

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/10/2024.



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

João Victor Piloto

**Simulações moleculares da interação da região conservada de
cisteínas do ectodomínio da proteína G do hRSV com o receptor
celular CX3CR1 do hospedeiro**

São José do Rio Preto

2022

João Victor Piloto

**Simulações moleculares da interação da região conservada de
cisteínas do ectodomínio da proteína G do hRSV com o receptor
celular CX3CR1 do hospedeiro**

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

Financiadora: CAPES – Proc.:
88887.502565/2020-00

Orientador: Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso
Coorientador: Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto
2022

P643s

Piloto, João Victor

Simulações moleculares da interação da região conservada de cisteínas do ectodomínio da proteína G do hRSV com o receptor celular CX3CR1 do hospedeiro / João Victor Piloto. -- São José do Rio Preto, 2022 129 p.

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

Orientador: Ícaro Putinhon Caruso

Coorientadora: Fátima Pereira de Souza

1. Biofísica Molecular. 2. Virologia. 3. Dinâmica molecular. 4. Biomoléculas. 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.

João Victor Piloto

**Simulações moleculares da interação da região conservada de
cisteínas do ectodomínio da proteína G do hRSV com o receptor
celular CX3CR1 do hospedeiro**

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

São José do Rio Preto, 10 de outubro de 2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso

Departamento de Física – UNESP- São José do Rio Preto

Prof. Dr. Francisco Gomes-Neto

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - Rio de Janeiro

Profa. Dra. Gabriela Campos de Araújo

Docente da União das Faculdades dos Grandes Lagos – UNILAGO – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
10 de outubro de 2022

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho de mestrado contou com a ajuda de diversas pessoas, dentre as quais eu agradeço:

Aos meus pais pela paciência que tiveram ao longo desses anos, ao meu irmão e minha namorada por compreenderem minha ausência em alguns momentos e a todos meus familiares.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso pela ajuda, apoio, paciência que me concedia em todos os momentos, principalmente nos momentos mais difíceis.

A minha coorientadora Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza pelo apoio e ajuda a quem me foi dado.

Aos professores orientadores, que durante todos esses meses me acompanharam pontualmente, dando auxílio necessário para a finalização deste projeto.

Aos professores da banca por aceitarem avaliar meu trabalho de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À CAPES pelo apoio financeiro neste projeto (88887.502565/2020-00), e as outras equipes de fomentos: FAPESP, CNPQ, FINEP, LNCC e FAPERJ.

A todos que participaram das pesquisas, pela colaboração e disposição de me ajudarem na realização, continuidade e finalização deste projeto.

A todos meus sinceros agradecimentos!

No fim tudo dá certo, e se não deu certo é
porque ainda não chegou ao fim.
Fernando Sabino, 1998, p. 7

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) é um dos principais causadores de doenças respiratórias agudas como bronquiolite e pneumonia em crianças e idosos. Atualmente, as patologias causadas pelo hRSV não são bem entendidas e as vacinas formuladas não apresenta efetividade e segurança suficientes. A infetividade do vírus está relacionada com suas proteínas de membrana e dentre elas a glicoproteína G ou proteína G, que é responsável pela ligação do vírus à célula epiteliais do trato respiratório do hospedeiro e consequente instalação da infecção. Esta glicoproteína exerce um importante papel como antígeno de reconhecimento, sendo alvo para identificação do RSV através de anticorpos. Há evidências na literatura de que a proteína G interage com um receptor celular, conhecido como CX3CR1, porém não existe informações estruturais experimentais sobre essa interação. O objetivo do trabalho foi caracterizar a interação da região conservada de cisteína do ectodomínio da proteína G com o receptor celular CX3CR1 utilizando ferramentas computacionais. A partir da abordagem de modelagem molecular, modelos estruturais para as quatro isoformas do receptor celular foram calculados, os quais passaram por uma etapa de 300 ns de simulação de dinâmica molecular em bicamada lipídica de POPC para avaliação de suas estabilidades estruturais. Em seguida, cálculos de *docking* molecular buscaram pela conformação mais provável do peptídeo da região conservada de cisteína da G na interação com a região N-terminal do barril de alfa-hélices do CX3CR1. Por fim, novas simulações de 300 ns reportaram a estabilidade estrutural do modelo proposto para o complexo CX3CR1/peptídeo da G (CX3CR1/G), apontando os resíduos LYS-171, GLY-177, TYR-179, GLN-184 e ARG-272 da proteína como importante para a formação de pontes de hidrogênio com o peptídeo. Os cálculos de PCA e de RMSF mostraram uma comparação entre as formas livres e ligadas, mostrando um maior grau de flexibilidade das regiões N e C-terminais, assim como uma maior flexibilidade das alças entre as hélices α das isoformas do CX3CR1. Os cálculos de energia livre de ligação teórica (MM/PBSA) mostraram que os resíduos ácidos interagem de forma favorável para a ligação e manutenção do peptídeo da G na região do *docking*, indicando que a isoforma 1 do CX3CR1 é aquela com energia de ligação mais favorável para a interação com o peptídeo da G. As informações

estruturais produzidas no presente trabalho podem trazer luz ao mecanismo de interação da proteína G do hRSV com o receptor celular CX3CR1, assim como proporcionar uma caracterização molecular do processo de adesão do vírus à célula do hospedeiro.

Palavras chaves: Hrsv. Proteína G. Receptor celular CX3CR1. Modelagem molecular. *Docking* molecular. Simulações de dinâmica molecular.

ABSTRACT

Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is one of the main causes of acute respiratory diseases such as bronchiolitis and pneumonia in children and the elderly. Currently, the pathologies caused by hRSV are not well understood and the formulated vaccines do not present sufficient effectiveness and safety. The infectivity of the virus is related to its membrane proteins and among them the G glycoprotein or G protein, which is responsible for binding the virus to the epithelial cells of the host's respiratory tract and consequent installation of the infection. This glycoprotein plays an important role as a recognition antigen, being a target for RSV identification through antibodies. There is evidence in the literature that the G protein interacts with a cellular receptor, known as CX3CR1, but there is no experimental structural information about this interaction. The objective of this work was to characterize the interaction of the conserved region of cysteine of the ectodomain of the G protein with the cellular receptor CX3CR1 using computational tools. From the molecular modeling approach, structural models for the four cellular receptor isoforms were calculated, which underwent a 300 ns step of molecular dynamics simulation in a POPC lipid bilayer to evaluate their structural stabilities. Then, molecular docking calculations looked for the most likely conformation of the peptide of the conserved region of cysteine of G in the interaction with the N-terminal region of the barrel of alpha-helices of CX3CR1. Finally, new 300 ns simulations reported the structural stability of the proposed model for the CX3CR1/G peptide complex (CX3CR1/G), pointing to residues LYS-171, GLY-177, TYR-179, GLN-184 and ARG- 272 of the protein as important for the formation of hydrogen bonds with the peptide. The PCA and RMSF calculations showed a comparison between the free and bound forms, showing a greater degree of flexibility of the N and C-terminal regions, as well as a greater flexibility of the loops between the α helices of the CX3CR1 isoforms. Theoretical binding free energy (MM/PBSA) calculations showed that acid residues interact favorably for the binding and maintenance of the G peptide in the docking region, indicating that CX3CR1 isoform 1 is the one with the highest binding energy. Favorable for the interaction with the G peptide. The structural information produced in the present work may shed light on the mechanism of interaction of the hRSV G protein with the cell receptor CX3CR1, as well

as provide a molecular characterization of the virus adhesion process to the cell of the host.

Keywords: hRSV. Protein G. CX3CR1 cell receptor. Molecular modeling. Molecular docking. Molecular dynamics simulations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Representação esquemática do RSV, sendo representadas as proteínas SH, F, G, M, P e N e o envelope da bicamada lipídica.....	22
FIGURA 2: Representação esquemática dos domínios da Glicoproteína G do hRSV.....	25
FIGURA 3: Sequências dos resíduos de aminoácidos das isoformas 1 (preto), 2 (vermelho), 3 (azul) e 4 (verde).....	26
FIGURA 4: Modelos estruturais calculados pelos servidores de modelagem molecular RosettaFOLD, Rosetta TR, I-Tasser e Phyre2. Modelos estruturais do receptor celular CX3CR1: isoforma 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D). As proteínas são apresentadas com o modelo <i>cartoon</i> utilizando o programa de visualização PyMOL. O barril de hélices alfa é denotado em cinza e as regiões N e C-terminal são destacadas em verde e azul, respectivamente.....	45
FIGURA 5: Gráficos de Ramachandran para ângulos torcionais dos resíduos dos modelos estruturais para o receptor celular CX3CR1 ou isoforma 1 determinados pelos servidores Rosetta FOLD (A), Rosetta TR (B), Phyre2 (C) e I-Tasser (D). Em vermelho resíduos em regiões favoráveis, amarelo escuro para regiões adicionais permitidas, em amarelo claro para regiões generosamente adicionais e em branco para regiões não permitidas.....	47
FIGURA 6: Gráficos de Ramachandran para ângulos torcionais dos resíduos dos modelos estruturais da isoforma 2 determinados pelos servidores Rosetta FOLD (A), Rosetta TR (B), Phyre2 (C) e I-Tasser (D). Em vermelho resíduos em regiões favoráveis, amarelo escuro para regiões adicionais permitidas, em amarelo claro para regiões generosamente adicionais e em branco para regiões não permitidas....	49
FIGURA 7: Gráficos de Ramachandran para ângulos torcionais dos resíduos dos modelos estruturais da isoforma 3 determinados pelos servidores Rosetta FOLD (A), Rosetta TR (B), Phyre2 (C) e I-Tasser (D). Em vermelho resíduos em regiões favoráveis, amarelo escuro para regiões adicionais permitidas, em amarelo claro para regiões generosamente adicionais e em branco para regiões não permitidas....	51
FIGURA 8: Gráficos de Ramachandran para ângulos torcionais dos resíduos dos modelos estruturais da isoforma 4 determinados pelos servidores Rosetta FOLD (A), Rosetta TR (B), Phyre2 (C) e I-Tasser (D). Em vermelho resíduos em regiões favoráveis, amarelo escuro para regiões adicionais permitidas, em amarelo claro para regiões generosamente adicionais e em branco para regiões não permitidas....	53
FIGURA 9: Análise de RMSD dos átomos da cadeia principal (A), do número de contatos < 0,6 nm por resíduos entre os átomos dos resíduos N-terminal e da fita beta GLU174–GLY177 (B), do ângulo de inclinação da proteína com relação a bicamada lipídica (C) e do ângulo do eixo principal com relação a normal da bicamada (D) ao longo das trajetórias de 300 ns das simulações de DM dos modelos estruturais da isoforma 1 do C3XCR1 determinados pelos servidores Rosetta FOLD (preto), Rosetta TR (vermelho), I-tasser (azul) e Phyre2 (ciano).....	56
FIGURA 10: Estruturas representativas para os modelos estruturais da isoforma 1 do Rosetta FOLD (A), Rosetta TR (B), I-Tasser (C) e Phyre2 (D) em bicamada lipídica de POPC, as quais foram obtidas	

