298K para a interação NS1 com A) Quercetina (■); B) Kaempferol (■); C) Kaempferol-3-β-D-Glicopiranosídeo (■) e; D) Miricetina (■).

Os valores da constante de ligação K_b , referentes à interação da proteína NS1 com os flavonóides quercetina, miricetina, kaempferol e kaempferol-3-β-D-Glucopyranosyde (Figura 19) indicam interação de alta afinidade. É consenso na literatura considerar a seguinte classificação: constantes da ordem de 10^{-10} a 10^{-2} como interações de afinidade fraca, 10^3 como interações de afinidade moderada e, acima de 10^4 , interações de afinidade forte. Outro dado importante obtido refere-se à estequiometria da interação, indicando que há um único sítio de ligação na NS1 para

qualquer um dos quatro flavonóides estudados ($n=1$).

Tabela 5. Constantes de ligação K_b e número de sítios de ligação n para a reação de NS1 com flavonóides. Temperatura 298K.

Flavonóides	K_b ($\times 10^5 M^{-1}$)	n	K_D ($\times 10^{-6}$)
Miricitina	3,80 \pm 0,10	0,99 \pm 0,04	2,63 \pm 0,07
Quercetina	3,61 \pm 0,09	0,95 \pm 0,02	2,77 \pm 0,07
Kaempferol3BD	3,05 \pm 0,05	0,97 \pm 0,01	3,28 \pm 0,05
Kaempferol	2,93 \pm 0,07	0,98 \pm 0,02	3,41 \pm 0,08

K_b : Constante de ligação; K_D : Constante de dissociação; n : Número de ligantes por sítio.

Os valores de K_b mostrados na Tabela 5 indicam uma sequência preferencial de interação dos flavonóides estudados com a NS1, sendo esta sequência dada por: Kaempferol \approx Kaempferol 3BD < Miricitina \approx Quercetina. Para todas as interações entre NS1 e flavonóides obteve-se 1 ligante por sítio. Os valores de K_D indicam que para que ocorra a interação é necessária uma quantidade de ligante da ordem de 10^{-6} (micromolar), reforçando que se trata de uma interação forte, o que é fisiologicamente relevante uma vez que é necessário pouco ligante para que ocorra a interação com a proteína.

Em uma etapa posterior, a discriminação da especificidade da interação entre um flavonóide escolhido (quercetina) e a NS1 (reconhecimento molecular) foi realizada por meio da análise termodinâmica da interação, ou seja, por meio do cálculo de K_b em diferentes temperaturas, o que permite analisar os parâmetros

termodinâmicos envolvidos na interação como: energia livre, entalpia e entropia. Estes dados são importantes na análise da especificidade da interação do flavonóide com a NS1, permitindo uma melhor compreensão de como a estrutura do flavonóide é importante nesse tipo de interação. Estas análises foram realizadas por técnicas de fluorescência e de dicroísmo circular, ambas complementares neste tipo de análise, conforme descrito a seguir.

4.4. Estudo das interações entre NS1 e quercetina

Após a realização dos testes iniciais com todos os flavonóides, o flavonóide quercetina foi selecionado para a realização de estudos termodinâmicos. Tal escolha ocorreu não apenas pelos valores obtidos das constantes de interação entre NS1 e quercetina, mas também em decorrência do fato da quercetina ser o flavonóide mais estudado, com uma distribuição ampla na natureza e de fácil aquisição comercial, associado ao fato de a quercetina ter baixa toxicidade e uma farmacocinética bem conhecida (GONZALEZ et al., 2009) e não apresentar efeitos adversos, o que é altamente desejável quando se procura uma substância para uso farmacológico. Outro fato importante foram os relatos de que a quercetina apresenta diversas atividades antivirais, inclusive tendo sido descrita como inibidora da infecção e replicação de hRSV (KAUL et al., 1985).

Zandi et al. (2011) testaram os efeitos antivirais de flavonóides contra o Dengue Vírus do tipo 2 (DENV) em células Vero e seus resultados mostraram que a quercetina exibiu propriedades significativas de inibição da replicação de DENV, afetando a replicação intracelular do vírus DENV enquanto Bachmetov et al. (2011) demonstraram a supressão da replicação do Vírus da Hepatite C pela quercetina, mediado pela

inibição da atividade da protease NS3. Outro estudo, realizado por Choi et al. (2009), mostrou inibição da replicação viral na fase inicial da infecção pelo Vírus Influenza A na presença de quercetina-3-ramnosídeo. Por fim, um ensaio de atividade antiviral utilizando quercetina e outros flavonóides em redução de unidades formadoras de placas (pfu) (KAUL et al., 1985) mostrou que a quercetina apresenta propriedades de redução da infectividade e da replicação intracelular do hRSV. Tais dados mostram a importância dos flavonóides, em especial, quercetina e seus derivados, tem inibido diferentes tipos virais e suas atividades. Uma vez que foi descrito que a quercetina inibe a replicação hRSV, é necessário investigar se esta inibição está ocorrendo por meio de interações entre a quercetina e as proteínas do hRSV, NS1 em especial, uma vez que esta é conhecida por auxiliar na eficiência da replicação viral.

Para a realização de experimentos de interação entre a NS1 e a quercetina, o processo de purificação da proteína foi padronizado novamente, utilizando-se desta vez, o cromatógrafo líquido ÄKTA (GE Healthcare Life Sciences), aumentando-se, assim, a eficiência de purificação. Nos experimentos de titulação por espectroscopia de fluorescência, os pontos de titulação foram concentrados na região compreendida entre as razões molares entre ligante e proteína de 0 a 2, região utilizada para obter valores de n e K_b .

4.5. Purificação em sistema ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES)

O gráfico resultante da purificação usando o cromatógrafo líquido ÄKTA Purifier (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES), pode ser visto na Figura 20, no qual podemos visualizar dois picos de contaminantes que são removidos com a lavagem de 40mM de imidazol e o pico da proteína

pura (seta) obtido com a eluição de 200mM de imidazol. O gel mostrado na Figura 21 permite visualizar, na coluna 2, a fração de proteína NS1 pura obtida com a eluição de 200mM de imidazol. A utilização do cromatógrafo líquido ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) propiciou uma maior eficiência na purificação da NS1, aumentando a concentração da NS1 obtida por purificação, que foi elevada de 1 μ M (utilizando purificação não automatizada) para 16 μ M (purificador ÄKTA).

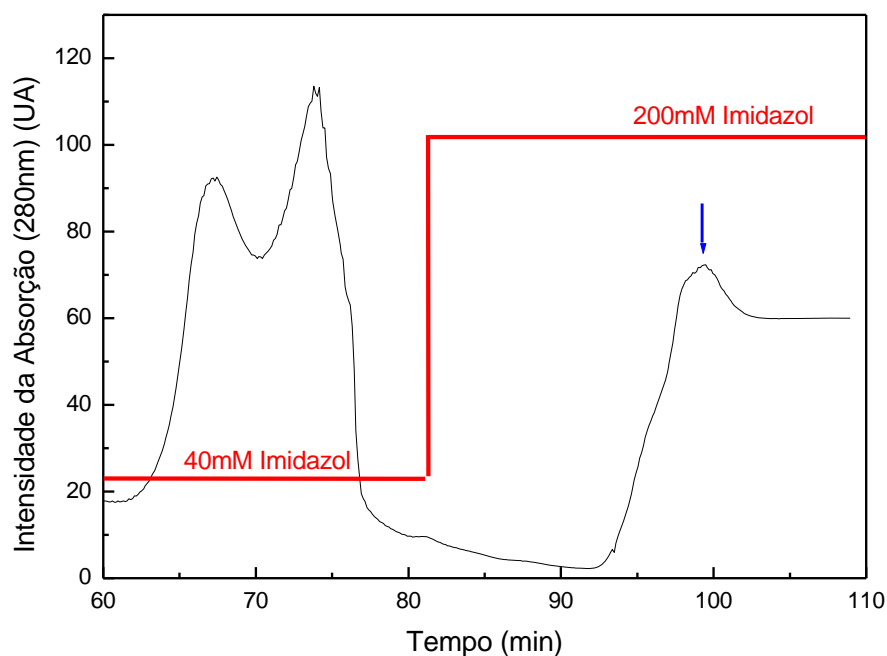


Figura 20. Cromatograma da purificação da NS1 em sistema ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) (lavagem e eluição). Em preto, absorção em 280nm, em vermelho, concentração de imidazol. A seta indica o pico da proteína pura.

