

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 18/12/2020



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

Mírian Feliciano da Costa

Docking, Dinâmica Molecular e Redes Neurais Artificiais na busca
por flavonoides anti-RSV

São José do Rio Preto
2018

Mírian Feliciano da Costa

Docking, Dinâmica Molecular e Redes Neurais Artificiais na busca
por flavonoides anti-RSV

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^a. Dra. Karina Alves de Toledo

Co-orientador: Prof^a. Dra. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto
2018

Costa, Mírian Feliciano da.

Docking, Dinâmica Molecular e Redes Neurais Artificiais na busca por flavonoides anti-RSV / Mírian Feliciano da Costa . – São José do Rio Preto, 2018

211 f.: il., grafs., tabs.

Orientador: Karina Alves de Toledo

Coorientador: Fátima Pereira de Souza

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Microbiologia. 2. Quercetina. 3. Proteínas. 4. Flavonóides.
5. Vírus Sincicial Respiratório Humano. I. Título.

CDU – 576.858

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

Mírian Feliciano da Costa

Docking, Dinâmica Molecular e Redes Neurais Artificiais na busca
por flavonoides anti-RSV

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a Dra. Karina Alves de Toledo
UNESP – Assis
Orientadora

Prof. Dr. Aripuanã Watanabe
UFJF – Juiz de Fora

Prof. Dr. Luís Octávio Regasini
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. José Celso Rocha
UNESP – Assis

Dra. Luciane Sussuchi da Silva
Hospital do Câncer de Barretos

Assis
18 de dezembro 2018

À minha mãe, minha inspiração.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é uma das formas mais belas e nobres de expressarmos nosso apreço por estarmos vivos e pelas oportunidades de (con)vivência e de aprendizado. A vida é uma confluência de nossos relacionamentos, do quanto somos influenciados por eles e das escolhas que fazemos, onde quer que estejamos. Não há como acreditar em Deus sem acreditar que Ele usa pessoas e nossos relacionamentos com elas para moldar a dimensão de e o nosso relacionamento para com Ele. Poucas páginas não são suficientes para mensurar o quanto eu tenho a agradecer, por tudo que vivi e aprendi nesta etapa, com pessoas maravilhosas e também com outras nem tanto assim.

Sou grata primeiramente à Deus. Pelo dom da fé, pela vida, pela provisão e pela capacitação em mais este percurso. Por me agradecer com pessoas fantásticas e corajosas que toparam, digamos que “voluntariamente”, dividir mais esta jornada desafiadora comigo. Isso já seria o suficiente por ser dito, mas os corajosos merecem ser mencionados. Então vamos lá...

Aos meus pais – Anselmo e Edna – e às minhas irmãs – Débora e Priscila – os quais compõem minha agência de fomento emocional, psicológico e também financeiro. Eles compartilharam momentos únicos de alegria e vitórias, e também dividiram angústias, incertezas, dificuldades. Entretanto, estiveram sempre ali torcendo por mim e me animando a prosseguir. “*No abraço distante, ao seu lado...*” Não tenho palavras para mensurar minha gratidão a eles.

Ao meu querido – Terkimbi –, por, dentre tantos outros motivos, auxiliar-me a manter em perspectiva o essencial e a não me deixar abalar por circunstâncias e pessoas não-favoráveis.

Aos meus sobrinhos – Maria Eduarda e Miguel – pelo olhar terno, simples e belo que me animou a continuar.

À minha orientadora – Karina – por todas as (con)vivências e ensinamentos. Isso já diz muito. Também pelo exemplo pessoal de superação e de humildade, pelo apoio, pela amizade, por me encorajar a alcançar voos maiores e melhores e pelos conselhos de resiliência em momentos oportunos.

À professora Fátima pela co-orientação e pela amizade. E também ao Ícaro, pela sua sempre constante disponibilidade em ajudar.

Ao professor José Celso pela orientação e pelo suporte com a parte de Redes Neurais. Ao Diogo pela disposição em sempre ajudar. E à professora Juliana pelas dicas, pela amizade e pela ajuda com esse aspecto também.

Ao programa de pós-graduação (PPG) em Microbiologia pelas oportunidades de aprimoramento.

À seção de PG pela prestatividade e em especial aos funcionários Alex e Felipe pela solicitude.

À professora Eleni, por ser exigente e com isso ter me incentivado a me aperfeiçoar e a crescer profissionalmente. E na figura dela eu agradeço a todos os professores de toda essa minha longa jornada de conhecimento e aprendizado. Desde a mais tenra idade, aqueles que me abriram o mundo às letras, às palavras, à diversidade de linguagens, bem como os que ensinaram a poesia divina traduzida na matemática e nas suas proporções, na dança dos átomos orquestrada pela química e pela física e representada na biologia e na geografia, e assim também os arranjos sociais, suas flutuações e excentricidades ao longo do tempo. Muito obrigada! A maioria de vocês realmente professou o conhecimento e iluminou a '*sem luz*' aqui (essência do vocábulo "*aluno*") através de suas aulas e dos conhecimentos que me foram passados, permitindo-me galgar muitos desafios, dentre os quais mais este.

Ao projeto Erasmus-IBrasil pela bolsa e pela oportunidade de intercâmbio na Universidade De Roma – *Tor Vergata*.

Ao professor Alessandro Desideri por me possibilitar realizar os experimentos de dinâmica molecular em seu laboratório.

Aos meus colegas de laboratório de Roma – Federico, Blasco, Francesca, Daniele, Jéssica, Fábio(s), Kumar, Bini, Jeg, Venn – pelos bons momentos. Em especial ao Federico, pela paciência em me ensinar e em me orientar durante o tempo em que estive ali... "*Se hai fatto bene, funziona!*" E também a Jessiquinha, Kumar, Bini, Jeg e Kassim pelo auxílio mútuo e por todos finais de semana em que estivemos juntos. "*Good friends, good wine, good times.*"

Minha profunda gratidão à Joseane Scarpassa, ao Guilherme, ao senhor César e à dona Célia por todas acolhidas carinhosas durante as inúmeras idas e vindas para São José do Rio Preto.

Aos meus amigos de Assis Naiana, Pedro, Letícia, Júlia, Gilsomar, Fabiana, e Silvânia pelas alegrias, vivências compartilhadas e os três últimos pelo encorajamento na fé.

Aos meus companheiros de laboratório pelos (onipresentes) cafés e aprendizados, e pelas memórias pitorescas (“depois de mim sou eu”) ... Amandinha, Venon (Gabriela), Pri, Lari, Bruno... Obrigada! Em especial ao último pelo auxílio com os vídeos das dinâmicas.

À Capes pela bolsa.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

Finalmente, gratidão a você que dispôs de seu tempo para ler esta tese. Espero que, ao final, você possa perceber que o conhecimento é uma jornada: de busca, de expansão, de contradição, e de reticências... A qual nos confere humildade, pelo simples fato de que quanto mais nela avançamos, mais conscientes nos tornamos da veracidade contida no *“Só sei que nada sei”* de Sócrates... E que essa jornada nos abre os olhos, a mente e a sensibilidade, e nos leva a enxergar e ir além... E que isso vale à pena!

“O seu tempo é a sua vida (...) e por isso o melhor presente que você pode dar a alguém é o seu tempo...” Rick Warren

Minha inestimável gratidão a vocês e àqueles que porventura minha memória tenha ofuscado os nomes... Muito obrigada!

*“Não repreenda o zombador, caso contrário ele o odiará; repreenda o sábio, e ele o
amará.
Instrua o homem sábio, e ele será ainda mais sábio; ensine o homem justo, e ele
aumentará o seu saber.”
(Provérbios 9:8,9)*

*“O amor é a última consequência do conhecimento.”
(Mário César Rodrigues)*

*“Você, Quaresma, é um visionário...”
(Lima Barreto)*

RESUMO

Respirar é essencial à sobrevivência humana, tal que o trato respiratório é alvo frequente de patógenos. O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) causa bronquiolite e pneumonia, especialmente em recém-nascidos e idosos, o que resulta em milhões de mortes e hospitalizações. Sua glicoproteína de superfície F – proteína de fusão – é responsável pela fusão do envelope viral à membrana celular. Diversos flavonoides demonstram atividade anti-RSV por meio do mecanismo virucida. Assim, os objetivos desse trabalho foram analisar a interação da proteína F modelada neste trabalho (RSVmF) com o flavonoide quercetina, seu derivado pentacetilado (Q1) e um ligante-referência (JNJ-2408068) por *docking* e dinâmica molecular (DM). Ademais, elaboramos uma rede neural artificial (ANN) assessorada pelo algoritmo genético para prever a capacidade anti-RSV de flavonoides. A modelagem da estrutura completa da proteína F, os *dockings*, a DM, e a ANN foram realizados, respectivamente, no servidor I-TASSER, no Auto-Dock/Vina 1.1.2., no Amber/14, e na plataforma Matlab®. Os experimentos de *docking* indicaram que os três ligantes preenchem a cavidade central de RSVmF e apresentam energia de interação em torno de -6,5 kcal/mol. Análises de DM revelaram tendência ao escape da cavidade para quercetina, enquanto Q1 e ligante-referência permanecem nela. Cálculos de MM-GBSA mostraram ΔG (kcal/mol) dos complexos RSVmF-quercetina= -4,92, RSVmF-Q1= -14,22, e RSVmF-inibidor = -22,78. Logo, a acetilação da quercetina aumentou sua capacidade virucida por favorecer a interação com a cavidade de RSVmF. Quanto à ANN, os resultados obtidos a partir de uma amostra (n=240 dados, referentes a 70 flavonoides), indicaram três possíveis modelos de predição, dentre os quais ANN-g2 obteve uma acurácia de 90% para predição de flavonoides “ativos” e 93,3% para “inativos”. O principal ganho referente ao nosso estudo é o respaldo à relevância de um planejamento racional de procedimentos experimentais, pela exclusão preliminar de flavonoides inativos e a pré-seleção de ativos.

Palavras-chave: RSV. Quercetina. Derivado de quercetina. Proteína F. Docking. Dinâmica Molecular. Redes Neurais Artificiais.

ABSTRACT

Breathing is a basic requirement for survival of human life and the respiratory tract is therefore a frequent target for pathogens. Respiratory syncytial virus (RSV) causes bronchiolitis and pneumonia, mainly in newborns and the elderly, which results in millions of deaths and hospitalizations. Its surface glycoprotein F – fusion protein – is responsible for the fusion of the viral envelope to cell membrane. Several flavonoids were shown to exert anti-RSV activity by virucidal mechanism. Thus, the aims of this study were to analyze the interaction of the F protein modeled herein (RSVmF) in complex with flavonoid quercetin, with its pentacetylated derivative (Q1) and with a reference-ligand (JNJ-2408068), by docking and molecular dynamics (MD). Moreover, we developed an artificial neural network (ANN), assisted by the genetic algorithm to predict the anti-RSV activity of flavonoids. The modeling of the complete protein F structure, dockings, DM, and ANN were performed, respectively, on I-TASSER server, Auto-Dock/Vina 1.1.2., Amber/14, and Matlab® platform. Docking experiments indicated that the three ligands fill RSVmF central cavity and present an interaction energy of about -6.5 kcal/mol. MD analyses revealed an escaping trend from the cavity to quercetin, whereas Q1 and the reference-ligand remain in it. MM-GBSA calculations showed ΔG (kcal/mol) for the complexes RSVmF-quercetin= -4.92, RSVmF-Q1= -14.22, and RSVmF-inhibitor = -22.78. Therefore, the acetylation of quercetin increased its virucidal activity by favoring the interaction with RSVmF cavity. ANN results were obtained from a sample (n = 240 data, regarding 70 flavonoids) and indicated three possible predictive models, among which ANN-g2 revealed an accuracy of 90% for prediction of “active” flavonoids and 93.3% for “inactive” ones. The major achievement of our study is that it has demonstrated the relevance of rational planning of experimental procedures, by the preliminary exclusion of inactive flavonoids and the pre-selection of active ones.

Keywords: RSV. Quercetin. Quercetin derivative. F protein. Docking. Molecular Dynamics. Artificial Neural Networks.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – O sistema respiratório	22
Figura 2 – Tipos celulares e epitélios do sistema respiratório – traqueia/brônquios, bronquíolos e alvéolos	23
Figura 3 – Fatores intrínsecos e extrínsecos que interferem na resposta inflamatória nas vias aéreas	24
Figura 4 – Formação de sincícios pelo RSV	28
Figura 5 – Formação de sincícios in vitro	28
Figura 6 – Pleomorfismo do RSV	30
Figura 7 – Representação esquemática do RSV, de suas proteínas e de seu genoma	31
Figura 8 – Estrutura resolvida da Nucleoproteína – Proteína N – do RSV	33
Figura 9 – Estrutura resolvida da Proteína de Matriz – Proteína M – do RSV	34
Figura 10 – Proteína F: sua sequência e modificações.....	37
Figura 11 – Estruturas resolvidas da Proteína de Fusão – Proteína F – em seus estados de pré e pós fusão	38
Figura 12 – Estrutura resolvida da Proteína M2-1 do RSV	39
Figura 13 – O processo de fusão entre o envelope do RSV e a membrana celular.....	44
Figura 14 – Síntese do ciclo replicativo do RSV	46
Figura 15 – O RSV e seus mecanismos de evasão do sistema imune	48
Figura 16 – O ciclo viral do RSV e algumas estratégias de inibição	51
Figura 17 – A engenharia dos anticorpos.....	52
Figura 18 – Palivizumabe (MEDI-493)	52
Figura 19 – Os sítios antigênicos da proteína F	53
Figura 20 – A Ribavirina.....	54
Figura 21 – RSV-F modelada neste trabalho e o bolsão trissimétrico dentro de sua cavidade central	56
Figura 22 – Estrutura básica dos flavonoides e alguns de seus grupos	60
Figura 23 – Acetilação da quercetina	63
Figura 24 – Do DNA à Proteína - fluxograma simplificado	68

Figura 25 – Resumo das principais técnicas de modelagem de proteínas	71
Figura 26 – Representação básica de um Docking Molecular	72
Figura 27 – Cálculos envolvidos no campo de forças	76
Figura 28 – Fluxograma simplificado de Simulação de Dinâmica Molecular	77
Figura 29 – Redes Neurais	79
Figura 30 – Algoritmo genético	90
Figura 31 – Resumo metodologia	91
Figura 32 – RSV-F pré-fusão modelada (RSVmF).....	93
Figura 33 – Avaliação de RSVmF por resíduo	96
Figura 34 – Desvio Quadrático Médio (RMSD) de RSVmF.....	99
Figura 35– Flutuação quadrática média (RMSF) de RSVmF	101
Figura 36 – Estrutura secundária RSVmF.....	103
Figura 37– Eigenvalues da matriz de covariância de RSVmF	105
Figura 38 – Porção final de RSVmF e seus aminoácidos principais	108
Figura 39 – Docking molecular dos complexos RSVmF-quercetina, RSVmF-Q1 e RSVmF-JNJ	111
Figura 40 – Simulação de DM: RSVmF-QCT, RSVmF-Q1, RSVmF-JNJ	112
Figura 41 – Variação da distância RSVmF-ligantes.....	114
Figura 42 – Quercetina, Q1 e inibidor JNJ-2408068	119
Figura 43 – Acetilação da quercetina	121
Figura 44 – Primeira simulação ANN	127
Figura 45 – Agrupamento simulação 2.....	133
Figura 46 – Matrizes de confusão da simulação 2	134
Figura 47 – Curva ROC ANN	137
Figura 48 – Desempenho dinâmico ANN-g2.....	138

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – MM-GBSA: Quercetina, Q1 e JNJ-2408068	117
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise de Ramachandran para RSVmF e 4JHW	94
Tabela 2 – Persistência das ligações de hidrogênio entre RSVmF e quercetina/ligante-referência para uma simulação de 20 ns	116
Tabela 3 – Resultados binários da simulação 1	129
Tabela 4 – Hierarquia Ativos e Inativos.....	131
Tabela 5 – Parâmetros das melhores arquiteturas ANN	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANN *Artificial Neural Network*¹

CPU *Central Processing Unit*

CX3CR *CX3C chemokine receptor*

DM *Dinâmica Molecular*

DNA *DeoxyriboNucleic Acid*

2D *2 dimensões (bidimensional)*

FIP *Family Interacting Protein*

GCRR *G protein Cysteine-Rich Region*

GPU *Graphics Processing Unit*

HIV *Human Immunodeficiency Virus*

ICAM *Intercellular Adhesion Molecule*

IFN *Interferon*

Ig *Immunoglobulin*

IL *Interleucin*

IP *Interferon- γ -Inducible Protein*

MAVs *Mitochondrial AntiViral Signalling Protein*

MIP *Macrophage Inflammatory Protein*

mRNA *messenger RNA*

pDC *Plasmacytoid Dendritic Cell*

QSAR *Quantitative Structure-Activity Relationship*

Rab *Ras Related Protein*

RANTES *Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*

RNA *RiboNucleic Acid*

RSVmF *Proteína F modelada neste trabalho*

SAR *Structure-activity Relationship*

STAT *Signal Transducer and Activator of Transcription*

3D *3 dimensões (tridimensional)*

TLR *Toll-Like Receptor*

TNF *Tumor Necrosis Factor*

¹ A fim de evitar possíveis confusões com as siglas “RNA”, as quais podem ser referentes ao “ácido ribonucleico”, bem como às “redes neurais artificiais”, nós adotamos exclusivamente a

terminologia “ANN” para se referir às redes neurais artificiais.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1. INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 Infecções do trato respiratório	21
1.1.2 O vírus sincicial respiratório (RSV)	27
1.1.2.1 Ciclo do RSV	42
1.1.2.1.2 Estratégias Antivirais contra RSV	50
1.2 Flavonoides	58
1.3 Estratégias Computacionais	65
2. OBJETIVOS.....	83
3. METODOLOGIA	84
<i>3.1 Modelagem Molecular da Glicoproteína F do RSV</i>	<i>84</i>
<i>3.2 Preparação do modelo para simulação de Dinâmica Molecular (MD)</i>	<i>85</i>
<i>3.3 Protocolo de dinâmica molecular (MD)</i>	<i>85</i>
<i>3.4 Análises da simulação de MD</i>	<i>86</i>
<i>3.5 Procedimento de Docking Molecular</i>	<i>86</i>
<i>3.6 Elaboração da base de dados de flavonoides para Rede Neural Artificial</i>	<i>87</i>
3.7 ANN	88
3.8 Algoritmo genético (AG).....	89
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4.1 Modelagem de RSVmF, dinâmica molecular e análises	92
4.2 Docking e Dinâmica Molecular RSVmF-quercetina, RSVmF-Q1 e análises.....	110
4.3 ANN: elaboração e implementação	125
5. CONCLUSÃO	142

6. PERSPECTIVAS.....	144
REFERÊNCIAS	147
BIBLIOGRAFIA	178
APÊNDICE I – Manuscript draft.....	179
APÊNDICE II – Simulação de DM: RSVmF-QRC	202
APÊNDICE III – Simulação de DM: RSVmF-Q1	203
APÊNDICE IV – Simulação de DM: RSVmF-JNJ	204
APÊNDICE V – Variação da distância RSVmF-ligantes – CADEIA A	205
APÊNDICE VI – Variação da distância RSVmF-ligantes – CADEIA B	206
APÊNDICE VII – Variação da distância RSVmF-ligantes – CADEIA C	207
APÊNDICE VIII – Método MM-GBSA	208
APÊNDICE IX – Propriedades físico-químicas dos ligantes quercetina, Q1 e JNJ-2408068	209
APÊNDICE X – Primeira simulação ANN.....	210
APÊNDICE XI – Matrizes de confusão da simulação 2	211

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO GERAL

“One is too many.” (UNICEF)

Respirar é quesito básico para sobrevivência e, por conseguinte, o sistema respiratório é também o mais comumente afetado por infecções. Dados da **Organização Mundial da Saúde (OMS)** de 2015 mostram que a pneumonia é uma das principais causas de mortalidade infantil [1]. Embora no Brasil e em outras nações em desenvolvimento, o diagnóstico da causa das infecções respiratórias seja pouco explorado, o agente viral pioneiro e desencadeador dessas infecções nesses casos pediátricos é o pneumovírus vírus sincicial respiratório (RSV – do inglês *respiratory syncytial virus*) [2-9].

O RSV infecta vias aéreas superiores e pode se estender às inferiores de crianças, adultos e idosos, sendo mais crítico no primeiro e no terceiro grupo devido ao sistema imune deficitário. O vírus pode causar desde coriza evoluindo até bronquiolite e pneumonia, o que pode levar à morte. A cada ano, estima-se que 34 milhões de crianças sejam infectadas ao redor do mundo [5]. Em 2010, houve cerca de 253 mil mortes, a maioria em países em desenvolvimento [10].

O tratamento atualmente disponibilizado adota o uso de ribavirina, um composto com efeitos potencialmente tóxicos e eficácia questionável [3,4,11-13]. A prevenção é feita pela utilização de palivizumabe, um anticorpo monoclonal (Synagis®), aplicável em casos restritos, devido aos custos intrínsecos. Sua eficácia, no entanto, também tem sido questionada [9].

Desta forma, a busca por alternativas que substituam a ribavirina, e que também reduzam os custos com a prevenção dessa infecção continua patente. Tais compostos

terapêuticos devem reunir características desejáveis, tais como baixa toxicidade, segurança na administração, eficácia e, além disso, custo reduzido.

Estudos [12,14-18] mostram que o desenvolvimento da infecção por RSV depende de sinalização celular regulada pela liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os compostos fenólicos, provenientes de metabolismo secundário vegetal, possuem capacidade neutralizante de EROS. Representam, portanto, uma alternativa para modulação do processo inflamatório resultante de infecção por RSV, e, possivelmente, para redução da carga viral.

Dentre a diversidade de compostos fenólicos se encontram os flavonoides e entre as suas várias classes, os flavonóis tipo quercetina são os mais conhecidos. A literatura relata uma miríade de atividades sobre o potencial farmacológico da quercetina, os quais incluem desde propriedade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, até atividade antibacteriana [19-23] e antiviral [24-29]. No entanto, os mecanismos moleculares concernentes a tais atividades ainda não foram bem elucidados.

Visando compreender as interações químicas entre moléculas pequenas como a quercetina e proteínas-alvo, diversas ferramentas e estratégias computacionais vêm sendo propostas e utilizadas. O intuito é suplantando limitações experimentais no que concerne à observação das interações químicas a nível molecular e atômico, além de buscar de forma efetiva padrões de interesse presentes dentro desse universo químico. Assim, associadas à parte experimental essas ferramentas possibilitam um melhor entendimento do fenômeno em questão.

A proposta do presente trabalho foi investigar flavonoides inibidores da replicação do RSV através de ferramentas computacionais. Foram realizadas análises das interações moleculares da proteína de fusão (proteína F) do RSV em complexo com a quercetina, pelo uso de ferramentas da biologia estrutural – *docking* e a Dinâmica Molecular. Ao mesmo tempo, procurou-se avaliar como uma modificação estrutural na quercetina – a acetilação – poderia influenciar na capacidade de interação com essa mesma proteína. Além disso, desenvolvemos uma rede neural artificial associada ao algoritmo genético para categorização de flavonoides em “ativos” ou “inativos”, a partir

de determinados parâmetros de entrada. Buscamos otimizar a investigação por moléculas inibitórias pertencentes a essa classe por estabelecer um critério seletivo anteriormente à experimentação na bancada, o que implica em maior funcionalidade experimental, e redução de custos e tempo.

1.1 Infecções do trato respiratório

“Infância – A vida em technicolor...” (Mário Quintana)

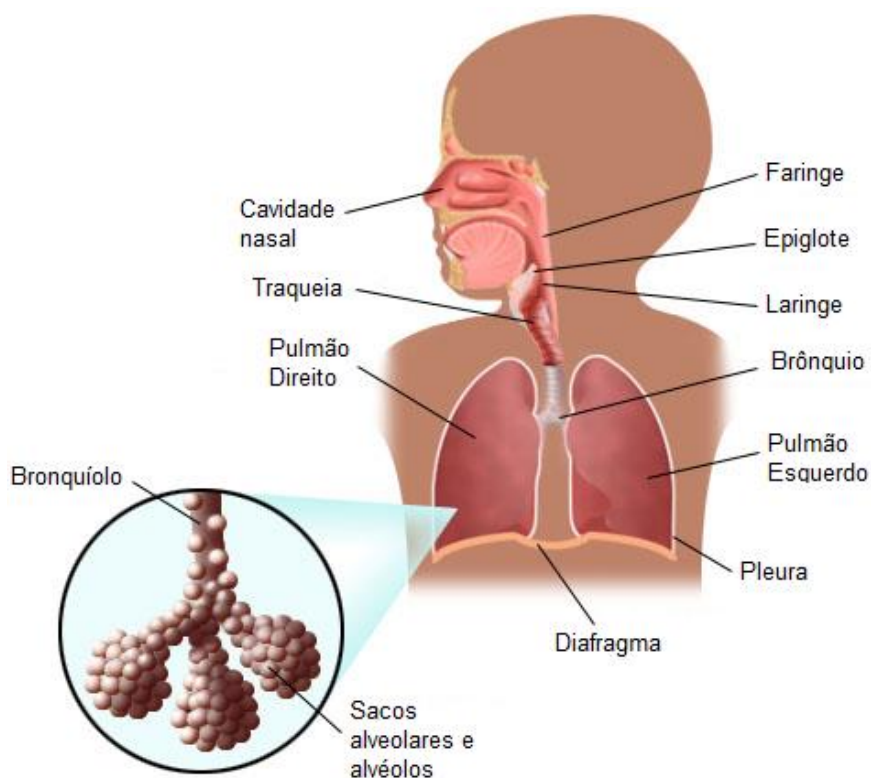
A respiração está diretamente relacionada à capacidade do nosso organismo de produzir energia e, portanto, é fundamental para nossa sobrevivência. Do latim *respirare*, composto de *re* = outra vez, e *spirare* = exalar, aspirar, inalar [30], a ação de espirar continuamente, em uma atmosfera previamente oxigenada, permitiu-nos e nos permite a permanência no planeta Terra. O radical *spir* ainda faz parte de uma gama de vocábulos presentes não só na língua portuguesa, como *espírito*, indicando, talvez, além de uma questão básica de sobrevivência, um elo transcendental da existência.

O sistema respiratório é dividido em trato respiratório superior (vias aéreas superiores) e trato respiratório inferior (vias aéreas inferiores). [Figura 1] O primeiro é formado pela cavidade nasal, faringe e laringe. O segundo é representado pela traqueia, a qual se ramifica em brônquios e bronquíolos, e pelos pulmões.

Esse sistema é revestido por tipos diferentes de epitélio, os quais atuam como barreira contra patógenos, alérgenos e quaisquer substâncias estranhas ao organismo [Figura 2]. A presença de cílios na superfície das células do sistema respiratório, bem como a produção de muco por estruturas especializadas visam dificultar a adesão de microrganismos e os degradar, tendendo, assim, a evitar as possíveis entradas de patógenos – infecção [31]. Ademais, as células do sistema respiratório também são capazes de secretar moléculas sinalizadoras – as citocinas* – as quais assinalam para o sistema de defesa – o sistema imune – de que uma possível inflamação e/ou infecção está ocorrendo ali, e de que o reparo e/ou o combate ao agente infeccioso é necessário.

“As citocinas/citoquinas formam um grupo grande de proteínas secretadas que apresentam uma variada gama de estruturas e de funções, e que regulam e coordenam muitas atividades das células do sistema imune inato e adaptativo [...] Entre suas muitas funções, as citocinas regulam crescimento e diferenciação das células imunes, ativação das funções efetoras de linfócitos e fagócitos, bem como o direcionamento das células imunes do sangue para o tecido e dentro do tecido. As citocinas que regulam a migração celular e o movimento são chamadas *quimiocinas*.” [31, tradução nossa]

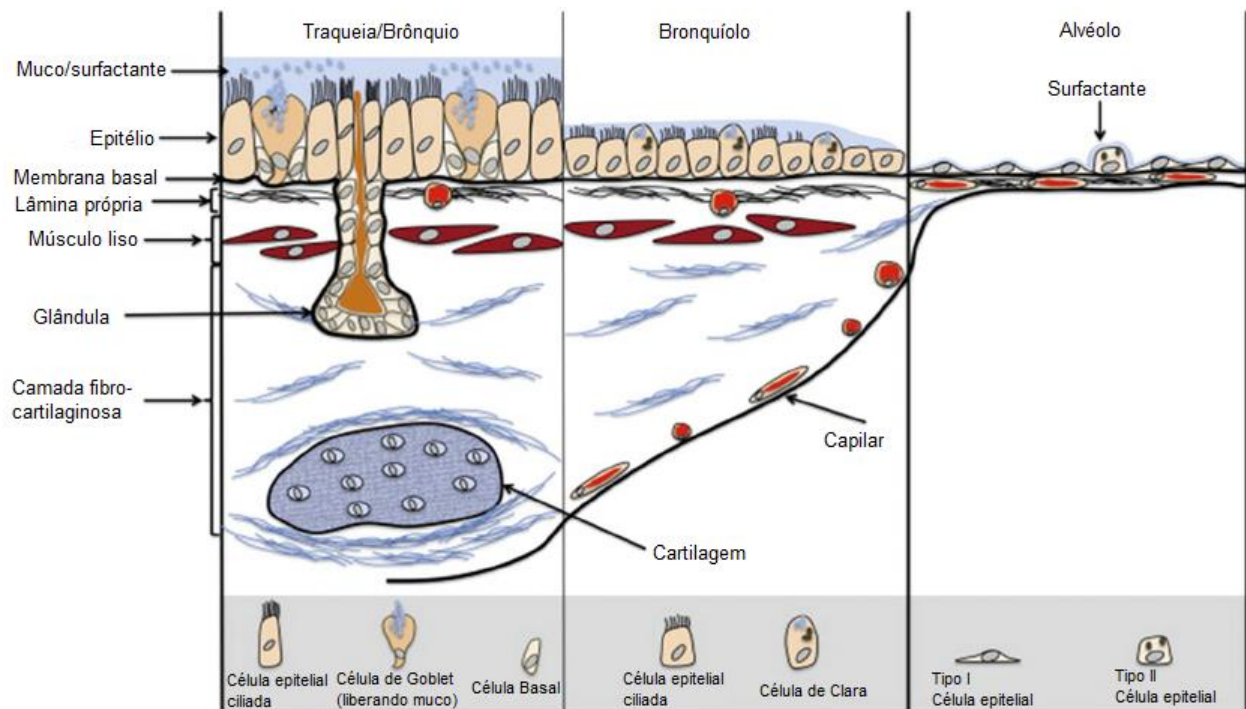
Figura 1 – O sistema respiratório



O sistema respiratório pode ser dividido em vias aéreas superiores e inferiores. As primeiras incluem a cavidade nasal, a faringe e a laringe. As segundas incluem a traqueia, ramificada em brônquios e bronquíolos, e os pulmões. Outra divisão possível é entre porção condutora (cavidade nasal, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos) e porção respiratória, na qual ocorrem as trocas gasosas (bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos).

Fonte: Adaptado [32].

