



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

Vitor Brassolatti Machado

**Caracterização biofísica da interação da proteína M2-1 do Vírus  
Sincicial Respiratório Humano (HRSV) com RNA e com os  
alcaloides esteroidais ciclopamina e solasodina**

São José do Rio Preto  
2020

Vitor Brassolatti Machado

**Caracterização biofísica da interação da proteína M2-1 do Vírus  
Sincicial Respiratório Humano (HRSV) com RNA e com os  
alcaloides esteroidais ciclopamina e solasodina**

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

Financiadora: FAPESP – Proc: 2018/08900-4  
FAPERP – Proc: 091/2019  
CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza  
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey  
Coorientador: Dr. Ícaro Putinhon Caruso

São José do Rio Preto  
2020

M149c

Machado, Vitor Brassolatti

Caracterização biofísica da interação da proteína M2-1 do Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) com RNA e com os alcaloides esteroidais ciclopamina e solasodina. / Vitor Brassolatti Machado. -- São José do Rio Preto, 2020

63 f.

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

Orientadora: Fátima Pereira de Souza

Coorientador: Ícaro Putinhon Caruso

1. Microbiologia. 2. Virologia. 3. Biofísica. 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.

Vitor Brassolatti Machado

**Caracterização biofísica da interação da proteína M2-1 do Vírus  
Sincicial Respiratório Humano (HRSV) com RNA e com os alcaloides  
esteroidais ciclopamina e solasodina**

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

Financiadoras: FAPESP – Proc: 2018/08900-4  
FAPERP – Proc: 091/2019  
CAPES

**Comissão Examinadora**

Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe  
UFJF – Câmpus de Juiz de Fora

Profa. Dra. Gabriela Campos de Araújo  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
25 de junho de 2020

Àqueles que apesar de todas as adversidades sempre acreditaram que eu seria capaz de atingir meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Fátima Pereira de Souza pela orientação, pela confiança depositada, pelos ensinamentos fornecidos antes e ao longo do projeto e pela preocupação com meu futuro profissional.

Agradeço aos meus coorientadores Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey e Dr. Ícaro Putinhon Caruso pela orientação e auxílio ao resolver problemas, ao tratar e interpretar os resultados biofísicos encontrados por meio dos experimentos.

Agradeço a todos os colegas de trabalho, mas especialmente agradeço a minha companheira de trabalho e de vida, Giovana Cavenaghi Guimarães, por me apoiar e me auxiliar a suportar as adversidades no decorrer deste mestrado.

Agradeço a todo o corpo docente e discente do departamento de biologia pelos conhecimentos transmitidos ao longo da graduação.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do IBILCE pelos conhecimentos transmitidos e pelos recursos concedidos para participação em eventos importantes para meu aprimoramento acadêmico.

Agradeço a todo o corpo docente do departamento de física e química por disponibilizar os equipamentos necessários ao desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos funcionários do IBILCE por auxiliar na manutenção dos laboratórios.

Agradeço à minha família por me incentivar e apoiar sempre.

O presente trabalho foi inicialmente realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2018/08900-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradeço também a FAPERP pela concessão de recursos adicionais para participação e organização de eventos.

Por fim, de maneira geral, agradeço ao IBILCE, que mesmo em momentos de dificuldade consegue ser capaz de acolher e suprir seus cursos, eventos e laboratórios com uma excelente infraestrutura.

“A resposta certa não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas.”

Mario Quintana (Caderno H, 1994)

