



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

Evelyn Pedroso Toscano Quintino

**Estudo da interação da Crisina e seu derivado  
monoacetilado com a proteína NS1 do Vírus Sincicial  
Respiratório humano (hRSV) por Espectroscopia de  
Fluorescência e *Docking* Molecular**

São José do Rio Preto

2019

Evelyn Pedroso Toscano Quintino

**Estudo da interação da Crisina e seu derivado  
monoacetilado com a proteína NS1 do Vírus Sincicial  
Respiratório humano (hRSV) por Espectroscopia de  
Fluorescência e *Docking* Molecular**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima Pereira de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey

São José do Rio Preto

2019

Q7e

Quintino, Evelyn Pedroso Toscano

Estudo da interação da crisina e seu derivado monoacetilado com a proteína NS1 do Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) por espectroscopia de fluorescência e docking molecular / Evelyn Pedroso Toscano Quintino. -- São José do Rio Preto, 2019

70 p. : il., tabs.

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

Orientadora: Fátima Pereira de Souza

Coorientador: Marcelo Andrés Fossey

1. hRSV. 2. Proteína NS1. 3. Crisina. 4. Espectroscopia de fluorescência. 5. Docking Molecular. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Evelyn Pedroso Toscano Quintino

**Estudo da interação da Crisina e seu derivado  
monoacetilado com a proteína NS1 do Vírus Sincicial  
Respiratório humano (hRSV) por Espectroscopia de  
Fluorescência e *Docking* Molecular**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima Pereira de Souza  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Vidotto  
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

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

São José do Rio Preto  
28 de março de 2019

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** pela vida, por me guiar até aqui, por me conceder paz nos momentos difíceis, pelas conquistas diárias, por me capacitar a cada dia e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

Agradeço aos meus pais, **Márcia Regina Pedroso** e **Edson Wander da Silva** que sempre me incentivaram a estudar, não mediando esforços para que eu tivesse um ensino de qualidade, por acreditarem em mim e por me proporcionarem todo o suporte emocional e financeiro para que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao meu esposo **Breno Quintino da Silva**, pelo companheirismo, por me incentivar e ser meu ponto de equilíbrio diário ao longo desses anos.

Agradeço à minha orientadora **Fátima Pereira de Souza** por ser meu exemplo, minha inspiração de todos os dias, por exigir cada vez mais de mim e mostrar que sou capaz, por me acolher nos momentos difíceis, por me proporcionar tantos momentos de aprendizado, por acreditar e ver meu potencial mesmo quando eu mesma não via, pelo amadurecimento profissional, pelo amor e dedicação que sempre demonstrou não somente a mim, mas a todo o grupo.

Agradeço ao meu coorientador **Marcelo Andres Fossey** pela paciência, dedicação, amor, por vibrar comigo a cada conquista, pelos aconselhamentos e por ensinar física a uma bióloga com tanto empenho e carinho.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, amigos esses que quero levar para a vida, por cada dia que passei com vocês, por cada café, cada risada, cada choro também, por me auxiliarem diariamente e até por me ajudarem a realizar meu maior sonho, uma festa de casamento. Agradeço especialmente a **Artemiza, Jéssica, Giovana, Amanda, Thainá, Vitor, Gabriela, Hêmily, Maria Fernanda e Raquel**.

À **Isabella**, que além de amiga, sempre me auxiliou nos experimentos e foi responsável pela realização da parte computacional deste trabalho.

Agradeço também ao **Ícaro** por ser nosso suporte diário no laboratório e por ter contribuído grandemente com este trabalho.

Agradeço à minha amiga de graduação **Gabrielle**, pela amizade e companheirismo que tem se sustentado desde o início da graduação, por me ouvir e me incentivar diariamente.

Ao professor **Luís Octávio Regasini** do Laboratório de Química Verde e Medicinal por fornecer os flavonoides usados nos experimentos.

Ao **Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular** e ao **departamento de física** no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP/São José do Rio Preto onde realizei os experimentos com toda a infraestrutura necessária.

Ao **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP)** por ter sido minha casa durante seis anos, pelo acolhimento, pela oportunidade de estudar em uma universidade maravilhosa com docentes excelentes e comprometidos com a formação dos alunos e por fornecer todo o suporte para a realização dos meus estudos, dos prédios aos livros.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Microbiologia** pelo suporte financeiro e de formação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, ao **CNPq** e à **FINEP** pelo apoio financeiro.

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

Agradeço à **Banca Examinadora**, pela disponibilidade e contribuição com este trabalho.

## RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) é um dos principais causadores de infecções respiratórias agudas (IRA), do trato inferior, em crianças menores de cinco anos de idade. O hRSV, membro da família Pneumoviridae, sintetiza a proteína NS1 que promove ao vírus evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Diante dos efeitos colaterais, alto custo e baixa eficácia dos tratamentos disponíveis, buscam-se tratamentos alternativos para hRSV com melhor eficácia, baixo custo e menos efeitos colaterais. A crisina, um flavonóide proveniente de produtos naturais, dentre suas atividades farmacológicas, apresenta atividade antiviral em estudos *in vitro* contra HSV-I e Influenza. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi estudar se há interação entre a proteína NS1 do hRSV e os flavonóides crisina e derivado monoacetilado de crisina, utilizando espectroscopia de fluorescência e *docking* molecular. Para isso, foi realizada a clonagem, expressão e purificação da proteína NS1 e caracterização dos ligantes. Os resultados da supressão de fluorescência da NS1 com ambos os ligantes apontam que o mecanismo de interação é do tipo dinâmico, já que as constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) é diretamente proporcional ao aumento da temperatura. A partir da análise do duplo log determinou-se a ordem da constante de ligação ( $K_b$ ) da ordem de  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , entretanto a interação NS1-crisina apresentou maior afinidade do que na interação NS1-derivado monoacetilado de crisina. Os parâmetros termodinâmicos indicaram que a reação de ligação é favorável, entropicamente dirigida e predominantemente hidrofóbica. Esses resultados, juntamente com estudos de *Docking* molecular, nos sugerem que apesar da diminuição na afinidade da proteína pelo derivado monoacetilado de crisina, a modificação não resultou em maior probabilidade de afinidade do ligante por outro sítio que não o mesmo da NS1-crisina. A acetilação, em sistemas mais complexos, poderá resultar em um aumento na sua absorção intestinal, biodisponibilidade e acesso ao seu alvo por facilitar sua passagem pela membrana citoplasmática.

**Palavras-chave:** hRSV, proteína NS1, crisina, derivado monoacetilado de crisina, espectroscopia de fluorescência, *docking* molecular.

## ABSTRACT

Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is a major cause of acute lower respiratory tract infections (ALRIs) in children under 5 years of age. HRSV, a member of the Pneumoviridae family, synthesizes the NS1 protein that promotes virus evasion of the host's immune system. In view of the collateral effects, high cost and low efficacy of available treatments, alternative treatments for hRSV was sought with better efficiency, low cost and fewer side effects. Chrysin, flavonoid from natural products, among its pharmacological activities, has antiviral activity in in vitro studies. Therefore, the aim of this work was to study the interaction between hRSV-NS1 and chrysin flavonoids and monoacetylated chrysin derivative using fluorescence spectroscopy and molecular docking. For this, cloning, expression and purification of the NS1 protein and characterization of the ligands were performed. The results of hRSV-NS1 fluorescence suppression with both ligands indicate that the interaction mechanism is of the collisional type, since the Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) constants increase with increasing temperature. From the double log analysis, the order of the binding constant ( $K_b$ ) of  $10^5 \text{ M}^{-1}$  was determined, however, the NS1-chrysin interaction showed higher affinity in comparison to the NS1-monoacetylated derivative of chrysin interaction. The thermodynamic parameters indicated that the binding reaction is favorable, entropically directed. These results, together with molecular docking studies, suggest us that despite the decrease in protein affinity for the monoacetylated derivative of chrysin, the modification did not result in a greater likelihood of affinity for the linker at a site other than that of NS1-chrysin. Chrysin acetylation, in more complex systems, may result in an increase in its intestinal absorption, bioavailability and access to its target by facilitating its passage through the cytoplasmic membrane.

**Keywords:** hRSV, hRSV-NS1, chrysin, monoacetylated derivative of chrysin, fluorescence spectroscopy, molecular docking.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** Mapa global do tempo de pico de infecção por RSV e duração da epidemia (n = 96 locais). As cores ilustram o tempo da atividade de pico de RSV, com base na legenda inferior esquerda, enquanto o tamanho dos círculos é proporcional à duração da epidemia. Observações independentes para o mesmo local foram calculadas uma média. Para estudos que não forneceram informações suficientes para estimar a duração, um triângulo é mostrado. Círculos preenchidos com mais de uma cor representam locais que experimentam picos semestrais de atividade de vírus. ....16

**Figura 2.** Representação da estrutura do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) e das suas proteínas. A. O hRSV possui proteínas estruturais e não estruturais. Dentre as proteínas estruturais, três compõem o envelope viral, a proteína de fusão F (verde), a glicoproteína G (amarelo) e a proteína hidrofóbica pequena SH (púrpura); quatro compõem o nucleocapsídeo, a proteína de matriz M (bege), a nucleoproteína N (azul), a fosfoproteína P (verde claro), a RNA polimerase dependente de RNA L (roxo). B Genoma do hRSV composto por 10 genes, sentido 3'-5', que codificam 11 proteínas. A cor representativa para cada gene corresponde à proteína que é produzida a partir do mesmo.....19

**Figura 3** Replicação do hRSV (Pneumoviridae). A replicação se inicia pela adsorção e fusão do vírus à célula hospedeira por meio da interação das proteínas G e F do vírus com receptores da célula hospedeira que resultam na fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática promovendo a internalização do material genético viral. O genoma viral internalizado é, em seguida, transcrito e traduzido. Tanto a replicação como a transcrição são dependentes da RNA polimerase dependente de RNA, que sintetiza antígeno de sentido positivo que servirá como molde para síntese de antígeno de sentido negativo e também será traduzido em proteínas virais. Após a síntese das proteínas e da replicação do genoma viral, a estrutura do vírion se reorganiza e sai da célula por brotamento dando origem ao vírion maduro. ....21

**Figura 4** Atuação das proteínas virais na modulação da resposta imunológica do hospedeiro. 1. NS1 inibe a ligação de RIG-I à proteína mitocondrial de sinalização antiviral (MAVS) impedindo a interação MAVS-RIG-I necessárias para a produção de

IFN; 2. NS1 pode ligar-se diretamente ao IRF-3, ativador de transcrição do sistema IFN tipo I; 3. As proteínas NS1 e NS2 induzem a degradação proteossômica da STAT2 que, quando ativados, associam-se ao fator 9 regulador de interferon (IRF-9) para formar o complexo ativador transcricional fator 3 (ISGF-3). Esse complexo é translocado para o núcleo e ativa a transcrição dos ISG. 4. Interação da proteína F do hRSV com receptores *Toll-like* 4 (TLR-4) importantes na ativação da resposta imune inata. ....26

**Figura 5** Esquema da estrutura molecular da crisina (5,7-di-OH-flavona) e derivado monoacetilado de crisina evidenciando o local onde foi realizada a modificação .....30

**Figura 6** Mapa do plasmídeo pJexpress 401-NS1. O plasmídeo contém uma região marcadora para resistência a canamicina, o gene *lacI*, origem de replicação de alta cópia bacteriana, promotor de transcrição T5, a região do operador *lac* (*lacO*), o gene da NS1 e o gene para a cauda com 6 Histidinas. ....31

**Figura 7** Espectro de absorção da crisina e seu derivado com os pontos utilizados. Coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ) de 240 a 500 dos flavonoides A. crisina e B. Derivado monoacetilado de crisina em DMSO.....40

**Figura 8** SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie brilliant blue* R-250 evidenciando o teste de expressão para averiguar o melhor tempo de indução da proteína NS1 em *Rosetta-gami* 2 (DE3). M. Marcador de massa molecular. Foram selecionados os tempos de 3, 4 e 17 horas após indução em três clones diferentes (C1, C2 e C3). Determinou-se a melhor condição de expressão após 4 horas de indução do clone 1. A proteína NS1 apresenta aproximadamente 16 kDa. ....41

**Figura 9.** SDS-PAGE 15% corado com *coomansie brilliant blue* R-250 evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade. A. M. Marcador de massa molecular, AI antes de induzir, DI depois da indução, Flow through 1 e 2, passos de lavagem de 5 a 40 mM de Imidazol. B. Passos de eluição de 60 a 500 mM de Imidazol. A proteína NS1 foi eluída no passo de 80 mM de Imidazol. ....43

**Figura 10** Cromatograma referente a cromatografia de exclusão molecular. Em azul está representado a absorbância no UV em mAU, em vermelho são as frações coletadas de 0,5 mL em cada fração e em preto o volume coletado em mL. Quatro picos foram observados, de B2 a B8, de B9 a C2, de C9 a C11 e o último pico em D1.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A proteína NS1 foi eluída nas frações B10 a C2, que apresentou pico de 110 mAU em um volume de 12 e 13 mL. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 45 |
| <b>Figura 11</b> Gel SDS-PAGE 15% evidenciando as frações coletadas após a cromatografia de exclusão molecular. A. AI (amostra antes de injetar), M (marcador de massa molecular), B2 a B8 frações coletadas referentes ao primeiro pico do cromatograma de 38 mAU. B. Frações de B9 a C2 referente ao segundo pico de 110 mAU (eluição da proteína NS1), C11 referente ao terceiro pico de 8 mAU e D1 referentes ao pico aproximadamente 2 mAU. .... | 46 |
| <b>Figura 12</b> Espectro Absorbância da proteína NS1 em tampão PBS 1X, pH 7,4. A. Absorbância da proteína NS1 na concentração de 34,14 $\mu$ M. B. Absorbância da proteína NS1 na concentração de 2 $\mu$ M. ....                                                                                                                                                                                                                                    | 47 |
| <b>Figura 13</b> Espectro de dicroísmo circular e estrutura da proteína NS1 (tampão PBS 1x, pH 7,4). (a) O espectro de CD da proteína obtido experimentalmente está representado pelos círculos pretos e o ajuste da curva utilizando programa CONTIN/LL.(b) Diagrama de topografia da proteína NS1. ....                                                                                                                                             | 48 |
| <b>Figura 14</b> Espectros de supressão da fluorescência da proteína NS1 pela presença dos flavonoides. A. Crisina. B. Derivado mono acetilado de crisina. Ambos na temperatura de 19 °C. A concentração dos ligantes variaram de 0 a 4 $\mu$ M. Proteína NS1 em Tampão PBS 1X em uma concentração de 2 $\mu$ M. ....                                                                                                                                 | 49 |
| <b>Figura 15.</b> Gráficos de Stern-Volmer e ajuste linear dos pontos nas temperaturas de 19 e 37 °C. A. complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina.....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 50 |
| <b>Figura 16</b> Gráficos de duplo log e ajuste linear dos pontos nas temperaturas de 19 e 37 °C .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 50 |
| <b>Figura 17</b> Gráficos de Van't Hoff. A. complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 52 |
| <b>Figura 18.</b> Gráficos em barras dos parâmetros termodinâmicos dos complexos NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina em duas temperaturas, 19 e 37 °C. A complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina. Variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e variação da entropia ( $T\Delta S$ ). ....                                                                 | 52 |

**Figura 19** Localização das moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina na cavidade de interação da proteína NS1 por docking molecular e mapa de interação. A. Localização da molécula crisina na proteína. B. Detalhe estrutural da interação entre NS1-crisina obtida pelo método de modelagem molecular. C. mapa de interação entre NS1 crisina obtida a partir do PayMol evidenciando as distâncias, linha tracejada verde, entre a crisina e os resíduos Lys-115 e Pro-67. D. Localização da molécula derivado monoacetilado de crisina na proteína. E. Detalhe estrutural da interação entre NS1-derivado monoacetilado de crisina obtida pelo método de modelagem molecular. F. mapa de interação entre NS1 e o derivado monoacetilado de crisina obtida a partir do PayMol. As moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina são representadas utilizando o modelo stick-balls, os resíduos de aminoácidos são denotados usando o modelo sticks (C, cinza; O, vermelho; N, azul; S, amarelo; H, branco) e as pontes de hidrogênio representadas por linhas tracejadas amarelas...54

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Constantes de Stern-Volmer resultantes da interação do complexo NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina. R = coeficiente de correlação.....49

**Tabela 2.** Constantes de ligação ( $K_b$ ) e o número de sítios de ligação nas temperaturas de 19 e 37 °C para a interação entre NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina. Os coeficientes de correlação (R) são > 0,995.....51

**Tabela 3.** Parâmetros termodinâmicos dos complexos NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina em duas temperaturas, 19 e 37 °C. A complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina. Variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e variação da entropia ( $T\Delta S$ ).....53

## Sumário

|           |                                                                                                                                     |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1-</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                             | <b>12</b> |
| <b>2-</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                                                                                  | <b>13</b> |
| 2.1.      | Replicação viral e função das proteínas do hRSV no processo de infecção.....                                                        | 20        |
| 2.2.      | Resposta imunológica e o papel da proteína NS1 na infecção viral ...                                                                | 23        |
| 2.3.      | Tratamento e busca de alvo para bloqueio da replicação viral .....                                                                  | 26        |
| 2.4.      | Crisina: Potencial Terapêutico e Antiviral .....                                                                                    | 27        |
| 2.4.1.    | Estrutura química da crisina e derivado monoacetilado de crisina .....                                                              | 28        |
| <b>3.</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                               | <b>30</b> |
| 3.3.      | Objetivos Gerais.....                                                                                                               | 30        |
| 3.4.      | Objetivos Específicos .....                                                                                                         | 30        |
| <b>4.</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                                                                    | <b>30</b> |
| 4.1.      | DNA recombinante pJexpress 401-NS1.....                                                                                             | 31        |
| 4.2.      | Parâmetros físico-químicos da proteína NS1 fornecidos pelo programa ProtParam .....                                                 | 32        |
| 4.3.      | Transformação e expressão da proteína NS1 em <i>Rosetta-Gami 2</i> (DE3) .....                                                      | 32        |
| 4.4.      | Purificação Proteína NS1 por Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados e Cromatografia de Exclusão Molecular ..... | 33        |
| 4.5.      | Caracterização dos flavonoides Crisina e derivado monoacetilado de crisina.....                                                     | 34        |
| 4.6.      | Estrutura secundária por deconvolução espectral de CD.....                                                                          | 35        |
| 4.7.      | Espectroscopia de fluorescência: medidas e análises .....                                                                           | 36        |
| 4.8.      | Parâmetros Termodinâmicos.....                                                                                                      | 38        |
| 4.9.      | Docking molecular e mapa de interação.....                                                                                          | 39        |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                              | <b>40</b> |
| 5.1.      | Caracterização dos ligantes crisina e derivado monoacetilado de crisina .....                                                       | 40        |
| 5.2.      | Teste de indução da proteína.....                                                                                                   | 40        |
| 5.3.      | Purificação da proteína NS1 .....                                                                                                   | 41        |
| 5.4.      | Dicroísmo Circular (CD).....                                                                                                        | 47        |
| 5.5.      | Supressão da fluorescência da NS1 Crisina e seu derivado .....                                                                      | 48        |
| <b>6.</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                               | <b>55</b> |
| <b>7.</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                              | <b>58</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                             | <b>60</b> |

## 1- INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que mais afetam as crianças nos primeiros anos de vida, encontram-se as infecções virais do trato respiratório inferior. O Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) é um dos principais causadores dessas infecções respiratórias agudas (IRA) graves como pneumonia e bronquiolite em crianças menores de 5 anos de idade, sendo o causador de milhões de hospitalizações e milhares de óbitos nessa faixa etária, afetando também imunodeficientes e idosos (NAIR et al., 2010; LAMBERT et al., 2014; GRIFFITHS et al., 2016).