pela análise de clusterização dos 300 ns de simulações de DM. A proteína é representada em modelo de *cartoon* e os lipídeos como modelos de esferas e linhas. O barril de hélices alfa da proteína são denotados em cinza, a região N-terminal em verde e a C-terminal em azul. O átomo de fósforo da cabeça polar dos lipídeos é mostrado como esfera laranja e a cauda hidrofóbica como linhas cinzas. As imagens da direita mostram uma vista de cima de como a proteína encontra-se inserida na bicamada lipídica de POPC.....58

FIGURA 11: Perfil de densidade de massa para a bicamada de POPC solvatada para as quatro isoformas. A espessura da bicamada é determinada pela distância P8-P8. A parte apolar da bicamada de POPC é denotada com uma linha preta, os fósforos P8 com linha vermelho, a proteína com linha verde e moléculas de água com linha azul.....60

FIGURA 12: Análise de RMSD dos átomos da cadeia principal (A) e do número de contados < 0,6 nm entre os átomos dos resíduos N-terminal e da fita beta GLU174–GLY177 (B) ao longo das trajetórias de 300 ns das simulações de DM dos modelos estruturais das isoformas 2, 3 e 4 do C3XCR1 determinados pelos servidores Rosetta FOLD.....61

FIGURA 13: Estruturas representativas para os modelos estruturais da isoforma 2 (A), isoforma 3 (B) e isoforma 4 (C) em bicamada lipídica de POPC, as quais foram obtidas pela análise de clusterização dos 300 ns de simulações de DM. A proteína é representada em modelo de *cartoon* e os lipídeos como modelos de esferas e linhas. O barril de hélices alfa da proteína são denotados em cinza, a região N-terminal em verde e a C-terminal em azul. O átomo de fósforo da cabeça polar dos lipídeos é mostrado como esfera laranja e a cauda hidrofóbica como linhas cinzas. As imagens da direita mostram uma vista de cima de como a proteína encontra-se inserida na bicamada lipídica de POPC.....62

FIGURA 14: Perfil de densidade de massa para a bicamada de POPC solvatada com NaCl para as quatro isoformas. A espessura da bicamada é determinada pela distância P8-P8. A parte apolar da bicamada de POPC é denotada com uma linha preta, os íons de NaCl são mostrados com linha amarela, os fósforos P8 com linha vermelho, a proteína com linha verde e moléculas de água com linha azul.....64

FIGURA 15: Análise de RMSD dos átomos da cadeia principal das isoformas (A) e do ângulo de inclinação da proteína com relação a bicamada lipídica de POPC com 150 mM de NaCl (B) ao longo das trajetórias de 300 ns das simulações de DM das isoformas do modelo estrutural de CX3CR1. Sendo a isoforma 1 representada em preto, a isoforma 2 em vermelho, a isoforma 3 em verde e a isoforma 4 em azul.....66

FIGURA 16: Comparação entre as estruturas de POPC e DPPC.....67

FIGURA 17: Perfil de densidade de massa para a bicamada de DPPC solvatada para as quatro isoformas. A espessura da bicamada é determinada pela distância P8-P8. A parte apolar da bicamada de DPPC é denotada com uma linha preta, os fósforos P8 com linha vermelho, a proteína com linha verde e moléculas de água com linha azul.....68

FIGURA 18: Perfil de densidade de massa para a bicamada de DPPC solvatada com concentração de íons NaCl de 150mM para as quatro isoformas. A espessura da bicamada é determinada pelas

distância P8-P8. A parte apolar da bicamada de DPPC (preto), os íons de NaCl (amarelo), os fósforos P8 (vermelho), a parte da proteína (verde) e a água (azul).....69

FIGURA 19: Análise de RMSD dos átomos da cadeia principal das isoformas (A e B) e do ângulo de inclinação da proteína com relação a normal da bicamada lipídica de DPPC (C e D), sendo os resultados na presença de 150 mM de cloreto de sódio na coluna da direita e sem NaCl na coluna da esquerda, ao longo das trajetórias de 300 ns das simulações de DM das isoformas para os modelos estruturais do receptor celular CX3CR1. Sendo a isoforma 1 representada em preto, isoforma 2 em vermelho, isoforma 3 em verde e isoforma 4 em azul.....70

FIGURA 20: Estrutura de cristal (PDB 4XTI) do complexo formado entre a fractalcina CX3CL1 (magenta) com o receptor homólogo US28 (cinza). As proteínas foram representadas com o modelo *cartoon*, com os resíduos N- e C-terminais denotados em verde e azul, respectivamente. A correspondente fita beta do homólogo CX3CR1 (GLU174–GLY177, numeração referente a isoforma 1) é destacada em ciano na cavidade de ligação da proteína.....72

FIGURA 21: Resultados dos cálculos de *docking* molecular para o servidor ClusPro (A) e HADDOCK (B). A proteína é apresentada com o modelo de *cartoon*, sendo o barril de hélices alfa colorido em cinza e o N e C-terminal em verde e azul, respectivamente. A fita beta GLU174–GLY177 (numeração referente a isoforma 1) na cavidade de ligação da proteína é destacada em ciano. O peptídeo da região de cisteínas conservadas da proteína G do hRSV é mostrado como modelo de *cartoon* em magenta e suas pontes de dissulfeto são denotadas com o modelo de *sticks* em amarelo.....74

FIGURA 22: Valores de RMSD calculados para os átomos da cadeia principal do proteína e do peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulação de DM para os modelos estruturais dos complexos determinados pelo servidores ClusPro (esquerda) e HADDOCK (direita). Os resultados de cada isoforma é apresentado no seguinte esquema de cores: preto para a isoforma 1, vermelho para a 2, azul para a 3 e ciano para a 4. A linha grossa na parte B denota os valores de RMSD do peptídeo para o alinhamento estrutural realizado com relação a proteína, enquanto que a linha fina se refere a um alinhamento feito com relação ao próprio peptídeo.....76

FIGURA 23: Valores de variação/diferença de distância (distância num tempo qualquer subtraído pela distância na posição inicial $t = 0$ ns) calculadas entre os centros de massa do barril de hélices alfa da proteína e do peptídeo da G ao longo de 300 ns de simulação para os modelos estruturais dos complexos determinados pelo ClusPro (esquerda) e HADDOCK (direita). Os resultados de cada isoforma é apresentado no seguinte esquema de cores: preto para a isoforma 1, vermelho para a 2, azul para a 3 e ciano para a 4.....77

FIGURA 24: Comparação entre as posições do peptídeo da G nos modelos estruturais dos cálculos de *docking* molecular, (A) ClusPRO e (B) HADDOCK, e nas estruturas representativas determinadas pela análise de clusterização das trajetórias de 300 ns de simulações dos complexos. A proteína é apresentada com o modelo de *cartoon*, sendo o barril de hélices alfa colorido em cinza e o N e C-terminal em verde e azul, respectivamente. A fita beta GLU174–GLY177 (numeração referente a isoforma 1) na cavidade de ligação da proteína é destacado em ciano. O peptídeo da região de cisteínas conservadas

da proteína G do hRSV é mostrado como modelo de *cartoon* em magenta para o modelo de *docking* e em amarelo para o estrutura representativa da clusterização.....79

FIGURA 25: Número de contatos menor que 0,6 nm determinados entre os átomos da proteína e do peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulação para os modelos estruturais dos complexos calculados pelo ClusPro (esquerda) e HADDOCK (direita). Os resultados de cada isoforma é apresentado no seguinte esquema de cores: preto para a isoforma 1, vermelho para a 2, azul para a 3 e ciano para a 4.....80

FIGURA 26: Número de ligações de hidrogênios determinados entre os átomos da proteína e do peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulação para os modelos estruturais dos complexos calculados pelo ClusPro (esquerda) e HADDOCK (direita). Os resultados de cada isoforma é apresentado no seguinte esquema de cores: preto para a isoforma 1, vermelho para a 2, azul para a 3 e ciano para a 4.....81

FIGURA 27: Representação esquemática em cartoon do receptor celular CX3CR1 e peptídeo G e em sticks os resíduos mais recorrentes da persistência das ligações de hidrogênios. Em cinza o receptor celular, com o N-terminal em verde, em ciano a fita β e os resíduos recorrentes na forma de sticks, carbonos em cinza, nitrogênio em azul e em vermelho oxigênio (A). Em magenta o peptídeo G, sendo as cisteínas representadas em amarelo na forma de sticks e os resíduos recorrentes em sticks, sendo carbono em bege, nitrogênio azul e oxigênio em vermelho (B).....88