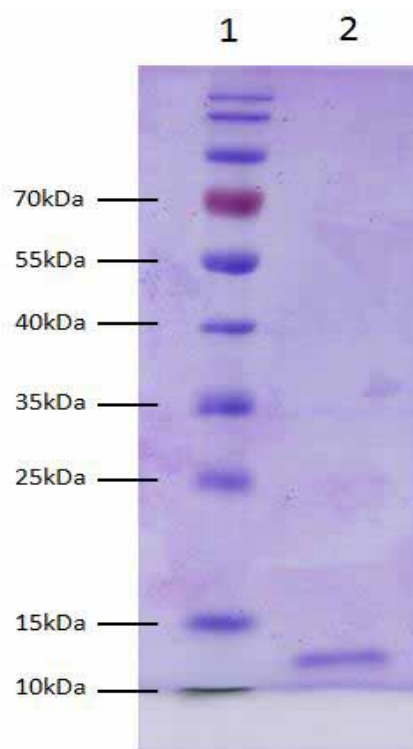


Figura 21. Gel SDS-PAGE corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 mostrando a proteína purificada. Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder; Coluna 2: NS1 pura.

4.6. Titulações espectrofluorimétricas

A concentração das soluções, determinadas por UV-Vis, foram $16.3\mu\text{M}$ para NS1 e 7.1mM para Quercetina. Foram analisadas as supressões ocorridas na fluorescência da proteína NS1 em decorrência da adição de quercetina até atingir-se a razão molar de ligante:proteína na ordem de 2:1 (Figura 22) nas temperaturas de 25°C , 31°C e 37°C . A adição do ligante à solução contendo a proteína mostrou supressão da fluorescência à medida que a concentração do ligante aumentou, causando decréscimo no espectro de fluorescência. A influência da absorção da quercetina na região de emissão da proteína foi corrigida pelo cálculo do filtro interno, conforme descrito no item 3.3.3.

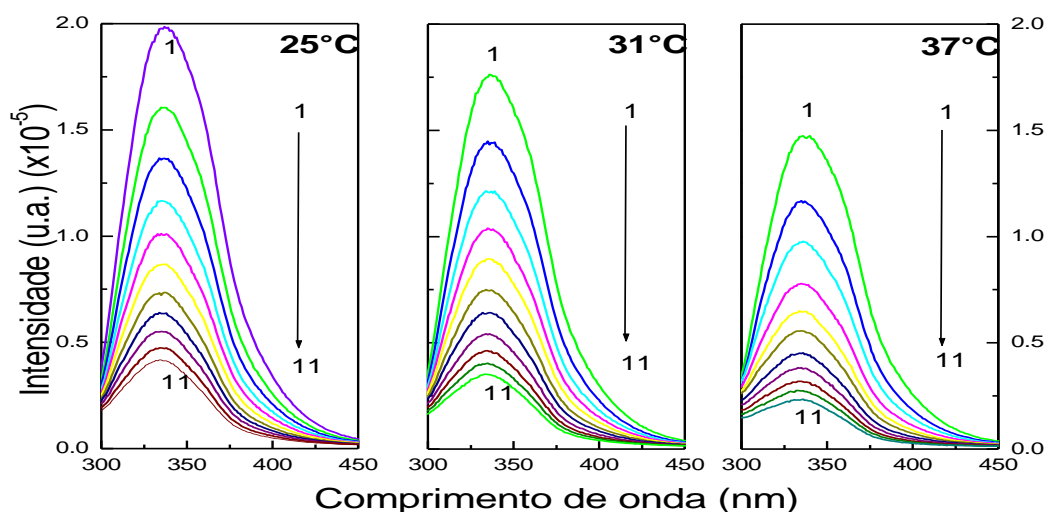


Figura 22. Espectro de emissão do complexo NS1-Quercetina. Concentração de NS1 [NS1]=16.3 μ M. A razão molar Ligante:Proteína em cada titulação foi 0,0 (1); 0,21 (2); 0,44 (3); 0,65 (4); 0,87 (5); 1,09 (6); 1,30 (7); 1,52 (8); 1,74 (9); 1,95 (10) e 2,18 (11). pH=7.4; λ_{ex} =280nm; λ_{em} =290-500nm; T=298K. A seta indica o sentido de supressão da fluorescência.

A supressão da fluorescência por via estática ou dinâmica pode ser diferenciada através da sua dependência com a temperatura (LAKOWICZ, 1999). Os gráficos de Stern-Volmer da interação de Quercetina com NS1 nas temperaturas de 25°C, 31°C e 37°C, conforme mostrado na Figura 23, e os valores de K_{sv} obtidos pelas declividades do gráfico da Figura 18, mostrados na Tabela 6, indicam que o mecanismo de supressão da fluorescência mais provável é o processo dinâmico, uma vez que os valores de K_{sv} aumentam com o aumento da temperatura. Estes valores de K_{sv} foram obtidos utilizando-se os pontos de titulação nos quais as razões de Ligante/Proteína variaram entre 0 e 1.

O fato da interação entre quercetina e NS1 apresentar uma tendência de aumento do valor das constantes de Stern Volmer com o aumento da temperatura, sugere que esta tendência se mantenha em

temperaturas acima das temperaturas analisadas neste estudo. Nesta linha de raciocínio pode-se sugerir a indicação deste flavonóide como agente terapêutico, uma vez que a infecção pelo hRSV ocasiona febre nos pacientes e, com o aumento da temperatura, ocorre também o aumento da afinidade deste ligante pela proteína NS1.

A Figura 23 permite ainda observar que as concentrações de quercetina utilizadas para o cálculo das constantes de Stern Volmer referente às titulações espectrofluorimétricas em três temperaturas não ultrapassaram $2\mu\text{M}$ de quercetina, valor este que não ultrapassa a concentração de $10\mu\text{M}$ descrita por Pohjala & Tammela (2012), como a concentração na qual já se observa agregação de quercetina por DLS.

