

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/03/2022.



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

Jéssica Maróstica de Sá

Estudo biofísico da interação do domínio N terminal da nucleoproteína do vírus sincicial respiratório humano com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e ressonância magnética nuclear

São José do Rio Preto
2020

Jéssica Maróstica de Sá

Estudo biofísico da interação do domínio N terminal da nucleoproteína do vírus sincicial respiratório humano com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e ressonância magnética nuclear

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

Financiadora: CAPES BR: Código: 001
FAPESP: 2019/04646-9
CNPq: 439306/2018-3

Orientador: Dr^o Ícaro Putinhon Caruso
Coorientadora: Prof^a Dr^a Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto
2020

S111e

Sá, Jéssica Maróstica de

Estudo biofísico da interação do domínio N terminal da nucleoproteína do vírus sincicial respiratório humano com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e ressonância magnética nuclear / Jéssica Maróstica de Sá. -- São José do Rio Preto, 2020
64 p. : il. + 1 CD-ROM

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

Orientador: Dr. Ícaro Putinhon Caruso

Coorientadora: Prof^ª Dr^a Fátima Pereira de Souza

1. Biologia Molecular. 2. Agentes antivirais. 3. Flavonoids. 4. Vírus Sincicial Respiratório Humano.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Jéssica Maróstica de Sá

Estudo biofísico da interação do domínio N terminal da nucleoproteína do vírus sincicial respiratório humano com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e ressonância magnética nuclear

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

Financiadora: CAPES BR: Código: 001
FAPESP: 2019/04646-9
CNPq: 439306/2018-3

Comissão Examinadora

Drº. Ícaro Putinhon Caruso
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto-SP
Orientador

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araújo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto-SP

Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas
UEM- Universidade Estadual de Maringá-PR

São José do Rio Preto
05 de março de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, as minhas irmãs Sibeli Martins Maróstica e Lizandra Maróstica de Sá, ao meu irmão Daniel Maróstica Marim por todo apoio prestado durante meu mestrado e especialmente a minha mãe Gesebel Maróstica de Sá pelo respaldo emocional e financeiro.

Agradeço ao meu companheiro João Victor da Silva Sereni pela dedicação, compreensão de todos os dias e por sempre me apoiar nas minhas decisões.

Minha gratidão à equipe do Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) da UNESP de São José do Rio Preto- SP, pela infraestrutura oferecida para desenvolvimento do meu estudo, á todos os amigos e professores de laboratório.

Agradeço imensamente ao meu orientador Dr. Ícaro Putinhon Caruso, por me aceitar, acreditar em mim e, de maneira acolhedora, me ensinar sobre o mundo da pesquisa científica, respeitando meu conhecimento, meu querer e meus objetivos.

Meus agradecimentos a minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Fátima Pereira de Souza por me receber como membro de sua equipe e pelos ensinamentos prestados a mim.

Ressalto também meu agradecimento à banca examinadora da qualificação: Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey, Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez e Dr. Ícaro Putinhon Caruso.

Sou imensamente grata à banca examinadora da defesa: Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas, Prof. Dr. Alexandre Araújo Suman e Dr. Ícaro Putinhon Caruso.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001, pelo financiamento da minha bolsa de estudos. Agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo), processo: 2019/04646-9 e a CNPq: 439306/2018-3 pelo apoio financeiro na compra dos materiais e equipamentos necessários para realização do estudo.

Resumo

O Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) é um dos principais causadores de doenças respiratórias agudas como bronquiolite e pneumonia em crianças e idosos. Atualmente, as patologias causadas pelo hRSV não são bem entendidas e os resultados de desenvolvimento de vacinas não são satisfatórios. Dentre as proteínas codificadas por esse vírus, a nucleoproteína N é importante na proteção do RNA viral formando o nucleocapsídeo (NC) e por sua atuação como molde para a replicação e transcrição pelo complexo da polimerase viral. O reconhecimento eficiente e específico do NC pela polimerase é mediado pela fosfoproteína P. Isso deve-se à interação de resíduos do C-terminal da proteína P em um bolso hidrofóbico no domínio N-terminal da proteína N (N-NTD). O presente estudo consiste em uma caracterização biofísica da proteína recombinante N-NTD e uma investigação da ligação de flavonoides ao bolso hidrofóbico no N-NTD utilizando abordagens experimentais e computacionais. Os espectros de dicroísmo circular (CD) mostraram que o N-NTD é composto majoritariamente de estruturas em α -hélice e seu processo de desenovelamento térmico é caracterizado por uma temperatura de *melting* (T_m) de $44,2 \pm 0,3$ °C e variação de entalpia de van't Hoff de desnaturação (ΔH_{vH}^D) de 620 ± 52 kJ·mol⁻¹. Os resultados de calorimetria de varredura diferencial para a temperatura de desenovelamento estão de acordo com os dados de CD, indicando uma T_m de $43,16 \pm 0,05$ °C. A variação de entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}^D) de $213,9 \pm 0,6$ kJ·mol⁻¹ calculada para a desnaturação térmica do N-NTD indica que o processo não é reversível e há a formação de agregados, uma vez que $\Delta H_{cal}^D < \Delta H_{vH}^D$. Os experimentos de diferença de transferência de saturação por ressonância magnética nuclear (STD-RMN) indicaram uma ligação específica e seletiva da hesperetina ao N-NTD visto que outros flavonoides testados não apresentaram interação com o domínio. O mapeamento dos epítomos de ligação da hesperetina sugere que seu anel benzeno conjugado com o anel heterocíclico encontra-se mais interiorizado no sítio de ligação do domínio N-NTD. Os experimentos de deslocamento via STD-RMN do dipeptídeo C-terminal (Asp-Phe) da proteína P pela hesperetina sugerem que esse flavonoide liga-se ao bolso hidrofóbico da proteína N. Os experimentos de competição por anisotropia de fluorescência corroboram com os dados de deslocamento via STD-RMN e também indicam que a hesperetina compete pelo bolso hidrofóbico no N-NTD. Os dados de simulação computacional sugerem um modo de ligação compatível com as análises experimentais, mostrando que a hesperetina interage no bolso hidrofóbico do N-NTD, com uma orientação semelhante a ligação do dipeptídeo. Em conclusão, os resultados sugerem que a hesperetina liga-se ao bolso hidrofóbico no sítio de interação nucleoproteína/fosfoproteína do hRSV,

caracterizando esse composto polifenólico como um potencial candidato à ação antiviral que inibiria o processo de replicação viral, o que poderia proporcionar o desenvolvimento de uma nova estratégia de combate ao vírus.

Palavras chaves: nucleoproteína, hRSV; hesperetina; interação proteína-flavonoide; RMN.

Abstract

Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is a major cause of acute respiratory diseases such as bronchiolitis and pneumonia in children and the elderly. Currently, the pathologies caused by hRSV are not well understood and results on vaccine development are not satisfactory. Among the proteins encoded by this virus, nucleoprotein N is important in protecting viral RNA forming the nucleocapsid (NC) and for its role as a template for replication and transcription by the viral polymerase complex. The efficient and specific recognition of NC by polymerase is mediated by phosphoprotein P. This is due to the interaction of residues of the C-terminal of protein P in a hydrophobic pocket in the N-terminal domain of protein N (N-NTD). The present study consists of a biophysical characterization of the recombinant protein N-NTD and an investigation of the binding of flavonoids to the hydrophobic pocket in N-NTD using different experimental and computational approaches. The CD spectra revealed that N-NTD is composed mostly of α -helix structures and its thermal unfolding process is characterized by a melting temperature (T_m) at 44.2 ± 0.3 °C and unfolding van't Hoff enthalpy change (ΔH_{vH}^D) of 620 ± 52 kJ·mol⁻¹. The results of differential scanning calorimetry for the unveiling temperature are in accordance with the CD data, indicating a T_m of 43.16 ± 0.05 °C; however, the ΔH_{vH}^D of 495 ± 5 kJ·mol⁻¹ presented a discrepancy with respect to that determined by circular dichroism. A calorimetry enthalpy change (ΔH_{cal}^D) of 213.9 ± 0.6 kJ·mol⁻¹ was calculated for the thermal denaturation of the N-NTD, indicating that the process is not reversible and there is the formation of aggregates since $\Delta H_{cal}^D < \Delta H_{vH}^D$. The nuclear magnetic resonance saturation transfer difference experiments (STD-NMR) indicated a specific and selective binding of hesperetin to N-NTD since other flavonoids were tested and these didn't present interaction with the protein. The epitope mapping of hesperetin suggests that its benzene ring conjugated with the heterocyclic ring is most buried in the binding site of N-NTD. The displacement experiments via STD-NMR of the C-terminal dipeptide (Asp-Phe) of protein P by hesperetin suggest that this flavonoid binds to the hydrophobic pocket of protein N. The competition experiments for fluorescence anisotropy corroborate with data from displacement via STD-NMR and also indicate that hesperetin competes for the hydrophobic pocket in N-NTD. The computer simulation data suggest a connection mode compatible with the experimental analyzes, showing that hesperetin interacts in the hydrophobic pocket of the N-NTD, with an orientation similar to the dipeptide binding. In conclusion, the results suggest that hesperetin binds to the hydrophobic pocket at the nucleoprotein /phosphoprotein interaction site of hRSV, characterizing this polyphenolic

compound as a potential candidate for antiviral action that would inhibit the viral replication process, which could provide the development of a new strategy to fight the virus.

Keyword: nucleoprotein; hRSV; hesperetin; protein-flavonoid interaction; NMR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** (A) Organização genômica do hRSV, demonstrando a sequência dos genes responsáveis pela codificação das proteínas virais. (B) Modelo representativo do hRSV (COLLINS & CROWE JR, 2007)..... 16
- Figura 2-** (A) Tomografia do nucleocapsídeo (NC) do hRSV. Uma seção central através de um tomograma de uma estrutura de ribonucleoproteína do tipo NC do hRSV revela a presença de anéis e hélices curtas. (B) Reconstrução tridimensional de 26 Å de resolução calculada a partir de imagens criogênicas. A hélice contém 9,8 unidades de proteína N por volta e tem um passo de 69 Å. Uma subunidade proteica é destacada, colorida por domínios, enquanto as outras estão em cinza, em representação de superfície. Um complexo anelar de ribonucleoproteína decamérica. Uma subunidade N é colorida de acordo com os domínios: amarelo e vermelho indicam N-NTD e N-CTD, respectivamente, e os braços N e C são azuis. O RNA é mostrado em ciano. (C) Visão abaixo do eixo do anel. A polaridade do RNA é indicada dentro do anel. (D) Vista lateral (TAWAR et al., 2009)..... 17
- Figura 3-** (A) Localização na superfície do monômero da proteína N os resíduos identificados como sendo críticos para a síntese de RNA e envolvidos na interação com a proteína P. Os resíduos são coloridos de acordo com suas propriedades bioquímicas (azul, resíduos básicos; vermelho, resíduos hidrofóbicos; resíduos magenta, neutros). (B) Vista lateral do nucleocapsídeo helicoidal modelado a partir do anel usando um espaçamento de 70 Å de acordo com os dados relatados anteriormente por Tawar et al. (2009). Domínios estruturais são coloridos; isto é, o N-CTD e o N-NTD estão em vermelho e amarelo, respectivamente, e o braço C e o braço N estão em azul claro. Resíduos críticos para a interação com o P-CTD são mostrados em roxo, e o RNA é mostrado em preto. A barra indica 100 Å. Detalhes do bolso de ligação do P-CTD (dipeptídeo Asp-Phe) (C) e o *scaffold* BPdC (D) no N-NTD. O N-NTD está representado em *cartoon*, com estruturas secundárias nomeadas. Resíduos envolvidos na ligação por meio de interações eletrostáticas (linhas tracejadas) ou forças de van der Waals são mostradas na representação do bastão e coloridas pelo tipo de átomo. O peptídeo e o *scaffold* BPdC é representado como *sticks*. O inserto em (D) mostra o alinhamento do peptídeo com o *scaffold* BPdC..... 19
- Figura 4-** Estrutura molecular base dos flavonoides..... 21
- Figura 5-** Espectros de referência de estruturas secundárias de proteínas. As linhas vermelha, azul e verde representam espectros compostos majoritariamente de estruturas alfa hélice, estrutura beta e *random coil*, respectivamente..... 22
- Figura 6-** (A) Esquema de dados brutos de um termograma de proteína. (B) Espectro de DSC de proteína mostrando o processo endotérmico na fase pré- desnaturação, a transição (pico) e na fase pós- desnaturação, o processo tornando- se exotérmico, mostrando um declínio no termograma decorrente da agregação da amostra..... 25
- Figura 7-** Exemplo esquemático de um experimento de diferença de transferência de saturação por ressonância magnética nuclear (STD-RMN). A troca entre o ligante livre e ligado permite a transferência de magnetização intermolecular da proteína para a molécula pequena..... 27
- Figura 8-** Efeitos da excitação polarizada e difusão rotacional em emissão de anisotropia. As setas verdes representam os fluoróforos fotoselecionados por uma luz polarizada. As setas vermelhas representam os fluoróforos em orientação aleatória de uma solução isotrópica, por exemplo. O círculo com setas vermelhas, no canto direito inferior da figura, evidencia as orientações paralela ($I^{\parallel}$) e perpendicular que a luz polarizada pode assumir..... 29