FIGURA 28: Valores de RMSF em função do número de resíduos para as quatro isoformas, isoforma 1 (A), isoforma 2 (B), isoforma 3 (C) e isoforma 4 (D) do receptor celular CX3CR1, com a forma livre do receptor celular CX3CR1 (preto), sua estrutura na forma de complexo CX3CR1/G obtida pela DM do resultado do ClusPro (verde) e sua estrutura na forma de complexo CX3CR1/G obtida pela DM do resultado do HADDOCK (azul). A estrutura secundária está mostrada ao topo de cada isoforma, sendo as hélices α do barril em amarelo, as folhas β em verde, e em cinza a estrutura secundária do N-terminal e C-terminal. Os cálculos de RMSF foram realizados para os 300 ns de simulação de dinâmica molecular.....91

FIGURA 29: Gráficos de dispersão PCA, PCA1 e PCA2 para CX3CR1 livre (pontos vermelhos) e para complexo CX3CR1/G da DM dado pelo *docking* do ClusPro(pontos pretos) da isoforma 1 (A). (B e C) Movções filtradas de os autovetores de PCA1 (B) e PCA2 (C) para a dinâmica dados de CX3CR1 em sua forma livre e na sua forma de complexo CX3CR1/G (D e E) . O movimento é indicada pela variação de cor de azul para vermelho. Para realizar os cálculos de PCA, os 300 ns de trajetórias foram concatenados para cada uma das moléculas sistemas (CX3CR1 livre ou CX3CR1/G).....92

FIGURA 30: Gráficos de dispersão PCA, PCA1 e PCA2 para CX3CR1 livre (pontos vermelhos) e para complexo CX3CR1/G da DM dado pelo *docking* do ClusPro(pontos pretos) da isoforma 2 (A). (B e C) Movções filtradas de os autovetores de PCA1 (B) e PCA2 (C) para a dinâmica dados de CX3CR1 em sua forma livre e na sua forma de complexo CX3CR1/G (D e E) . O movimento é indicada pela variação de cor de azul para vermelho. Para realizar os cálculos de PCA, os 300 ns de trajetórias foram concatenados para cada uma das moléculas sistemas (CX3CR1 livre ou CX3CR1/G).....94

FIGURA 31: Gráficos de dispersão PCA, PCA1 e PCA2 para CX3CR1 livre (pontos vermelhos) e para complexo CX3CR1/G da DM dado pelo *docking* do ClusPro(pontos pretos) da isoforma 3 (A). (B e C) Moções filtradas de os autovetores de PCA1 (B) e PCA2 (C) para a dinâmica dados de CX3CR1 em sua forma livre e na sua forma de complexo CX3CR1/G (D e E) . O movimento é indicada pela variação de cor de azul para vermelho. Para realizar os cálculos de PCA, os 300 ns de trajetórias foram concatenados para cada uma das moléculas sistemas (CX3CR1 livre ou CX3CR1/G).....95

FIGURA 32: Gráficos de dispersão PCA, PCA1 e PCA2 para CX3CR1 livre (pontos vermelhos) e para complexo CX3CR1/G da DM dado pelo *docking* do ClusPro(pontos pretos) da isoforma 4 (A). (B e C) Moções filtradas de os autovetores de PCA1 (B) e PCA2 (C) para a dinâmica dados de CX3CR1 em sua forma livre e na sua forma de complexo CX3CR1/G (D e E) . O movimento é indicada pela variação de cor de azul para vermelho. Para realizar os cálculos de PCA, os 300 ns de trajetórias foram concatenados para cada uma das moléculas sistemas (CX3CR1 livre ou CX3CR1/G).....97

FIGURA 33: Gráficos de dispersão PCA, PCA1 e PCA2 para CX3CR1 livre (pontos vermelhos) e para complexo CX3CR1/G da DM dado pelo *docking* do HADDOCK(pontos azuis) da isoforma 1 (A). (B e C) Moções filtradas de os autovetores de PCA1 (B) e PCA2 (C) para a dinâmica dados de CX3CR1 em sua forma livre e na sua forma de complexo CX3CR1/G (D e E) . O movimento é indicada pela variação de cor de azul para vermelho. Para realizar os cálculos de PCA, os 300 ns de trajetórias foram concatenados para cada uma das moléculas sistemas (CX3CR1 livre ou CX3CR1/G).....99

FIGURA 34: Gráficos de dispersão PCA, PCA1 e PCA2 para CX3CR1 livre (pontos vermelhos) e para complexo CX3CR1/G da DM dado pelo *docking* do HADDOCK(pontos azuis) da isoforma 2 (A). (B e C) Moções filtradas de os autovetores de PCA1 (B) e PCA2 (C) para a dinâmica dados de CX3CR1 em sua forma livre e na sua forma de complexo CX3CR1/G (D e E) . O movimento é indicada pela variação de cor de azul para vermelho. Para realizar os cálculos de PCA, os 300 ns de trajetórias foram concatenados para cada uma das moléculas sistemas (CX3CR1 livre ou CX3CR1/G).....100

FIGURA 35: Gráficos de dispersão PCA, PCA1 e PCA2 para CX3CR1 livre (pontos vermelhos) e para complexo CX3CR1/G da DM dado pelo *docking* do HADDOCK(pontos azuis) da isoforma 3 (A). (B e C) Moções filtradas de os autovetores de PCA1 (B) e PCA2 (C) para a dinâmica dados de CX3CR1 em sua forma livre e na sua forma de complexo CX3CR1/G (D e E) . O movimento é indicada pela variação de cor de azul para vermelho. Para realizar os cálculos de PCA, os 300 ns de trajetórias foram concatenados para cada uma das moléculas sistemas (CX3CR1 livre ou CX3CR1/G).....102

FIGURA 36: Gráficos de dispersão PCA, PCA1 e PCA2 para CX3CR1 livre (pontos vermelhos) e para complexo CX3CR1/G da DM dado pelo *docking* do HADDOCK(pontos azuis) da isoforma 4 (A). (B e C) Moções filtradas de os autovetores de PCA1 (B) e PCA2 (C) para a dinâmica dados de CX3CR1 em sua forma livre e na sua forma de complexo CX3CR1/G (D e E) . O movimento é indicada pela variação de cor de azul para vermelho. Para realizar os cálculos de PCA, os 300 ns de trajetórias foram concatenados para cada uma das moléculas sistemas (CX3CR1 livre ou CX3CR1/G).....103

FIGURA 37: Contribuição individual de cada resíduo de aminoácido na energia total do receptor celular CX3CR1 para os resultados de docking obtidos pelas quatro isoformas do server ClusPro. Sendo contribuição favorável (vermelho) e contribuição desfavorável (azul).....105

FIGURA 38: Contribuição individual de cada resíduo de aminoácido na energia total do receptor celular CX3CR1 para os resultados de docking obtidos pelas quatro isoformas do server HADDOCK. Sendo contribuição favorável (vermelho) e contribuição desfavorável (azul).....106

FIGURA 39: Estrutura representativa das isoformas do receptor celular CX3CR1 com os resíduos que apresentam uma contribuição favoráveis e desfavoráveis significativas (acima da média mais desvio padrão) para a energia livre de ligação total para as simulações de DM dos modelos estruturais dos complexos com o peptídeo da G determinados pelo servidor ClusPro. As contribuições favoráveis e desfavoráveis para as energias totais são representadas gradientes de cores indo vermelho para o azul, respectivamente. As barras de cores denotam o aspecto quantitativo de cada gradiente de cor. As isoformas 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) são apresentadas em modelos de *cartoon* em cinza e os resíduos de aminoácidos na forma de sticks.....111

FIGURA 40: Estrutura representativa das isoformas do receptor celular CX3CR1 com os resíduos que apresentam uma contribuição favoráveis e desfavoráveis significativas (acima da média mais desvio padrão) para a energia livre de ligação total para as simulações de DM dos modelos estruturais dos complexos com o peptídeo da G determinados pelo servidor HADDOCK. As contribuições favoráveis e desfavoráveis para as energias totais são representadas gradientes de cores indo vermelho para o azul, respectivamente. As barras de cores denotam o aspecto quantitativo de cada gradiente de cor. As isoformas 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) são apresentadas em modelos de *cartoon* em cinza e os resíduos de aminoácidos na forma de sticks.....116

