

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/02/2027.



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

Sérgio Luís Ferreira Júnior

Investigação de ligantes para o domínio globular da proteína M2-1 como potenciais antivirais contra o Vírus Sincicial Respiratório humano

**São José do Rio Preto
2025**

Sérgio Luís Ferreira Júnior

Investigação de ligantes para o domínio globular da proteína M2-1 como potenciais antivirais contra o Vírus Sincicial Respiratório humano

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

Financiadora: FAPESP nº 2023/06367-5

Área de concentração: Farmacologia e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Icaro Putinhon Caruso

São José do Rio Preto

2025

F383i Ferreira Júnior, Sérgio Luís

Investigação de ligantes para o domínio globular da proteína M2-1 como potenciais antivirais contra o Vírus Sincicial Respiratório humano. / Sérgio Luís Ferreira Júnior. -- São José do Rio Preto, 2025
60 p. : il., tabs.

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

Orientador: Ícaro Putinhon Caruso

1. RMN. 2. hRSV. 3. dgM2-1. 4. Espectroscopia de Fluorescência.
I. Título.

Sérgio Luís Ferreira Júnior

Investigação de ligantes para o domínio globular da proteína M2-1 como potenciais antivirais contra o Vírus Sincicial Respiratório humano

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Biotecnologia

Data da defesa: 13/02/2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Icaro Putinhon Caruso

UNESP - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) - Campus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey

UNESP - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) - Campus de São José do Rio Preto

Prof. Dr(a). Gisele Cardoso de Amorim

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Duque de Caixias

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o apoio, carinho e amor incondicional que demonstraram por mim em toda a minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é o esforço colaborativo de várias pessoas, tanto no âmbito profissional quanto no âmbito pessoal, portanto, este espaço é dedicado a agradecer cada uma dessas pessoas.

Agradecer primeiramente aos meus pais, que foram as pessoas que mais me apoiaram em todo o processo, desde o momento em que decidi sair da minha antiga graduação até o meu ingresso no mestrado e todo o desenvolvimento da minha pesquisa, sempre me incentivando a seguir os meus sonhos e não medir esforços para conquistá-los.

Gostaria de agradecer também a uma pessoa muito especial, Júlia Guimarães Dias Rubiato, a mulher que tenho a felicidade de chamar de amor da minha vida e que me acompanhou em todo o processo, tanto nos momentos de alegria pelas conquistas que obtive até os momentos de temor devido as adversidades do processo. Eu não tenho palavras pra descrever o quanto sua participação foi imprescindível para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos eu dedico o mesmo agradecimento, vocês que me arrancaram sorrisos nos momentos de adversidade, incentivaram e apoiaram as decisões que tomei e me acompanharam por todo o trajeto. Em especial, 2 pessoas das quais eu não teria escrito este trabalho se não tivessem me ajudado desde o minuto 0, Isabela Brunozi de Oliveira e Murilo Nogueira Sanches, que me falaram sobre o programa, me ajudaram a pegar os livros para estudar e que ajudaram a estudar para o processo, saibam que sou eternamente grato todos vocês.

Por fim, mas não menos importante ao meu orientador, o Professor Ícaro Putinhon Caruso, uma pessoa com uma mente ímpar e extremamente dedicado ao seu trabalho. Gostaria de agradecer a todos os momentos que disponibilizou para me guiar nesse sonho que é a pós-graduação, pela paciência infinita em explicar das mais diversas formas a mesma coisa para que eu pudesse entender e acompanhar o seu raciocínio rápido e por fim, por abrir uma outra dimensão de possibilidades para o meu futuro, assim como para os meus amigos, sou eternamente grato!

Saibam que todos vocês, citados ou não, mas que estão lendo este texto foram especiais para mim durante todo esse processo, então mais uma vez eu gostaria de dizer, por tudo que fizeram por mim, MUITO OBRIGADO!

Gostaria também de agradecer a FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2023/06367-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.88887.806758/2023-00.

RESUMO

Os vírus respiratórios são responsáveis por significativa morbidade, mortalidade e perdas econômicas globais. O Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) é um dos principais agentes de infecções respiratórias agudas graves em prematuros, idosos e imunocomprometidos. Atualmente, as formas de tratamento profilático incluem vacinas aprovadas pela FDA para idosos e gestantes, além do medicamento Palivizumab, um anticorpo monoclonal que visa a proteína de fusão. Para ambos os tratamentos, destaca-se que são métodos para prevenir ou amenizar um possível quadro da doença, o que evidencia a necessidade de um tratamento terapêutico para pacientes com quadros mais graves. Neste sentido, a proteína M2-1 do hRSV é um fator de antiterminação transcricional fundamental para o ciclo de replicação do vírus, com suas funções mediadas pela interação de seu domínio globular (dgM2-1) com parceiros biológicos como o RNA e a fosfoproteína viral, caracterizando-se como um potencial alvo para o desenvolvimento de antivirais. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar possíveis ligantes para o dgM2-1 como potenciais antivirais com base em duas vertentes: i) a aplicação de um método sistematizado para identificar novas pequenas moléculas ligantes, como a abordagem da triagem de fragmentos por RMN, e ii) o uso de uma característica físico-química presente no dgM2-1, sua extensa superfície carregada positivamente, favorável para interação com moléculas de carga líquida negativa como a suramina. Para a triagem, foram selecionados sete fragmentos mais promissores de uma biblioteca com ~700, baseado nas medidas de perturbação de deslocamento químico, tempo de relaxação transversal e WaterLOGSY. Esses fragmentos identificados apresentaram resultados positivos para ao menos dois parâmetros utilizados na triagem, e foram selecionados para análise de diferença de transferência de saturação, entretanto, um foi excluído da análise de ^{15}N HSQC devido a questões de solubilidade. A partir dos experimentos de STD e HSQC, observou-se que quatro dos fragmentos selecionados apresentaram interação satisfatória, sendo essa próxima aos resíduos das hélices α_2 , α_4 , α_5 e α_6 do dgM2-1, regiões importantes para a interação do domínio com RNA e a fosfoproteína viral. Os fragmentos selecionados tiveram sua capacidade de competição com o peptídeo P90-110, fragmento da fosfoproteína, testada através de experimentos de anisotropia de fluorescência, para os quais três dos quatro fragmentos apresentaram competição com o P90-110, com destaque para o fragmento P2_C07, que proporcionou maior aumento da K_d do complexo dgM2-1/P90-110. Para a análise de interação dgM2-1/suramina, experimentos de fluorescência mostram um melhoramento do sinal de emissão da suramina na presença de concentrações crescentes de dgM2-1. A partir deste experimento, a construção de uma isoterma de ligação possibilitou a determinação da constante de dissociação (K_d) de ~13 nM para o complexo dgM2-1/suramina. A análise termodinâmica para os valores de K_d nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C revelou uma variação de entalpia de ligação significativamente reduzida frente a principal contribuição entrópica para a energia livre de Gibbs, sugerindo uma contribuição eletrostática importante para a formação do complexo dgM2-1/suramina, o que corroborou com o experimento de competição com NaCl. Outros experimentos de competição de suramina com RNA e um fragmento da fosfoproteína viral (P96-110) para o sítio de ligação no dgM2-1 revelaram que a molécula polissulfatada é deslocada por ambos os parceiros biológicos naturais, indicando que a suramina interage tanto nos sítios de ligação do RNA quanto do P96-110. Portanto, o presente estudo apresenta dados moleculares relevantes para o desenho de novas estratégias de combate a infecções causadas pelo hRSV.

Palavras-chave: RMN; hRSV; dgM2-1; espectroscopia de fluorescência.