A maioria das infecções por hRSV ocorrem em períodos específicos do ano, o que o caracteriza como sazonal. No hemisfério norte, entre outubro e maio e, no hemisfério sul, especialmente no Brasil, entre abril e julho, com pico no final do verão (CHECON et al., 2002; BLOOM-FESHBACH et al., 2013; PAYNTER, 2015).

O hRSV é membro da família Pneumoviridae pertencente ao gênero *Orthopneumovirus*, sendo um vírus de RNA não segmentado de cadeia negativa. O genoma viral contém 10 genes responsáveis pela transcrição de 11 proteínas. Suas proteínas são: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, L, M2-1 e M2-2 (COLLINS et al., 2013; TAPIA et al., 2014; FREITAS et al., 2015).

A molécula alvo desse trabalho é a NS1, uma proteína não estrutural envolvida na inibição da produção de interferon, que juntamente com outros mediadores inatos das células epiteliais, têm um papel crucial no curso subsequente da infecção por RSV por induzir mecanismos de defesa contra a infecção viral. A inibição do interferon do tipo I parece ser um dos principais determinantes da suscetibilidade à reinfecção pelo RSV, com seus efeitos de longo alcance na imunidade inata e adaptativa (GARCÍA-SASTRE et al., 2006; MUNIR et al., 2011; PRETEL et al., 2013; OPENSHAW et al., 2017).

Até o momento, não existe vacina aprovada para a imunização contra a infecção por hRSV e o tratamento oferecido atualmente, como o palvizumab e a Ribavirina são de alto custo, causam efeitos colaterais, principalmente a Ribavirina, e não são efetivos no tratamento da doença (DE VINCENZO et al., 2008). Dessa forma, buscar tratamentos alternativos mais efetivos, de baixo

custo e com menos efeitos colaterais passou a ser o objetivo de muitos pesquisadores da área (HEYLEN et al., 2017).

A crisina, uma flavona oriunda de produtos naturais, dentre suas atividades farmacológicas, apresenta atividade antiviral em estudos *in vitro* contra o vírus do HSV-I e Influenza (SCHNITZLER et al., 2010 e HOUR et al., 2013). Modificações realizadas na estrutura desses flavonoides para facilitar sua entrada na célula por meio de difusão passiva e, portanto, melhorar sua absorção, são uma estratégia utilizada para melhorar a biodisponibilidade de um fármaco (PEREIRA, 2007).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi estudar e caracterizar por espectroscopia de fluorescência, aspectos da interação, como supressão de fluorescência, *Stern-Volmer*, duplo-log e parâmetros termodinâmicos. Além disso, estudos utilizando *docking* molecular e mapa de interação foram realizados a fim de analisar as principais interações intermoleculares entre a crisina e derivado monoacetilado de crisina e os resíduos de aminoácidos presentes na cavidade de interação da proteína NS1.

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

Infecções respiratórias agudas (IRAs) são consideradas a principal causa de morte infantil no mundo. Dentre os causadores desse tipo de infecção encontra-se o Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV), que acomete principalmente crianças com até 5 anos de idade. Até dois anos de idade, o risco de infecção por hRSV é maior e 40% delas desenvolvem as infecções respiratórias agudas. Destas, 0,5-2% necessitam de hospitalização tornando as IRAs de trato inferior associadas ao hRSV a principal causa de hospitalização em crianças durante o inverno (NAIR et al., 2010; LAMBERT et al., 2014; GRIFFITHS et al., 2016).

Em um levantamento global realizado por Shi e colaboradores (2017) as IRAs causadas por hRSV corresponderam, no ano de 2015, há 33,1 milhões de casos que resultaram em 3,2 milhões de internações hospitalares e 59,6 mil óbitos de crianças com menos de cinco anos de idade hospitalizadas (SHI et al., 2017; GRIFFITHS et al., 2016; NAIR et al., 2010). Sendo assim, as infecções por

hRSV são consideradas um relevante problema de saúde pública em todo o mundo (FREITAS et al., 2015; TAPIA et al., 2014).

Alguns fatores podem contribuir de forma significativa para o agravamento do quadro infeccioso, durante a infecção por hRSV, que resultam em hospitalizações. A prematuridade, peso inferior a 2,5 kg ao nascer, distúrbios imunológicos sejam eles genéticos ou adquiridos, anomalias cromossômicas numéricas, como Síndrome de Down, e presença de outras doenças pulmonares como asma, neoplasias e cardiopatias, são fatores que contribuem para o estabelecimento de quadros mais graves ocasionados da infecção por hRSV (SHARMA et al, 2016; GRIFFITHS et al., 2016; CHAN et al., 2017; SHI et al., 2017).

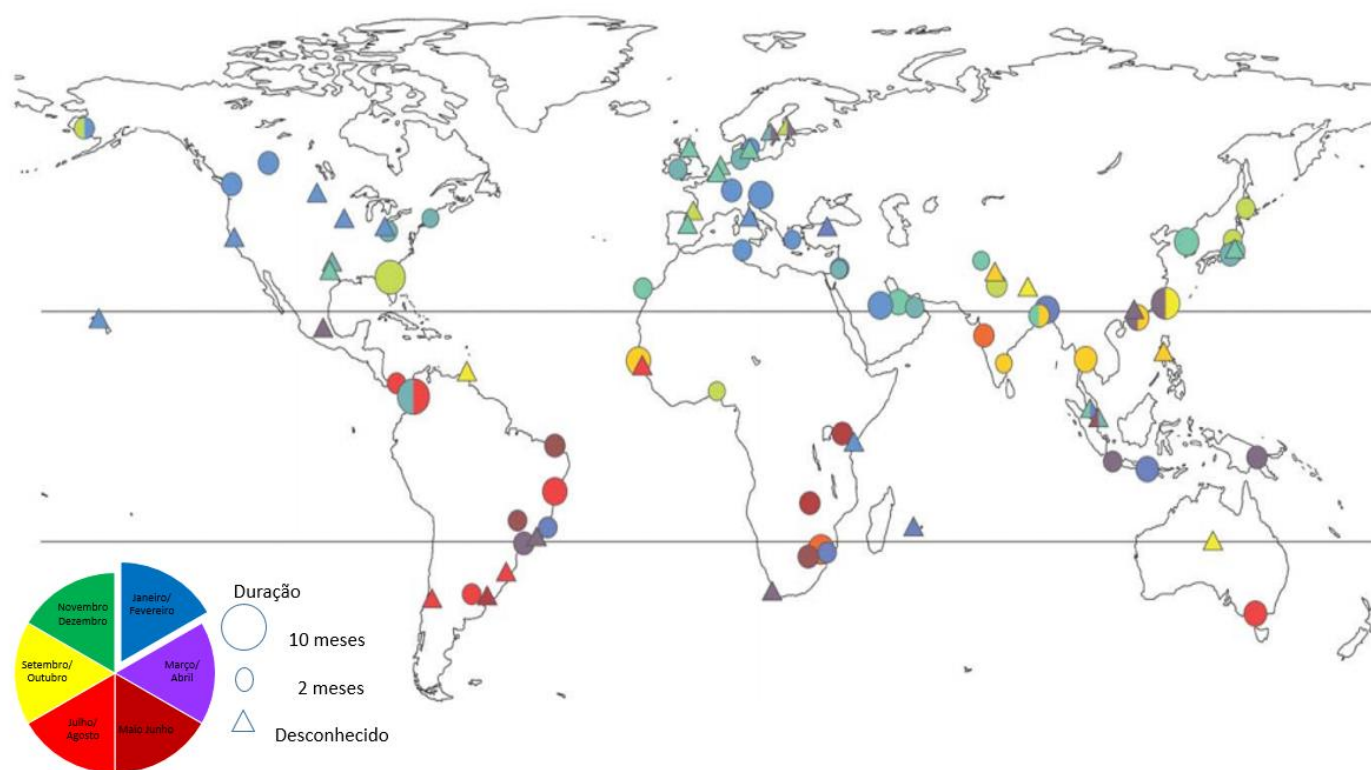
As infecções do trato respiratório inferior, incluindo o hRSV, resultam no agravamento dos sintomas pulmonares, incluindo tosse, taquipneia, dificuldade ao respirar e um chiado audível. No entanto, são bronquiolite e pneumonia que resultam nas doenças pulmonares mais grave e potencialmente fatais. A bronquiolite causa a obstrução dos lúmens de diâmetro estreito das vias aéreas brônquicas, reduzindo o fluxo de ar normal através dos bronquíolos (PICKLES et al., 2015; MEISSNER, 2016; WOLKOFF, 2018).

A obstrução das vias aéreas causa redução da capacidade de expiração, que leva ao aprisionamento de gás carbônico, hiperexpansão pulmonar, aumento das taxas respiratórias e declínio rápido da função pulmonar. Já a pneumonia, infecção do epitélio alveolar, resulta em lesão e edema, que impedem que as trocas gasosas ocorram de forma eficiente, resultando em doença pulmonar grave, incluindo hipóxia, insuficiência respiratória e morte (PICKLES et al., 2015; WOLKOFF, 2018).

A patologia pulmonar observada durante a infecção deve-se, em parte, a uma resposta imunológica exacerbada do hospedeiro, caracterizada por infiltração de células do sistema imune nos pulmões e alta carga viral, que resultam nos quadros mais graves de infecção por hRSV, bronquiolite e pneumonia. A importância relativa da inflamação e carga viral para a patogênese dessas doenças varia de acordo com o indivíduo, mas ambas são igualmente importantes para o estabelecimento do quadro clínico (GRIFFITHS et al., 2016; OPENSHAW et al., 2017).

A maioria das infecções por hRSV ocorrem em períodos específicos do ano em todo o mundo, o que o caracteriza como sazonal, como demonstrado na Figura 1. No Hemisfério Norte, as infecções por hRSV tendem a coincidir com as estações em que há maior circulação do vírus da *influenza*, entre os meses de outubro e maio. Na América do Norte, as infecções por hRSV geralmente aparecem em outubro ou novembro, com um pico entre janeiro e fevereiro e término da primavera (BLOOM-FESHBACH et al., 2013; PAYNTER, 2015; GRIFFITHS et al., 2016).

**Figura 1** Mapa global do tempo de pico de infecção por RSV e duração da epidemia (n = 96 locais). As cores ilustram o tempo da atividade de pico de RSV, com base na legenda inferior esquerda, enquanto o tamanho dos círculos é proporcional à duração da epidemia. Observações independentes para o mesmo local foram calculadas uma média. Para estudos que não forneceram informações suficientes para estimar a duração, um triângulo é mostrado. Círculos preenchidos com mais de uma cor representam locais que experimentam picos semestrais de atividade de vírus.



Fonte: Adaptado de BLOOM-FESHBACH et al, 2013.

Em climas tropicais o período de infecção por hRSV tende a alongar-se, com relatos dos primeiros casos no meio do verão, não sendo bem definido (GRIFFITHS et al., 2016). No sudeste do Brasil, no período de 2011 a 2013, a maioria dos casos de infecção por hRSV ocorreram de abril a julho, com pico em maio (28% dos casos), período de temperaturas mais baixas na região (MOREIRA et al, 2017). Em outro estudo, também no Sudeste, a infecção por hRSV foi identificada em 10 dos 12 meses do período do estudo, mas a maioria (88,5%) dos casos ocorreu no final do verão (CHECON et al., 2002, BLOOM-FESHBACH et al., 2013).

No interior de São Paulo, as precipitações são identificadas como um fator característico importante para as infecções respiratórias (PICA, 2014). A umidade relativa do ar, também interfere nos períodos de maior incidência de infecção respiratória. Um trabalho realizado entre 2004 e 2005 em São José do Rio Preto mostrou que quanto maior a umidade relativa do ar, menor é a taxa de detecção de infecção por vírus respiratório como o hRSV, de modo inverso, quanto menor a umidade relativa do ar, maior é a taxa de detecção do mesmo (GARDINASSI et al., 2012).

Assim, a temperatura e a umidade exibem papéis importantes nos períodos de maior incidência de infecção por hRSV. Dentre os fatores influenciados por estes dois parâmetros, o ar frio predominante nos períodos de inverno diminui a temperatura do epitélio respiratório nasal e isso promove a diminuição da depuração mucociliar, pela redução da frequência de batimento ciliar e diminuição da taxa de secreção de muco. Da mesma forma, a baixa umidade prejudica a máxima velocidade do transporte mucociliar. A diminuição do muco e batimento ciliar facilita a aderência do vírus às células do epitélio respiratório do hospedeiro aumentando as chances de infecção (PITTET et al., 2010; WOLKOFF, 2018).

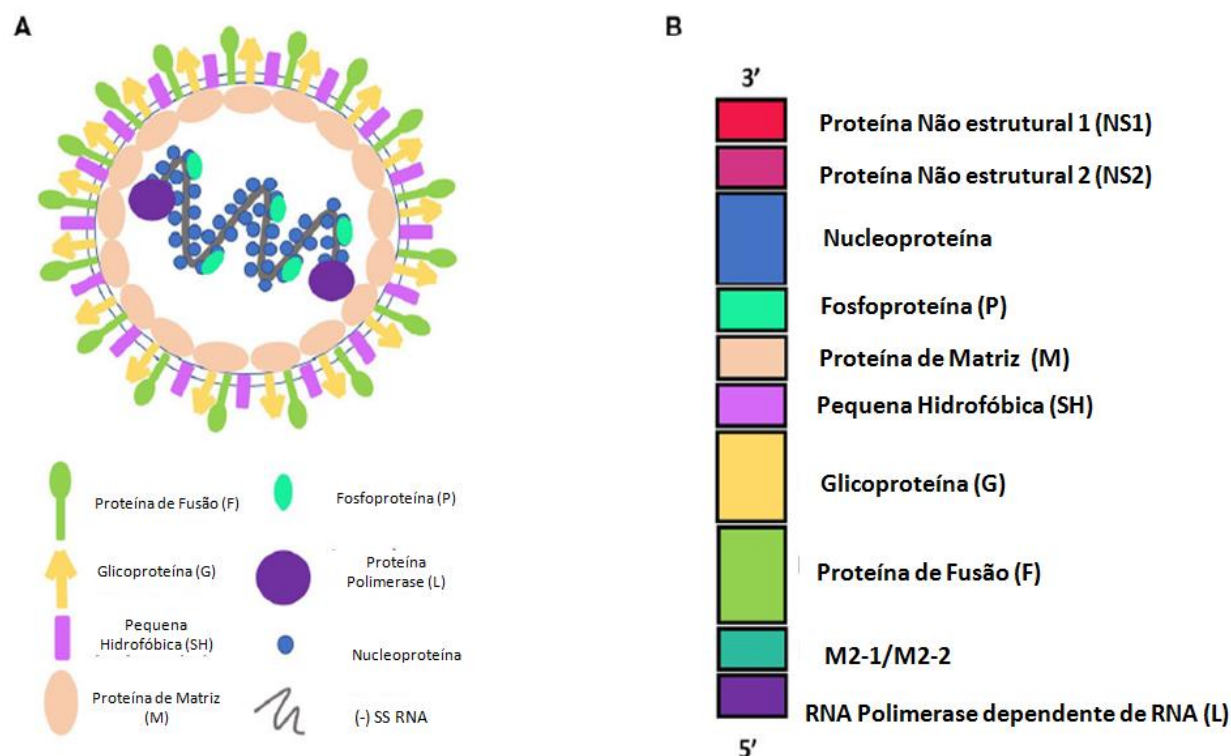
Além disso, outros mecanismos distintos podem estar associados à sazonalidade incluindo mudanças sazonais no comportamento social do hospedeiro, que pode aumentar o coeficiente de transmissão para muitas doenças contagiosas pelo aumento das taxas de contato, além de pulsos anuais

de nascimentos e mortes de indivíduos infectados e mudanças nas defesas imunológicas do hospedeiro (ALTIZER et al., 2006).