Figura 2 – Tipos celulares e epitélios do sistema respiratório – traqueia/brônquios, bronquíolos e alvéolos

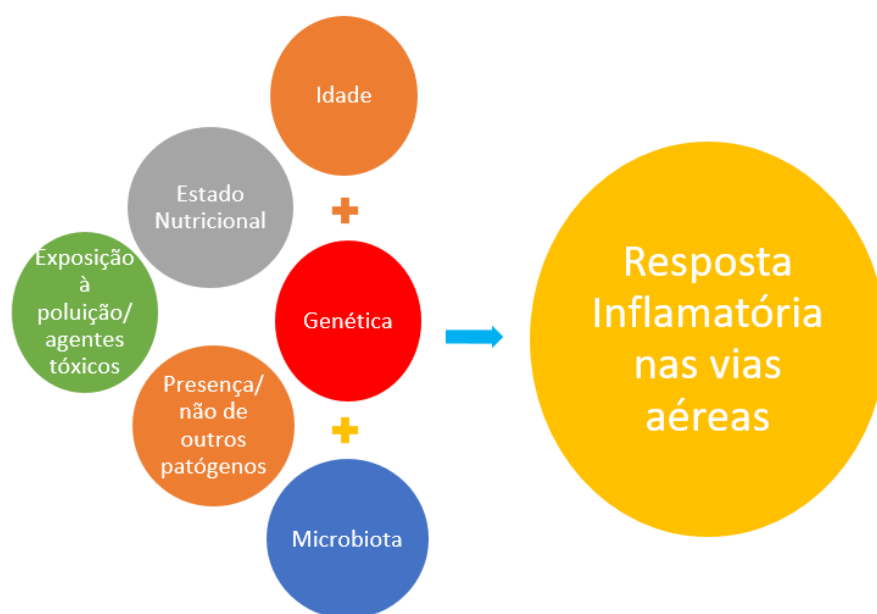


O epitélio da traqueia/brônquios é do tipo pseudo-estratificado ciliado com a presença de células de Goblet (também chamadas de células caliciformes) responsáveis pela produção de muco contendo mucinas e outras enzimas, cuja função é degradar alérgenos e alguns microrganismos. A produção de muco neste local tem papel fisiológico. Já nos bronquíolos, o epitélio é do tipo simples colunar/cúbico e ciliado com a presença de células de Clara (renomeadas células *Club* [33]), cuja função é excretar glicoproteínas, proteínas e enzimas, visando a defesa contra agentes estranhos, bem como auxiliando a evitar o colapso dos bronquíolos. Quanto aos alvéolos, há a divisão em dois tipos celulares: pneumócitos I, formando epitélio pavimentoso simples, e pneumócito II, compondo epitélio cúbico simples. A secreção de surfactantes aqui tem como função diminuir a tensão superficial e, assim, evitar o colapso do alvéolo. Fonte: Adaptado [34].

A elaboração da resposta inflamatória nas vias aéreas superiores e inferiores é dependente de diversos fatores, dentre os quais idade, estado nutricional (as condições socioeconômicas do indivíduo), genética, exposição à poluição e ao cigarro, dentre outros [2] [Figura 3]. Assim sendo, indivíduos cujo sistema imune ainda não esteja bem formado (idade), ou nos quais esse se encontre de alguma forma suprimido/deficiente (idade, estado nutricional, genética, exposição a agentes tóxicos, entre outros), apresentam

organismos potencialmente mais vulneráveis às infecções e aos danos causados por essas no sistema respiratório.

Figura 3 – Fatores intrínsecos e extrínsecos que interferem na resposta inflamatória nas vias aéreas



Diversos fatores influenciam na elaboração da resposta inflamatória nas vias aéreas. Alguns autores [revisto por [65,73](#)] defendem que a idade seja o aspecto mais determinante. Em recém-nascidos e crianças até 1-2 anos, o sistema imune ainda não está maduro o suficiente, tendendo a realizar uma resposta inflamatória mais alérgica, e nos idosos, o sistema está em declínio. Os outros fatores podem atuar sinergicamente em um quadro de infecção, ora auxiliando o sistema imune (genética com menor tendência alérgica, um bom estado nutricional, a não-exposição à poluição, ausência de coinfeções e uma microbiota com menor potencial patogênico) ou o prejudicando (genética tendencialmente alérgica, má-nutrição, exposição constante a agentes tóxicos, coinfeções, microbiota potencialmente patogênica).
Fonte: o autor

As infecções respiratórias representam a forma mais comum e facilmente disseminada de infecção entre os humanos. Entre seus diversos tipos epidemiológicos, as de origem viral são notórias e frequentes. Quem não se lembra dos surtos de gripe

suína e aviária de 2009 para cá? Ou também ao longo da história, como a pandemia da gripe espanhola de 1918? Isso porque o contágio ocorre, dentre outras formas, por meio de inalação de partículas virais [35], as quais podem ser, por exemplo, provenientes de um espirro de alguém contaminado que esteja próximo. Em épocas de inverno, nas quais a tendência é a aglomeração em ambientes fechados, potencializa-se a transmissão desses vírus. Além disso, em períodos secos, como é o caso do inverno na maior parte do Brasil, a falta de umidade favorece o acúmulo de partículas e poluentes no ar além de também contribuir para o ressecamento das mucosas do trato respiratório, o que propicia a irritação nas mesmas. A transmissão facilitada pelo agrupamento em ambientes fechados, associada à irritação das mucosas devido às condições climáticas e ainda a um sistema imune não completamente formado ou deficitário, são fatores que intensificam a propagação das infecções virais, além de as agravarem.

Dentre os vírus responsáveis pelas infecções respiratórias em humanos, sobressaem adenovírus, enterovírus, **coronavírus** (CoV), **metapneumovírus** (MPV), **rinovírus** (RV), influenza, parainfluenza e o vírus sincicial respiratório (RSV) [36]. Entre os mencionados, destacam-se influenza, RV e RSV. Os três ocasionam infecções respiratórias agudas (IRAs). O primeiro é a causa mais frequente de mortes relacionadas à pneumonia nas nações desenvolvidas [36]. O segundo é o responsável pelos resfriados comuns, e também por boa parte da exacerbação dos sintomas concernentes à asma [36]. E o último, é o maior motivo de hospitalização de crianças [36], predominantemente recém-nascidos, acarretando uma alta taxa de morbimortalidade dentro desse grupo.

Apesar de todos os avanços da ciência e dos esforços atingidos no setor da saúde, principalmente com o desenvolvimento da Epidemiologia [37] e, por conseguinte, do foco no desenvolvimento de estratégias de prevenção e de cuidados em um determinado tempo e contexto histórico, as IRAs em crianças e recém-nascidos permanecem como problema de saúde pública, seja no Brasil [38-44] ou mundialmente [3-5,45-47]. Estima-se que as doenças pulmonares obstrutivas crônicas e as infecções respiratórias estarão entre as seis maiores causas de morte no ano de 2030 [48,49]. A alta taxa de morbimortalidade infantil relacionada às IRAs em países em desenvolvimento decorre,

dentre outros fatores, de agravamentos consequentes a elas, tais como infecções bacterianas secundárias, além de infecções do trato respiratório inferior (ITRI), nomeadamente pneumonia clínica (bronquiolite e pneumonia). O Brasil figura entre os 15 países com números expressivos de casos de pneumonia clínica em crianças menores de 5 anos (1,8 milhão), atingindo uma taxa estimada em 0,11 episódio/criança-ano [41]. E o estado de São Paulo aparece como líder nas taxas de óbitos infantis por IRAs em crianças menores de 5 anos, segundo dados do Ministério da Saúde [50], com uma taxa de 454 óbitos para o ano de 2011.

É na infância que se configuram grande parte das potencialidades de um indivíduo. Assim, os distúrbios que acontecem nessa fase suscitam graves consequências não só pessoais como também sociais, de forma que a saúde da criança representa uma prioridade [51], justamente por caracterizar o capital humano de uma nação. O coeficiente de mortalidade infantil além de ser um indicativo de saúde, ainda mostra a eficácia das políticas públicas de atendimento às mães e aos recém-nascidos [51,52]. A redução da mortalidade infantil, é um dos objetivos da **Organização Mundial da Saúde (OMS)** [53], por meio da implementação de políticas de saúde. No Brasil, o **Estatuto da Criança e do Adolescente (ECA)** versa sobre o compromisso de bem-estar desse grupo, pelo qual a família, o estado e a sociedade têm responsabilidades [54]. Dados da OMS de 2015 mostram que, dentre as causas mais proeminentes de mortalidade de crianças, destaca-se a pneumonia [1]. De acordo com o relatório do Fundo das Crianças das Nações Unidas (UNICEF – *United Nations Children's Fund*), uma a cada seis mortes de crianças menores de 5 anos em 2015 ocorreu devido à pneumonia [55]. Isso representa uma morte a cada 35 segundos [55]. Embora as ocorrências sejam subnotificadas, especialmente em nações em desenvolvimento, como o Brasil, o agente viral mais comumente encontrado nesses casos pediátricos é o RSV [2-9].

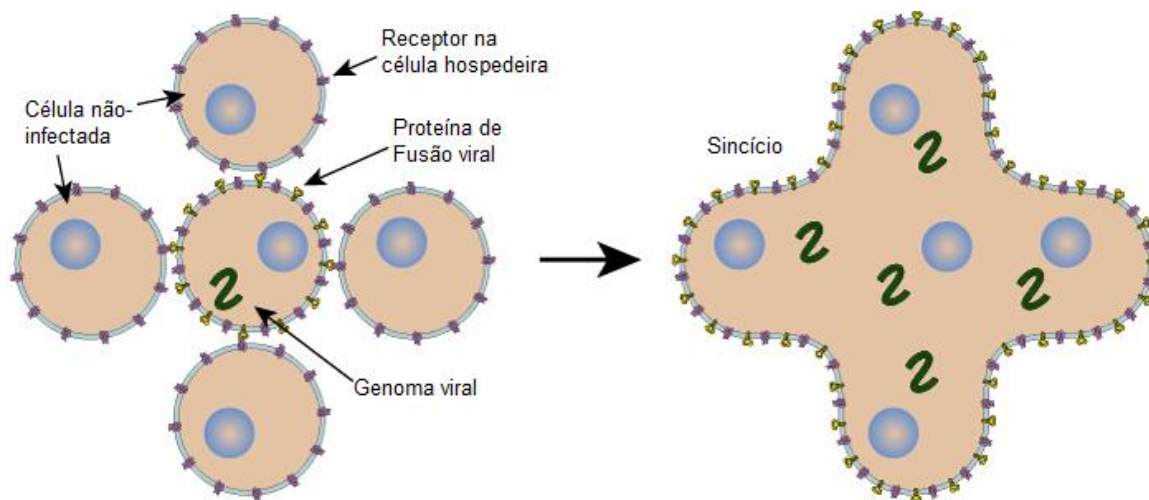
1.1.2 O vírus sincicial respiratório (RSV)

“... Porque pelo fruto se conhece a árvore...” (Mateus 12:33)

O RSV é um pneumovírus, isto é, infecta as vias respiratórias e foi recentemente reclassificado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV) [56]. Pertence à ordem *Mononegavirale*, família *Pneumoviridae*, gênero *Orthopneumovirus* e sua renomeação para *Orthopneumovirus humano* foi proposta.

Foi descoberto em 1955 e isolado de chimpanzés de laboratório [57]. Recebeu o nome de agente da coriza do chimpanzé (*Chimpanzee Coryza Agent* – CCA) por ter sido isolado de chimpanzés que apresentavam coriza. Posteriormente, em 1956, foi identificado em um dos pesquisadores desse grupo, o qual trabalhava diretamente com os animais em questão, além de em adolescentes e em adultos, cuja sintomatologia era semelhante [57]. No entanto, a primeira suposta descrição do vírus data de 1826 [58,59], embora se acredite que ele seja bem mais antigo, e apenas não tenha sido descrito anteriormente devido às limitações técnicas concernentes à diferenciação dos agentes causadores de infecções respiratórias [58]. A patologia foi relatada em 1939 [60] e a primeira exposição clínica da doença foi feita nos anos 40 [61,62]. A presença de RSV no organismo gera características peculiares, tais como a fusão das células, produzindo células gigantes multinucleadas – o sincício [63] – e, por isso, foi denominado vírus sincicial respiratório [Figura 4 e Figura 5].

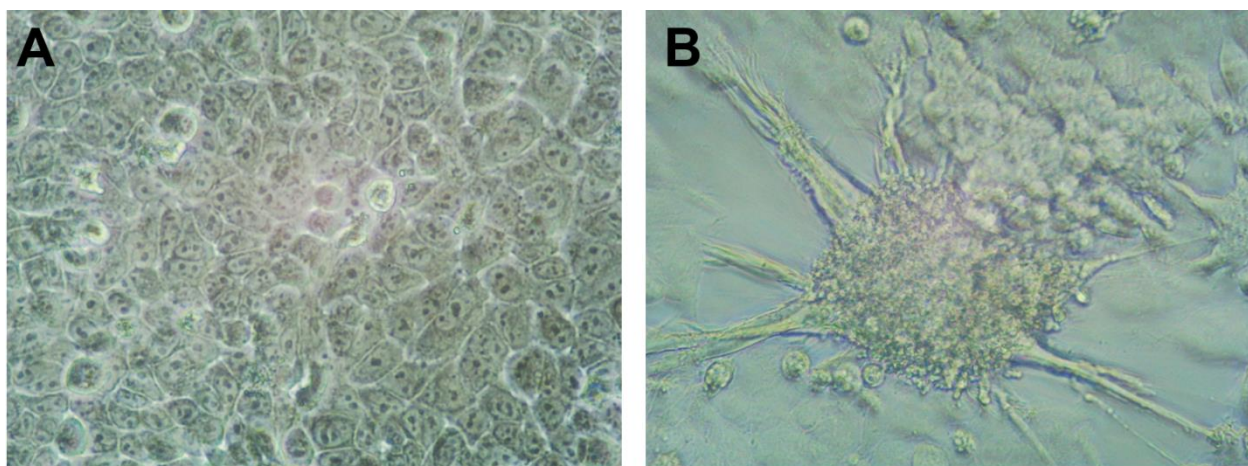
Figura 4 – Formação de sincícios pelo RSV



A fusão de células infectadas com células vizinhas, através da expressão de proteínas de fusão (proteína F) do vírus na superfície da célula hospedeira e da interação dessa proteína com receptores celulares, leva à formação de aglomerados multicelulares, os sincícios.

Fonte: Adaptado [64].

Figura 5 – Formação de sincícios *in vitro*



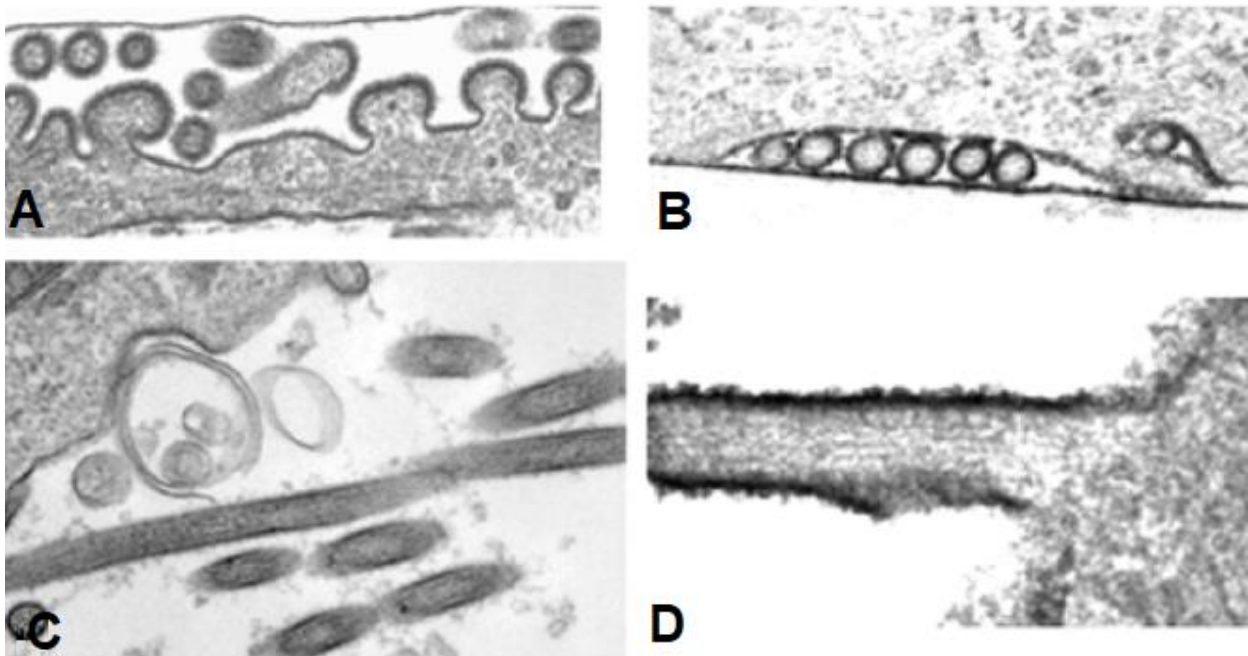
Células epiteliais humanas (5×10^4) do tipo 2 (HEP-2), derivadas de carcinoma de laringe, cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) 10% soro fetal bovino, anteriores à infecção por RSV (A) e posteriormente à infecção (B) com multiplicidade de infecção (MOI) 0.1 (isto é, uma proporção de uma partícula viral para cada 10 células). Aumento de 20x.

Fonte: Fotos cedidas por MSc. Larissa Figueiredo Alves Diniz (2017).

Ele infecta as células epiteliais das vias aéreas superiores, podendo se estender às inferiores de crianças, adultos e idosos, sendo mais crítico entre crianças e idosos devido ao sistema imune deficitário [revisto por [65](#)]. Além disso, existem os grupos de risco, isto é, indivíduos com maior predisposição a desenvolverem uma infecção mais exarcebada, devido à prematuridade e baixo peso, a má-formações pulmonares e cardíacas, a doenças de etiologia genética e cromossômica, como portadores de síndrome de Down, ou também à imunossupressão que afeta indivíduos soropositivos [[66-70](#)] e transplantados [revisto por [71](#)]. Embora não sejam muito comuns, existem registros de infecção ou de material genético viral em outros locais que não somente no aparelho respiratório, tais como fluido cerebral, músculo cardíaco e fígado [[2,72](#)].

É um vírus envelopado, com um diâmetro de aproximadamente 150 nm [[73](#)]. Suas partículas infectantes, os vírions, podem ser encontrados tanto na forma semi-esférica, como também na forma de filamentos, sendo, portanto, um vírus pleomórfico [[Figura 6](#)]. Ambas as formas são infectantes [[74](#)].

Figura 6 – Pleomorfismo do RSV



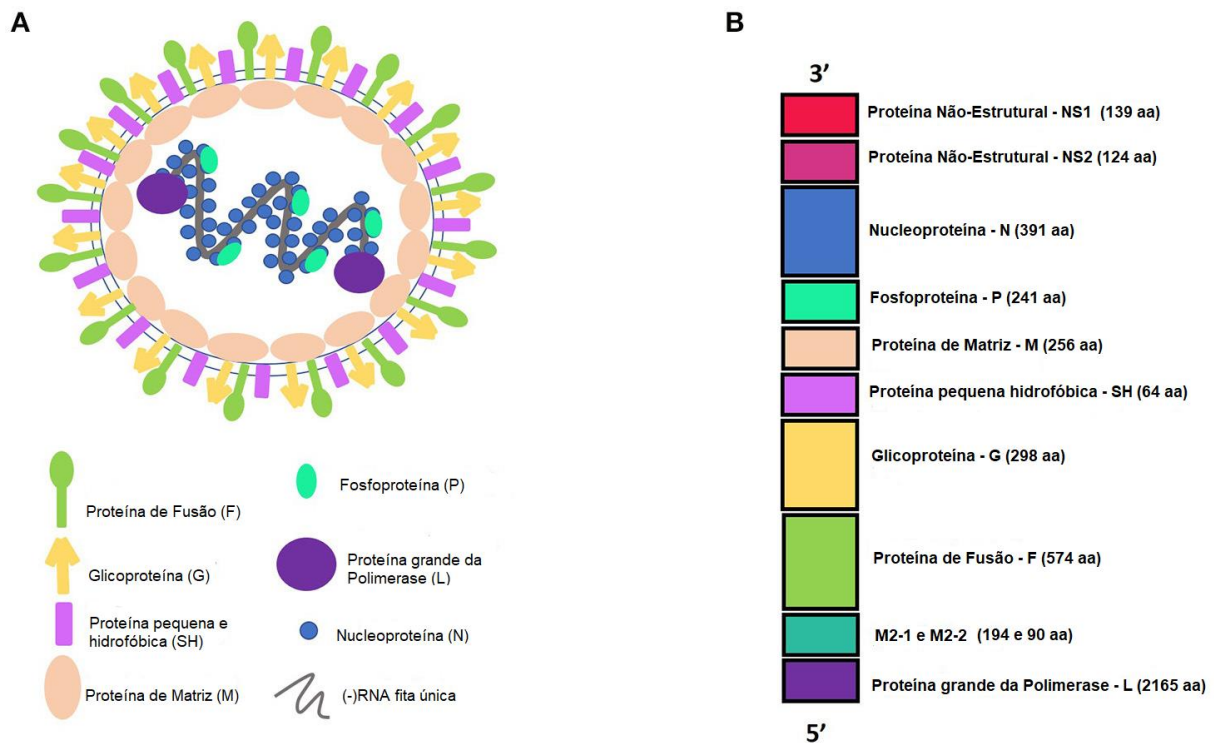
As partículas infectantes do RSV, os vírions, são pleomórficos e suas formas podem variar desde semi-esféricas (A e B) até a forma mais comumente encontrada de filamentos (C e D).

Fonte: Adaptado [74].

Seu material genético consiste de uma fita de RNA genômico não-segmentada de sentido negativo, isto é, sentido 3'-5', com aproximadamente 15.2 quilo-bases (kb – *kilo-base pair*, logo, 15.222 nucleotídeos), o qual codifica onze proteínas [Figura 7], nomeadamente NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 (subdividida em M2-1 e M2-2) e L. Suas proteínas se dividem em não-estruturais (aquelas que não são parte da partícula viral) – NS1 e NS2 – e estruturais – todas as demais, as quais compõem a partícula viral: N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 e L. As cepas virais são classificadas em dois grandes grupos antigênicos A e B, os quais diferem principalmente quanto à variabilidade genética da proteína G [75-77]. Por ser um vírus cujo genoma é não-segmentado, e, portanto, não realiza mudança antigênica (*antigenic shift*, em inglês) como o vírus influenza, sua taxa

de variabilidade é devida, principalmente, ao erro intrínseco à leitura de sua RNA polimerase, a qual não conta com mecanismos de correção e edição [77].

Figura 7 – Representação esquemática do RSV, de suas proteínas e de seu genoma



A - O RSV possui três glicoproteínas de superfície responsáveis pela mediação do processo de reconhecimento celular com o hospedeiro e posterior adesão e fusão (respectivamente, proteínas G e F, auxiliadas pela proteína SH). A proteína M age no processo de empacotamento de novas partículas virais, enquanto que as proteínas L, N, P compõem o complexo ribonucleoprotéico (RNP), e juntamente com as proteínas M2-1 e M2-2 atuam no processo de replicação e transcrição do material genético viral. As proteínas não-estruturais NS1 e NS2 desempenham papel importante nos mecanismos de evasão do sistema imune. **B** - O material genético do RSV consiste de uma fita de RNA simples não-segmentado e com polaridade negativa. Esse genoma é codificado em 11 proteínas, sendo que a proteína M2 se subdivide em M2-1 e M2-2.

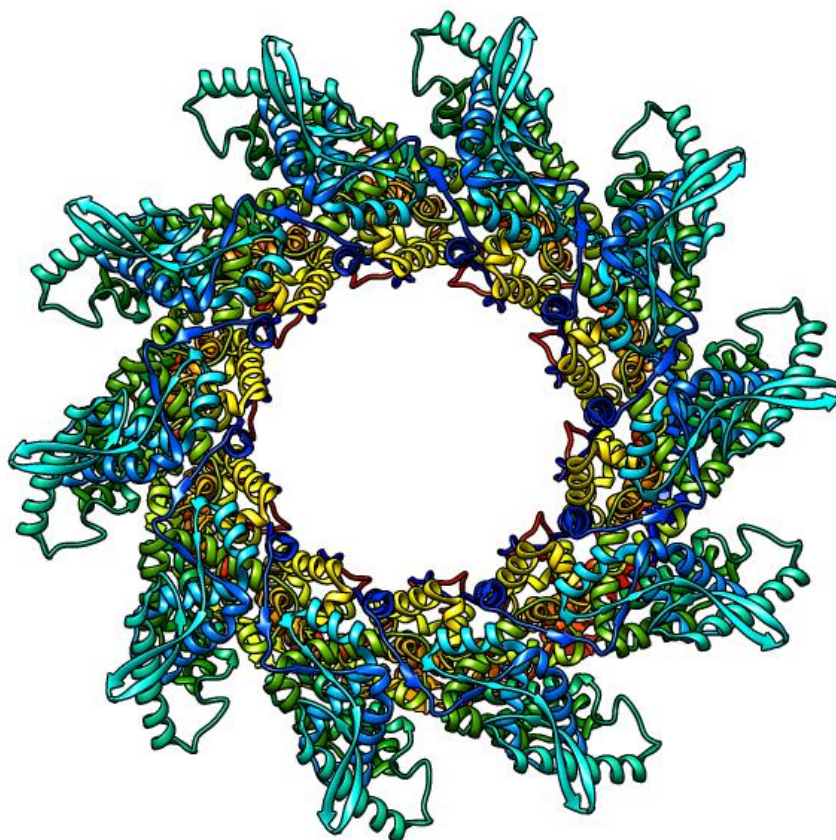
Fonte: Adaptado [78].

Pela ordem de leitura do RNA (3'–5') [Figura 7], os primeiros genes a serem codificados são os das proteínas não-estruturais (NS – *nonstructural*) NS1 e NS2, as

quais são proteínas pequenas com 139 e 124 aminoácidos, respectivamente. Elas podem formar complexos homoméricos (NS1-NS1, NS2-NS2), como também podem se associar em um complexo heteromérico (NS1-NS2). Podem atuar sinergisticamente [79,80], com foco no bloqueio da resposta imune inata da célula epitelial através da inibição da secreção de interferon dos tipos I e III (α e β , λ). [79,80]

Na sequência, vem a nucleoproteína N, a qual é composta de 391 aminoácidos e possui uma estrutura helicoidal [Figura 8]. É responsável por proteger (encapsular) o material genético viral resultante dos processos de replicação (o antigenoma, ou seja, o genoma de polaridade positiva – (+)RNA) e transcrição (síntese de RNA mensageiro – mRNA – a partir do (+)RNA), a fim de evitar sua degradação por nucleases [81,82].

Figura 8 – Estrutura resolvida da Nucleoproteína – Proteína N – do RSV



A nucleoproteína do RSV apresenta estrutura helicoidal e é responsável por encapsular o material genético resultante dos processos de replicação e transcrição. Observa-se a visão superior da proteína. A estrutura foi escolhida por critérios de completude, e não de resolução.

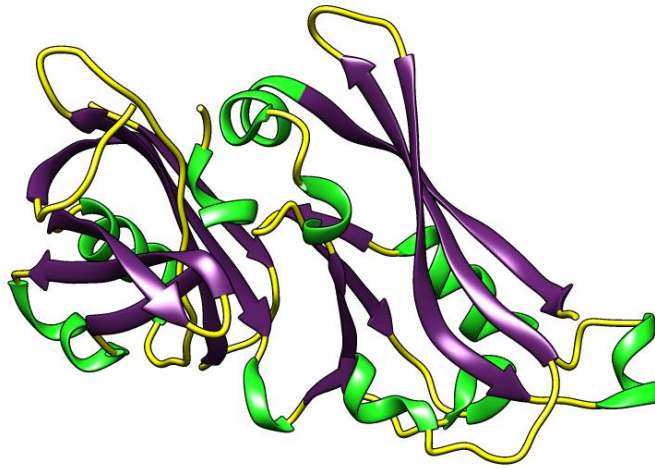
Fonte: Protein Data Bank [83] (Código de Identificação PDB: 2WJ8). Edições de imagem feitas no programa Chimera [84].

Consequente à nucleoproteína, vem a fosfoproteína P, cuja estrutura contém 241 aminoácidos. Ela é fosforilada em diversas serinas e treoninas, sendo que tal processo é realizado em diferentes taxas entre as diferentes cepas, com papel importante na regulação da replicação e do brotamento do vírus [revisto por 85]. Interage tanto com a proteína N, quanto com a proteína L, formando o complexo ribonucleoprotéico (RNP), e

também interage com a proteína M. Ela atua como cofator e estabilizador do complexo da polimerase [81].

A próxima proteína é proteína de matriz M, que é uma proteína não-glicosilada [Figura 9]. Forma uma camada protéica embaixo do envelope viral, envolvendo o nucleocapsídeo e interagindo com a membrana viral [78]. Desenvolve papel fundamental no empacotamento do vírus bem como em sua liberação. Sua ausência prejudica a formação dos vírions [86]. Possui 256 aminoácidos e sua dimerização é fundamental para exercer sua função [87].

Figura 9 – Estrutura resolvida da Proteína de Matriz – Proteína M – do RSV



A proteína de Matriz é fundamental para o empacotamento e liberação do vírus. Sua forma ativa é um dímero e é uma proteína não-glicosilada. Observa-se a visão lateral da proteína. A estrutura foi escolhida por critérios de completude, e não de resolução.

Fonte: Protein Data Bank [83] (Código de Identificação PDB: 2VQP). Edições de imagem feitas no programa Chimera [84].

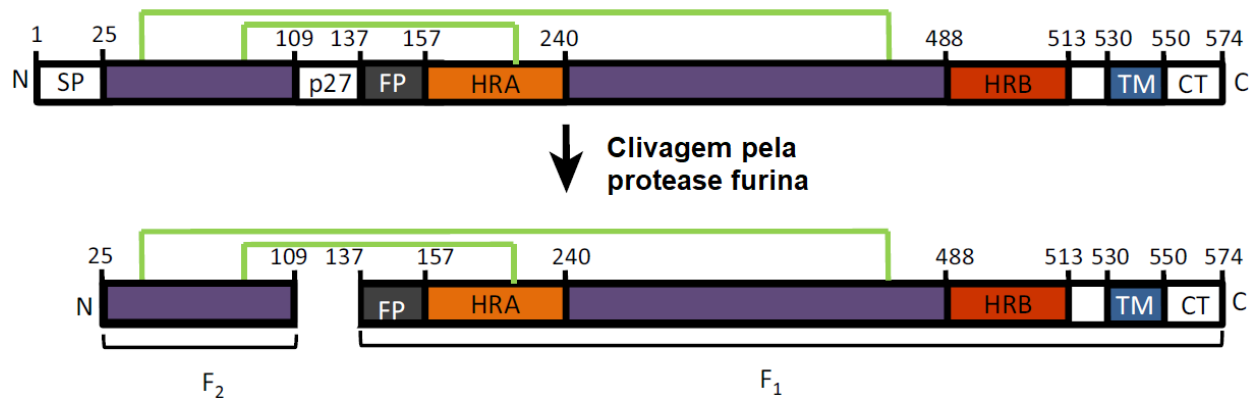
As proteínas seguintes são as glicoproteínas transmembrânicas SH, G e F. Elas desenvolvem papel primordial na adesão da partícula viral e na fusão de sua membrana à membrana da célula que será infectada. A proteína SH (SH – *Small Hydrophobic*, proteína “hidrofóbica pequena”) apresenta 64 aminoácidos, no subtipo A, e 65

aminoácidos, no subtipo B [88], e é uma proteína transmembrânica do tipo II. Isto significa, basicamente, que seu domínio C-terminal se localiza externamente à membrana celular viral, enquanto que seu domínio N-terminal é citoplasmático [89]. Sua função parece estar relacionada à formação de poros, com características de canais iônicos, nas células infectadas, as quais, provavelmente, sofrem com alteração da permeabilidade da membrana [90,91].

A glicoproteína de membrana G é responsável por mediar o processo de adesão do RSV à célula hospedeira. É uma proteína transmembrânica do tipo II, assim como a proteína SH. Contém em sua estrutura de 289 a 299 aminoácidos, dependendo da cepa [88], sendo extremamente glicosilada [revisito por 88,92]. Aproximadamente 60% do seu peso molecular é carboidrato [88]. A proteína G é expressa em duas formas: uma forma transmembrânica (mG) e uma forma secretada (sG), as quais diferem quanto à presença/ausência dos domínios N-terminal e transmembrânico [93], sendo que a segunda não os contém. A forma sG corresponde a quase 80% do total de proteína G liberada durante os estágios iniciais da infecção por RSV [94], e auxilia a bloquear a opsonização e neutralização do vírus por anticorpos anti-G específicos produzidos pelo hospedeiro [95]. A parte externa da proteína G (seu ectodomínio) contém dois domínios característicos de mucinas, ou seja, domínios altamente glicosilados. Entre eles, existe uma região altamente conservada de 13 aminoácidos, a qual contém tanto um CX3C *motif* (sequência conservada de aminoácidos, a qual interage com o receptor de quimiocina – CX3CR1 – na célula epitelial) e uma região rica em cisteína (GCRR), a última formada por quatro resíduos de cisteínas ligados por duas pontes dissulfeto [96,97]. Tanto o *motif* CX3C quanto a GCRR são importantes para modulação do sistema imune do hospedeiro, sendo CX3C *motif* um dos fatores essenciais para adesão da proteína G nas células epiteliais [98-102]. A proteína G também interage com os proteoglicanos de heparan-sulfato (HSPG – **Heparan-Sulfate ProteoGlycans**) comumente encontrados nas superfícies celulares, embora isso venha sendo contestado como artefato de cultura *in-vitro* [73, 103].