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores de área por lipídio em bicamada lipídica de POPC dos programas utilizados para modelagem molecular.....	40
TABELA 2: Valores de área por lipídio das isoformas utilizando Rosetta FOLD para os modelos de bicamada lipídica em POPC e DPPC.....	40
TABELA 3: Valores das porcentagens dos ângulos torcionais dos resíduos dos modelos estruturais do CX3CR1 ou isoforma 1 encontrados nas regiões descritas pelo gráfico de Ramachandran.....	47
TABELA 4: Valores das porcentagens dos ângulos torcionais dos resíduos dos modelos estruturais da isoforma 2 encontrados nas regiões descritas pelo gráfico de Ramachandran.....	49
TABELA 5: Valores das porcentagens dos ângulos torcionais dos resíduos dos modelos estruturais da isoforma 3 encontrados nas regiões descritas pelo gráfico de Ramachandran.....	51
TABELA 6: Valores das porcentagens dos ângulos torcionais dos resíduos dos modelos estruturais da isoforma 4 encontrados nas regiões descritas pelo gráfico de Ramachandran.....	53
TABELA 7: Valores de RMSD para a região do barril de hélices alfa calculados para os modelos estruturais determinados pelos servidores Rosetta FOLD, Rosetta TR, I-tasser e Phyre2. O modelo do Rosetta FOLD foi utilizado como referência para o alinhamento estrutural e cálculo de RMSD.....	54
TABELA 8: Porcentagens de persistência maior que 10% para as ligações de hidrogênio formadas entre o receptor celular CX3CR1 e o peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulações de DM para o modelo estrutural do complexo obtidos a partir do servidor ClusPro. Para diferenciar da proteína, os resíduos do peptídeo da G são denotados com um asterisco (*).....	83
TABELA 9: Porcentagens de persistência maior que 10% para as ligações de hidrogênio formadas entre a isoforma 2 do receptor celular CX3CR1 e o peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulações de DM para o modelo estrutural do complexo obtidos a partir do servidor ClusPro. Para diferenciar da proteína, os resíduos do peptídeo da G são denotados com um asterisco (*).....	83
TABELA 10: Porcentagens de persistência maior que 10% para as ligações de hidrogênio formadas entre a isoforma 3 do receptor celular CX3CR1 e o peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulações de DM para o modelo estrutural do complexo obtidos a partir do servidor ClusPro. Para diferenciar da proteína, os resíduos do peptídeo da G são denotados com um asterisco (*).....	84
TABELA 11: Porcentagens de persistência maior que 10% para as ligações de hidrogênio formadas entre a isoforma 4 do receptor celular CX3CR1 e o peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulações de DM para o modelo estrutural do complexo obtidos a partir do servidor ClusPro. Para diferenciar da proteína, os resíduos do peptídeo da G são denotados com um asterisco (*).....	84
TABELA 12: Porcentagens de persistência maior que 10% para as ligações de hidrogênio formadas entre o receptor celular CX3CR1 e o peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulações de DM para o modelo estrutural do complexo obtidos a partir do servidor HADDOCK. Para diferenciar da proteína, os resíduos do peptídeo da G são denotados com um asterisco (*).....	85
TABELA 13: Porcentagens de persistência maior que 10% para as ligações de hidrogênio formadas entre a isoforma 2 do receptor celular CX3CR1 e o peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulações	

de DM para o modelo estrutural do complexo obtidos a partir do servidor HADDOCK. Para diferenciar da proteína, os resíduos do peptídeo da G são denotados com um asterisco (*).....	86
TABELA 14: Porcentagens de persistência maior que 10% para as ligações de hidrogênio formadas entre a isoforma 3 do receptor celular CX3CR1 e o peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulações de DM para o modelo estrutural do complexo obtidos a partir do servidor HADDOCK. Para diferenciar da proteína, os resíduos do peptídeo da G são denotados com um asterisco (*).....	86
TABELA 15: Porcentagens de persistência maior que 10% para as ligações de hidrogênio formadas entre a isoforma 4 do receptor celular CX3CR1 e o peptídeo da G ao longo dos 300 ns de simulações de DM para o modelo estrutural do complexo obtidos a partir do servidor HADDOCK. Para diferenciar da proteína, os resíduos do peptídeo da G são denotados com um asterisco (*).....	87
TABELA 16: Resíduos de aminoácidos da isoforma 1 do CX3CR1 e seus respectivos valores das contribuições favoráveis e desfavoráveis (acima do valor de corte média mais desvio padrão) para a energia livre de ligação total para a trajetória de DM do modelo estrutural determinado pelo servidor ClusPro.....	108
TABELA 17: Resíduos de aminoácidos da isoforma 2 do CX3CR1 e seus respectivos valores das contribuições favoráveis e desfavoráveis (acima do valor de corte média mais desvio padrão) para a energia livre de ligação total para a trajetória de DM do modelo estrutural determinado pelo servidor ClusPro.....	108
TABELA 18: Resíduos de aminoácidos da isoforma 3 do CX3CR1 e seus respectivos valores das contribuições favoráveis e desfavoráveis (acima do valor de corte média mais desvio padrão) para a energia livre de ligação total para a trajetória de DM do modelo estrutural determinado pelo servidor ClusPro.....	109
TABELA 19: Resíduos de aminoácidos da isoforma 4 do CX3CR1 e seus respectivos valores das contribuições favoráveis e desfavoráveis (acima do valor de corte média mais desvio padrão) para a energia livre de ligação total para a trajetória de DM do modelo estrutural determinado pelo servidor ClusPro.....	110
TABELA 20: Resíduos de aminoácidos da isoforma 1 do CX3CR1 e seus respectivos valores das contribuições favoráveis e desfavoráveis (acima do valor de corte média mais desvio padrão) para a energia livre de ligação total para a trajetória de DM do modelo estrutural determinado pelo servidor HADDOCK.....	112
TABELA 21: Resíduos de aminoácidos da isoforma 2 do CX3CR1 e seus respectivos valores das contribuições favoráveis e desfavoráveis (acima do valor de corte média mais desvio padrão) para a energia livre de ligação total para a trajetória de DM do modelo estrutural determinado pelo servidor HADDOCK.....	113
TABELA 22: Resíduos de aminoácidos da isoforma 3 do CX3CR1 e seus respectivos valores das contribuições favoráveis e desfavoráveis (acima do valor de corte média mais desvio padrão) para a energia livre de ligação total para a trajetória de DM do modelo estrutural determinado pelo servidor HADDOCK.....	113

TABELA 23: Resíduos de aminoácidos da isoforma 4 do CX3CR1 e seus respectivos valores das contribuições favoráveis e desfavoráveis (acima do valor de corte média mais desvio padrão) para a energia livre de ligação total para a trajetória de DM do modelo estrutural determinado pelo servidor HADDOCK.....	114
TABELA 24: Valores das contribuições favoráveis e desfavoráveis para os resíduos de aminoácidos do peptídeo da G com as respectivas isoformas (1,2,3 e 4) obtidos para as simulações de DM dos modelos estruturais dos complexos determinados pelo servidor ClusPro.....	117
TABELA 25 Valores das contribuições favoráveis e desfavoráveis para os resíduos de aminoácidos do peptídeo da G com as respectivas isoformas (1,2,3 e 4) obtidos para as simulações de DM dos modelos estruturais dos complexos determinados pelo servidor HADDOCK.....	118
TABELA 26: Valores de variação de energia livre de ligação total para a interação do peptídeo da G com as isoformas (1,2,3 e 4) calculados a partir das simulações de DM para os modelos estruturais dos complexos obtidos pelos servidores ClusPro e HADDOCK.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CX3CR1 - Receptor Celular para a Adesão da Proteína G

DM - Dinâmica Molecular

DPPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina

hRSV - *Respiratory Syncytial Virus human* (Vírus Sincicial Respiratório humano)

LNCC- Laboratório Nacional de Computação Científica

POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina.

PCA - *Principal Component Analysis* (Análise da Componente Principal)

RMSD - *Root Mean Square Deviation* (Desvio da Raiz Quadrática Média)

RMSF - *Root Mean Square Fluctuation* (flutuação da Raiz Quadrática Média)

GROMACS- Groningen Machine for Chemical Simulations

GROMOS –Groningen Molecular Simulations

PDB- Protein Data Bank

PyMOL- Sistema de Visualização Molecular

VMD- Visual Molecular Dynamics

Sumário

1	INTRODUÇÃO	200
1.1	Dinâmica Molecular.....	27
1.2	Docking Molecular.....	30
1.3	Cálculo de Energia Livre de Ligação.....	33
2	OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	35
3	METODOLOGIA	36
3.1	Modelagem Molecular.....	36
3.2	Dinâmica Molecular em Bicamada Lipídica POPC e DPPC.....	38
3.3	Docking Molecular.....	40
3.4	Dinâmica Molecular dos Complexos das Isoformas do CX3CR1 com o Peptídeo da Proteína G.....	42
3.5	Cálculo de Variação de Energia Livre de Ligação Teórica.....	44
4	RESULTADOS e DISCUSSÕES	44
4.1	Modelagem Molecular.....	44
4.2	Simulações de Dinâmica Molecular do Receptor e suas Isoformas.....	54
4.3	Simulações de Dinâmica Molecular de CX3CR1 e suas Isoformas em POPC na Presença de Força Iônica e em DPPC na Ausência e Presença de Força Iônica.....	63
4.4	Cálculos de Docking Molecular e Simulações de Dinâmica Molecular da Interação do CX3CR1 com o Peptídeo da Região Conservada de Cisteínas da Proteína G do hRSV.....	71
4.5	Cálculo de Energia Livre de Ligação.....	104
5	CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS	120
	REFERÊNCIAS	122

1 INTRODUÇÃO

O Vírus Sincicial Respiratório humano (do inglês, *human Respiratory Syncytial Virus* - hRSV) foi isolado pela primeira vez em 1956, por Morris, Blount e Savage, em estudo para investigar o agente etiológico responsável pela doença respiratória aguda em chimpanzés do Instituto de Pesquisa Walter Reed Army, nos Estados Unidos da América, sendo descrito como “agente de coriza de chimpanzé” (MORRIS et al., 1956; COLLINS & GRAHAM, 2008). Em 1957, após estudos em cultura de tecido, o vírus foi renomeado para Vírus Sincicial Respiratório (RSV), devido ao seu padrão exclusivo de formar sincícios celulares multinucleados e, só em 1981, começou a caracterização detalhada do RSV com a clonagem molecular e sequenciamento do seu genoma (COLLINS et al., 2013; HOGAN et al., 2018).

Este vírus é um dos principais agentes causadores de doenças agudas do trato respiratório, tais como pneumonia e bronquiolite em crianças com idade igual e abaixo de cinco anos, em todo o mundo, através de epidemias sazonais decorrente do clima de cada região do planeta. Todavia, não são somente as crianças que são acometidas por esse vírus, idosos e imunocomprometidos também fazem parte do grupo de risco, aumentando a taxa de mortalidade nessas epidemias. O principal grupo de risco são crianças que apresentam prematuridade, imunodeficiência congênita e doenças cardiorrespiratórias (COLLINS; CROWE JR, 2007; HALL et al., 2009; OTHUMPANGAT et al., 2009; FALSEY et al., 2005; RICCETTO et al., 2009; YE, et al., 2019).