O hRSV é membro da família Pneumoviridae pertencente ao gênero *Orthopneumovirus*, sendo um vírus de RNA não segmentado de cadeia negativa (ICTV, 2015). Estruturalmente, o hRSV é um vírus helicoidal, envelopado, com um diâmetro de aproximadamente 150 nm. O genoma viral apresenta 15.222 nucleotídeos, contendo 10 genes responsáveis pela transcrição de 11 proteínas, como representado na Figura 2.a. Suas proteínas são: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, L, M2-1 e M2-2 ilustradas na Figura 2.b. Destas proteínas, cinco compõe o nucleocapsídeo (M, N, P, L, M2), três são proteínas de envelope transmembrânicas (F, G, SH), e duas (NS1 e NS2) são proteínas não estruturais (FREITAS et al., 2015; TAPIA et al., 2014).

O vírus apresenta dois tipos sorológicos: hRSV-A e hRSV-B (SANDE et al, 2013), ambos são variações nos padrões de ligação de anticorpos monoclonais na proteína G, sendo o hRSV-A o tipo sorológico de maior gravidade (TAPIA et al., 2014; FREITAS et al., 2015).

**Figura 2.** Representação da estrutura do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) e das suas proteínas. **A.** O hRSV possui proteínas estruturais e não estruturais. Dentre as proteínas estruturais, três compõem o envelope viral, a proteína de fusão F (verde), a glicoproteína G (amarelo) e a proteína hidrofóbica pequena SH (púrpura); quatro compõem o nucleocapsídeo, a proteína de matriz M (bege), a nucleoproteína N (azul), a fosfoproteína P (verde claro), a RNA polimerase dependente de RNA L (roxo). **B** Genoma do hRSV composto por 10 genes, sentido 3'-5', que codificam 11 proteínas. A cor representativa para cada gene corresponde à proteína que é produzida a partir do mesmo.

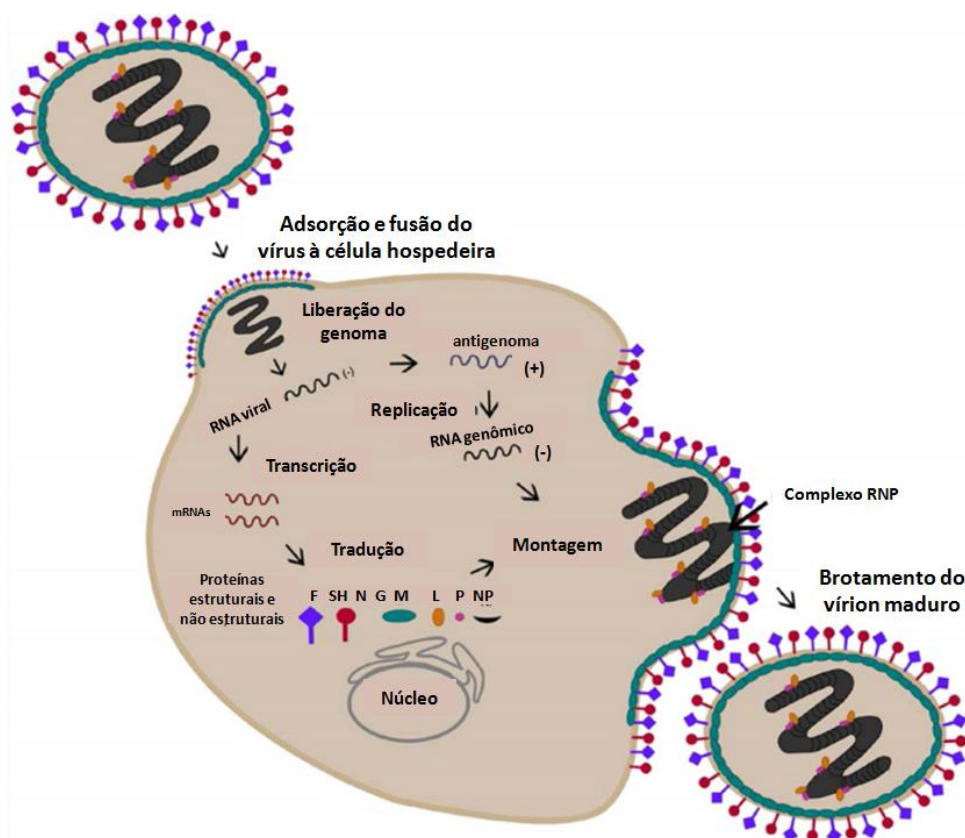


Fonte: Adaptado de CANEDO-MARROQUÍN et al, 2017.

## **2.1. Replicação viral e função das proteínas do hRSV no processo de infecção**

A replicação do hRSV, representada na Figura 3, inicia-se com a infecção das células do epitélio respiratório das vias aéreas superiores. A ligação do vírus com a célula hospedeira é mediada pela proteína G que interage com receptores celulares, seguida da ação da proteína F que desencadeia a fusão do envelope viral à membrana celular (CANE, 2001). Um dos receptores presentes na célula hospedeira é o receptor para quimiocina CX3C1 (CX3CR1). A ligação da proteína G do hRSV ao receptor CX3CR1 possibilita a ligação de partículas virais à superfície celular e desencadeiam também uma sinalização celular por mediar a quimiotaxia de leucócitos para a célula que está sendo atacada (GRIFFITHS et al., 2016; MARCHANT et al., 2010).

**Figura 3** Replicação do hRSV (Pneumoviridae). A replicação se inicia pela adsorção e fusão do vírus à célula hospedeira por meio da interação das proteínas G e F do vírus com receptores da célula hospedeira que resultam na fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática promovendo a internalização do material genético viral. O genoma viral internalizado é, em seguida, transcrito e traduzido. Tanto a replicação como a transcrição são dependentes da RNA polimerase dependente de RNA, que sintetiza antígeno de sentido positivo que servirá como molde para síntese de antígeno de sentido negativo e também será traduzido em proteínas virais. Após a síntese das proteínas e da replicação do genoma viral, a estrutura do vírion se reorganiza e sai da célula por brotamento dando origem ao vírion maduro.



Fonte: Adaptado de SHAHRIAR *et al*, 2016.

As glicoproteínas F, proteínas que promovem a fusão do vírus à célula hospedeira, ligam-se aos receptores *Toll-like 4* (TLR4), que são expressos nas células epiteliais bronquiais ciliadas das vias aéreas, que por sua vez, ativam cinases, que facilitam a entrada de partículas de hRSV nas células hospedeiras alvo, promovendo o aumento da endocitose (MARCHANT et al., 2010; GRIFFITHS et al., 2016).

Após a internalização do material genético viral no citoplasma da célula, inicia-se a transcrição sequencial do genoma viral, pela maquinaria da célula hospedeira, gerando um conjunto de mRNA, que posteriormente serão traduzidos e terão como produto as proteínas, que constituem o vírus e que são necessárias para formar o complexo transcricional (CERVANTES-ORTIZ et al., 2016).

As proteínas N, P e L são suficientes e necessárias para a replicação do RNA e transcrição. A nucleoproteína (N) é uma proteína que se encontra intimamente relacionada com o RNA viral e consiste no principal componente do nucleocapsídeo. A proteína L, RNA polimerase dependente de RNA, é o principal componente do complexo polimerase, e está associada ao nucleocapsídeo. A fosfoproteína (P) corresponde a um cofator essencial para a RNA polimerase, apresentando uma estrutura tetramérica sendo sua fosforilação essencial para exercer sua função (PRETEL, 2014).

A proteína M2-1 promove a transcrição, sendo um fator anti-terminador e um fator de processabilidade, constituindo o complexo polimerase. A proteína M2-2 participa da regulação da síntese de RNA, alternando entre a transcrição e a replicação do hRSV (PRETEL et al., 2013).

A RNA polimerase dependente de RNA (L) desempenha um papel duplo, capaz de transcrever RNA mensageiro e sintetizar antígeno de sentido positivo de comprimento total. Quando a região do *trailer* é replicada no RNA de sentido positivo, o complemento do *trailer* é um poderoso promotor, semelhante à região líder, que impulsiona a replicação de antígenomas de volta para genomas de sentido negativo (GRIFFITHS et al., 2016; CANEDO-MARROQUÍN et al., 2017).

As proteínas de matriz M são importantes para a morfogênese viral e coordena a montagem dos componentes que constituem o vírion. Ainda dentro

da célula, os componentes virais organizam-se de modo a originar os vírions e as proteínas de superfície são endereçadas para a membrana citoplasmática do hospedeiro, geralmente em regiões de “jangadas lipídicas” (CANE, 2001). As ribonucleoproteínas (RNPs) se associam às proteínas M e utilizam microfilamentos como meio de transporte para alcançar os locais de montagem. Estes, além de se associarem aos filamentos de actina, se associam às glicoproteínas do envelope viral, para completar a montagem e iniciar o brotamento (SHAHRIAR et al., 2016).

A proteína SH do RSV atua como viroporina na membrana plasmática e no aparelho de Golgi, onde se acumula em estruturas de jangada lipídica e forma canais iônicos seletivos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Ela tem sido descrita como uma proteína que atua como um canal de íon, que medeia a permeabilidade da membrana, atuando também na inibição de apoptose pela via do fator de necrose tumoral ( $\text{TNF-}\alpha$ ) (TAPIA et al, 2014; CERVANTES-ORTIZ et al., 2016).

## **2.2. Resposta imunológica e o papel da proteína NS1 na infecção viral**

Como descrito anteriormente, a proteína F do hRSV interage com receptores *Toll-like 4* (TLR-4). Esses receptores são receptores de reconhecimento padrão (RRP), induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias e ativam o fator de transcrição  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . O recrutamento de células do sistema imunológico inato contribui para uma complexa rede de sinais pró e anti-inflamatórias, que ajudam a eliminar a infecção e estabelecer o ambiente para a imunidade adaptativa subsequente (CANEDO-MARROQUÍN et al, 2017).

Outros RRP também são desencadeados durante a infecção pelo hRSV, dentre eles os receptores induzidos por ácido retinóico do tipo 1 (*retinoic acid-inducible gene 1* - RIG-I) citosólico, que induz, através da proteína de sinalização antiviral mitocondrial (*Mitochondrial antiviral-signaling protein* – MAVS), uma proteína adaptadora, a produção de interferon do tipo I (IFN-I) e outras moléculas antivirais, que são consideradas essenciais para ativar o sistema imune adaptativo. As citocinas IFN-I induzem um estado antiviral nas células vizinhas através da indução de numerosos genes estimulados por interferon (*Interferon-stimulated gene* - ISGs) (OPENSHAW et al, 2017).

Os receptores de IFN tipo I consiste em duas subunidades, IFNAR1 e IFNAR2, que estão associadas às Janus quinase (JAK1) e tirosina quinase (TYK2), que resultam na fosforilação da tirosina do transdutor de sinal e ativador da transcrição 2 (STAT2) e STAT1 que, quando ativados, associam-se ao fator regulador de interferon 9 (IRF-9), para formar o complexo ativador transcricional fator 3 (ISGF-3). Esses complexos translocam-se para o núcleo e ativam a transcrição dos ISG. A indução de alguns dos numerosos ISGs amplifica a resposta inflamatória após a infecção pelo hRSV por ativar células dendríticas (DCs), células *natural killer* (NK) e células T (ELLIOTT et al., 2007).

A ativação de respostas adaptativas de células B e T são conduzidas por células dendríticas (DCs) que são ativadas ao detectar a infecção viral através dos RRP. Estas células deslocam-se para os linfonodos, apresentam os antígenos virais e fornecem sinais adicionais para ativar as células T CD4 e CD8 (STOLEY, et al., 2016).

As células T CD4 ativadas podem, por sua vez, ativar células B específicas do vírus, resultando na produção de anticorpos. As células T CD8 + reconhecem e destroem as células epiteliais infectadas pelo vírus. À medida que a infecção é controlada, a população de células do sistema imunológico regride para formar um *pool* de células de memória locais e circulantes, que podem responder mais rapidamente à infecção (GRIFFITHS et al., 2016; STOLEY, et al., 2016).

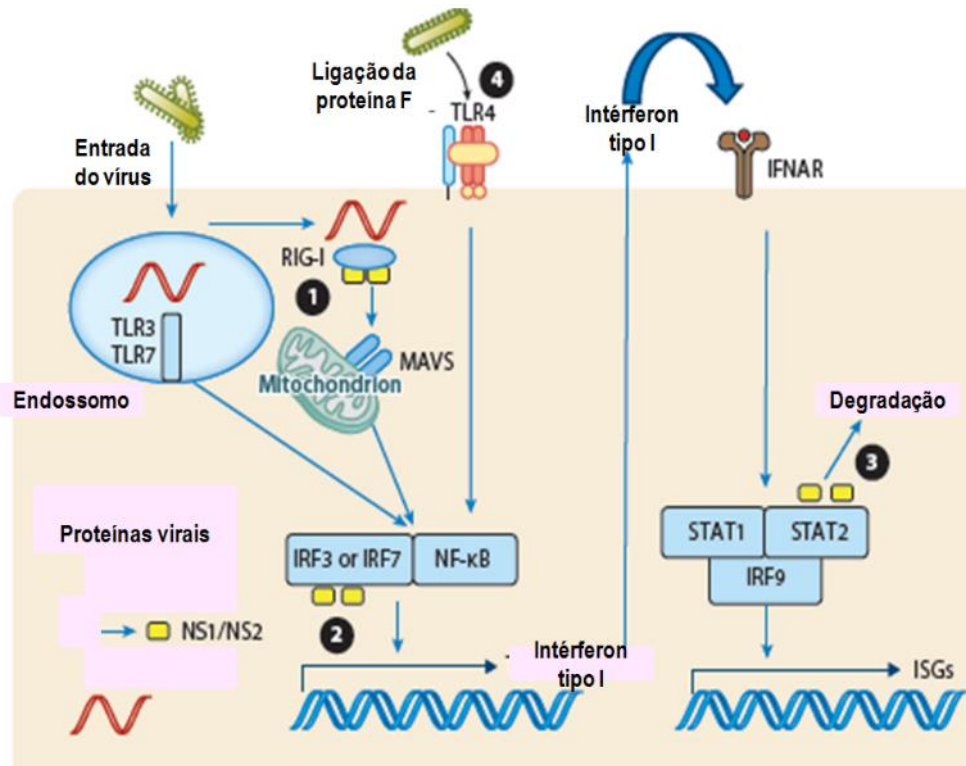
As células T são essenciais para combater a infecção aguda e para adquirir memória imunológica específica do vírus, células T de memória residente (Trm). Na maioria dos modelos animais, o RSV induz uma resposta imune adaptativa antiviral típica, com resolução da infecção primária, resultando em altos títulos de anticorpos específicos para vírus e um grande número de células T específicas para antígeno. Isso limita a virulência durante a infecção secundária (GRIFFITHS et al., 2016; STOLEY, et al, 2016; OPENSHAW et al., 2017).

Dentre as proteínas virais que atuam na evasão do sistema imunológico, encontram-se as proteínas não estruturais (NS) 1 e 2 imunomoduladoras que são expressas apenas em células infectadas, não sendo empacotados em vírions maduros (YANG et al, 2015). Essas proteínas são as principais antagonistas virais do IFN. Elas atuam em suas vias e, juntas, desempenham um papel chave na resposta imunológica inata e adaptativa, suprimem a

maturação de células dendríticas e a resposta de linfócitos T (PRETEL et al, 2013; MUNIR et al, 2011).

A proteína NS1 inibe a ligação de RIG-I à proteína mitocondrial de sinalização antiviral (MAVS), impedindo a interação MAVS-RIG-I, mostrado na figura 4, necessárias para a produção de IFN, suprimem a proliferação e ativação de populações de células T efectoras, que conferem proteção (células T e células CD8+ e Th17), e promove a proliferação e ativação de células Th2 que favorecem a doença devido ao aumento da inflamação durante a produção de anticorpos contra o hRSV (YANG et al, 2015). A NS1 interfere na ligação do promotor de IFN- $\beta$  aos IRF3, ativadores de transcrição do sistema IFN-I. Portanto, acredita-se que essas interações reduzem a ligação entre o IRF-3 e o promotor do IFN- $\beta$ , diminuindo a ativação da cascata antiviral (CANEDO-MARROQUÍN et al, 2017). Recentemente, foi demonstrado que tanto as proteínas NS1 como NS2 induzem a degradação proteossômica do transdutor de sinal e do ativador da transcrição 2 (STAT2), figura 4 (GARCÍA-SASTRE et al., 2006). Como resultado, a resposta antiviral do hospedeiro mediada pela via do IFN do tipo I é amplamente prejudicada. Diante do importante papel da proteína NS1 na evasão do sistema imune do hospedeiro, essa proteína se torna um importante alvo na busca de moléculas que possam atuar como potenciais fármacos que auxiliem no tratamento de infecções por hRSV.

**Figura 4** Atuação das proteínas virais na modulação da resposta imunológica do hospedeiro. **1.** NS1 inibe a ligação de RIG-I à proteína mitocondrial de sinalização antiviral (MAVS) impedindo a interação MAVS-RIG-I necessárias para a produção de IFN; **2.** NS1 pode ligar-se diretamente ao IRF-3, ativador de transcrição do sistema IFN tipo I; **3.** As proteínas NS1 e NS2 induzem a degradação proteossômica da STAT2 que, quando ativados, associam-se ao fator 9 regulador de interferon (IRF-9) para formar o complexo ativador transcricional fator 3 (ISGF-3). Esse complexo é translocado para o núcleo e ativa a transcrição dos ISG. **4.** Interação da proteína F do hRSV com receptores *Toll-like* 4 (TLR-4) importantes na ativação da resposta imune inata.