Figura 9- Combinações dos termos de funções *scoring* ponderadas utilizadas no programa AutoDock Vina. Interações estéricas em preto, interações estéricas e hidrofóbicas em vermelho, e interações estéricas e pontes de hidrogênio em laranja, as quais foram ponderadas com os fatores apresentados no texto..... 33

Figura 10- (A) Teste de expressão e solubilidade da proteína N-NTD do hRSV- SDS-PAGE 15% corado com Coomassie *brilhant blue* R (Sigma Aldrich). M: marcador de peso molecular; 1: amostra antes da indução para o clone I; 2: amostra depois da indução para o clone I; 3: sobrenadante para o clone I; 4: pelete para o clone I; 5: amostra antes da indução para o clone II; 6: amostra depois da indução para o clone II; 7: sobrenadante para o clone II; 8: pelete para o clone II. (B) Etapas da purificação da proteína N-NTD do hRSV por cromatografia de afinidade com resina de Ni-NTA- SDS-PAGE 15% corado com Coomassie *brilhant blue* R (Sigma Aldrich) . M: marcador de peso molecular; 1: eluição com 60 mM de imidazol; 2: eluição com 80 mM de imidazol; 3: eluição com 150 mM de imidazol; 4: eluição com 250 mM de imidazol; 5: eluição com 500 mM de imidazol; 6: eluição com 1 M de imidazol. A caixa vermelha indica a massa molecular correspondente à proteína N-NTD (26kDa)..... 41

Figura 11- (A) Cromatograma correspondente ao processo de purificação por exclusão molecular. O pico representado próximo de 17 ml corresponde a eluição da proteína N-NTD (w26.0 kDa). (B) Membrana de nitrocelulose de *western blot* revelando a proteína N-NTD. A caixa em vermelho indica a proteína N-NDT com tamanho molecular de aproximadamente 26 kDa..... 42

Figura 12- Espectro de CD-UV *far* do domínio N-NTD do hRSV (3,0 μ M, círculos pretos não preenchidos) a 25 °C (298 K) e em solução tampão de 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6,5) contendo NaCl 150 mM, 1,0 mM DTT (dithiothreitol) e 0,5 mM EDTA. A linha vermelha representa o melhor resultado para a curva ajustada realizada pelo programa CONTINLL. A caixa a esquerda representa a porcentagem de cada tipo de estrutura secundária encontradas no N- NTD, sendo 38% de estruturas alfa hélice, 15% de estruturas beta, 18% de estruturas *randoim coil* e 29% de *turns*..... 43

Figura 13- (A) Espectros CD-UV *far* característicos da proteína N-NTD; a linha preta indica a proteína a 25 °C; a linha vermelha mostra o N-NTD depois do processo de desenovelamento a 80 °C e a linha verde caracteriza a proténa a 25 °C no processo de *refolding*. (B) Desenovelamento térmico (θ mdeg) em 222 nm do N-NDT obtida com uma taxa de varrimento de 1,0 K / min. A linha vermelha sólida representa a melhor curva ajustada usando as Equações 15 e 16, a linha preta na vertical indica a temperatura de *melting* (T_m) e a entalpia correspondente do processo de desenovelamento (ΔH_{vH}^D)..... 44

Figura 14- Calorimetria de varredura diferencial da proteína N-NTD. (A) a linha sólida vermelha exibe o termograma com os dados não tratados, mostrando o processo de agregação na fase pós-desnaturação e (B) os dados tratados da desnaturação térmica do N- NDT (1,0 μ M) obtida pela varredura de 293 a 353 K, de 1 K/min, com a correção da linha de base. (C) Analise de dados da calorimetria de varredura diferencial (DSC) da proteína N-NTD. Plot de van't Hoff. Os círculos mostram os dados experimentais e a linha vermelha é a melhor reta ajustada..... 45

Figura 15- *Screening* por STD- RMN das interações dos flavonoides (100 μ M) com o N-NTD (10 μ M). Os STDs representando as tentativas de interação para cada flavonoide estão representados de uma cor e

sequência (de cima para baixo): naigirina, rosa claro; baicalina, verde claro; apigenina, vermelho; morina, amarelo; crisina, fúcsia; rutina, verde escuro; quercetina, vermelho; hesperidina, azul..... 47

Figura 16- (A) Espectro de referência da interação da hesperetina (100 μ M) com o N-NTD (10 μ M), representado pela linha azul, na qual está também representado por asteriscos o sinal proveniente do solvente DMSO e as estrelas apontam os sinais do etanol presente na amostra analisada. A linha vermelha apresenta o STD-RMN da interação e os picos representados nas regiões 7 e 6,5 ppm são dos hidrogênios do flavonoide que receberam maior magnetização proveniente da proteína.(B) Mapa de epítomos de interação da hesperetina com N-NTD..... 47

Figura 17- (A) Curvas de STD-AF em função do tempo de saturação em diferentes concentrações de hesperetina de 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 μ M correspondentes as cores: preta, vermelho, verde, azul, ciano, fúcsia e amarelo, respectivamente, para o complexo N-NTD/Hsp. (B) Isoterma de STD-AF₀ em relação a concentração de hesperetina. Os círculos vazios representam os dados experimentais e a linha sólida preta corresponde ao ajuste teórico (Equação 18) para determinar a constante de dissociação do complexo N-NTD/Hsp, na temperatura de 25 °C..... 49

Figura 18- (A) A linha verde representa o espectro de referência do dipeptídeo Asp-Phe em tampão fosfato. A linha vermelha caracteriza o espectro de STD da competição entre o dipeptídeo (Asp-Phe) e a hesperetina (HSP) pelo bolso hidrofóbico no domínio N-NTD; os asterisco em preto indicam os sinais de ressonância referentes a molécula de hesperetina. O espectro de STD do complexo N-NTD/Asp-Phe é representado pela linha azul. (B) Estrutura de cristal do complexo do N-NTD/Asp-Phe (código PDB 4UC9), sendo a proteína representada pelo modelo *cartoon* e o dipeptídeo (Asp-Phe) presente no bolso hidrofóbico do N-terminal da nucleoproteína do hRSV, representado pelo modelo *ball and stick*. (C) O mapa de epítomos mostra a redução de transferência de magnetização dos hidrogênios do dipeptídeo no experimento de competição com a hesperetina..... 50

Figura 19- Medidas de anisotropia de fluorescência. (A) Curva da interação do peptídeo Ppep ao N-NTD. Pontos de dados e barras de erro representam as médias e os desvios padrão, respectivamente, de 1 duplicata. A linha vermelha sólida representa o melhor ajuste encontrado e os círculos pretos preenchidos são os dados experimentais junto com o erro (traço preto vertical nos círculos). (B) Curva das titulações do Ppep no N-NTD representadas pelos quadrados pretos; as titulações do Ppep no complexo N-NTD/hesperetina são representadas pelos círculos vermelhos. As linhas sólidas vermelha e preta representam os melhores ajustes encontrados, respectivamente, e as barras são os desvios padrão. O inserto representa o experimento controle da titulação de etanol no complexo N-NTD/Ppep..... 52

Figura 20- (A) Espectros CD- UV *far*. O espectro do N-NTD a 25 °C está representado pela linha com círculos pretos; o espectro do complexo N-NTD/Hsp a 25 °C, está identificado pela linha com círculos vermelha; a linha em verde representa o espectro da hesperetina em tampão fosfato. As linhas sólidas (vermelha, preta e verde) representam a melhor curva teórica ajustada usando Equação 15 e 16, e correspondente a variação de entalpia do processo de desenovelamento (ΔH_{vH}^D) do complexo (B) Desnaturação térmica do complexo N-NTD/Hsp (θ mdeg) em 222 nm obtida com uma taxa de varrimento de 1,0 K / min, representada pelos círculos pretos. A linha vermelha representa o melhor ajuste teórico..... 53

Figura 21: (A) Representação da superfície da ligação do domínio N terminal da nucleoproteína com a hesperetina (ciano) e o dipeptídeo Asp-Phe (verde) representados em modelos de *sticks* e *balls*. (B) Figura confeccionada no programa Pymol com os dados de *docking* do sítio hidrofóbico do N-NTD (representado em *cartoon*) com a hesperetina (*stick* ciano) e o dipeptídeo (*stick* verde) mostrando o mesmo local de interação e orientação do flavonoide e do dipeptídeo. (C) Dados do *docking* ilustrando o microambiente de ligação da hesperetina no bolso hidrofóbico do N-NTD mostrando os cinco contatos polares formados entre o flavonoide e os resíduos Glu128, Ser131 e Arg132; resíduos de aminoácidos representados por modelo *stick* e *balls*. (D) Mapa das interações não covalentes envolvidas na ligação da hesperetina ao bolso hidrofóbico do N-NTD, calculado pelo programa LigPlot. O complexo apresentou quatro pontes de hidrogênio estabelecidas entre a cadeia principal e lateral da Arg132 e grupos hidroxilas e carbonila da hesperetina, e uma entre as cadeias laterais da Ser131 e Glu128 e grupos hidroxilas no anel A do flavonoide.....

54

Figura 22- (A) A figura representa a estrutura química do flavonoide quercetina, da classe dos flavonóis. O círculo em vermelho evidencia a dupla ligação do anel heterocíclico, presente em todos os flavonóides do grupo dos flavonóis. (B) Estrutura química do flavonoide apigenina da família das flavonas; o círculo em vermelho mostra a dupla ligação do anel C, também existente nessa classe de flavonoides. (C) Esquema da estrutura química da hesperidina, o qual o círculo em azul mostra os dois açúcares rutinose do anel aromático A. (D) Estrutura química do composto polifenólico hesperetina. A seta preta do esquema identifica a falta da dupla ligação no anel C, motivo pelo qual torna a estrutura do flavonoide não planar.....