## RESUMO

O vírus sincicial respiratório humano (HRSV) é o principal agente causador de doenças crônicas do trato respiratório inferior em crianças e idosos por todo o mundo. A proteína M2-1 do HRSV atua como um fator de antiterminação transcricional, possibilitando a transcrição de todos os genes. Essa proteína é dividida em quatro domínios: um domínio de dedo de zinco; o domínio de oligomerização; o domínio globular que interage com o RNA viral; e um domínio C-terminal não estruturado. Em 2016, um estudo publicado por Bailly e colaboradores mostrou que alguns alcaloides esteroidais possuíam atividade antiviral significativa contra o HRSV e que o principal alvo do composto era o domínio globular da proteína M2-1 (dgM2-1). O presente estudo teve como objetivo responder às seguintes perguntas: i) quais são os parâmetros termodinâmicos e as interações não covalentes envolvidas na formação e estabilização do complexo dgM2-1 / RNA ?; ii) ciclopamina e solasodina realmente interagem no domínio globular? Quais regiões destas moléculas estão envolvidas na interação com a proteína? Para alcançar os resultados, mensuramos a supressão de fluorescência do dgM2-1 pelo RNA em diferentes condições de temperatura, força iônica e pH. A constante de dissociação determinada para o complexo é da ordem de  $10^{-9}$  M e a estequiometria de ligação é de 2 proteínas para 1 molécula de RNA. O efeito da temperatura revelou uma variação negativa na entalpia de ligação, enquanto o aumento no pH ou na concentração salina confirmou que a orientação da interação possui uma componente eletrostática. Os resultados também indicam que a interação é espontânea, com ligações de hidrogênio e forças de van der Waals desempenhando um papel fundamental na estabilização do complexo. Com relação aos alcaloides esteroidais, descobriu-se que ambos interagem no sítio de ligação ao AMP e o complexo formado foi visualizado por meio de *docking* molecular, o qual demonstrou que a interação ocorre na região de interface interdomínio dgM2-1/dedo de zinco e depende de ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos para ocorrer. Esses achados necessitam de maiores investigações e são importantes para a compreensão do mecanismo de interação entre a proteína M2-1 do HRSV com o RNA e com candidatos promissores para o desenvolvimento de antivirais.

**Palavras-chave:** HRSV, M2-1, RNA, solasodina, ciclopamina.

## ABSTRACT

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the major causative agent of chronic lower respiratory tract diseases in children and elderly worldwide. The M2-1 protein from HRSV acts as a transcription antitermination factor, enabling the transcription of all genes. This protein is divided into four domains: a zinc finger domain; the oligomerization domain; the core domain that interacts with the viral RNA; and unstructured C-terminal domain. In 2016, a study published by Bailly and colleagues showed that steroidal alkaloids had significant antiviral activity against HRSV and that the main target of the compound was the M2-1 protein core domain (cdM2-1). Then, the present study aimed to answer two questions: i) what are the thermodynamic parameters and the non-covalent interactions involved in the formation and stabilization of the cdM2-1/RNA complex? ii) do solasodine and cyclopamine really interact in the core domain? Which regions of these molecules are involved in the interaction with the protein? To achieve the results, we measured the fluorescence quenching of cdM2-1 by RNA under different conditions of temperature, ionic strength and pH. The determined dissociation constant for the complex was on the range of hundreds nanomolar and the binding stoichiometry is of two proteins per RNA molecule. The effect of temperature revealed a negative binding enthalpy change, whereas the increase either in pH or in saline concentration confirmed that electrostatic forces drive the interaction. The results also indicate that it is spontaneous, with hydrogen bonds and van der Waals forces playing a key role on the stabilization of the complex. Regarding to the steroidal alkaloids, it was found that both interact at the AMP binding site and the complex formed was visualized by molecular docking, which demonstrated that the interaction occurs at the cdM2-1 / zinc finger interdomain interface region and it depends on hydrogen bonds and hydrophobic contacts to occur. These findings require further investigation and are important for understanding the mechanism of interaction between HRSV M2-1 protein with RNA and with promising candidates for the development of antivirals.

**Keywords:** HRSV, M2-1, RNA, solasodine, cyclopamine.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Tendências idade-específicas do HRSV no ano de 2019.                                                                               | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Aspectos clínicos e resposta imunológica da infecção por HRSV por faixa etária.                                                    | 19 |
| <b>Figura 3.</b> Representação esquemática do monômero e do tetrâmero formado pelas unidades da proteína M2-1.                                      | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura química dos alcaloides esteroidais ciclopamina e solasodina.                                                             | 28 |
| <b>Figura 5.</b> SDS-PAGE 15% do processo de purificação da dgM2-1 por cromatografia de afinidade.                                                  | 39 |
| <b>Figura 6.</b> Identificação das proteínas de interesse por <i>western-blotting</i> e SDS-PAGE 15% do processo de clivagem da His6 do dgM2-1.     | 40 |
| <b>Figura 7.</b> SDS-PAGE 15% do processo de purificação e cromatograma da purificação por exclusão molecular do dgM2-1.                            | 40 |
| <b>Figura 8.</b> SDS-PAGE 15% do processo de purificação da proteína M2-1 por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA.                          | 41 |
| <b>Figura 9.</b> SDS-PAGE 15% do processo de purificação e cromatograma da purificação por exclusão molecular da proteína M2-1.                     | 42 |
| <b>Figura 10.</b> Espectro de supressão de fluorescência da M2-1 pelo RNA a 25 ° C.                                                                 | 43 |
| <b>Figura 11.</b> Variação de supressão de fluorescência do dgM2-1 em função da concentração de ácido nucleico.                                     | 45 |
| <b>Figura 12.</b> Variação de supressão de fluorescência do dgM2-1 em função da concentração de RNA para diferentes condições de força iônica e pH. | 45 |
| <b>Figura 13.</b> Espectros de dicroísmo circular do dgM2-1 (5,5 µM) na região do ultravioleta distante.                                            | 47 |
| <b>Figura 14.</b> Espectros de supressão de fluorescência da proteína M2-1 pelo AMP a 25 ° C.                                                       | 47 |
| <b>Figura 15.</b> Gráficos da supressão de fluorescência da M2-1 pelo AMP à temperatura de 25 ° C na presença de solasodina.                        | 49 |
| <b>Figura 16.</b> Gráficos da supressão de fluorescência da M2-1 pelo AMP à                                                                         |    |