Fonte: Adaptado de OPENSHAW *et al*, 2017

### 2.3. Tratamento e busca de alvo para bloqueio da replicação viral

Estratégias atuais de prevenção às infecções virais são usadas principalmente em uma pequena porcentagem de bebês de alto risco. Estes bebês dependem de anticorpos monoclonais (Palivizumab, MedImmune), que são apenas parcialmente eficazes (BOIVIN *et al.*, 2008). Nenhuma vacina contra o hRSV está disponível, apesar de haver algumas em desenvolvimento (HIGGINS *et al.*, 2016). A pouca compreensão dos mecanismos que limitam a indução de imunidade duradoura afeta o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra infecção por hRSV (HIGGINS *et al.*, 2016). A resposta imune inata

desempenha um papel crítico na condução do desenvolvimento da imunidade adaptativa e é, portanto, um determinante crucial do resultado da infecção (SUN et al., 2017). A única terapia antiviral aprovada para hRSV (ribavirina) é raramente usada na população pediátrica europeia ou norte-americana devido ao seu potencial teratogênico e sua eficácia limitada além dos seus efeitos colaterais observados apresentam custo extremamente elevado da droga (DE VINCENZO et al., 2008).

Diante da ausência de vacina até o momento, do alto custo dos tratamentos oferecidos, pelos efeitos colaterais e pelo impacto das infecções por hRSV que resultam em milhões de internações hospitalares e até óbito de crianças com menos de cinco anos de idade em todo mundo, é imprescindível a busca por tratamentos alternativos que sejam mais efetivos contra esse vírus, que possuam baixo custo e menos efeito colateral (GRIFFITHS et al., 2017; PANGESTI et al., 2018).

Investigar a ação de moléculas provenientes de produtos naturais tais como os flavonóides, moléculas presentes na dieta diária humana, que são extraídos de vegetais, legumes e frutas com potencial farmacológico. Na literatura existem relatos de estudos utilizando flavonóides como sendo uma molécula com ação anti-inflamatória, antibacteriana, antitumoral, que atua no bloqueio de radicais livres e antiviral (BARBARIĆ et al, 2011; MANI et al., 2018).

#### **2.4. Crisina: Potencial Terapêutico e Antiviral**

Os flavonóides são polifenóis de ocorrência natural com padrões de hidroxilação e substituições, que dão origem a várias subclasses, incluindo flavanonas, antocianidinas, flavonóis, flavonas, catequinas (ou flavanóis), isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas. A Crisina (5,7-dihidroxiavona) é um fitoquímico alimentar, pertencente à classe das flavonas encontradas em muitos extratos vegetais, incluindo a flor azul paixão (*Passiflora caerulea*), além do mel e da própolis (BARBARIĆ et al, 2011; MANI et al., 2018).

Este flavonóide exerce uma vasta variedade de atividades farmacológicas, apresenta propriedades anticarcinogênicas, pró-apoptóticas, antiangiogênicas, antimetastáticas, imunomoduladoras e antioxidantes. Outra atividade

demonstrada pela crisina em estudos recentes consiste na proteção dos neurônios contra estresse oxidativo e apoptose, sugerindo ainda que a crisina melhorasse déficits cognitivos e danos cerebrais induzidos por hipoperfusão cerebral crônica em ratos (SURESH BABU et al, 2006; TSUJI et al., 2006; PUSHPAVALLI et al, 2010; CANDIRACCI et al, 2011; BAE et al., 2011; AHAD et al., 2014; SOUZA et al, 2015; SATHISHKUMAR et al., 2015; NABAVI et al, 2015; RAMÍREZ-ESPINOSA et al., 2017;).

A crisina também tem o potencial para aplicações clínicas e terapêuticas contra os efeitos fisiológicas e bioquímicos de envelhecimento (SOUZA et al, 2015). Pode atuar também na inibição da síntese de prostaglandina, sendo um potente inibidor da expressão e transcrição da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) relacionada à inflamação (CHO et al, 2004).

A crisina também tem demonstrado atividade antiviral em estudos *in vitro* para HSV-I, enterovirus e Influenza vírus. Contra HSV-I (*Herpes simplex vírus type 1*) a crisina reduziu a formação de placa livre em 56,4% das células tratadas quando comparadas com as células controle (SCHNITZLER et al., 2010). Contra influenza virus, em estudos *in vitro* e *docking* molecular mostraram que a crisina apresenta efeito inibitório moderado (HOUR et al, 2013).

Ambos os vírus hRSV e influenza são vírus que infectam o epitélio respiratório, apresentam genoma de RNA de senso negativo e proteínas não estruturais como a NS1 que também atuam na inibição da via do interferon (FERNANDEZ-SESMA et al, 2006; GARCIA-SASTRE et al, 2006). Tais achados, sustenta a investigação da crisina como um potencial antiviral para o hRSV.

#### **2.4.1. Estrutura química da crisina e derivado monoacetilado de crisina**

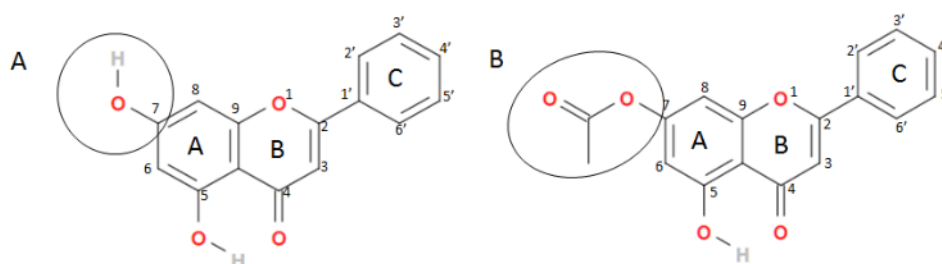
A crisina tem uma estrutura química comum, consistindo de dois anéis fundidos, A e C, e um anel heterocíclico B, ligado à segunda posição do anel C (MANI et al., 2018). Ele compartilha a estrutura flavona comum, com um grupo hidroxila adicionais nas posições 5ª e 7ª do anel A representado na Figura 5 A. Tais hidroxilas são denominadas hidroxilas fenólicas. O derivado monoacetilado de crisina apresenta uma substituição da hidroxila da posição 7 do anel A por um éster, demonstrado na Figura 5 B.

Quando a molécula é ingerida, hidroxilas fenólicas, como o presente na estrutura da crisina, sofrem rápida inativação por conjugação química, metabolismo de primeira passagem, que pode diminuir a biodisponibilidade do fármaco antes que este atinja a circulação sistêmica e atue no seu alvo. Para impedir esta inativação e melhorar a biodisponibilidade oral, a estratégia habitual é mascarar o grupo metabolizável, isto é, converter a hidroxila fenólica à um grupo éster (PEREIRA, 2007). No caso da derivado monoacetilado de crisina, apenas uma hidroxila presente no anel A, foi substituída por um grupo éster, e sugere-se que essa substituição foi idealizada a fim de reduzir a metabolização de primeira passagem e aumentar a biodisponibilidade (PEREIRA, 2007).

Entretanto, a presença das hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel A também têm mostrado ser importantes para a inibição do vírus influenza A (H5N1), o que ressalta a importância dessas hidroxilas para a estrutura e atividade (SITHISARN et al., 2013). Outro exemplo, são os efeitos da hidroxilação de flavonóides nas na inibição de xantina oxidase, enzima que catalisa a oxidação da hipoxantina e xantina na produção de ácido úrico, que desempenha um papel crucial na gota, mostrou que o efeito inibitório da xantina oxidase foi maior nos experimentos com crisina, com hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel A, do que com 7-hidroxiavona, uma molécula que deixou de possuir uma hidroxila em relação à crisina, ressaltando a importância da presença das duas hidroxilas na estrutura e atividade dessa molécula (COS et al., 1998).

Diante disso, é preciso investigar se a substituição da hidroxila da posição 7 do anel A por um éster resultará, além do aumento da hidrofobicidade da molécula e provavelmente, sua biodisponibilidade quando ingerida, em mudanças na interação do ligante com seu alvo molecular, favorecendo ou não a interação e podendo afetar sua atividade farmacológica (WANG et al., 2018).

**Figura 5** Esquema da estrutura molecular da crisina (5,7-di-OH-flavona) e derivado monoacetilado de crisina evidenciando o local onde foi realizada a modificação



Fonte: Modificado de PubChem

### 3. OBJETIVOS

#### 3.3. Objetivos Gerais

O objetivo desse trabalho foi estudar a interação entre os flavonoides crisina e derivado monoacetilado de crisina e a proteína NS1 do hRSV, por espectroscopia de fluorescência e *docking* molecular.

#### 3.4. Objetivos Específicos

- Expressar e purificar a proteína NS1 em bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*);
- Investigar a interação proteína/ligante por métodos espectroscópicos (Fluorescência);
- Encontrar a constante de associação proteína/ligante e a estequiometria da interação o numero de sítios de interação;
- Descrever os parâmetros termodinâmicos das interações;
- Representar por *docking* molecular a interação das moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina à proteína NS1.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS



#### **4.2. Parâmetros físico-químicos da proteína NS1 fornecidos pelo programa ProtParam**

Os parâmetros físico-químicos da proteína NS1 foram obtidos a partir da análise da sequência de resíduos de aminoácidos pela ferramenta *ProtParam* (GASTEIGER et al., 2005). A NS1 possui 139 resíduos de aminoácidos apresentando massa molecular de 14 kDa (YANG et al., 2015). Entretanto, a proteína NS1-His, com adição da cauda de histidina, possui 145 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 16 kDa, ponto isoelétrico (pI) teórico de 6,33 e coeficiente de extinção molar de  $10.220 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  em 280 nm. O coeficiente de extinção molar foi utilizado para determinar a concentração das amostras de proteína, realizando medidas de absorção óptica na região de UV próximo.

#### **4.3. Transformação e expressão da proteína NS1 em *Rosetta-Gami 2* (DE3)**

O plasmídeo pJexpress401-NS1 foi incorporado a célula competente de *Escherichia coli* da linhagem *Rosetta-gami 2* (DE3), pelo processo de transformação por choque térmico, que consiste em incubar 30 minutos no gelo, 45 segundos a 42 °C e mais 2 minutos no gelo. Posteriormente meio LB foi adicionado a mistura e incubou-se em *shaker* a 37 °C, 100 rpm por 1 hora. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 1 minuto a 5000 rpm e ressuspendida em 20 µL de meio LB para então ser plaqueada pela técnica de esgotamento em meio sólido, contendo 50 µg/mL de canamicina, 34 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL de estreptomicina para então ser incubada por 16 horas a 37 °C.

Três colônias recém transformadas de *Escherichia coli* da linhagem *Rosetta-gami 2* (DE3), contendo o plasmídeo pJexpress401-NS1 foram cultivadas em meio LB, contendo os antibióticos descritos acima a 37 °C, 120 rpm, afim de realizar um teste de expressão. Após atingir a densidade óptica (D.O.) de 0,6 a 600 nm, a expressão da proteína NS1 foi induzida pela adição de 0,3 mM de

*isopropil - D-tiogalactopiranosido* (IPTG) a 37 ° C, por 17 horas, com coleta de alíquotas para verificar o melhor tempo de expressão foram elecionados os tempos de 3h, 4h e 17h após indução.

O Resultado do teste de expressão foi analisado por gel de poliacrilamida SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) com gel de separação a 15% e o de empilhamento a 4%.

Após selecionada a colônia com melhor expressão e tempo após indução, o pré-inóculo contendo as bactérias selecionadas, foram cultivadas em 2 litros de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina, 34 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL de estreptomicina até atingir a D.O. de 0,6 para então ser induzida com 0,3 mM de IPTG, a 37 °C, por 4 horas, a 150 rpm. As mesmas foram colhidas por centrifugação de 4000 xg durante 50 minutos a 4 °C e ressuspensas em 40 mL de tampão de lise [50 mM Tris-HCl pH 8,0; NaCl 100 mM; 1 mM de p-mercaptoetanol; cocktail de inibidores de protease 1x (Sigma Aldrich)]. A lise das células foi completada por sonicação com 6 ciclos de 2 segundos ligado e 1 segundo desligado, 32 W com intervalo de 40 segundos para cada ciclo. O lisado foi centrifugado a 28.000 xg durante 40 min a 4 °C e filtrado em corte de 0,45 µm para então seguir para a etapa seguinte, que é a purificação.

#### **4.4. Purificação Proteína NS1 por Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados e Cromatografia de Exclusão Molecular**

A partir dos extratos bacterianos, a proteína NS1 foi purificada por dois métodos cromatográficos. O primeiro método consistiu na purificação por cromatografia de afinidade com íon cobalto imobilizado na resina (coluna HiTrap™ 5mL, GE Healthcare) no Purificador AKTA (GE). A resina foi previamente equilibrada com tampão purificação (50 mM de Tris-HCl; 100 mM de NaCl 1 mM β-Mercaptoetanol e 5 mM de Imidazol, pH 8,0). A NS1 foi injetada a um fluxo de 0,5 mL por minuto e eluída por passos de imidazol de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 200 e 500 mM, a um fluxo de 2 mL por minuto. As frações contendo a proteína foram então concentradas e submetidas ao segundo método cromatográfico de purificação, a cromatografia de exclusão molecular.

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL, 10 × 300 mm (GE Healthcare) equilibrada com tampão PBS 1X (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2 mM de DTT com pH 7,4) no Purificador AKTA (GE).

A análise dos resultados de ambas as purificações foi observada por gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%.

A concentração da proteína obtida foi determinada espectrofotometricamente (Espectrofotômetro UV-visível, BioMATE 3S, Thermo Scientific, USA) no comprimento de onda de 280nm.

#### 4.5. Caracterização dos flavonoides Crisina e derivado monoacetilado de crisina

As moléculas Crisina e derivado monoacetilado de crisina, cedidas pelo Prof. Dr. Luis Octavio Regasini do Departamento de Química e Ciências Ambientais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, foram primeiramente caracterizadas. As massas moleculares da crisina e derivado monoacetilado de crisina são 254,23 g/mol e 296,27 g/mol, respectivamente.

As massas das moléculas foram aferidas e diluídas em DMSO para a determinação da concentração molar estoque obtida pela equação:

$$C = \frac{m}{MM \times V(L)} \quad (1)$$

sendo que  $C$  é a concentração do ligante,  $m$  é a massa de ligante obtida em balança analítica de alta precisão (0,1mg),  $MM$  é a massa molecular do ligante e  $V$  (0,002 L) é o volume, em que o ligante foi dissolvido. A concentração estoque da crisina e seu derivado foram determinadas em 8,65 mM e 3,71 mM, respectivamente.

Ambas as moléculas foram tituladas em DMSO e os espectros de absorção obtidos por meio do Espectrofotômetro UV-visível (BioMATE 3S, Thermo Scientific, USA) foram utilizadas para determinar o coeficiente de extinção molar em um comprimento de onda de 271 nm, para isso, utilizou-se a relação obtida na Lei de Beer-Lambert (GOBRECHT et al, 2015) onde:

$$Abs_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C \quad (2)$$

ou seja,

$$\varepsilon_{\lambda} = Abs_{\lambda} / (l \cdot C) \quad (3)$$

sendo que  $Abs$  representa a absorção em um determinado comprimento de onda em nm,  $\varepsilon_{\lambda}$  representa o coeficiente de extinção molar em  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ,  $l$  o caminho óptico da cubeta em cm e  $C$  a concentração molar da solução absorvente em mol/litro.

Para encontrar o coeficiente de extinção molar em qualquer comprimento de onda, calculou-se a concentração final de ligante na cubeta onde este foi titulado utilizando a relação

$$C (\text{solução}) = \frac{\Delta V \times C_0}{V_0 + \Delta V} \quad (4)$$

sendo que  $C$  (solução) é a concentração de ligante na solução,  $\Delta V$  é o incremento de volume,  $C_0$  a concentração estoque e  $V_0$  é o volume inicial.

Substituindo a concentração da solução na fórmula de Beer-Lambert tem-se:

$$Abs_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot \frac{\Delta V \times C_0}{V_0 + \Delta V} \quad (5)$$

Ao isolar o  $\varepsilon$  tem-se

$$\varepsilon_{\lambda} = Abs_{\lambda} \cdot l \cdot \frac{\Delta V \times C_0}{V_0 + \Delta V} \quad (6)$$

#### 4.6. Estrutura secundária por deconvolução espectral de CD

As medidas de CD foram realizadas em espectroolarímetro (Jasco-810) na temperatura de 25°C utilizando uma cubeta de 0,5 cm de caminho óptico para a amostra. O espectro da amostra de proteína foi obtido na faixa de comprimento de onda de 200 a 260 nm com 10 acumulações e abertura de fenda de 1,0 nm. A proteína NS1 estava em uma concentração de 26,8  $\mu\text{M}$ .

O princípio básico envolvido na análise dos espectros de CD de proteínas e utilizado na estimativa das frações de estrutura secundária é que o espectro de

CD da proteína ( $\theta_\lambda$ ) pode ser expresso como uma combinação linear de espectros de estrutura secundária individuais, então:

$$\theta_\lambda = \sum f_k \Theta_{k,\lambda} \quad (7)$$

sendo que  $f_k$  é a fração de estrutura secundária e  $\Theta_{k,\lambda}$  é o espectro padrão da estrutura secundária k (GREENFIELD et al., 2007).

As frações da estrutura secundária da proteína NS1 foram obtidas pelo método de CONTINLL, uma variação do método COLTIN, desenvolvido por Provencher e Glockner (1981). Por meio da análise das frações de estrutura secundária da proteína foi possível verificar a integridade da mesma.

#### 4.7. Espetroscopia de fluorescência: medidas e análises

As medidas de espectroscopia de fluorescência foram feitas no espectrofluorímetro ISS PC1 (Champaign, IL, USA) equipado com banho térmico Nestlab RTE-221 (ThermoElectron Corporation, USA), nas temperaturas de 192 (19) e 310 K (37 °C) utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm com excitação em 295 nm e emissão entre 305 e 500 nm utilizando fendas de 1 mm com largura de 8 nm para excitação e emissão para ambos os experimentos.