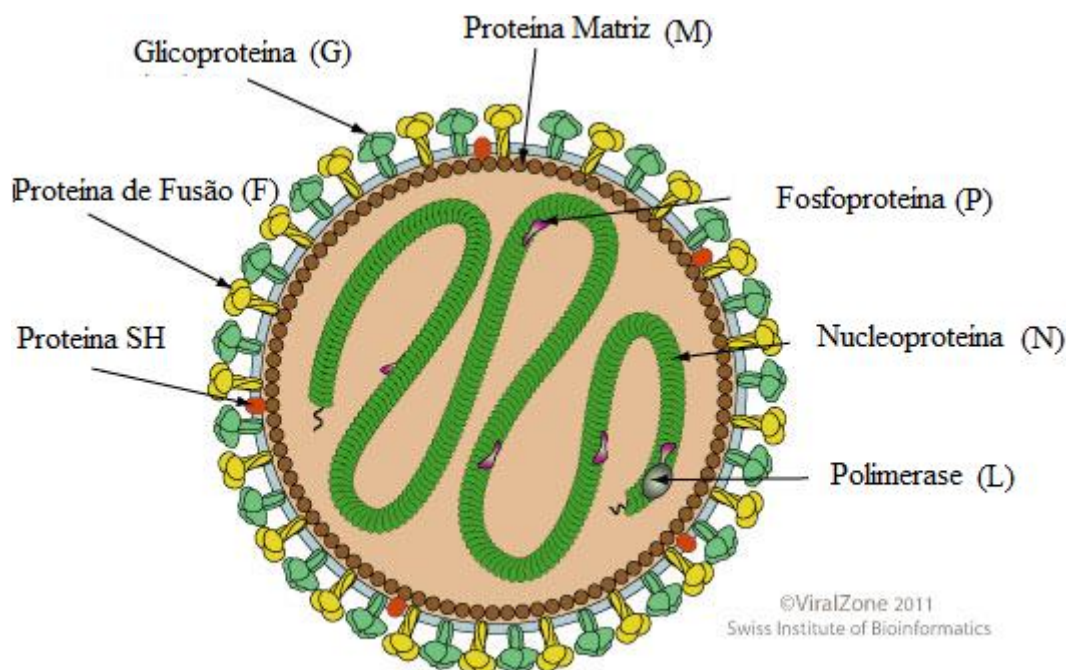
As infecções por hRSV podem causar desde hospitalizações com quadros clínicos graves e até a morte. Um levantamento epidemiológico global relatou que 33,1 milhões de episódios de infecções por hRSV ocorreram em 2015 no mundo todo, sendo 3,2 milhões de hospitalizações e 59.600 mil mortes de crianças menores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

As infecções pelo hRSV podem acometer pessoas de qualquer idade, apresentando-se como um quadro gripal ou um resfriado. Ainda não há um tratamento eficaz para os casos de hRSV graves, nem mesmo vacinas para atenuar e/ou evitar a infecção por este vírus (MORRIS et al., 2009; LIU et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2007). Estudos foram realizados para a busca de um medicamento ou até uma vacina

eficiente contra o hRSV, porém a variabilidade antigênica viral e as características do sistema imune do hospedeiro dificultam a produção destas vacinas (PARVEEN et al., 2006). A administração intravenosa de anticorpo monoclonal humanizado (Palivizumab), que age contra a atividade de fusão da proteína F, é a principal medida de prevenção utilizada atualmente. Todavia, devido ao alto custo dessa intervenção e, ela tem sido aplicada apenas em crianças prematuras com grande risco de desenvolver infecções graves, visto que o Palivizumab confere uma imunidade temporária, assim diminui o risco da criança prematura vir a óbito (MEISSNER et al., 2003). A única droga antiviral aprovada para tratamento do hRSV é a Ribavirina aerolizada (usada para tratamentos de outras doenças respiratórias), a qual é atribuída a atividade de inibição da síntese de ácido nucléico viral. A Ribavirina tem grande importância no tratamento de adultos imunocomprometidos, no entanto é responsável pela ocorrência de alguns efeitos colaterais. (NOKES e CANE, 2008).

A partícula viral do hRSV é constituída das seguintes proteínas: proteína hidrofóbica pequena (SH), proteína de fusão (F), proteína matriz (M), proteína M2-1, proteína L, fosfoproteína (P), nucleoproteína (N) e glicoproteína (G) (Figura 1). Além dessas proteínas presentes no vírus maduro, as proteínas não estruturais NS1 e NS2 são produzidas durante o processo de infecção viral na célula hospedeira, assim como a proteína M2-2, para a qual há escassa informação na literatura sobre suas funções.

FIGURA 1: Representação esquemática do hRSV, sendo representadas as proteínas SH, F, G, M, P e N e o envelope da bicamada lipídica.



Fonte: Adaptada *Swiss Institute of Bioinformatics. ViralZone® [database]. Suíça: SIB; 2009. Disponível em: http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/90.html*

O nucleocapsídeo presente nas partículas virais maduras é formado pelo RNA genômico complexado com as proteínas N, P, L e M2-1 (COLLINS et al. 2001). A proteína M2-1 é necessária para uma eficiente transcrição do genoma pela polimerase viral (FEARNS E COLLINS, 1999). A proteína N está associada ao RNA genômico é a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo (COLLINS et al., 2001). O RNA genômico do hRSV encontra-se sempre complexado com a proteína N e este complexo é usado como molde para a síntese de RNA. Este complexo proteína N-RNA previne a formação de estruturas secundárias no RNA, protegendo-o de degradação por nucleases e reduzindo a formação de RNAs dupla fita, podendo levar a reposta celular antiviral (COWTON et al., 2006).

As proteínas não estruturais NS1 e NS2 interferem na indução e sinalização do interferon (COLLINS & CROWE JR, 2007), o qual representa o principal mecanismo da imunidade inata no combate a infecções virais. O hRSV, através das proteínas NS1

e NS2, pode agir inibindo ou neutralizando várias etapas da via dos interferons, o que favorece o maior sucesso da progênie viral (SWEDAN et al., 2009; LO et al., 2005).

A proteína P é altamente fosforilada e desempenha função importante na transcrição e replicação do hRSV (COLLINS et al., 2001). A proteína P constitui uma subunidade da RNA-polimerase viral (formada pelas proteínas P e L) e parece mediar o contato entre a proteína L e o conjunto formado pela proteína N e o RNA (TRAN et al., 2007).

A proteína L, a maior proteína do hRSV, contém seis segmentos altamente conservados sendo a proteína estrutural de menor abundância na partícula viral (COLLINS et al., 2001). Atribui-se a essa proteína as atividades de RNA-polimerase e de poliadenilação e para formação de estrutura de *cap* do RNAm viral (MASON et al., 2004).

A proteína M2-1 é interna e não glicosilada e interage com as proteínas N e P, atuando no processo de transcrição (COLLINS et al., 2001). Essa proteína tem função na replicação do hRSV e alterações em sua sequência podem diminuir a infectividade do vírus (TANG et al., 2001). A proteína M2-2 está relacionada à regulação da transcrição e replicação do RNA viral (ATREYA et al., 1998). A M2-2, quando expressa em altos níveis, inibe completamente a replicação do hRSV, mostrando que se essa proteína estiver em grande quantidade, pode ser um fator crítico para a replicação viral (CHENG et al., 2005).

A proteína M encontra-se na face interna do envelope viral, apresentando um papel-chave na montagem e liberação do vírus e associando o complexo ribonucleoproteico com as glicoproteínas do envelope viral (GHILDYAL et al., 2002).

A glicoproteína de superfície SH é uma molécula pequena, hidrofóbica e transmembrânica cuja função ainda não está completamente elucidada, mas possivelmente sua atuação esteja relacionada ao Complexo de Golgi da célula hospedeira, no qual facilitaria o transporte das proteínas virais pela via de secreção (RIXON et al., 2004). Também se associa a SH um importante fator de virulência, uma vez que essa proteína altera a permeabilidade da membrana celular (Perez et al., 1997).

A proteína F é uma glicoproteína responsável pela fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira, fazendo com que o nucleocapsídeo

seja liberado no interior do citoplasma (WALSH e HRUSKA, 1983). Essa proteína também proporciona a fusão de células infectadas formando sincícios (COLLINS et al., 2001).

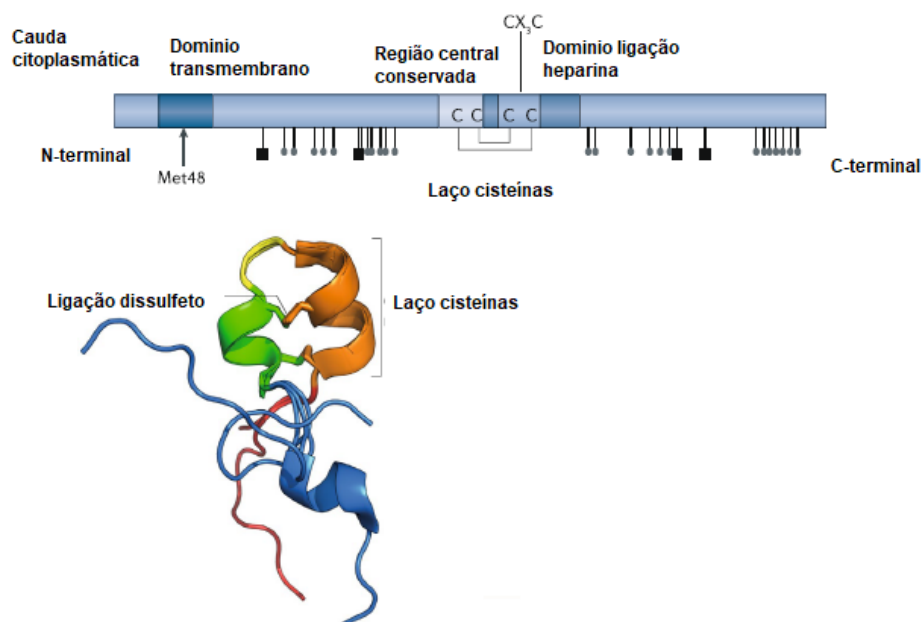
A proteína G do hRSV é uma proteína de superfície, tem de 289 a 319 resíduos de aminoácidos dependendo da amostra viral (COLINS et al., 2002). Ela foi identificada como a responsável pela adesão do vírus à célula hospedeira, a partir da observação de que anticorpos específicos contra a mesma inibem esse processo (COLLINS et al., 2001, LEVINE et al., 1987; BOTOSSO et al, 2009). A proteína G tem sido alvo de estudos sobre a variabilidade genética do hRSV. Estudos indicam que ela é pouco conservada entre os grupos A e B, mostrando até 50% de divergência na sequência de aminoácidos (ARBIZA et al., 2006). Alguns estudos mostraram que vários genótipos diferentes cocirculam e alguns predominam em uma comunidade a cada ano (OSTLUND et al., 2008; PERET et al., 1998).