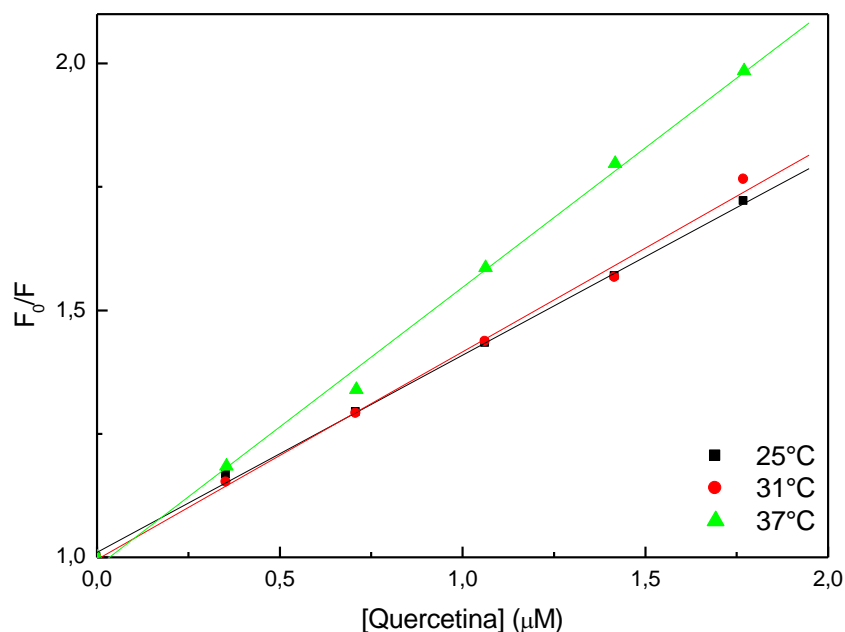


Figura 23. Gráfico de Stern-Volmer da supressão da fluorescência da proteína NS1 pela quercetina. As retas indicam o melhor ajuste linear para os dados experimentais.

Tabela 6. Valores de K_{sv} obtidos na interação entre NS1 e quercetina.

Temperatura (K)	K_{sv} ($\times 10^4$) M^{-1}	R
298	$4,9 \pm 0,2$	0,99
304	$5,4 \pm 0,2$	0,99
310	$7,5 \pm 0,3$	0,99

K: Kelvin; K_{sv} : Constante de Stern Volmer; R: Coeficiente de Correlação.

Os valores de K_{sv} obtidos em nossos experimentos ($4,9-7,5 \times 10^4$) são semelhantes aos valores encontrados por WANG et al. (2011) que variaram de $2,3-2,9 \times 10^4$, quando analisada a ligação entre quercetina e lisozima, uma proteína com massa molar de 14kDa semelhante à massa da NS1, 16kDa.

4.7. Cálculo dos parâmetros de interação

A constante de associação aparente (K_b) e o número de ligantes da interação entre NS1 e quercetina podem ser obtidos pela análise dos resultados do gráfico da Figura 24, de acordo com o modelo descrito na equação 16. A

Figura 24 (gráfico $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log(1/[Quercetina]-[NS1] [(F_0-F)/F_0])$) mostra o equilíbrio físico químico da titulação de NS1 com quercetina com base na equação 17. Os valores de K_b e n para as três temperaturas utilizadas são apresentados na Tabela 7.

$$\log\left[\frac{(F_0 - F)}{F}\right] = n \log(K_b) + n \log\left[\frac{1}{[\text{Quercetina}] - [\text{NS1}] \frac{(F_0 - F)}{F}}\right] \quad (17)$$

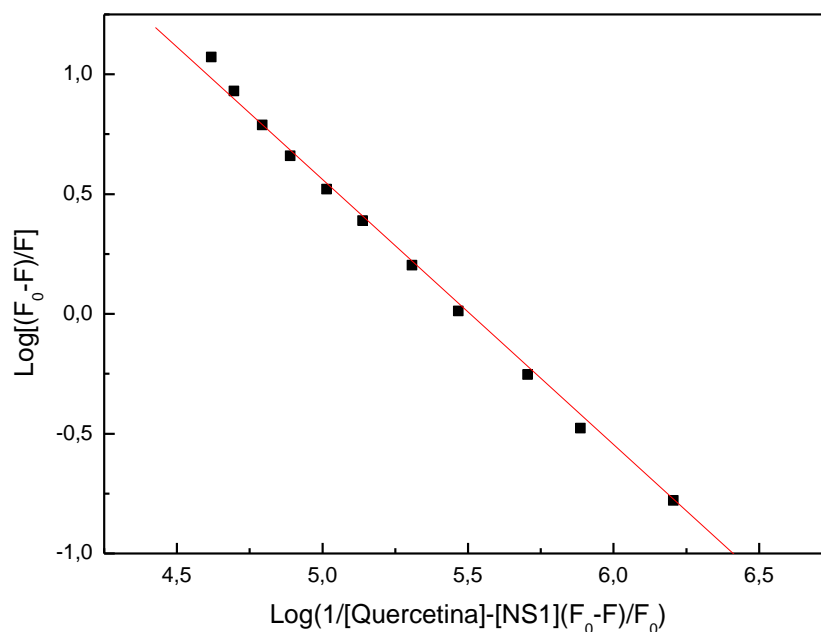


Figura 24. Gráfico $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log(1/[\text{Quercetina}] - [\text{NS1}](F_0-F)/F_0)$ a 298K para interação entre NS1 e quercetina. A reta em vermelho representa o melhor ajuste linear para a interação do complexo NS1-Quercetina.

Tabela 7. Valores das constantes de associação aparente (K_b), constantes de dissociação (K_D) e número de sítios de interação (n).

Temperatura (K)	K_b (M^{-1})	K_D (M)	n	R
298	$(8,6 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,16 \pm 0,04) \times 10^{-6}$	$0,93 \pm 0,05$	0,99
304	$(1,69 \pm 0,06) \times 10^6$	$(5,9 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$1,03 \pm 0,04$	0,99
310	$(4,3 \pm 0,2) \times 10^6$	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$0,98 \pm 0,04$	0,99

K: Kelvin; K_b : Constante de associação aparente; K_D : Constante de dissociação; n : Número de ligantes por sítio; R: Coeficiente de Correlação.

A constante de ligação (K_b) da interação entre NS1 e quercetina (

Figura 24) mostra uma interação de alta afinidade, sugerindo que a interação é hidrofóbica, o que ocorre quando um ligante altamente hidrofóbico interage com uma região hidrofóbica da proteína. Os resultados da interação NS1-Quercetina mostram que a K_b é da ordem de 10^5 - 10^6 e o número de sítios n é 1 e estes valores obtidos são da mesma ordem de grandeza dos valores obtidos nos experimentos de Sengupta & Sengupta (2002) e Bi et al. (2004), os quais realizaram estudos de interação HSA-Quercetina.

Sengupta & Sengupta (2002) estudaram o processo de ligação, por espectroscopia de fluorescência, entre quercetina e HSA no qual propuseram que a quercetina se liga na região interdomínio da HSA, próxima ao triptofano 214 e a interação apresentou uma constante ligação de $K \approx 1.9 \times 10^5 M^{-1}$, que é semelhante aos valores obtidos neste estudo. Em 2004, Bi et al. determinaram K_b e n por três métodos diferentes para interação por fluorescência entre HSA e quercetina e obteve valores entre 9.1×10^5 a 3.8×10^6 para a K_b e n variando entre 1,3 e 1,6. Resultados de estudos de interação por fluorescência resolvida no tempo entre HSA e quercetina desenvolvidos por Rolinsky et al. (2007) mostraram valores de K_b de $7,6 \pm 0,8 \times 10^4 M^{-1}$ e número de sítios de ligação de 1,3. O estudo de interação por absorvância entre HSA-Q efetuada por Kanakis et al. (2006) apresentou K_b de $1.4 \times 10^4 M^{-1}$ e os resultados da interação de dicroísmo circular de HSA-Q desenvolvido por Zsila et al. (2003) apresentou um valor de K_b de $1,46 \pm 0.21 \times 10^4 M^{-1}$ corroborando com os outros resultados apresentados.

O valor da entalpia foi obtido a partir da inclinação da reta (ajuste linear) do gráfico de Vant`tHoff, o qual é apresentado na Figura 25. Os

valores de ΔH , ΔG e ΔS são mostrados na Tabela 8.