Durante a realização dos experimentos, a concentração da proteína foi de 2  $\mu$ M, com variação de 1% ao longo do experimento, em 2 mL de tampão PBS 1X, enquanto a concentração de ligante variou de 0 a 4  $\mu$ M em 20 titulações de 1  $\mu$ L partindo das concentrações estoque de crisina de 408  $\mu$ M e crisina modificada de 350  $\mu$ M. As análises dos dados de fluorescência foram realizadas utilizando a equação de Stern-Volmer e gráfico de Hill (LAKOWICZ, 1999).

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

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[L] = 1 + k_q\tau_0[L] \quad (8)$$

no qual  $F_0$  e  $F$  são respectivamente as intensidades de fluorescência antes e após a adição de ligante.  $K_{SV}$ ,  $K_q$ ,  $\tau_0$ , e  $[L]$  são: a constante de Stern–Volmer, a constante de supressão biomolecular, o tempo de vida média de emissão da fluorescência da biomolécula na ausência de ligante e a concentração de ligante (supressor), respectivamente. Neste modelo (Eq. 8) a concentração de supressor (ligante total) é admitida como sendo igual à concentração de supressor livre, pois esta não é conhecida no experimento.

Quando o gráfico de Stern-Volmer apresenta concavidade positiva indica que a fração  $F_0/F$  está relacionada com a concentração de ligante (ou supressor) pela seguinte relação (LAKOWICZ, 1999):

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[L])(1 + K_S[L]) \quad (9)$$

ou seja,

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[L] + K_D K_S [L]^2 \quad (10),$$

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

Independentemente do agente supressor, a verificação dos efeitos do filtro interno nas intensidades de fluorescência deve ser corrigida.

A intensidade de fluorescência foi corrigida utilizando a seguinte relação:

$$F_C = F \cdot 10^{((A_{ex} + A_{em})/2)} \quad (11)$$

sendo que  $F_C$  e  $F$  são a fluorescência corrigida e fluorescência experimental, respectivamente,  $A_{ex}$  é o valor da absorbância no comprimento de onda de excitação, e  $A_{em}$ , a absorbância no comprimento de onda de emissão da proteína (LARSSON et al., 2007). As absorbâncias, nos comprimentos de onda de

absorção e excitação são obtidos pela lei de Beer-Lambert (NELSON et al., 2005), onde:

$$A_{ex} = \varepsilon_{ex}.c.l \quad (12)$$

$$A_{em} = \varepsilon_{em}.c.l \quad (13)$$

no qual  $\varepsilon_{ex}$  e  $\varepsilon_{em}$  são os coeficientes de extinção molar do ligante no comprimento de onda de excitação e emissão da proteína, respectivamente,  $c$  é a concentração do ligante na solução após cada titulação e  $l$ , o caminho óptico da cubeta utilizada na medida.

Através do gráfico de Hill, representado por  $\log [(F_0-F)/F]$  versus  $\log[1/([L]-([P](F_0-F)/F_0))]$ , no qual observa-se uma dependência linear, pode-se obter os valores relativos ao número  $n$  de sítios de ligação da proteína e a constante de ligação  $K_b$  relativa à interação dos ligantes com as proteínas, sendo a inclinação igual ao valor de  $n$  e o valor de  $\log(K_b)$  obtido do valor da interseção da reta com o eixo  $y$  (CARUSO, 2016).

#### 4.8. Parâmetros Termodinâmicos

O cálculo da variação de entalpia ( $\Delta H$ ) foi obtido a partir do gráfico de Van't Hoff (JOHN et al., 2000) dado pela equação:

$$-R \ln K_b = \left( \frac{\Delta H}{T} \right) - \Delta S \quad (14)$$

no qual  $R$  é a constante universal dos gases ideais (1,92 cal/mol K),  $K_b$  é a constante de ligação obtido a partir do gráfico de duplo log e  $T$  é a temperatura em Kelvin.

No gráfico de van'tHoff, ( $\ln K_b$ ) versus ( $1/T$ ), a partir da inclinação da reta obteve-se a variação de entalpia ( $\Delta H$ ). A variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) foi calculada para cada temperatura a partir da seguinte equação:

$$\Delta G = -TR \ln K_b \quad (15)$$

A partir da variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) foi possível calcular a variação da entropia ( $\Delta S$ ) do sistema a partir da seguinte equação:

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (16)$$

#### 4.9. Docking molecular e mapa de interação

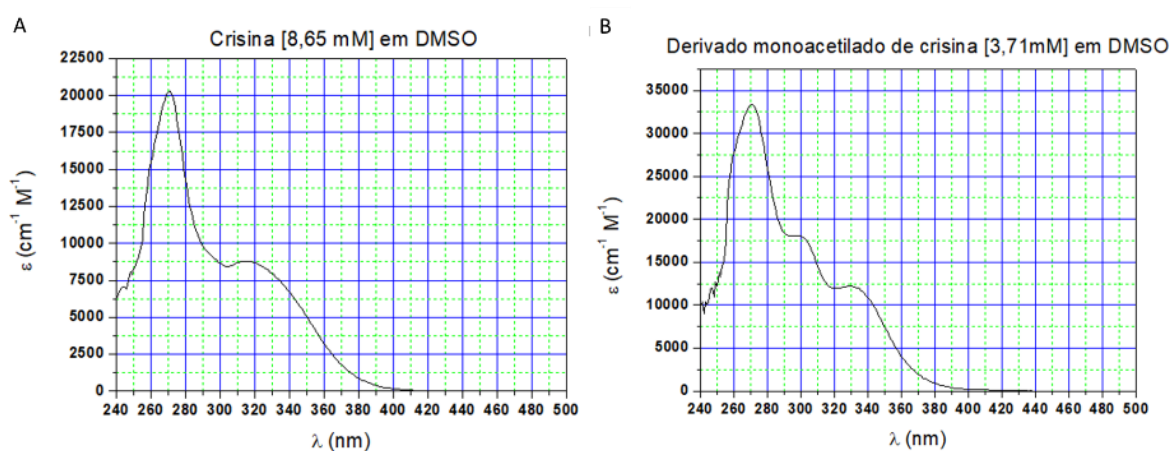
A estrutura da proteína NS1 de maior cluster após a dinâmica molecular foi utilizada para o docking molecular com os ligantes crisina (molid 269290) e derivado monoacetilado de crisina (molid 269851) do banco ATB (STROET et al., 2018). Utilizou-se a ferramenta AutoDockTools (ADT) (SANNER, 1999) para preparar a proteína NS1 e os ligantes e foi gerado mapa grid com espaçamento de 0,375 Å e dimensão de 126 x 126 x 126 pontos pelo programa AutoGrid 4.2.6 (MORRIS et al., 1998) centrado na proteína NS1. O programa AutoDock 4.2.6 (MORRIS et al., 1998) foi empregado para estudar o local de ligação entre a NS1 e os ligantes, aplicando o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) para minimização onde o número de avaliações de energia foi de 25 milhões, o tamanho da população foi de 250 e a tolerância do RMSD de 2 Å. Para a simulação de docking molecular, foram consideradas posições iniciais aleatórias em toda a superfície da proteína e orientações aleatórias para cada ligante gerando 100 conformações diferentes cada um. A representação estrutural foi preparada usando PyMOL (DELANO, 2002) e o mapa de interação foi calculado usando programa *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP). A dinâmica molecular e o docking molecular foram realizados pela Isabella Otenio Lourenço.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização dos ligantes crisina e derivado monoacetilado de crisina

A caracterização dos ligantes a partir da concentração resultou na obtenção dos coeficientes de extinção molar em qualquer comprimento de onda. Para determinar a concentração estoque dos ligantes usados nos experimentos, foram utilizados os coeficientes de extinção molar em 271 nm  $\epsilon = 20.208 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  para crisina e  $\epsilon = 33.310 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  para o derivado monoacetilado de crisina. A figura 7 A e B evidencia o gráfico com os coeficientes de extinção molar da crisina e derivado monoacetilado de crisina, respectivamente.

**Figura 7** Espectro de absorção da crisina e seu derivado com os pontos utilizados. Coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ) de 240 a 500 dos flavonoides **A.** crisina e **B.** Derivado monoacetilado de crisina em DMSO.



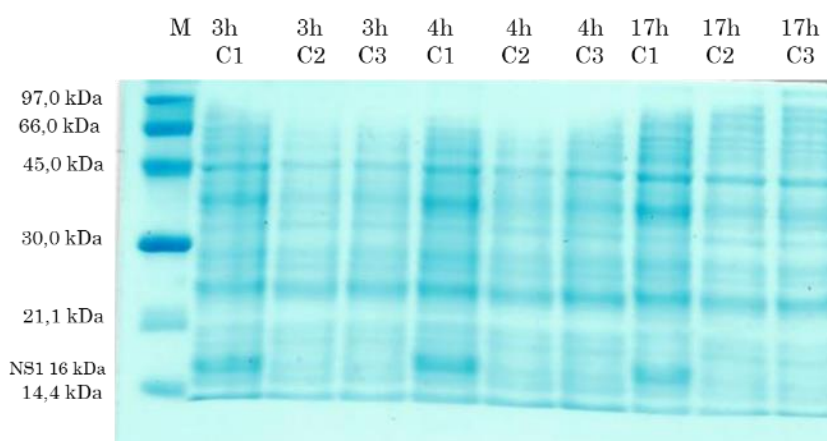
Fonte: Elaborado pelo autor

### 5.2. Teste de indução da proteína

No teste de indução verificou-se que dentre os clones 1, 2 e 3, o clone 1 expressou a proteína NS1 com mais eficiência. Em relação ao tempo de indução observou-se que dentre 3, 4 e 17 horas de após indução com 0,3 mM de IPTG.

O tempo que demonstrou ser o mais apropriado para a expressão da proteína deu-se após 4 horas de indução. Ambos os achados foram determinados com base na maior intensidade da banda observada no gel SDS-PAGE 15% como evidenciado na figura 8. A proteína NS1 está representada pela banda de aproximadamente 16 kDa.

**Figura 8** SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie brilliant blue* R-250 evidenciando o teste de expressão para averiguar o melhor tempo de indução da proteína NS1 em *Rosetta-gami 2* (DE3). M. Marcador de massa molecular. Foram selecionados os tempos de 3, 4 e 17 horas após indução em três clones diferentes (C1, C2 e C3). Determinou-se a melhor condição de expressão após 4 horas de indução do clone 1. A proteína NS1 apresenta aproximadamente 16 kDa.



Fonte: Elaborado pelo autor

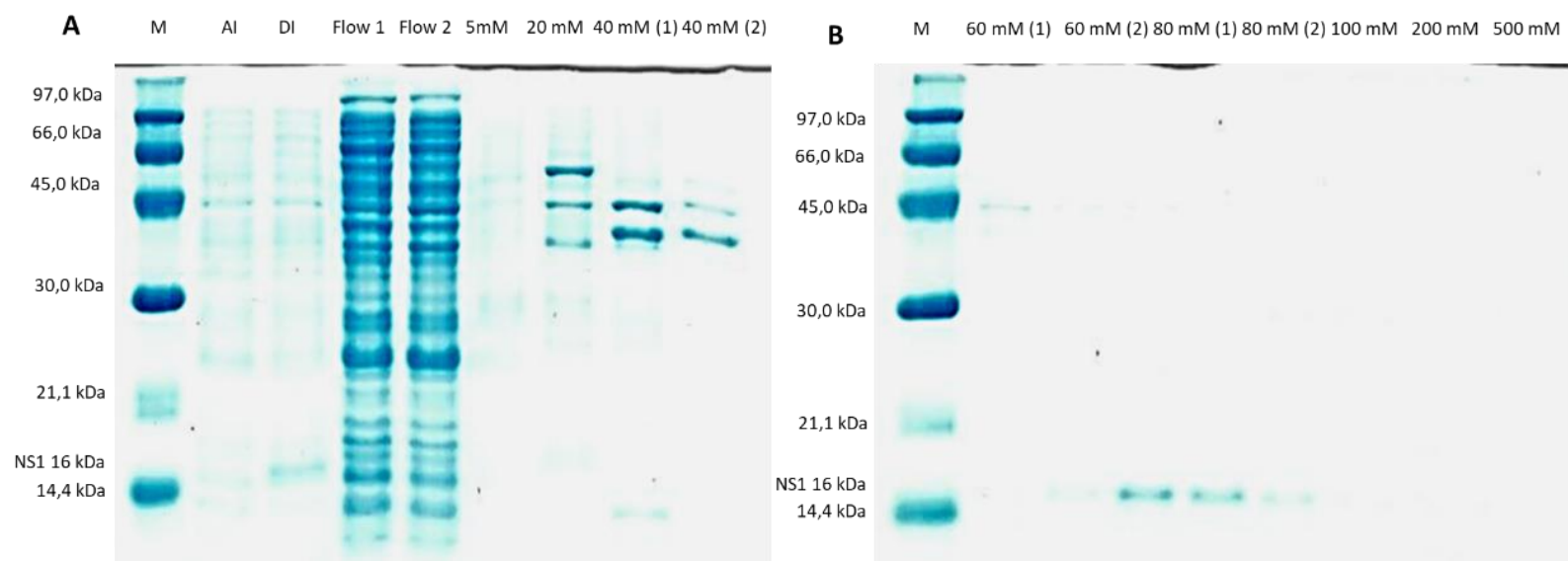
### 5.3. Purificação da proteína NS1

O resultado da purificação por afinidade, primeiro método cromatográfico empregado, revelou por meio do gel SDS-PAGE 15% que a proteína eluiu-se em maior concentração no passo de 80 mM de Imidazol, com base na maior intensidade da banda.

O gel SDS-PAGE referente a purificação por afinidade está representado na figura 9. Na figura 9 A. observou-se que a proteína foi expressa após indução

com 0,3 mM de IPTG, evidenciado pelas colunas AI (antes da indução) e DI (depois da indução). Além disso, estão representados também o *flow through* que representa as frações de proteínas que não se ligaram a resina e os primeiros passos de eluição de 5 a 40 mM de Imidazol. A figura 9 B evidencia os passos de eluição de 60 a 500 mM de Imidazol.

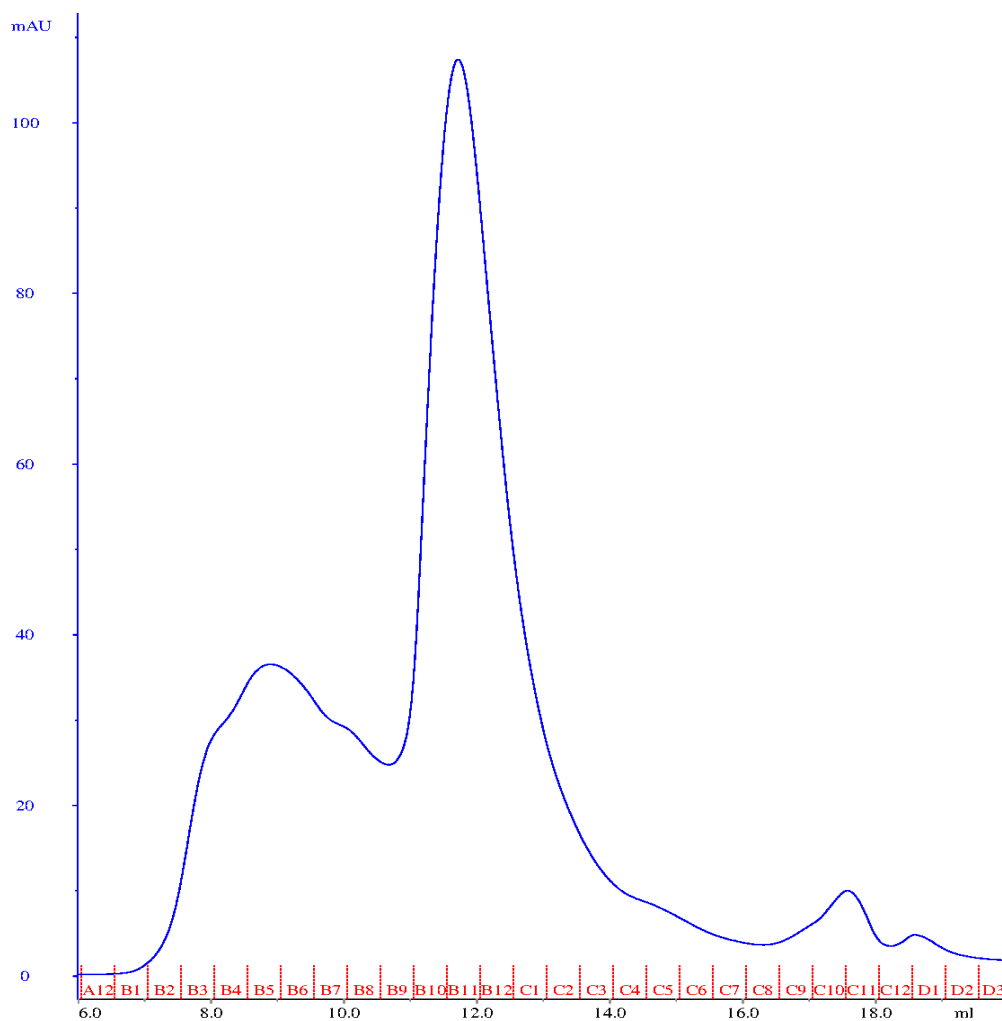
**Figura 9.** SDS-PAGE 15% corado com coomassie brilliant blue R-250 evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade. **A.** M. Marcador de massa molecular, AI antes de induzir, DI depois da indução, Flow through 1 e 2, passos de lavagem de 5 a 40 mM de Imidazol. **B.** Passos de eluição de 60 a 500 mM de Imidazol. A proteína NS1 foi eluída no passo de 80 mM de Imidazol.