ABSTRACT

Respiratory viruses are responsible for significant morbidity, mortality, and global economic losses, with Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) being one of the main agents of severe acute respiratory infections in premature infants, elderly, and immunocompromised individuals. Currently, prophylactic treatments include FDA-approved vaccines for the elderly and pregnant women, as well as the drug Palivizumab, a monoclonal antibody targeting the fusion protein. Both treatments are methods to prevent or mitigate a possible disease condition, highlighting the need of a therapeutic treatment for patients with more severe conditions. In this sense, the M2-1 protein of hRSV is a crucial transcriptional antitermination factor for the virus replication cycle, with its functions mediated by the interaction of its core domain (cdM2-1) with biological partners, RNA, and viral phosphoprotein, making it a potential target for the development of antivirals. Thus, the present work aimed to investigate potential ligands for cdM2-1 as potential antivirals based on two approaches: i) the application of a systematic method to identify new small molecule ligands, such as the fragment screening approach by NMR, and ii) the use of a physicochemical characteristic present in M2-1/cdM2-1, its extensive positively charged surface, favorable for interaction with negatively charged molecules like suramin. For the screening, seven of the most promising fragments from a library of ~700 were selected, based on chemical shift perturbation measurements, transverse relaxation time, and WaterLOGSY. These identified fragments showed positive results for at least two parameters used in the screening and were selected for saturation transfer difference analysis, for which two did not show satisfactory results and were excluded from the ^{15}N HSQC stage. From the HSQC experiments, it was observed that the selected fragments interacted in the $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, and $\alpha 6$ helices of dgM2-1, important regions for the domain's interaction with RNA and the viral phosphoprotein. The selected fragments had their ability to compete with the P90-110 peptide, a fragment of the phosphoprotein, tested through fluorescence anisotropy experiments. Three out of the four fragments showed competition with P90-110, with particular emphasis on the P2_C07 fragment, which resulted in the greatest increase in the K_d of the cdM2-1/P90-110 complex. For the cdM2-1/suramin interaction analysis, fluorescence experiments showed an improvement in suramin emission signal in the presence of increasing concentrations of cdM2-1. From this experiment, constructing a binding isotherm enabled the determination of the dissociation constant (K_d) of ~13 nM for the cdM2-1/suramin complex. Thermodynamic analysis for K_d values at 15, 25, and 35 °C revealed a significantly reduced binding enthalpy variation against the main entropic contribution to Gibbs free energy, suggesting an important electrostatic contribution to the cdM2-1/suramin complex formation, corroborated by the competition experiment with NaCl. Other competition experiments of suramin with RNA and a fragment of the viral phosphoprotein (P96-110) for the binding site on dgM2-1 revealed that the polysulfated molecule is displaced by both natural biological partners, indicating that suramin interacts with both RNA and P96-110 binding sites. Therefore, this study presents relevant molecular data for designing new proposals for strategies to combat infections caused by hRSV.

Keywords: NMR; hRSV; cdM2-1; fluorescence spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Representação do genoma do hRSV, segmentado de forma a representar as proteínas derivadas deste genoma. (B) Estrutura representativa do vírus.	15
Figura 2. (A) Esquema do tetrâmero da proteína M2-1 do hRSV (32). O monômero é composto por um domínio de ligação ao zinco (magenta), um domínio de oligomerização (verde), um domínio globular de ligação à proteína P e ao RNA (laranja) e uma região não estruturada do C-terminal. (B) Estrutura tridimensional da M2-1 do hRSV (PDB: 4C3B,(33)). Representação em cartoon da estrutura tetramérica da proteína com as cadeias coloridas em diferentes cores. Os átomos de zinco são representados como esferas cinzas.....	16
Figura 3. (A) Estrutura tridimensional do domínio globular da proteína M2-1 (dgM2-1) do hRSV e suas α -hélices. Em vermelho: α 1 (Gly75-Gly85); laranja: α 2 (Lys92-Glu105); amarelo: α 3 (Ser108-Asp117); azul: α 4 (Lys124-Lys140); ciano: α 5 (Lys143-Arg151); magenta: α 6 (Asp155-Ile171). (B) Superfície de potencial eletrostático do dgM2-1 calculada com programa APBS, usando os valores de carga e estados de protonação (pH 6,5, 150 mM de NaCl, 25°C) determinados pelo servidor PDB2PQR juntamente com o programa PROPKA. A barra indica a faixa de potencial eletrostático de -5 kT (vermelho) a +5 kT (azul).	17
Figura 4. Representação da estrutura molecular da suramina.	19
Figura 5. Imagem representativa onde podemos observar os estados ligado e livre de um ligante (representados por hexágonos azuis) interagindo com uma macromolécula (representada por um semicírculo laranja) e seu impacto no espectro 1D H^1	21
Figura 6. Representação teórica da variação do tempo de relaxação transversal observado nos sinais de CPMG quando um ligante interage com uma macromolécula.....	22
Figura 7. Representação dos valores de NOE em função de $\omega\tau c$	23
Figura 8. Representação do efeito de WaterLOGSY teórico, onde o ligante interagindo apresenta inversão de sinal no espectro 1D H^1 . Nesta figura o ligante é representado pelo losango azul e a macromolécula com a qual interage é representado pela fórmula geométrica em verde.	24
Figura 9. Representação da obtenção de um sinal de STD a partir da dedução do sinal on-resonance do sinal off-resonance.	25
Figura 10. Representação de um espectro obtido de ^{15}N -HSQC. (A) espectro ^{15}N -HSQC, em preto a proteína livre e em vermelho a proteína ligada, onde é possível detectar a interação entre as moléculas analisadas devido as mudanças de deslocamento químico presentes no experimento, variando de acordo com a concentração do composto estudado. (B) Mostra o histograma desenvolvido a partir da análise dos dados de deslocamento químico do N-HSQC, neste podemos quantificar o quão significativo cada shift apresentado é com base na sua média e desvio padrão.	27
Figura 11. O Diagrama de Jablonski apresenta o estado fundamental, o primeiro e segundo estado eletrônico como traços horizontais denominados S_0 , S_1 e S_2 , representando respectivamente um nível de energia vibracional diferente. Neste diagrama existem flechas verticais que representam a transição de um estado para o outro como a absorção (roxo), conversão interna (tracejada), fluorescência (verde), conversão intersistema (preta) e fosforescência (vermelha).	28
Figura 12. (A) Gel de SDS-PAGE 15% do processo expressão do dgM2-1. M: marcador de massa molecular; A.I.: antes da indução; D.I.: depois da indução. A seta vermelha denota a proteína recombinante expressão. (B) Gel de SDS-PAGE 15% do processo de purificação por cromatografia de afinidade Ni-NTA. S: sobrenadante do processo de lise; P: pellet da lise; M: marcador de massa molecular; FT: <i>flow through</i> ; e os números indicam as concentrações (mM) do gradiente de imidazol. (C) Gel de SDS-PAGE 15% para o processo de clivagem proteolítica com TEV protease. A.T.: antes da protease TEV; D.T.: depois da protease TEV; M: marcador de massa molecular; F: <i>flow through</i> , e os	

números indicam as concentrações (mM) de imidazol. (D) Gel de SDS-PAGE 15% evidenciando a pureza da proteína dgM2-1 após o processo de gel filtração. A proteína purificada com bandas correspondentes a massa molecular de ~15 kDA indicadas por um quadrado vermelho.37

Figura 13. Espectros 1D ^1H de uma mistura de 12 fragmentos a 200 μM cada na ausência (linha preta) e presença de 20 μM de dgM-1 (linha vermelha) coletados para os experimentos de CSP da etapa de triagem de fragmentos de RMN.38

Figura 14. Abordagem de triagem de fragmentos por RMN para o dgM2-1, exemplificando os resultados para os fragmentos P7_F07, P7_E12, P7_B08 e P2_H11. Experimentos de CSP (preto e laranja representam o fragmento na ausência e presença da proteína, respectivamente), medidas de T_2 na ausência e presença da proteína (preto e verde representam as medidas em 10 e 400 ms, respectivamente) e WaterLOGSY (preto e magenta representam o fragmento na ausência e presença da proteína, respectivamente). Um zoom do espectro de referência de cada fragmento identificado é apresentado na parte de cima dos gráficos.39