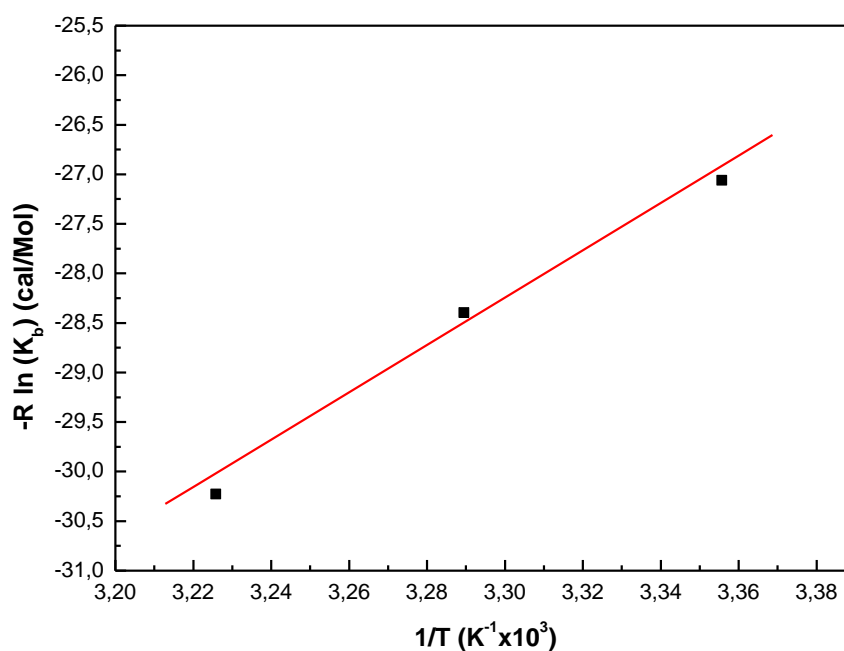


Figura 25. Gráfico de Van't Hoff ($\ln K$ vs $1/T$) para a interação entre NS1 e quercetina nas temperaturas de 298K, 304K e 310K. A reta em vermelho representa o melhor ajuste linear.

Tabela 8. Valores de ΔH , ΔG e ΔS .

Temperatura (K)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)	T. ΔS (kcal.mol ⁻¹)
298		-8,1±0,3	107±6	31±6
304	23,9±0,5	-8,7±0,3	106±6	32±6
310		-9,4±0,3	107±6	33±6

K: Kelvin; ΔH : entalpia; ΔG : energia livre de Gibbs e; ΔS : entropia.

A interação do ligante com uma proteína pode envolver a formação de pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, dentre outras. Uma forma de avaliar quais destes modos de interação são predominantes em uma reação, é a determinação de parâmetros termodinâmicos, tais como, variação de entropia e de entalpia da reação. O estudo da dependência da constante de ligação com a temperatura, em uma faixa de valores que não afeta a estrutura da NS1 conforme mostrados através de experimentos de CD, permite, através do gráfico de van't Hoff, obter esses valores. O gráfico de van't Hoff relaciona a variação de temperatura com a variação da constante de associação, dado pela diferença de entalpia (ΔH). A linearidade obtida no gráfico $\ln K$ versus $1/T$, Figura 25, e dos valores obtidos para a variação da energia livre de Gibbs, mostrados na Tabela 8, mostram que o processo de interação entre a quercetina e a NS1 é espontâneo ($\Delta G < 0$), endotérmico ($\Delta H > 0$) e entrópico ($\Delta S > 0$), sendo este componente entrópico o responsável pelo processo ser espontâneo. Estes valores dos parâmetros termodinâmicos indicam que a interação entre a Quercetina e a NS1 é dirigida pela entropia, sugerindo que interações eletrostáticas e hidrofóbicas desempenham o papel principal. É provável que com a interação da quercetina com a NS1, houve liberação de água para o sistema, uma vez que houve aumento da entropia deste. O fato da interação apresentar predomínio de processos hidrofóbicos era esperado em virtude das características de hidrofobicidade da quercetina, a qual apresenta coeficiente de partição água/octanol de 1,48.

Os espectros de CD da NS1 (Figura 26) mostram que esta proteína tem a seguinte distribuição de componentes de estruturas secundárias, conforme análise de deconvolução espectral realizada pelo método de Contin (Sreerama & Woody, 2000): alfa-hélice: 75%; folha Beta: <3%; voltas: 10% e outras: 12%. Os espectros de CD obtidos na mesma relação de 2 ligantes por proteína (mesma relação utilizada para as

interações de fluorescência) mostram que não há perdas ou alterações nas componentes de estruturas secundárias na NS1 pela interação com a quercetina. Os dados obtidos a partir da desnaturação térmica da NS1 na faixa de temperaturas compreendidas entre 20°C e 80°C mostram que a NS1 não apresenta variação da elipticidade até a temperatura de 40°C, confirmando que as medidas realizadas na temperatura de 37°C não produziram alteração na estrutura secundária da mesma.

No gráfico de θ_{222} versus temperatura (Figura 27), pode-se verificar a curva de desnaturação térmica da proteína NS1 (preto) e do complexo NS1-Quercetina (vermelho). A partir da figura 27 é possível obter a temperatura de *melting*, ou seja, a temperatura na qual 50% das moléculas da proteína estão na estrutura nativa e 50% com estrutura desnaturada. Verificou-se que a temperatura de *melting* da NS1 é de 338,6K (65,6°C), indicando que esta proteína é termicamente estável. A temperatura de *melting* difere da encontrada por Pretel et al. (2013), o qual apresentou uma T_m de 55°C. Uma possível explicação para esta diferença pode estar no tampão utilizado nos experimentos de Pretel, o qual continha TRIS, um composto que causa alteração no pH da solução quando aquecido. Para a desnaturação térmica da NS1 acrescida de quercetina na razão molar 5:1, obteve-se uma T_m de 329,2K (56,2°C). A interação do ligante com a proteína pode ser responsável por desestabilizar a proteína, ocasionando, assim, a redução da temperatura de *melting* desta quando acrescida de quercetina. Dado que a quercetina desestabiliza a NS1, sugere-se que a quercetina possa, como consequência desta desestabilização, interferir na função desta proteína.

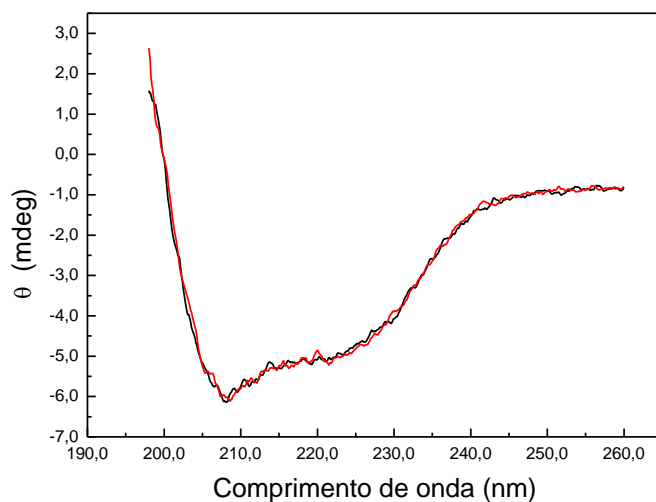


Figura 26. Espectro de dicroísmo circular de NS1 (preto) e da interação NS1-quercetina (vermelho) realizado na razão de 2 ligantes por proteína. A concentração de proteína utilizada para este experimento foi de $16,3\mu\text{M}$ com caminho óptico de $0,5\text{cm}$.