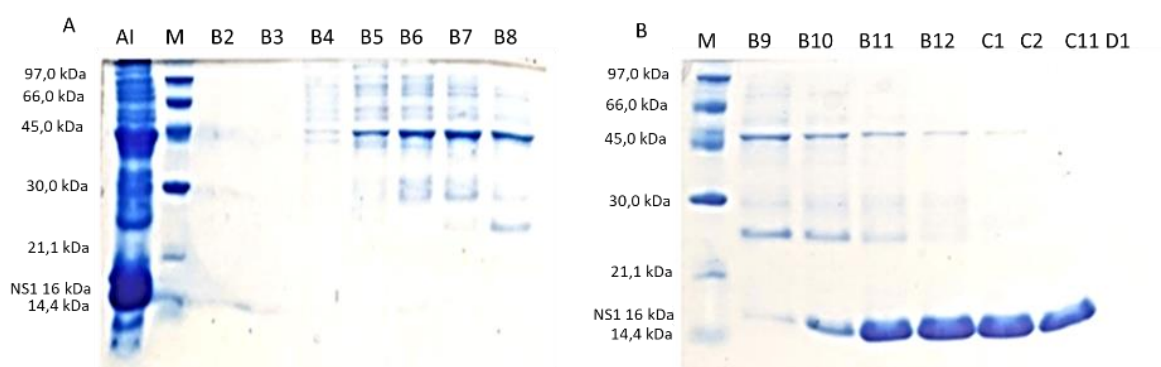
Fonte: Elaborada pelo autor

A fração eluída no passo de 80 mM de imidazol, por ainda apresentar contaminantes de maior massa molecular, foi concentrada e submetida à cromatografia de exclusão molecular no qual foi eluída com aproximadamente 13 mL de tampão PBS 1X, demonstrado no cromatograma da Figura 10 e no gel SDS-PAGE 15% da Figura 11. O cromatograma evidencia o maior pico de absorção no UV com aproximadamente 110 mAU, que abrange as frações de B10 a C3 com volume de aproximadamente 12 e 13 mL de tampão. No gel SDS-PAGE observa-se na figura 11 A. as frações de B2 a B8 referente aos contaminantes de maior massa molecular e na figura 11 B. estão representadas as frações de B9 a C3 e D1. As frações utilizadas nos experimentos foram C1, C2 e C11.

**Figura 10** Cromatograma referente a cromatografia de exclusão molecular. Em azul está representado a absorbância no UV em mAU, em vermelho são as frações coletadas de 0,5 mL em cada fração e em preto o volume coletado em mL. Quatro picos foram observados, de B2 a B8, de B9 a C2, de C9 a C11 e o último pico em D1. A proteína NS1 foi eluída nas frações B10 a C2, que apresentou pico de 110 mAU em um volume de 12 e 13 mL.



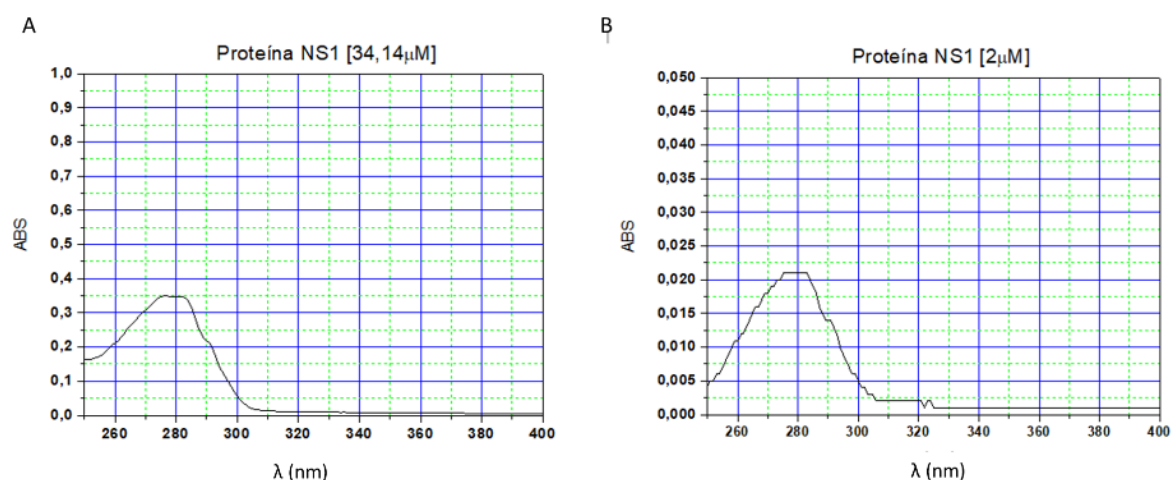
**Figura 11** Gel SDS-PAGE 15% evidenciando as frações coletadas após a cromatografia de exclusão molecular. **A.** AI (amostra antes de injetar), M (marcador de massa molecular), B2 a B8 frações coletadas referentes ao primeiro pico do cromatograma de 38 mAU. **B.** Frações de B9 a C2 referente ao segundo pico de 110 mAU (eluição da proteína NS1), C11 referente ao terceiro pico de 8 mAU e D1 referentes ao pico aproximadamente 2 mAU.



Fonte: Elaborado pelo autor

A concentração da proteína NS1 obtida após a purificação e a usada nos experimentos de fluorescência foram determinadas a partir da absorbância no comprimento de onda de 280 nm e do coeficiente de extinção molar da proteína de  $\epsilon = 10220 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . A concentração mais alta obtida de proteína NS1 foi 34,14  $\mu\text{M}$ , observado na figura 12 A, a concentração utilizada nos experimentos de fluorescência foi de 2  $\mu\text{M}$ , demonstrado na figura 12 B.

**Figura 12** Espectro Absorbância da proteína NS1 em tampão PBS 1X, pH 7,4. **A.** Absorbância da proteína NS1 na concentração de 34,14  $\mu\text{M}$ . **B.** Absorbância da proteína NS1 na concentração de 2  $\mu\text{M}$ .

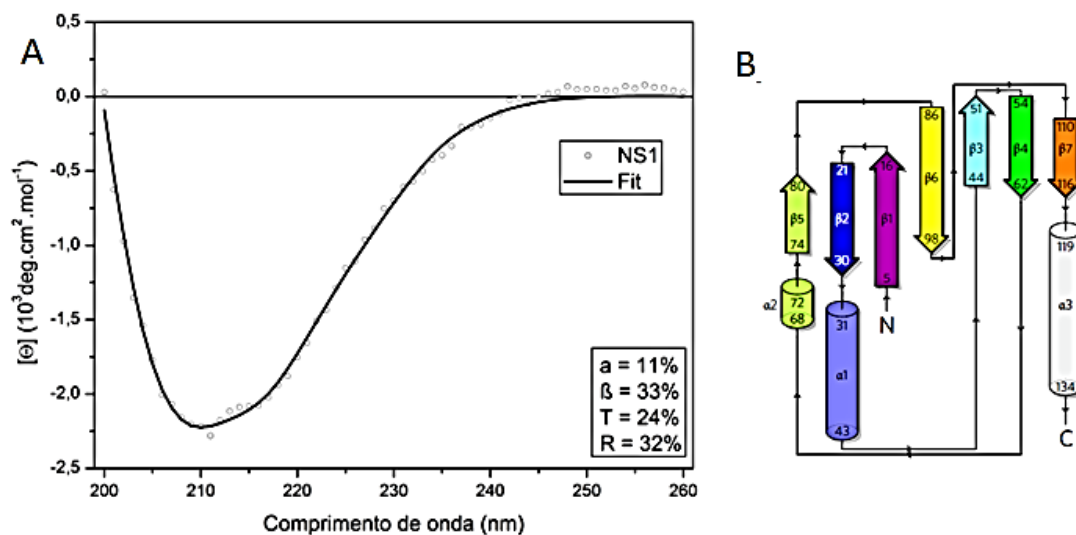


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 5.4. Dicroísmo Circular (CD)

A análise de deconvolução espectral da proteína NS1 pelo método de CONTIN/LL, demonstrado na figura 13 A., evidenciou que sua estrutura secundária é constituída pelas seguintes frações: 11% de  $\alpha$ -hélice, 33% de folha- $\beta$ , 24% de voltas e 32% de estruturas aleatórias, como mostrado no espectro de CD. A figura 13 B. evidencia o diagrama da proteína NS1 proposta por CHATTERJEE e colaboradores (2016), no qual observa-se que a quantidade de folha  $\beta$  é de fato maior que a quantidade de  $\alpha$ -hélice, e que em torno de 50% da estrutura secundária corresponde à voltas e estruturas aleatórias. Estes resultados indicam que a proteína NS1 estava em seu estado nativo e, portanto, adequada para a realização de experimentos subsequentes.

**Figura 13** Espectro de dicroísmo circular e estrutura da proteína NS1 (tampão PBS 1x, pH 7,4). (a) O espectro de CD da proteína obtido experimentalmente está representado pelos círculos pretos e o ajuste da curva utilizando programa CONTIN/LL.(b) Diagrama de topografia da proteína NS1.

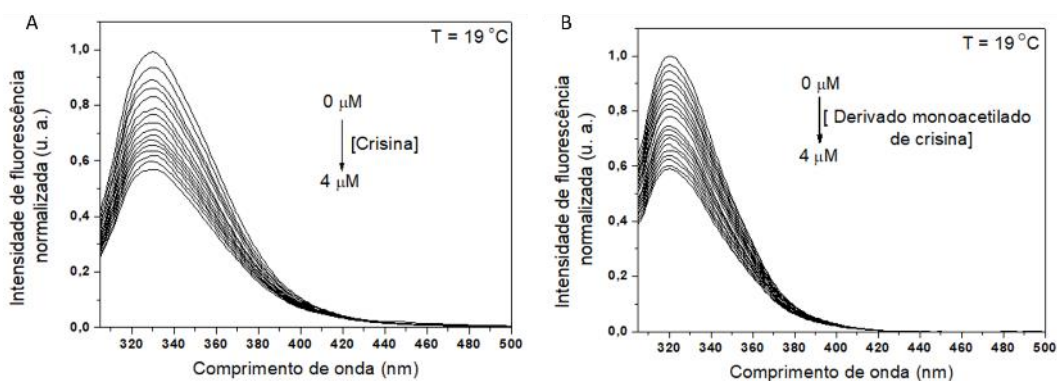


Fonte: Elaborado pelo autor; CHATTERJEE et al, 2017

### 5.5. Supressão da fluorescência da NS1 Crisina e seu derivado

Os dados de supressão de fluorescência evidenciaram que a emissão da proteína NS1 ( $\lambda_{\text{ex}}=295 \text{ nm} \rightarrow \text{Trp90}$ ) diminui com o aumento da concentração dos flavonóides crisina e derivado monoacetilado de crisina, como demonstrado na figura 14.

**Figura 14** Espectros de supressão da fluorescência da proteína NS1 pela presença dos flavonoides. A. Crisina. B. Derivado mono acetilado de crisina. Ambos na temperatura de 19 °C. A concentração dos ligantes variaram de 0 a 4  $\mu\text{M}$ . Proteína NS1 em Tampão PBS 1X em uma concentração de 2  $\mu\text{M}$ .



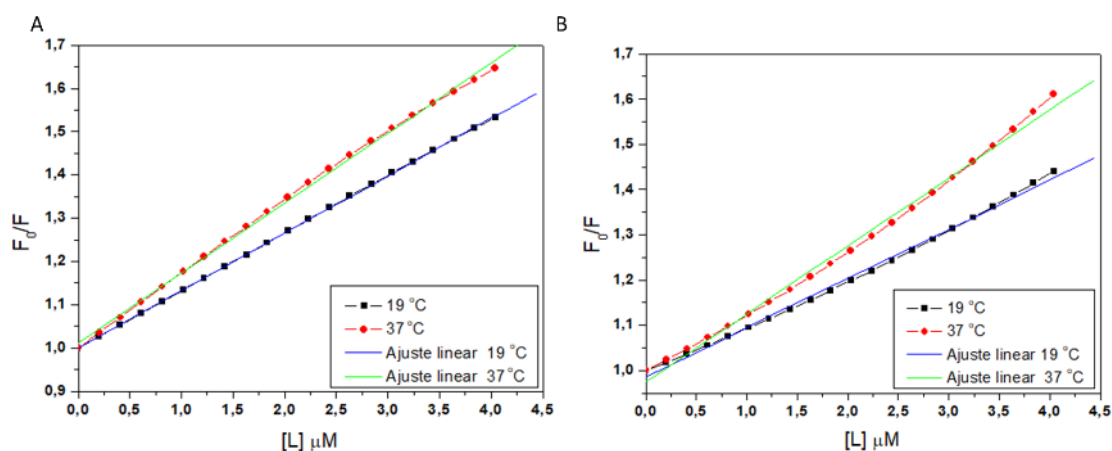
Fonte: Elaborado pelo autor

As análises dos dados de supressão de fluorescência foram feitas utilizando a equação de Stern-Volmer (Eq. 8). Os resultados apontam que os valores das constantes de Stern-Volmer são diretamente proporcionais ao aumento da temperatura. Observa-se este comportamento pelos valores das constantes na tabela 1 e pelo aumento da declividade da reta com o aumento da temperatura de ambos os experimentos evidenciados na figura 15.

**Tabela 1.** Constantes de Stern-Volmer resultantes da interação do complexo NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina. R = coeficiente de correlação.

| T (°C) | $K_{sv} (10^5 \text{ M}^{-1})$ | $K_{sv} (10^5 \text{ M}^{-1})$    | R    |
|--------|--------------------------------|-----------------------------------|------|
|        | Crisina                        | Derivado monoacetilado de crisina |      |
| 19     | 1,33                           | 1,09                              | 0,99 |
| 37     | 1,88                           | 1,52                              | 0,99 |

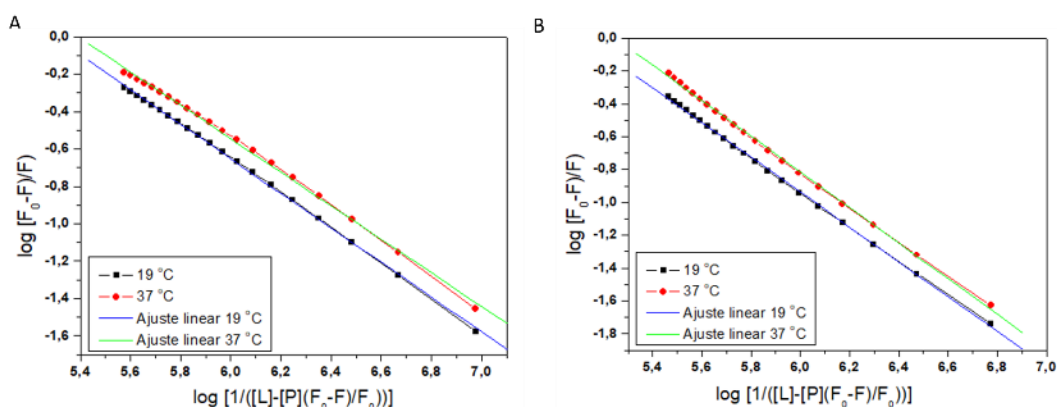
**Figura 15.** Gráficos de Stern-Volmer e ajuste linear dos pontos nas temperaturas de 19 e 37 °C. A. complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina



Fonte: Elaborado pelo autor

A dependência de  $\log ((F_0-F)/F)$  com relação a  $\log (1/([Crisina] - [NS1] (F_0 - F)/F_0))$  (Figura 12.a) e  $\log (1/([Derivado\ monoacetilado\ de\ crisina] - [NS1] (F_0 - F)/F_0))$  (Figura 12.b) é linear, sendo a inclinação da reta igual a  $n$  referente ao número de ligante por proteína (CARUSO, 2016). A inclinação da reta do gráfico duplo log (ou gráfico de Hill), mostrado na figura 16, referente às interações NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina, indicam que os valores de  $n$  para as duas temperaturas são próximos de 1 para ambos os experimentos, sugerindo a estequiometria de um ligante por proteína. Além disso, como demonstrado na Tabela 2, a constante de ligação ( $K_b$ ) é da ordem de  $10^5\text{ M}^{-1}$ , sendo considerada uma constante de associação moderada por estar dentro do intervalo de  $10^4$  a  $10^7\text{ M}^{-1}$ .