A glicoproteína de membrana F – proteína de fusão – é responsável pela fusão da membrana viral à célula epitelial do hospedeiro. Ela é uma glicoproteína do tipo I, isto é, seu domínio N-terminal se localiza externamente à membrana celular viral, enquanto que seu domínio C-terminal é citoplasmático [89]. Possui 574 aminoácidos [104]. A proteína F existe em dois estados de conformação principais: pré e pós-fusão. Na superfície viral, as duas possibilidades conformacionais são possíveis de serem encontradas [105]. Essencialmente, considerando o ciclo celular no hospedeiro, essa proteína é sintetizada como um precursor F0 na forma monomérica. Posteriormente à passagem pelo aparelho Golgiense, os monômeros são clivados após os aminoácidos 109 e 136 [106,107], por uma protease celular do hospedeiro chamada furina [108,109], resultando em três polipeptídeos. Os produtos finais da clivagem, ou seja, as porções N e C (-terminais) dão origem às subunidades F2 e F1, as quais são interligadas por duas pontes dissulfeto [110,111] [Figura 10, linhas em verde]. O trímero formado é exposto na superfície do vírion. No entanto, ele é meta-estável, ou seja, ele não está na conformação termodinâmica mais equilibrada, sendo que nessa configuração é denominado RSV-F pré-fusão [Figura 11A]. Por um estímulo ainda desconhecido [112], a proteína sofre uma série de alterações conformacionais que culminam em seu estado de pós-fusão [Figura 11B]. A interação de RSV-F com alguns receptores celulares tem sido sugerida, tais como TLR4, ICAM-1 e nucleolinas [113-117]. A proteína F é o principal foco de desenvolvimento de estratégias farmacêuticas de prevenção e de tratamento contra infecções por RSV, por ser essencial à infecção viral [118] e, além disso, por ser a principal proteína responsável pela formação de sincícios, característicos dessa infecção [Figuras 4 e 5].

Figura 10 – Proteína F: sua sequência e modificações

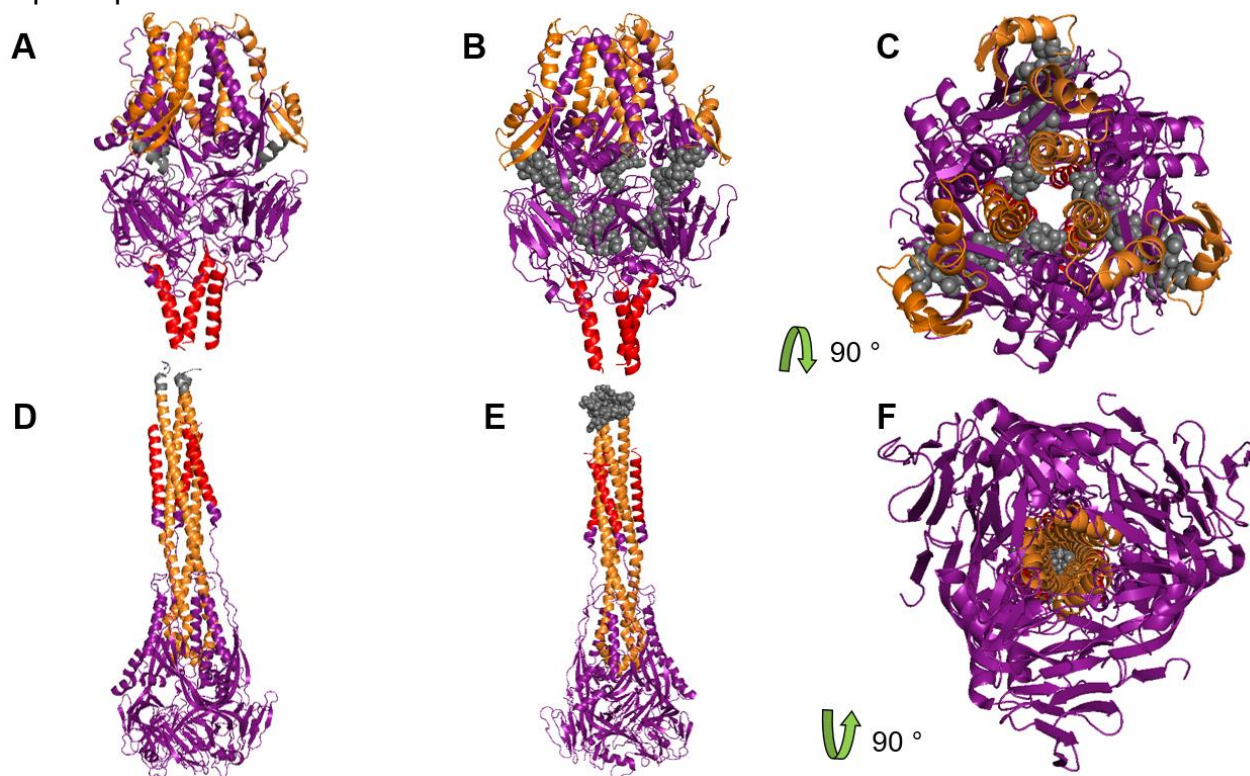


A proteína de Fusão do RSV. Representação esquemática da estrutura primária de um monômero de RSV F, antes (A) e depois da clivagem pela protease furina (B).

Legenda: HR (Região de repetição de padrão *Heptad*, isto é, sequência de 7 aminoácidos, nomeados genericamente a b c d e f g, em que “a” e “d” são geralmente hidrofóbicos e “b” “c” e “f” tendem a apresentar cargas. A estrutura formada, nesse caso, é um *coiled coil* [119]) A e B são indicadas em laranja e vermelho, respectivamente. As pontes dissulfeto são representadas pelas linhas verdes. SP - peptídeo sinal; p27 - peptídeo 27; FP - peptídeo de fusão; HRA e HRB - regiões de repetição *heptad* A e B; TM - domínio transmembrana; CT - cauda citoplasmática.

Fonte: Adaptado [112]

Figura 11 – Estruturas resolvidas da Proteína de Fusão – Proteína F – em seus estados de pré e pós fusão



A proteína F do RSV possui dois estados principais de conformação: pré-fusão, um estado meta-estável (A), (B) e (C) e pós-fusão, um estado estável (D), (E) e (F).

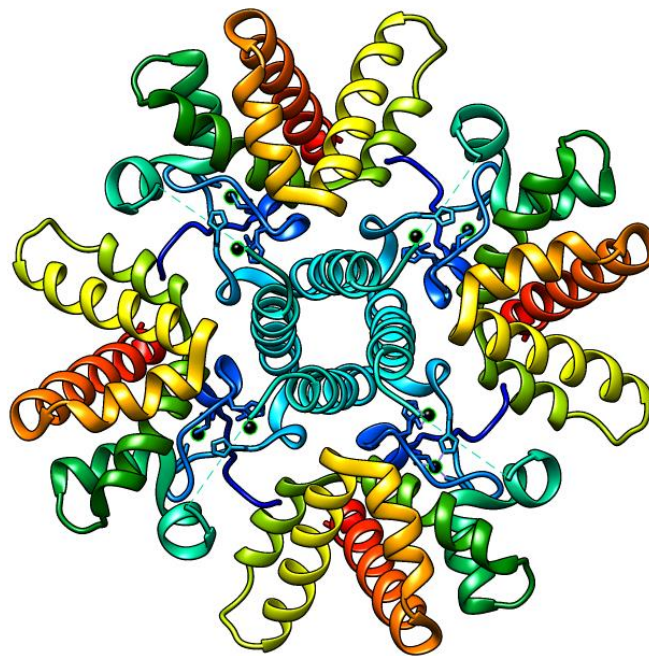
Em laranja, a região HRA, em vermelho a região HRB, e em cinza, realçado no formato de bolas o peptídeo de fusão. Observam-se a visão lateral da proteína em (A), (B), (D), e (E) e superior em (C) e (F). As estruturas foram escolhidas por critérios de completude, e não de resolução.

Fonte: Protein Data Bank [83] (Códigos de Identificação PDB: 4JHW (A) e 3RRR (B)). Edições das imagens feitas no programa Chimera [84].

As últimas proteínas a serem lidas são as proteínas M2-1, M2-2 e a proteína L. As proteínas M2-1 e M2-2 participam e regulam os processos de replicação e transcrição do RSV. A M2-1, uma fosfoproteína de 190 aminoácidos [Figura 12], regula a transcrição dos mRNA em conjunto com a proteína P, atuando como um fator de processividade e antiparada, e contribuindo, desta forma, para o trabalho de leitura da proteína L [120]. Para exercer sua função antiparada, a M2-1 necessita estar em sua forma tetramérica

[121]. Outra importante função é que ela auxilia na interação da proteína M com o nucleocapsídeo (formado pelas proteínas L, N e P) para a liberação da partícula viral [121]. Já a M2-2, uma proteína de 94 aminoácidos, medeia a transição da transcrição para replicação, regulando negativamente a síntese de RNA (replicação) [122].

Figura 12 – Estrutura resolvida da Proteína M2-1 do RSV



A fosfoproteína M2-1 atua na transcrição do vírus como um fator de processividade e antiparada. Para exercer sua função antiparada, a M2-1 deve estar em sua forma tetramérica. Observa-se a visão superior da proteína. A estrutura foi escolhida por critérios de completude, e não de resolução.

Fonte: Protein Data Bank [83] (Código de Identidade PDB: 4C3D). Edições de imagem feitas no programa Chimera [84].

A última e a maior proteína do RSV a ser lida é a proteína L (L – *Large*, “grande”). Ela é composta de 2165 aminoácidos, e atua como a maior subunidade catalítica do

complexo RNA-polimerase-RNA-dependente (RpRd). Sua principal função é na replicação e transcrição do genoma viral, reguladas pelo complexo RNP [120].

O conhecimento das estruturas protéicas do RSV auxilia na elaboração de novas estratégias de controle e prevenção da patologia, o que é urgente. Estima-se que a taxa de episódios de infecção por RSV em 2005 em todo mundo e em crianças menores de 5 anos foi de quase 34 milhões, sendo que dessas, 3,4 milhões requeriram hospitalizações [5]. Considerando-se todas as idades, a taxa sobe para 64 milhões. Em 2010, houve cerca de 253 mil mortes, a maioria em países em desenvolvimento [10]. Nos Estados Unidos, de 11 a 17 mil adultos morrem devido à infecção por RSV anualmente [123]. Além da problemática de saúde pública a nível global, o RSV também representa um peso em termos de gastos com as taxas de admissões hospitalares e internações, e de perda de produtividade e estresse por parte dos pais e cuidadores. Os gastos anuais com internações relacionadas ao RSV em crianças menores de 5 anos foram estimados em £54 milhões no Reino Unido [124]. Um estudo publicado por pesquisadores do Canadá, estimou em \$ 736,69 (dólares canadenses) os custos por internação, sendo que o tempo de permanência no hospital foi, em média, de 7 dias [125]. Esses gastos tendem a ser maiores quando considerados os grupos de risco.

Para além da infecção por RSV estritamente, existe ainda o problema das consequências da infecção *per si*. As IRAs virais no trato respiratório inferior de neonatos e crianças tendem a ocasionar sequelas graves, devido, principalmente, ao remodelamento das frágeis vias aéreas em resposta à presença do patógeno. Uma das consequências, que vem sendo relacionada à infecção por RSV na tenra idade é o desenvolvimento de asma [126-129], a qual também é uma problemática de saúde pública a nível global [revisto por 130]. No Brasil, no período de 2003 a 2013, ela foi responsável por 38% das internações hospitalares [131].

Portanto, prevenir infecções por RSV ou elaborar estratégias mais eficientes de tratamento, significa não só fazer jus ao compromisso de bem-estar das crianças, como também reduzir gastos públicos e particulares concernentes ao tratamento do estado patológico causado pelo vírus. Além disso, diminuir a possibilidade de desenvolvimento

de doenças respiratórias crônicas como a asma, desonera o sistema público de saúde. A elaboração de novas estratégias perspassa o entendimento não só da estrutura do vírus, como também da interação com o hospedeiro por meio de seu ciclo replicativo, ou seja, de seu ciclo de multiplicação.

1.1.2.1 Ciclo do RSV

“To be or not to be, that is the question.” (William Shakespeare)

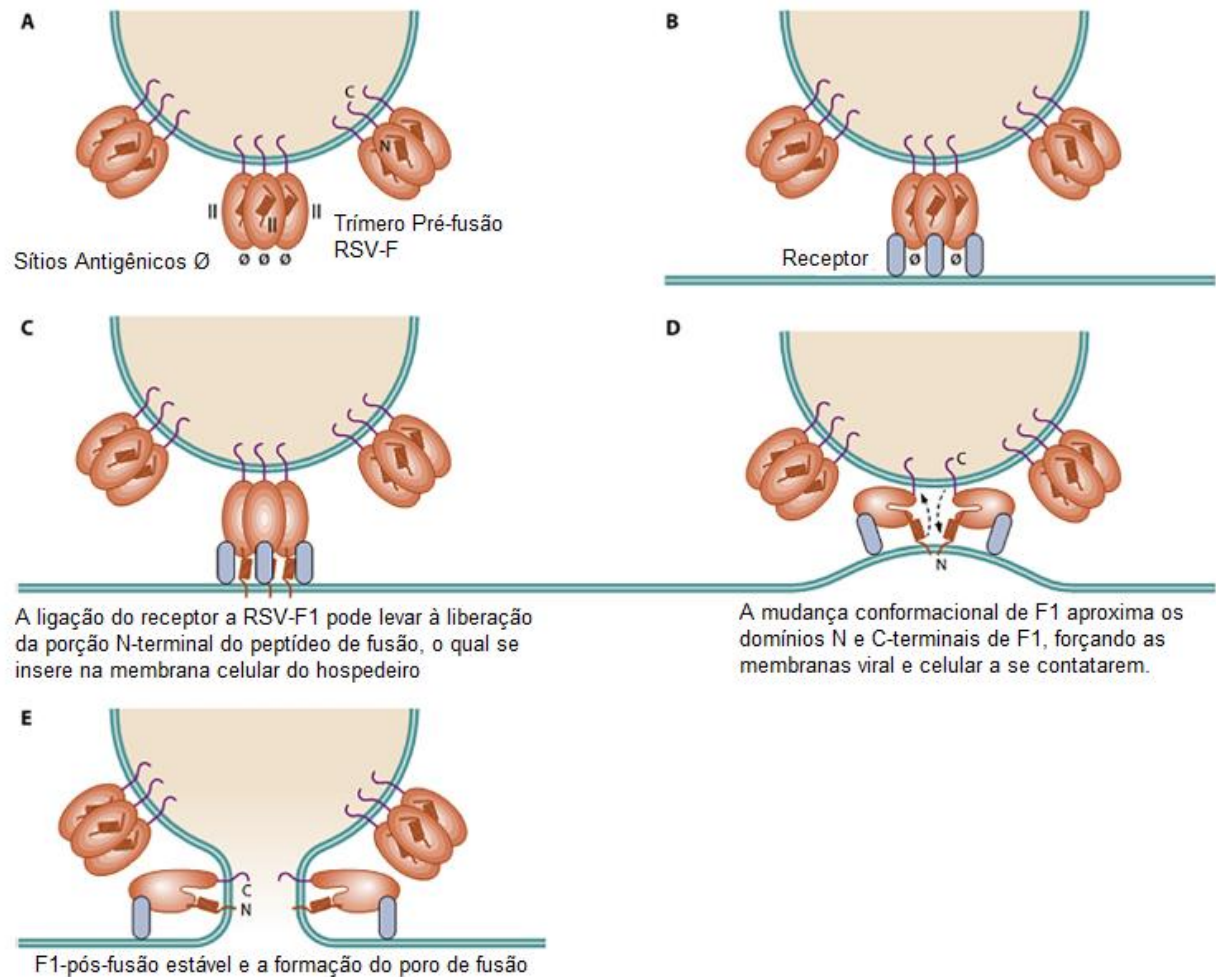
Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios. Se por um lado eles existem como entidades biológicas por apresentarem uma estrutura organizada, embora acelular, e um material genético que codifica para proteína, por outro, no entanto, eles dependem de uma maquinaria celular para executar todos os seus processos metabólicos. Ou seja, eles só “são” dentro de uma célula. A dicotomia do “ser ou não ser” abrange do micro ao macro. E o RSV não foge a ela.

O primeiro passo em direção à infecção de uma célula é superar as barreiras químicas e físicas que se interpõem no caminho. Não é fácil. No caso do RSV, as células a serem “conquistadas” (ou talvez “invadidas”, a depender do ponto de vista) são as células epiteliais do aparelho respiratório superior e inferior. O RSV tem preferência por infectar a superfície apical dessas células [132], ou seja, o topo delas. Para obter sucesso nessa infecção, ele precisa primeiramente resistir à presença de substâncias tais como muco, surfactantes e peptídeos antimicrobianos, os quais são produzidos por células especializadas no tecido epitelial como mecanismo de lubrificação e de defesa [33,39, [Figura 2](#)], não só contra o RSV, mas também contra quaisquer outros patógenos. Além dessas substâncias, existe ainda o movimento dos cílios, o qual tende a dificultar a adesão do vírus às células, como também a favorecer o transporte de microrganismos, eventualmente presos no muco, para o ambiente ácido do estômago.

Se superadas as barreiras químicas e físicas, o RSV deve aderir à célula, para então poder adentrá-la e iniciar seu ciclo replicativo. Portanto, é necessário haver uma interação entre suas proteínas de superfície e os receptores celulares. Ademais, é fundamental que a célula seja susceptível e permissiva à infecção, isto é, seja infectada e ofereça as condições para que o vírus se multiplique. Isso é chamado de tropismo [133]. As proteínas do RSV responsáveis pelo processo de adesão e fusão à célula epitelial são

as glicoproteínas de membrana G e F. A proteína G medeia o processo de adesão, pela interação com heparan-sulfatos e o receptor de quimiocina CXCR3 [98-102]. E a proteína F realiza o processo de fusão da membrana do envelope viral com a membrana celular, por meio de alterações conformacionais na sua própria estrutura, como também por estímulos desencadeados pela interação com receptores celulares tais como TLR-4, nucleolina e ICAM-1 [113-117]. Um modelo de fusão bem elucidativo, a partir da interação da proteína F com o receptor nucleolina foi proposto por Griffiths e colegas [73] [Figura 13]:

Figura 13 – O processo de fusão entre o envelope do RSV e a membrana celular



O envelope do RSV contém várias RSV-F proeminentes, ancoradas via seus domínios transmembranas. (A) RSV-F no estado de pré-fusão, com a maior parte dos epítomos de neutralização do peptídeo de fusão localizados na região N-terminal. O maior sítio antigênico Ø existe apenas na conformação de pré-fusão e é perdido após a fusão. A interação entre o trímero de RSV-F e o receptor pode causar uma mudança dramática na conformação de RSV-F pré-fusão (B) o que leva à inserção do peptídeo de fusão na membrana celular da célula do hospedeiro (C) forçando o contato entre o envelope viral e a membrana celular (D). Apesar de apenas dois monômeros de RSV-F serem simplismente mostrados aqui, é necessária a força combinada de múltiplas mudanças de conformação de RSV-F para superar a barreira termodinâmica em mesclar as membranas, para assim estabelecer um poro de fusão que possibilite a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira.

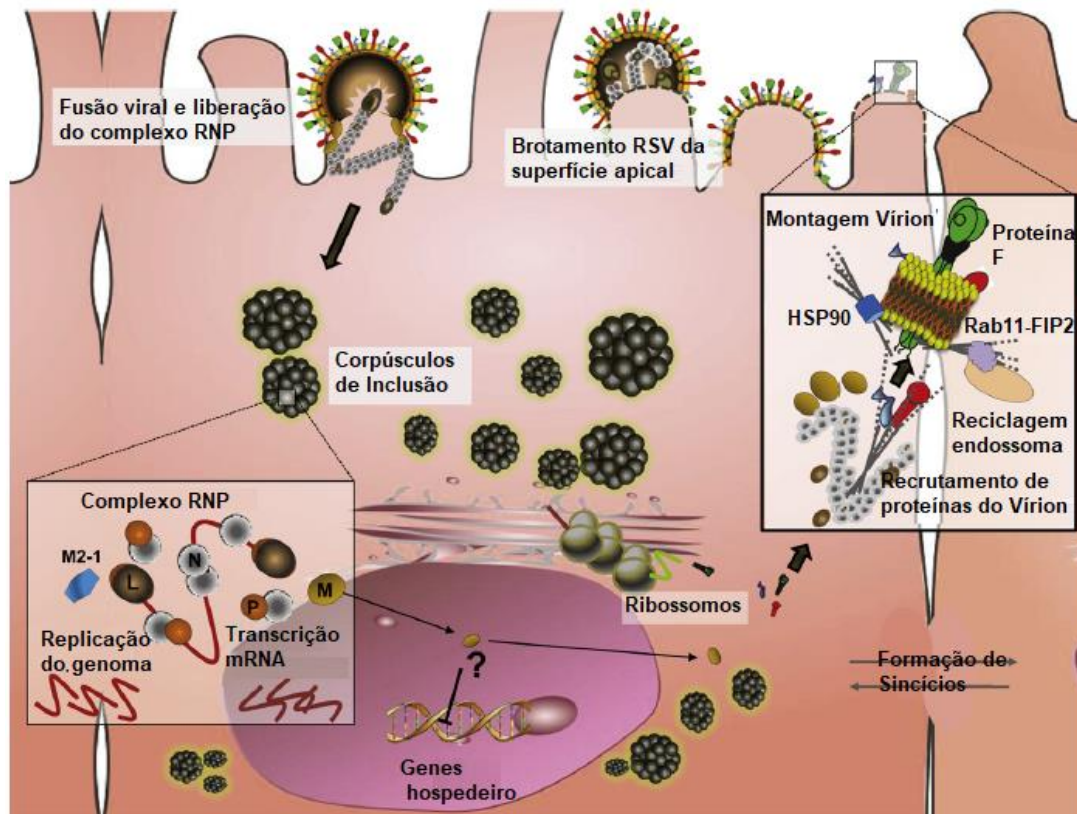
Fonte: Adaptado [73].

Além da fusão, o RSV também é capaz de adentrar a célula por outro mecanismo chamado macropinocitose, embora ainda não seja bem estabelecido o papel dos receptores e de quais deles atuem nesse sistema [134].

Após o processo de fusão, ou de macropinocitose, o nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma celular e a replicação deve ser iniciada. No caso do RSV, os sítios de replicação viral são conhecidos com corpúsculos de inclusão (CI) [73]. Embora o papel dos corpúsculos de inclusão não seja completamente elucidado, eles têm participação na síntese de RNA viral e na modulação das respostas imunes do hospedeiro [73]. A formação de CI em células infectadas se inicia quase que ao mesmo tempo em que se começa a síntese de proteínas virais (ao redor de 6 horas após a infecção), e seu tamanho aumenta gradativamente conforme o processo de replicação continua [135].

O RNA viral liberado no citoplasma é então coberto pela proteína N, de forma a evitar seu reconhecimento por nucleases e, assim, impedir sua degradação [81,82]. O posicionamento da proteína N sobre o RNA viral possibilita o trabalho do complexo RpRd (proteína L acessoriada pelas proteínas P, N, M2-1 e M2-2), o que constitui o centro do sistema de replicação do RSV [120]. A relação complexa de interação entre as proteínas do complexo RpRd resultará na alternância entre os processos de replicação do material genético viral ((-)RNA->(+)RNA) e transcrição do mesmo, produzindo assim suas proteínas e possibilitando o empacotamento e a geração de novos vírions [Figura 14]. Apenas as proteínas N, P, M e F são estritamente essenciais para a formação de novas partículas virais [136].

Figura 14 – Síntese do ciclo replicativo do RSV



O modelo de replicação do RSV em células epiteliais das vias aéreas (AEC – *airway epithelial cells*). 1- O RSV se liga e entra na célula epitelial, como descrito na figura 13. 2- O complexo RNP se dissocia do restante da estrutura de revestimento viral e é liberado no citoplasma. 3- Uma vez dentro do citoplasma, o complexo RNP inicia o processo de replicação-transcrição do genoma viral, o qual ocorre principalmente dentro dos corpúsculos de inclusão. As principais proteínas atuantes no complexo são as proteínas L, N e P, acessoradas pelas proteínas M2-1 e M. 4- Nos estágios iniciais da infecção, a proteína M migra para o núcleo, possivelmente para bloquear a transcrição de genes do hospedeiro. Nas etapas finais da infecção, a proteína M se localiza novamente no citoplasma através de um sinal de exportação núcleo dependente de Crm-1. 5- A proteína F se desloca aos lipídios de superfície para mediar a formação de filamentos para os vírions que sairão na superfície da célula hospedeira. Ali, a proteína F recruta outras proteínas virais, tais como as proteínas G, SH, N, P e M para formar um complexo na superfície das células infectadas e unir as proteínas do RSV. No vírion, a proteína M se liga a proteína M2-1 no complexo RNP, recrutando essa estrutura para a membrana celular a fim de possibilitar a montagem do vírion. Nesse estágio, a ação da actina facilita a montagem e liberação do vírion. Além disso, a proteína de choque térmico (HSP90 – *heat shock protein*) liga a actina às proteínas virais. Finalmente, o brotamento do vírion ocorre na superfície apical da célula AEC através do endossoma de reciclagem, o que envolve a participação da proteína Rab11-FIP-2.

Fonte: Adaptado [137].

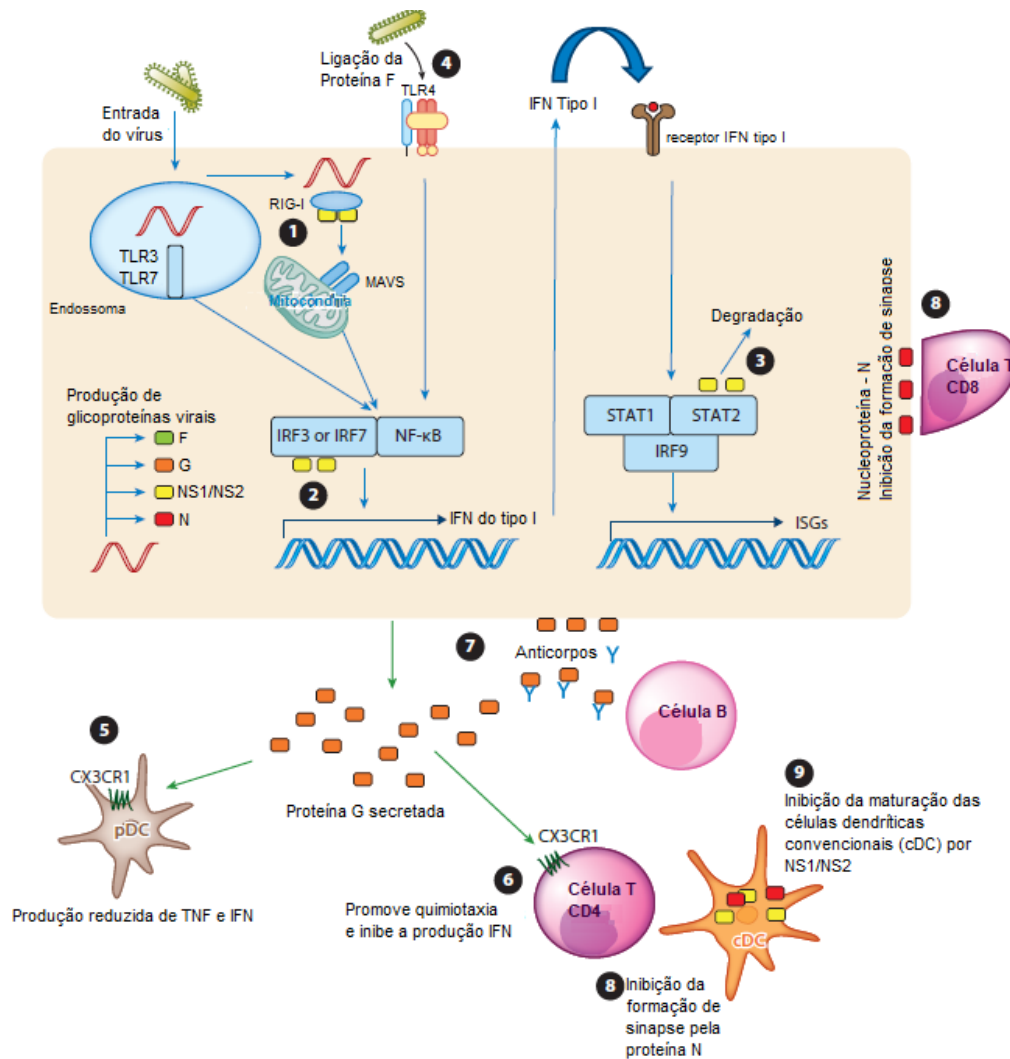
Para ter sucesso na infecção, o RSV necessita driblar os mais variados mecanismos de defesa do organismo. Assim que ocorre a interação das proteínas G e F com a superfície celular, seja em células epiteliais, como também em células dendríticas e macrófagos residentes no tecido epitelial, as partículas virais são reconhecidas por receptores específicos. Esses receptores específicos de sinalização incluem receptores de reconhecimento padrão (PRRs), receptores do tipo Toll (TLRs), receptores de gene induzíveis pelo ácido retinóico (RIG-1) e receptores do tipo Nod (NLRs) [138]. Eles promovem, então, o desencadeamento de uma cascata de sinalização na célula infectada, a qual impulsionará um estado antiviral nas células vizinhas ainda não-infectadas, e recrutará células de defesa para combaterem o vírus.

O reconhecimento das partículas virais leva à produção de várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, tais como IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α [139,140], o que estimula o recrutamento de células do sistema imune inato tais como monócitos, macrófagos, células NK, neutrófilos e células dendríticas. Além disso, a célula infectada também passa a produzir interferons (IFN) do tipo I (α e β) e liberá-los no meio extracelular. Isso induz as células vizinhas não-infectadas ainda, a transcreverem genes estimulados por interferon (ISG – *interferon stimulated genes*), proporcionando a essas um estado antiviral característico, o que já as prepara para uma eventual infecção.

Ademais, as células do sistema inato, interagem com as células do sistema adaptativo – linfócitos T e B – de forma a tentar otimizar a defesa do organismo contra o patógeno, como também a gerar memória a partir da produção de anticorpos. Entretanto, a produção de anticorpos contra RSV (IgA e IgG) é marcadamente decrescente com o passar do tempo. Após um ano de infecção, os anticorpos IgG anti-RSV não foram detectados em 25-50% em crianças pequenas, e apresentaram uma taxa de detecção de apenas 25% em quase 75% dos adultos [141-143]. Isso evidencia que a produção de anticorpos não gera memória de longa duração contra RSV, o que favorece re-infecções.

Os principais mecanismos desenvolvidos pelo RSV para escapar do sistema imune são mostrados na [Figura 15](#).

Figura 15 – O RSV e seus mecanismos de evasão do sistema imune



O RSV prejudica a elaboração de uma resposta imune efetiva, por interagir com a imunidade do hospedeiro por meio de diversos mecanismos. 1- A proteína NS2 se liga a RIG-1 e dificulta a resposta imune inata via MAVs. 2- A proteína NS1 bloqueia a ligação de IRF3 ao promotor de IFN-β; a proteína G e a proteína N também inibem a produção de interferon do tipo I. 3- As proteínas NS1 e NS2 aumentam a taxa de degradação de STAT2. 4- A proteína F se liga a TLR4 e pode causar dessensitização da via de sinalização de TLR. 5- A proteína G secretada (sG) pode se ligar a CX3CR1 nas células dendríticas e 6- em alguns linfócitos, ocasionando alteração da quimiotaxia e redução de função. 7- sG pode atuar como uma "isca" para anticorpos de neutralização. 8- A proteína N pode desfazer a sinapse imunológica formada por linfócitos TCD4+ e TCD8+. 9- As proteínas NS1-NS2 reduzem a maturação de células dendríticas, atenuando a eficácia delas em apresentar antígenos. Abreviações: cDC – células dendríticas convencionais; ISG – gene estimulado por interferon; pDC – célula dendrítica plasmocitoide; TLR – receptor do tipo Toll.