temperatura de 25 ° C na presença de ciclopamina. 50

**Figura 17.** Modelagem e *docking* molecular dos alcaloides esteroidais na proteína M2-1. 52

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Parâmetros termodinâmicos encontrados para a interação dgM2-1/RNA.                                                | 45 |
| <b>Tabela 2.</b> Valores de $K_d$ encontrados para o ajuste realizado a cada curva de supressão de fluorescência da M2-1 pelo AMP. | 49 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AC** – Antes da clivagem

**ADT** – AutoDockTools

**AI** – Amostra Injetada

**AMP** – Adenosina 5'-monofosfato

**Arg** – Arginina

**Asn** – Asparagina

**Asp** – Aspartato

**CD** – *Circular Dichroism* (Dicroísmo Circular)

**CMIB** – Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular

**CPM** – Ciclopamina

**Cys** – Cisteína

**dgM2-1** – Domínio Globular da proteína M2-1

**DO** – Densidade Óptica

**DPOC** – Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas

**DTT** – Ditionitrito

**EDTA** – *Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido Etilenodiamino tetracético)

**FT** – *Flow-through* (todas as proteínas que passam pela coluna de afinidade sem se ligar a ela)

**GE** – *Gene End* (Final do gene)

**Glu** – Glutamato

**Gly** – Glicina

**GS** – *Gene Start* (Início do gene)

**HCl** – Ácido Clorídrico

**His<sub>6</sub>** – Cauda de poli-histidina

**HIV** – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

**HRSV** – Human Respiratory Syncytial Virus

**Ile** – Isoleucina

**IPTG** – Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo

**IRA** – Infecções Respiratórias Agudas

**LB** – Luria-Bertani broth

**Lys** – Lisina

**mRNA** – RNA mensageiro

**MW** – Marcador de massa molecular

**NaCl** – Cloreto de Sódio

**Ni-NTA** – *Nickel Nitrilotriacetic Acid*

**P** – Precipitado no saco de diálise

**PC** – Pós clivagem

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**Phe** – fenilalanina

**PI** – Ponto isoelétrico

**PMSF** – *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetilsulfonila)

**RNA** – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

**RPM** – Rotações por Minuto

**SDS-PAGE** – *Sodium dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*  
(Eletroforese em Gel de Poliacrilamida desnaturante)