**Figura 16** Gráficos de duplo log e ajuste linear dos pontos nas temperaturas de 19 e 37 °C



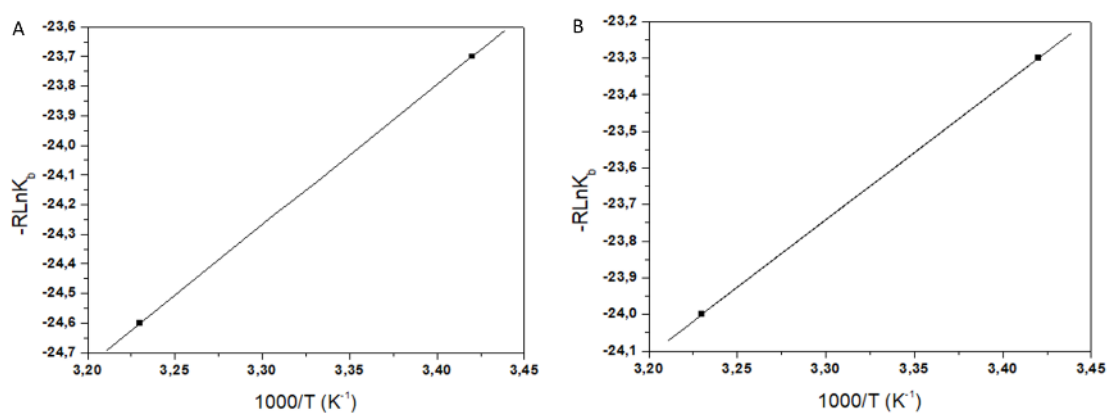
Fonte: Elaborado pelo autor

**Tabela 2.** Constantes de ligação ( $K_b$ ) e o número de sítios de ligação nas temperaturas de 19 e 37 °C para a interação entre NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina. Os coeficientes de correlação (R) são > 0,995

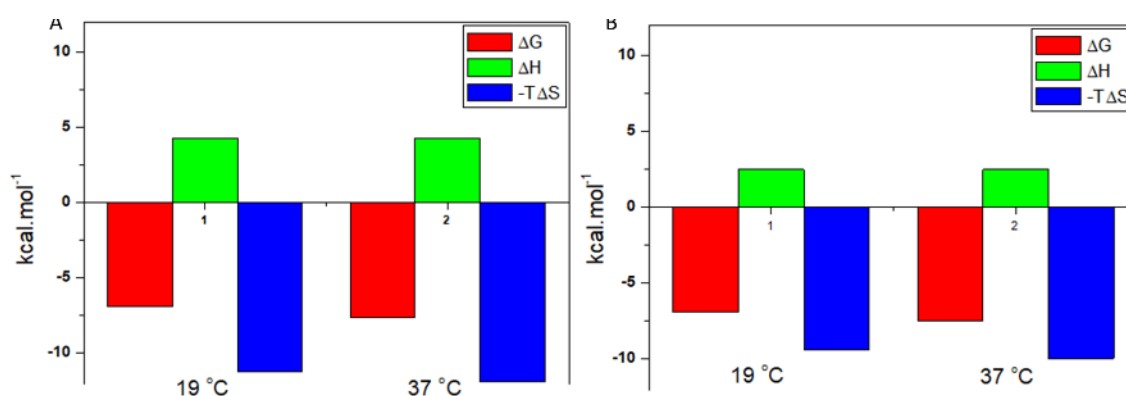
| <b>T</b><br><b>(°C)</b> | <b>N</b><br><b>Crisina</b> | <b><math>K_b</math></b><br><b>(<math>10^5 \text{M}^{-1}</math>)</b><br><b>Crisina</b> | <b>N</b><br><b>Derivado</b><br><b>monoacetilado</b><br><b>de crisina</b> | <b><math>K_b</math> (<math>10^5 \text{M}^{-1}</math>)</b><br><b>Derivado</b><br><b>monoacetilado</b><br><b>de crisina</b> |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>19</b>               | 0,92                       | 1,61                                                                                  | 1,06                                                                     | 1,31                                                                                                                      |
| <b>37</b>               | 0,90                       | 2,47                                                                                  | 1,08                                                                     | 1,85                                                                                                                      |

Os parâmetros termodinâmicos foram obtidos a partir do gráfico de Van't Hoff representado na Figura 17 que fornece a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) das interações NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina. Para a obtenção desses gráficos, mostrados na figura 18, foram utilizados os valores da constante de ligação ( $K_b$ ) para cada temperatura 19°C e 37 °C, tabela 3. A variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) foi obtida a partir da Equação 15 e a variação entrópica a partir da equação 16.

**Figura 17** Gráficos de Van't Hoff. A. complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina



**Figura 18.** Gráficos em barras dos parâmetros termodinâmicos dos complexos NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina em duas temperaturas, 19 e 37 °C. A complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina. Variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e variação da entropia ( $T\Delta S$ ).



Fonte: Elaborado pelo autor

**Tabela 3.** Parâmetros termodinâmicos dos complexos NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina em duas temperaturas, 19 e 37 °C. A complexo NS1-crisina. B. complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina. Variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e variação da entropia ( $T\Delta S$ ).

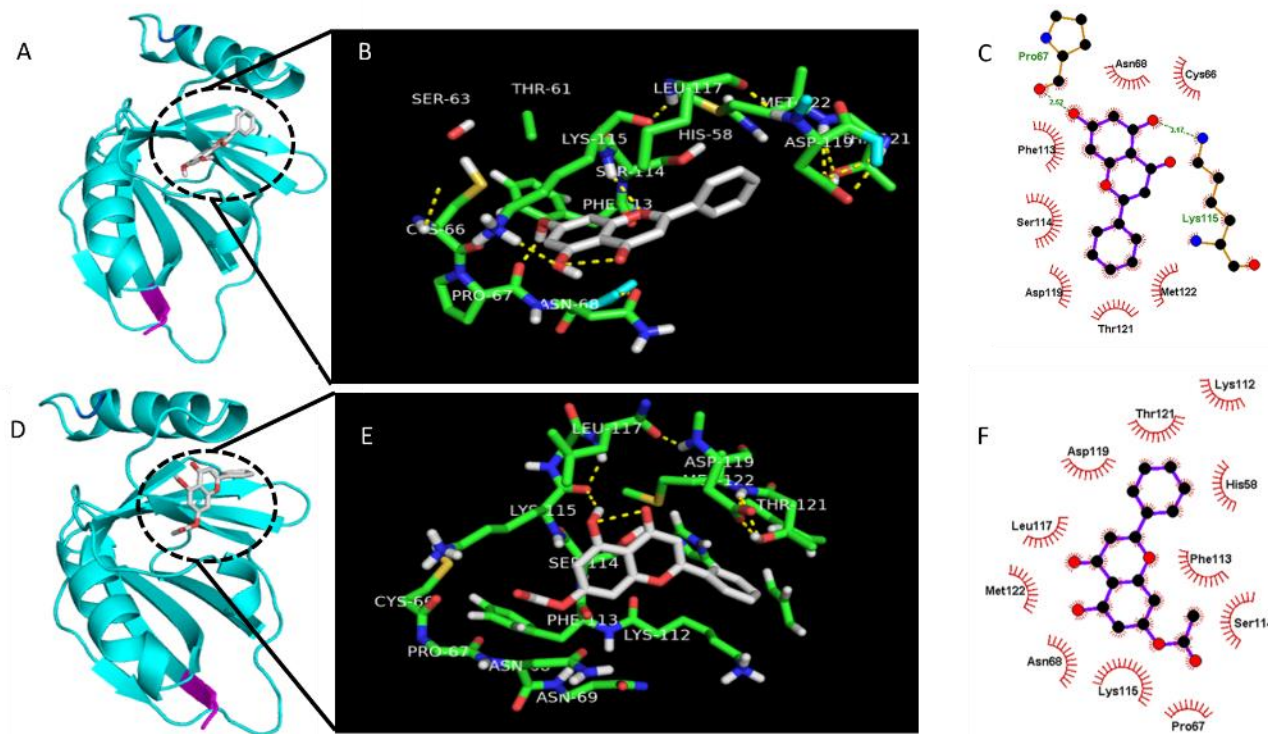
| Flavonoide                               | T<br>(°C) | $\Delta G$<br>(kcal.mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta H$<br>(kcal.mol <sup>-1</sup> ) | - $T\Delta S$<br>(kcal.mol <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>Crisina</b>                           | 19        | -6,93                                   | 4,26                                    | -11,2                                      |
|                                          | 37        | -7,62                                   |                                         | -11,9                                      |
| <b>Derivado monoacetilado de crisina</b> | 19        | -6,90                                   | 2,49                                    | -9,38                                      |
|                                          | 37        | -7,47                                   |                                         | -9,96                                      |

Dentro da cavidade de interação mostrada na figura 19, a crisina e derivado monoacetilado de crisina interagem por meio de ligações de hidrogênio com um resíduo de lisina (Lys- 115). De acordo com o mapa de interação gerado a partir do Paymol, distâncias entre os átomos doador e aceitador nas ligações de hidrogênio do resíduo de lisina (Lys-115) e prolina (Pro-67) da proteína NS1 e grupos hidroxila dos carbonos (C5 e C7) da crisina são de 3,17 Å e 2,52 Å, respectivamente.

Essas mesmas ligações não foram observadas no mapa de interação do complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina, figura 19 F. Os ligantes parecem interagir também com a proteína NS1 por meio de interações hidrofóbicas com resíduos como Phe-113 e Pro-67. O complexo NS1-derivado monoacetilado de crisina apresentou também com outros resíduos que diferem do complexo NS1-crisina, como metionina (Met-122) e leucina (Leu-117), sendo estes resíduos apolares que favorecem interações hidrofóbicas.

Observou-se também que a acetilação no carbono 7 (C7) mudou a orientação de atracamento molecular da crisina modificada à proteína em relação a interação NS1- crisina. As ligações de hidrogênio também sofreram com essa modificação, dificultando a formação das mesmas na cavidade da proteína NS1 ao interagir com a crisina modificada.

**Figura 19** Localização das moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina na cavidade de interação da proteína NS1 por docking molecular e mapa de interação. **A.** Localização da molécula crisina na proteína. **B.** Detalhe estrutural da interação entre NS1-crisina obtida pelo método de modelagem molecular. **C.** mapa de interação entre NS1 crisina obtida a partir do PyMol evidenciando as distâncias, linha tracejada verde, entre a crisina e os resíduos Lys-115 e Pro-67. **D.** Localização da molécula derivado monoacetilado de crisina na proteína. **E.** Detalhe estrutural da interação entre NS1-derivado monoacetilado de crisina obtida pelo método de modelagem molecular. **F.** mapa de interação entre NS1 e o derivado monoacetilado de crisina obtida a partir do PyMol. As moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina são representadas utilizando o modelo stick-balls, os resíduos de aminoácidos são denotados usando o modelo sticks (C, cinza; O, vermelho; N, azul; S, amarelo; H, branco) e as pontes de hidrogênio representadas por linhas tracejadas amarelas.



## 6. DISCUSSÃO

A extinção de fluorescência de uma substância por interação com outra, pode ser usada para medir as afinidades de ligação entre algumas macromoléculas e os ligantes que atuam como supressores (quenchers). Isso indica que a localização dos flavonoides crisina e derivado monoacetilado de crisina estão próximas ao triptofano da proteína exercendo influência na polaridade do microambiente da cavidade ao redor do resíduo de Trp. Esta supressão é expressa como a diminuição do rendimento quântico da fluorescência do fluoróforo induzida por uma variedade de interações moleculares (CHAVES et al., 2015).

De acordo com os resultados experimentais e de *docking* molecular sugere-se que apesar de haver supressão da fluorescência do triptofano observado nos experimentos de fluorescência, os flavonoides crisina e crisina modificada interagem com a proteína em uma cavidade hidrofóbica próxima a ele (Trp-90), porém não na região onde ele se encontra.

Uma das técnicas experimentais usadas para fornecer informações quantitativas do *quenching* são as constantes de *Stern-Volmer*. Muitas interações moleculares podem resultar em um processo de supressão, dentre elas, formação de complexo de estado fundamental e processo colisional. Altas temperaturas resultam em difusões mais rápidas e, portanto, uma extensão maior do processo de supressão por colisão (supressão dinâmica). Ao mesmo tempo, temperaturas elevadas também implicam em dissociação de complexos fracamente ligados, conduzindo a uma redução no processo de supressão estática (CARUSO, 2016).

A supressão da fluorescência se deu de forma dinâmica para ambos os complexos NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina. Já que o aumento do processo colisional promovido pelo aumento da temperatura favoreceu a interação para ambos os ligantes.

Se o mecanismo de extinção se deve principalmente ao processo dinâmico, os resultados experimentais seguem uma relação linear de Stern-Volmer. Em alguns casos, o quenching é devido a uma combinação de processo

estático e dinâmico e os gráficos de *Stern-Volmer* ( $S - V$ ) tendem a exibir um desvio positivo da linearidade, como pode ser o caso da interação NS1-derivado monoacetilado de crisina (KEIZER et al., 1983; GEETHANJALI et al., 2015).

As constantes de ligação ( $K_b$ ) para as interações NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina foram da ordem de  $10^5 \text{ M}^{-1}$  e foi maior para a interação NS1-crisina do que na interação NS1-derivado monoacetilado de crisina, ambas consideradas de caráter moderado, ou seja, não é fraca o bastante para que permina que a proteína tenha afinidade pela crisina modificada em outro sítio que não o mesmo da crisina, e nem forte demais para que o complexo não se dissocie e a proteína NS1 seja totalmente inibida. Além disso, os valores de  $n$  revelaram que a estequiometria de ligante por proteína é de 1 para 1.

O valor negativo de  $\Delta G$  é consistente com a ligação espontânea, e se torna mais favorável com o aumento da temperatura. O valor positivo de  $\Delta H$  indica que o processo de ligação da crisina e derivado monoacetilado de crisina é endotérmico, e o valor positivo de  $\Delta S$  mostra que a interação é devida principalmente a fatores hidrofóbicos (CHAVES et al., 2015). Assim sendo, a interação entre a proteína NS1 e as flavonas crisina e derivado monoacetilado de crisina são entropicamente dirigidas e do tipo hidrofóbica. Esses fatores hidrofóbicos estão relacionados provavelmente à influência das moléculas de hidratação (CHAVES et al., 2015), no qual as moléculas de água são expelidas com a entrada das moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina na cavidade proteica da NS1.

Dockings moleculares, realizados a fim de analisar as principais interações intermoleculares, sugeriram que a acetilação observada no carbono 7 do derivado monoacetilado de crisina modificou a orientação de atracamento do ligante à proteína e resultou em interação com átomos diferentes da interação NS1-crisina, sendo esses resíduos apolares como (Met-122) e leucina (Leu-117), favorecendo a interação hidrofóbica.

Diante disso, o presente trabalho mostrou que a acetilação do derivado monoacetilado de crisina, resultou em interações novas com outros resíduos apolares não observados na interação NS1-crisina, o que era esperado pelo aumento da hidrofobicidade do derivado monoacetilado de crisina em relação à

crisina, e também resultou em mudança no atracamento do ligando à cavidade da proteína NS1 atrapalhou a formação de ligações de hidrogênio com resíduos de Lys-115 e Pro-67, tornando-a pouco menos estável, que a interação NS1-crisina o que corrobora com os demais resultados experimentais.

O primeiro estudo investigando a biodisponibilidade da crisina foi realizado em 1999 por Walle e colaboradores em células de intestino epitelial humano Caco-2 (WALLE et al., 1999). Apesar de ser melhor absorvida em relação a quercetina, a crisina ainda apresenta baixa biodisponibilidade oral por ser alvo de conjugação rápida por glucuronidação e sulfatação (WEN et al., 2006).

Estudos revelam que a proteção dos grupos funcionais OH de flavonoides através de O-metilação ou O-acetilação resulta em análogos com maior absorção intestinal, resistência ao metabolismo hepático e melhora sua atividade farmacológica, dependendo do seu alvo, em relação aos compostos originais (KYRIAKOU et al., 2012), sendo essa proteção, portanto, altamente desejável (ARAÚJO et al., 2016). Entretanto, essas modificações estruturais modulam a atividade farmacológica do flavonoide através de alterações em sua solubilidade, estabilidade, reatividade e interação com alvos celulares (ARAÚJO et al., 2016).

A síntese de moléculas que conserve sua atividade biológica e aumente sua biodisponibilidade é algo desejável para que o agente terapêutico proposto chegue ao seu alvo em maior quantidade, mantendo sua atividade biológica. O presente estudo mostrou que, apesar de pouco menos estável, o derivado monoacetilado de crisina se ligou provavelmente ao mesmo sítio que a crisina, o que pode indicar que tal modificação não resultou em mudanças drásticas na sua ação biológica. Além disso, provavelmente resultará em maior biodisponibilidade em estudos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, tais estudos precisam ser realizados.

## 7. CONCLUSÃO

A proteína NS1, utilizada nos experimentos, foi expressa com 0,3mM de IPTG e sua purificação se deu por meio de dois processos cromatográficos, cromatografia de afinidade, em que a proteína foi eluída com 80 mM de imidazol, e cromatografia de exclusão molecular, no qual foi eluída com aproximadamente 13 mL de tampão PBS.

A fluorescência do triptofano da proteína NS1 foi suprimida com a adição de ambos os ligantes, crisina e derivado monoacetilado de crisina. Entretanto, os resultados do atracamento molecular mostraram que a região mais provável onde ambos os ligantes interagiram com a proteína estão próximas, porém não na cavidade onde se encontra o resíduo de triptofano, o que mostra que, mesmo não interagindo no local onde se encontra o triptofano, podem de alguma forma exercer influência sobre o microambiente do mesmo, suprimindo a fluorescência.

Pelo método de espectroscopia de fluorescência obteve-se o gráfico de Stern-Volmer sugerindo que ambas as supressões se deram pelo mecanismo colisional, já que o valor de  $K_{SV}$  aumenta com a temperatura. A partir do gráfico do duplo log foi possível obter a constante de associação que foi da ordem de  $10^5 M^{-1}$ , bem como a estequiometria de ligante por proteína que foi de 1:1 para as interações NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina.

Os parâmetros termodinâmicos para as duas temperaturas, 19 e 37°C, revelaram que a ligação NS1-crisina e NS1-derivado monoacetilado de crisina ocorrem de forma espontânea e aumentam sua afinidade com o aumento da temperatura. O valor positivo de  $\Delta H$  e o valor positivo de  $\Delta S$  mostra que a interação é devida principalmente a fatores hidrofóbicos. Tal perfil termodinâmico indica uma interação predominantemente do tipo hidrofóbica e entropicamente dirigida provavelmente devido à influência das moléculas de hidratação que são expelidas com a entrada das moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina na cavidade proteica da NS1.

Esses resultados sugerem que a substituição de um grupo hidroxila no carbono 7 do anel A da crisina resultou em uma diminuição na afinidade da proteína pelo ligante que pode ser observada nas constantes de Stern-Volmer, constantes de ligação ( $K_b$ ) e nos parâmetros termodinâmicos. Entretanto, não foi

suficiente para que o derivado monoacetilado de crisina interagisse em outra região que não a mesma que a crisina.