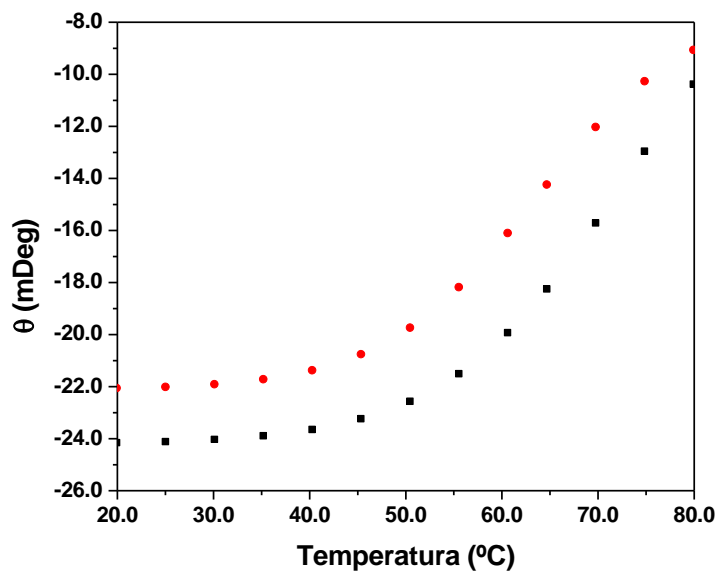


Figura 27. Desnaturação térmica por CD da proteína NS1 (preto) e NS1-Quercetina (vermelho) entre 20°C e 80°C à velocidade de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ com caminho óptico de $0,5\text{cm}$. A concentração da proteína e o tampão utilizados foram, respectivamente, $16,3\mu\text{M}$ e NaCl 100mM , NaH_2PO_4 50mM , $\text{pH}7.4$.

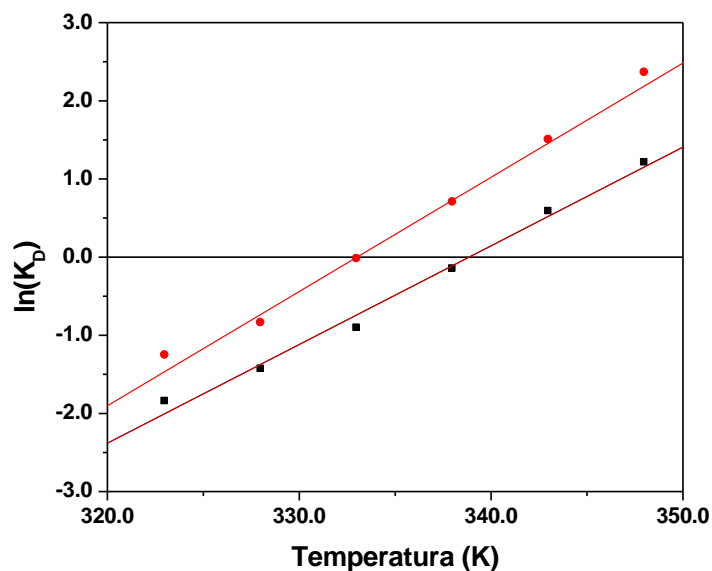


Figura 28. Gráfico de $\ln(K_D)$ versus temperatura. Proteína NS1 (preto) e NS1-Quercetina (vermelho)

Sabe-se que a NS1 está envolvida na subversão do sistema imune, por meio da inibição ou neutralização de várias etapas na via dos interferons do tipo I, bem como, no silenciamento do complexo ribonucleoproteico do hRSV. A NS1 é capaz de diminuir os níveis celulares de IKK ϵ e TRAF3 (SWEEDAN et al., 2009), os quais compõem a cascata do interferon. Além disso, NS1 também interage com muitas proteínas celulares, como descrito por Wu et al. (2012). Considerando-se que a atividade desta proteína torna a replicação do vírus mais eficiente, bloqueando-se sua atividade, mediante a escolha de moléculas com alta afinidade ao sítio de ligação de NS1, pode ser uma boa estratégia para reduzir a replicação do hRSV e, conseqüentemente, a severidade dos sintomas causados por este vírus.

Desta forma, os flavonóides têm estado em foco devido à sua importância nutracêutica e terapêutica, bem como por exibirem várias

atividades antimicrobianas. Assim, a quercetina, o flavonóide mais estudado entre todos, é um ligante em potencial da proteína NS1, uma vez que vários estudos têm demonstrado suas propriedades antivirais.

Em particular neste estudo, demonstrou-se que a quercetina interage com a proteína NS1, apresentando uma interação dinâmica, na qual ocorre aumento da afinidade deste ligante pela proteína NS1 com o aumento da temperatura do sistema. *In vivo*, durante a infecção pelo hRSV é comum o aumento de temperatura nos pacientes e, uma vez que mostrou-se que há uma tendência de aumento do valor da constante de Stern Volmer da interação entre NS1 e quercetina com o aumento da temperatura, reforça-se a hipótese de indicação da quercetina como um composto que pode ser utilizado em estudos específicos como candidato a agente terapêutico anti-hRSV.

Vale ressaltar ainda que este trabalho contribui para o enriquecimento da área de antivirais em virtude da existência de poucos fármacos pertencentes a esta classe e a indicação da quercetina como agente anti-hRSV mostra-se apropriada, visto que há relatos de que esta molécula apresenta atividade redutora da infecção e replicação do Vírus Sincicial Respiratório Humano.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os resultados da espectroscopia de fluorescência sugerem que a interação entre a proteína hRSV-NS1 e quercetina é dinâmica e hidrofóbica. Espera-se que a interação com a quercetina proporcione uma interferência na atividade da proteína e, desta forma, resulte na redução da subversão do sistema imune e, conseqüentemente, na redução da eficiência de replicação viral do hRSV e severidade de seus sintomas. Assim, estes resultados associados aos resultados reportados anteriormente e, principalmente, considerando as propriedades anti-hRSV de quercetina, sua alta absorção, farmacocinética bem caracterizada e a baixa toxicidade deste flavonóide, sugerem que este composto pode ser investigado para os seus usos específicos como candidato a agente terapêutico anti-hRSV. Diante dos dados anteriormente apresentados neste trabalho, foi possível concluir que:

1. A proteína hRSV-NS1 foi expressa utilizando-se a construção BL-21(DE3)-pJexpress401-NS1 sob as condições de 0,5mM de IPTG por 3 horas de indução à 37°C;
2. A proteína NS1, com aproximadamente 16kDa, foi purificada em resina de afinidade His60 Ni Superflow (Clontech®) acoplada a um cromatógrafo líquido ÄKTA (GE Healthcare Life Sciences) utilizando-se tampão com 200mM de imidazol para eluição;

3. A estrutura secundária da NS1, na ausência de quercetina, apresentou a seguinte composição: 75% de alfa-hélice, 3% de folha Beta, 10% de voltas e 12% de outras estruturas. Na presença de quercetina (na razão de dois ligantes por proteína) não houve alteração ou perda de estrutura secundária de NS1. A análise da desnaturação térmica mostrou que a temperatura de *melting* da NS1 é de 65,6°C e que na presença de quercetina (na razão de cinco ligantes por proteína) esta temperatura é deslocada para 56,2°C;

4. A quercetina mostrou-se o melhor flavonóide para interação com a NS1, apresentando uma ligação do tipo dinâmica (aumento de K_{sv} com o aumento da temperatura), com valores de K_{sv} variando entre $4,9-7,5 \times 10^4$, com constante de associação aparente (K_b) entre $8,6 \times 10^5$ e $4,3 \times 10^6$ e 1 sítio de interação entre NS1 e quercetina. A análise termodinâmica mostrou que o processo de interação entre a quercetina e a NS1 é espontâneo ($\Delta G = -8,06$ a $-9,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$), endotérmico ($\Delta H = 23,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$) e entrópico ($\Delta S = 107 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$). Os valores positivos das variações da entalpia e entropia indicam que a interação é dominada por potenciais hidrofóbicos.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS³

AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; TSAI, S. M.; PARK, Y. K. Transformações Enzimáticas de Flavonóides. B.CCEPPA, 25(1): 61-76, 2007.