A glicoproteína G é uma proteína transmembrânica integral do Tipo II (ou seja, está ancorada à membrana próximo à sua porção amino terminal por um domínio hidrofóbico que se estende do resíduo 38 ao 66), altamente glicosilada, com uma região localizada no citoplasma (N-terminal), uma região transmembrana e um grande ectodomínio C-terminal (GARCIA, O. et al., 1994). Esta proteína é sintetizada como um precursor de massa molecular de 36 kDa, sendo posteriormente glicosilada originando um complexo intermediário de 45 kDa. Esses açúcares são convertidos para tipos complexos produzindo uma forma madura de 90 kDa.

Sua variabilidade e glicosilação estão localizadas principalmente no ectodomínio, que contém dois segmentos hipervariáveis com alto teor de serina e treonina, entre os aminoácidos 69-164 e 207-298, com aproximadamente 56% de divergência entre os tipos A e B (JONHSON *et al.*, 1987), separados por uma região altamente conservada (Figura 2) entre os aminoácidos 164 e 199, e quatro resíduos de cisteínas (173, 176, 182, 186). Esta sequência *motif* de 35 resíduos de aminoácidos é considerada como provável sítio de ligação ao receptor de quimiocina CX3CR1 da célula hospedeira (JOHNSON *et al.*, 1987; CANE *et al.*, 1991; SULLENDER *et al.*, 2000). A proteína G interage com o receptor celular CX3CR1, modulando assim a resposta imunológica do hospedeiro e facilitando a infecção (COLLINS *et al.*, 2008). Essa interação do receptor CX3CR1 com a proteína G é um contribuidor importante

para a infecção do hRSV em células epiteliais das vias aéreas dos humanos (CHIRKOVA, 2015).

FIGURA 2: Representação esquemática dos domínios da Glicoproteína G do hRSV.



Fonte: Adaptada de BATTLES, 2019.

O receptor celular CX3CR1 é encontrado em 4 formas parecidas em suas sequências, denominadas de isoformas, pois essas apresentam sequências de resíduos de aminoácidos semelhantes. A isoforma 1 é constituída de 355 resíduos de aminoácidos, enquanto as isoformas 2 e 4 são constituídas de 387 resíduos, visto que a isoforma 4 apresenta uma fenilalanina no resíduo 8 enquanto a isoforma 2 tem uma leucina na mesma posição, e a isoforma 3 é composta de 362 resíduos. A principal diferença encontrada nas isoformas está na constituição dos resíduos de aminoácidos na região N-terminal, enquanto a parte central e a região C-terminal é idêntica para todas as isoformas (Figura 3). A diferença na região do N-terminal é a extensão da sequência primária que para as isoformas 2 e 4 têm 32 resíduos a mais com relação a isoforma 1, sendo que a diferença entre a isoforma 2 e 4 é a mudança de um resíduo de lisina para fenilalanina para a isoforma 4, e a isoforma 3 têm 7 resíduos a mais do que a isoforma 1. Em um estudo realizado por Burg e colaboradores (2015) mostrou que uma parte da região N-terminal do US28, um homolog do receptor celular

CX3CR1 (38% de identidade), interage com a fractalcina (CX3CL1), o ligante nativo do CX3CR1 que apresenta semelhante estrutural com a região conservadas de cisteínas do ectodomínio da proteína G. Esse resultado indica que a região N-terminal das isoformas pode ter um papel importante para a interação com a região conservada de cisteínas do ectodomínio da proteína responsável pelo processo de adesão do hRSV.

FIGURA 3: Sequências dos resíduos de aminoácidos das isoformas 1 (preto), 2 (vermelho), 3 (azul) e 4 (verde).

```

isoformal      -----MDQFPESVTENFEYDDLAEACYIGDIVV
isoforma2      MREPLEALKLADLDFRKSSLASGWRMASGAFTMDQFPESVTENFEYDDLAEACYIGDIVV
isoforma3      -----MASGAFTMDQFPESVTENFEYDDLAEACYIGDIVV
isoforma4      MREPLEAFKLADLDFRKSSLASGWRMASGAFTMDQFPESVTENFEYDDLAEACYIGDIVV
                *****

Isoformal      FGTVFLSIFYSVIFAIGLVGNLLVVFALTNSKKPKSVTDIYLLNLALSDDLFFVATLPFWT
Isoforma2      FGTVFLSIFYSVIFAIGLVGNLLVVFALTNSKKPKSVTDIYLLNLALSDDLFFVATLPFWT
Isoforma3      FGTVFLSIFYSVIFAIGLVGNLLVVFALTNSKKPKSVTDIYLLNLALSDDLFFVATLPFWT
Isoforma4      FGTVFLSIFYSVIFAIGLVGNLLVVFALTNSKKPKSVTDIYLLNLALSDDLFFVATLPFWT
                *****

Isoformal      HYLINEKGLHNAMCKFTTAAFFIGFFGSIFFITVISIDRYLAIVLAANSMMNRTVQHGV
Isoforma2      HYLINEKGLHNAMCKFTTAAFFIGFFGSIFFITVISIDRYLAIVLAANSMMNRTVQHGV
Isoforma3      HYLINEKGLHNAMCKFTTAAFFIGFFGSIFFITVISIDRYLAIVLAANSMMNRTVQHGV
Isoforma4      HYLINEKGLHNAMCKFTTAAFFIGFFGSIFFITVISIDRYLAIVLAANSMMNRTVQHGV
                *****

Isoformal      ISLGVWAAAILVAAPQFMFTKQKENECLGDYPEVLQEIWPVLRNVETNFLGFLPLLLIMS
Isoforma2      ISLGVWAAAILVAAPQFMFTKQKENECLGDYPEVLQEIWPVLRNVETNFLGFLPLLLIMS
Isoforma3      ISLGVWAAAILVAAPQFMFTKQKENECLGDYPEVLQEIWPVLRNVETNFLGFLPLLLIMS
Isoforma4      ISLGVWAAAILVAAPQFMFTKQKENECLGDYPEVLQEIWPVLRNVETNFLGFLPLLLIMS
                *****

Isoformal      YCYFRIIQTLFSCKNHKKAKAIKLILLVVIVFFLFWTPYNVMIFLETCLKLYDFFPSCDMR
Isoforma2      YCYFRIIQTLFSCKNHKKAKAIKLILLVVIVFFLFWTPYNVMIFLETCLKLYDFFPSCDMR
Isoforma3      YCYFRIIQTLFSCKNHKKAKAIKLILLVVIVFFLFWTPYNVMIFLETCLKLYDFFPSCDMR
Isoforma4      YCYFRIIQTLFSCKNHKKAKAIKLILLVVIVFFLFWTPYNVMIFLETCLKLYDFFPSCDMR
                *****

Isoformal      KDLRLALSVTETVAFSHCCLNPLIYAFAGEKFRRYLYHLYGKCLAVLCGRSVHVDFFSSSE
Isoforma2      KDLRLALSVTETVAFSHCCLNPLIYAFAGEKFRRYLYHLYGKCLAVLCGRSVHVDFFSSSE
Isoforma3      KDLRLALSVTETVAFSHCCLNPLIYAFAGEKFRRYLYHLYGKCLAVLCGRSVHVDFFSSSE
Isoforma4      KDLRLALSVTETVAFSHCCLNPLIYAFAGEKFRRYLYHLYGKCLAVLCGRSVHVDFFSSSE
                *****

Isoformal      SQRSRHGSVLSSNFTYHTSDGDALLLL
Isoforma2      SQRSRHGSVLSSNFTYHTSDGDALLLL
Isoforma3      SQRSRHGSVLSSNFTYHTSDGDALLLL
Isoforma4      SQRSRHGSVLSSNFTYHTSDGDALLLL
                *****

```

Fonte: Elaborada pelo Autor.

Com relação ao contexto apresentado, o presente trabalho faz uso de ferramentas computacionais para buscar compreender aspectos moleculares da

interação entre as isoformas do receptor celular CX3CR1 com a proteína G do hRSV, responsável pela adesão viral à célula hospedeira e aqui mimetizada por sua região de cisteínas conservadas, sendo nomeada neste trabalho como peptídeo da G. Vale destacar que não existe na literatura qualquer estudo experimental que detalhe molecularmente essa interação CX3CR1/G (peptídeo da G). Portanto, o presente estudo proporciona, além de importantes informações de biologia estrutural computacional para o entendimento do processo de interação vírus/célula hospedeira, uma base molecular útil para nortear um futuro desenvolvimento de novos compostos com ação antiviral que tenham como alvo o bloqueio da interação CX3CR1/G fundamental para o processo de infecção viral pelo hRSV.