**Ser** – Serina

**TEVP** – *Tobacco Etch Virus Protease*

**T<sub>h</sub>** – Linfócito T *Helper*

**Thr** – Treonina

**UV/Vis** – Espectro de luz na região do ultravioleta ao visível

**Val** – Valina

**VSR** – Vírus Sincicial Respiratório

**βME** – β-mercaptoetanol

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                      |                                  |
|----------------------|----------------------------------|
| <b>m</b>             | Metro                            |
| <b>cm</b>            | Centímetro                       |
| <b>nm</b>            | Nanometro                        |
| <b>L</b>             | Litro                            |
| <b>mL</b>            | Mililitro                        |
| <b>μL</b>            | Microlitro                       |
| <b>kg</b>            | Quilograma                       |
| <b>g</b>             | Grama                            |
| <b>mg</b>            | Miligrama                        |
| <b>ng</b>            | Nanograma                        |
| <b>μg</b>            | Micrograma                       |
| <b>s</b>             | Segundo                          |
| <b>min</b>           | Minuto                           |
| <b>3'</b>            | Extremidade 3' do ácido nucleico |
| <b>5'</b>            | Extremidade 5' do ácido nucleico |
| <b>° C</b>           | Graus Celcius                    |
| <b>K</b>             | Kelvin                           |
| <b>mol</b>           | Mol                              |
| <b>M</b>             | Molar                            |
| <b>dmol</b>          | Decimolar                        |
| <b>mM</b>            | Milimolar                        |
| <b>nM</b>            | Nanomolar                        |
| <b>Å</b>             | Ångström                         |
| <b>Cal</b>           | Calorias                         |
| <b>kCal</b>          | Quilocalorias                    |
| <b>ua</b>            | Unidades de Absorbância          |
| <b>K<sub>d</sub></b> | Constante de Dissociação         |
| <b>K<sub>b</sub></b> | Constante de Afinidade           |
| <b>Pa</b>            | Pascal                           |
| <b>j</b>             | Joule                            |
| <b>kJ</b>            | Quilojoule                       |

|                              |                                                                                       |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>x g</b>                   | Veze aceleração da gravidade                                                          |
| <b>kb</b>                    | Quilobases                                                                            |
| <b>Rpm</b>                   | Rotações por minuto                                                                   |
| <b><math>\epsilon</math></b> | Coeficiente de Extinção Molar                                                         |
| <b>F<sub>0</sub></b>         | Fluorescência inicial                                                                 |
| <b>F</b>                     | Fluorescência após titulação                                                          |
| <b>K<sub>SV</sub></b>        | Constante de Stern-Volmer                                                             |
| <b>K<sub>q</sub></b>         | Constante de supressão da biomolécula                                                 |
| <b><math>\tau_0</math></b>   | Tempo de vida média de emissão da fluorescência da biomolécula na ausência de ligante |
| <b>[L]</b>                   | Concentração de ligante                                                               |
| <b>[P]</b>                   | Concentração de proteína                                                              |
| <b>F<sub>sat</sub></b>       | Fluorescência da proteína saturada com RNA                                            |
| <b>n</b>                     | Número de sítios de ligação                                                           |
| <b>[P]<sub>t</sub></b>       | Concentração de proteína total                                                        |
| <b>[L]<sub>t</sub></b>       | Concentração total de ligante                                                         |
| <b><math>\Delta H</math></b> | Variação de entalpia                                                                  |
| <b><math>\Delta G</math></b> | Variação de energia livre de Gibbs                                                    |
| <b><math>\Delta S</math></b> | Variação de entropia                                                                  |
| <b>T</b>                     | Temperatura                                                                           |
| <b>R</b>                     | Constante universal dos gases                                                         |
| <b><math>\theta</math></b>   | Sinal de CD registrado como miligraus                                                 |
| <b>[<math>\Theta</math>]</b> | Elipcticidade molar por resíduo                                                       |
| <b>mdeg</b>                  | Miligraus                                                                             |
| <b>l</b>                     | Comprimento do caminho óptico                                                         |
| <b>n<sub>r</sub></b>         | Número de resíduos de aminoácidos                                                     |
| <b>Da</b>                    | Dalton                                                                                |
| <b>kDa</b>                   | Quilodalton                                                                           |
| <b>[RNA]</b>                 | Concentração de RNA                                                                   |
| <b>n</b>                     | Coeficiente estequiométrico                                                           |
| <b>&gt;</b>                  | Maior que                                                                             |
| <b>&lt;</b>                  | Menor que                                                                             |
| <b>%</b>                     | Porcentagem                                                                           |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                        | <b>17</b> |
| 1. 1. Vírus Sincicial Respiratório Humano: Epidemiologia, aspectos clínicos e classificação.....                                                                  | 17        |
| 1. 2. O papel da proteína M2-1 e dgM2-1 na infectividade e replicação viral.....                                                                                  | 22        |
| 1. 3. Moléculas com potencial terapêutico e candidatas a antivirais para interação com a proteína M2-1 .....                                                      | 25        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                                          | <b>29</b> |
| 2. 1. Objetivo geral .....                                                                                                                                        | 29        |
| 2. 2. Objetivos específicos .....                                                                                                                                 | 29        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                                | <b>31</b> |
| 3. 1. Clonagem e expressão das proteínas.....                                                                                                                     | 31        |
| 3. 2. Extração e purificação das proteínas .....                                                                                                                  | 32        |
| 3. 3. Medidas espectrofotométricas e espectrofluorimétricas .....                                                                                                 | 33        |
| 3. 3. 1. Preparo das soluções de RNA, solasodina, ciclopamina e AMP. ....                                                                                         | 34        |
| 3. 3. 2. Titulações fluorimétricas e cálculos para verificação das interações da proteína dgM2-1 com RNA .....                                                    | 34        |
| 3. 3. 3. Titulações fluorimétricas e cálculos para verificação das interações da proteína M2-1 com AMP, na presença e ausência de solasodina ou ciclopamina. .... | 36        |
| 3. 4. Medidas de dicroísmo circular.....                                                                                                                          | 37        |
| 3.5. <i>Docking</i> Molecular.....                                                                                                                                | 38        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                            | <b>39</b> |
| 4. 1. Purificação das proteínas.....                                                                                                                              | 39        |
| 4. 1. 1. Purificação do dgM2-1 .....                                                                                                                              | 39        |
| 4. 1. 2. Purificação da M2-1 .....                                                                                                                                | 41        |