ALLEWELL, N. M.; NARHI, L. O.; RAYMENT, I. Molecular Biophysics for the Life Sciences. Springer, 2013

ALMEIDA, J. R. G. S., LIMA, J. T., NUNES, X. P., CERQUEIRA, G. S., FIGUEIREDO, C. S. Flavonóides da dieta e sua importância para a saúde humana. Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança. , v.2, p.65 - 76, 2004.

BACHMETOV, L.; GAL-TANAMY, M.; SHAPIRA, A.; VOROBAYCHIK, M.; GITERMAN-GALAM, T.; SATHIYAMOORTHY, P.; GOLAN-GOLDHIRSH, A.; BENHAR, I.; TUR-KASP, R.; ZEMEL R. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. Journal of Viral Hepatitis, 19, e81–e88, 2012.

BATONICK, M.; OOMENS, A. G. P.; WERTZ, G. W. Human Respiratory Syncytial Virus glycoproteins are not required for apical targeting and release from polarized epithelial cells. Journal of Virology, v. 82, n. 17, p.

³ Referências segundo normas da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT), NBR 6023 de 2002.

8664-8672, 2008.

BHARAJ, P.; SULLENDER, W. M.; KABRA, S. K. et al. Respiratory viral infection detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infection seen at an urban hospital in Dehi from 2005 to 2007. *Virology Journal*, v. 06, n.89, 2009.

BEHLING, e. b.; SENDÃO, m. c.; FRANCESCATO, h. d. c.; ANTUNES, I. m. g.; BIANCHI, m. I. p. FLAVONÓIDE QUERCETINA: ASPECTOS GERAIS E AÇÕES BIOLÓGICAS. *Alim. Nutr.*, 5(3): 285-292, 2004.

BI, S.; DING, L.; TIAN, Y.; SONG, D.; ZHOU, X.; LIU, X.; ZHANG, H. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin . *Journal of Molecular Structure*, 703: 37-45, 2004.

BORISSEVITCH, I. E. More about the inner effect: corrections of Stern-Volmer fluorescence quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher. *Journal of Luminescence*, 81: 219-2244, 1999.

BOTOSO, V. F.; ZANOTTO, P. M. A.; UEDA, M. et al. Positive selection results in frequent reversible aminoacid replacements in the G protein gene on Human Respiratory Syncytial Virus. *PLoS Pathogens*, v. 05, n. 01, 2009.

BOYAPALLE, S.; WONG, T.; GARAY, J.; TENG, M.; JUAN-VERGARA, H. S.; MOHAPATRA, M. Respiratory Syncytial Virus NS1 Protein Colocalizes with Mitochondrial Antiviral Signaling Protein MAVS following Infection. *PlosOne*, 7(2): e29386, 2012

BRAHMS, S.; BRAHMS, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol*, v.138 (2), p.149–178, 1980.

CAMPBELL, I.D., DWEK, R.A. *Biological spectroscopy*, Benjamin, Cummings Publishing Company, California, 1984.

CHOI, H. J.; KIM, J. H.; LEE, C. H., AHN, Y. J.; SONG, J. H.; BAEK, S. H.; KWON, D. H. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Research* 81: 77–81, 2009.

COLLINS, P. L.; CROWE JR, J. E. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1601-1646.

CREIGHTON, T. E. *Protein structure: a practical approach*, IRL Press, New York, 1990.

CREIGHTON, T. E. *Proteins: structure and molecular properties*, W. H.

Freeman and Company, 2nd, New York, 1993.

ELLIOTT, J.; LYNCH, O. T.; SUESSMUTH, Y.; BOYD, C. R.; BURROWS, J. F.; BUICCK, R.; STEVENSON, N. J.; TOUZELET, O.; GADINA, G.; POWER, U. F.; JOHNSTON, J. A. Respiratory Syncytial Virus NS1 Protein Degrades STAT2 by Using the Elongin-Cullin E3 Ligase. *Journal of Virology*, 81(7) 3428–3436, 2007.

Fasman, G. D, *Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, Plenum Press, New York, 1996.

GAN, S. W.; NG, L.; LIN, X. et al. Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain. *Protein Science*, v. 17, p. 813-829, 2008.

GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., BAIROCH A.; *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press (2005). pp. 571-607

GIAS, E.; NIELSEN, S. U.; MORGAN L. A. F. et al Purification of human respiratory syncytial virus by ultracentrifugation in iodixanol density gradient. *Journal of Virological Methods*, v. 147, n. 2, p. 328-332, 2008.

GONZALEZ, O.; FONTANES, V.; RAYCHAUDHURI, S.; LOO, R.; LOO, J.; ARUMUGASWAMI, V.; SUN, R.; DASGUPTA, A.; FRENCH, S. W. The Heat Shock Protein Inhibitor Quercetin Attenuates Hepatitis C Virus Production *Hepatology*, 50 (n. 6): 1756-1764, 2009.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G.D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, v.8 (10), p.4108-4116, 1969.

GUTZEIT, H. O.; HENKER, Y.; KIND, B.; FRANZ, A. Specific interactions of quercetin and other flavonoids with target proteins are revealed by elicited fluorescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318: 490–495, 2004.

HACKING, D.; HULL, J. Respiratory Syncytial Virus – Viral Biology and the Host Response. *Journal of infection*, v. 45, p. 18-24, 2002.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G.W.; WILLIAMS, G.M.; LINES, T.C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 2179–2205, 2007.

JOHNSON, W. C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins*, v.35 (3), p.307–312, 1999.

KANAKIS, C. D.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M. G.; DIAMANTOGLU, S.; TAJMIR-RIahi, H. A. Antioxidant flavonoids bind human serum albumin. *Journal of Molecular Structure* 798: 69–74, 2006.

KAUL, T. N.; MIDDLETON JR, E.; OGRA, P. L. Antiviral Effect of Flavonoids on Human Viruses. *Journal of Medical Virology*, 15:71-79, 1985.

KOTELKIN, A.; BELYAKOV, I. M.; YANG, L. et al. The NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response. *Journal of Virology*, v. 80, n. 12, p. 5958-5967, 2006.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, 2nd ed., 1999.

LEES, J. G.; MILES, A. J.; WIEN, F.; WALLACE, B. A. A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. *Bioinformatics*, v.22 (16), p.1955–1962, 2006.

LING, Z.; TRAN, K. C.; ARNOLD, J. J. et al Purification and characterization of recombinant human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS1. *Protein Expression and Purification*, v. 57, p.261-270, 2008.

LING, Z.; TRAN, K. C.; TENG, M. N. Human Respiratory Syncytial Virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *Journal of Virology*, v. 83, n. 08, p. 3734-3742, 2009.

LIU C.; DAY, N. D.; BRANIGAN, P. et al. Relationship between the loss of neutralizing antibody binding and fusion activity of the F protein of human respiratory syncytial virus. *Virology Journal*, v. 4, n. 71, 2007.

LO, M. S.; BRAZAS, R. M.; HOLTZMAN, M. J. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta infeteron responsiveness. *Journal of Virology*, v. 79, n. 14, p. 9315-9319, 2005.