5 CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho com a utilização de simulações computacionais contribuem para o entendimento da interação das isoformas do receptor celular CX3CR1 com a região conservadas de cisteínas do ectodomínio da proteína G do Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) ajudando na compreensão de detalhes moleculares do processo de adesão vírus/célula e também na busca de candidatos antivirais que poderiam atuar como potenciais inibidores dessa interação. As predições de estrutura tridimensional das isoformas do CX3CR1 calculadas no presente trabalho se mostraram estáveis ao longo de 300 ns de simulações de DM, indicando que a conformação em barril de hélices alfas, como a estrutura de cristal do receptor homólogo US28 (PDB 4XT1), é a mais provável para esse receptor celular. O modelo estrutural de interação da região conservada de cisteínas da proteína G com as isoformas do CX3CR1 também se mostrou estável em todas as simulações, sugerindo que a proposta de orientação do *loop* entre as hélices alfas do peptídeo em direção a fita beta GLU-174–GLY-177 (numeração referente a isoforma 1) na cavidade de ligação da porção N-terminal da proteína é aceitável e provável de ocorrer experimentalmente. Nesse contexto, os resíduos LYS-171, GLY-177, TYR-179, GLN-184 e ARG-272 da CX3CR1 (numeração referente a isoforma 1) destacam por sua importância para a estabilização da interação com o peptídeo, uma vez que participam de ligações de hidrogênio, outra característica observada são os resíduos do peptídeo da G, LYS-187 e ARG-188, os quais obtiveram a menor energia livre de ligação dos resíduos do peptídeo da G. Outro fator importante é as características traduzidas pelo RMSF e PCA, demonstrando como a ligação do peptídeo no N-terminal do receptor celular influencia o seu movimento, obtendo uma maior flexibilidade das regiões terminais para as formas ligadas, indicando que o peptídeo da G altera essas regiões. Os cálculos de energia livre de ligação destacaram um caráter de carga positiva para

o peptídeo, mostrando que os resíduos que favorecem a interação do peptídeo no receptor celular são ácidos, outro fator é a isoforma 1 tem maior favorecimento para o peptídeo da G, apresentando uma menor energia livre de ligação em torno de -700 KJ/mol. Vale mencionar que a configuração de interação do peptídeo da G na cavidade de ligação das isoformas é análoga a observada para a fractalcina (CX3CL1), o parceiro biológico do CX3CR1, com o receptor homólogo US28 (BURG *et al*, 2015).

Os passos realizados neste trabalho servem como uma locomoção para que pesquisas sejam feitas em busca de fármacos que reduzam ou inibam a adesão do Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) na célula do hospedeiro, ocasionando um menor número de enfermos e consequentemente um menor número de hospitalizações e de óbitos.

6 REFERÊNCIAS

ARBIZA, J. et al. Genetic characterization of respiratory syncytial viruses isolated from consecutive acute respiratory infections in a HIV infected child. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v. 35, p. 41-45, 2006.

BAEK, M *et al.*, “Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network,” *Science*, vol. 373, no. 6557, pp. 871–876, Aug. 2021, doi: 10.1126/SCIENCE.ABJ8754.

BAKER, N. A., SEPT, D., JOSEPH, S., HOLST, M. J., & McCAMMON, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10037–10041. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398>

BERGER, OLIVER, O. EDHOLM and Fritz JAHNING. 1997. “Molecular Dynamics Simulations of a Fluid Bilayer of Dipalmitoylphosphatidylcholine at Full Hydration, Constant Pressure, and Constant Temperature.” *Biophysical Journal* 72 (5): 2002–13. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78845-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78845-3).

BOTOSSO, V. F.; ZANOTTO, P. M. A.; UEDA, M. et al. Positive selection results in frequent reversible aminoacid replacements in the G protein gene on human respiratory syncytial virus. *PLoS Pathogens*, San Francisco, v. 5, n. 1, p. faltam as páginas, 2009.

BURG, J.S., INGRAM, J., VENKATAKRISHNAN, A.J., JUDE, K.M., DUKKIPATI, A., *et al* *Structural basis for chemokine recognition and activation of a viral G protein–coupled receptor*. *SCIENCE* sciencemag.org 6 MARCH 2015 • VOL 347 ISSUE 6226 (2015)

C. L. BROOKS III, M. KARPLUS, B. M. PETTITT, *Proteins: A theoretical perspective of dynamics structure and Thermodynamics*, Advances in chemical physics, John Wiley & Sons, New York, 1988

CANE, P. A.; MATTHEWS, D. A.; PRINGLE, C. R. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *Journal of General Virology*, London, v. 72, n. 9, p. 2091–2096, Sept. 1991.

CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* 12:405-413

CHIRKOVA, T et al. CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. *Journal of General Virology* (2015), 96, 2543–2556

COLLINS, P.L & GRAHAM, B.S. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *Journal of virology*, v. 82, n. 5, p. 2040–2055. 2008.

DELANO WL. 2002. *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, California, USA; <http://www.pymol.org>.

DE SÁ. J.M., PILOTO, J.V., CILLI, E.M., TASIC, L., FOSSEY, M.A., ALMEIDA, F.C.L., SOUZA, F.P., CARUSO, I.P. (2020): Hesperetin targets the hydrophobic pocket of the nucleoprotein/phosphoprotein binding site of human respiratory syncytial virus, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, DOI: 10.1080/07391102.2020.1835717

DESTA IT, PORTER KA, XIA B, KOZAKOV D, VAJDA S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure*. 2020 Sep; 28 (9):1071-1081

DILBECK, C.W and FINLAYSON-PITTS, B. J. s . (2013). Hydroxyl radical oxidation of phospholipid-coated NaCl particles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013,15, 9833-9844 doi.org/10.1039/C3CP51237A.

DOMINGUEZ, C., BOELEN, R. & BONVIN, A.M.J.J. HADDOCK: A proteinprotein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1731–1737 (2003).

ESWAR, N., JOHN, B., MIRKOVIC, N., FISER, A., ILYVIN, V. A., PIEPER, U., et al. (2003). Tools for comparative protein structure modeling and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3375-3380

FEDECHKIN, S.O., GEORGE, N.L., WOLFF, J.T., KAUVAR, L.M., DUBOIS, R.M. Structure of antibody 2D10 bound to the central conserved region of RSV G (2017) DOI: 10.2210/pdb5wn9/pdb

FERREIRA, L.G. *et al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules** v. 20, pp. 13384-13421, 2015. DOI: 10.3390/molecules200713384.

FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E.; ROBB, M.A.; et al.; Gaussian 09, Revision A.02. Gaussian Inc. Wallingford CT. Cheeseman, J.R, 2009.

GALLOUX, M.; TARUS, B.; BLAZEVIC, I.; FIX, J.; DUQUERROY, S.; ELÉOUËT, J.F. Characterization of a Viral Phosphoprotein Binding Site on the Surface of the Respiratory Syncytial Nucleoprotein. *Journal of Virology*, v. 86, p. 8375–8387, 2012.

GARCIA, O., MARTIN, M.; DOPAZO, ARBIZA, J.; FRABASILE, S.; RUSSI, J.; HORTAL, M; PEREZ-BREÑA, P.; MARTINEZ, I.; GARCIA-BARRENO, B. J. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *Journal of Virology*, Washington, v. 68, n. 9, p. 5448–5459, Sept. 1994.

GILSON, M. K.; HONIG, B., Calculation of the total electrostatic energy of a macromolecular system: solvation energies, binding energies, and conformational analysis. *Proteins* 1988, 4, 7-18.

GROTEWOLD, E. *The Science of Flavonoids*, New York: Springer, 2006.

HALL, C. B.; WEINBERG, G. A.; IWANE, M. K.; BLUMKIN, A. K.; EDWARDS, K. M.; STAAT, M. A.; AUINGER, P.; GRIFFIN, M. R.; POHLING, K. A.; ERDMAN, D.; GRIJALVA, C. G.; ZHU Y.; SZILAGYI P. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N. Engl. J. Med.*, v. 360, p. 588-598, 2009.

HOGAN, C.A., CAYA, C., PAPENBURG, J. Rapid and simple molecular tests for the detection of respiratory syncytial virus: a review. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(7), pp. 617–629. 2018. <http://www.rcsb.org/pdb/>

HOMEYER, N.; GOHLKE, H., Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area Method. *Mol. Inform.* 2012, 31, 114-122.

JORGENSEN, WILLIAN L.; CHANDRASEKHAR, J; MADURA, JEFFREY D.; IMPERY, ROGER W.; KLEIN, M. L. *Journal of Chemical Physics* (1983), 79 (2), 926-35 CODEN: JCPSA6; ISSN:0021-9606.

JOHNSON, P. R.; SPRIGGS, M. K.; OLMSTED, R. A.; COLLINS, P. L. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 84, n. 16, p.5625–5629, Aug. 1987.

JO, S., KIM, T. IYER, V.G., and W. IM (2008) CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* 29:1859-1865

KOZAKOV D, HALL DR, Xia B, PORTER KA, PADHORN D, YUEH C, BEGLOV D, VAJDA S. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*. 2017 Feb;12(2):255-278.

KOZAKOV D, BRENKE R, COMEAU SR, VAJDA S. PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins*. 2006; 65:392–406. [PubMed: 16933295]

KUMARI, R.; KUMAR, R.; OSSD Consortium.; Lynn, A. g_mmpbsa - A GROMACS tool for highthroughput MM-PBSA Calculations; *J. Chem. Inf. model*, 2014

HOMMEYER, N.; GOHLKE, H., Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area Method. *Mol. Inform.* 2012, 31, 114-122.