Figura 15. Estrutura molecular dos fragmentos selecionados na etapa de triagem. Os retângulos de contorno preto denotam os fragmentos que apresentaram ambiguidade na identificação pelo assinalamento. **P7_F07** (2-(1H-imidazol-1-il)etil N,N-dimetilcarbamato), **P2_C07** (N-[2-(4-sulfamoilfenil)etil]acetamida), **P6_H03** (1-(morfolin-4-il)-4-fenilbutan-1-ona), **P1_H11** (4-etoxi-N-(5-metil-1,2-oxazol-3-il)benzamida), **P7_E12** (N-[2-(4-hidroxifenil)etil]piridina-2-carboxamida), **P2_H11** (3-[2-(2-oxopirrolidin-1-il)etil]-1-fenilureia), e **P7_B08** (3-(ciclopropilmetil)-1-(2,3-di-hidro-1-benzofuran-5-il)ureia).40

Figura 16. Efeito resultante de STD-RMN para os fragmentos selecionados na interação com o dgM2-1 (linha azul). O sinal em vermelho corresponde ao espectro 1H 1D dos fragmentos livres coletados no mesmo tampão dos experimentos de STD-RMN. O símbolo de cruz denota o sinal do tampão. A estrela de cinco pontas indica o sinal residual de DMSO não deuterado e a estrela de seis pontas denota o sinal de etanol. O símbolo de raio indica o sinal remanescente do processo de irradiação magnética do dgM2-1 no experimento de *off-resonance*.41

Figura 17. Espectros ^{15}N HSQC do dgM2-1 na ausência (preto) e presença do fragmento (A) P2_C07 (laranja), (B) P2_H11 (verde), (C) P7_F07 (amarelo) e (D) P7_E12 (violeta). Os espectros foram coletados em um equipamento de RMN de 600 MHz na temperatura de 25 °C utilizando concentração de proteína de 50 μM e 10 mM de fragmentos em solução tampão Bis-Tris de 50 mM em pH 6,5.....42

Figura 18. (A) Análise de CSP para os sete fragmentos selecionados na etapa da triagem. A linha tracejada representa o valor médio de CSP e a linha pontilhada denota o valor médio mais o um desvio padrão. Nesta imagem destaca-se os fragmentos P2_C07 e P7_E12 como os fragmentos com maior interação com resíduos de interesse biológico do dgM2-1.42

Figura 19. Representação dos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com os fragmentos (A) P2_C07, (B) P2_H11, (C) P7_F07 e (D) P7_E12. Os resíduos que foram destacados apresentam valores de CSP maiores do que a média mais desvio padrão. (E) Estrutura do dgM2-1 com os resíduos identificados pela análise conjunta de CSP para dos fragmentos P2_C07, P2_H11, P7_F07 e P7_E12. Resíduo com uma ocorrência é denotado em ciano, duas em verde, três em amarelo e quatro em vermelho.....44

Figura 20. Variação da intensidade da fluorescência do P90110RB em função da concentração de dgM2-1, com emissão medida em 584 nm, realizado em tampão 50 mM Bis-Tris (pH 6,5) à 25 °C....45

Figura 21. Modelo do domínio globular da proteína M2-1 interagindo com o peptídeo P90-110. Em ciano está destacado o peptídeo e em laranja os resíduos do dgM2-1 que interagem com o fragmento P2_C07.....47

Figura 22. Espectro de emissão da suramina (2,5 μM) apresentando um melhoramento do sinal de fluorescência com o aumento das concentrações de dgM2-1 (de 0 a 4 μM) em solução tampão de 50

mM de Bis-Tris em pH 6,5 na temperatura de 25 °C. Para a realização das medidas foi empregado um comprimento de onda de excitação de 315 nm.	48
Figura 23. Variação da intensidade de fluorescência com máximo demarcado em 405 nm em função da concentração de dgM2-1, realizado em tampão 50 mM Bis-Tris (pH 6,5) nas temperaturas de 15 °C (A), 25 °C (B) e 35 °C (C), com Fit demarcado em vermelho, realizado segundo a equação 7. (D) demonstração das três temperaturas analisadas, representando sua baixa variação, com destaque para 35 °C sendo a maior variação entre as temperaturas analisadas.....	49
Figura 24. Job-plot para o sítio de ligação da suramina para o dgM2-1 em pH 6,5 e 25 °C. A concentração total de suramina e dgM2-1 foi de 5 µM. A intensidade máxima de fluorescência atingiu seu máximo na proporção de 1:22 de suramina para dgM2-1. As intensidades foram calculadas em uma excitação de 320 nm e emissão máxima de 405 nm.....	50
Figura 25. Gráfico de van't Hoff para os valores de constantes de dissociação do complexo dgM2-1/suramina determinadas nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C. Os círculos pretos denotam os dados experimentais e a linha contínua representa o ajuste teórico empregando a relação de van't Hoff da equação 8.....	51
Figura 26. Curvas de competição pelo sítio de ligação do dgM2-1, com medidas realizadas a 25 °C e pH 6,5 partindo do ponto de saturação entre dgM2-1/Suramina. (A) Competição entre Suramina e NaCl, demonstrando dissociação quase completa do complexo, com 88% de redução da intensidade total. (B) Curva de competição entre Suramina e RNA com menor eficiência quando comparada ao NaCl, neste caso a redução da intensidade é de cerca de 60%. (C) Curva de competição entre Suramina e P96-110 com eficiência inferior as demonstradas pelo RNA e NaCl, neste caso a redução da intensidade observada é de cerca de 55%.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos experimentos de CSP, relaxação T_2 e WaterLOGSY para a triagem de fragmentos do dgM2-1. Os fragmentos apresentados passaram por ao menos dois critérios mencionados anteriormente.....	39
Tabela 2. Valores referentes a equação de Hill aplicada aos experimentos de competição entre os fragmentos e o peptídeo P90110RB.....	46
Tabela 3. Constantes de dissociação, variação de entalpia ΔH , variação da energia livre de Gibbs ΔG , variação de entropia ΔS e termo entrópico do ΔG da interação dgM2-1/suramina determinados utilizando os dados dos experimentos de melhoramento do sinal de fluorescência da suramina nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	EPIDEMIOLOGIA E TRATAMENTO.....	12
1.2	ESTRUTURA VIRAL.....	14
1.3	PROCESSO TRANSCRICIONAL E O PAPEL DA M2-1 E SEU DOMÍNIO GLOBULAR..	15
1.4	PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS	18
1.4.1	FRAGMENTOS MOLECULARES.....	18
1.4.2	POLIÂNIONS	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E TRIAGEM DE FRAGMENTOS	20
2.1.1	Perturbação de deslocamento químico.....	20
2.1.2	Tempo de relaxação transversal (T_2)	21
2.1.3	WaterLOGSY	22
2.1.4	Diferença de Transferência de Saturação por RMN	24
2.1.5	Experimentos de 2D ^{15}N HSQC.....	25
2.2	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	27
3	OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO GLOBULAR DA M2-1.....	31
4.2	TRIAGEM DE FRAGMENTOS POR RMN	32
4.3	EXPERIMENTO DE DIFERENÇA DE TRANSFERÊNCIA DE SATURAÇÃO POR RMN	33
4.4	EXPERIMENTOS DE ^{15}N HSQC	34
4.5	EXPERIMENTOS DE FLUORESCÊNCIA	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
5.1	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO GLOBULAR DA M2-1.....	36
5.2	TRIAGEM DE FRAGMENTOS POR RMN PARA O DGM2-1	37
5.3	MEDIDAS DE DIFERENÇA DE TRANSFERÊNCIA DE SATURAÇÃO POR RMN	40
5.4	ANÁLISE DOS SÍTIOS DE INTERAÇÃO VIA ^{15}N HSQC	41
5.5	ANÁLISES DE FLUORESCÊNCIA DA INTERAÇÃO ENTRE DGM2-1 E FRAGMENTOS	44
5.6	ANÁLISES DOS EXPERIMENTOS DE FLUORESCÊNCIA DO COMPLEXO DGM2-1/SURAMINA.....	48
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA E TRATAMENTO