Fonte: Adaptado [65].

Resumindo, o ciclo replicativo do RSV envolve as etapas de adesão e entrada, desnudamento e liberação do material genético, replicação e transcrição, empacotamento da partícula viral e, por fim, o brotamento e a liberação do vírus. Apesar de em alguns desses passos, uma ou duas proteínas serem protagonistas, é a atuação conjunta de todas elas que propicia o sucesso da infecção, justamente pela junção de diversos mecanismos de modulação do sistema imune. Desenvolver estratégias antivirais requer não só o entendimento desses passos e da estrutura e atuação das proteínas virais, como também a compreensão de que existe uma delicada rede de interações químicas, físicas e biológicas estabelecidas entre o vírus e a célula. As estratégias podem focar diferentes proteínas virais ou celulares em uma ou diferentes etapas, como também se fixar em uma enzima ou proteína específica de uma etapa. Vamos a elas.

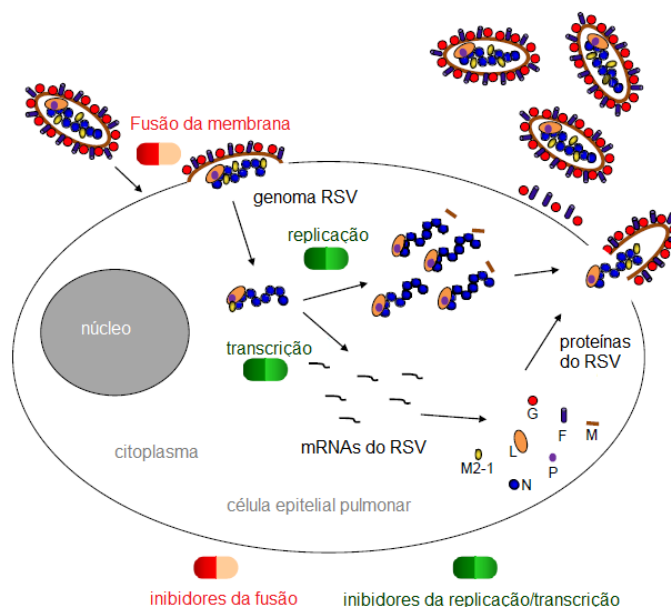
1.1.2.1.2 Estratégias Antivirais contra RSV

*“... Mas onde se achará a sabedoria?
E onde está o lugar
do entendimento?...” (Jó 28:20)*

Elaborar estratégias antivirais, assim como antibacterianas e antifúngicas requer lidar com um desafio pertinente e persistente nesses casos: o surgimento de mutantes resistentes. Devido à alta taxa de erros íntinseca ao processo de replicação-transcrição viral, no caso do RSV ligada à falta de mecanismos de reparo e edição em sua RNA-polimerase [77], a resistência é um fator crucial, o que pressupõe a necessidade constante de elaboração, aprimoramento e combinação de estratégias anti-RSV.

Diferentes etapas do ciclo reprodutivo do vírus na célula podem ser exploradas, na tentativa de inibir a replicação viral [Figura 16]. Focar na inibição da entrada do vírus, por exemplo, apresenta a vantagem de haver uma quantidade menor de vírus com a qual se deve lidar. Nas etapas posteriores, de replicação, brotamento e liberação do vírus, a aposta é na especificidade do composto em questão, de interagir especificamente com os processos e proteínas do vírus, de forma a não causar malefícios à célula hospedeira. Neste caso, cabe mencionar o antiviral acyclovir, um análogo de guanina, pela sua alta seletividade e eficiência na inibição da replicação do vírus do herpes [144].

Figura 16 – O ciclo viral do RSV e algumas estratégias de inibição



O passo-a-passo do ciclo do RSV e as estratégias mais comuns de intervenção, as quais consistem no bloqueio da fusão e/ou da síntese de RNA.

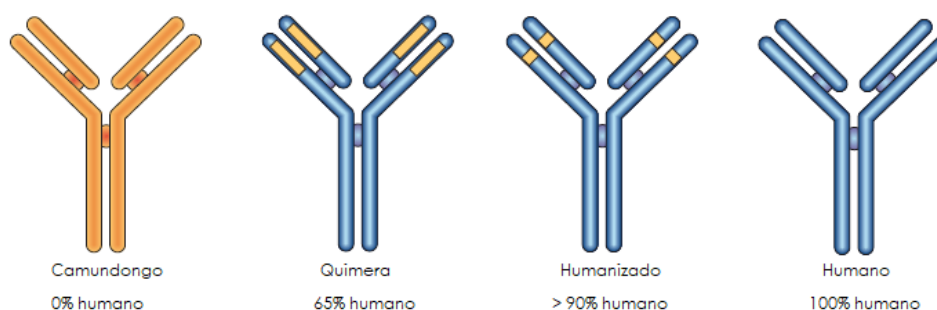
Fonte: Adaptado [3].

Os únicos antivirais disponíveis atualmente contra RSV são o palivizumabe (Synagis®) para prevenção e a ribavirina para tratamento. Além desses, medidas paliativas de cuidado também são utilizadas.

O palivizumabe (MEDI-493) é um anticorpo monoclonal humanizado [Figuras 17 e 18, 145], direcionado à proteína F nas conformações de pré e pós fusão [146]. Logo, sua ação consiste em se ligar à proteína F em seu respectivo sítio (sítio II – aminoácidos 254 a 277 [Figura 19, 146, 147]) e inibir a fusão do vírus à célula [148]. Ele deve ser aplicado em cinco doses mensais, durante a temporada de infecção por RSV, na concentração de 15 mg/kg e intramuscularmente em crianças pertencentes aos grupos de risco – aquelas com má-formação pulmonar, com doenças cardíacas, prematuras, acometidas por desnutrição, imunocomprometidas pelo vírus da imunodeficiência humana (do inglês

human immunodeficiency virus – HIV), dentre outras [149]. Sua eficácia, no entanto, tem sido questionada entre os diferentes grupos de risco [41]. Além disso, já foram identificados mutantes resistentes ao palivizumabe, tanto em modelos experimentais, como também clínicos [150-152]. Os custos de tal profilaxia dificultam sua aplicação em larga escala (1 mililitro da solução intramuscular a 100 mg/mL custa em torno de \$2.960 (dois mil, novecentos e sessenta dólares americanos) [153]).

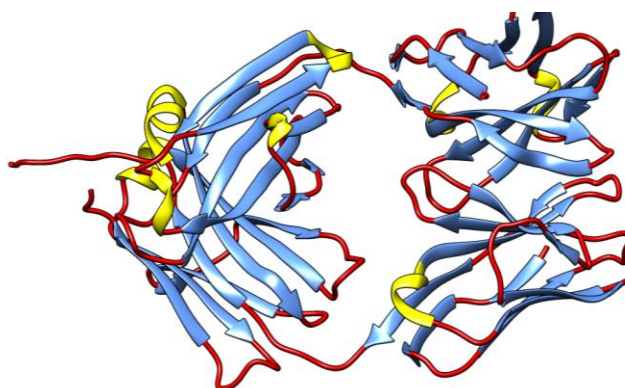
Figura 17 – A engenharia dos anticorpos



O palivizumabe é um anticorpo humanizado, isto é, resulta da combinação, por meio de tecnologia de engenharia genética, de anticorpos humanos e de camundongos.

Fonte: Adaptado [154]

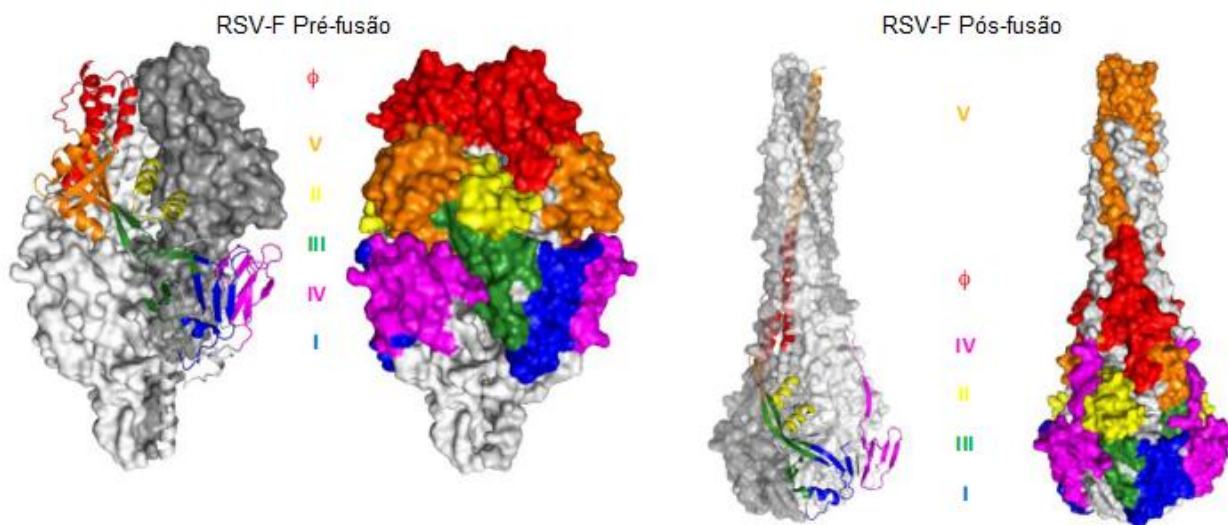
Figura 18 – Palivizumabe (MEDI-493)



A estrutura resolvida do anticorpo Palivizumabe (código de identificação PDB:2HWZ). Edição da imagem feita no programa Chimera [84].

Fonte: o autor.

Figura 19 – Os sítios antigênicos da proteína F

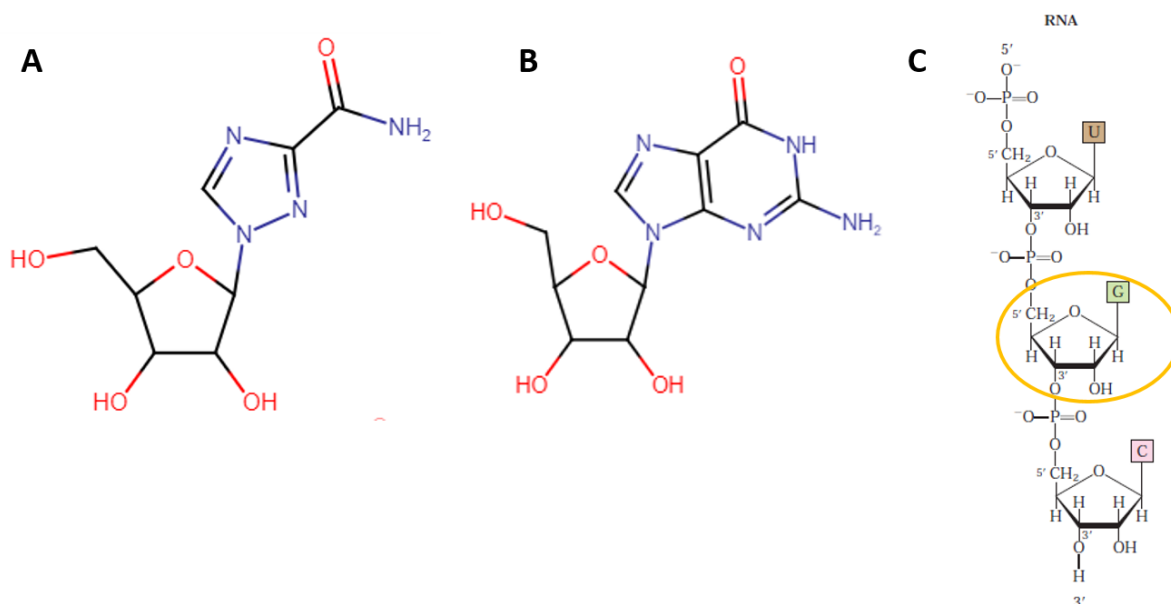


A proteína F é o principal foco de desenvolvimento de estratégias de anticorpos e de inibidores pequenos. Seis sítios antigênicos têm sido descritos, sendo que desses, o palivizumabe se liga ao sítio II (em amarelo) presente em ambas conformações.

Fonte: Adaptado [112].

A ribavirina [Figura 20] é uma molécula análoga ao nucleosídeo guanosina, disponível no mercado para ser usado sob a forma de aerossol. No entanto, apresenta efeitos potencialmente tóxicos (mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos), dificuldades na administração e eficácia questionável [3,4,11-13].

Figura 20 – A Ribavirina



A ribavirina (A) é um antiviral de amplo-espectro utilizado no tratamento de infecções por RSV, pelo vírus da hepatite C e pela febre hemorrágica viral. Sua ação consiste em bloquear a síntese de RNA e o encapsulamento de mRNA virais. Por ser um análogo do nucleosídeo guanósina (B), um dos mecanismos sugeridos para ação antiviral da ribavirina é que ela seja incorporada ao RNA e, por não possuir o fosfato que liga um nucleotídeo ao outro lateralmente, compromete a integridade desse. Moléculas (A) e (B) elaboradas no servidor *Swiss Model* [155].

Fonte: Adaptado [156, 157]

As medidas paliativas consistem no uso de suporte respiratório por meio de ventilação (fornecimento de oxigênio) e de broncodilatadores, e estes últimos têm sido questionados quanto à sua eficácia [4,12,158].

É importante salientar que crianças recém-nascidas e idosos são os grupos mais acometidos pela infecção por RSV, devido ao seu sistema imune não completamente formado ou debilitado. Até aos 2 anos de idade, virtualmente todas as crianças já foram infectadas e aproximadamente 50% delas serão infectadas ao menos duas vezes pelo RSV [159,160]. Logo, a prevenção dessa infecção e seu tratamento devem prezar pelo uso de compostos terapêuticos com características como baixa toxicidade, segurança na administração, eficácia e, além disso, custo reduzido. Embora a elaboração de uma nova

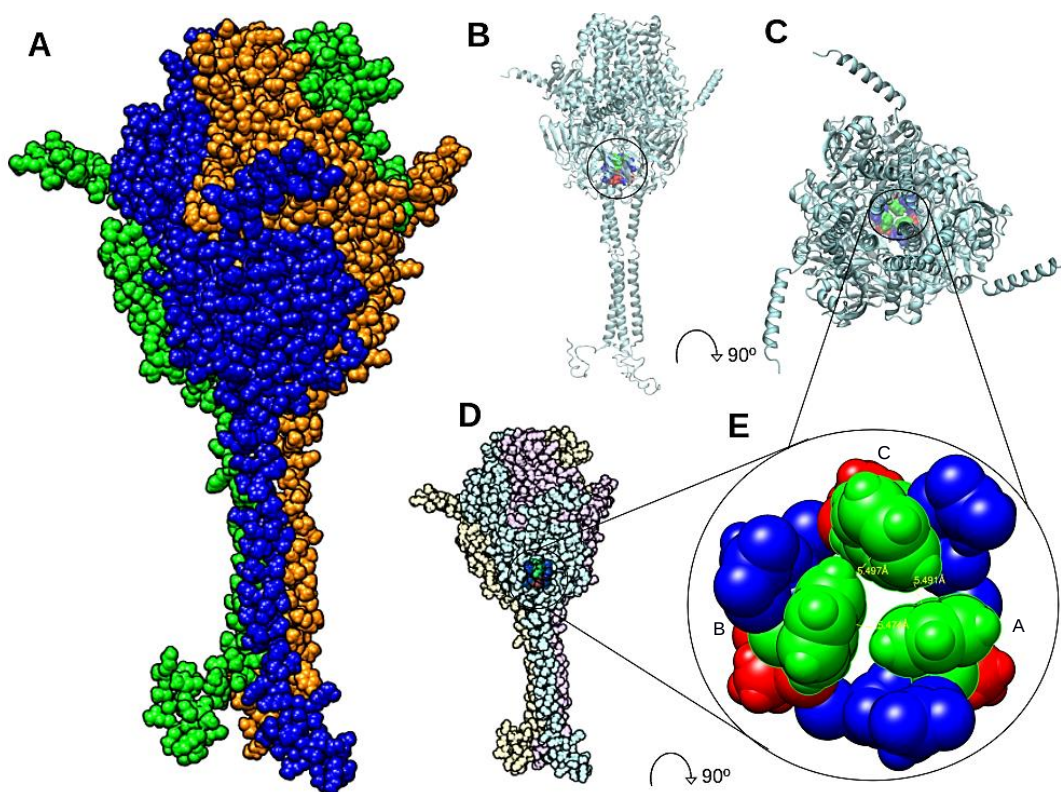
vacina contra RSV tenha entrado em fase 1 de testes clínicos em adultos saudáveis [161], a problemática da resistência justifica o fato de que a busca por compostos ativos continue. Esses compostos devem prevenir a infecção, reduzir a sua gravidade, diminuir o tempo de internação, a taxa de admissão hospitalar bem como os gastos intrínsecos.

Diversas estratégias têm sido estudadas como alternativas ao uso de ribavirina e palivizumabe [para revisão 73,162,163]. Essas abarcam desde a proposta de utilização de cisteinil-leucotrienos para o tratamento de bronquiolite [164], como também o uso de citocinas [165], o desenvolvimento de vacinas [161], outros anticorpos [166], *nanobodies* [167] até a descoberta de pequenas moléculas inibidoras de entrada, fusão ou da replicação desse vírus [3,168-179].

O principal foco das pesquisas, no entanto, é o bloqueio da alteração conformacional de RSV-F. Isso representa uma obstrução à infecção logo em sua etapa inicial. Ainda que o RSV possua o mecanismo de macropinocitose [134], a restrição oferecida por uma proteína F imobilizada configura um grande revés para o sucesso da infecção.

À vista disso, várias regiões de RSV-F têm sido candidatas a alvo de intervenção farmacológica, como sítios antigênicos [257,259], sítios de N-glicosilações [260], resíduos de cisteína [261], assim como diferentes resíduos de RSV F os quais podem interagir com peptídeos e moléculas pequenas capazes de inibir a entrada do vírus [256,258,262]. Battles e colegas [256] descreveram um mecanismo desenvolvido por moléculas pequenas capazes de inibir a entrada do vírus via proteína F. Eles sugerem o inibidor JNJ-2408068 e relatam que sua atividade se deva à ligação com alta afinidade a um bolsão trissimétrico dentro da cavidade central da estrutura de pré-fusão da RSV-F, e, portanto, ocasione a estabilização da região, devido à restrição da movimentação dela. Por conseguinte, mantém o estado meta-estável de conformação pré-fusão [Figura 21], o que evita a alteração conformacional para pós-fusão.

Figura 21 – RSV-F modelada neste trabalho e o bolsão trissimétrico dentro de sua cavidade central



A) Trímero de RSV-F modelada neste trabalho (RSVmF), no formato de esferas. B-D) Diferentes visualizações da estrutura de RSVmF, com o bolsão trissimétrico em realce. Em (B), exibe-se uma vista frontal da proteína, sob formato de *new cartoon*. Em (C), uma vista superior, ainda sob esse mesmo formato. Em (D), vista lateral, sob formato de esferas. Em (E), o bolsão trissimétrico e negativamente carregado isolado da estrutura RSVmF, sob formato de esferas. Esse bolsão é formado por resíduos de fenilalanina (488, em verde, nas cadeias A, B e C), de aspartato (486 e 489, em vermelho, nas cadeias A, B e C) e glutamato (487, em azul, nas cadeias A, B e C). As distâncias entre as fenilalaninas são exibidas, e equivalem a 5,474 Å entre cadeia A (direita abaixo) e B (esquerda abaixo), 5,497 Å entre cadeia B e C (acima, no meio), e 5,491 Å entre cadeia C e A. O VMD [239] e o Chimera [84] foram usados para elaboração e edição da imagem.

Fonte: o autor.

Dentre as muitas moléculas que vêm sendo testadas e, a despeito de todo desenvolvimento da química sintética, os produtos naturais continuam representando um expoente estratégico de exploração [180-183]. Garofalo e colegas [12] e outros [14-18] mostram que o desenvolvimento da infecção por RSV depende de sinalização celular

regulada pela liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs ou, em inglês, *Reactive Oxygen Species* – ROS). Os compostos fenólicos, provenientes de metabolismo secundário vegetal, possuem capacidade neutralizante de EROS sendo, portanto, uma alternativa para modulação do processo inflamatório resultante de infecção por RSV, e, possivelmente, para redução da carga viral. Além de sua capacidade antioxidante, os compostos fenólicos interagem com membranas e, por conseguinte, podem interagir com proteínas ali presentes [266-271], sendo que muitas dessas interações explicam seus efeitos farmacológicos. Vejamos algumas dessas moléculas.

1.2 Flavonoides

“... Metafísica? Que metafísica têm aquelas árvores? ...” (Fernando Pessoa)

A história da humanidade perspassa o paradigma saúde-doença e, intrínseco a ele, a forma como a cura é buscada e a doença encarada. Desde os primórdios das civilizações, os registros históricos mostram que, para os povos antigos, as moléstias eram como castigos dos deuses, ao passo que o estar-bem era visto como uma relação harmoniosa para com os mesmos. Se a doença era causada por um desentendimento com as divindades, a cura também deveria ser buscada nelas e no que por elas foi criado, a natureza. Os egípcios inauguram uma medicina mais empírica através não só do desenvolvimento de técnicas de mumificação, como também do uso de ervas medicinais [184].

Assim, os vegetais foram e continuam sendo fontes expressivas de compostos com atividades farmacológicas significativas. Podemos mencionar as civilizações orientais e milenares e seu vasto conhecimento florístico e medicinal. Além disso, o poder ‘curativo’ de alguns chás, os quais, em certas épocas, foram até chamados de “poções mágicas”. De igual forma, o “*néctar dos deuses*” ou simplesmente “vinho”, tão comumente citado em muitas literaturas, não só como um estimulante mas também como remédio: o primeiro milagre de Jesus foi converter água em vinho; Paulo recomenda a Timóteo que tome vinho como remédio para o estômago; os gregos tinham até um deus consagrado a ele – Dionísio – convertido pelos romanos ao deus Baco. E dessa maneira chegamos a um comprimido de aspirina tão popular atualmente. A produção de compostos com atividades farmacológicas relevantes nada tem a ver com nossas necessidades humanas, mas sim com o custo de sobrevivência requerido daqueles organismos.

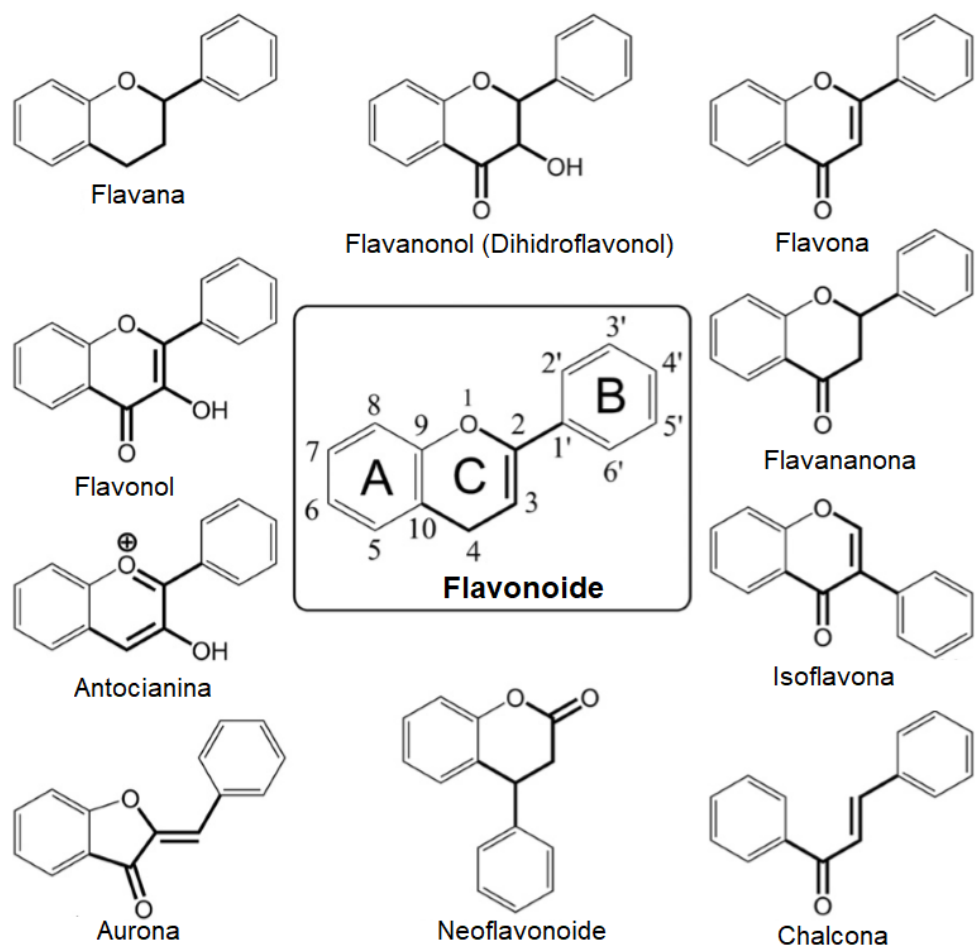
Os vegetais são seres fixos. Isso significa que, independente de como o ambiente ao seu entorno se encontra, eles não possuem como estratégia de sobrevivência a locomoção. Dessa forma, é patente a necessidade de produção de moléculas as quais os possibilitem resistir desde aos raios solares, como também a ataques de

microrganismos, de nematódeos e à herbivoria, e, além disso, a poderem garantir seu pedacinho-de-terra. “*Cada um no seu quadrado*”.

Dentre a mais variada gama de compostos produzidos pelos vegetais, assumem proeminência os compostos flavonoídicos. Flavonoides são moléculas pertencentes ao metabolismo secundário [\[185\]](#) vegetal, isto é, ao conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células vegetais com a finalidade de produzir substâncias que auxiliem na adequação ao ambiente e às suas exigências. A importância desse tipo de metabolismo não se reduz, ainda que classificado como secundário, por não se relacionar à nutrição, respiração ou à síntese de moléculas estruturais, tais como proteínas, lipídios e carboidratos. Ele se destaca, entretanto, por ser essencial para assegurar uma maior chance de competição e sobrevivência. Em sua maioria, os flavonoides compartilham uma estrutura química semelhante (esqueleto de difenil propano com dois anéis benzênicos), como mostrado na parte central [\[Figura 22\]](#).

Entre as suas várias classes, os flavonóis tipo quercetina são os mais abundantes entre os flavonóides conhecidos. Podem ser encontrados em uma variedade de alimentos comuns como maçãs, uvas, tomates, cebolas, chás, entre outros. A quercetina corresponde a cerca de 90% da ingestão humana diária de flavonóides (50-500mg/dia) [\[186\]](#).

Figura 22 – Estrutura básica dos flavonoides e alguns de seus grupos



Os flavonoides diferem entre si, em termos de classes, pelo grau de oxidação do anel "C". Dentro de cada classe, as diferenças residem na presença de radicais e/ou açúcares nos anéis "A" e "B". Moléculas de açúcares (carboidratos) ligadas aos carbonos 6 e 8 (anel A), são classificadas como C-heterosídeos. Se estiverem em outros carbonos que não esses dois, exclusivamente, a molécula é classificada como O-heterosídeo. A quercetina possui radical -OH nas posições 3, 5, 7, 3', 4' (figura central) e uma dupla ligação com oxigênio na posição 4.

Fonte: Adaptado [267].

A quercetina é um flavonoide bastante controverso na literatura. Alguns concordam com o seu potencial, enquanto outros não. E os argumentos de ambos os lados são persuasivos.

A literatura relata uma miríade de atividades sobre o potencial farmacológico da quercetina. Estudos *in-vitro* descrevem propriedades antioxidante, hepatoprotetora, antitumoral, anti-inflamatória, nefroprotetora, imunomodulatória, anti-histamínica, regulatória da pressão arterial, antifibriogênica, gastroprotetiva, entre outras. Além disso, possui atividade antibacteriana contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Micrococcus luteus*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis* [19,20], *Staphylococcus aureus* [21], contra a formação de biofilmes em patógenos presentes nos alimentos [22] e inibição parcial da DNA girase de *Escherichia coli* [23]. Também apresenta atividade antiviral contra *Herpes simplex* tipo 1, *parainfluenza* tipo 3, rinovírus, influenza A, hepatite C, dengue, contra a transcriptase reversa do HIV e outros retrovírus [24-29].

No entanto, essa vastidão de atividades tem sido questionada quanto à sua efetividade, confiabilidade e validade, por certos autores que a classificam, junto a outros compostos e produtos naturais (*natural products* – NP) como composto de pan-interferência em ensaios (*Pan-assay interference compounds* – PAINS [186]), panaceia metabólica inválida (*Invalid Metabolic Panaceas* – IMPs [187]) ou inibidor promíscuo (*Promiscuous Inhibitors* – PI [188]). As críticas residem justamente no fato de a quercetina apresentar uma vastidão de atividades, o que revelaria inespecificidade. Além disso, menciona-se que tal enormidade de efeitos se deve à propensão da molécula em formar agregados entre si e com proteínas celulares, e, portanto, devido à agregação, causar múltiplos impactos nas diversas atividades celulares. É relatada também a susceptibilidade à interferência com reagentes de ensaios baseados em reações de oxirredução e luminescentes, justamente devido ao seu potencial antioxidante bem como de absorção luminosa [186-189].

Muito vem sendo especulado quanto à especificidade de moléculas candidatas à elaboração de novas drogas, especialmente antivirais, sem que ainda se tenha chegado

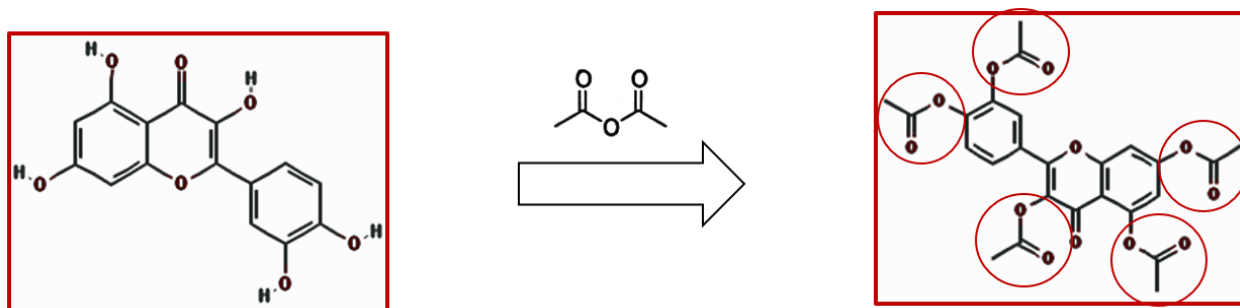
a um consenso. Alguns relatam que a abordagem mais válida seria a da polifarmacologia, ou seja, drogas com múltiplos alvos (*multitarget drugs*), enquanto outros defendem a vertente da especificidade (*one target drug*), a qual, enquanto antivirais, tem sido a predominantemente empregada. Esta última vertente, embora seja bastante eficaz em um primeiro momento, tem produzido medicamentos de alto-custo, ocasionado aumento da resistência viral associado ao baixo índice de resposta em determinados grupos, além de potencializar sua toxicidade na interação com outras drogas [182]. Na verdade, mais recentemente, as nomenclaturas relacionadas a essas duas abordagens vêm sendo revistas, dado que até mesmo compostos tidos “específicos”, como por exemplo, nucleosídeos, não são tão específicos assim. Logo, vêm sendo adotadas as referências *broad-spectrum* e *narrow-spectrum* (amplo e pequeno espectro) [304].

Martinez e colaboradores [182] e outros [190-196] defendem a abordagem polifarmacológica e mostram que, dada a complexidade do organismo em responder às infecções ou mesmo às inflamações, uma abordagem mais abrangente traria como vantagens o combate a diversos patógenos, diminuindo o nível de desenvolvimento de resistência, ao mesmo tempo que seria eficiente para combater coinfeções. Ademais, compostos com múltiplos alvos seriam ideais como uma primeira linha de tratamento ou profilaxia para infecções virais agudas, como aquelas que afetam o trato respiratório. É importante enfatizar que, dadas as diversas possibilidades de interação e alvos, o ideal seria que a proteína pela qual o composto tivesse mais afinidade fosse a responsável pelo seu efeito terapêutico, enquanto que as interações prejudiciais fossem mínimas [193], o que estaria correlacionado com a dose terapêutica [192].