57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD- dicroísmo circular

- capacidade calorífica aparente

DSC- Calorimetria de varredura diferencial

DTT- ditionitrito

- fração desnaturada

hRSV- Vírus Sincicial Respiratório Humano

Hsp- hesperetina

- orientação perpendicular
- intensidade de diferença de transferência de saturação
- intensidade de saturação
- orientação paralela
- intensidade 0
- constante de equilíbrio de desnaturação

NC- nucleocapsídeo

Ni-NTA- resina de afinidade por níquel

N-CTD- domínio C terminal da nucleoproteína do hRSV

N-NTD- domínio N terminal da nucleoproteína do hRSV

NS1- proteína não estrutural 1 do hRSV

NS2- proteína não estrutural 2 do hRSV

OME- óxidos de metal

P-CTD- domínio C terminal da fosfoproteína do hRSV

pD441-CH- plasmídeo com o gene do N terminal da nucleoproteína do hRSV

Pep11- peptídeo de onze resíduos de aminoácidos do C- terminal da fosfoproteína do hRSV

P-NTD- domínio N terminal da fosfoproteína do hRSV

RNP- complexo ribonucleoproteico

STD- diferença de transferência de saturação

T_m- temperatura de *melting*(fusão)

- anisotropia
- elipticidade molar
- energia livre de Gibbs de desnaturação
- variação de entalpia de calorimétrica de desnaturação
- variação de entalpia de desnaturação de van't Hoff
- variação de entropia de desnaturação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Vírus Sincicial Respiratório humano e a nucleoproteína N.....	14
1.2	Abordagens experimentais.....	21
1.2.1	Dicroísmo circular (CD).....	21
1.2.1.1	Desnaturação térmica de proteína por CD.....	23
1.2.2	Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	24
1.2.3	Diferença de transferência de saturação por RMN.....	26
1.2.4	Anisotropia de fluorescência.....	28
1.2.5	<i>Docking</i> molecular.....	30
2	OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS.....	33
3	METODOLOGIA.....	34
3.1	Expressão e purificação da proteína em meio de cultura LB.....	34
3.2	Dicroísmo circular.....	35
3.3	Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	36
3.4	Diferença de transferência de saturação por RMN.....	37
3.5	Análise da interação N-NTD/hesperetina por anisotropia de fluorescência.....	39
3.6	<i>Docking</i> molecular.....	40
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Produção da proteína recombinante.....	41
4.2	Caracterização biofísica do N-NTD por dicroísmo circular (CD).....	42
4.3	Desnaturação térmica por calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	44
4.4	Caracterização da interação N-NTD/flavonoides por STD- RMN.....	45
4.5	Caracterização da interação N-NTD/Hsp por anisotropia de fluorescência.....	50
4.6	Caracterização estrutural e de estabilidade térmica do complexo N-NTD/hesperetina por CD.....	52
4.7	<i>Docking</i> molecular.....	53
5	DISCUSSÃO.....	55
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1. Introdução

1.1. Vírus Sincicial Respiratório humano e a nucleoproteína N

O Vírus Sincicial Respiratório humano (*human Respiratory Syncytial Virus* - hRSV) é o principal agente causador de doenças agudas do trato respiratório, como pneumonia e bronquiolite em crianças com idade igual e abaixo de cinco anos, em todo o mundo. Esse vírus também é responsável pelo aumento da taxa de mortalidade em idosos imunocomprometidos, submetidos a transplantes de células hematopoiéticas e com doença cardiorrespiratória. O principal grupo de risco relacionado com o hRSV é formado por crianças as quais apresentam imunodeficiência congênita, displasia broncopulmonar, doença cardíaca, hipertensão, prematuridade e baixo peso ao nascimento (COLLINS; CROWE JR, 2007; HALL et al., 2009; OTHUMPANGAT et al., 2009; FALSEY et al., 2005; RICCETTO et al., 2009; YE, et al., 2019).

As infecções por hRSV podem causar desde hospitalizações com quadros clínicos graves e até a morte. Um levantamento epidemiológico global relatou que 33,1 milhões de episódios de infecções por hRSV ocorreram em 2015 no mundo todo, sendo 3,2 milhões de hospitalizações e 59.600 mil mortes de crianças menores de cinco anos (SHI et al., 2017).

De acordo com dados coletados por equipes sentinelas da Secretaria de Vigilância em Saúde, em 2018 130 de 218 casos registrados no Brasil de infecções agudas respiratórias foram causadas por hRSV. No ano passado (2019), de 534 casos registrados 187 foram provocados pelo vírus sincicial respiratório humano, 178 por influenza e o restante por outros vírus respiratórios, como Parainfluenza e Adenovírus. As pesquisas demonstraram que o hRSV tomou uma proporção significativa em 2019, infectando mais que o vírus influenza, o qual é responsável por várias pandemias no último século (MITRA et al., 2019; SVS, 2019).

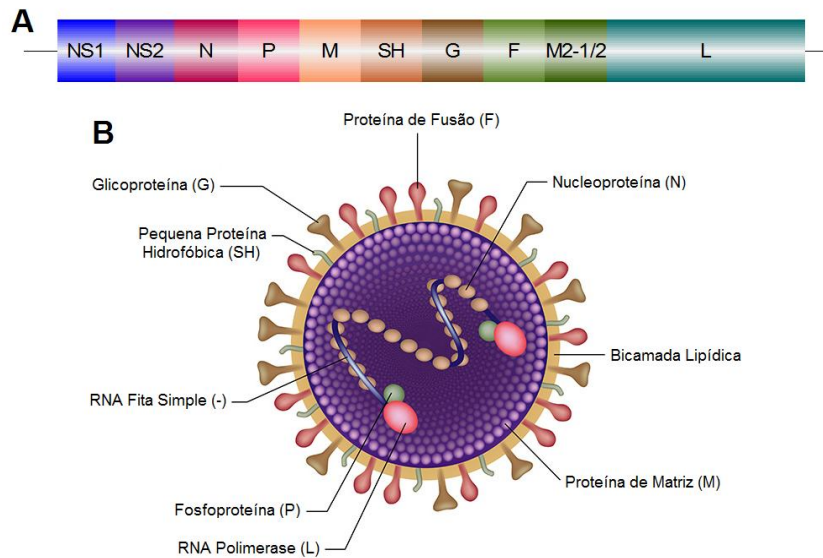
As reinfecções por hRSV são comuns ao longo da vida e até o presente momento não há vacina contra o vírus (MARINHEIRO et al., 2009). O único tratamento licenciado comumente oferecido é o anticorpo monoclonal direcionado à proteína F, Palivizumabe, que é administrado às crianças de alto risco durante a estação de maior incidência de infecções, reduzindo a ocorrência da forma mais severa da doença. Entretanto, esse medicamento é de alto custo e tem apresentado reações adversas expressivas (MORRIS et al., 2009; LIU et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2007).

O hRSV é um vírus da ordem *Monogavirales*, família *Pneumoviridae*, de RNA de sentido negativo, fita simples não segmentado organizado em um envelope lipídico apresentando uma simetria helicoidal e tamanho médio de 120 a 300 nm. Seu genoma é composto por 15.222 nucleotídeos, distribuídos em 10 genes, os quais codificam 11 proteínas. Dessas 11 proteínas, duas

(M2-1 e M2-2) são expressas pelo gene M2. A Figura 1A mostra um esquema da organização genômica do vírus (COLLINS; CROWE JR, 2007; YE, et al., 2019).

No envelope viral encontram-se três glicoproteínas de superfície que se projetam a partir da bicamada lipídica: a proteína de adesão (G), a proteína de fusão (F) e a pequena proteína hidrofóbica (SH). A proteína G é responsável pelo reconhecimento da célula hospedeira, enquanto que a proteína F realiza a fusão do vírus transmitindo seu material genético para dentro da célula hospedeira e também promove a agregação de células multinucleadas produzindo os sincícios (COLLINS; CROWE JR, 2007). A proteína SH é um importante fator de virulência visto que essa altera a permeabilidade da membrana celular (PEREZ et al., 1997). Na face interna do envelope viral encontra-se a proteína de matriz (M) que tem o papel-chave na montagem e liberação do vírus, associando o complexo ribonucleoproteico (RNP) com as glicoproteínas do envelope viral (GHILDYAL et al., 2002 e 2005). O complexo ribonucleoproteico (RNP) é formado pelo nucleocapsídeo (NC), o RNA viral fortemente ligado à nucleoproteína N e a RNA polimerase dependente de RNA (*RNA dependent RNA polymerase* – RdRp) que é composta da proteína L com seu cofator, a fosfoproteína P (COLLINS; KARRON, 2013). As proteínas do gene M2 encontram-se envolvidas na construção da forma ativa do complexo RNP, sendo que a M2-1 atua na transcrição como um fator de processamento e antiparada, e M2-2 age como um “interruptor” molecular entre a transcrição e replicação viral (ASENJO; VILLANUEVA, 2016; LAMB; PARKS, 2006; BERMINGHAM; COLLINS, 1999). Há também duas proteínas não estruturais 1 e 2 (NS1 e NS2) que atua na resposta imunológica do hospedeiro suprimindo a indução de interferons alfa, beta e lambda (SPANN et al., 2004; MUNNIR et al., 2008). A Figura 1B mostra um esquema para o arranjo das proteínas do hRSV.

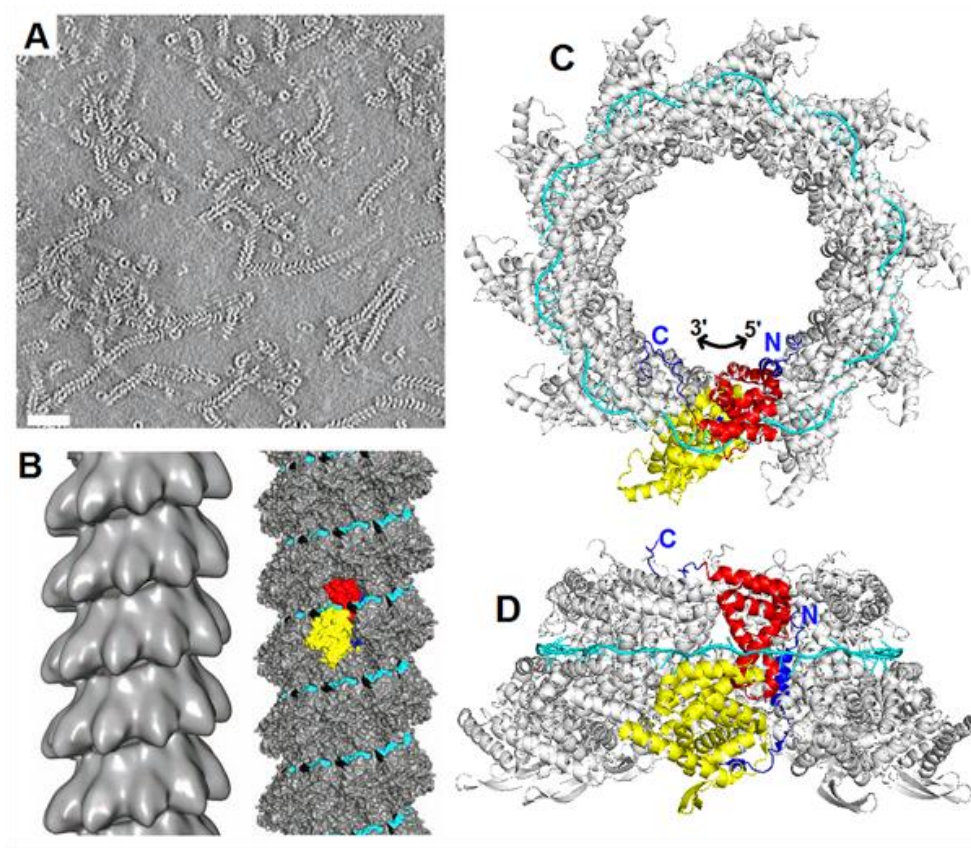
Figura 1: (A) Organização genômica do hRSV, demonstrando a sequência dos genes responsáveis pela codificação das proteínas virais. (B) Modelo representativo do hRSV.