Os vírus respiratórios são os agentes patogênicos mais frequentes em humanos, com um impacto significativo na morbidade, mortalidade e grandes perdas econômicas em todo o mundo, como observado na pandemia de COVID-19 (BOHMWALD et al., 2021; TRAMUTO et al., 2021). Esses vírus são altamente adaptados a transmissão rápida e eficiente por contato direto, indireto, gotículas e aerossóis, derivados de sintomas comuns em doenças respiratórias como a tosse e o espirro, o que facilita a sua circulação em escala global, tornando-os agentes infecciosos com potencial pandêmico (BOCCALINI et al., 2023). Entre estes agentes, o Vírus Sincicial Respiratório humano (do inglês, hRSV) destaca-se por ser um agente causador de infecções agudas do trato respiratório (do inglês, ARI), tanto superior quanto inferior, atingindo principalmente crianças menores que 2 anos de idade e idosos, mas podendo se manifestar na fase adulta, mesmo que o vírus tenha sido contraído na infância (BOCCALINI et al., 2023; TRAMUTO et al., 2021).

Quanto aos sintomas, estes costumam ser brandos, característicos de infecções do trato respiratório superior (do inglês, URIs) como tosses e espirros, que podem progredir para infecções do trato respiratório inferior (LRTIs) levando a quadros como bronquiolite, pneumonia e traqueobronquite (BOCCALINI et al., 2023; TRAMUTO et al., 2021). Estes quadros mais severos são altamente associados à fatores de risco como doença cardíaca congênita, pacientes imunossuprimidos, com doenças crônicas do trato respiratório como a doença pulmonar obstrutiva crônica, além de crianças menores que 1 ano de idade e crianças prematuras (BOCCALINI et al., 2023; PAROLA et al., 2024; TRAMUTO et al., 2021). Estima-se que o hRSV infecte 60% das crianças em seu primeiro ano de vida, estendendo esse número para quase todas as crianças até o segundo ano de vida (PAROLA et al., 2024). Com alta taxa de infecção, em 2015 o hRSV foi a causa de 33,1 milhões de casos de LRTIs em crianças de até 5 anos de idade, resultando em 3,2 milhões de crianças hospitalizadas das quais 59.600 vieram a óbito, sendo a segunda classificada nas causas de morte em todo o mundo e a primeira colocada nas mortes por doenças respiratórias (PAROLA et al., 2024; REN et al., 2022). No Brasil, em 2023 foram notificados 67.771 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (do inglês, SARS) causados por vírus respiratórios, dos quais 22.297 provieram de infecções por hRSV, que representam um total de 32,9% dos casos, um número comparável ao de infecções por SARS-CoV-2 que representou 34,8% destes casos de SARS (“Boletim InfoGripe - semana 50/2023 - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciência e tecnologia em saúde para a população brasileira”, [s.d.]).

Com o surto pandêmico de COVID-19 e a consequente adoção das medidas de controle sanitário como uso de máscaras, higienização frequente das mãos e distanciamento social, houve uma redução significativa no número de casos de infecção por hRSV. Entretanto, com o avanço da vacinação e relaxamento das medidas de controle, os casos de infecção por hRSV tem apresentado expressivo aumento em todo o mundo em comparação com os números vistos antes da pandemia, o que pode estar relacionado com uma mudança na sazonalidade do vírus (AGHA; AVNER, 2021; LAVOIE et al., 2021; MATTIA et al., 2021; UJIIE et al., 2021). Nesse sentido, pesquisadores alertam que o cenário atual pode aumentar a suscetibilidade das pessoas a doenças causadas pelo hRSV, resultando em grandes surtos com potencial epidêmico e/ou pandêmico no futuro (GROVES et al., 2021; KUHN et al., 2002; PRINCETON UNIVERSITY, 2020). Vale citar que em 2008 foi relatado pela primeira vez a transmissão de vírus com potencial pandêmico (entre eles o hRSV) de humanos para macacos de grande porte causando um grande declínio na população destes animais na Costa do Marfim (KÖNDGEN et al., 2008). Destaca-se ainda que a Organização das Nações Unidas produziu um guia (*Preventing the next Pandemic*) que inclui o hRSV como um dos vírus que demandam vigilância (RANDOLPH, 2020).

Atualmente, infecções por hRSV são tratadas de forma profilática com o uso do Palivizumab, um anticorpo monoclonal (mAB) produzido com tecnologia de DNA recombinante humanizado que age no epítipo do sítio II da proteína F do hRSV, em casos de alto risco como crianças prematuras e com comorbidades pré-existent (UJIIE et al., 2021). Estudos *in vivo* demonstram que este medicamento consegue neutralizar os subtipos A e B do hRSV e reduzir a carga viral em ratos infectados quando administrado de forma profilática (AGHA; AVNER, 2021; LAVOIE et al., 2021). Destaca-se, entretanto, que mutações neste sítio específico podem levar a variantes resistentes ao tratamento com este mAB devido à pressão seletiva exercida, como já reportado pelo hospital Universitari Vall d'Hebron em 2024 onde cepas com mutações nos epítipos antigênicos S276N e M274I do sítio II surgiram (MATTIA et al., 2021; PIÑANA et al., 2024a).

Recentemente duas vacinas foram aprovadas pela *Food and Drugs Administration* (FDA), Arexvy (RSVPreF3-AS01E) e Abrysvo (RSVpreF), desenvolvidas respectivamente pelas empresas GSK Biologicals e Pfizer. Voltadas para o uso profilático em adultos acima dos 60 anos de idade, ambas demonstraram ser formas seguras e baratas de imunizar esta população (FAUSTHER-BOVENDO et al., 2022; LOAIZA et al., 2024). Destaca-se também que a Abrysvo também foi aprovada para o uso em recém-nascidos (< 6 meses) pela FDA (LOAIZA et al., 2024). Entretanto, é importante observar que as vacinas apresentadas ainda não

demonstraram total capacidade de proteção a crianças e recém-nascidos e todos os tratamentos existentes têm caráter profilático, ou seja, são métodos para prevenir ou amenizar um possível quadro da doença. Assim, neste cenário, evidencia-se que o surgimento de um antiviral, voltado para o tratamento terapêutico do quadro, seria benéfico para o tratamento de pacientes em quadros mais graves (LOAIZA et al., 2024).

1.2 ESTRUTURA VIRAL

O vírus do hRSV é um vírus de RNA polimórfico, com fita simples de sentido negativo, pertencente ao gênero *Orthopneumovirus* da família *Pneumoviridae* e ordem *Mononegavirales*. Este vírus é dividido em dois subtipos (A e B), e é propenso a sofrer alterações genéticas (LOAIZA et al., 2024; PIÑANA et al., 2024b). Quanto à sua morfologia, o hRSV é um vírus pleomórfico, com seu diâmetro variando entre 50 a 250 nm (LOAIZA et al., 2024). O genoma viral de 15,2 kb é segmentado em 10 partes, traduzidas em 11 proteínas (PAPI et al., 2023; PIÑANA et al., 2024b; WALSH et al., 2023).