Diferentes estudos têm focado em mostrar a relação entre a estrutura de um flavonoide e sua atividade, baseando-se na avaliação das diferentes posições de radicais no esqueleto dessas moléculas, e também na análise do impacto de algumas modificações – glicosilações ou substituição de radicais hidroxila por radicais metil, acetil, dentre outros – sobre sua respectiva atividade [197-213]. Nesse sentido, Danihelova e colaboradores [209] fazem uma revisão básica, mas interessante, sobre o impacto da lipofilização de flavonoides em algumas de suas atividades farmacológicas, o que inclui,

por exemplo, o aumento da permeabilidade do flavonoide pela membrana. A mesma autora também expõe que a acetilação da quercetina diminui seu efeito citotóxico sobre células de cultura Hela [208]. Um exemplo de acetilação da quercetina pode ser visto na [Figura 23](#) abaixo. Ainda nessa linha de pensamento, Gusdinar e colegas demonstram que a acetilação da quercetina aumenta seu efeito anti-inflamatório em um modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina [210]. Park e colaboradores também mostram que a acetilação do resveratrol não afetou a eficiência na inibição de melanogênese celular [211]. Outros pesquisadores, em um estudo combinado de relação estrutura-atividade – SAR – [203] com Ressonância Magnética Nuclear, UV-vis e cromatografia mostram que a a monoacetilação de um glicosídeo aumenta a capacidade de inibição sobre a enzima colinesterase.

Figura 23 – Acetilação da quercetina



A figura ilustra a pentacetilação da quercetina, ou seja, a substituição dos radicais -OH por radicais acetil. Fonte: o autor.

Finalmente, Harvey e colegas [181] mostram que o espaço biologicamente relevante, isto é, os potenciais sítios para ligação em proteínas, é bem mais coberto por *screenings* (triagens) de bibliotecas baseadas em moléculas de produtos naturais do que em bibliotecas de compostos sintéticos. Os mesmos autores argumentam que os principais desafios referentes às moléculas naturais dizem respeito às suas massas moleculares e à sua lipofilicidade, as quais devem ser menores que 350 daltons e

apresentarem um coeficiente de partição ($\log P$) que varie de -1 a 3, respectivamente. Moléculas naturais que se encaixem nessa categoria devem ser usadas como um esqueleto, a partir do qual, modificações estruturais possam ser feitas com intuito de otimizar sua respectiva atividade biológica e aumentar sua especificidade. A validade e o impacto dessas modificações podem ser preliminarmente mensurados via uso de ferramentas computacionais, o que torna a experimentação na bancada menos laboriosa e mais seletiva. Adentremos, então, nesse universo computacional...

1.3 Estratégias Computacionais

“El hombre es un milagro químico que sueña.” (Alfredo Conte)

Apesar de muitas vezes ser um pouco difícil acreditar nisso, nós, seres humanos, somos seres pensantes. Descartes, um dos fundadores do método científico (junto a Francis Bacon) e da geometria cartesiana (ou analítica) que entremeia este trabalho, diria que a confirmação da existência vem através da dúvida. Porque quando duvido, penso. E se penso, existo. O famoso *“Cogito ergo sum.”* Assim, o critério básico para existência, e posteriormente aplicado ao desenvolvimento da Ciência seria duvidar.

A dúvida nos leva não só a (ousar) questionar, como também a buscar respostas e, talvez na ausência dessas, a imaginarmos, a sonharmos ou a ansearmos por algo diferente. Diversos foram os personagens que sonharam com algo diferente, ou mesmo aqueles mais *“fora-da-casinha”*, com algo, porventura, inconcebível para o momento. Os egípcios sonhavam com a imortalidade, e, por isso, desenvolveram as técnicas de mumificação e construíram pirâmides. Nesse mesmo sentido, muitos povos da antiguidade sonharam em eternizar seus impérios e isso se traduziu arquitetonicamente em algumas construções que até hoje desafiam nossa engenharia moderna. Os atenienses, ainda que não plenamente, ousaram ao implementar um projeto de sociedade democrática. Leonardo da Vinci, um daqueles totalmente *“fora-da-casinha”* planejava protótipos de aviões e helicópteros, numa época em que nem carros, como concebemos hoje, existiam. Galileu Galilei atreveu-se a desafiar a lógica predominante do geocentrismo, ainda que não com a intrepidez de Giordano Bruno. Joana D’arc, Marie Curie, Ada Lovelace, Katherine Johnson, Dorothy Vaughan, Cecilia Payne, Mary Jackson e Comandante Grace Hopper prodigalizaram o papel da mulher na sociedade. Martim Lutero quebrou paradigmas ao questionar o abuso da fé, ao escrever e publicar suas 95 teses e ao começar a traduzir a Bíblia para que as pessoas comuns a pudessem ler. Por outro lado, John Lennon, em um contexto de guerra, com sua canção *“Imagine”*, sonhou

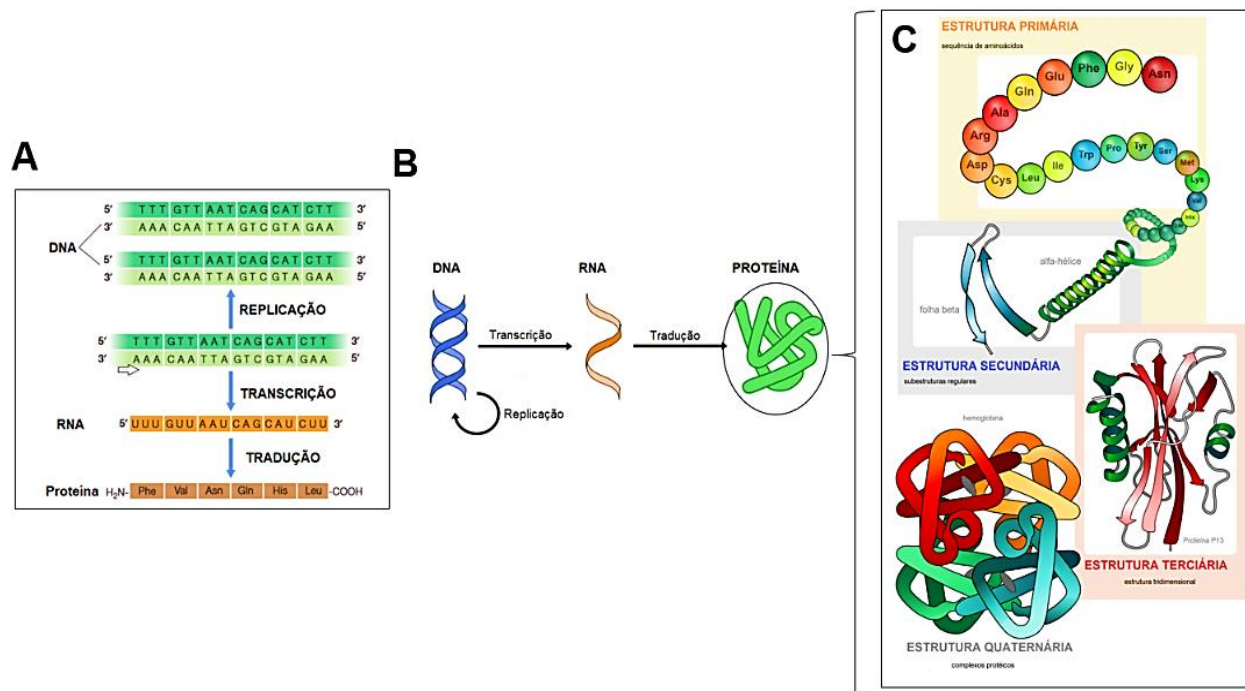
com uma sociedade alternativa, sem religiões. Um outro Martim, desta vez Luther King, com sua política pacifista e seu célebre discurso “*I have a dream*”, também insuflou ânimos que se opuseram a um sistema de ódio racial.

Tantos são os nomes e tantos os sonhos, as causas e os questionamentos advogados por eles... Continuamos (ousando, talvez) a sonhar com uma sociedade mais equilibrada como preconizaram tantas revoluções no passado, e com um Brasil mais educado e, quiçá, menos corrupto... No entanto, certas questões mais elementares atravessam a história da humanidade: o que somos? Para onde vamos? Por que estamos aqui? Se quando pensamos, existimos, qual o sentido da existência? Talvez não encontremos respostas para todas, mas ao menos algumas já começaram a ser solucionadas. E as contribuições são inumeráveis e inomináveis.

O desenvolvimento da filosofia, ou seja, do “*amor ao conhecimento*” é impulsionado pelos gregos na Antiguidade. Filósofos como Platão discorrem, dentre outras coisas, sobre modelos de governo e de sociedade, enquanto alguns como Demócrito e Leucipo estabelecem os conceitos iniciais de “*átomos*”, minúsculas partículas indivisíveis que comporiam a matéria, ou seja, aquilo do que é feito o universo. Esse conceito foi sendo aprimorado ao longo do tempo, por contribuições significativas de personagens como Dalton, Thomsom, Rutherford, Bohr, Heisenberg, Schrödinger, Chadwick e alguns outros. O progresso conceitual sobre do que seria feita a matéria não impediu que outras áreas se expandissem também, como por exemplo, o entendimento das “*leis*” que regulam a matéria, no espaço e no tempo. Um outro grego, Arquimedes, já versava sobre as propriedades da dinâmica dos corpos na água, em 250 a.C. Contribuições significativas relacionadas à astronomia foram feitas por povos antigos como maias, mesopotâmicos e egípcios. Nesse sentido, cabe mencionar o aporte proporcionado pelas pesquisas de Copérnico, Galileu Galilei, Kepler e Newton. As maiores contribuições de Newton se referem ao estabelecimento das bases da mecânica clássica sobre o estudo dos movimentos dos corpos, bem como da gravitação universal e da decomposição luminosa que impactariam os estudos desde então.

Muitos outros cientistas, o que iria muito além da menção no escopo deste trabalho, colaboraram para estabelecer o que hoje temos como a química, a física, a biologia e suas interfaces. Hooke, a partir de um pedaço de cortiça estabelece que a unidade funcional do corpo humano seria a “*célula*”. Pasteur e Koch dão início aos estudos microbiológicos. Mendel contribui com os conceitos de herança genética. Darwin, com a relação evolutiva de desenvolvimento entre os seres vivos. Pauling, Watson, Crick, Wilkins e Rosalind Franklin desvendando a estrutura tridimensional de moléculas fundamentais para a vida [Figura 24]. Sanger inaugura a era dos sequenciamentos com o primeiro sequenciamento de uma proteína. Dayhoff cataloga as sequências protéicas até então existentes, desenvolve o sistema de uma letra para caracterizar os aminoácidos e estabelece algumas das bases para algo que seria equivalente ao “Blast” atual. E a matemática então? O que dizer? Ela acompanha todo o desenrolar civilizatório. Medidas, música, contagem do tempo, trocas, comércio... De mesopotâmicos e sumérios, aos computadores atuais e a nossa realidade virtual, dos quais não abdicamos... Quem hoje imaginaria fazer pesquisa sem o “oráculo” google? Ou se aventurar em uma coleta, ou mesmo uma viagem sem gps? Ou ter de estar fisicamente presente para conversar com alguém, ou comprar produtos que deseja? Ou ainda, não poder ver a pessoa com quem se está falando? Ou talvez, não poder socializar com pessoas de qualquer lugar do mundo e “vender” seus dados em troca de “likes”? *Computador*, máquina de fazer cálculos, ou seja, cálculos, função essa inicialmente desenvolvida por mulheres, por ser considerado um serviço braçal. Para todo esse desenvolvimento foi necessário, entretanto, o estabelecimento de um sistema numérico padrão e que abarcasse o zero. Isso foi propiciado pelas rotas de comércio entre Europa-Ásia (o nosso sistema numérico é indo-arábico).

Figura 24 – Do DNA à Proteína - fluxograma simplificado



Do ácido deoxirribonucléico à proteína. Embora a figura acima exibida seja mais ilustrativa do que explanativa, o intento é ter uma visão global do processo, ou seja, a sequência de passos DNA->RNA->Proteína (A e B), bem como como os níveis de organização dessa estrutura protéica (C). Os trabalhos pioneiros de Linus Pauling com cristalografia, propiciaram o entendimento da estrutura secundária das proteínas e forneceram as bases para que Watson e Crick também desvendassem a estrutura tridimensional do DNA. Há controvérsias sobre a originalidade do trabalho de Watson & Crick, quanto à possível participação colaborativa, mas não inclusa, de cientistas como Wilkins e Franklin. A estrutura linear de uma proteína (C), ou seja, a sequência de aminoácidos da qual ela é composta foi desvendada, primeiramente, por Sanger no sequenciamento da insulina bovina (1958). Margaret Dayhoff auxiliou no estabelecimento de um sistema de uma única letra para catalogar os aminoácidos, bem como em propor matrizes matemáticas para o processo de alinhamento dessas sequências. A relação entre a sequência linear de aminoácidos de uma proteína (estrutura primária) e a determinação de sua estrutura tridimensional continua representando um desafio, não só para área experimental quanto também para área computacional, em que algoritmos combinados a cálculos biofísicos e estatísticos vêm sendo aprimorados com este intuito.

Fonte: Adaptado – (A) [272], (B) [273], (C) [274].

Se outrora o progresso científico foi marcado, majoritariamente, por contribuições individuais, a partir do século XX e, principalmente, com o desmembramento dos diferentes campos científicos e do aprofundamento do conhecimento, as pesquisas se

tornaram mais coletivas e voltadas para a sociedade. Isso é impulsionado pela aplicação dos conhecimentos científicos, ou seja, a tecnologia, voltada às invenções: carros, telefone, rádio, rede elétrica, eletrodomésticos, aviões, vacinas, medicamentos....O que antes era sonho, começa, gradativamente, a se tornar mais e mais palpável, a facilitar a vida do homem contemporâneo, e a prolongá-la, esta última devido, preponderantemente, às descobertas e práticas preventivas na área de saúde.

Contudo, ainda há muito o que descobrir e explorar. Mesmo o desenlace do material genético humano a partir do Projeto Genoma Humano, o qual supostamente desvendaria todo o mistério para cura das doenças que afligem a humanidade, na verdade trouxe muito mais questionamentos do que respostas. Embora os conceitos primitivos de *átomos* tenham sido estabelecidos há mais de 2000 anos, ainda hoje é algo desafiador entender as interações atômicas e moleculares em uma escala experimental. Dentre tantas áreas e aplicações, o desenvolvimento de fármacos, na atualidade, é imprescindível. Não só porque isso nos possibilitou melhorias na qualidade de vida, como por exemplo, tratar doenças como câncer, alzheimer, parkinson, diabetes, como também, porque, à medida que tentamos controlar infecções com antibióticos, antimicóticos e antivirais, teremos de lidar com o surgimento constante de mutantes resistentes. Para isso, é necessário compreender os princípios pelos quais moléculas de interesse interagem ou com os alvos celulares ou com os alvos no microrganismo em questão, nesse caso, proteínas ou enzimas. Todo esse conhecimento é elementar para o desenvolvimento de novas drogas. As principais técnicas utilizadas para essa finalidade incluem **R**essonância **M**agnética **N**uclear (RMN), **R**essonância **P**aramagnética **E**letrônica (RPE) e Cristalografia, as quais apresentam limitações, não só por serem laboriosas e frequentemente custosas, como também por apresentarem dificuldades de representação no que concerne à dinâmica de alterações estruturais dos sistemas biológicos [214].

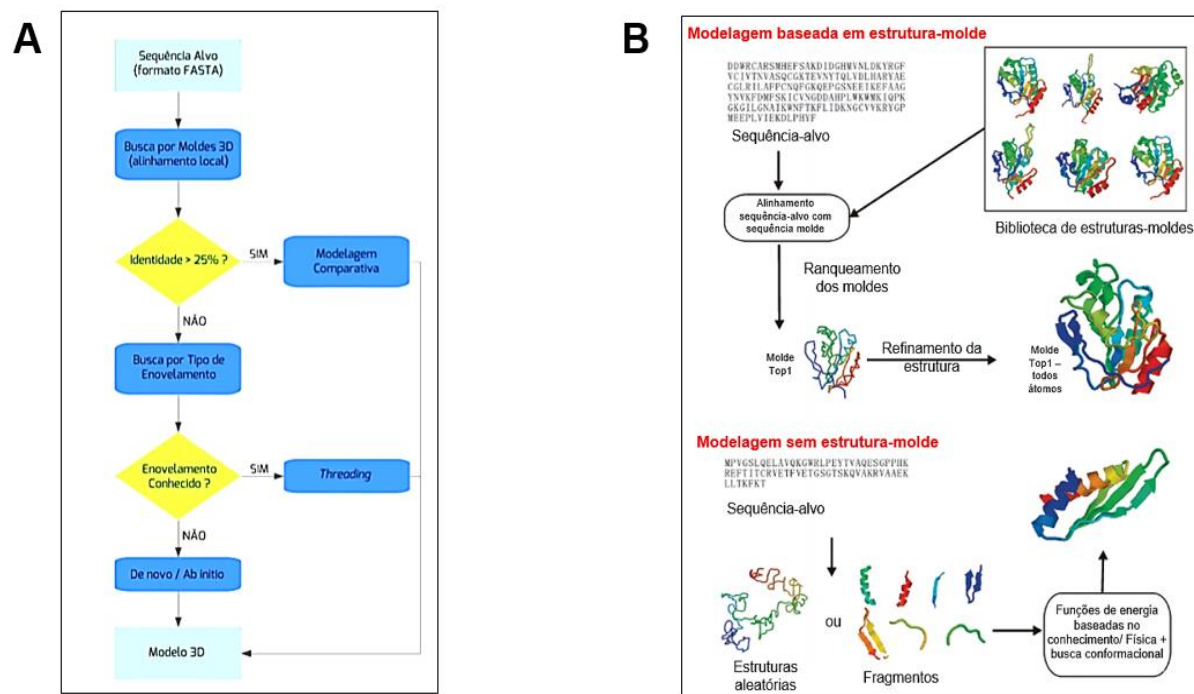
Como alternativa às limitações das técnicas experimentais, diversas ferramentas e estratégias computacionais vêm sendo propostas e utilizadas, assistidas pela constante atualização e aperfeiçoamento de seus algoritmos-base. Essas ferramentas incluem a o

uso de metodologias baseadas em equações físicas e o uso de metodologias fundamentadas numa aprendizagem informática. Cabe ressaltar, entretanto, que o fato de essas metodologias serem baseadas em um ou noutro princípio, não há a exclusão da possibilidade de que elas possam ser combinadas.

As primeiras abordagens são chamadas de *simulações* e embasadas, principalmente, em cálculos biofísicos de estrutura protéica, bem como na utilização de equações provenientes da mecânica clássica, ou seja, em equações de Newton. As segundas, são chamadas *aprendizagem automática* e *data-mining* e se caracterizam pela extração de dados de uma amostragem definida e pela busca por padrões, através de inferências estatísticas [215].

Tanto as simulações quanto as abordagens de aprendizagem e extração de dados têm sido extensivamente utilizadas no processo de descoberta de novas drogas [195-200,202-207,220-222]. Dentro dessa categoria se enquadram a modelagem computacional, o *docking* (“Atracamento”/ “Acoplagem”) e a dinâmica molecular (DM). A proposta da modelagem computacional de proteínas é a de oferecer uma alternativa ao uso de Cristalografia e RMN, e possibilitar que simulemos a estrutura tridimensional (3-D) de uma proteína para o qual temos interesse e cuja estrutura não tenha sido resolvida experimentalmente. Ela pode ser realizada através de métodos independentes de estrutura-molde (*template free* – predição *ab initio* e *de novo*) e aqueles baseados em estrutura-molde (*template based* – *modelagem comparativa* e *threading*) [275, 276]. A adoção de cada uma dessas abordagens diz respeito à qualidade de alinhamentos da sequência primária (a sequência linear de aminoácidos) de uma proteína desejada contra um banco de dados de sequências, bem como à presença de estruturas 3-D de alta qualidade as quais correspondam e representem essas sequências no banco de dados de proteínas (PDB) [275, 276], podendo, ou não, haver relação evolutiva entre essas sequências. Se há relação evolutiva, diz-se que a modelagem é por homologia; em não havendo relação evolutiva, é por enovelamento (*threading*) [Figura 25].

Figura 25 – Resumo das principais técnicas de modelagem de proteínas

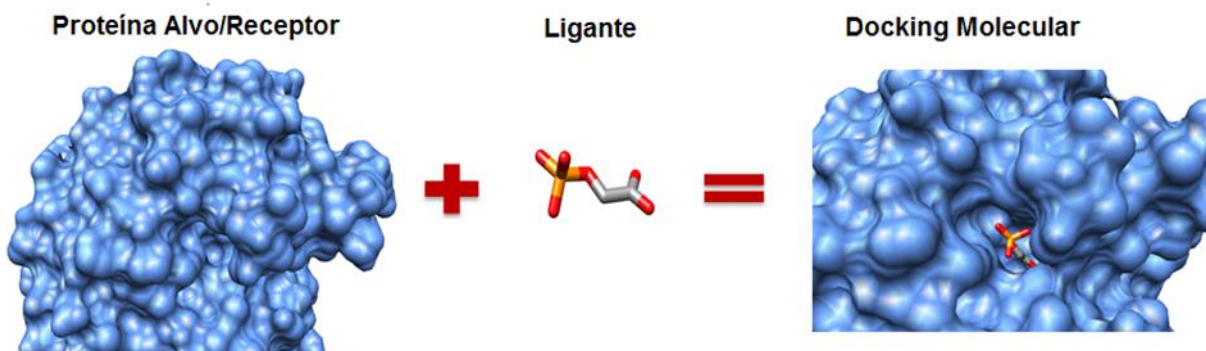


A modelagem nos possibilita simular a estrutura de uma proteína, de uma enzima ou sítio ativo para os quais não existam estruturas tridimensionais resolvidas experimentalmente. A importância da técnica se deve justamente a essa possibilidade, já que experimentalmente tal determinação é um processo laborioso e custoso. A partir da sequência de aminoácidos de uma proteína, é possível verificar se, nos bancos de dados disponíveis (principalmente o “[Blast](#)”) existem sequências similares àquela de interesse, o que pode indicar alguma relação evolutiva entre elas (modelagem comparativa), e/ou para as quais constem estruturas tridimensionais resolvidas. No [Uniprot](#) também é possível averiguar se uma proteína de interesse já foi completamente sequenciada. O Protein Data Bank ([PDB](#)), por outro lado, é o banco de dados mais utilizado para consulta das estruturas tridimensionais de proteínas resolvidas (Biblioteca de estruturas-moldes). A partir do alinhamento e da possível similaridade entre as sequências, a modelagem a ser feita pode ser por homologia ou *threading* (os dois “basicamente” representados na parte superior de (B), pois o *threading* pode relacionar a sequência a um enovelamento para o qual não exista relação evolutiva) ou, em não havendo estruturas 3D disponíveis, a modelagem é feita mais artesanalmente – parte inferior de (B), e envolve *expertise* nos cálculos (Monte Carlo) e refinamentos (bio)físicos, mas também implica em redução da dimensão do tamanho das estruturas estudadas.

Fonte: A [\[b4\]](#), B adaptado [\[275\]](#).

Já quanto ao *docking* e a DM, a proposta é representar macroscopicamente um evento microscópico, isto é, o conjunto de interações interatômicas e intermoleculares entre estruturas tridimensionais (3D) de macromoléculas (*proteínas*, também chamadas *receptores*) com pequenos compostos (*ligantes*), ou de macromoléculas com macromoléculas, através de estratégias como *docking* [Figura 26] e DM. O que mantém e estabiliza esses complexos proteína-ligantes/proteína-proteína são as interações intermoleculares, também chamadas de interações não-covalentes. As ligações de hidrogênio são um exemplo e são bem conhecidas, devido ao seu papel na formação da estrutura secundária de proteínas. Além dessas existem, basicamente, as interações hidrofóbicas, eletrostáticas e de van der Waals [220].

Figura 26 – Representação básica de um Docking Molecular



O *docking* possibilita visualizar a orientação preferencial de interação entre uma proteína alvo e um ligante, ou mesmo entre duas proteínas, através da formação de um complexo. A afinidade dessa ligação pode ser mensurada por meio de funções de pontuação.

Fonte: Adaptado [217].

O *Docking* e a Dinâmica Molecular fazem parte de uma estratégia de desenvolvimento de novas drogas conhecido como “*Modelagem de Drogas Baseada na Estrutura*” (*Structure-Based Drug Design* – SBDD, em inglês). O propósito desse tipo de pesquisa é entender a estrutura de macromoléculas, em termos físico-químicos, e, assim, realizar buscas sistemáticas por ligantes, os quais exibam uma alta afinidade de ligação

com, por exemplo, o sítio ativo dessas macromoléculas [215]. O foco aqui é na estrutura da macromolécula (proteína/receptor). O intuito do *docking* é prever qual a conformação de um determinado ligante dentro de um sítio de interesse na macromolécula [223], de forma a estabelecer qual é o modo de ligação nesse caso, bem como correlacionar isso com a atividade biológica do ligante. A afinidade dessa interação é traduzida em energia de ligação, ou em diferentes funções de pontuação, as quais variam de acordo com o tipo de algoritmo utilizado. Um exemplo de função de pontuação é representado nas seguintes equações (1 e 2) de constante de ligação:

$$K_{\text{ligação}} = e^{\frac{-\Delta G}{RT}} \quad (1)$$

Em que $R \approx 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$;
 T = temperatura em Kelvin;
 ΔG = energia livre de Gibbs ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)

E ΔG equivale a:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

Em que ΔH = entalpia (J);
 T = Temperatura (Kelvin)
 ΔS = Entropia ($\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Frequentemente, o que difere a constante de ligação entre alguns tipos de algoritmos voltados a *Docking* é justamente o cálculo da energia livre de Gibbs. Esse cálculo pode variar de forma a considerar diferentemente os tipos de interações não-covalentes, como também a ponderar a presença ou não de solvente, e, além disso, dos efeitos entrópicos [215, 220]. Ademais, outros critérios diferenciam os algoritmos: o tipo

de busca em termos do espaço conformacional que o ligante em questão pode ocupar – dividindo-se em estocático ou sistemático – bem como o critério a ser utilizado no ranqueamento das funções de pontuação – os quais podem ser fundamentados na utilização de um campo de forças, empíricos (como o da [equação 1](#)) ou baseados no conhecimento [revisto por – [215](#), [220](#), [223](#)]. Alguns softwares de *Docking* bastante utilizados são Gold [\[224\]](#) – estocástico e baseado em campo de forças –, Glide [\[225\]](#) – sistemático e empírico – e o Autodock [\[226\]](#) – estocástico, e podendo ser baseado em campo de forças ou empírico.

Diferentemente da estratégia do *docking*, o qual tende a considerar uma conformação mais rígida, tanto do receptor quanto do ligante, a DM surge com intuito de ultrapassar essa limitação ao conceder flexibilidade ao complexo proteína-ligante [\[214,216,221,222,227\]](#). A ideia por trás dessa estratégia é a aplicação da mecânica Newtoniana (2ª lei de Newton) a um sistema molecular. Consiste no estudo do comportamento de um determinado conjunto de átomos (podendo ser uma proteína, ou um complexo proteína-ligante, ou uma proteína em uma membrana, dentre outros) durante um período de avaliação. Para isso, essa proteína ou complexo é colocado dentro de uma caixa com água, cujo formato depende desse conjunto de átomos e moléculas em questão, formando um sistema (proteína/complexo proteína-ligante + água). Após passar por um processo de minimização de energia, o sistema é gradativamente submetido a um aquecimento até uma temperatura desejada. Isso gera movimento nos e dos átomos, isto é, transforma a energia potencial em energia cinética. Ou seja, as coordenadas espaciais e as velocidades dos átomos vão gradativamente se alterando em função do aquecimento do sistema e do tempo, até a temperatura desejada. Alcançada essa temperatura, o sistema é nela simulado sob determinados parâmetros até atingir o equilíbrio. O comportamento desse sistema é mensurado a partir da resolução da equação de movimento (2) para cada átomo do sistema. Além disso, a interação entre esses átomos e suas energias, ao mesmo tempo, é sistematizada a partir de um determinado campo de forças. A resultante do movimento e das forças atuantes no sistema é atualizada a cada intervalo de tempo, durante um determinado número de

passos. Os cálculos, em relação à equação de movimento (3) e ao campo de forças [Figura 27] são representados abaixo, bem como uma figura esquemática simples de um procedimento de DM clássica [Figura 28]:

$$\vec{F} = m\vec{a} \quad (3)$$

Em que F= força (N);
m= massa (kg);
a = aceleração (m*s⁻²).

Figura 27 – Cálculos envolvidos no campo de forças

A

$$V = \sum_i^{\text{ligações}} \frac{k_{l,i}}{2} (l_i - l_{0,i})^2 + \sum_i^{\text{ângulos}} \frac{k_{\alpha,i}}{2} (\alpha_i - \alpha_{0,i})^2$$

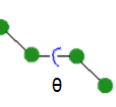
$$+ \sum_i^{\text{torsões}} \left\{ \sum_k^M \frac{V_{ik}}{2} [1 + \cos(n_{ik} \cdot \theta_{ik} - \theta_{0,ik})] \right\}$$

$$+ \sum_{i,j}^{\text{pares}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i,j}^{\text{pares}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}}$$

B

Ligação 

Ângulos 

Torsões 

van der Waals 

Eletrostática 

Em A, estão representados os termos mais comumente calculados pelos Campos de Forças.

Em que esses representam variações na energia em função:

- do alongamento das ligações (l), de acordo com a lei de Hooke – O parâmetro κ define a rigidez da mola de ligação. $l_{0,i}$ representa a distância de equilíbrio entre dois átomos. Logo, apenas pequenas alterações em l_i são permitidas, já que um valor alto implica em quebra da ligação;
- dos ângulos (α), ou energia de flexão, também baseada na lei de Hooke. O parâmetro κ controla a rigidez da mola de ângulo, enquanto $\alpha_{0,i}$ é o ângulo de equilíbrio;
- das torsões nos ângulos diédricos (θ), ou energia de torsão, modelada por uma função periódica.

V representa a barreira torsional (ou amplitude, isto é, o intervalo de oscilação), θ é o ângulo de torsão ao redor do eixo de ligação, e η é a periodicidade. Esses parâmetros são fundamentados no tipo de ligação entre quatro átomos (e.g. C-C-C-C, C-O-C-N, H-C-C-H, entre outros).

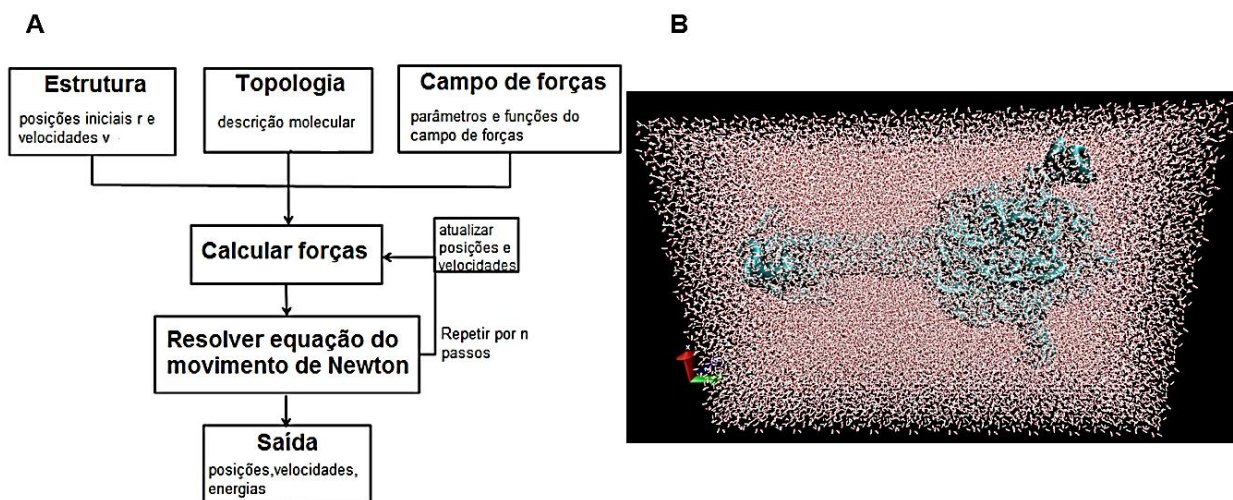
- De forças de van der Waals, ou potencial de Lennard-Jones, em que ϵ é a “profundidade” da curva no gráfico (energia x distância do Potencial de Lennard-Jones) e representa também uma medida de quão fortemente as duas partículas se atraem; σ é a distância em que o potencial intermolecular entre as duas partículas é zero, o que possibilita analisar quão perto duas partículas não-ligadas podem chegar e é, portanto, referido como o raio de van der Waals; r é a distância de separação entre ambas as partículas (medida do centro de massa de uma partícula para o centro de massa da outra partícula)
- e as interações eletrostáticas, baseadas na lei de Coulomb, em que q representa as cargas parciais de dois átomos não-ligados A e B, r é a distância entre eles, e ϵ é a constante dielétrica.