|                                                                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4. 2. Experimentos de fluorescência .....                                                                              | 43        |
| 4. 2. 1. Investigação da interação entre dgM2-1 e RNA por espectroscopia de fluorescência.....                         | 43        |
| 4. 2. 2. Investigação da interação entre M2-1, AMP, solasodina e ciclopamina por espectroscopia de fluorescência ..... | 47        |
| 4.3. Simulações de <i>docking</i> molecular entre M2-1 e alcaloides esteroidais .....                                  | 51        |
| <b>5. CONCLUSÕES.....</b>                                                                                              | <b>53</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                | <b>54</b> |
| <b>ANEXO A – DESENVOLVIMENTO DA EQUAÇÃO 1.....</b>                                                                     | <b>62</b> |

## 1. Introdução

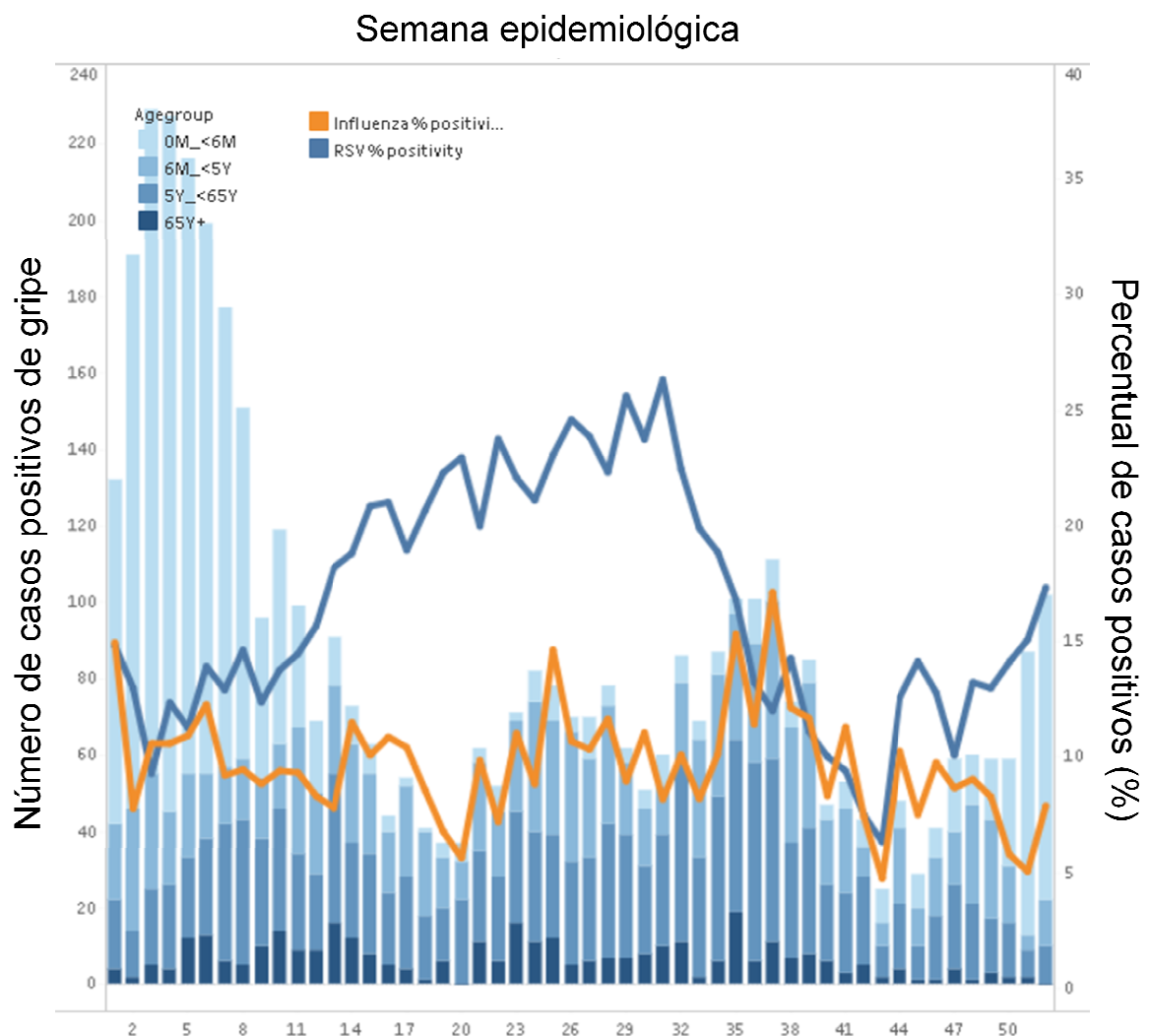
### 1. 1. Vírus Sincicial Respiratório Humano: Epidemiologia, aspectos clínicos e classificação