Destas proteínas, três são responsáveis por formar o ribonucleocapsídeo (RNP) envolvendo o RNA genômico e as outras proteínas virais, a nucleoproteína (N) e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), essa por sua vez é composta da proteína L com seu parceiro molecular, a fosfoproteína (P). Outras três estão associadas ao envelope viral e são denominadas: proteína de fusão (F), glicoproteína de ancoragem ou adesão (G) e uma pequena proteína hidrofóbica (SH). Considerando esta morfologia, logo abaixo do envelope viral situa-se a proteína M, desempenhando um importante papel na montagem do vírus. Além destas sete proteínas estruturais, NS1 e NS2 são duas proteínas não estruturais responsáveis por burlar o sistema imune da célula infectada (PIÑANA et al., 2024b; WALSH et al., 2023). Por fim as duas últimas proteínas são traduzidas do gene M2 e denominadas M2-1 e M2-2. A proteína M2-1 é descrita como um importante fator transcricional enquanto a M2-2 demonstra papel inibitório da transcrição e replicação. Estudos apontam que a M2-2 também desenvolve papel regulatório, agindo como um “interruptor” entre o processo de transcrição e replicação. Outros estudos também apontam que o hRSV recombinante sem o gene M2-2 demonstrou uma menor capacidade de atuação no processo transcricional, resultando em uma atenuada do vírus (PIÑANA et al., 2024b; SHANG; TAN; MA, 2021; WALSH et al., 2023).

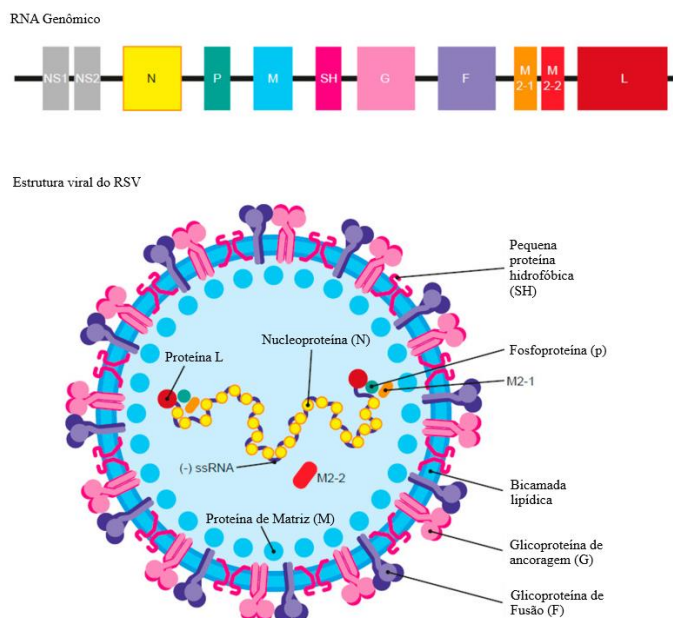


Figura 1. Representação da estrutura viral do hRSV. (A) Representação do genoma do hRSV, segmentado de forma a representar as proteínas derivadas deste genoma. (B) Estrutura representativa do vírus. Fonte: Adaptado de (JENKINS et al., 2023).

1.3 PROCESSO TRANSCRICIONAL E O PAPEL DA M2-1 E SEU DOMÍNIO GLOBULAR

O reconhecimento eficiente e específico do molde nucleocapsídeo (NC) pela RNA polimerase é crítico para a síntese de RNA viral. Segundo Selvaraj e colaboradores, a M2-1 atua diretamente no processo transcrricional, junto das proteínas L e P (complexo RdRp) sendo este processo dependente da M2-1 para a produção eficiente de RNA mensageiro viral (MUNIYANDI et al., 2018). Esta dependência foi reportada por Collins e colaboradores em experimentos realizados na ausência e na presença da proteína M2-1, os quais resultaram em uma variação das taxas de RNAs mensageiros completos, onde a presença da M2-1 resultou em um maior número desses RNAs completos, sugerindo a baixa processividade da proteína L e a necessidade da M2-1 como um fator de processamento e antiterminação, especialmente durante a síntese de RNAs mensageiros longos (COLLINS et al., 1996).

O processo transcrricional é mediado pela fosfoproteína P que se liga a proteína L, N e M2-1 (ASENJO; VILLANUEVA, 2000; GARCIA et al., 1993; KHATTAR; YUNUS; SAMAL, 2001; MASON et al., 2003). A fosfoproteína P é uma proteína modular que consiste em um domínio de tetramerização flanqueado por duas regiões longas preditas como intrinsecamente desordenadas (CASTAGNÉ et al., 2004; LLORENTE et al., 2006). Durante a replicação e transcrição, a proteína P posiciona a polimerase viral no molde NC (proteína N mais RNA viral) e auxilia na translocação do complexo da polimerase ao longo do

nucleocapsídeo helicoidal. No processo de transcrição, a proteína M2-1 atua como um fator de processividade e antiterminação, evitando que o complexo RdRp (proteínas L e P) se dissocie ao chegar ao códon de parada e permitindo que a RNA polimerase acesse promotores gênicos distais, portanto, aumentando a eficiência de transcrição dos genes próximos à extremidade 5' (BLONDOT et al., 2012; MOLINA et al., 2018).

Estruturalmente, o fator de antiterminação M2-1 se arranja em quatro domínios (Figura 2) (TANNER et al., 2014): domínio dedo de zinco, sendo composto por resíduos iniciais do N-terminal que se ligam ao átomo de zinco; domínio de oligomerização, responsável pela formação do tetrâmero; domínio globular, envolvido diretamente na interação com a P e o RNA viral; e o domínio C-terminal, uma região não estruturada.

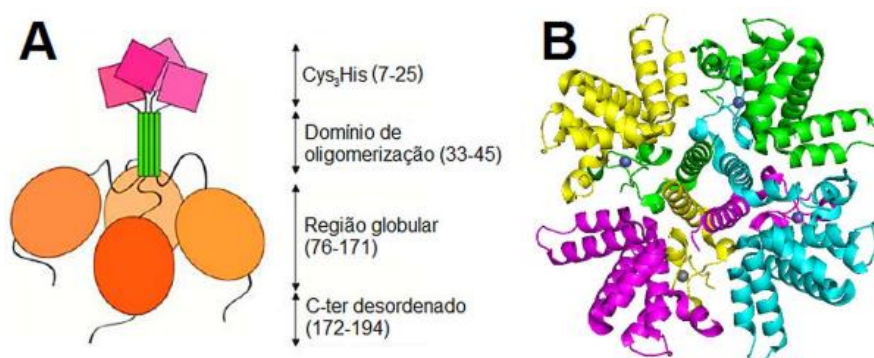


Figura 2. Representação bidimensional e tridimensional da proteína M2-1. (A) Esquema do tetrâmero da proteína M2-1 do hRSV (BLONDOT et al., 2012). O monômero é composto por um domínio de ligação ao zinco (magenta), um domínio de oligomerização (verde), um domínio globular de ligação à proteína P e ao RNA (laranja) e uma região não estruturada do C-terminal. (B) Estrutura tridimensional da M2-1 do hRSV (PDB: 4C3B, (TANNER et al., 2014)). Representação em cartoon da estrutura tetramérica da proteína com as cadeias coloridas em diferentes cores. Os átomos de zinco são representados como esferas cinzas. Fonte: (BLONDOT et al., 2012)

Como demonstrado na Figura 3A, o domínio globular da M2-1 (dgM2-1, resíduos Ser58–Lys177) é constituído de seis α -hélices: $\alpha 1$ (Gly75–Gly85), $\alpha 2$ (Lys92–Glu105), $\alpha 3$ (Ser108–Asp117), $\alpha 4$ (Lys124–Lys140), $\alpha 5$ (Lys143–Arg151) e $\alpha 6$ (Asp155–Ile171) e apresenta duas faces opostamente carregadas (Figura 3B), sendo uma delas positiva e contendo um grande conjunto básico delimitado pelas hélices $\alpha 2$, $\alpha 5$, e $\alpha 6$, associadas à interação da proteína com o RNA (BLONDOT et al., 2012). Segundo os trabalhos de Blondot e colaboradores (2012) e Tanner e coautores (2014), o dgM2-1 apresenta alta afinidade por fitas de RNA com polaridade negativa, ricas em uracilas, e por RNA senso positivo, rico em purina e utilizado como molde para a formação de RNA mensageiro durante o processo de transcrição (BLONDOT et al., 2012; TANNER et al., 2014). Estudos apontam que as hélices $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$ estão envolvidas na interação com a proteína P e o RNA (BLONDOT et al., 2012). Um outro estudo mostrou

que mutações promovidas nas hélices $\alpha 2$ e $\alpha 4$, substituição dos resíduos Lys92, Arg126 e Thr130 por aspartato, demonstraram menor taxa transcricional. Este mesmo efeito foi observado quando resíduos das hélices $\alpha 5$ e $\alpha 6$ (Lys150, Arg151, Thr160 e Asn163) foram substituídos por aspartato (BLONDOT et al., 2012). Sugerindo a importância das cargas positivas para a interação com o RNA.