Os termos “ligações”, “ângulos” e “torções” representam os *termos ligados*, isto é, existe uma ligação intramolecular entre os átomos. Já os dois termos “pares” respondem pelos *termos não-ligados* e constituem os cálculos das interações intermoleculares.

Em B há a representação dos termos vistos em A. As esferas verdes representam núcleos dos átomos, e as linhas pretas representam a existência de ligação intramolecular entre eles. No caso dos dois últimos termos, não há ligação intramolecular estabelecida, apenas as interações intermoleculares.

Fonte: Adaptado B [227].

Figura 28 – Fluxograma simplificado de Simulação de Dinâmica Molecular



A – esquema básico dos passos envolvidos e dos tipos de arquivos de entrada numa simulação de Dinâmica Molecular.

B – Visualização da proteína F do RSV modelada neste trabalho, imersa em uma caixa cúbica com solvente, preparada pelo módulo tleap do Amber.

Fonte: Adaptado A [216], B - o autor.

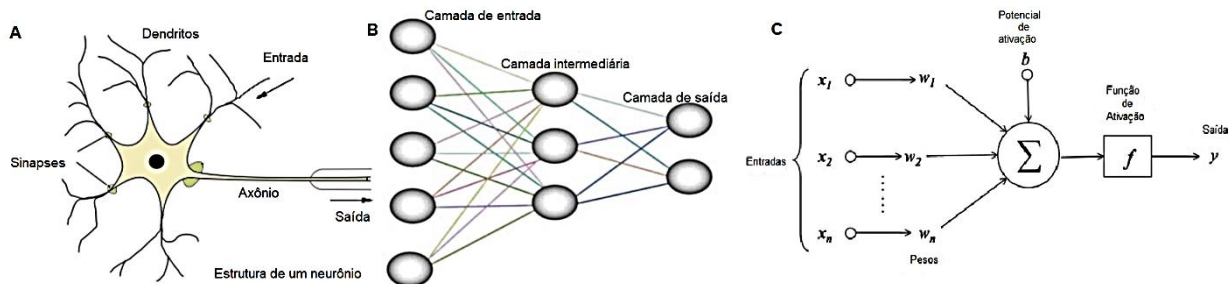
Fica claro que a simulação de DM é baseada em cálculos complexos, fundamentados na resolução da equação de movimento e do campo de forças, a cada passo determinado por um intervalo de tempo. Assim, mesmo para um sistema pequeno, os cálculos para cada átomo e para todos os tipos de interação possíveis (especialmente as forças de van der Waals) se tornam um problema considerável. Logo, esquemas de aproximações são necessários. Isso inclui o uso de “*cutoff*”, isto é, estabelecer um limite de distância para as interações consideradas, bem como de outras abordagens, por exemplo, PME (particle-mesh Ewald) [214]. Os principais pacotes de programas de DM incluem AMBER (www.ambermd.org), GROMACS (www.gromacs.org), CHARMM (www.charmm.org), NAMD (www.ks.uiuc.edu/Research/namd/), Desmond (www.deshawresearch.com/) e Hyperchem (www.hyper.com/) .

Enquanto a DM e o *docking* são estratégias de desenvolvimento de novas drogas voltadas à estrutura, e nesse caso, a estrutura representada é de uma proteína alvo,

existem outras estratégias voltadas aos ligantes. Essas estratégias são chamadas “Triagens virtuais baseadas nos ligantes” (LBVS – *Ligand-Based Virtual Screening*, em inglês). Elas se fundamentam no conhecimento de propriedades físico-químicas de ligantes ativos, de forma a obter um padrão de atividade biológica fundamentada nas características moleculares desses ligantes ativos [215,228,229]. A partir disso, realizam-se buscas sistemáticas por moléculas que apresentem propriedades semelhantes, das quais se espera obter resultados de atividade biológica equivalentes. As ferramentas de *aprendizagem informática* e *data-mining* são expressivamente importantes nesse aspecto. E uma dessas ferramentas são as Redes Neurais Artificiais.

A proposta das Redes Neurais Artificiais (ANN – *Artificial Neural Network*, em inglês) é de simular o complexo sistema neuronal humano, representado pelo cérebro, cujo conhecimento se baseia em um processo de aprendizagem. Um neurônio possui em sua estrutura os dendritos, por onde o impulso nervoso (ou a informação) entra, o corpo celular, por onde a informação é processada, o axônio, por onde a informação passa, e os terminais sinápticos, por onde a informação sai [Figura 29, (A)]. Da mesma forma, a ANN possui a sua camada de entrada, a(s) sua(s) camada(s) de processamento e a camada de saída [____, (B)]. Na ANN, os neurônios são chamados de nós, ou de elementos de processamento [230]. Os nós podem ser interconectados entre si, de forma a gerar multicamadas. A importância dessas múltiplas conexões é mensurada através de um fator peso [230] [____, (C)].

Figura 29 – Redes Neurais



O princípio das redes neurais é o estabelecimento de um sistema interconectado de múltiplos neurônios (neurônios artificiais), os quais operam em paralelo, pelo ajuste (treinamento) dos pesos a eles dados, o que resulta em uma saída com a resposta à alguma questão.

Fonte: Adaptado A e B [218], C [219].

As ANN representam uma estratégia computacional atrativa, não só por possuírem atributos de não linearidade, alto paralelismo, robustez, como também por sua tolerância a falhas, por sua capacidade de aprendizado, habilidade em lidar com imprecisões, e por sua competência em generalizar soluções [277]. Esses atributos propiciam um melhor ajuste aos dados, uma predição adequada ainda que com algum grau de incerteza, além da possibilidade de aplicação de dados novos ao modelo gerado.

Para que uma ANN possa ser utilizada para resolução de algum problema, principalmente aqueles que envolvam sistemas não-lineares (ou seja, nos quais não há uma relação de causalidade direta), é necessário que ela seja treinada. Neste processo de treinamento, ocorre aprendizagem e, então, a rede deve ser capaz de generalizar soluções para o referido problema. Esse processo de treinamento pode ser dividido em duas categorias principais: treinamento supervisionado e treinamento não-supervisionado. O primeiro consiste no conhecimento *a priori* das entradas e das saídas da rede, de forma que os pesos da ANN possam ser corrigidos, para que o erro entre a resposta gerada pela rede e aquela desejada seja mínimo. É como resolver equações e depois checar as respostas. Se você errou, você tem de repetir o processo, até que você se torne apto a resolver e acertar o maior número possível de equações. Por outro lado,

no treinamento não-supervisionado não existem respostas *a priori*, e, portanto, a rede deve se auto-organizar de forma a identificar características comuns entre os elementos do conjunto em questão e categorizá-los. É como organizar o guarda-roupa. Podemos separar as roupas por cor, por tipo, por tecido, por tamanho... Ou seja, algum critério de classificação pode também ser estipulado.

Um treinamento supervisionado pode ser dividido em três etapas: uma fase de treinamento concomitante a uma de validação, e uma de teste, sendo que essas podem seguir a proporção 70:15:15 [278-281]. Para a fase de treinamento é reservada a maior parte da amostragem. A cada ciclo que a rede roda, os resultados esperados são mostrados a ela, de forma que o algoritmo ajuste os pesos (camada por camada) e corrija os erros (camada por camada) [231]. O algoritmo que faz esses ajustes é conhecido como retropropagação de erros (*backpropagation*) [282,283]. A fim de evitar que a rede memorize o conjunto de treinamento, ao mesmo tempo em que esse ocorre, acontece também o processo de validação. A validação é feita com 15% do conjunto amostral. Ou seja, uma parte dos dados os quais não foram mostrados para rede no treinamento, são mostrados e as respostas produzidas pela rede são comparadas com as respostas desejadas, e o erro quadrático dessa comparação também é mensurado. Isso possibilita visualizar se a rede é capaz de generalizar soluções, uma vez que um erro quadrático muito alto na validação indica que não há capacidade de generalização. Os outros 15% restantes da amostra são utilizados para o teste, ou seja, após o treinamento e a validação. Eles nos possibilitam verificar a qualidade final em prover soluções generalizadas da rede. Assim, a rede treinada pode então ser usada para avaliação de um conjunto de dados não-conhecidos.

Entretanto, um dos fatores cruciais para se obter uma boa acurácia para predição executada por uma ANN diz respeito à sua arquitetura (número de camadas e neurônios, bem como os pesos) [284]. Uma das estratégias que tem se provado extremamente eficaz em otimizar a arquitetura de ANN é a adoção de algoritmos genéticos (AG). Os AGs são métodos computacionais os quais combinam princípios de evolução e genética (hereditariedade, mutação, seleção natural e recombinação ou *crossing over*) para

buscar soluções de acordo com operadores probabilísticos [285]. Essa abordagem consiste em produzir uma vasta gama de soluções potenciais e “evoluir” uma solução para o problema. Assim, primeiramente uma população formada por um conjunto aleatório de indivíduos é gerada. Logo, a definição de indivíduos se refere a uma codificação das variáveis relacionadas à arquitetura da rede. Essa população representa possíveis soluções para um dado problema. Durante o processo evolutivo, essa população é avaliada, e, portanto, cada indivíduo recebe uma nota, de acordo com sua habilidade de adaptação ao ambiente. Uma parte dos mais adaptados são mantidos, enquanto o restante é descartado. O grupo mantido pela seleção pode sofrer alterações através de mutações ou recombinação e gerar descendentes para próxima geração. Esse processo de reprodução é mantido até que uma solução ótima, de acordo com algum critério matemático, seja encontrada.

Redes Neurais Artificiais, *Docking*, Dinâmica Molecular e Modelagem Molecular são ferramentas computacionais utilizadas no intento de otimizar estudos, tecnologias, investigações, bem como a descoberta de novos medicamentos, pois, apesar de todos os avanços científicos, a pesquisa contemporânea vem passando por um momento peculiar. A despeito da miríade de desafios a qual o mundo está enfrentando, alguns dos quais incluem explosão populacional, imigração, pobreza, segurança alimentar, crise humanitária, surgimento de microrganismos super-resistentes, reaparecimento de doenças outrora erradicadas, dentre outros, cortes de investimentos cada vez maiores e mais frequentes têm sido anunciados. Há ainda o fato de que, a exigência de soluções profícuas mine toda curiosidade advinda de um resultado malogrado. Erros devem ser considerados como resultados na pesquisa científica? Como lidaríamos hoje com um monge que faz experimentos com ervilhas? Em um artigo, recentemente publicado, os autores revisam que, atualmente, os custos para a produção (do primeiro estudo laboratorial até a liberação no mercado) de uma única droga beira os US\$2.6 bilhões de dólares, em um tempo estimado de 14 anos [221]. Os gastos se devem principalmente a questões de segurança na administração dos compostos candidatos a drogas, bem como a uma baixa atividade numa fase final de avaliação (teste em humanos). Ainda que não

seja possível diminuir todos os custos, essas ferramentas computacionais colaboram no aprimoramento desse processo, ao proporcionarem maior racionalidade, melhor direcionamento, funcionalidade e uniformidade aos procedimentos experimentais, por previamente ranquearem os compostos e excluírem os inativos, o que leva a um aumento de eficiência, e, assim, reduz custos, tempo e favorece maior aproveitamento das pesquisas.

5. CONCLUSÃO

“... all things are made of atoms, and [that] everything that living things do can be understood in terms of the jiggings and wiggings of atoms”. (Richard Feynman)

Nossos objetivos para este estudo foram elaborar a modelagem da proteína F em seu estado de pré-fusão e então realizar simulações de *docking* e dinâmica molecular dessa proteína em complexo com a quercetina e o Q1, e avaliar a interferência da acetilação nesse processo. Além disso, desenvolver uma ANN associada ao algoritmo genético de forma a prever flavonoides com capacidade anti-RSV.

Nossos resultados podem ser sumarizados da seguinte forma:

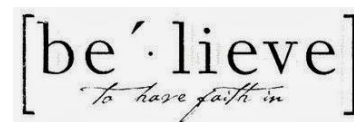
- a) O que deu certo:
 - a proteína F foi modelada completamente (RSVmF), incluindo as porções N-e C-terminais, o peptídeo 27, o domínio transmembrânico e a cauda citoplasmática;
 - os resultados de *docking* evidenciaram que a quercetina, o Q1 e o inibidor-controle ocupam a cavidade central da proteína e possuem basicamente a mesma energia de interação $\sim -6,5$ kcal/mol;
 - a DM com os ligantes evidenciou que a quercetina possui uma tendência ao escape da região da cavidade central, enquanto que o Q1 permanece na cavidade;
 - a acetilação aumentou a capacidade virucida da quercetina por favorecer a interação com a proteína. Isso é traduzido na energia livre de Gibbs, a qual, para o complexo RSVmF-Quercetina foi de $-4,92$ Kcal/mol enquanto que para o Q1 foi de $-14,22$ kcal/mol;
 - o modelo de ANN proposto no trabalho revelou excelente capacidade preditiva ($\approx 92,5\%$ de acerto geral), o que evidencia ser um método válido para o planejamento racional de procedimentos experimentais, pela exclusão preliminar de flavonoides inativos e a pré-seleção de ativos.

b) o que não deu (tão) certo:

- embora RSVmF tenha sido válida para explicar a interação com as moléculas, 200ns não foram suficientes para a estabilizar, principalmente quanto ao seu domínio transmembrânico e cauda citoplasmática. Isso sugere que ou essas regiões devem ser retiradas do modelo, ou inseridas em uma membrana;

- o banco de dados utilizado na elaboração de nossa ANN precisa ser aumentado, de forma a conferir ainda maior capacidade de generalização à rede.

6. PERSPECTIVAS



O desenvolvimento de estratégias computacionais para auxiliar na descoberta de novos medicamentos está alvorecendo. Em nosso trabalho, estipulamos um modelo para avaliação da capacidade virucida de flavonoides, bem como uma proposta de rede neural artificial para seleção de flavonoides com atividade anti-RSV.

No entanto, nenhuma pesquisa é finita em si. Existem pontos no trabalho a serem melhorados e continuados:

- a) Pode-se estabelecer um elo entre a predição gerada pela rede neural artificial e o modelo de avaliação de capacidade virucida (RSVmF);
- b) O modelo de avaliação de capacidade virucida pode ser inserido numa membrana, ou podem ser retirados as porções transmembrânicas, citoplasmáticas, o peptídeo sinal e o peptídeo 27;
- c) O efeito de mutações também pode ser incluso no modelo RSVmF;
- d) Seria interessante se RSVmF fosse inserida em uma membrana e se avaliassem os impactos de flavonoides na membrana e qual efeito disso sobre a proteína;
- e) A ANN pode ser acrescida de alguns outros parâmetros, tais como quantidade de doadores/aceptores de elétrons, e quantidade de ligações rotacionáveis;
- f) O modelo de ANN pode ser estendido a outros vírus respiratórios (e.g. influenza, rinovírus), de forma a se poder ter um comparativo;
- g) O banco de dados BD1 da ANN pode ser usado num modelo de programação dinâmica, de maneira a se avaliar qual parâmetro tem mais peso na determinação de uma possível atividade.

Como um último adendo, gostaria de fazer algumas considerações pessoais.

Muito embora o papel da Ciência seja o de trazer soluções que beneficiem a humanidade como um todo, a dor também é fruto de ações danosas realizadas por ela, e, frequentemente, o desenvolvimento científico esbarra no pecado que tenazmente nos assedia de querermos controlar tudo. Poder. Devemos prezar pela ética, bem como pela

aproximação da Ciência à sociedade, na qual o debate e o esclarecimento devem sempre estar presentes. É desolador ver que, apesar de todo progresso científico (inteligência artificial, *machine learning*, internet das coisas) continuamos tendo como meta a erradicação do analfabetismo em 2018. É desalentador saber que a cada 35 segundos uma criança morre de pneumonia no mundo ou ainda que, a cada 3 segundos, uma morre de fome. 1... 2... 3... Não existe desenvolvimento tecnológico que não exerça impacto na sociedade, beneficiando-a ou sendo usado como subterfúgio para excluir ainda mais. E esse desenvolvimento se inicia, embora não exclusivamente, na Academia. A tecnologia depende essencialmente de quem está por trás dela, seja desenvolvendo, programando ou consumindo. E aqui há um grande perigo em ser apenas consumidor. Em um momento em que máquinas assumem afazeres humanos, no qual algoritmos são utilizados para desvelar nossas afinidades políticas, em que eleições são decididas com base na divulgação massificada de notícias falsas, onde pessoas utilizam democracia para clamar pelo retorno de ditaduras, no qual nos apercebemos envoltos por um noção forjadamente social tão frágil e tênue do poder da informação e do conhecimento, em que mesmo nossos sentimentos mais íntimos são traduzidos por algoritmos de “curtir”, e no qual ferramentas computacionais têm sido usadas com intuito de usurpar nossas consciências, URGE que retomemos nossa posição de seres humanos criativos, críticos e inventivos, que pensam, para repensarmos o direcionamento que temos dado à tecnologia. Sensibilidade, sensatez, dúvida são necessárias para fomentar a empatia e o árduo trabalho socrático de "conhecer-se a si mesmo", e de "saber que nada sabemos". A construção de um SER científico demanda bases de humildade, curiosidade e empatia. Assim, podemos desenvolver uma tecnologia que nos assista na busca pela nossa humanidade, que nos mostre *que não somos apenas algoritmos, mas somos um complexo aglomerado de matemática, lógica, na conjunção, injunção, exclusão da vida, em que a dor é necessária e lapidar essa dor de forma construtiva também*⁴. A dor, aquela de nos sentirmos sozinhos na imensidão do universo, ou talvez na curiosidade imensa

⁴ COSTA, P.F. Em “O sentido da Tecnologia”. Disponível em: <https://unicolegio.com/home/>

de não estarmos, a qual não precisa ser abrandada somente por remédios e controle de hormônios, mas também pela busca conjunta de conhecimento e construção de contextos. URGE que usemos os algoritmos para podermos sentir, sim!, sentir! Mas um *sentir que nos leve a buscar conhecimento, pois conhecimento dá contexto e contexto dá significado*⁴. Um sentir que nos leve a *tentar abrandar a nossa dor e a dor do outro* também. Essa é a proposta desse trabalho. Esse é o *sentido da tecnologia*⁴.

REFERÊNCIAS

- 1- WORLD HEALTH ORGANIZATION . Global Health Observatory Data (GHO). **Child mortality and causes of death**. Disponível em: http://www.who.int/gho/child_health/mortality/en/ . Acesso em 16 março 2018.
- 2- TREGONING, J.S.; SCHWARZE, J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology and immunology. **Clinical Microbiology Reviews** v. 23, n.1, pp. 74-98, 2010. DOI: [10.1128/CMR.00032-09](https://doi.org/10.1128/CMR.00032-09).
- 3- FEARNES, R.; DEVAL, J. New antiviral approaches for respiratory syncytial virus and other mononegaviruses: Inhibiting the RNA polymerase. **Antiviral Research** v. 134, pp. 63-76, 2016. DOI: [10.1016/j.antiviral.2016.08.006](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.08.006) .
- 4- HUANG, K.; WU, H. Prevention of respiratory syncytial virus infection: from vaccine to antibody. **Microbiology Spectrum** v. 2, n. 4, 2014. DOI: [10.1128/microbiolspec.AID-0014-2014](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0014-2014) .
- 5- NAIR, H. *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. **Lancet** v. 375, n. 9725, pp. 1545-1555, 2010. DOI: [10.1016/S0140-6736\(10\)60206-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60206-1) .
- 6- PELTOLA, V.; RUUSKANEN, O. Respiratory viral infections in developing countries: common, severe, and unrecognized. **Clinical Infectious Disease** v. 46, n. 1, pp. 58-60, 2008. DOI: [10.1086/524020](https://doi.org/10.1086/524020) .
- 7- RUDAN, I. *et al.*, Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. **Journal of Global Health** v. 3, n. 1, 2013. DOI: [10.7189/jogh.03.010401](https://doi.org/10.7189/jogh.03.010401) .
- 8- VISSERS, M.; GROOT, R.; FERWERDA, G. Severe respiratory infections: are bugs bugging? **Mucosal Immunology** v. 7, n. 2, pp. 227-238, 2014. DOI: [10.1038/mi.2013.93](https://doi.org/10.1038/mi.2013.93)
- 9- HOMAIRA, N. *et al.*, Effectiveness of Palivizumab in preventing RSV hospitalization in high risk children: a real-world perspective. **International Journal of Pediatrics** v. 2014. DOI: [10.1155/2014/571609](https://doi.org/10.1155/2014/571609) .
- 10- LOZANO, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. **Lancet** v. 380, pp. 2095-2128, 2012. DOI: [10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0) .

- 11- LEYSSSEN, P.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. **Antiviral Research** v. 78, n. 1, pp. 9-25, 2008. DOI: [10.1016/j.antiviral.2008.01.004](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.01.004) .
- 12- GAROFALO, R.P.; KOLLI, D.; CASOLA, A. Respiratory Syncytial Virus infection: mechanisms of redox control and novel therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling** v. 18, n. 2, pp. 186-217, 2013. DOI: [10.1089/ars.2011.4307](https://doi.org/10.1089/ars.2011.4307) .
- 13- SIMÕES, E.A.F. *et al.* Challenges and opportunities in developing respiratory syncytial virus therapeutics. **The Journal of Infectious Diseases** v. 15, n. 211, pp. S1-S20, 2015. DOI: [10.1093/infdis/jiu828](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu828) .
- 14- DUMONT, P. Increasing the complexity of respiratory syncytial virus infection: reactive oxygen species, DNA damage and premature senescence. **Virulence** v. 7, n. 4, pp. 372-375, 2016. DOI: [10.1080/21505594.2016.162370](https://doi.org/10.1080/21505594.2016.162370) .
- 15- CERVANTES-ORTIZ, S.L.; CUERVO, N.Z.; GRANDVAUX, N. Respiratory syncytial virus and cellular stress responses: impact on replication and physiopathology. **Viruses** v. 8, n; 124, 2016. DOI: [10.3390/v8050124](https://doi.org/10.3390/v8050124) .
- 16- HARIJITH, A.; EBENEZER, D.L.; NATARAJAN, V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. **Frontiers in Physiology** v. 5, n. 352, 2014. DOI: [10.3389/fphys.2014.00352](https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00352) .
- 17- HOSAKOTE, Y.M. *et al.* Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** v. 41, pp. 348-357, 2009. DOI: [10.1165/rcmb.2008-0330OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0330OC) .
- 18- JAMALUDDIN, M. *et al.* Respiratory syncytial virus infection induces a reactive oxygen species-MSK1-Phospho-Ser-276 RelA pathway required for cytokine expression. **Journal of Virology** v. 83, n. 20, pp. 10605-10615, 2009. DOI: [10.1128/JVI.01090-09](https://doi.org/10.1128/JVI.01090-09) .
- 19- LI, M.; XU, Z. Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. **Archives of Pharmacal Research** v. 31, n. 5, pp. 640-644, 2008. DOI: [10.1007/s12272-001-1206-5](https://doi.org/10.1007/s12272-001-1206-5) .
- 20- GEOGHEGAN, F.; WONG, R.W.; RABIE, A.B. Inhibitory effect of quercetin on periodontal pathogens in vitro. **Phytotherapy Research** v. 24, n. 6, pp. 817-820, 2010. DOI: [10.1002/ptr.3014](https://doi.org/10.1002/ptr.3014) .
- 21- HIRAI, I. *et al.* Characterisation of anti-Staphylococcus aureus activity of quercetin. **Food Science and Technology** v. 45, pp. 1250-1254, 2010.

- 22- GOPU, V.; MEENA, C.K.; SHETTY, P.H. Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: In-vitro and In-silico evidence. **Plos One** v. 6, 2015. DOI: [10.1371/journal.pone.0134684](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134684) .
- 23- PLAPER, A. *et al.* Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 306, n. 2, pp. 530-536. DOI: [10.1016/S0006-291X\(03\)01006-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01006-4) .
- 24- GONZALEZ, O. *et al.* The heat shock protein inhibitor quercetin attenuates hepatitis C virus production. **Hepatology** v. 50, n. 6, pp. 1756-1764, 2009. DOI: [10.1002/hep.23232](https://doi.org/10.1002/hep.23232).
- 25- KAUL, T.N.; MIDDLETON, E.Jr.; OGRA, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. **Journal of Medical Virology** v. 15, n. 1, pp. 71-79, 1985.
- 26- GANESAN, S. *et al.* Quercetin inhibits rhinovirus replication in vitro and in vivo. **Antiviral Research** v. 94, pp. 258-271, 2012. DOI: [10.1016/j.antiviral.2012.03.005](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.03.005) .
- 27- WU, W. *et al.* Quercetin as an antiviral agent inhibits Influenza A Virus (IAV) entry. **Viruses** v. 8, n. 1, 2016. DOI: [10.3390/v8010006](https://doi.org/10.3390/v8010006) .
- 28- ROJAS, A. *et al.* Effect of quercetin on Hepatitis C Virus life cycle: from viral to host targets. **Nature Scientific Reports** v. 6, n. 3177, 2016. DOI: [10.1038/srep31777](https://doi.org/10.1038/srep31777) .
- 29- ZANDI, K. *et al.* Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. **Virology Journal** v. 8, n. 560, 2011. DOI: [10.1186/1743-422X-8-560](https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-560) .
- 30- BUENO, F. S.. **Grande dicionário etmológico-prosódico da língua portuguesa**. São Paulo: Saraiva, 1963-1967. 8 v.
- 31- ABBAS, A.K. **Cellular and molecular immunology**. Canada: Elsevier, 2015, 8ª ed. ISBN: 978-0-323-22275-4.
- 32- **STANDFORD CHILDREN'S CARE**. Disponível em: <http://www.stanfordchildrens.org/en/topic/default?id=anatomy-of-the-respiratory-system-in-children-90-P02950>. Acesso em 10 março 2018.
- 33- FLINT, S. J. *et al.* **Principles of Virology**. Washington D.C : American Society of Microbiology, 2015, 4th Edition.
- 34- HITTINGER, M. *et al.* Preclinical safety and efficacy models for pulmonary drug delivery of antimicrobials with focus on in vitro models. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 85, pp. 44-56, 2015. DOI: [10.1016/j.addr.2014.10.011](https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.011) .

- 35- HALL, C.D. et al. Infectivity of respiratory syncytial virus by various route of inoculation. **Infection and Immunity** v. 33, n. 3, pp. [779-783](#), 1981.
- 36- TROY, N.M.; BOSCO, A. Respiratory viral infections and host responses; insights from genomics. **Respiratory Research** v. 17, n. 156, 2016. DOI: [10.1186/s12931-016-0474-9](#).
- 37- FILHO, N.A. Bases históricas da Epidemiologia. **Cadernos de Saúde Pública** v. 2, n. 3, pp. 304-311, 1986.
- 38- ALVES, M.V.F.F. et al. Perfil dos pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva pediátrica de um hospital escola do interior de São Paulo. **Ciência, Cuidado e Saúde** v. 13, n. 2, pp. 294-301, 2014. DOI: [10.4025/cienccuidsaude.v13i2.21912](#).
- 39- MONTEIRO, C.C.; DEZANET, L.N.C.; FRANÇA, E.B. Monitoramento de vírus respiratórios na região metropolitana de Belo Horizonte, 2011 a 2013. **Epidemiologia, Serviços e Saúde** v. 25, n. 2, pp. 233-242, 2016. DOI: [10.5123/S1679-49742016000200002](#).
- 40- OLIVEIRA, B.R.G. et al. Perfil de morbidade de crianças hospitalizadas em um hospital público: implicações para a Enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem** v. 65, n. 4, pp. 586-593, 2012. DOI: [10.1590/S0034-71672012000400006](#).
- 41- CARDOSO, A. M. A persistência das infecções respiratórias agudas como problema de Saúde Pública. **Caderno de Saúde Pública** v. 26, n. 7, pp. 1270-1271, 2010. Versão On-line [ISSN 1678-4464](#).
- 42- OLIVEIRA, B.R.G. et al. Causas da hospitalização no SUS de crianças de zero a quatro anos no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia** v. 13, n. 2, pp. 268-277, 2010. DOI: [10.1590/S1415-790X2010000200009](#).
- 43- THOMAZELLI, L.M. et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in Southeast Brazil. **Jornal de Pediatria** v. 83, n. 5, pp. 422-428, 2007. DOI: [10.2223/JPED.1694](#).
- 44- CAETANO, J.R.M. et al. Fatores associados à internação hospitalar de crianças menores de cinco anos, São Paulo, SP. **Revista Saúde Pública** v. 36, n. 3, pp. 285-291, 2002. DOI: [10.1590/S0034-89102002000300005](#).
- 45- CALY, L.; GHILDYAL, R.; JANS, D.A. Respiratory virus modulation of host nucleocytoplasmic transport; target for therapeutic intervention? **Frontier in Microbiology** v. 6, n. 848, 2015. DOI: [10.3389/fmicb.2015.00848](#).

- 46- LAY, M.K. *et al.* New insights on the viral and host factors contributing to the airway pathogenesis caused by the respiratory syncytial virus. **Critical Reviews in Microbiology** v. 42, n. 5, pp. 800-812, 2015. DOI: [10.3109/1040841X.2015.1055711](https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1055711) .
- 47- LEGAND, A. *et al.*, Addressing the public health burden of respiratory viruses: the battle against Respiratory Viruses (BRaVe) Initiative. **Future Virology** v. 8, n. 10, pp. 953-968, 2010. DOI: [10.2217/fvl.13.85](https://doi.org/10.2217/fvl.13.85) .
- 48- MATHERS, C.D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **Plos Medicine** v. 3, n.11, pp. 2011-2030, 2006. DOI:[10.1371/journal.pmed.0030442](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442) .
- 49- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global burden of disease: 2004 update**. ISBN 978 92 4 156371 0. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/ . Acesso em 16 março 2018.
- 50- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Indicadores e Dados Básicos – Brasil 2012 . IDB -2012. Indicadores de mortalidade – C7. Proporção de óbitos por infecção respiratória aguda em menores de 5 anos de idade. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c07.def> . Acesso em 17 março 2018.
- 51- SILVA, D.A.O.; PEDRON, C.D.; CABERLON, I.C. Perfil epidemiológico dos moradores de 0 a 14 anos da área II do bairro São Vicente da cidade de Gravataí/RS. **Revista Ampliar** v. 2, n. 2, 2015.
- 52- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Planejamento. Gestão e Participação Cidadã. **Indicadores Sociais**: coeficiente de mortalidade infantil. Porto Alegre: SEPLAG, 2011.
- 53- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Newborns: Reducing Mortality**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs333/en/>. Acesso em 17 março 2018.
- 54- BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei nº 8069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá providências**. Brasília: Presidência da República, 1990.
- 55- UNICEF, One is too many: Ending child deaths from pneumonia and diarrhea. **UNICEF**, New York, 2016. ISBN: [978-92-806-4859-1](https://doi.org/10.7927/9789280648591) .
- 56- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTV Taxonomy history: Human orthopneumovirus**. Disponível em:

https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20161069. Acesso em 24 fevereiro 2018.