HONORATO, R.V., KOUKOS, P.I., JIMENEZ-GARCIA, B., TSAREGORODTSEV, A., VERLATO, M., GIACHETTI, A., A. ROSATO and A.M.J.J. BONVIN (2021). "Structural biology in the clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem." *Frontiers Mol. Biosci.*, 8, fmo1b.2021.729513.

KATCHALSKI-KATZIR E, et al. Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:2195–2199. [PubMed: 1549581]

KELLEY LA et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis *Nature Protocols* 10, 845-858 (2015)

KOZAKOV D, HALL DR, XIA B, PORTER KA, PADHORN D, YUEH C, BEGLOV D, VAJDA S. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*. 2017 Feb;12(2):255-278.

KOZAKOV D, BEGLOV D, BOHNUUD T, MOTARELLA S, XIA B, HALL DR, VAJDA, S. How good is automated protein docking? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2013 Dec; 81(12):2159-66.

KUMARI, R., KUMAR, R., & LYNN, A, (2014). G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(7), 1951–1962

KUMARI, R.; KUMAR, R.; OSSD Consotium.; Lynn, A. g_mmpbsa - A GROMACS tool for highthroughput MM-PBSA Calculations;J. Chem. Inf.model, 2014

LEVINE S.; KLAIBER-FRANCO, R.; PARADISO, P. R. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology*, London, v. 68, n. 9, p. 2521-2524, Sept. 1987.

LIU C.; DAY, N. D.; BRANIGAN, P.; GUTSHALL, L. L.; SARISKY, R. T.; DEL VECCHIO, A. M. Relationship between the loss of neutralizing antibody binding and fusion activity of the F protein of human respiratory syncytial virus. *Viol. J.*, v. 4, 2007.

MALDE, A. K., ZUO, L., BREEZE, M., STROET, M., POGER, D., NAIR, P. C., OOSTENBRINK, C., & MARK, A. E. (2011). An automated force field topology builder (ATB) and repository: Version 1.0. *J Chem Theory Comput*, 7(12), 4026–4037. <https://doi.org/10.1021/ct200196m>

MENG, X.; ZHANG, H.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Curr Comput Aided Drug Des.* **2011**; 7(2): 146-157

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking, *Methods Mol Biol.* **2008**; 443: 365-382, Springer. 10.1007/978-1-59745-177-2_19

MORRIS, J.A., BLOUNT JR, R.E SAVAGE Recovery of cytopathogenic agente from chimpanzees with goryza. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92(3), pp. 544-549. 1956.

MEISSNER, H. C. et al. Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*, v. 112, p. 1447-1452, Dec. 2003.

MOHAMED.OUIZOUGUN OUBARI ETAL; A Druggable Pocket at the Nucleocapsid/Phosphoprotein Interaction Site of Human Respiratory Syncytial Virus November 2015 Volume 89 Number 21.

NOKES, J. D.; CANE, P. A. New strategies for control of respiratory syncytial virus infection: review. *Current Opinion of Infectious Diseases*, Philadelphia, v. 21, n. 6, p. 639- 643, Dec. 2008.

SCHMID, N., EICHENBERGER, A. P., CHOUTKO, A., RINIKER, S., WINGER, M., MARK, A. E., & VAN GUNSTEREN, W. F. (2011). Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal: EBJ*, 40(7), 843–856. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>

OLSSON, M. H. M., SØNDERGARD, C. R., ROSTKOWSK, M., & JENSEN, J. H. (2011).

PEREZ, M., GARCIA-BARRENO, B., MELERO, J.A., CARRASCO, L., and GUINEA, R. (1997). Membrane Permeability Changes Induced in *Escherichia coli* by the SH Protein of Human Respiratory Syncytial Virus. *Virology* 235, 342–351.

PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(2), 525–537.

ÖLUND, M. R.; LINDELL, A. T. ; STENLER, S.; RIEDEL, H. M; WIRGART, B. Z.; GRILLNER, L. Molecular epidemiology and genetic variability of respiratory syncytial virus (RSV) in Stockholm, 2002–2003. *Journal of Medical Virology*, New York, v. 80, n. 1, p. 159–167, Jan. 2008.

OTHUMPANGAT, S.; GIBSON, L. F.; SAMSELL, L.; PIEDIMONTE, G. NGF is essential survival factor for bronchial epithelial cells during respiratory syncytial virus infection. PLoS ONE, v. 04, p. 1-13, 2009.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V.; Conformation of polypeptides and proteins. Advances in Protein Chemistry, New York, v. 23, p. 283-487, 1968.

REED, J.L., WELLIVER, T.P., SIMS, G.P., MCKINNEY, L., VELOZO, L., AVENDANO, L., HINTZ, K., LUMA, J., COYLE, A.J., and WELLIVER, R.C., Sr. (2009). Innate immune signals modulate antiviral and polyreactive antibody responses during severe respiratory syncytial virus infection. J. Infect. Dis. 199, 1128–1138.

RICCETTO, A. G. L.; SILVA, L. H. A.; SPILKI, F. R.; MORCILLO, A. M.; ARNS, C. W.; BARACAT, E. C. E. Genotypes and clinical data of respiratory syncytial virus and metapneumovirus in brazilian infants: A new perspective. Braz. J. Infect. Dis., v. 13, n. 1, p 35-39, 2009.

SABINO, F. No fim dá Certo, 1998, p. 7.

SENIOR, A.W., EVANS, R., JUMPER, J. *et al.* Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature* **577**, 706–710 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1923-7>

SIT, A. Solving distance geometry problems for protein structure determination. Tese (Doutorado) — Iowa State University, 2010.

SHI, T., MCALLISTER, D. A., O'BRIEN, K. L., SIMOES, E. A. F., MADHI, S. A., GESSNER, B. D., et al. (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *The Lancet*, 390(10098), 946–958, 2017.

SÖDING, J. (2005). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics*, 21(7), 951-960.

SULLENDER, W. M. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clinical Microbiology Review*, Washington, v. 13, n. 1, p. 1-15, Jan. 2000.

TRAN, T. L., CASTAGNE, N., BHELLA, D., VARELA, P. F., BERNARD, J., CHILMONCZYK, S.,

WALLACE, A. C., LASKOWSK, R. A., & THORNTHON, J. M. (1995). LIGPLOT: A Program to Generate Schematic Diagrams of Protein-Ligand Interactions. *Protein Engineering*, 8(2), 127–134.

VAJDA S, YUEH C, BEGLOV D, BOHNUUD T, MOTARELLA SE, XIA B, HALL DR, KOZAKOV D. New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2017 Mar; 85(3):435-444.

de VRIES, S.J., van DIJK, A.D.J. & BONVIN, A.M.J.J. WHISCY: What information does surface conservation yield? Application to data-driven docking. *Proteins* 63, 479–489 (2006).

de VRIES, S.J. & BONVIN, A.M. How proteins get in touch: interface prediction in the study of biomolecular complexes. *Curr. Protein Pept. Sci.* 9, 394–406 (2008).

de VRIES, S.J. et al. HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins* (2007).

G.C.P VAN ZUNDERT, J.P.G.L.M. RODRIGUES, M. TRELLET, C. SCHMITZ, P.L. KASTRITIS, E. KARACA, A.S.J. MELQUIOND, M. van DIJK, S.J. de VRIES and A.M.J.J. BONVIN (2016). "The HADDOCK2.2 webserver: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes." *J. Mol. Biol.*, 428, 720-725 (2015).

WELLIVER, T.P., GAROFALO, R.P., HOSAKOTE, Y., HINTZ, K.H., AVENDANO, L., SANCHEZ, K., VELOSO, L., JAFRI, H., CHAVEZ-BUENO, S., OGRA, P.L., et al.

Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *J. Infect. Dis.* 195, 1126–1136, 2007

W. F. van GUNSTEREN, H. J. C. BERENDSEN, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29 (1990) 992.

W. F. van GUNSTEREN, H. J. C. BERENDSEN, *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*, Biomos, Groningen, The Netherlands, 1987.

YE, X; IWUCHUKWU, O.P.; AVADHANULA, V.; AIDEYAN, L.O.; MCBRIDE, T.J.; FERLIC-STARK, L.L.; PATEL, K.D.; PIEDRA, F.A.; SHAH, D.P.; CHEMALY, R.F.; PIEDRA, P.A. Antigenic Site-Specific Competitive Antibody Responses to the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Were Associated With Viral Clearance in Hematopoietic Cell Transplantation Adults. *Front Immunol*, v. Mar 29, p-10:706, 2019.

YANG, J., YAN, R., ROY, A., XU, D., POISSON, J., ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12: 7-8 (2015)

YANG, J., ANISHCHENKO, I., PARK, H., PENG, Z., OVCHINNIKOV, S., BAKER, D. Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 1496–1503 (2020).

YERSHOVA A, JAIN S, LAVALLE SM, MITCHELL JC. Generating Uniform Incremental Grids on SO(3) Using the Hopf Fibration. *Int J Robot Res.* 2010; 29:801–812.

YUNTA, M.J.R. Docking and ligand binding affinity: uses and pitfalls. *American Journal of Modeling and Optimization* v. 4, n.3, pp. 74-114, 2016. DOI: 10.12691/ajmo-4-3-2 .

ZHANG, W., CHOI, Y., HAYNES, L.M., HARCOUT, J.L., ANDERSON, L.J., JONES, L.P and TRIPP, R.A (2010). Vaccination To Induce Antibodies Blocking the CX3C-CX3CR1 Interaction of Respiratory Syncytial Virus G Protein Reduces Pulmonary

Inflammation and Virus Replication in Mice *journal of virology*, p. 1148–1157 Vol. 84, No. 2 doi:10.1128/JVI.01755-09

ZHIVAKI, D., LEMOINE, S., LIM, A., MORVA, A., *et al* (2017). Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Promotes Lung Disease Severity. *Immunity* 46, 301–314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.010>