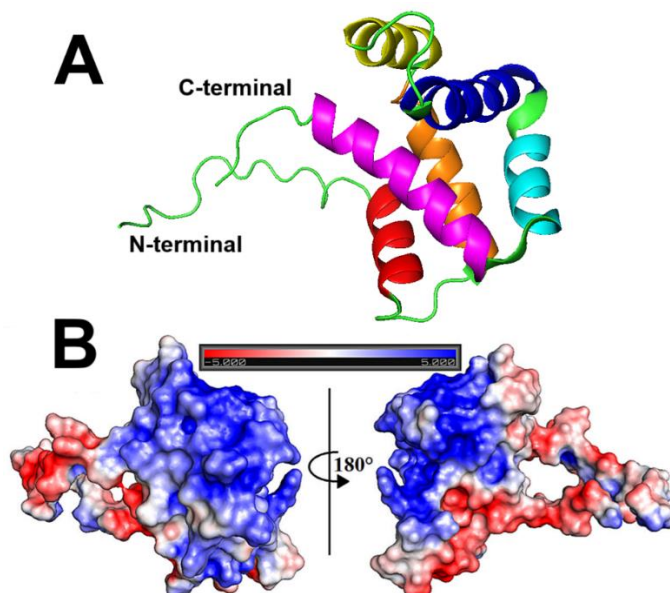


Figura 3. (A) Estrutura tridimensional do domínio globular da proteína M2-1 (dgM2-1) do hRSV e suas α -hélices. Em vermelho: $\alpha 1$ (Gly75-Gly85); laranja: $\alpha 2$ (Lys92-Glu105); amarelo: $\alpha 3$ (Ser108-Asp117); azul: $\alpha 4$ (Lys124-Lys140); ciano: $\alpha 5$ (Lys143-Arg151); magenta: $\alpha 6$ (Asp155-Ile171). (B) Superfície de potencial eletrostático do dgM2-1 calculada com programa APBS, usando os valores de carga e estados de protonação (pH 6,5, 150 mM de NaCl, 25°C) determinados pelo servidor PDB2PQR juntamente com o programa PROPKA. A barra indica a faixa de potencial eletrostático de -5 kT (vermelho) a +5 kT (azul). Fonte: Adaptado de (CARUSO et al., 2020)

Assim, o reconhecimento molecular do RNA e da fosfoproteína P pelo dgM2-1 é fundamental para o ciclo de replicação do hRSV. Os pontos específicos da interação dgM2-1/RNA e dgM2-1/P podem ser considerados como potenciais sítios de ligação de antivirais, uma vez que a oclusão desses sítios poderia promover um bloqueio da atividade desempenhada pela M2-1 no contexto do complexo co-transcricional viral. Um exemplo dessa estratégia antiviral foi reportado por Bailly e colaboradores (2016) que demonstrou a atuação do alcaloide esteroideal ciclopamina como um inibidor potente e seletivo da replicação *in vivo* e *in vitro* do hRSV. Nesse estudo, os autores propuseram um efeito específico da ciclopamina na ligação do dgM2-1 ao RNA e a P, o que resultaria na exclusão do fator de antiterminação M2-1 do complexo co-transcricional viral (BAILLY et al., 2016). Portanto, pode-se destacar que o dgM2-1 é um promissor alvo para o desenvolvimento de antivirais que objetivam inibir o ciclo de replicação do hRSV.

1.4 PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS

Diante do contexto apresentado, a busca por ligantes como potenciais candidatos antivirais para o dgM2-1 poderia ser realizada com base em duas vertentes: i) aplicando um método sistematizado para encontrar novas moléculas, como a abordagem da triagem de fragmentos por RMN, e ii) fazendo uso de uma característica físico-química fundamental para uma proteína que se liga a ácido nucleico como o dgM2-1, que é sua extensa superfície carregada positivamente inerente de um valor de pI igual a 9,0 para o dgM2-1, o qual o confere uma carga líquida positiva em pH neutro (Figura 3B). Ambas as abordagens podem ser empregadas com a finalidade de identificar compostos que interajam nos sítios de ligação do dgM2-1 com RNA e fosfoproteína viral atuando como potenciais inibidores do ciclo de replicação viral.

Dessa forma, vale destacar que a aplicação da técnica de RMN para a abordagem da triagem de fragmentos é promissora para a descoberta de novos ligantes devido a suas características únicas. Essa técnica experimental permite uma investigação de um conjunto de pequenos ligantes de uma única vez, em um intervalo de tempo razoável de poucas horas e proporciona resolução de nível atômico (DIETHELM-VARELA, 2021). Da mesma forma também vale destacar que uma estratégia comumente reportada na literatura é a aplicação de poliânions como ligantes para proteínas com regiões positivamente carregadas como o dgM2-1. Dentre esses poliânions, a molécula polissulfatada suramina merece destaque para essa aplicação, até mesmo como um tipo de molécula modelo (ONO; NAKANE; FUKUSHIMA, 1988; WIEDEMAR; HAUSER; MÄSER, 2020; WILLSON et al., 1993).

1.4.1 FRAGMENTOS MOLECULARES

A prospecção de fármacos por fragmentos é uma forma de estabelecer um ponto inicial para a descoberta de novos medicamentos e que já possui medicamentos aprovados pela FDA em circulação como o pexidartinib, vemurafenib, erdafitinib, venetoclax, sotorasib e asciminib assim como inúmeros candidatos a fármacos sendo estudados (BON et al., 2022). Como base para identificar ligantes para uma proteína alvo, a triagem de fragmentos por RMN utiliza uma vasta gama de fragmentos moleculares, pequenas estruturas originadas de moléculas maiores com características semelhantes às dos fármacos existentes, e organizadas em grupos denominados bibliotecas (BERG et al., 2021; SINGH; TAM; AKABAYOV, 2018). Nestas bibliotecas os fragmentos são dispostos de forma a apresentarem uma alta diversidade para que abranjam o maior número de grupos químicos possíveis durante a triagem de fragmentos e seguem a “Regra de 3” proposta por Congreve e colaboradores, destacando que os fragmentos

com maior probabilidade de interação exibem um peso molecular <300 Da, três ou menos doadores e aceptores de hidrogênio e um coeficiente de partição ≤ 3 (CARBERY et al., 2022; CONGREVE et al., 2003). Destaca-se ainda que as bibliotecas são organizadas de forma que os ligantes possam ser analisados em conjunto, sem que interajam entre si ou que seus sinais de ressonância sejam sobrepostos (BERG et al., 2021; SINGH; TAM; AKABAYOV, 2018).