- 57- BLOUNT, R.E. Jr.; MORRIS, J.A.; SAVAGE, R.E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** v. 92, n. 3, pp. 544-549, 1956.
- 58- GRAHAM, B.S. Vaccine development for respiratory syncytial virus. **Current opinion in Virology** v. 23, pp. 107-112, 2017. DOI: [10.1016/j.coviro.2017.03.012](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.012) .
- 59- PARRISH, J. Observations on a peculiar catarrhal complaint in children. **The North American Medical and Surgical Journal** v. 1, pp. 24-31, 1826.
- 60- GOODPASTURE, E.W. *et al.* Virus pneumonia of infants secondary to epidemic infections. **American Journal of Disease of Children** v. 57, n. 5, pp. 997-1011, 1939. DOI: [10.1001/archpedi.1939.01990050003001](https://doi.org/10.1001/archpedi.1939.01990050003001).
- 61- ADAMS, J.M. Primary virus pneumonitis with cytoplasmic inclusion bodies: study of epidemic involving 32 infants with 9 deaths. **JAMA** v. 116, n. 10, pp. 925-933, 1941. DOI: [10.1001/jama.1941.02820100019005](https://doi.org/10.1001/jama.1941.02820100019005) .
- 62- ADAMS, J.M. Primary virus pneumonitis in infants. **JAMA** v. 138, n. 16, pp. 1142-1144, 1948. DOI: [10.1001/jama.1948.02900160010004](https://doi.org/10.1001/jama.1948.02900160010004) .
- 63- CHANOCK, R.; ROIZMAN, B.; MYERS, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. I. Isolation, properties and characterization. **American Journal of Hygiene** v. 66, n. 3, pp. 281-290, 1957.
- 64- **VIRALZONE**. Syncytium formation induced by viral infection. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/5957?outline=all_by_species . Acesso em 13 fevereiro 2018.
- 65- OPENSHAW, P.J.M. *et al.* Protective and harmful immunity to RSV infection. **Annual Reviews of Immunology** v. 35, pp. 501-532, 2017. DOI: [10.1146/annurev-immunol-051116-052206](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052206) .
- 66- BOYCE, T. G. *et al.* Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. **The Journal of Pediatrics** v. 137, n. 6, pp. 865–870, 2000. DOI: [10.1067/mpd.2000.110531](https://doi.org/10.1067/mpd.2000.110531).
- 67- WANG, E. E.; LAW, B.J.; STEPHENS, D. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. **The Journal of Pediatrics** v. 126, n. 2, pp. [212–219](#), 1995.

- 68- NAVAS, L. *et al.* Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada. **The Journal of Pediatrics** v. 121, n. 3, pp. 348–354, 1992. DOI: [10.1016/S0022-3476\(05\)90000-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)90000-0) .
- 69- AUJARD, Y.; FAUROUX, B. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in infants. **Respiratory Medicine**, 2002. DOI: [10.1053/rmed.2002.1295](https://doi.org/10.1053/rmed.2002.1295) .
- 70- MOYES, J. *et al.* Epidemiology of respiratory syncytial virus-associated acute lower respiratory tract infection hospitalizations among HIV-infected and HIV-uninfected South African children, 2010-2011. **The Journal of Infectious Diseases** v. 208, n. SUPPL. 3, 2013. DOI: [10.1093/infdis/jit479](https://doi.org/10.1093/infdis/jit479) .
- 71- ABBAS, S. *et al.* Respiratory viruses in transplant recipients: more than just a cold. Clinical syndromes and infection prevention principles. **International Journal of Infectious Diseases** v. 62, pp. 86-93, 2017. DOI: [10.1016/j.ijid.2017.07.011](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.07.011) .
- 72- EISENHUT, M. Extrapulmonary manifestations of severe respiratory syncytial virus infection – a systematic review. **Critical Care** v. 10, n. 4, 2006. DOI: [10.1186/cc4984](https://doi.org/10.1186/cc4984) .
- 73- GRIFFITHS, C.; DREWS, S.J.; MARCHANT, D.J. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment. **Clinical Microbiology Reviews** v. 30, n.1, pp. 227-319, 2017. DOI: [10.1128/CMR.00010-16](https://doi.org/10.1128/CMR.00010-16) .
- 74- GOWER, T.L. *et al.* Rhoa signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology. **Journal of Virology** v. 79, n. 9, pp. 5326-5336, 2005. DOI: [10.1128/JVI.79.9.5326-5336.2005](https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5326-5336.2005) .
- 75- MUFSON, M.A. *et al.* Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology** v. 66, pp. 2111-2124, 1985. DOI: [10.1099/0022-1317-66-10-2111](https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-10-2111) .
- 76- SIQUEIRA, M.M.; NASCIMENTO, J.P.; ANDERSON, L.J. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology** v. 29, n. 3, pp. 557-559, 1991.
- 77- SULLENDER, W.A. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. **Clinical Microbiology Reviews** v. 13, n. 1, pp. 1-15, 2000. DOI: [10.1128/CMR.13.1.1-15.2000](https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.1-15.2000) .
- 78- CANEDO-MARROQUIN, G. *et al.* Modulation of host immunity by human respiratory syncytial virus virulence factors: a synergic inhibition of both innate and adaptive immunity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** v. 7, n. 367, 2017. DOI: [10.3389/fcimb.2017.00367](https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00367) .

- 79- SWEDAN, S. *et al.* 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** v. 85, n. 19, pp. 10090-10100, 2011. DOI: [10.1128/JVI.DD413-11](https://doi.org/10.1128/JVI.DD413-11) .
- 80- SPANN, K.M. *et al.* 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. **Journal of Virology** v. 78, n. 12, pp. 4363-4369, 2004. DOI: [10.1128/JVI.78.8.4363-4369.2004](https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.4363-4369.2004) .
- 81- FEARNES, R.; PEEPLES, M.E.; COLLINS, P.L. Increased expression of the N protein of respiratory syncytial virus stimulates minigenome replication but does not alter the balance between the synthesis of mRNA and antigenome. **Virology** v. 236, pp. 188-201, 1997. DOI: [10.1006/viro.1997.8734](https://doi.org/10.1006/viro.1997.8734) .
- 82- SCHMIDT, M.E.; VARGA, S.M. Modulation of the host immune response by respiratory syncytial virus proteins. **Journal of Microbiology** v. 55, n. 3, pp. 161-171, 2017. DOI: [10.1007/s12275-017-7045-8](https://doi.org/10.1007/s12275-017-7045-8) .
- 83- ROSE, P.W. *et al.* The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. **Nucleic Acids Research** v. 45: D271-D281, 2017. DOI: [10.1093/nar/gkw1000](https://doi.org/10.1093/nar/gkw1000) .
- 84- PETTERSEN, E.F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry** v. 25, n. 13, pp.1605–1612, 2004. DOI: [10.1002/jcc.20084](https://doi.org/10.1002/jcc.20084) .
- 85- ASENJO, A.; GONZÁLEZ-ARMAS, J.C.; VILLANUEVA, N. Phosphorilation of human respiratory syncytial virus P protein at serine 54 regulates viral uncoating. **Virology** v. 380, n.1, pp. 26-33, 2008. DOI: [10.1016/j.virol.2008.06.045](https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.045) .
- 86- MITRA, R. *et al.* The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. **Journal of Virology** v. 86, n.8, pp. 4432-4443, 2012. DOI: [10.1128/JVI.06744-11](https://doi.org/10.1128/JVI.06744-11) .
- 87- FÖRSTER, A. *et al.* Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. **Journal of Virology** v. 89, n. 8, pp. 4624-4635, 2015. DOI: [10.1128/JVI.03500-14](https://doi.org/10.1128/JVI.03500-14) .
- 88- McLELLAN, J.S.; RAY, W.C.; PEEPLES, M.E. Structure and function of RSV Glycoproteins. **Current topics in Microbiology and Immunology** v. 373, pp. 83-104, 2013. DOI: [10.1007/978-3-642-38919-1_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_4) .

- 89- GODER, V.; SPIESS, M. Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. **FEBS Letters** v. 504, n. 3, pp. 87-93, 2001. DOI: [10.1016/S0014-5793\(01\)02712-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02712-0) .
- 90- GAN, S.W. *et al.* The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. **Journal of Biological Chemistry** v. 287, pp. 24671-24689, 2012. DOI: [10.1074/jbc.M111.332791](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.332791) .
- 91- TRIANTAFILOU, K. *et al.* Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. **Thorax** v. 68, n. 1, pp. 66-75, 2013. DOI: [10.1136/thoraxjnl-2012-202182](https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202182) .
- 92- LEVINE, S.; KLAIBER-FRANCO, R.; PARADISO, PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. **The Journal of General Virology** v. 68, n. 9, pp. 2521-2524, 1987. DOI: [10.1099/0022-1317-68-9-2521](https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-9-2521) .
- 93- ROBERTS, S.R. *et al.* The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. **Journal of Virology** v. 68, n. 7, pp. [4538-4546](#), 1994.
- 94- HENDRICKS, D.A.; McINTOSH, K.; PATTERSON, J.L. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. **Journal of Virology** v. 62, n.7, pp. [2228-2233](#), 1988.
- 95- BUKREYEV, A.; YANG, L.; COLLINS, P.L. The secreted G protein of human respiratory syncytial virus antagonizes antibody-mediated restriction of replication involving macrophages and complement. **Journal of Virology** v. 86, n. 19, pp. 10880-10884, 2012. DOI: [10.1128/JVI.01162-12](https://doi.org/10.1128/JVI.01162-12) .
- 96- JOHNSON, P.R. *et al.* The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 84, n.16, pp. [5625-5629](#), 1987.
- 97- RUEDA, P.; GARCÍA-BARRENO, B.; MELERO, J.A. Loss of conserved cysteine residues in the attachment (G) glycoprotein of two human respiratory syncytial virus escape mutants that contain multiple A-G substitutions (hypermutations). **Virology** v. 198, n.2, pp. [653-662](#), 1994.
- 98- CHIRKOVA, T. *et al.* CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. **The Journal of General Virology** v. 96, n.8, pp. 2543-2556, 2015. DOI: [10.1099/vir.0.000218](https://doi.org/10.1099/vir.0.000218) .

- 99- JOHNSON, S.M. *et al.* Respiratory syncytial virus uses CX3CR1 as a receptor on primary human airway epithelial cultures. **Plos Pathogens** v. 11, n.12, e1005318, 2015. DOI: [10.1371/journal.ppat.1005318](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005318) .
- 100- JEONG, K. *et al.* CX3CR1 is expressed in differentiated human ciliated airway cells and co-localizes with respiratory syncytial virus on cilia in a G protein-dependent manner. **Plos One** v. 10, n. 6, e0130517. DOI: [10.1371/journal.pone.0130517](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130517) .
- 101- CHIRKOVA, T. *et al.* Respiratory syncytial virus G protein CX3C motif impairs human airway epithelial and immune cell responses. **Journal of Virology** v. 87, n. 24, pp. 13466-13479, 2013. DOI: [10.1128/JVI.01741-13](https://doi.org/10.1128/JVI.01741-13) .
- 102- TRIPP, R.A. *et al.* CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. **Nature Immunology** v. 2, n.8, pp. 732-738, 2001. DOI: [10.1038/90675](https://doi.org/10.1038/90675) .
- 103- ZHANG, L. *et al.* Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an in vitro model of human airway epithelium. **Journal of Virology** v. 79, n.2, pp. 113-1124, 2005. DOI: [10.1128/JVI.79.2.1113-1124.2005](https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1113-1124.2005) .
- 104- COLLINS, P.L.; HUANG, Y.T.; WERTZ, G.W. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 81, n. 24, pp. 7683-7687, 1984.
- 105- LILJEROOS, L. *et al.* Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 110, n. 27, pp. 11133-11138, 2013. DOI: [10.1073/pnas.1309070110](https://doi.org/10.1073/pnas.1309070110) .
- 106- GONZÁLEZ-REYES, L. *et al.* Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 98, n. 17, pp. 9859-9864, 2001. DOI: [10.1073/pnas.151098198](https://doi.org/10.1073/pnas.151098198) .
- 107- ZIMMER, G.; BUDZ, L.; HERRLER, G. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. **The Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 34, pp. 31642-31650, 2001. DOI: [10.1074/jbc.M102633200](https://doi.org/10.1074/jbc.M102633200) .
- 108- BOLT, G.; PEDERSEN, L.O.; BIRKESLUND, H.H. Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. **Virus Research** v. 68, n.1, pp. 25-33, 2000.

- 109- COLLINS, P.L.; MOTTET, G. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. **The Journal of General Virology** v. 72, pp. 3095-3101, 1991. DOI: [10.1099/0022-1317-72-12-3095](https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-12-3095) .
- 110- GRUBER, C.; LEVINE, S. Respiratory syncytial virus polypeptides. III. The envelope-associated proteins. **The Journal of General Virology** v. 64, pp. 825-832, 1983. DOI: [10.1099/0022-1317-64-4-825](https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-4-825) .
- 111- DAY, N.D. *et al.* Contribution of cysteine residues in the extracellular domain of the F protein of human respiratory syncytial virus to its function. **Virology Journal** v. 3, n. 34, 2006. DOI: [10.1186/1743-422X-3-34](https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-34) .
- 112- ROSSEY, I. *et al.* Clinical potential of prefusion RSV F-specific antibodies. **Trends in Microbiology** v. 26, n. 3, pp. 209-219, 2018. DOI: [10.1016/j.tim.2017.09.009](https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.009) .
- 113- HOLGUERA, J.; VILLAR, E.; MUÑOZ-BARROSO, I. Identification of cellular proteins that interact with Newcastle disease virus and human respiratory syncytial virus by a two-dimensional virus overlay protein binding assay (VOPBA). **Virus Research** v. 191, pp. 138-142, 2014. DOI: [10.1016/j.virusres.2014.07.031](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.031) .
- 114- TAYYARI, F. *et al.* Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. **Nature Medicine** v. 17, pp. 1131-1135, 2011. DOI: [10.1038/nm.2444](https://doi.org/10.1038/nm.2444) .
- 115- BEHERA, A.K. *et al.* Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 280, n.1, pp. 188-195, 2001. DOI: [10.1006/bbrc.2000.4093](https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4093) .
- 116- MARCHANT, D. *et al.* Toll-like-receptor 4-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase is determinant of respiratory virus entry and tropism. **Journal of Virology** v. 84, n.21, pp. 11359-11373, 2010. DOI: [10.1128/JVI.00804-10](https://doi.org/10.1128/JVI.00804-10) .
- 117- KURT-JONES, E. *et al.* Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. **Nature Immunology** v. 1, pp. 398-401, 2000. DOI: [10.1038/80833](https://doi.org/10.1038/80833) .
- 118- TECHAARPORNKUL, S., BARRETTO, N., AND PEEPLES, M. E. (2001). Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. **Journal of Virology** v. 75, n. 15, pp. 6825–6834, 2001. DOI: [10.1128/JVI.75.6825-6834.2001](https://doi.org/10.1128/JVI.75.6825-6834.2001) .

- 119- **UNIPROT**: Coiled Coil. Disponível em: <https://www.uniprot.org/help/coiled> . Acesso em 06 março 2018.
- 120- COLLINS, P. L. *et al.* Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 93, n.1, pp. [81–85](#), 1996.
- 121- LI, D. *et al.* Association of Respiratory Syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. **Journal of Virology** v. 82, n.17, pp. 8863–8870, 2008. DOI: [10.1128/JVI.00343-08](#) .
- 122- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 96, n.20, pp. [11259–11264](#), 1999.
- 123- WALSH, E.E.; FALSEY, A.R. Respiratory syncytial virus infection in adult populations. **Infectious Disorders Drug Targets** v. 12, n.2, pp. [98-102](#), 2012.
- 124- CROMER, D. *et al.* Burden of paediatric respiratory syncytial virus disease and potential effect of different immunization strategies: a modelling and cost-effectiveness analysis for England. **Lancet Public Health** v. 2, e367-e374, 2017. DOI: [10.1016/S2468-2667\(17\)30103-2](#) .
- 125- MITCHELL, I.; DEFOY, I.; GRUBB, E. Burden of respiratory syncytial virus hospitalizations in Canada. **Canadian Respiratory Journal** v. 2017, 2017. DOI: [10.1155/2017/4521302](#) .
- 126- YOU, D. *et al.* Exposure of neonates to respiratory syncytial virus is critical in determining subsequent airway response in adults. **Respiratory Research** v. 7, 2006. DOI: [10.1186/1465-9921-7-107](#) .
- 127- CARROLL, K.N. *et al.* Season of infant bronchiolitis and estimates of subsequent risk and burden of early childhood asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 123, n.4, pp. 964-966, 2009. DOI: [10.1016/j.jaci.2008.12.011](#) .
- 128- SIGURS, N. *et al.* Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. **Thorax** v. 65, n.12, pp. 1045-1052, 2010. DOI: [10.1136/thx.2009.121582](#) .
- 129- BLANKEN, M.O. *et al.* Respiratory syncytial virus and recurrent wheeze in healthy preterm infants. **The New England Journal of Medicine** v. 368, pp. 1791-1799, 2013. DOI: [10.1056/NEJMoa1211917](#) .

- 130- GBD 2015. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet Respiratory Medicine** v. 5, pp. 691-706, 2017. DOI: [10.1016/S2213-2600\(17\)30293-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30293-X) .
- 131- BRASIL. Ministério Da Saúde – Secretaria De Vigilância Em Saúde. **Boletim Epidemiológico: Perfil da morbimortalidade por doenças respiratórias crônicas no Brasil, 2003 a 2013** v. 47, n. 19, 2016. ISSN [2358-9450](https://doi.org/10.1186/2358-9450) .
- 132- COLLINS, P.L.; MELERO, J.A. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. **Virus Research** v. 162, n.1-2, pp. 80-99, 2011. DOI: [10.1016/j.virusres.2011.09.020](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.020) .
- 133- COLLINS, P.L.; FEARN, R.; GRAHAM, B.S. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology** v. 372, pp. 3-38, 2013. DOI: [10.1007/978-3-642-38919-1_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_1) .
- 134- KRZYZANIAK, M.A. *et al.* Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. **Plos Pathogens** v. 9, n.4, e1003309, 2012. DOI: [10.1371/journal.ppat.1003309](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003309) .
- 135- LIFLAND, A.W. *et al.* Human respiratory syncytial virus nucleoprotein and inclusion bodies antagonize the innate immune response mediated by MDA5 and MAVS. **Journal of Virology** v. 86, n. 15, pp. 8245-8258, 2012. DOI: [10.1128/JVI.00215-12](https://doi.org/10.1128/JVI.00215-12) .
- 136- TENG, M.N.; COLLINS, P.L. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. **Journal of Virology** v. 72, n. 7, pp. [5707-5716](https://doi.org/10.1128/JVI.72.7.5707-5716), 1998.
- 137- LAY, M.K. *et al.* Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. **Microbes and Infection** v. 15, n. 3, pp. 230-242, 2013. DOI: [10.1016/j.micinf.2012.11.012](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.11.012) .
- 138- ZENG, R. *et al.* Pattern recognition receptors for respiratory syncytial virus infection and design of vaccines. **Virus Research** v. 167, n.2, pp. 138-145, 2012. DOI: [10.1016/j.virusres.2012.06.003](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.003) .
- 139- McNAMARA, P.S. *et al.* Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. **The Journal of Infectious Diseases** v. 191, n. 8, pp. 1225-1232, 2005. DOI: [10.1086/428855](https://doi.org/10.1086/428855) .

- 140- YOON, J.S. *et al.* Cytokine induction by respiratory syncytial virus and adenovirus in bronchial epithelial cells. **Pediatric Pulmonology** v. 42, n.3, pp. 277-282, 2007. DOI: [10.1002/ppul.20574](https://doi.org/10.1002/ppul.20574) .
- 141- MURPHY, B.R. *et al.* Serum and nasal-wash immunoglobulin G and A antibody response of infants and children to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins following primary infection. **Journal of Clinical Microbiology** v. 23, n.6, pp. [1009-1014](https://doi.org/10.1093/jc.23.6.1009), 1986.
- 142- BRANDENBURG, A.H. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. **Journal of Medical Virology** v. 52, n. 1, pp. [97-104](https://doi.org/10.1093/jmv.52.1.97), 1997.
- 143- FALSEY, A.R.; SINGH, H.K.; WALSH, E.E. Serum antibody decay in adults following natural respiratory syncytial virus infection. **Journal of Medical Virology** v. 78, n. 11, pp. 1493-1497, 2006. DOI: [10.1002/jmv.20724](https://doi.org/10.1002/jmv.20724) .
- 144- ELLION, G.B. Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *Journal of Medical Virology* Supplement 1, pp. 2-6, 1993.
- 145- CIANCI, C. *et al.* Orally active fusion inhibitor of respiratory syncytial virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, n.2, pp. 413-422, 2004. DOI: [10.1128/AAC.48.2.413-422.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.413-422.2004) .
- 146- McLELLAN, J.S. *et al.* Structure of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the post fusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes. **Journal of Virology** v. 85, n. 15, pp. 7788-7796, 2011. DOI: [10.1128/JVI.00555-11](https://doi.org/10.1128/JVI.00555-11) .
- 147- ARBIZA, J. *et al.* Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology** v. 73, n. 9, 1992. DOI: [10.1099/0022-1317-73-9-2225](https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-9-2225) .
- 148- SUBRAMANIAN, K.N. *et al.* Safety, tolerance and pharmacokinetics of a humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. MEDI-493 Study Group. **The Pediatric Infectious Disease Journal** v. 17, n. 2, pp. [110-115](https://doi.org/10.1097/01.pid.1998.02010), 1998.
- 149- COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES AND BRONCHIOLITIS GUIDELINES. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. **Pediatrics** v. 134, n. 2, 2014.

- 150- ZHAO, X.; SULLENDER, W.M. In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab. **Journal of Virology** v. 79, n. 7, pp. 3962-3968, 2005. DOI: [10.1128/JVI.79.7.3962-3968.2005](https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.3962-3968.2005).
- 151- ZHAO, X. *et al.* Variable resistance to palivizumab in cotton rats by respiratory syncytial virus mutants. **The Journal of Infectious Diseases** v. 190, n. 11, pp. 1941-1946, 2004. DOI: [10.1086/425515](https://doi.org/10.1086/425515).
- 152- ZHU, Q. *et al.* Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. **The Journal of Infectious Disease** v. 203, n. 3, pp. 674-682, 2011. DOI: [10.1093/infdis/jiq100](https://doi.org/10.1093/infdis/jiq100).
- 153- SYNAGIS PRICES, COUPONS AND PATIENT ASSISTANCE PROGRAMS. Disponível em: <https://www.drugs.com/price-guide/synagis>. Acesso em 24 fevereiro 2018.
- 154- BREKKER, O.H.; SANDLE, I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 2, pp. 52-62, 2003. DOI: [10.1038/nrd984](https://doi.org/10.1038/nrd984).
- 155- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports** v. 7, n. 42717, 2017. DOI: [10.1038/srep42717](https://doi.org/10.1038/srep42717).
- 156- FIELDS, B. N., IN KNIPE, D. M., & IN HOWLEY, P. M. (2013). Fields virology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- 157- LEHNINGER, A.L.; DAVID, L. 1942- NELSON E MICHAEL M. COX. Lehninger Principles of Biochemistry. 5^a ed. New York ; New Delhi: W.H. Freeman, 2008.
- 158- GADOMSKI, A.M.; BHASALE, A.L. Bronchodilators for bronchiolitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews** v. 19, n. 3, 2006. DOI: [10.1002/14651858.CD001266.pub2](https://doi.org/10.1002/14651858.CD001266.pub2).
- 159- DUDAS, R.A.; KARRON, R.A. Respiratory syncytial virus vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, pP. 430-439, 1998.
- 160- KIM, J.Y.; CHANG, J. In hot pursuit of the first vaccine against respiratory syncytial virus. **Yonsei Medical Journal** v. 57, n. 4, pp. 809-816, 2016. DOI: [10.3349/ymj.2016.57.4.809](https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.4.809).
- 161- GREEN, C.A. *et al.*, Safety and immunogenicity of novel respiratory syncytial virus (RSV) vaccines based on the RSV viral proteins F, N and M2-1 encoded by simian

adenovirus (PanAd3-RSV) and MVA (MVA-RSV); protocol for an open-label, dose-escalation, single-centre, phase 1 clinic trial in healthy adults. **BMJ Open** v 5, n. 10, 2015. DOI: [10.1136/bmjopen-2015-008748](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-008748) .

- 162- PAPADOULOS, N.G. *et al.* Promising approaches 1 for treatment and prevention of viral respiratory illnesses. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 140, n. 4, pp. 921-932, 2017. DOI: [10.1016/j.jaci.2017.07.001](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.07.001).
- 163- JORQUERA, P.A.; TRIPP, R.A. Respiratory syncytial virus: prospects for new and emerging therapeutics. **Expert Review of Respiratory Medicine** v. 11, n.8, pp. 609-615, 2017. DOI: [10.1080/17476348.2017.1338567](https://doi.org/10.1080/17476348.2017.1338567) .
- 164- BISGAARD, H. A, STUDY GROUP ON MONTELUKAST AND RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS. A randomized trial of montelukast in respiratory syncytial virus postbronchiolitis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 167, n. 3, pp. 379-383, 2003. DOI: [10.1164/rccm.200207-747OC](https://doi.org/10.1164/rccm.200207-747OC) .
- 165- PETERSEN, B.C. *et al.* IL-17E (IL-25) and IL-17RB promote respiratory syncytial virus-induced pulmonary disease. **Journal of Leukocyte Biology** v. 95, n. 5, pp. 809-815, 2014. DOI: [10.1189/jlb.0913482](https://doi.org/10.1189/jlb.0913482) .
- 166- ROSSEY, I. *et al.* Potent single-domain antibodies that arrest respiratory syncytial virus fusion protein in its prefusion state. **Nature Communication** v. 8, 2016. DOI: [10.1038/ncomms14158](https://doi.org/10.1038/ncomms14158) .
- 167- SCHEPENS, B. *et al.* Nanobodies® specific for respiratory syncytial virus fusion protein protect against infection by inhibition of fusion. **The Journal of Infectious Diseases** v. 204, n. 11, pp. 1692-1701, 2011. DOI: [10.1093/infdis/jir622](https://doi.org/10.1093/infdis/jir622) .
- 168- CHUNG, D.H. *et al.* A cell based high-throughput screening approach for the discovery of new inhibitors of respiratory syncytial virus. **Virology Journal** v. 10, n. 19, 2013. DOI: [10.1186/1743-433x-10-19](https://doi.org/10.1186/1743-433x-10-19) .
- 169- LEYSSEN, P.; DE CLERCQ, E., NEYTS, J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. **Antiviral Research** v. 78, n. 1, pp. 9-25, 2008. DOI: [10.1016/j.antiviral.2008.01.004](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.01.004) .
- 170- SHIGETA, S. Recent progress in antiviral chemotherapy for respiratory syncytial virus infections. **Expert Opinion on Investigational Drugs** v. 9, n. 2, pp. 221-235, 2000. DOI: [10.1517/13543784.9.2.221](https://doi.org/10.1517/13543784.9.2.221) .
- 171- BONFANTI, J.F. *et al.* Selection of a respiratory syncytial virus fusion inhibitor clinical candidate. 2. Discovery of a Morpholinopropylaminobenzimidazole derivative

- (TMC353121). **Journal of Medicinal Chemistry** v. 51, n. 4, pp. 875-896, 2008. DOI: [10.1021/jm701284j](https://doi.org/10.1021/jm701284j) .
- 172- SIDWELL, R.W.; BARNARD, D.L. Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. **Antiviral Research** v. 71: 379-390, 2006. DOI: [10.1016/j.antiviral.2006.05.014](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.05.014) .
- 173- SUDO, K. *et al.* YM-53403, a unique anti-respiratory syncytial virus agent with a novel mechanism of action. **Antiviral Research** v. 65, n. 2, pp. 125-131, 2005. DOI: [10.1016/j.antiviral.2004.12.002](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.12.002) .
- 174- DEVICENZO, J. *et al.* Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). **Antiviral Research** v. 77, n. 3, pp. 225-231, 2008. DOI: [10.1016/j.antiviral.2007.11.009](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.11.009) .
- 175- BATTLES, M.B. *et al.* Molecular mechanism of respiratory syncytial virus fusion inhibitors. **Nature Chemical Biology** v. 12, n. 2, pp. 87-93, 2016. DOI: [10.1038/nchembio.1982](https://doi.org/10.1038/nchembio.1982) .
- 176- BONAVIDA, A. *et al.* Identification of broad-spectrum antiviral compounds and assessment of the druggability of their target for efficacy against respiratory syncytial virus (RSV). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 108, n. 17, pp. 6739-6744, 2011. DOI: [10.1073/pnas.1017142108](https://doi.org/10.1073/pnas.1017142108) .
- 177- RASMUSSEN, L. *et al.* A high-throughput screening strategy to overcome virus instability. **Assay and Drug Development Technologies** v. 9, n. 2, pp. 184-190, 2011. DOI: [10.1089/adt.2010.0298](https://doi.org/10.1089/adt.2010.0298) .
- 178- GOBEL, J. *et al.* A phenotypic high-throughput screen with RSV-infected primary human small airway epithelial cells (SAECs). **Journal of Biomolecular Screening** v. 20, n. 6, pp. 729-738, 2015. DOI: [10.1177/1087057115580271](https://doi.org/10.1177/1087057115580271) .
- 179- PLANT, H. *et al.* High-throughput hit screening cascade to identify respiratory syncytial virus inhibitors. **Journal of Biomolecular Screening** v. 20, n. 5, pp. 597-605, 2015. DOI: [10.1177/1087057115569428](https://doi.org/10.1177/1087057115569428) .
- 180- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Natural Products** v. 79, pp. 629-661, 2016. DOI: [10.1021/acs.jnatprod.5b01055](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055) .
- 181- HARVEY, A.L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 14, pp. 111-129, 2015. DOI: [10.1038/nrd4510](https://doi.org/10.1038/nrd4510) .

- 182- MARTINEZ, J.P. *et al.*, Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. **Natural Products Reports** v. 1, 2015. DOI: [10.1039/c4np00085d](https://doi.org/10.1039/c4np00085d) .
- 183- BUTLER, M.S.; ROBERTSON, A.A.B.; COOPER, M.A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Products Reports** v. 31, n. 11, pp. 1612-1661, 2014. DOI: [10.1039/c4np00064a](https://doi.org/10.1039/c4np00064a) .
- 184- ABOELSOU, N.H. Herbal medicine in Egypt. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 2, n. 2, pp. [82-86](#), 2010.
- 185- SIMÕES, C. M. O.; *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis Ed.Universidade UFRGS, 1999.
- 186- BAEEL, J.B.; HOLLOWAY, G.A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. **Journal of Medicinal Chemistry** v. 53, pp. 2719-2740, 2010. DOI: [10.1021/jm901137j](https://doi.org/10.1021/jm901137j) .
- 187- BISSON, J. *et al.* Can invalid bioactives undermine natural product-based drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry** v. 59, pp. 1671-1690, 2015. DOI: [10.1021/acs.jmedchem.5b01009](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01009) .
- 188- McGOVERN, S.L. *et al.* A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. **Journal of Medicinal Chemistry** v. 45, pp. 1712-1722, 2002. DOI: [10.1021/jm010533y](https://doi.org/10.1021/jm010533y) .
- 189- GLASER, J.; HOLZGRABE, U. Focus on PAINS: false friends in the quest for selective anti-protozoal lead structures from Nature? **Medicinal Chemistry Communication** v. 7, pp. 214-223, 2016. DOI: [10.1039/C5MD00481K](https://doi.org/10.1039/C5MD00481K) .
- 190- SENGER, M.R. *et al.* Filtering promiscuous compounds in early drug discovery: is it a good idea? **Drug Discovery Today** v. 21, n. 6, pp. 868-872, 2016. DOI: [10.1016/j.drudis.2016.02.004](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.02.004) .
- 191- CHAI, C.L.L.; MÁTYUS, P. One size does not fit all: challenging some dogmas and taboos in drug discovery. **Future Medicinal Chemistry** v. 8, n. 1, pp. 29-38, 2016. DOI: [10.4155/fmc.15.167](https://doi.org/10.4155/fmc.15.167) .
- 192- MEDINA-FRANCO, J.L. *et al.* Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. **Drug Discovery Today** v. 18, n. 9/10, pp. 495-501. DOI: [10.1016/j.drudis.2013.01.008](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.01.008) .