Fonte adaptada: COLLINS; CROWE JR, (2007).

O genoma do hRSV é revestido pela nucleoproteína viral (N) para formar o nucleocapsídeo (NC), o qual serve como molde para a síntese de RNA pela RNA polimerase dependente de RNA. O NC é uma hélice flexível com um número variável de proteínas N por volta da hélice (Figura 2A e 2B) (TAWAR *et al.*, 2009). Tawar *et al.*, (2009) descreveram a estrutura de cristalização por raios-X de um complexo *like*-NC do hRSV como um anel decamérico de proteínas N em complexo com RNA de origem celular (Figura 2C e 2D). A estrutura mostrou que a proteína N tem uma região central, a qual é dividida em dois domínios N e C-terminal nomeados N-NTD (resíduos 28–254) e N-CTD (resíduos 254–360), com o RNA ligado em um “sulco” entre esses domínios. Em particular, uma α -hélice “braço”-N inserido no núcleo hidrofóbico da proteína N 5’ vizinha fornece uma importante interação estabilizadora.

Figura 2. (A) Tomografia do nucleocapsídeo (NC) do hRSV. Uma seção central através de um tomograma de uma estrutura de ribonucleoproteína do tipo NC do hRSV revela a presença de anéis e hélices curtas. (B) Reconstrução tridimensional de 26 Å de resolução calculada a partir de imagens criogênicas. A hélice contém 9,8 unidades de proteína N por volta e tem um passo de 69 Å. Uma subunidade proteica é destacada, colorida por domínios, enquanto as outras estão em cinza, em representação de superfície. Um complexo anelar de ribonucleoproteína decamérica. Uma subunidade N é colorida de acordo com os domínios: amarelo e vermelho indicam N-NTD e N-CTD, respectivamente, e os braços N e C são azuis. O RNA é mostrado em ciano. (C) Visão abaixo do eixo do anel. A polaridade do RNA é indicada dentro do anel. (D) Vista lateral.



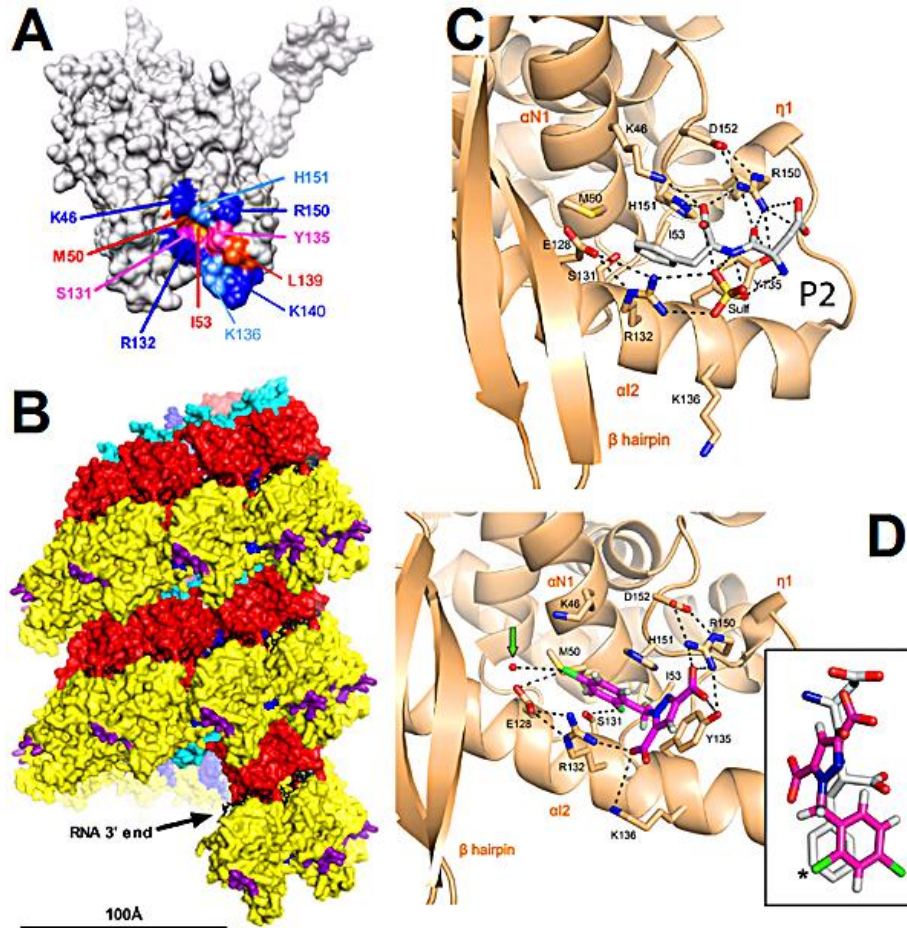
Fonte: TAWAR et al. (2009).

As proteínas P, N e L são os componentes moleculares mínimos para a replicação e transcrição *in vitro* de vírus de RNA. O reconhecimento eficiente e específico do molde NC pela RpRd é crítico para a síntese de RNA viral. Esse reconhecimento é mediado pela fosfoproteína P, uma proteína multifuncional capaz de interagir com múltiplas macromoléculas parceiras. Estudos mostram que a proteína P do hRSV forma homoligômeros que adotam um estado tetramérico (ASENJO; VILLANUEVA, 2000) e ligam-se à proteína L (KHATTAR et al., 2001), N (GARCÍA et al., 1993) e M2-1 (MASON et al., 2003). Durante a replicação e transcrição, a fosfoproteína posiciona a proteína L no molde NC e ajuda na translocação do complexo da polimerase ao longo do nucleocapsídeo helicoidal. Acredita-se que a proteína P desempenha um papel de chaperona,

mantendo a nucleoproteína N recém-sintetizada em uma forma solúvel monomérica (N_0) e direcionando-a para o encapsulamento especialmente com os RNAs genômicos e anti-genômicos do vírus (KOLAKOFSKY et al., 2004).

A fosfoproteína P é uma proteína modular que consiste de um domínio de tetramerização flanqueado por duas regiões longas preditas como intrinsecamente desordenadas, nomeadas de domínios N e C-terminal (P-NTD e P-CTD, respectivamente) (CASTAGNE et al., 2004; LLORENTE et al., 2006). Tran et al. (2007) mostraram que os nove resíduos do C-terminal (Asp233–Phe241) da proteína P são essenciais para sua ligação ao nucleocapsídeo NC e, conseqüentemente, para a síntese de RNA viral. Em particular, a mudança do último resíduo de aminoácido Phe241 do C-terminal de P para alanina anula tanto a ligação com a proteína N como também a síntese de RNA viral (GALLOUX et al., 2012). Galloux e colaboradores (2012) identificaram, por uma abordagem racional usando deleções e mutações sítio dirigidas da proteína N, que um bolso hidrofóbico em seu domínio N-NTD corresponde a região de ligação do P-CTD. Nessa região de ligação foram identificados resíduos com cadeias laterais hidrofóbicas e básicas (Lys46, Met50, Ile53, Ser131, Arg132, Tyr135, Arg150, His151), tanto dentro do bolso como na superfície exposta do N-NTD, os quais são críticos para a interação N/P e síntese de RNA (Figura 3). Pela técnica de cristalografia de raios-X, Ouizougoun-Oubari e coautores (2015) revelaram as interações entre o dipeptídeo Asp240-Phe241 do C-terminal da fosfoproteína com o N-NTD (Figura 3C). É possível observar a partir dessas estruturas determinadas que a Phe241 está completamente enterrada no bolso hidrofóbico do N-NTD localizado entre as hélices α I2 (resíduos Ser131, Arg132 e Tyr135) e α N1 (resíduos Met50 e Ile53) e o loop no qual encontra-se a hélice 3_{10} η 1 (resíduos Arg150 e His151). Essa região correlaciona perfeitamente com os resíduos críticos para a atividade da polimerase do hRSV determinada *in vitro* por Galloux e colaboradores em 2012. A Figura 3C mostram que Phe241 está envolvida em uma rede intrincada de interações de hidrogênio, sugerindo que esse resíduo é fundamental para o reconhecimento do P-CTD pelo N-NTD. O grupo aromático da fenilalanina 241 da proteína P ajusta-se perfeitamente ao bolso hidrofóbico e sua posição é a mesma em ambos os complexos do N-NTD com Phe241 e Asp240-Phe241 determinados por Ouizougoun-Oubari et al. (2015). Um dos lados do anel aromático da Phe241 faz uma interação de empilhamento π - π com o grupo imidazólico da His151 da proteína N. O outro lado do anel benzênico da Phe241 empilha contra a parte alifática da cadeia lateral de R132.

Figura 3. (A) Localização na superfície do monômero da proteína N os resíduos identificados como sendo críticos para a síntese de RNA e envolvidos na interação com a proteína P. Os resíduos são coloridos de acordo com suas propriedades bioquímicas (azul, resíduos básicos; vermelho, resíduos hidrofóbicos; resíduos magenta, neutros). (B) Vista lateral do nucleocapsídeo helicoidal modelado a partir do anel usando um espaçamento de 70 Å de acordo com os dados relatados anteriormente por Tawar *et al.* (2009). Domínios estruturais são coloridos; isto é, o N-CTD e o N-NTD estão em vermelho e amarelo, respectivamente, e o braço C e o braço N estão em azul claro. Resíduos críticos para a interação com o P-CTD são mostrados em roxo, e o RNA é mostrado em preto. A barra indica 100 Å. Detalhes do bolso de ligação do P-CTD (dipeptídeo Asp-Phe) (C) e o *scaffold* BPdC (D) no N-NTD. O N-NTD está representado em *cartoon*, com estruturas secundárias nomeadas. Resíduos envolvidos na ligação por meio de interações eletrostáticas (linhas tracejadas) ou forças de van der Waals são mostradas na representação do bastão e coloridas pelo tipo de átomo. O peptídeo e o *scaffold* BPdC é representado como *sticks*. O inserto em (D) mostra o alinhamento do peptídeo com o *scaffold* BPdC.



Fonte: Ouizougou- Oubari et al. (2015).

As interações entre proteínas podem ser difíceis de perturbar com moléculas de baixa massa molecular, se essas ocorrerem ao longo de uma extensa superfície de contato entre essas macromoléculas. Pontos específicos de interação proteína-proteína apresentando regiões confinadas e bem definidas com aspectos topológicos profundos como bolsos hidrofóbicos oferecem um maior potencial para a descoberta de moléculas bloqueadoras desse tipo de interação. A informação descrita sobre a interação do C-terminal da proteína P do hRSV com a proteína N (ou o

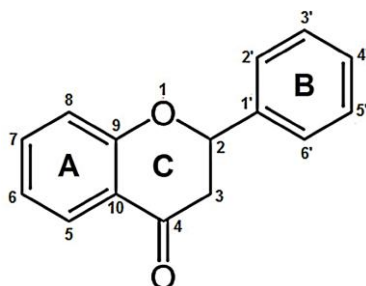
nucleocapsídeo) sugere que essa interação pode ocorrer em tal *hotspot*. Ouizougoun- Oubari et al. (2015) determinaram estruturas cristalinas do N-NTD em complexo com compostos de baixa massa molecular selecionados por *screening in silico*. Esses compostos que compartilham o *scaffold* 1-benzil-1H-pirazol-3,5-dicarboxilato (BPdC) mostraram afinidades similares àquela do P-CTD e competiu eficientemente com o P-CTD para ligação *in vitro* pelo deslocamento da Phe241 do bolso hidrofóbico (Figura 3D). Uma molécula derivada a partir do *scaffold* BPdC com a mais alta afinidade para N-NTD foi capaz de inibir especificamente a replicação do hRSV em ensaios de cultura celular (OUIZOUGUN-OUBARI et al., 2015).