1.4.2 POLIÂNIONS

O notável caráter eletrostático positivo presente no dgM2-1 é favorável para a interação com as cargas negativas presentes nos grupos fosfato do RNA viral (CARUSO et al., 2020). Partindo deste conceito, outras estruturas com notável caráter eletrostático negativo podem interagir com o mesmo *hotspot*, inibindo a interação do dgM2-1 com o RNA viral e atuando como um inibidor do processo de replicação viral. Uma estratégia comum para este tipo de cenário, no qual uma proteína em solução apresenta caráter eletrostático fortemente positivo, é o uso de poliânions como a suramina (Figura 4), uma nafitilurea polisulfatada, altamente negativa em pH neutro com uma estrutura simétrica contendo dois grupos de ácido naftaleno-trissulfônico conectados por um ligante central de benzamida, que possui uma ampla gama de potencial de aplicação para doenças parasitárias, virais, câncer, picadas de cobra e autismo (SALVADOR et al., 2018; WIEDEMAR; HAUSER; MÄSER, 2020). Destaca-se que recentemente, Khanna et al. relataram a atividade da suramina em algumas infecções virais, nas quais demonstrou atividade inibitória para a influenza A, redução de proteínas virais em células infectadas com Chikungunya e inibiu a interação do hPIV-3 em células epiteliais (KHANNA; NANDI, 2022). Destaca-se também que a suramina é considerada uma molécula com alta afinidade para as mais diversas proteínas, servindo neste estudo como um protótipo para a análise da interação de poliânions com o dgM2-1 (WIEDEMAR; HAUSER; MÄSER, 2020).

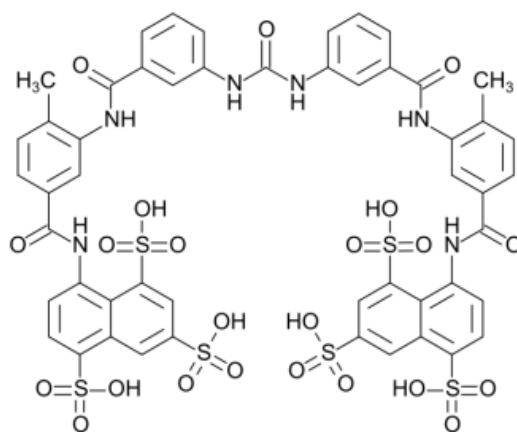


Figura 4. Representação da estrutura molecular da suramina.
Fonte: Adaptado de (ZHANG et al., 1998).

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nas análises realizadas entre do dgM2-1 e os fragmentos, 7 fragmentos foram selecionados após a triagem inicial, sendo estes P7_F07, P2_C07, P6_H03, P1_H11, P7_E12, P2_H11 e P7_B08 por apresentarem ao menos 2 resultados positivos entre os experimentos empregados na triagem. Estes fragmentos foram submetidos a experimentos de diferença de transferência de saturação (STD), e com exceção do fragmento P1_H11, por questões de solubilidade, também foram submetidos a experimentos de ^{15}N HSQC, dos quais a análise conjunta resultou na seleção nos fragmentos P2_C07, P2_H11, P7_F07 e P7_E12. É importante destacar que estes fragmentos selecionados apresentaram potencial de ligação dos parceiros biológicos, fosfoproteína P e o RNA viral, no domínio globular da M2-1. Nos experimentos de competição com um fragmento da fosfoproteína P viral, o peptídeo P90-110 marcado com rodamina B, os fragmentos P2_C07, P7_F07 e P7_E12 demonstraram maior capacidade de interferir na afinidade do complexo dgM2-1/P90-110, com destaque para o fragmento P2_C07 que proporcionou o maior aumento na constante de dissociação do complexo dgM2-1/P90-110. Vale destacar que os compostos utilizados para a prospecção realizada neste trabalho são fragmentos moleculares, que devido à natureza de sua constituição funcionam como estrutura base para o desenvolvimento de novas moléculas, oriundas da união desses fragmentos, com maior capacidade de interação e melhor competitividade com os parceiros biológicos do dgM2-1 por seus sítios de interação.

Os experimentos relacionados a suramina demonstraram valores de K_d menores do que os reportados pela literatura, que associados aos resultados de competição entre suramina e miméticos de seus parceiros biológicos (RNA_{lev} e peptídeo P96-110) entende-se que este poliânion possui uma afinidade maior pelo dgM2-1, sugerindo que sua atuação possa ter um potencial ação como antiviral. Entretanto, faz-se necessários novos estudos para complementar estes dados, como ensaios de cultura de célula para averiguar se o mesmo comportamento pode ser observado no citoplasma celular.

Quanto as perspectivas, para uma melhor caracterização dos fragmentos selecionados, serão realizados experimentos de melhoramento de emissão de fluorescência com os fragmentos P2_C07, P2_H11, P7_F07 e P7_E12, a fim de determinar suas constantes de dissociação (K_d) com destaque para o composto com melhor competição que apresenta uma fluorescência intrínseca. Para a suramina, serão realizados experimentos de STD e ^{15}N HSQC a fim de melhor caracterizar aspectos estruturais de interação como os resíduos do dgM2-1 envolvidos na formação deste complexo.

REFERÊNCIAS

- AGHA, R.; AVNER, J. R. Delayed Seasonal RSV Surge Observed During the COVID-19 Pandemic. **Pediatrics**, v. 148, n. 3, set. 2021.
- ASENJO, A.; VILLANUEVA, N. Regulated but not constitutive human respiratory syncytial virus (HRSV) P protein phosphorylation is essential for oligomerization. **FEBS Letters**, v. 467, n. 2–3, p. 279–284, fev. 2000.
- BAILLY, B. et al. Targeting human respiratory syncytial virus transcription anti-termination factor M2-1 to inhibit in vivo viral replication. **Scientific Reports** 2016 **6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–11, maio 2016.
- BERG, H. et al. NMR-based Fragment Screening in a Minimum Sample but Maximum Automation Mode. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, v. 2021, n. 172, p. e62262, jun. 2021.
- BINAS, O. et al. 19F NMR-Based Fragment Screening for 14 Different Biologically Active RNAs and 10 DNA and Protein Counter-Screens. **ChemBioChem**, v. 22, n. 2, p. 423–433, 15 jan. 2021.
- BLONDOT, M.-L. et al. Structure and Functional Analysis of the RNA- and Viral Phosphoprotein-Binding Domain of Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002734, 2012.
- BOCCALINI, S. et al. Human Respiratory Syncytial Virus Epidemiological Burden in Pediatric Outpatients in Italy: A Systematic Review. **Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1484, 14 set. 2023.
- BOHMWALD, K. et al. Lung pathology due to hRSV infection impairs blood-brain barrier permeability enabling astrocyte infection and a long-lasting inflammation in the CNS. **Brain, behavior, and immunity**, v. 91, p. 159–171, jan. 2021.
- Boletim InfoGripe - semana 50/2023 - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciência e tecnologia em saúde para a população brasileira.** Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/documento/boletim-infogripe-semana-50/2023>>. Acesso em: 27 maio. 2024.
- BON, M. et al. Fragment-based drug discovery—the importance of high-quality molecule libraries. **Molecular Oncology**, v. 16, n. 21, p. 3761, 1 nov. 2022.
- CARBERY, A. et al. Fragment Libraries Designed to Be Functionally Diverse Recover Protein Binding Information More Efficiently Than Standard Structurally Diverse Libraries. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 16, p. 11404–11413, 25 ago. 2022.

CARUSO, I. P. et al. Biophysical and Dynamic Characterization of Fine-Tuned Binding of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Core Domain to Long RNAs. **Journal of Virology**, v. 94, n. 23, set. 2020.

CASTAGNÉ, N. et al. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P–P and P–N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 6, p. 1643–1653, jun. 2004.

COLLINS, P. L. et al. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 1, p. 81–85, jan. 1996.

CONGREVE, M. et al. A “Rule of Three” for fragment-based lead discovery? **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 19, p. 876–877, 1 out. 2003.

DIETHELM-VARELA, B. Using NMR Spectroscopy in the Fragment-Based Drug Discovery of Small-Molecule Anticancer Targeted Therapies. **ChemMedChem**, v. 16, n. 5, p. 725–742, 3 mar. 2021.

EMWAS, A.-H. et al. NMR as a “Gold Standard” Method in Drug Design and Discovery. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 20, 9 out. 2020.