O vírus sincicial respiratório humano (VSRH) foi descoberto na década de 1950 e desde então é apontado como o principal agente causador de infecções respiratórias agudas (IRA) por todo o mundo, especialmente em recém-nascidos (MORRIS et al., 1956; CHANOCK et al., 1957; MUFSON et al., 1973; PARROTT et al., 1973; HALL et al., 1994; HALL et al., 2009). O vírus, assim como os demais vírus respiratórios, é dispersado por gotículas de muco ou saliva nos momentos em que um indivíduo infectado tosse, espirra ou fala. O contágio pode ocorrer diretamente ou, principalmente, indiretamente, quando um indivíduo sadio entra em contato com secreções depositadas em um objeto ou superfície do ambiente e as conduz para as mucosas orais, nasais ou oculares. Ao alcançar as células epiteliais ciliadas do trato nasofaríngeo do futuro hospedeiro, o HRSV (do inglês – *Human Respiratory Syncytial Virus*) penetra e inicia a replicação, podendo atingir as células ciliadas dos bronquíolos e os pneumócitos do tipo I nos alvéolos, principais alvos do agente e locais onde ocorrem os sintomas característicos da infecção aguda do trato respiratório inferior (HALL et al., 1975; HALL et al., 1980; HALL et al., 1981a; HALL et al., 1981b; COLLINS et al., 2008).

Os surtos de HRSV apresentam sazonalidade regional, assim como ocorre com o vírus *Influenza*, porém nem sempre os ciclos de ambos os vírus coincidem. Fatores como a umidade são importantes para a disseminação do vírus, principalmente em regiões tropicais. Mas, de maneira geral, os picos no número de casos ocorrem em meses de inverno, nos quais a temperatura média é mais baixa e as pessoas tendem a se aglomerar em suas casas, facilitando a transmissão intrafamiliar, onde o contágio geralmente ocorre dos indivíduos adultos para as crianças (YANG et al., 2015; PAYNTER et al., 2015; HEIKKINEN et al., 2015). Apesar de existirem dois subtipos virais (RSVA e RSVB), não existe distinção geral clara entre a sazonalidade de ambos. O que se sabe até o momento é que os subtipos alternam surtos e que RSVA gera títulos virais mais altos, possivelmente facilitando sua dispersão nos momentos de aglomeração familiar. Reservatórios para o vírus ainda não foram encontrados, mas provavelmente existem pequenas

populações virais que se replicam "silenciosamente" em hospedeiros adultos ou em crianças durante o verão (AUSAR et al., 2005; KIM et al., 2015).