Diante dos resultados experimentais apresentados, pode-se destacar que o bolso hidrofóbico do N-NTD no qual ocorre a ligação da Phe241 do P-CTD é um promissor alvo para o desenvolvimento de antivirais com objetivo de inibir a replicação do hRSV. Nesse contexto, os flavonoides apresentam-se como potenciais candidatos para a interação no *hotspot* hidrofóbico do N-NTD, pois estudos realizados por Kaul e colaboradores (1985) mostraram que os flavonoides quercetina e hesperetina são capazes de inibir aproximadamente 90% da replicação do hRSV em ensaios de cultura celular. Entretanto, nenhum mecanismo molecular foi proposto para os efeitos biológicos observados (KAUL et al., 1985).

Os flavonoides são uma ampla coleção de moléculas hidrofóbicas que contêm um esqueleto de carbono C6–C3–C6 (fenil-benzopirano) (Figura 4). As várias classes desses polifenóis diferem quanto ao nível de oxidação e/ou saturação presente no anel heterocíclico C. Dentre as várias classes podem ser citadas as flavanas, flavanonas, flavonas, flavonóis e flavanóis (flavan-3-ol, flavan-4-ol e flavan-3,4-diol). Os compostos individuais dentro de uma classe diferenciam-se pelo padrão de substituição dos anéis A e B, tais como: substituintes hidroxilas (OH) e metilações (OMe), glicosilações e acilações (GROTEWOLD, 2006). Esses compostos polifenólicos são metabólitos secundários que ocorrem naturalmente nas plantas e fungos, e são parte integrante da dieta humana e sua fácil absorção pelo corpo humano promove uma significativa visibilidade no ramo farmacêutico, a qual confere a essas moléculas uma característica atrativa no desenho de novas estratégias terapêuticas (WALLE, 2004).

Estudos mostraram que uma variedade de extratos fenólicos revelaram-se capazes de inibir espécies fúngicas e bacterianas, incluindo *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, assim como apresentaram ação inibitória contra o hRSV (ZEGUIN et al., 2019; KAUL et al., 1985).

Figura 4. Estrutura molecular base dos flavonoides.



Fonte: GROTEWOLD (2006).

Conforme o contexto apresentado o presente estudo realizou uma abordagem de técnicas experimentais (espectroscopia de fluorescência e Ressonância Magnética Nuclear) que permitiu investigar importantes aspectos biofísico-químicos da interação entre flavonoides e o bolso hidrofóbico do N-NTD que poderá contribuir para o desenvolvimento de uma nova estratégia de tratamento contra a infecção causada pelo hRSV. Esses estudos de interação entre flavonoides e o domínio N-terminal da nucleoproteína do hRSV poderão proporcionar avanços consideráveis no desenvolvimento de novas estratégias de combate as infecções causadas pelo hRSV.

1.2. Abordagens experimentais e computacional.

1.2.1. Dicroísmo circular (CD)

Os ensaios de dicroísmo circular foram utilizados para analisar as estruturas secundárias da proteína N-NTD no momento em não estava ligada e quando complexada a hesperetina, a fim de verificar as características das estruturas secundárias da proteína, assim como observar se o flavonoide induzia alguma modificação estrutural no N-NTD quando o complexo era formado.

A técnica de dicroísmo circular mensura a diferença de absorção de luz circularmente polarizada entre duas componentes com igual magnitude, uma com rotação à direita (R) e outra a esquerda (L). O sinal de CD pode ser observado em moléculas quirais, as quais apresentam em sua estrutura quatro carbonos com quatro substituintes diferentes. Os instrumentos de CD são conhecidos como espectropolarímetros e reportam a diferença de absorção de luz polarizada a esquerda e a direita ($\Delta A = A_L - A_R$); entretanto, essa diferença é reportada em termos de elipticidade (θ medida em graus). O espectro de CD é coletado em função de comprimentos de onda (KELLY et al., 2005).

A técnica CD reporta que quando a luz polarizada passa por um meio circularmente dicróico, a absorção diferencial das duas componentes circulares converte a luz plana polarizada em luz

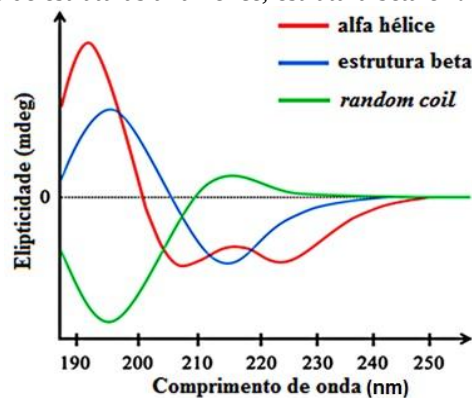
elípticamente polarizada, o vetor elétrico traça uma elipse ao invés de oscilar em um plano ou formar um círculo. Quando os vetores elétricos dos dois componentes circulares estão na mesma direção, a soma de suas magnitudes origina o eixo maior da elipse, e quando eles estão em direções opostas, a diferença de suas magnitudes origina o eixo menor da elipse. O sinal de CD é caracterizado pela razão dos eixos menor e maior da elipse, que é a tangente de um ângulo θ , chamado de elipticidade expresso pela relação:

$$(1)$$

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

As proteínas apresentam espectros característicos para cada tipo de estrutura secundária que as compõem; como por exemplo, as proteínas α -helicoidais têm bandas com elipticidade negativa em 222 e 208 nm e uma banda positiva em 193 nm. As proteínas com majoritária estrutura β (fitas e/ou folhas- β) exibem bandas de elipticidade negativa em 215 nm e banda positiva em 195 nm. As estruturas proteicas desordenadas ou irregulares (*random coil*) têm elipticidade positiva por volta de 210 nm e uma banda negativa perto de 195 nm (Figura 1) (GREENFIELD, 2007).

Figura 5. Espectros de referência de estruturas secundárias de proteínas. As linhas vermelha, azul e verde representam espectros compostos majoritariamente de estruturas alfa hélice, estrutura beta e *random coil*, respectivamente.



Fonte adaptada: GREENFIELD (2007).

Com base nos perfis espectrais de dados de CD de estruturas secundárias de proteínas conhecidas, há algoritmos que utilizam os espectros de CD-UV para fornecer uma estimativa das estruturas secundárias de proteínas de interesse. Em geral, os procedimentos utilizam como base de

dados, uma biblioteca de estruturas de proteínas determinadas por cristalografia de raios-X (KELLY et al., 2005), as quais são comparadas com as amostras analisadas e, por fim, é feita uma estimativa da porcentagem das estruturas secundárias (α -hélice, estrutura- β , voltas e irregulares) da proteína de interesse. Para essas análises de deconvolução espectral dos dados CD são comumente utilizados os programas: CONTIL, SELCON3 e CDSSTR, os quais se encontram presentes no pacote CDpro (MATSUO et al., 2007; KELLY et al., 2005).

1.2.1.1. Desnaturação térmica de proteína por CD

A desnaturação de uma proteína exibe características importantes para o entendimento dos mecanismos de enovelamento e estabilidade (MATSUO et al, 2007). Quando uma proteína desenovela ela perde suas estruturas altamente ordenadas e, conseqüentemente, há uma mudança no seu sinal de dicroísmo circular. As mudanças no sinal de CD de uma proteína em função da temperatura, em comprimentos de onda característicos, podem ser utilizadas para determinar parâmetros termodinâmicos de sua desnaturação, tais como: variação de entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}^D), variação de entropia de desenovelamento (ΔS^D), variação da energia livre de Gibbs de desnaturação (ΔG^D) e a temperatura de *melting* (T_m). Em adição, a análise dos espectros de CD obtida como função de temperatura pode ser útil para determinar se uma proteína tem intermediários de desenovelamento/enovelamento ou se seu processo de desnaturação é reversível/irreversível.

A fração de proteína desnaturada (f_D) de um processo de desenovelamento pode ser calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{\theta - \theta_D}{\theta_N - \theta_D} = f_N \quad (2)$$

sendo que θ , θ_N e θ_D são sinais de dicroísmo circular da proteína em cada temperatura investigada, na primeira (proteína nativa) e na última (proteína desnaturada) temperatura, respectivamente. Portanto, a fração de proteína nativa pode ser calculada por $f_N = 1 - f_D$. A temperatura na qual

$f = 0.5$ é denominada a temperatura de *melting* ou de desnaturação (T_m). Usando um modelo de transição de dois estados (nativa $\leftrightarrow$ desenovelada) para a desnaturação térmica de uma proteína e calculando a constante de equilíbrio desse processo entre estado nativo e desenovelado como

$K = f_D / f_N$, a variação de entalpia de van't Hoff para o processo de desnaturação (ΔH_{vH}^D) pode ser determinada pela seguinte relação:

$$\frac{1}{f_D} \ln \left(\frac{f_D}{1 - f_D} \right) = \frac{\Delta H_{vH}^D}{RT^2} + \frac{\Delta S^D}{R} \quad (3)$$

e a variação de entropia de desenovelamento pode ser calculada por

1.2.2. Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) é uma técnica experimental utilizada para medir a absorção ou liberação de energia térmica por uma amostra durante o aumento ou diminuição controlada de temperatura. Na prática, a técnica de DSC pode ser usada para determinar a temperatura térmica de transição (ou também conhecida como temperatura de *melting*) de amostras em solução, em estado sólido ou em suspensões. (COOPER, 2001).

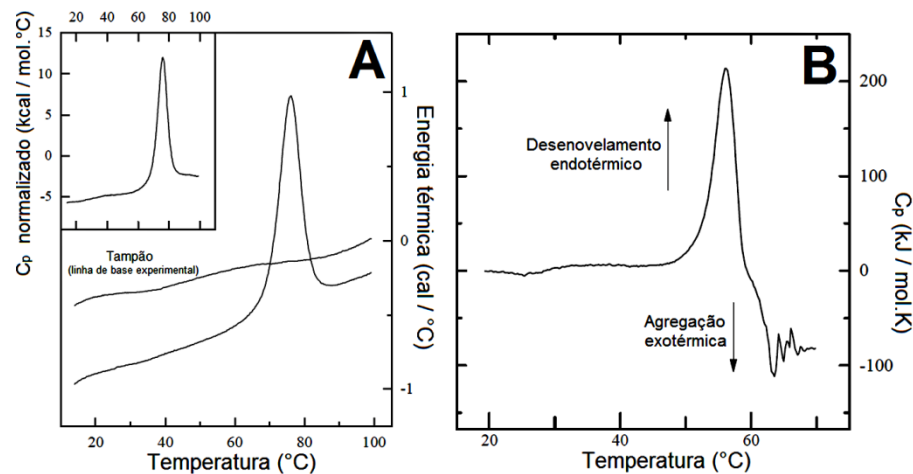
Em particular, a técnica de DSC pode ser utilizada para estudar a termodinâmica de desenovelamento ou reenovelamento de proteínas, assim como a estabilidade de suas estruturas. Em um experimento de DSC é possível quantificar a energia térmica necessária para aumentar a temperatura de uma solução e, dessa forma, fornecer informações sobre alterações estruturais que ocorreram durante o processo de desenovelamento induzido termicamente de uma proteína de interesse (JACOBS et al., 2019).