FAUSTHER-BOVENDO, H. et al. A Candidate Therapeutic Monoclonal Antibody Inhibits Both HRSV and HMPV Replication in Mice. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, 1 out. 2022.

GARCIA, J. et al. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: Formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22k protein. **Virology**, v. 195, n. 1, p. 243–247, jul. 1993.

GROVES, H. E. et al. The impact of the COVID-19 pandemic on influenza, respiratory syncytial virus, and other seasonal respiratory virus circulation in Canada: A population-based study. **The Lancet Regional Health – Americas**, v. 1, p. 100015, set. 2021.

JENKINS, V. A. et al. The Quest for a Respiratory Syncytial Virus Vaccine for Older Adults: Thinking beyond the F Protein. **Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 382, 7 fev. 2023.

KHANNA, M.; NANDI, T. Anti-viral activity of suramin against influenza A virus in A549 cells. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 3, p. 190–194, 28 out. 2022.

KHATTAR, S. K.; YUNUS, A. S.; SAMAL, S. K. Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P and P-L interactions using a minigenome system. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 4, p. 775–779, 2001.

KÖNDGEN, S. et al. Pandemic Human Viruses Cause Decline of Endangered Great Apes. **Current Biology**, v. 18, n. 4, p. 260–264, fev. 2008.

KUHN, R. J. et al. Structure of Dengue Virus. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–725, mar. 2002.

L, F. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 3, n. 1, 2003.

LAKOWICZ, J. R. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. Em: **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. [s.l.] Springer US, 2006. p. 27–61.

LAMEIRAS, P.; NUZILLARD, J. M. Tailoring the nuclear Overhauser effect for the study of small and medium-sized molecules by solvent viscosity manipulation. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 123, p. 1–50, 1 abr. 2021.

LAVOIE, P. M. et al. Potential resurgence of respiratory syncytial virus in Canada. **CMAJ**, v. 193, n. 29, p. E1140–E1141, jul. 2021.

LLORENTE, M. T. et al. Structural analysis of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein: characterization of an α -helical domain involved in oligomerization. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 1, p. 159–169, jan. 2006.

LOAIZA, R. A. et al. A molecular perspective for the development of antibodies against the human respiratory syncytial virus. **Antiviral research**, v. 222, 1 fev. 2024.

MASON, S. W. et al. Interaction between Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) M2-1 and P Proteins Is Required for Reconstitution of M2-1-Dependent RSV Minigenome Activity. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10670–10676, out. 2003.

MATTIA, G. DI et al. During the COVID-19 pandemic where has respiratory syncytial virus gone? **Pediatric Pulmonology**, v. 56, n. 10, p. 3106–3109, out. 2021.

MAYER, M.; MEYER, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 25, p. 6108–6117, 2001.

MLADENOV, G.; DIMITROV, V. S. Extraction of T2 from NMR linewidths in simple spin systems by use of reference deconvolution. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 672–680, 1 nov. 2001.

MOLINA, I. G. et al. Cooperative RNA Recognition by a Viral Transcription Antiterminator. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 6, p. 777–792, 2018.

MUNIYANDI, S. et al. Structure and Function of the Human Respiratory Syncytial Virus M2–1 Protein. **Subcellular Biochemistry**, v. 88, p. 245–260, 2018.

- ONO, K.; NAKANE, H.; FUKUSHIMA, M. Differential inhibition of various deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases by suramin. **European journal of biochemistry**, v. 172, n. 2, p. 349–53, 1 mar. 1988.
- PAPI, A. et al. Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Protein Vaccine in Older Adults. **The New England journal of medicine**, v. 388, n. 7, p. 595–608, 16 fev. 2023.
- PAROLA, F. et al. Impact of SARS-CoV-2 Pandemic and Lockdown on the HRSV Circulation: Experience of Three Spoke Hospitals in Northern Italy. **Viruses**, v. 16, n. 2, 1 fev. 2024.
- PEREIRA, N. et al. New Insights into Structural Disorder in Human Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein and Implications for Binding of Protein Partners. **The Journal of biological chemistry**, v. 292, n. 6, p. 2120–2131, fev. 2017.
- PERKINS, S. J. et al. The binding of monosaccharide inhibitors to hen egg-white lysozyme by proton magnetic resonance at 270 MHz and analysis by ring-current calculations. **The Biochemical journal**, v. 193, n. 2, p. 553–72, 1 fev. 1981.
- PIÑANA, M. et al. Genomic evolution of human respiratory syncytial virus during a decade (2013–2023): bridging the path to monoclonal antibody surveillance. **Journal of Infection**, v. 88, n. 5, p. 106153, 1 maio 2024a.
- PIÑANA, M. et al. Genomic evolution of human respiratory syncytial virus during a decade (2013–2023): bridging the path to monoclonal antibody surveillance. **The Journal of infection**, v. 88, n. 5, 1 maio 2024b.
- PJ, H.; RP, M.; SW, F. NMR-based screening in drug discovery. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 32, n. 3, 1999.
- PRINCETON UNIVERSITY. Large, delayed outbreaks of endemic diseases possible following COVID-19 controls – ScienceDaily. **ScienceDaily**, nov. 2020.
- RANDOLPH, D. G. **Preventing the next pandemic: Zoonotic diseases and how to break the chain of transmission**. [s.l.: s.n.].
- REN, H. et al. Intranasal immunization with HRSV prefusion F protein and CpG adjuvant elicits robust protective effects in mice. **Vaccine**, v. 40, n. 47, p. 6830–6838, 8 nov. 2022.
- ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981.
- SALVADOR, G. H. M. et al. Structural and functional characterization of suramin-bound MjTX-I from *Bothrops moojeni* suggests a particular myotoxic mechanism. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10317, 9 jul. 2018.

SELVARAJ, M. et al. The structure of the human respiratory syncytial virus m2-1 protein bound to the interaction domain of the phosphoprotein p defines the orientation of the complex. **mBio**, v. 9, n. 6, p. 1–13, nov. 2018.

SHANG, Z.; TAN, S.; MA, D. Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies. **International journal of biological sciences**, v. 17, n. 14, p. 4073–4091, 2021.

SINGH, M.; TAM, B.; AKABAYOV, B. NMR-Fragment Based Virtual Screening: A Brief Overview. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 2, 25 jan. 2018.

SREERAMULU, S. et al. Exploring the Druggability of Conserved RNA Regulatory Elements in the SARS-CoV-2 Genome. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 60, n. 35, p. 19191–19200, 23 ago. 2021.

TANNER, S. J. et al. Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1 protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 4, p. 1580–1585, jan. 2014.

TRAMUTO, F. et al. Respiratory Syncytial Virus: New Challenges for Molecular Epidemiology Surveillance and Vaccination Strategy in Patients with ILI/SARI. **Vaccines**, v. 9, n. 11, 16 nov. 2021.

UJIIE, M. et al. Early Release - Resurgence of Respiratory Syncytial Virus Infections during COVID-19 Pandemic, Tokyo, Japan - Volume 27, Number 11—November 2021 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. **Emerging infectious diseases**, v. 27, n. 11, ago. 2021.

VIEGAS, A. et al. Saturation-transfer difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. **Journal of Chemical Education**, v. 88, n. 7, p. 990–994, 2011.

WALSH, E. E. et al. Efficacy and Safety of a Bivalent RSV Prefusion F Vaccine in Older Adults. **The New England journal of medicine**, v. 388, n. 16, p. 1465–1477, 20 abr. 2023.

WIEDEMAR, N.; HAUSER, D. A.; MÄSER, P. 100 Years of Suramin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 3, 21 fev. 2020.

WILLSON, M. et al. Synthesis and activity of inhibitors highly specific for the glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 59, n. 2, p. 201–10, jun. 1993.

ZHANG, Y. L. et al. Suramin is an active site-directed, reversible, and tight-binding inhibitor of protein-tyrosine phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 20, p. 12281–12287, 15 maio 1998.