LOHMAN, T.M. Determination of Equilibrium Binding Isotherms for Protein-DNA Interactions: Spectroscopic Approaches to Monitor Binding, by Timothy M. Lohman and Wlodzimierz Bujalowski, 1991.

MARKETON, J. W.; CORRY, J.; TENG M. N. The respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural proteins mediate RSV suppression of glucocorticoid receptor transactivation. *Virology*, 449: 62–69, 2014

MARINHEIRO, J. C.; SANALIOS, R. B.; SANTOS, D. C. et al. Duplex-PCR assay for the detection of adenovirus and respiratory syncytial virus

nasopharyngeal samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p 118-120, 2009.

MARTÍNEZ, I.; LOMBARDÍA, L.; GARCÍA-BARRENO, B. et al. Distinct gene subsets are induced at different time points after human respiratory syncytial virus infection of A549 cells. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 570-581, 2007.

MORRIS, S. K.; DZOLGANOVSKI, B.; BEYENE, J. et al. A meta-analysis of the effect of antibody therapy for the prevention of severe respiratory syncytial virus infection. *BMC Infectious Diseases*, v. 09 n. 106, 2009.

MUNIR, S.; LE NOUEN, C.; LUONGO, C.; BUCHHOLZ, U. J.; COLLINS, P. L.; BUKREYEV, A. Nonstructural Proteins 1 and 2 of Respiratory Syncytial Virus Suppress Maturation of Human Dendritic Cells. *Journal of Virology*, 82(17): 8780–8796, 2008.

NAKAMURA, M.; ITOKAZU, K.; TAIRA, K. et al. Genotypic and phylogenetic of the G gene of respiratory syncytial virus isolates in Okinawa, Japan, 2008. *Japan Journal of Infectious Diseases*, v. 62, p. 326-327, 2009.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K; VAN LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*,

74: 418–25, 2001.

OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. *Pediatr Respir Rev.*, v. 5 Suppl A: S119-26, 2004.

OLSZEWSKA, W.; OPENSHAW, P. Emerging drugs for respiratory syncytial virus infection. *Expert Opin Emerg Drugs*, v. 14, n. 2, p.207-217, 2009.

Openshaw, P. J. M.; Tregoning J. S. Immune Responses and Disease Enhancement during Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18(3):541-555, 2005

OTHUNPANGAT, S.; GIBSON, L. F.; SANSELL, et al. L. NGF is essential survival factor for bronchial epithelial cells during respiratory syncytial virus infection. *PLoS ONE*, v. 04, n. 07, 2009.

ÖZÇELİK, B.; ORHAN, I.; TOKER, G. Antiviral and Antimicrobial Assessment of Some Selected Flavonoids. *Z. Naturforsch*, 61c: 632-638, 2006.

PATEL, J. M. A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids. *Lethbridge Undergraduate Research Journal*. 2008. Volume 3 Number 2. Disponível em: <http://lurj.org/article.php/vol3n2/flavonoids.xml>. Acesso em: 23.01.2014

PAVLOVA, S.; HADZHILOVA, T.; ABADJIEVA, P. et al. Application of RT-PCR for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infection in Bulgaria, 2006-7 and 2007-8. *Eurosurveillance*, v. 14, n. 23, 2009.

POHJALA, L.; TAMMELA, P. Aggregating Behavior of Phenolic Compounds — A Source of False Bioassay Results?. *Molecules*, 17, 10774-10790, 2012.

PRETEL E, CAMPOREALE G, DE PRAT-GAY G. et al. The Non-Structural NS1 Protein Unique to Respiratory Syncytial Virus: A Two-State Folding Monomer in Quasi-Equilibrium with a Stable Spherical Oligomer. *PLoS ONE* 8(9): e74338, (2013)

RASOULZADEH, F.; JABARY, H. N.; NASERI, A.; RASHIDI, M. R. Fluorescence quenching study of quercetin interaction with bovine milk xanthine oxidase. *Spectrochimica Acta Part A*, 72: 190–193, 2009.

REN, J.; LIU, T.; PANG, L.; LI, K.; GAROFALO, R. P.; CASOLA, A. BAO, X. A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein Junping. *Journal of General Virology*, 92: 2153–2159, 2011

RICCETTO, A. G. L.; SILVA, L. H. A.; SPILKI, F. R. et al. Genotypes and

clinical data of respiratory syncytial virus and metapneumovirus in brazilian infants: A new perspective. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 13, n. 1, p 35-39, 2009.

ROLINSKI, O. J.; MARTIN, A.; BIRCH, D. J. S. Human serum albumin and quercetin interactions monitored by time-resolved fluorescence: evidence for enhanced discrete rotamer conformations. *Journal of Biomedical Optics* 12(3): 034013-1-7, 2007.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability? *American Chemical Society*, 20(11): 3096-3192, 1981.

SASTRE, P.; OOMENS, A. G. P.; WERTZ, G. W. The Stability of human respiratory syncytial virus is enhanced by incorporation of the baculovirus GP64 protein. *Vaccine*, v. 25, n.27, p. 5025-5033, 2007.

SEMPLE, M. G.; DANKERT, H. M.; EBRAHIMI, B. et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infants is associated with reduced airway interferon gamma and substance P. *PLoS ONE*, n. 10, 2007.

SENGUPTA, B.; SENGUPTA, P. The interaction of quercetin with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299: 400–403, 2002.

SIMAS, P. V. M.; GARDINASSI, L. G. A.; NOGUEIRA, F. C.; BONFIM, C. M.; GOMES, D. E.; LACERDA, M. N.; DURIGON, E. L.; RAHAL, P.; SOUZA, F. P. Analysis of climatic factors impact on RSV infection distribution in children attending childcare at northwest region of São Paulo, Brazil. *Virus Reviews and Research*, 23-28, 2012.

SPANN, K. M.; TRAN, K. C.; CHI, B. et al. Suppression of the induction of alpha, beta, and gamma interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in epithelial cells and macrophages. *Journal of Virology*, v. 78, n. 08, p. 4363-4369, 2004.

SPANN, K. M.; TRAN, K. C.; COLLINS, P. L. Effects of proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF- κ B, and proinflammatory cytokines. *Journal of Virology*, v. 79, n. 09, p. 5353-5362, 2005.

SREERAMA, N.; WODDY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry*, 287 (2): 252–260, 2000.

STRAUB, C. P.; LAU, W-H.; PRESTON, F. M.; HEADLAM, M. J.; GORMAN, J. J.; COLLINS, P. L.; SPANN, K. M. Mutation of the elongin C binding domain of human respiratory syncytial virus non-structural protein 1 (NS1) results in degradation of NS1 and attenuation of the virus.

Virology Journal, 8:252, 2011.

SWEDAN, S.; MUSIYENKO, A.; BARIK, S. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease multiple members of the cellular interferon pathways. *Journal of Virology*, 85(19): 10090–10100, 2009.

SWEDAN, S.; ANDREWS, J.; MAJUMDAR, T.; MUSIYENKO, A.; BARIK, S. Multiple Functional Domains and Complexes of the Two Nonstructural Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus Contribute to Interferon Suppression and Cellular Location. *Journal of Virology*, 85(19): 10090–10100, 2011.

TAN, Y.; PENG, D.; CHEN, C.; Qin, X. Nonstructural protein-1 of respiratory syncytial virus regulates HOX gene expression through interacting with histone. *Mol Biol Rep*, 40: 675–679, 2013.

TENG, Y.; ZHANG, H.; LIU, R. Molecular interaction between 4-inoantipyrine and catalase reveals a potentially toxic mechanism of the drug. *Mol. BioSyst.*, 7: 3157–3163, 2011.