Atualmente, a microcalorimetria tornou-se parte integrante do roteiro padrão de técnicas disponíveis para estudos biofísico-químicos de biomoléculas em solução, gerando, por exemplo, informações importantes sobre a estabilidade estrutural de proteínas durante os processos de desenovelamento térmico (COOPER, 2001). Em um experimento de DSC, uma solução de proteína é aquecida a uma taxa constante na célula calorimétrica ao lado de uma outra célula de referência idêntica contendo tampão. Diferenças na absorção de energia térmica entre as células de amostra e de referência as quais são necessárias para manter a temperatura iguais em ambas células, correspondem a diferenças na capacidade calorífica aparente (C_p) que fornecem informações diretas sobre os processos energéticos induzidos termicamente na amostra. Importantes parâmetros termodinâmicos para um processo de desenovelamento térmico de uma proteína podem ser extraídos de um experimento de DSC, tais como: a variação de entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}^D), a variação de entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}^D) que pressupõe um modelo de dois estados (nativo $\leftrightarrow$ desnaturado, como visto no item 1.2.1.1), a variação da capacidade calorífica a pressão constante entre o estado nativo e desenovelado (ΔC_p), a temperatura de *melting* (T_m) e, por fim, a variação de entropia de desnaturação (ΔS^D) associada com o ponto de desnaturação térmica (JACOBS et al., 2019).

Para uma proteína globular, o termograma de DSC apresenta três regiões principais: a linha de base pré-desnaturação, o pico (transição) de desenovelamento endotérmico e a linha de base pós-

desnaturação (Figura 6). Quando a proteína começa a se desenovelar, o C_p aumenta à medida que mais energia térmica (calor) é absorvida na desnaturação da proteína, atingindo um pico em uma correspondente temperatura de ponto médio do processo que também é conhecida como temperatura de *melting* (T_m), antes de reduzir até a linha de base em altas temperaturas. Essa linha de base pós-desnaturação, representando a capacidade calorífica relativa da proteína desenovelada, a qual geralmente é encontrada com valores maiores do que a linha de base pré-desnaturação (COOPER, 2001).

Figura 6. (A) Esquema de dados brutos de um termograma de proteína. (B) Espectro de DSC de proteína mostrando o processo endotérmico na fase pré- desnaturação, a transição (pico) e na fase pós- desnaturação, o processo tornando- se exotérmico, mostrando um declínio no termograma decorrente da agregação da amostra.



Fonte adaptada: COOPER (2001).

A temperatura de *melting* (T_m) é definida como a temperatura na qual 50% das moléculas de proteína estão desenoveladas ou, em um equilíbrio dinâmico ideal de dois estados, seria a temperatura na qual qualquer molécula de proteína permanece 50% do seu tempo em um estado nativo e outros 50% em um estado desenovelado.

A variação de entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}^D) é determinada a partir da integral do termograma que, após correção da linha de base, representa a absorção total de energia térmica pela proteína em estudo. Essa absorção de energia térmica depende da quantidade de amostra presente no volume da célula do equipamento de DSC. A ΔH_{cal}^D é uma medida livre de modelo da entalpia absoluta do processo de desnaturação térmica (COOPER, 2001).

A variação de entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}^D) é uma estimativa independente da entalpia da desnaturação, baseada em um modelo de dois estados (nativo $\leftrightarrow$ desnaturado) assumido para o

processo. Em termos práticos, calcula-se uma área parcial no pico do termograma da proteína em qualquer temperatura e, em seguida, divide-se esse valor pela área total do termograma, resultando em uma medida da fração de proteína desenovelada. O sinal calorimétrico é utilizado da mesma maneira que qualquer outro método indireto para o cálculo da ΔH_{vH}^D , como por exemplo a técnica de CD mencionada anteriormente (COOPER, 2001). Assumindo um modelo simples de dois estados, como na seção 1.2.1.1, pode-se relacionar a variação de temperatura da fração desenovelada com a variação de entalpia usando a equação de van't Hoff (Equação 3). Essa abordagem baseia-se apenas nas proporções de áreas sob o termograma e não requer qualquer informação sobre concentração da amostra (COOPER, 2001).

Nas análises de DSC, valores iguais de ΔH_{vH}^D e ΔH_{cal}^D confirmam a ocorrência predominante de um modelo de dois estados, sendo que valores diferentes sugerem a formação de agregados ($\Delta H_{cal}^D < \Delta H_{vH}^D$) e existência de estados intermediários ($\Delta H_{cal}^D > \Delta H_{vH}^D$) no processo de desnaturação térmica de uma proteína. Na prática, a maioria das proteínas apresentam a formação de agregados após um processo de desnaturação térmica ($\Delta H_{cal}^D < \Delta H_{vH}^D$). Essa agregação é normalmente exotérmica e irreversível, causando distorções da linha de base pós-desnaturação no termograma da proteína (Figura 6). O processo de agregação é um fenômeno cinético dependente da concentração de proteína na célula do DSC e também da taxa de varredura de aquecimento do equipamento (COOPER, 2001).

1.2.3 Diferença de transferência de saturação por RMN

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta bastante utilizada para estudar moléculas em solução. Ela pode ser utilizada para investigar a interação de proteínas com outras moléculas de interesse biológico, tais como: proteínas, ligantes e ácidos nucleicos. A RMN tem se tornado uma técnica essencial para estudos que caracterizam eventos de reconhecimento molecular, como por exemplo, as interações de pequenos ligantes com proteínas.

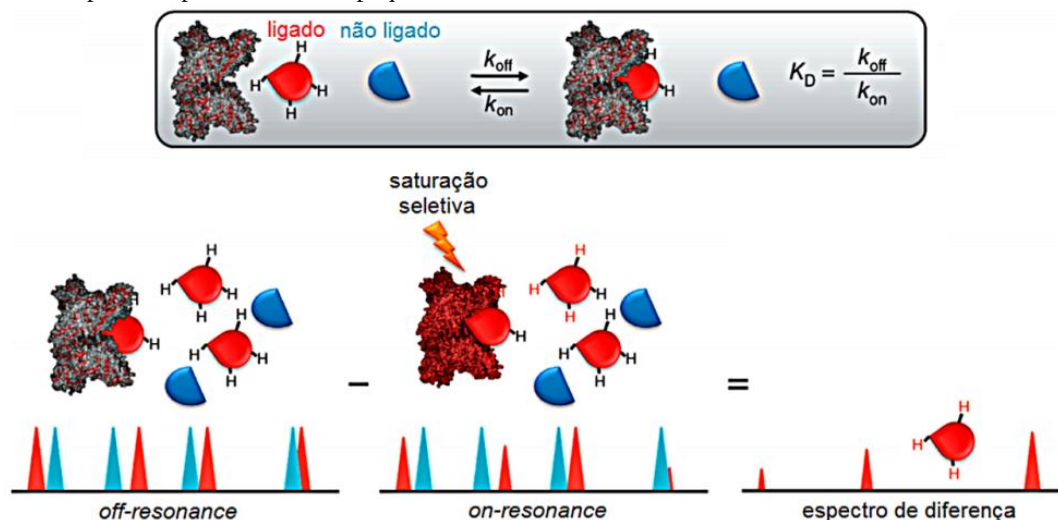
Dentre algumas metodologias da RMN destaca-se os experimentos de diferença de transferência de saturação (*Saturation Transfer Difference* – STD), nos qual é possível investigar a interação proteína/ligante observando apenas os sinais da pequena molécula. O experimento de STD-RMN é baseado no efeito nuclear de *Overhauser* e na observação dos sinais de ressonância do ligante. Pode ser usado como técnica de *screening* experimental, buscando identificar pequenas moléculas que se ligam a uma proteína de interesse ou como uma ferramenta útil para identificar

porções (prótons) do ligante importantes para a interação no sítio da macromolécula (VIEGAS et al., 2011).

O experimento de STD-RMN utiliza-se do princípio de equilíbrio químico do processo de interação entre proteína e pequena molécula, no qual há uma constante troca entre o estado ligado e livre do ligante. Basicamente, um experimento de STD-RMN envolve subtrair um espectro no qual a proteína foi seletivamente saturada (espectro de *on-ressonance*, o qual é obtido pela irradiação em uma região espectral que contém apenas ressonâncias da proteína, normalmente entre 0 e 1,0 ppm) denominada intensidade de saturação (I_{sat}) de um espectro sem saturação da macromolécula (espectro de *off-ressonance*), com sinal de intensidade I_0 . No espectro de diferença (I

), somente os sinais (dos prótons) do ligante que receberam transferência de saturação da proteína (via difusão *spin*, através do efeito nuclear *Overhauser*) permanecem (Figura 7) (VIEGAS et al., 2011).

Figura 7. Exemplo esquemático de um experimento de diferença de transferência de saturação por ressonância magnética nuclear (STD-RMN). A troca entre o ligante livre e ligado permite a transferência de magnetização intermolecular da proteína para a molécula pequena.



Fonte adaptada: VIEGAS et al (2011).

Além da observação direta da interação do ligante com a proteína alvo, o espectro de STD-RMN confere uma imagem dos epítomos de interação, ou seja, dos prótons (^1H) que direcionam a interação proteína/ligante. No mapa de epítomos do ligante são identificados os hidrogênios que estabelecem contatos com a proteína em distâncias menores do que 5,0 Å, e aqueles que estiverem mais perto da proteína têm sinais mais intensos devido a uma maior eficiência da transferência de saturação (VIEGAS et al., 2011). O efeito STD (I_{STD}/I_0) consiste da razão entre as intensidades de

ressonância no espectro de referência e suas correspondentes ressonâncias no espectro de STD. Esse efeito pode ser melhor analisado utilizando o conceito de fator de amplificação ($S \rightarrow AF$), o qual é obtido multiplicando de um dado hidrogênio por pela razão entre uma certa concentração total de ligante e de proteína], como apresentado matematicamente a seguir:

$$\frac{S}{S_0} = \frac{AF}{AF_0} \quad (4)$$

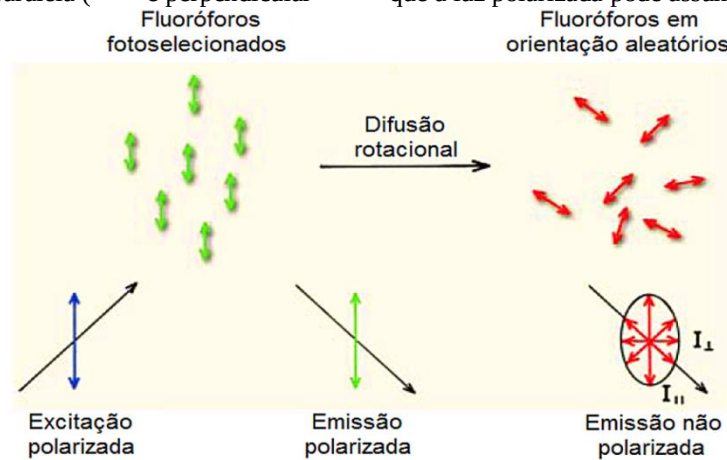
1.2.4 Anisotropia de fluorescência

A luminescência é a emissão de luz proveniente de uma substância que origina-se do decaimento de estados eletronicamente excitados. Ela é formalmente dividida em duas categorias denominadas fluorescência e fosforescência, as quais dependem da natureza do o estado excitado. A fluorescência é a emissão de luz a partir de um estado singlete excitado, no qual o elétron no orbital excitado é pareado (por um *spin* oposto) ao segundo elétron no orbital do estado fundamental. Por outro lado a fosforescência é a emissão de luz via estado tripleto excitado, no qual o elétron no orbital excitado tem a mesma orientação como do elétron no estado fundamental (LAKOWICZ, 1999).