- 193- MERINO, A. *et al.* Drug profiling: knowing where it hits. **Drug Discovery Today** v. 15, n. 17/18, pp. 749-756, 2010. DOI: [10.1016/j.drudis.2010.06.006](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.006) .
- 194- AHMAD, A. *et al.* Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against viral infections – A review. **Food Research International** v. 77, pp. 221-235, 2015. DOI: [10.1016/j.foodres.2015.06.021](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.021) .
- 195- SCOTTI, L. *et al.* Docking studies for multi-target drugs. **Current Drug Targets** v. 17, 2015. DOI: [10.2174/1389450116666150825111818](https://doi.org/10.2174/1389450116666150825111818) .
- 196- ZHANG, W.; PEI, J.; LAI, L. Computational multitarget drug design. **Journal of Chemical Information and Modeling** v. 57, pp. 403-412, 2017. DOI: [10.1021/acs.jcim.6b00491](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00491) .
- 197- UTKARSH, R.; VARADWAJ, P.K. Flavonoids as multi-target inhibitors for proteins associated with Ebola virus: *In silico* discovery using virtual screening and molecular docking studies. **Interdisciplinary Sciences, Computational Life Sciences** v. 8, pp. 132-141, 2015. DOI: [10.1007/s12539-014-0246-5](https://doi.org/10.1007/s12539-014-0246-5) .
- 198- FANG, Y. *et al.* 3D-QSAR and docking studies of flavonoids as potent Escherichia coli inhibitors. **Scientific reports** v. 6, n. 23634, 2016. DOI: [10.1038/srep23634](https://doi.org/10.1038/srep23634) .
- 199- OLIVERO-VERBEL, J.; PACHECO-LONDOÑO, L. Structure-activity relationships for the anti-HIV activity of flavonoids. **Journal of Chemical Information and Modeling** v. 42, n. 5, pp. 1241-1246, 2002. DOI: [10.1021/ci020363d](https://doi.org/10.1021/ci020363d) .
- 200- LIU, A.L. *et al.* Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 16, pp. 7141-7147, 2008. DOI: [10.1016/j.bmc.2008.06.049](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.06.049) .
- 201- CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 26, pp. 343-356, 2005. DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002) .
- 202- SHANMUGAM, A.; GROMIHA, M.M. Quercetin derivatives as non-nucleoside inhibitors for dengue polymerase: molecular docking, molecular dynamics and binding-free energy calculation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** v. 35, n.13, 2016. DOI: [10.1080/07391102.2016.1234416](https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1234416) .
- 203- URIARTE-PUEYO, I.; CALVO, M.I. Structure-activity relationships of acetylated flavone glycosides from *Galeopsis ladanum* L. (Lamiaceae). **Food Chemistry** v. 120, pp. 679-683, 2010. DOI: [10.1016/j.foodchem.2009.10.060](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.060) .

- 204- TEIXEIRA, T.S. *et al.* Biophysical characterization of the interaction between M2-1 protein of hRSV and quercetin. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 95, pp. 63-71, 2017. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2016.11.033](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.033) .
- 205- GUIMARÃES, G.C. *et al.* Binding investigation between M2-1 protein from hRSV and acetylated quercetin derivatives: ¹H NMR, fluorescence, spectroscopy and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 111, pp. 33-38, 2017. DOI: [10.1080/07391102.2016.1234416](https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1234416) .
- 206- SOUZA, F.P. *et al.* Interaction model between hRSV G-protein and flavonoids. **International Journal of Sciences** v. 2, n.10, pp. [12-19](#), 2013.
- 207- GOMES, D.E. *et al.* Experimental evidence and molecular modeling of the interaction between hRSV-NS1 and quercetin. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 85, pp. 40-47, 2016. DOI: [10.1080/07391102.2016.1234416](https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1234416) .
- 208- DANIHELOVÁ, M. *et al.* Antioxidant action and cytotoxicity on Hela and NIH-3T3 cells of new quercetin derivatives. **Interdisciplinary Toxicology** v. 6, n.4, pp. 209-216, 2013. DOI: [10.2478/intox-2013-0031](https://doi.org/10.2478/intox-2013-0031) .
- 209- DANIHELOVÁ, M.; VISKUPICOVÁ, J.; STURDÍK, E. Lipophilization of flavonoids for their food, therapeutic and cosmetic applications. **Acta Chimica Slovaca** v.5, n. 1, pp. 59-69, 2012. DOI: [10.2478/v10188-012-0010-6](https://doi.org/10.2478/v10188-012-0010-6) .
- 210- GUSDINAR, T. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activity of quercetin-3',3',4'-Triacetate. **Journal of Pharmacology and Toxicology** v. 6, n.2, pp. 182-188, 2011. DOI: [10.3923/jpt.2011.182.188](https://doi.org/10.3923/jpt.2011.182.188) .
- 211- PARK, J. *et al.* Effects of resveratrol, oxyresveratrol, and their acetylated derivatives on cellular melanogenesis. **Archives of Dermatological Research** v. 306, n.5, pp. 475-487, 2014. DOI: [10.1007/s00403-014-1440-3](https://doi.org/10.1007/s00403-014-1440-3) .
- 212- SAKAO, K.; FUJII, M.; HOU, D.X. Acetyl derivative of quercetin increases the sensitivity of human leukemia cells toward apoptosis. **Biofactors** v. 35, n.4, pp. 399-405, 2009. DOI: [10.1002/biof.53](https://doi.org/10.1002/biof.53) .
- 213- DAYEM, A.A. *et al.* Antiviral effect of methylated flavonol Isorhamnetin against influenza. **Plos One** v. 10, n.3, e0121610, 2015. DOI: [10.1371/journal.pone.0121611](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121611) .
- 214- MURA, C.; McANANY, C.E. An introduction to biomolecular simulations and docking. **Molecular Simulation** v. 40, n. 10-11, 2014. DOI: [10.1080/08927022.2014.935372](https://doi.org/10.1080/08927022.2014.935372) .

- 215- FERREIRA, L.G. *et al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules** v. 20, pp. 13384-13421, 2015. DOI: [10.3390/molecules200713384](https://doi.org/10.3390/molecules200713384) .
- 216- SONAVANE, Y. *et al.* Molecular dynamics simulation of functionalized nanofibrillar cellulose. Conference: **International Parallel Conferences on Researches in Industrial and Applied Sciences**, At Dubai, UAE, Volume: Panel II: Life and Biological Studies, Page: 1-9, 2014.
- 217- HERNÁNDEZ-SANTOYO, A. *et al.* **Protein-Protein and Protein-Ligand Docking, Protein Engineering - Technology and Application**, Dr. Tomohisa Ogawa (Ed.), InTech, 2013 DOI: 10.5772/56376. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/howtoreference/protein-engineering-technology-and-application/protein-protein-and-protein-ligand-docking>. Acesso em 15 fevereiro 2018.
- 218- **MODELING ANAEROBIC PROCESS FOR WASTEWATER TREATMENT: NEW TRENDS AND METHODOLOGIES**. Disponível em: https://pdfs.semanticscholar.org/5ce7/ced92f890fd0a7028dd61e18c73b9d63744b.pdf?_ga=2.123199945.330265711.1542743805-346756214.1542743805 . Acesso em 16 novembro 2018.
- 219- **DIAGRAM OF AN ARTIFICIAL NEURAL NETWORK**. Disponível em: <https://tex.stackexchange.com/questions/132444/diagram-of-an-artificial-neural-network> . Acesso em 17 março 2018.
- 220- YUNTA, M.J.R. Docking and ligand binding affinity: uses and pitfalls. **American Journal of Modeling and Optimization** v. 4, n.3, pp. 74-114, 2016. DOI: [10.12691/ajmo-4-3-2](https://doi.org/10.12691/ajmo-4-3-2) .
- 221- GANESAN, A.; COOTE, M.L.; BARAKAT, K. Molecular dynamics-driven drug discovery: leaping forward with confidence. **Drug Discovery Today** v. 22, n.2, pp. 249-269, 2017. DOI: [10.1016/j.drudis.2016.11.001](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.001) .
- 222- PERILLA, J.R. *et al.* Molecular dynamics simulations of large macromolecular complexes. **Current Opinion in Structural Biology** v. 31, pp. 64-74, 2015. DOI: [10.1016/j.sbi.2015.03.007](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.03.007) .
- 223- MENG, X.Y. *et al.* Molecular Docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-aided Drug Design** v. 7, n.2, pp. [146-157](#), 2011.
- 224- JONES, G. *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology** v. 267, n.3, pp. 727-748, 1997. DOI: [10.1006/jmbi.1996.0897](https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897) .

- 225- FRIESNER, R.A. *et al.* Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry** v. 47, n. 7, pp. 1739-1749, 2004. DOI: [10.1021/jm0306430](https://doi.org/10.1021/jm0306430) .
- 226- MORRIS, G.M. *et al.* Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. **Journal of Computer-aided Molecular Design** v. 10, n.4, pp. [293-304](#), 1996.
- 227- BIOCHEMISTRY ONLINE. Disponível em: https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/mechdynam2_041416.html . Acesso em 30 março 2018.
- 228- RIPPHAUSEN, P.; NISIUS, B.; BAJORATH, J. State-of-the-art in ligand-based virtual screening. **Drug Discovery Today** v. 16, n.9-10, pp. 372-376, 2011. DOI: [10.1016/j.drudis.2011.02.011](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.02.011) .
- 229- GEPPERT, H.; VOGT, M.; BAJORATH, J. Current trend in ligand-based virtual screening: molecular representations, data mining methods, new application areas, and performance evaluation. **Journal of Chemical Information and Modeling** v. 50, n.2, pp. 205-216, 2010. DOI: [10.1021/ci900419k](https://doi.org/10.1021/ci900419k) .
- 230- MANDLIK, V.; BEJUGAM, P.R.; SINGH, S. Application of artificial neural networks in modern drug discovery. **Artificial Neural Network for Drug Design, Delivery and Disposition** pp. 123-139, 2016. DOI: [10.1016/B978-0-12-801559-9.00006-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801559-9.00006-5) .
- 231- BASKIN, I.I.; WINKLER, D.; TETKO, I.V. A renaissance of neural networks in drug discovery. **Expert Opinion On Drug Discovery** v. 11, n.8, pp. 785-795, 2016. DOI: [10.1080/17460441.2016.1201262](https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1201262) .
- 232- YANG, J. *et al.* The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. **Nature Methods** v. 12, pp. 7-8, 2015. DOI: [10.1038/nmeth.3213](https://doi.org/10.1038/nmeth.3213) .
- 233- CASE, D.A. *et al.* **AMBER 14**, University of California, San Francisco, 2014.
- 234- MAIER, J.M.A. *et al.* ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and Backbone parameters from 99SB. **Journal of Chemical Theory and Computation** v. 11, n.8, pp. 3896-3713, 2015. DOI: [10.1021/acs.jctc.5b00255](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255) .
- 235- JORGENSEN, W.L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **Journal of Chemical Physics** v. 79, pp. 926-935, 1983. DOI: [10.1063/1.445869](https://doi.org/10.1063/1.445869) .
- 236- IZAGUIRRE, J.A. Langevin stabilization of molecular dynamics. **Journal of Chemical Physics** v. 114, pp. 2090-2098, 2001. DOI: [10.1063/1.1332996](https://doi.org/10.1063/1.1332996) .

- 237- VAN DER SPOEL, D.; E. LINDAHL, B. HESS, and the GROMACS development team. **GROMACS 4.6.7**, Royal Institute of Technology and Uppsala University, Sweden, 2014.
- 238- WEISER, J.; SHENKIN, P.; STILL, W. Approximate Atomic Surfaces from Linear Combinations of Pairwise Overlaps (LCPO). **Journal of Computational Chemistry** v. 20, pp. 217-230, 1999. DOI: [10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19990130\)20:2<217::AID-JCC4>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19990130)20:2<217::AID-JCC4>3.0.CO;2-A) .
- 239- HUMPHREY, W., DALKE, A., SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics** v. 14, n.1, pp. 33-38, 27-28, 1996. DOI: [10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5) .
- 240- TROTT, O.; OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry** v. 31, pp. 455-461, 2010. DOI: [10.1002/JCC.21334](https://doi.org/10.1002/JCC.21334) .
- 241- BOYLE, N.M.O. *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics** v. 3, n.33, 2011. DOI: [10.1186/1758-2946-3-33](https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33) .
- 242- AMADEI, A.; LINSEN, A.B.; BERENDSEN, H.J. Essential dynamics of proteins. **Proteins** v. 17, n.4, pp. 412-425, 1993. DOI: [10.1002/prot.340170408](https://doi.org/10.1002/prot.340170408) .
- 243- MU, Y.; NGUYEN, P.H.; STOCK, G. Energy landscape of a small peptide revealed by dihedral angle principal component analysis. **Proteins** v. 58, n.1, pp. 45-52, 2005. DOI: [10.1002/prot.20310](https://doi.org/10.1002/prot.20310) .
- 244- KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers** v. 22, n.12, pp. 2577-2637, 1983. DOI: [10.1002/bip.360221211](https://doi.org/10.1002/bip.360221211) .
- 245- PRATHAMESH, M. *et al.* Applications of Principal Component Analysis (PCA) in Materials Science, Principal Component Analysis - Engineering Applications, Dr. Parinya Sanguansat (Ed.), **InTech**, 2012. DOI: 10.5772/37523. Disponível em: <https://mts.intechopen.com/books/principal-component-analysis-engineering-applications/applications-of-principal-component-analysis-pca-in-materials-science> . Acesso em 24 março 2018.
- 246- SHLENS, J. **A tutorial on principle component analysis**. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/1404.1100> . Acesso em 24 março 2018.

- 247- McLELLAN, J. *et al.* Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. **Science** v. 340, n. 6136, pp. 113-117, 2013. DOI: [10.1126/science.1234914](https://doi.org/10.1126/science.1234914) .
- 248- THOMAS, F. *et al.* Conformational dynamics of asparagine at coiled-coil interfaces. **Biochemistry** v. 56, n.50, pp. 6544-6554, 2017. DOI: [10.1021/acs.biochem.7b00848](https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00848) .
- 249- PIÑEIRO, A. *et al.* A molecular dynamics study of the formation, stability, and oligomerization state of two designed coiled coils: possibilities and limitations. **Biophysical Journal** v. 89, n. 6, pp. 3701-3713, 2005. DOI: [10.1529/biophysj.104.055590](https://doi.org/10.1529/biophysj.104.055590) .
- 250- MISSIMER, J.H. *et al.* Molecular-dynamics simulations of C- and N-terminal peptide derivatives of GCN4-p1 in aqueous solution. **Chemistry & Biodiversity** v. 2, n.8, pp. 1086-1104, 2005. DOI: [10.1002/cbdv.200590078](https://doi.org/10.1002/cbdv.200590078) .
- 251- TRUEBESTEIN, L.; LEONARD, T.A. Coiled-coils: the long and short of it. **Bioessays** v. 38, n.9, pp. 903-916, 2016. DOI: [10.1002/bies.201600062](https://doi.org/10.1002/bies.201600062) .
- 252- MARTÍN-GARCIA, F. *et al.* Molecular dynamics analysis of conformational change of paramyxovirus F protein during the initial steps of membrane fusion. **Biochemical and biophysical research communications** v. 420, n.1, pp. 42-47, 2012. DOI: [10.1016/j.bbrc.2012.02.112](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.112) .
- 253- HADLEY, K.R.; McCABE, C. Coarse-grained molecular models of water: a review. **Molecular Simulation** v. 38, n.8-9, pp. 671-681, 2012. DOI: [10.1080/08927022.2012.671942](https://doi.org/10.1080/08927022.2012.671942) .
- 254- BRADLEY, R.; RADHAKRISHNAN, R. Coarse-grained models for protein-cell membrane interactions. **Polymers (Basel)** v. 5, n.3, pp. 890-936, 2013. DOI: [10.3390/polym5030890](https://doi.org/10.3390/polym5030890) .
- 255- WALSH, E.E., HRUSKA, J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. **Journal of virology** v. 47, pp. [171-177](#), 1983.
- 256- BATTLES, M.B. *et al.* Molecular mechanism of respiratory syncytial virus fusion inhibitors. **Nature Chemical Biology** v. 16, pp. 87-93, 2016. DOI: [10.1038/nchembio.1982](https://doi.org/10.1038/nchembio.1982) .
- 257- MORTON, C.J. *et al.* Structure characterization of respiratory syncytial virus fusion inhibitor escape mutants: homology model of the F protein and a syncytium formation assay. **Virology** v. 11, pp. [275-288](#), 2003.

- 258- DOUGLAS, J.L., *et al.* Small molecules VP-14637 AND JNJ-2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms. **Antimicrobial agents and chemotherapy** v. 49, n.6, pp. 2460-2466, 2005. DOI: [10.1128/AAC.49.6.2460-2466.2005](https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2460-2466.2005) .
- 259- LÓPEZ, J.A. *et al.* Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. **Journal of Virology** v. 72, n.8, pp. [6922-6928](https://doi.org/10.1128/JVI.72.8.6922-6928.1998), 1998.
- 260- ZIMMER, G.; TROTZ, I.; HERRLER, G. N-glycans of F protein differentially affect fusion activity of human respiratory syncytial virus. **Journal of Virology** v. 75, n.10, pp. 4744-4751, 2001. DOI: [10.1128/JVI.75.10.4744-4751.2001](https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4744-4751.2001).
- 261- DAY, N.D. *et al.* Contribution of cysteine residues in the extracellular domain of the F protein of human respiratory syncytial virus to its function. **Virology Journal** v. 34, n.3, 2006. DOI: [10.1186/1743-422X-3-34](https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-34) .
- 262- SUN, Z. *et al.* Respiratory syncytial virus inhibitors targeting the F protein. **Viruses** v.5, pp. 211-225, 2013. DOI: [10.3390/v5010211](https://doi.org/10.3390/v5010211) .
- 263- COLIZZI, F. *et al.* Single-molecule pulling simulations can discern active from inactive enzyme inhibitors. **Journal of the American Chemical Society** v. 132, n.21, pp. 7361-
- 264- ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics** v. 57, n. 4, pp. 702-710, 2004. DOI: [10.1002/prot.20264](https://doi.org/10.1002/prot.20264) .
- 265- _____ TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic Acid Research** v. 33, n.7, pp. 2302-2309, 2005. DOI: [10.1093/nar/gki524](https://doi.org/10.1093/nar/gki524) .
- 266- SANVER, D. *et al.*, Experimental modeling of flavonoid-biomembrane interactions. **Langmuir** v. 32, n. 49, pp. 13234-13243, 2016. DOI: [10.1021/acs.langmuir.6b02219](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b02219) .
- 267- TARAHOVSKY, Y.S. *et al.*, Flavonoid-membrane interactions: involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. **Biochimica et biophysica acta** v. 1838, n.5, pp. 1235-1246, 2014. DOI: [10.1016/j.bbamem.2014.01.021](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.021) .
- 268- KOPÉČ, W.; TELENÍUS, J.; KHANDELIA, H. Molecular dynamics simulations of the interactions of medicinal plant extracts and drugs with lipid bilayer membranes. **FEBS Journal** v. 280, n.12, pp. 2785-2805, 2013. DOI: [10.1111/febs.12286](https://doi.org/10.1111/febs.12286) .
- 269- CHADAL, B. *et al.* Structure-dependent membrane interaction and bioactivity of flavonoids with lipid bilayers. International Symposium on micro-nanomechanics and human Science (MHS), 2012. DOI:

[10.1109/MHS.2012.6492463](https://doi.org/10.1109/MHS.2012.6492463) .

- 270- HENDRICH, A.B. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica** v. 27, pp. 27-40, [2006](#).
- 271- OTEIZA, P.I. *et al.* Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface? **Clinical and Developmental Immunology** v. 12, n.1, pp. 19-25, [2005](#).
- 272- MARDIGAN, M.T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**. 13th edition, 2011. ISBN 10: 0-321-64963-X.
- 273- **THE CENTRAL DOGMA OF MOLECULAR BIOLOGY**. Disponível em: <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/27-dna-replication-transcri/central-dogma.html> . Acesso em 15 novembro 2018.
- 274- **PROTEIN STRUCTURE LEVELS**. Disponível em: https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Main_protein_structure_levels_en.svg . Acesso em 15 novembro 2018.
- 275- WU, S.; ZHANG, Y. **Protein structure prediction**. Disponível em: https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/papers/2009_8.pdf . Acesso em 21 de novembro 2018.
- 276- DORN, M. Three-dimensional protein structure prediction: methods and computational strategies. **Computational Biology and Chemistry** v. 53, Part B, pp. 251-276, 2014. DOI: [10.1016/j.compbiolchem.2014.10.001](https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2014.10.001) .
- 277- BASHEER, I. A.; HAJMEER, M. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. **Journal of Microbiological Methods** v. 43, n. 1, pp.3–31, [2000](#).
- 278- BENZER, R.; BENZER, S. Application of artificial neural network into the freshwater fish caught in Turkey. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies** v. 2,n.5, pp. 341–346, [2015](#).
- 279- CHAKRABARTY, A., DE, A.; DUBEY, R. An excursion towards multi-frequency-prediction based flexible asset allocation system. **Global Journal of Flexible Systems Management** v. 16, n.2, pp. 173–190, [2015](#).
- 280- GEBLER, D. *et al.* Artificial neural network modelling of macrophyte indices based on physic-chemical characteristics of water. **Hydrobiologia** v. 737, n.1, pp. 215–224, [2014](#).

- 281- SEGURITAN, V. *et al.* Artificial neural networks trained to detect viral and phage structural proteins. **PLOS Computational Biology** 8, e1002657, 2012. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1002657](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002657) .
- 282- HAYKIN, S. **Redes Neurais: princípios e prática**. Bookman, 2001.
- 283- KROGH, A. What are artificial neural networks? **Nature Biotechnology** v. 26, n.2, pp. 195–197, 2008. DOI: [10.1038/nbt1386](https://doi.org/10.1038/nbt1386) .
- 284- WALCZAK, S.; CERPA, N. Heuristic principles for the design of artificial neural networks. **Information and Software Technology** v. 41, pp. 107–117, [1999](https://doi.org/10.1016/0950-5849(99)00050-0).
- 285- TANOMARU, J. **Motivação, fundamentos e aplicações de Algoritmos Genéticos**. Curitiba: II Congresso Brasileiro de Redes Neurais, 1995.
- 286- BEALE, M. H.; HAGAN, M. T.; DEMUTH, H. B. **Neural Network Toolbox™ User's Guide 8**, 2015.
- 287- GOETHALS, P. L. M. *et al.* Applications of artificial neural networks predicting macroinvertebrates in freshwaters. **Aquatic Ecology** v. 41, n.3, pp. 491–508, 2007. DOI: [10.1007/s10452-007-9093-3](https://doi.org/10.1007/s10452-007-9093-3) .
- 288- LUDERMIR, T. B.; YAMAZAKI, A.; ZANCHETTIN, C. An optimization methodology for neural networks weights and architectures. **IEEE Transactions on Neural Networks** v. 17, pp.1452–1459, [2006](https://doi.org/10.1109/TNN.2006.2582582).
- 289- KOVÁCS, Z. L. **Redes Neurais Artificiais: fundamentos e aplicações: um texto básico**. Editora Livraria da Física, 2006.
- 290- KHOSRAVI, A. *et al.* Comprehensive review of neural network-based prediction intervals and new advances. **IEEE Transactions on Neural Networks** v. 22, n.9, pp. 1341–1356, 2011. DOI: [10.1109/TNN.2011.2162110](https://doi.org/10.1109/TNN.2011.2162110) .
- 291- LASKOWSKI, R.A. *et al.* PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography** v. 26, pp. 283-291, 1993. DOI: [10.1107/S0021889892009944](https://doi.org/10.1107/S0021889892009944) .
- 292- BENKERT, P.; TOSATTO, S.C.E.; SCHOMBURG, D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics** v. 71, n.1, pp. 261-277, 2008. DOI: [10.1002/prot.21715](https://doi.org/10.1002/prot.21715) .

- 293- ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols** v. 5, n.4, pp. 725-738, 2010. DOI: [10.1038/nprot.2010.5](https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5) .
- 294- ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics** v. 9, n. 40, 2008. DOI: [10.1186/1471-2105-9-40](https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40) .
- 295- ZHANG, Y. Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. **Proteins** v. 69, n.8, pp. 108-117, 2007. DOI: [10.1002/prot.21702](https://doi.org/10.1002/prot.21702) .
- 296- ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. Automated structure prediction of weakly homologous proteins on a genomic scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 101, n.20, pp. 7594-7599, 2004. DOI: [10.1073/pnas.0305695101](https://doi.org/10.1073/pnas.0305695101) .
- 297- ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. Tertiary structure predictions on a comprehensive benchmark of medium to large size proteins. **Biophysical Journal** v. 87, n.4, pp. 2647-2655, 2004. DOI: [10.1529/biophysj.104.045385](https://doi.org/10.1529/biophysj.104.045385) .
- 298- WHITE, S.H. Biophysical dissection of membrane proteins. **Nature** v. 459, pp. 344-346, 2009. DOI: [10.1038/nature08142](https://doi.org/10.1038/nature08142) .
- 299- ILKOWSKI, B.; SKOLNICK, J.; KOLINSKI, A. Helix-coil and beta sheet-coil transitions in a simplified, yet realistic protein model. **Macromolecular Theory and Simulations** v. 9, n.8, pp. 523-533, [2000](#).
- 300- YAPA, K.; WEAVER, D.L.; KARPLUS, M. B-sheet coil transitions in a simple polypeptide model. **Proteins** v. 12, n.3, pp. 237-265, 1992. DOI: [10.1002/prot.340120304](https://doi.org/10.1002/prot.340120304) .
- 301- **SECONDARY STRUCTURE ASSIGNMENT: DSSP AND STRIDE**. Disponível em: <https://slideplayer.com/slide/4047493/> . Acesso em 03 novembro 2018.
- 302- **FISIPRED: PHI PSI PREDICTION**. Disponível em: <http://crdd.osdd.net/raghava/fisipred/index.html> . Acesso em 03 novembro 2018.
- 303- HEYLEN, E.; NEYTS, J.; JOCHMANS, D. Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus antiviral drug discovery. **Biochemical Pharmacology** v. 1, n.127, pp. 1-12, 2017. DOI: [10.1016/j.bcp.2016.09.014](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.014) .
- 304- RASCHKA, S. *et al.* Protein-ligand interfaces are polarized: discovery of a strong trend for intermolecular hydrogen bonds to favor donors on the protein side with implications for

- predicting and designing ligand complexes. **Journal of Computer-aided molecular design** v. 32, n.4, pp. 511-528, 2018. DOI: [10.1007/s10822-018-0105-2](https://doi.org/10.1007/s10822-018-0105-2) .
- 305- LIPINSKI, C.A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 23, n.1, pp. 3-25, 1997. DOI: [10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1) .
- 306- LIPINSKI, C.A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 46, pp. 3-26, [2001](#).
- 307- VEBER, D.F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry** v. 45, n.12, pp. 2615-2623, 2002. DOI: [10.1021/jm020017n](https://doi.org/10.1021/jm020017n) .
- 308-KOHAVI, R. A Study of Cross-Validation and Bootstrap for Accuracy Estimation and Model Selection. **International Joint Conference on Artificial Intelligence(IJCAI)**, [1995](#).
- 309- RIPLEY, B.D. **Pattern recognition and neural networks**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1996.
- 310- NOORIZADEH, H.; FARMANY, A. Investigation of capacity behaviors by linear and nonlinear models chemometrics. **Trends in Applied Sciences Research** v. 6, pp. 1324-1334, 2011. DOI: [10.3923/tasr.2011.1324.1334](https://doi.org/10.3923/tasr.2011.1324.1334) .
- 311- CERIT, I. *et al.* Estimation of antioxidant activity of foods using artificial neural networks. **Journal of Food and Nutrition Research** v. 56, n.2, pp. 138-148, [2017](#).
- 312- SHEN, J. *et al.* A genetic algorithm-backpropagation artificial neural network model to quantify the affinity of flavonoids toward P-glycoprotein. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening** v. 17, n.2, pp. 162-172, [2014](#).
- 313- KARAWAJCZYK, A. *et al.* Properties of flavonoids influencing the binding to bilitranslocase investigated by neural network modelling. **Biochemical Pharmacology** v. 73, n.2, pp. 308-320, 2007. DOI: [10.1016/j.bcp.2006.09.024](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.09.024) .
- 314- ZUVELA, P.; DAVID, J.; WONG, M.W. Interpretation of ANN-based QSAR models for prediction of antioxidant activity of flavonoids. **Journal of Computational Chemistry** v. 39, n.16, pp. 953-963, 2018. DOI: [10.1002/jcc.25168](https://doi.org/10.1002/jcc.25168) .

- 315- WU, Y.; WANG, G. Machine learning based toxicity prediction: from chemical structural description to transcriptome analysis. **International Journal of Molecular Sciences** v. 19, n.8, E2358, 2018. DOI: [10.3390/ijms19082358](https://doi.org/10.3390/ijms19082358) .
- 316- RIFAIOGLU, A.S. *et al.* Recent applications of deep learning and machine intelligence on *in silico* drug discovery: methods, tools and databases. **Briefings in Bioinformatics**, bby061, 2018. DOI: [10.1093/bib/bby061](https://doi.org/10.1093/bib/bby061) .
- 317- SCHNEIDER, G. Automating drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 17, pp. 97-113, [2018](https://doi.org/10.1038/s41573-018-0000-0).
- 318- ROCHA, J.C. *et al.* A method based on artificial intelligence to fully automatize the evaluation of bovine blastocyst images. **Scientific Reports** v. 7, n. 7659, [2017](https://doi.org/10.1038/s41598-017-07659-0).
- 319- MANDLIK, V.; BEJUGAM, P.R.; SINGH, S. Application of artificial neural networks in modern drug discovery. **Artificial Neural Network for Drug Design, Delivery, and Disposition**, pp. 123-139, 2016. DOI: [10.1016/B978-0-12-801559-9.00006-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801559-9.00006-5) .
- 320- MERCADER, A.G.; POMILIO, A.B. 2D- and 3D-QSAR Studies of Flavonoids, Biflavones and Chalcones: Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antimycobacterial Activities. **Anti-infective Agents** v. 10, n.1, 2012. DOI: [10.2174/2211362611201010041](https://doi.org/10.2174/2211362611201010041) .
- 321- AMIC, D. *et al.* SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. **Current Medicinal Chemistry** v. 14, n.7, pp. 827-845, [2007](https://doi.org/10.2174/093964603000000000).
- 322- LANDAVAZO, D.; FOGEL, G.B. Evolved neural networks for quantitative structure-activity relationships of anti-HIV compounds. **Proceedings of the 2002 Congress on Evolutionary Computation. CEC'02 (Cat. No.02TH8600)**, 2002. DOI: [10.1109/CEC.2002.1006233](https://doi.org/10.1109/CEC.2002.1006233) .
- 323- BASKIN, I.I.; WINKLER, D.; TETKO, I.V. A renaissance of neural networks in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery** v. 11, n.8, pp. 785-795, 2016. DOI: [10.1080/17460441.2016](https://doi.org/10.1080/17460441.2016) .
- 324- HILLER, S.A. *et al.* Cybernetic methods of drug design. I. Statement of the problem—the perceptron approach. **Computers and Biomedical Research, an International Journal** v. 6, n.5, pp. 411-421, [1973](https://doi.org/10.1016/0010-0285(73)90001-0).
- 325- CHENG, T. *et al.* Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. **Journal of Chemical Information and Modeling** v. 47, n.6, pp. 2140-2148, 2007. DOI: [10.1021/ci700257y](https://doi.org/10.1021/ci700257y) .

- 326- ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **Journal of Medicinal Chemistry** v. 43, n. 20, pp. 3714-3717, 2000. DOI: [10.1021/jm000942e](https://doi.org/10.1021/jm000942e) .
- 327- DECHERCHI, S. *et al.* Implicit solvent methods for free energy estimation. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 91, pp. 27-42, 2015. DOI: [10.1016/j.ejmech.2014.08.064](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.064) .
- 328- ZHANG, Y.; DING, Y. Molecular dynamics simulation and bioinformatics study on chloroplast stromal ridge complex from rice (*Oryza sativa* L). **BMC Bioinformatics** v. 17, n.28, 2016. DOI: [10.1186/s12859-016-0877-0](https://doi.org/10.1186/s12859-016-0877-0) .
- 329- DAURA, X. *et al.* Peptide folding: when simulation meets experiment. **Angewandte International Edition Chemie** v. 38, n. 1-2, pp. 236-240, 1999. DOI: [10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990115\)38:1/2<236::AID-ANIE236>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990115)38:1/2<236::AID-ANIE236>3.0.CO;2-M) .
- 330- GONÇALVES, L. *et al.* Roc curve estimation: an overview. **Revstat – Statistical Journal** v. 12, n.1, pp. 1-20, [2014](#).