THOMAZELLI, L. M.; VIEIRA, S.; LEAL, A. L. et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *Jornal de Pediatria*. v. 83, n.05, p. 422-428, 2007.

THORNBURG, N. J.; HAYWARD, S. L.; CROWE JR., J. E. Respiratory syncytial virus regulates human microRNAs by using mechanisms involving beta interferon and NF- κ B. *mBio* 3(6):e00220-12, 2012.

TIM T. P.; LAMB; A. J. Antimicrobial activity of flavonoides. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005. 26, p-343-356.

TREMAGLIO, C. Z.; NOTON, S. L.; DEFLUBÉL. R.; FEARNES R. Respiratory Syncytial Virus Polymerase Can Initiate Transcription from Position 3 of the Leader Promoter. *J. Virol.*, 87(6): 3196-3207, 2013.

VAZ-DE-LIMA, L. R. A.; SOUZA, M. C. O.; MATSUMOTO, T. K. et al. Performance of indirect immunofluorescence assay, immunochromatography assay and Reverse transcription – polymerase chain reaction for detecting human respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 05, p. 463-467, 2008.

WANG, G.; WANG, L.; TANG, W.; HAO, X.; WANG, Y.; LU, Y. Binding of Quercetin to Lysozyme as Probed by Spectroscopic Analysis and Molecular Simulation. *J Fluoresc*, 21: 1879–1886, 2011.

WELCH, M.; VILLALOBOS, A.; GUSTAFSSON, C.; MINSHULL, J. You're one in a googol: Optimizing genes for protein expression. *J R Soc Interface*, 6:S467-76, 2009.

WU, W., TRAN KC, TENG, MN et al. The Interactome of the human respiratory syncytial Virus NS1 Protein Highlights Multiple Effects on host Cell Biology. *Journal of Virology*, 2012, 86, p.7777-7789.

ZANDI, K.; TEOH, B. T.; SAM, S. S.; WONG, P. F.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology Journal*, 8:560, 2011.

ZHANG, Y.; JAMALUDDIN, M.; WANG, S.; TIAN, B.; GAROFALO, R. P.; CASOLA, A.; BRASIER, A. Ribavirin Treatment Up-Regulates Antiviral Gene Expression via the Interferon-Stimulated Response Element in Respiratory Syncytial Virus-Infected Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 77(10): 5933–5947, 2003.

ZHANG, W.; YANG, H.; KONG, X.; MOHAPATRA, S.; JUAN-VERGARA, H. S.; HELLERMANN, G.; BEHERA, S.; SINGAM, R.; LOCKEY, R.; MOHAPATRA, S. S. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nature Medicine*, 11: 56-62, 2005.

ZLATEVA, K. T.; VIJGEN, L.; DEKEERSMAEKER, N. et al. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n.09, p. 3022-3030, 2007.

ZSILA, F.; BIKÁDI, Z.; SIMONYI, M. Probing the binding of flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods. *Biochemical Pharmacology*, 65: 447-456, 2003.

7. ANEXOS

7 - ANEXOS

Anexo 01: Protocolo de transformação

Adicionou-se 2 μ L do plasmídeo pJexpress401-NS1 ao tubo com células *Escherichia coli* linhagem BL21(DE3) quimicamente competentes. Incubou-se em gelo por 30 minutos. Em seguida, procedeu-se o choque térmico por 1 minuto e 30 segundos a 42°C. Imediatamente os tubos foram transferidos para o gelo e incubados por 2 minutos. Adicionou-se 300 μ L de meio S.O.C. (Invitrogen®) à temperatura ambiente. Incubou-se horizontalmente no *shaker* por uma hora a 37°C. Colocou-se em gelo e plaqueou-se 50 μ L da transformação em placas pré-aquecidas (placas de LB contendo 25 μ g/mL de kanamicina). As placas foram incubadas *overnight* a 37°C.

Anexo 02: Protocolo de purificação de plasmídios com QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen®)

Os inóculos foram centrifugados por 20 minutos a 5.000rpm. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 250 μ L de tampão P1 (Buffer P1), transferindo-o para um tubo 1,5mL. Adicionou-se 250 μ L de tampão de tampão P2 (Buffer P2) invertendo o tubo 4-6 vezes. Adicionou-se, então, 350 μ L de tampão de tampão N3 (Buffer N3) e homogeneizou-se imediatamente invertendo o tubo 4-6 vezes. Centrifugou-se por 10 minutos a 13.000rpm. O sobrenadante foi transferido para uma nova coluna. Centrifugou-se por 30-60 segundos e descartou-se o filtrado. A coluna foi lavada com adição de 0,5mL de tampão PB (Buffer PB) e centrifugada por 30-60 segundos, descartando-se o sobrenadante. A coluna foi lavada novamente com adição de 0,5mL de tampão PE (Buffer PE) e centrifugada por 30-60 segundos. Descartou-se o sobrenadante e fez-se uma centrifugação adicional de 30-60 segundos para remover o tampão de lavagem residual. A coluna foi transferida para um tubo 1,5mL estéril, adicionar 30-50 μ L de tampão de eluição EB (Buffer EB) ou água ao centro da coluna, incubando-se por 1 minuto e centrifugando-se por 1 minuto.

Anexo 03: Sequenciamento do gene NS1

>Sequência nucleotídica do gene NS1

```
ATGGGTAGCAATTCTTTGAGCATGATTAAGGTACGTCTGCAAAATCTGTTTGATA
ACGACGAAGTTGCTCTGTTGAAAATCACGTGCTACACGGACAACTGATTCACCT
GACGAACGCCTTGGCGAAGGCGGTGATCCACACTATCAAGCTGAATGGTATTGTC
TTTGTGCACGTCATCACCAGCTCCGACATCTGCCCGAACAATAACATTGTTGTTA
AAAGCAATTTACCACCATGCCAGCACTGCAAAACGGCGGCTACATTTGGGAGAT
GATGGAGCTGACCCATTGTAGCCAGCCGAACGGTCTGATTGACGATAACTGTGAA
ATCAAATTCAGCAAAAAGCTGTCGGATAGCACCATGACCAACTATATGAATCAGC
TGAGCGAGCTGCTGGGTTTCGATCTGAATCCGCATCATCATCACCACCACTAA
```

>Sequência de aminoácidos da proteína NS1

```
MGSNSLSMIKVRLQNLFDNDEVALLKITCYTDKLIHLTNALAKAVIHTIKLNGIV
FVHVITSSDICPNNNIVVKSNTTTPALQNGGYIWEMMELTHCSQPNGLIDDNCE
IKFSKKLSDSTMTNYMNQLSELLGFDLNPHHHHH*
```

Anexo 04: Meio Sólido LB pH=7,0 (p/ cultivo bacteriano)

Reagentes	100mL	1000mL
Triptona	1g	10g
NaCl	1g	10g
Extrato de Levedo	0,5g	5g
Agar	1,5g	15g
Água Milli-Q q.s.p.	100mL	1000mL

Meio líquido:

- Diluir todos os ingredientes;
- Acertar volume e pH e autoclavar.

Anexo 05: Protocolo de dessalinização utilizando as colunas PD-10 Desalting Columns - GE®

Após a remoção do tampão de armazenamento, equilibrou-se a resina com 25mL do tampão 300mM de NaCl; 50mM de Na₂HPO₄ (cinco passagens). Adicionou-se 2,5mL proteína purificada com 500mM de imidazol, e coletou-se o *flow through*. Em seguida, adicionou-se 3,5mL de tampão 300mM de NaCl; 50mM de Na₂HPO₄ (ou outro dependendo do experimento a ser realizado) e coletou-se a proteína dessalinizada