Dentre as diferentes aplicações da técnica de fluorescência, a anisotropia de fluorescência merece destaque, pois fornece informações relevantes como, por exemplo: *tumbling* molecular (movimento rotacional) e viscosidade dos ambientes moleculares. As medições de anisotropia também podem ser empregadas para investigar interações moleculares entre proteínas e de proteína com ligantes/peptídeos e para estudar a fluidez de membranas (LAKOWICZ, 1999).

Os experimentos de anisotropia de fluorescência baseiam-se no princípio de excitação fotosselativa de fluoróforos por luz polarizada. Os fluoróforos absorvem preferencialmente fótons cujos vetores elétricos são alinhados paralelamente ao momento de transição do fluoróforo. O momento de transição tem uma orientação definida com relação ao eixo molecular. Em uma solução isotrópica, os fluoróforos são orientados aleatoriamente. Sob excitação com luz polarizada, um fóton excita seletivamente as moléculas de fluoróforos cujo dipolo de transição de absorção é paralelo ao vetor elétrico da excitação. Essa excitação seletiva resulta em uma população parcialmente orientada de fluoróforos e em uma emissão de fluorescência parcialmente polarizada. A emissão também ocorre com a luz polarizada ao longo de um eixo fixo no fluoróforo (Figura 8) (LAKOWICZ, 1999).

Figura 8. Efeitos da excitação polarizada e difusão rotacional em emissão de anisotropia. As setas verdes representam os fluoróforos fotoselecionados por uma luz polarizada. As setas vermelhas representam os fluoróforos em orientação aleatória de uma solução isotrópica, por exemplo. O círculo com setas vermelhas, no canto direito inferior da figura, evidência as orientações paralela ($I_{\parallel}$) e perpendicular ($I_{\perp}$) que a luz polarizada pode assumir.



Fonte adaptada: Lascowics (1999).

Nos experimentos de anisotropia de fluorescência a amostra é excitada com luz polarizada verticalmente. O vetor elétrico da luz de excitação é orientado paralelamente a vertical. A intensidade de emissão é medida através de um polarizador. Quando o polarizador de emissão é orientado em paralelo para a direção da excitação polarizada a intensidade observada é chamada $I^{\parallel}$. Da mesma forma, quando o polarizador é perpendicular à excitação, a intensidade é chamada $I^{\perp}$. Estes valores de intensidade são usados para calcular a anisotropia, descrita como:

$$\text{Anisotropia} = \frac{I^{\parallel} - I^{\perp}}{I^{\parallel} + I^{\perp}} \quad (5)$$

Os espectrofluorímetros mais utilizados são em formato-L com o monocromador de emissão postado perpendicularmente em relação ao monocromador de excitação. Esses fluorímetros em formato-L apresentam um único canal de emissão. Assumindo que a amostra é excitada com luz polarizada verticalmente e sendo a emissão observada através de um monocromador, esse normalmente apresenta uma eficiência de transmissão diferente para a luz polarizada verticalmente e horizontalmente. A rotação (de horizontal para vertical e vice-versa) do polarizador de emissão proporciona como consequência medidas de intensidades incorretas que necessitam de correção. Essa correção é realizada pela incorporação de uma constante denominada de fator instrumental G na Equação 5. O fator instrumental G pode ser determinado experimentalmente para cada equipamento e, dessa forma, a anisotropia de fluorescência é melhor determinada pela seguinte relação (LAKOWICZ, 1999):

1.2.5 *Docking* molecular

O planejamento e a descoberta de novos fármacos dentro da área de desenho de fármacos envolve a compreensão dos mecanismos do reconhecimento molecular receptor- ligante, além de ser um dos principais desafios da biologia molecular. Dessa maneira, realizar uma abordagem detalhada e automatizada do processo de reconhecimento molecular receptor- ligante, utilizando métodos computacionais, reduz o tempo e alto custo para o desenvolvimento de novos fármacos. Atualmente, o desenvolvimento racional de novos medicamentos tornaram os métodos computacionais uma parte importante e indispensável de pesquisas associadas à química medicinal e teórica computacional. Um dos principais métodos utilizados na pesquisa de desenvolvimento racional de novos fármacos é o *docking* molecular, e vem atraindo o interesse de universidade, indústrias farmacêuticas e empresas de biotecnologia em todo o mundo (MORGON et al., 2007).

O fundamento do *docking* molecular receptor-ligante consiste na predição do modo de ligação de uma pequena molécula ligante (inibidor) na região de ligação (sítio ativo) de um alvo molecular, e na quantificação da afinidade entre o receptor e o ligante. Alvos moleculares podem ser proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, correlacionados a uma patologia para qual pretende-se desenvolver um tratamento. O reconhecimento molecular trata-se de processo dinâmico de grande complexidade que envolve muitas interações intermoleculares entre o receptor, o ligante e o solvente. No decorrer do processo de *docking* molecular tanto o receptor como o ligante sofrem diversas modificações conformacionais, implicando em centenas de milhares de graus de liberdade (MORRIS et al., 1998; MORGON et al., 2007).

O reconhecimento receptor-ligante depende de características estruturais e físico-químicas das moléculas que estão interagindo, sendo que as características estruturais definem os arranjos espaciais moleculares, posições espaciais moleculares, rotação de ligações covalentes das moléculas envolvidas e as características físico-químicas especificam o grau de afinidade e especificidade entre as moléculas interagentes, dados por interações intermoleculares como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes (MORGON et al., 2007).

Diversos programas de modelagem molecular estão disponíveis para a pesquisa científica, tais como: GOLD, DOCK, AutoDock, AutoDock Vina, FlexX, LUDI, ChemScore e outros. O AutoDock Vina foi o programa de modelagem molecular usado neste trabalho, visto que esse é um dos mais utilizado pela comunidade científica para as pesquisas de reconhecimento molecular e

também proporciona resultados confiáveis e de boa concordância com os dados experimentais (TROTT; OLSON, 2010).

O AutoDock Vina (referido por diante como Vina) é uma nova geração de programa de *docking* molecular desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa que criou o AutoDock (GOODSELL; MORRIS; OLSON, 1996; MORRIS et al., 2009). Em testes comparativos com o AutoDock, o Vina alcançou uma “velocidade computacional” aproximadamente duas ordens de grandeza maior do que o AutoDock, quando relacionado a interação de uma única molécula e também melhorou significativamente a acurácia das predições de modo de ligação. Vale mencionar que a realização de *docking* molecular realizada pelo Vina tornou o procedimento mais simples e automatizado, uma vez que esse programa requer mínima preparação das estruturas moleculares da proteína e do ligante, e os cálculos de mapas grade (*grid maps*) e de clusterização/análise dos modelos de ligação gerados são executados automaticamente sem expor o usuário para intermediar detalhes. Portanto, pode-se dizer que o AutoDock Vina é uma versão simplificada e otimizada do AutoDock; entretanto, deve-se ressaltar que as funções de pontuação ou *scoring* desses programas são diferentes. Geralmente, os programas de *docking* molecular como o AutoDock fazem uso de uma função *scoring* que pode ser entendida como uma tentativa de aproximar os potenciais químicos padrão do sistema, aplicando termos físicos como por exemplo as interações de van der Waals e as energias Coulomb ponderados empiricamente. Por outro lado, a função *scoring* do Vina é empregada como um método de “aprendizagem de máquina” (*machine learning*) do que diretamente baseada na natureza física do problema (TROTT; OLSON, 2010).

A forma funcional geral da parte dependente de conformação da função *scoring* do Vina é arquitetada para trabalhar com:

(7)

sendo que a soma é sobre todos os pares de átomos que podem se mover em relação uns aos outros, normalmente excluindo interações 1-4, ou seja, átomos separados por 3 ligações covalentes consecutivas. Cada átomo i é atribuído um tipo t_i , e um conjunto simétrico de funções de interação

da distância interatômica r_{ij} . Esse valor c pode ser visto como uma soma de contribuições intermoleculares e intramoleculares, $c_{inter} + c_{intra}$. O algoritmo de otimização tenta encontrar o mínimo global de c e outras conformações de reduzido *scoring*, as quais são então classificadas.

A energia livre de ligação predita é calculada a partir da parte intermolecular da conformação de menor *scoring*, descrita como 1:

), (8)

sendo que g pode ser uma função suave possivelmente não linear e arbitrariamente crescente. No resultado final, outras conformações de reduzido *scoring* são também recebem formalmente valores de s , mas para controle da classificação, usa-se o valor de c_{intra} do mode de ligação com menor *scoring*, $s_i = g(c_i - c_{intra1})$.

As funções de interação $f_{t_it_j}$ são definidas em relação à distância da superfície

:

(9)

sendo que r_t é o raio de van der Waals do átomo tipo t . Na função *scoring* do Vina, s_i é uma soma ponderada de interações estéricas (ponderação $\times$ função: $-0,0356 \times gauss_1, -0,00516 \times gauss_2$ e $0,840 \times$ repulsão), idêntica para todos os pares de átomos, interação hidrofóbica entre átomos hidrofóbicos (ponderação: $-0,0351$), e, quando aplicável, ligação de hidrogênio (ponderação: $-0,587$). Os termos estéricos são dados por:

(10)

(11)

(12)

O termo hidrofóbico é igual a 1, quando $d < 0,5 \text{ \AA}$; 0, quando $d > 1,5 \text{ \AA}$, e é linearmente interpolado entre esses valores. O termo de ligação do hidrogênio é igual a 1, quando $d < 0,3 \text{ \AA}$; 0, quando $d > 0,5 \text{ \AA}$, e é linearmente interpolado no entre esses valores. Nesta implementação, todas as funções de interação são restringidas em $r_{ij} = 8 \text{ \AA}$. A Figura 9 mostra a função *scoring* resultante para diferentes combinações dos termos estéricos, hidrofóbico e de interação de pontes de hidrogênio.

A função independente de conformação g foi escolhida como sendo:

(13)

sendo que N_{rot} é o número de ligações rotativas ativas entre átomos pesados no ligante e w é o fator de ponderação associado (0,0585) (TROTT; OLSON, 2010).

bolso hidrofóbico no N-NTD proporciona uma ação específica e seletiva de inibição do processo replicativo do hRSV.