Conclui-se, portanto, que a acetilação do grupo hidroxila de fato aumentou a hidrofobicidade da molécula, provavelmente aumentará sua absorção e biodisponibilidade. Entretanto, apesar de haver uma pequena diminuição da afinidade da proteína pelo ligante em relação à crisina, o sítio mais provável de interação se manteve o mesmo.

O local onde as moléculas crisina e derivado monoacetilado de crisina provavelmente interagiram estão próximas a uma região flexível da proteína, a alfa-hélice 3, que segundo Chatterjee e colaboradores (2017), é uma região importante para a função da proteína NS1. A interação das crisinias nessa região pode expor ou esconder resíduos de aminoácidos, dentre eles Y125 e L132 e L133 que segundo Chatterjee, podem ter um papel crítico no antagonismo de IFN mediado por NS1.

## 8. REFERÊNCIAS

AHAD, A., GANAI, A. A., MUJEEB, M., & SIDDIQUI, W. A.. Chrysin, an anti-inflammatory molecule, abrogates renal dysfunction in type 2 diabetic rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2014.

ALTIZER, S.; DOBSON, A.; HOSSEINI, P.; HUDSON, P.; PASCUAL, M.; ROHANI, P. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. **Ecology Letters**, 2006.

ATUM. Bacterial expression vectors. Disponível em: <https://www.atum.bio/products/expression-vectors/bacterial?hl=PJ401#pg29> Acesso em: 20 de outubro de 2018

ARAÚJO, M. E. M. B. Biossíntese de novos derivados acilados de flavonoidese avaliação in vitro de suabioatividade. Tese (Doutorado) apresentado ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Bragança Paulista, 2016.

BAE, Y., LEE, S., & KIM, S.-H. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: Involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor-κB. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2011.

BARBARIĆ, M.; MIŠKOVIĆ, K.; BOJIĆ, M.; LONČAR, M. B.; SMOLČIĆ-BUBALO, A.; DEBELJAK, Ž.; MEDIĆ-ŠARIĆ, M. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. **Journal of Ethnopharmacology**, 2011

BLOOM-FESHBACH, K.; ALONSO, W. J.; CHARU, V.; TAMERIUS, J.; SIMONSEN, L.; MILLER, M. A.; VIBOUD, C. Latitudinal Variations in Seasonal Activity of Influenza and Respiratory Syncytial Virus (RSV): A Global Comparative Review. **Plos One**, 2013.

BOIVIN, G, CAOUETTE, G.; FRENETTE, L.; CARBONNEAU, J. OUAKKI, M.; SERRES, G. Human respiratory syncytial virus and other viral infections in infants receiving palivizumab. **Journal of Clinical Virology**, 2008.

CANDIRACCI, M., CITTERIO, B., DIAMANTINI, G., BLASA, M., ACCORSI, A., & PIATTI, E. Honey Flavonoids, Natural Antifungal Agents Against *Candida Albicans*. **International Journal of Food Properties**, 2011.

CANE, P. A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial vírus. **Reviews in Medical Virology**, 2001.

CANEDO-MARROQUÍN, G. ACEVEDO-ACEVEDO, O.; REY-JURADO, E.; SAAVEDRA, J. M. LAY, K. M.; BUENO, S. M.; RIEDEL, C. A; KALERGIS, A. M. 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**, 2017.

CARUSO, I. P. Estudo de interação dos flavonóides Isoviteína e 2-Fenilcromona com a Albumina do Soro Humano: abordagem experimental e computacional. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2016.

CERVANTES-ORTIZ, S. L.; CUERVO, N. V.; GRANDVAUX, N. Respiratory Syncytial Virus and Cellular Stress Responses: Impact on Replication and Physiopathology. **Viruses**, 2016.

CHATTERJEE S, LUTHRA P, ESAULOVA E, et al. Structural basis for human respiratory syncytial virus NS1-mediated modulation of host responses. **Nature Microbiology**, 2017.

CHAVES, O., AMORIM, A., CASTRO, L., SANT'ANNA, C., DE OLIVEIRA, M., CESARIN-SOBRINHO, D., ... FERREIRA, A. Fluorescence and Docking Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Pheophytin. **Molecules**, 2015.

[CHECON](#), R. E.; [SIQUEIRA](#), M. M.; [LUGON](#), A. K.; [PORTES](#), S.; [DIETZE](#), R. Short report: seasonal pattern of respiratory syncytial virus in a region with a tropical climate in southeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2002.

CHO, H.; YUN, C-W.; PARK, W-K.; KONG, J-Y; KIM, K. S.; PARK, Y.; LEE, S.; KIM, B-K. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. **Pharmacological Research**, 2004.

COLLINS, P.L.; FEARNES, R.; GRAHAM, B.S. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. **Curr Top Microbiol Immunol.**, 2013. 372:3-38.

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; POEL, B. V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. **Journal of Natural Products**, 1998.

DE VINCENZO, J.; CEHELKY, J. E.; ALVAREZ, R.; ELBASHIR, S.; HARBORTH, J.; TOUDJARSKA, I.; NECHEV, L.; MURUGAIAH, V.; ANDRE VAN VLIET, A. V.; VAISHNAW, A. K.; MEYERS, R. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). **Antiviral Research**, 2008.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific: Palo Alto, CA. Disponível em: <http://www.pymol.org>. Acesso em: 24 de Junho de 2019.

ELLIOTT, J.; LYNCH, O. T.; SUESSMUTH, Y.; QIAN, P.; BOYD, C. R. BURROWS, J. F.; BUICK, R.; STEVENSON, N. J.; TOUZELET, O.; GADINA, M.; POWER, U. F.; JOHNSTON, J. A. Respiratory syncytial virus ns1 protein degrades stat2 by using the elongin-cullin e3 ligase. **Journal of virology**, 2007.

FERNANDEZ-SESMA, A.; MARUKIAN, S.; EBERSOLE, B. J.; KAMINSKI, D.; PARK, M-S.; YUEN, T.; SEALFON, S. C.; GARCÌA-SASTRE, A.; MORAN, T. M. Influenza Virus Evades Innate and Adaptive Immunity via the NS1 Protein. **Journal of Virology**, 2006.

FREITAS, D. N. Avaliação de mecanismos relacionados com a diferenciação de células TCD8 de memória durante a infecção pelo vírus sincicial respiratório. Dissertação (Mestrado em saúde da criança). Universidade Católica do Rio Grande do Sul. **Porto Alegre**, 2015.

GARCÌA-SASTRE, A.; BIRON, C. A. Type 1 Interferons and the Virus-Host Relationship: A Lesson in Détente. **Science**, 2006.

GARDINASSI, L. G.; SIMAS, P. V. M.; SALOMÃO, J. B.; DURIGON, E. L.; TREVISAN, D. M. Z.; CORDEIRO, J. A.; LACERDA, M. N.; RAHAL, P.; SOUZA, F. P. Seasonality of viral respiratory infections in Southeast of Brazil: the influence of temperature and air humidity. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2012.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy

Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, **Humana Press**, 2005.

GEETHANJALI, H. S.; NAGARAJA, D.; MELAVANKI, R. M. Exploring the mechanism of fluorescence quenching in two biologically active boronic acid derivatives using Stern-Volmer kinetics. **Journal of Molecular Liquids**, 2015

GOBRECHT, A.; BENDOULA, R.; ROGER, J.-M.; BELLON-MAUREL, V. Combining linear polarization spectroscopy and the Representative Layer Theory to measure the Beer–Lambert law absorbance of highly scattering materials. **Analytica Chimica Acta**, 2015.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, 2007.

GRIFFITHS, C.; DREWS, A. S. J.; MARCHANTA, D. J. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, 2017.

HEYLEN, E.; NEYTS, J.; JOCHMANS, D. Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus antiviral drug discovery. **Biochemical Pharmacology**, 2017.

HIGGINS, D.; TRUJILLO, C.; KEECH, C. Advances in RSV vaccine research and development – A global agenda. **Vaccine**, 2016.

HOUR, M.-J.; HUANG, S.-H.; CHANG, C.-Y.; LIN, Y.-K.; WANG, C.-Y.; CHANG, Y.-S.; LIN, C.-W. Baicalein, Ethyl Acetate, and Chloroform Extracts of *Scutellaria baicalensis* Inhibit the Neuraminidase Activity of Pandemic 2009 H1N1 and Seasonal Influenza A Viruses. **Hindawi Publishing Corporation**, 2013.

JOHN, D. M.; WEEKS, K. M. Van't Hoff enthalpies without baselines. **Protein Science**, 2000.

KEIZER, J. Nonlinear fluorescence quenching and the origin of positive curvature in Stern-Volmer plots. **Journal of the American Chemical Society**, 1983.

KYRIAKOU, E.; PRIMIKYRI, A.; CHARISIADIS, P.; KATSOURA, M.; GEROTHANASSIS, I. P.; STAMATIS, H.; TZAKOS, A. G. Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 2012

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, Ed. 3, 2006.

LAMBERT, L., SAGFORS, A. M., OPENSHAW, P. J., AND CULLEY, F. J. (2014). Immunity to RSV in Early-Life. **Frontiers in Immunology**, 2014.

MANI, R.; NATESAN, V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. **Phytochemistry**, 2018. .

MARCHANT D, SINGHERA GK, UTOKAPARCH S, HACKETT TL, BOYD JH, LUO Z, SI X, DORSCHIED DR, MCMANUS BM, HEGELE RG. Toll-like receptor 4-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase is a determinant of respiratory virus entry and tropism. **Journal of Virology**, 2010.

MEISSNER HC. Viral bronchiolitis in children. **The New England Journal of Medicine**, 2016.

MOREIRA, F. B.; ROSARIO, C. S.; SANTOS, J. S.; AVANZI, V. M.; NOGUEIRA, M. B.; LUINE R. VIDAL, L. R.; RABONI, S. M. Molecular characterization and clinical epidemiology of human respiratory syncytial virus (HRSV) A and B in hospitalized children, Southern Brazil. **Journal of Medical Virology**, 2017.

MORRIS, G. M., GOODSELL, D. S., HALLIDAY, R. S., HUEY, R., HART, W. E., BELEW, R. K., & OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, 1998.

MUNIR, *et al.* Respiratory syncytial virus interferon antagonist NS1 protein suppresses and skews the human T lymphocyte response. **PLoS Pathology**, 2011.

NABAVI, S. F., BRAIDY, N., HABTEMARIAM, S., ORHAN, I. E., DAGLIA, M., MANAYI, A., ... NABAVI, S. M. Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine. **Neurochemistry International**, 2015.

NAIR, H; NOKES, D.J.; GESSNER, B.D.; DHERANI, M.; MADHI, S.A.; SINGLETON, R.J.; O'BRIEN, K.L.; ROCA, A.; WRIGHT, P.F.; BRUCE, N.; CHANDRAN, A.; THEODORATOU, E.; SUTANTO, A.; SEDYANINGSIH, E. R.; NGAMA, M.; MUNYWOKI, P. K.; KARTASASMITA, C.; SIMOES, E. A.; RUDAN, I.; WEBER, M. W.; CAMPBELL, H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory

syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, 2010.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Chrysin, CID=5281607, Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chrysin>> Acesso em: 24 de Junho de 2019

OPENSHAW, P. J. M.; CHIU, C. CULLEY, F. J.; JOHANSSON, C. Protective and Harmful Immunity to RSV Infection. **Annual Review of Immunology**, 2017.

PANGESTI, K. N. A.; GHANY, M. A. E.; WALSH, M. G.; KESSON, A. M.; HILL-CAWTHONE, G. A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. **Wiley**, 2017.

PAYNTER S. Humidity and respiratory virus transmission in tropical and temperate settings. **Epidemiol. Infect.**, 2015.143:1110–1118.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, 2007.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, 2007.

PICA, N.; VERGOUWE, Y. Ambient Temperature and Respiratory Virus Infection. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, 2014.

PICKLES, R. J.; DEVINCENZO, J. P. Respiratory syncytial virus (RSV) and its propensity for causing bronchiolitis. **Journal of Pathology**, 2015.

PITTET, L. A.; HALL-STOODLEY, L.; RUTKOWSKI, M. R.; HARMSSEN, A. G. Influenza Virus Infection Decreases Tracheal Mucociliary Velocity and Clearance of *Streptococcus pneumoniae*. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 2010.

PRETEL, E.; CAMPOREALE, G.; DE PRAT-GAY, G. The Non-Structural NS1 Protein Unique to Respiratory Syncytial Virus: A Two-State Folding Monomer in Quasi-Equilibrium with a Stable Spherical Oligomer. **Plos ONE**, 2013.

PRETEL, M. E. La proteína no-estructural NS1 exclusiva del virus respiratorio sincicial: mecanismo de plegamiento y ensamblado quasispontáneo de oligómeros esféricos

estables. Tese: Doutorado em Química Biológica. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina, 2014.

PUSHPAVALLI, G., KALAIARASI, P., VEERAMANI, C., & PUGALENDI, K. V. (2010). Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in d-galactosamine-induced hepatitis in rats. **European Journal of Pharmacology**, 2010.

RAMÍREZ-ESPINOSA, J., SALDAÑA-RÍOS, J., GARCÍA-JIMÉNEZ, S., VILLALOBOS-MOLINA, R., ÁVILA-VILLARREAL, G., RODRÍGUEZ-OCAMPO, A, et al. Estrada-Soto, S. Chrysin Induces Antidiabetic, Antidyslipidemic and Anti-Inflammatory Effects in Athymic Nude Diabetic Mice. **Molecules**, 2017.

SANDE, C.J.; MUTUNGA, M.N.; MEDLEY, G.F.; CANE, P.A.; NOKES, D.J. Group and Genotype-Specific Neutralizing Antibody Responses Against Respiratory Syncytial Virus in Infants and Young Children With Severe Pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**, 2013.

SANNER MF. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 1999.

SATHISHKUMAR, G., BHARTI, R., JHA, P. K., SELVAKUMAR, M., DEY, G., JHA, R., SIVARAMAKRISHNAN, S, et al. Dietary flavone chrysin (5,7-dihydroxyflavone ChR) functionalized highly-stable metal nanoformulations for improved anticancer applications. **RSC Advances**, 2015.

SCHNITZLER, P.; NEUNER, A.; NOLKEMPER, S.; ZUNDEL, C.; NOWACK, H.; SENSCH, K. H.; REICHLING, J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytotherapy Research**, 2010.

SHAHRIARI, S.; GORDON, J. GHILDYAL, R. Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding. **Virology Journal**, 2016

SHARMA, A.; WU, W.; SUNG, B.; HUANG, J.; TSAO, T.; LI, X.; GOMI, R.; TSUJI, M.; WORGALL, S. Respiratory Syncytial Virus (RSV) Pulmonary Infection in Humanized Mice Induces Human Anti-RSV. **Immune Responses and Pathology**, 2016.

SHI, T., MCALLISTER, D.A., O'BRIEN, KL, et al. Global, regional and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. **The Lancet**, 2017.

SITHISARN, P.; MICHAELIS, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; CINATL, J. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. **Antiviral Research**, 2013.

SOUZA, L. C.; ANTUNES, M. S.; FILHO, C. B.; FABBRO, L. D.; GOMES, M. G.; GOES, A. T. R.; DONATO, F.; PRIGOL, M.; BOEIRA, S. P.; JESSE, C. R. Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **Editora Elsevier**, 2015.

STOLEY, M. E.; KNUDSON, C. J.; PEWE, L. L.; MEYERHOLZ, D. K.; LANGLOIS, R. A.; TENEVER, B. R.; Harty, J. T.; Memory CD8 T cells in RSV infection: friend or foe?. **The Journal of Immunology**, 2016.

STROET, M., CARON, B., VISSCHER, K. M., GEERKE, D. P., MALDE, A. K., & MARK, A. E. The Automated Topology Builder Version 3.0 (ATB3.0): Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2018.

SUN, Y., López, C. B. The innate immune response to RSV: Advances in our understanding of critical viral and host factors. **Vaccine**, 2017.

SURESH BABU, K., HARI BABU, T., SRINIVAS, P. V., HARA KISHORE, K., MURTHY, U. S. N., & RAO, J. M. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006.

TAPIA L. I.; SHAW, C. A.; AIDEYAN, L. O.; JEWELL, A. M.; BRIAN C. DAWSON, B. C.; TAHA R. HAQ, T. R.; PIEDRA, P. A.. Gene Sequence Variability of the Three Surface Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in Texas. **PLoS ONE**, 2014.

TAPIA L. I.; SHAW, C. A.; AIDEYAN, L. O.; JEWELL, A. M.; BRIAN C. DAWSON, B. C.; TAHA R. HAQ, T. R.; PIEDRA, P. A.. Gene Sequence Variability of the Three Surface Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in Texas. **PLoS ONE**, 2014.

TSUJI, P. A., WINN, R. N., & WALLE, T. Accumulation and metabolism of the anticancer flavonoid 5,7-dimethoxyflavone compared to its unmethylated analog chrysin in the Atlantic killifish. **Chemico-Biological Interactions**, 2006.

WALLE, U. K.; GALIJATOVIC, A.; WALL, T. Transport of the Flavonoid Chrysin and Its Conjugated Metabolites by the Human Intestinal Cell Line Caco-2. **Biochemical Pharmacology**, 1999.

WANG, T-Y.; LI, Q.; BI, K-S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, 2018.

WEN, X.; WALLE, T. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. **Drug Metabolism & Disposition**, 2006.

WOLKOFF, P. Indoor air humidity, air quality, and health - An overview. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2018.

YANG, P.; ZHENG, J.; WANG, S.; LIU, P.; XIE, M.; IZHAO, D. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2 are crucial pathogenic factors that modulate interferon signaling and Treg cell distribution in mice. *Virology*. **Editora Elsevier**, 2015.