6. Conclusão e Perspectivas

A principal conclusão do presente trabalho é a evidência da ligação específica e seletiva da hesperetina no bolso hidrofóbico do N-terminal da proteína N, ou seja, no sítio de interação nucleoproteína/fosfoproteína do hRSV, o que corrobora com os resultados publicados por Kaul e colaboradores que identificaram esse composto polifenólico como um potencial antiviral devido a sua ação inibitória contra o processo replicativo do hRSV. Ouizougoun-Oubari e coautores (2015) reportaram que compostos sintético com o *scaffold* 1-benzil-1H-pirazol-3,5-dicarboxilato (BPdC) ligam-se ao sítio hidrofóbico no N-NTD e apresentam uma atividade antireplicativa contra o vírus sincicial respiratório; entretanto, o flavonoide hesperetina identificado no presente estudo fornece uma base natural polifenólica de fácil obtenção, como exemplo pode ser extraído da laranja, que poderia passar por modificações químicas com o objetivo de diminuir a constante de dissociação da sua interação com o domínio N-NTD, proporcionar um aumento do seu efeito antireplicativo contra hRSV e possivelmente garantir uma redução da sua citotoxicidade celular. Dessa forma, uma das perspectivas do presente trabalho é propor a adição de grupo(s) químico(s) na estrutura da hesperetina com a finalidade de alcançar os resultados acima citados, assim como também testar outros grupos flavonoides. Portanto, o objetivo final dos resultados somados as perspectivas é encontrar um candidato antiviral com expressivo potencial de ação contra o ciclo replicativo do vírus sincicial respiratório humano.

REFERÊNCIAS

- ANGULO, J.; ENRÍQUEZ-NAVAS, P. M.; NIETO, P. M. Ligand-Receptor Binding Affinities from Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy: The Binding Isotherm of STD Initial Growth Rates. **Chemistry- A European Journal**, 16(26), 7803–7812, 2010.
- ASENJO, A.; VILLANUEVA, N. Phosphorylation of the human respiratory syncytial virus P protein mediates M2-2 regulation of viral RNA synthesis, a process that involves two P proteins. **Virus Res.**, v. 211, p. 117-125, 2016.
- BERMINGHAM, A.; COLLINS, P. L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 11259-11264, 1999.
- CIANCI, C.; MEANWELL, N.; KRYSTAL, M. Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor, **J. Antimicrob. Chemother.** 55 289–292, 2005.
- COLLINS, P. L.; HILL, M. G.; CRISTINA, J.; GROSFELD, H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. **PNAS**, v. 93, p. 81-85, 1996.
- COLLINS, P. L.; CROWE JR, J. E. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology.**, Lippincott Williams & Wilkins, p. 1601-1646, 2007.
- COLLINS, P. L.; KARRON, R. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (Eds.), **Fields Virology.**, 6^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- COOPER, A. DSC Interpretation Notes. [Internet]. Disponível em: <http://www.chem.gla.ac.uk/staff/alanc/dscbrief.pdf>. 2001.
- FALSEY, A. R.; HENNESSEY, P. A.; FORMICA, M. A.; COX, C.; WALSH, E. E. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, p. 1749-1759, 2005.
- DELANO, W.L. PyMol: An open-source molecular graphics tool. The PyMOL Molecular Graphics System. **DeLano Scientific**, 2002.
- DOLINSKY, T. J.; NIELSEN, J. E.; MCCAMMON, J. A.; BAKER, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Res.** 32(Web Server issue):W665-7, 2004.
- GALLOUX, M.; TARUS, B.; BLAZEVIC, I.; FIX, J.; DUQUERROY, S.; ELÉOUËT, J.F. Characterization of a Viral Phosphoprotein Binding Site on the Surface of the Respiratory Syncytial Nucleoprotein. **Journal of Virology**, v. 86, p. 8375–8387, 2012.
- FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E.; ROBB, M.A.; et al.; Gaussian 09, Revision A.02. Gaussian Inc. Wallingford CT. **Cheeseman, J.R.**, 2009.
- GESKEY, J.M.; THOMAS, N.J.; BRUMMEL, G.L. Palivizumab: a review of its use in the protection of high risk infants against respiratory syncytial virus (RSV), **Biologics** 1 33–43, 2007.
- GHILDYAL, R.; MILLS, J.; MURRAY, M.; VARDAXIS, N.; MEANGER, J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. **J. Gen. Virol.**, v.83, p. 753-757, 2002.
- GHILDYAL, R.; HO, A.; WAGSTAFF, K. M.; DIAS, M. M.; BARTON, C. L.; JANS, P.; BARDIN, P.; JANS, D. A. Nuclear import of the respiratory syncytial virus matrix protein is mediated by importin beta1 independent of importin alpha. **Biochemistry**, v. 44, p. 12887-12895, 2005.
- GROTEWOLD, E. The Science of Flavonoids, New York: Springer, 2006.
- GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, 1(6), 2876–2890, 2007.
- HALL, C. B.; WEINBERG, G. A.; IWANE, M. K.; BLUMKIN, A. K.; EDWARDS, K. M.; STAAT, M. A.; AUINGER, P.; GRIFFIN, M. R.; POHLING, K. A.; ERDMAN, D.; GRIJALVA, C. G.; ZHU Y.; SZILAGYI P. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. **N. Engl. J. Med.**, v. 360, p. 588-598, 2009.
- HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSELL, D. S. Software News and Update, A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, p. 1145-1152, 2007.
- JACOBS, M. R.; GRACE, M.; BLUMLEIN, A.; MCMANUS, J. J. Differential Scanning Calorimetry to Quantify Heat-Induced Aggregation in Concentrated Protein Solutions. **Protein Self-Assembly**, 117–129, 2019.
- KAUL, T. N.; MIDDLETON, E. J.; OGRA, P.L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses, **J. Med. Virol.** v. 15, p. 71–79, 1985.
- KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 1751(2), 119–139, 2005.
- KHATTAR SK, YUNUS AS, SAMAL SK. Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P and P-L interactions using a minigenome system. **J Gen Virol**, v. 82, p.775–779, 2001.

- LAGANÁ, M.T.C.; FARO, A.C.M.; ARAÚJO, T.L. A problemática da temperatura corporal enquanto um procedimento de enfermagem: conceitos e mecanismos reguladores. *Revista Da Escola de Enfermagem Da USP*, v. 26, p.173–186, 1992.
- LAMB, R. A.; PARKS, G. D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; p. 1449-1496, 2006.
- LAKOWICZ J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, second ed., Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, New York, 1999.
- LIU C.; DAY, N. D.; BRANIGAN, P.; GUTSHALL, L. L.; SARISKY, R. T.; DEL VECCHIO, A. M. Relationship between the loss of neutralizing antibody binding and fusion activity of the F protein of human respiratory syncytial virus. *Viol. J.*, v. 4, 2007.
- MARINHEIRO, J. C.; SANALIOS, R. B.; SANTOS, D. C.; COSTA, C. A.; HÁRSI, C. M. Duplex-PCR assay for the detection of adenovirus and respiratory syncytial virus nasopharyngeal samples. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 118-120, 2009.
- MARTÍNEZ, I.; LOMBARDÍA, L.; GARCÍA-BARRENO, B.; DOMÍNGUEZ, O.; MELERO, J. A. Distinct gene subsets are induced at different time points after human respiratory syncytial virus infection of A549 cells. *J. Gen. Virol.*, v. 88, p. 570-581, 2007.
- MATSUO, K.; SAKURADA, Y.; YONEHARA, R.; KATAOKA, M.; GEKKO, K. Secondary-Structure Analysis of Denatured Proteins by Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 92(11), 4088–4096, 2007.
- MITRA, S.; KUMAR, D.; HU,L; SANKARAN,B.; MOOSA,M.M; RICE, A.P.; FERREON, J.C.; FERREON, A.C.M.;PRASAD, B.V.V. Influenza A virus protein NS1 exhibits strain-independent conformational plasticity. *Journal of Virology*, v.00917-19, 2019.
- MORRIS, S. K.; DZOLGANOVSKI, B.; BEYENE, J., SUNG L. A meta-analysis of the effect of antibody therapy for the prevention of severe respiratory syncytial virus infection. *BMC Infect. Dis.*, v. 09, 2009.
- NOCEDAL, J.; WRIGHT, SJ. Numerical optimization. Berlin: Springer Series in Operations Research. **Springer**; 1999.
- OLSSON, M. H. M.; SONDERGAARD, C. R.; ROSTKOWSKI, M.; JENSEN, J. H. J. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *Chem. Theory Comput.*, v. 7, p. 525, 2011.
- OUIZOGUN-OUBARI, M. ET AL. A Druggable Pocket at the Nucleocapsid/Phosphoprotein Interaction Site of Human Respiratory Syncytial Virus, *Journal of Virology*, v.89, p. 11129- 11143, 2015.
- OTHUMPANGAT, S.; GIBSON, L. F.; SAMSELL, L.; PIEDIMONTE, G. NGF is essential survival factor for bronchial epithelial cells during respiratory syncytial virus infection. *PLoS ONE*, v. 04, p. 1-13, 2009.
- PEREZ, M.; GARCIA-BARRENO, B.; MELERO, J. A.; CARRASCO, L.; GUINEA, R. Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology*, v. 235, p. 342-351, 1997.
- RICCETTO, A. G. L.; SILVA, L. H. A.; SPILKI, F. R.; MORCILLO, A. M.; ARNS, C. W.; BARACAT, E. C. E. Genotypes and clinical data of respiratory syncytial virus and metapneumovirus in brazilian infants: A new perspective. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 13, n. 1, p 35-39, 2009.
- SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v.17, p. 57–61, 1999.
- SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAUDE DO BRASIL. Influenza: Monitoramento até a semana epidemiologica 17 de 2019. Brasil; 2019. [acesso em 06 agosto 2019]. Disponível : <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/08/Informe-influenza-SE17-maio-2019b.pdf>
- SHAPIRO, A.B.; GAO, N.; O'CONNELL. N.;HU, J.; THRESHER, J.;GU, R.; OVERMAN, R.; HARDERN, I.M.; SPROAT, G.G. Quantitative investigation of the affinity of human respiratory syncytial virus phosphoprotein C-terminus binding to nucleocapsid protein. *Virology Journal*, 2014, :191.
- SHI, T., MCALLISTER, D. A., O'BRIEN, K. L., SIMOES, E. A. F., MADHI, S. A., GESSNER, B. D., et al. (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *The Lancet*, 390(10098), 946–958, 2017.
- SPANN, K. M.; TRAN, K. C.; CHI, B.; RABIN, R. L.; COLLINS, P. L. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages., *J. Virol.*, v. 78, p. 4363-4369, 2004.
- TRAN, T. L. et al. The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 196–206, 2007.
- TAWAR R. G. et al. Crystal Structure of a Nucleocapsid-Like Nucleoprotein-RNA Complex of Respiratory Syncytial Virus. *Science*, v. 326, p. 1279-1285, 2009.

- TROTT, O.; OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J Comput Chem**, v. 30, p. 455–461, 2010.
- VIEGAS, A.; MANSO, J.; NOBREGA, F.L.; Cabrita, E.J. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. **J. Chem. Educ.**, 88 (7), pp. 990–99, 2011..
- VILLANUEVA N, HARDY R, ASENJO A, YU Q, WERTZ G. The bulk of the phosphorylation of human respiratory syncytial virus phosphoprotein is not essential but modulates viral RNA transcription and replication. **J Gen Virol**, v. 81, p.129–133, 2000.
- WALLACE, A.C.; LASKOWSKI, R.A. ; THORNTON, J.M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng.**, v. 8, p. 127–134, 1995.
- YE, X; IWUCHUKWU, O.P.; AVADHANULA, V.; AIDEYAN, L.O.; MCBRIDE, T.J.; FERLIC-STARK, L.L.; PATEL, K.D.; PIEDRA, F.A.; SHAH, D.P.; CHEMALY, R.F.; PIEDRA, P.A. Antigenic Site-Specific Competitive Antibody Responses to the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Were Associated With Viral Clearance in Hematopoietic Cell Transplantation Adults. **Front Immunol**, v. Mar 29, p-10:706, 2019.