**Figura 1.** Tendências idade-específicas do HRSV no ano de 2019. As barras azuis representam o número total de casos de gripe contabilizados por semana epidemiológica em 14 diferentes países ao redor do planeta. O gradiente de cor azul das barras representa a faixa etária acometida pelos casos de gripe, partindo do azul claro (bebês de 0 a 6 meses de idade), seguindo para um tom pouco mais escuro (crianças de 6 meses a 5 anos de idade), depois um tom de azul escuro intermediário (crianças de 5 anos até idosos de 65 anos de idade), chegando até o azul escuro (idosos com idade superior a 65 anos). A linha azul representa o percentual de casos positivos para HRSV, enquanto a linha laranja representa o percentual de positividade para *Influenza*.

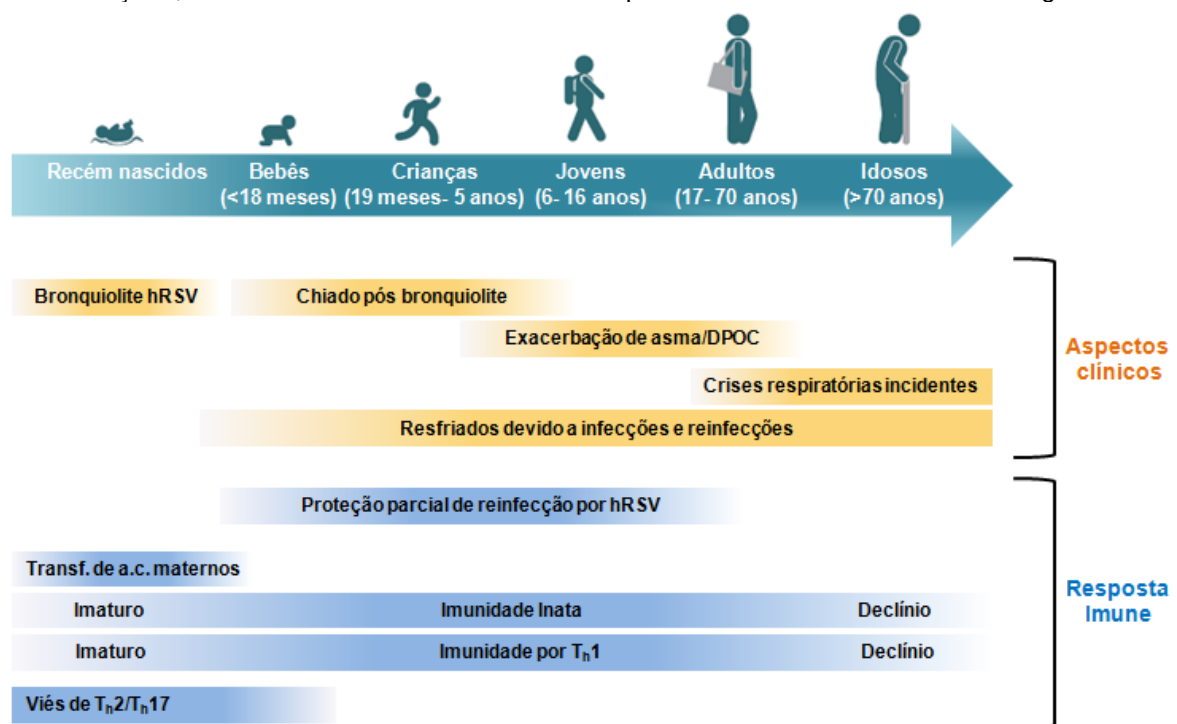


Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020). Disponível em: [http://ais.paho.org/phil/viz/ed\\_who\\_rsv.asp](http://ais.paho.org/phil/viz/ed_who_rsv.asp).

A idade é o fator determinante para o aumento da susceptibilidade de contrair o HRSV, sendo recém-nascidos, crianças até 2 anos de idade e idosos os principais grupos de risco (figura 1), provavelmente em virtude de múltiplos fatores intrínsecos, destacando-se a fragilidade do sistema imunológico, ora imaturo, ora menos eficiente (MUFSON et al., 1973; FALSEY et al., 1995; DOWELL et al., 2006; HALL

et al., 2009;). Porém, estudos epidemiológicos apontam outros fatores agravantes para o estado patológico destes pacientes, sendo eles a exposição excessiva à fumaça (por tabagismo e ao cozinhar), evidências de asma na mãe e o nível socioeconômico (WEBER et al., 1999; OKIRO et al., 2008). Outros grupos notavelmente susceptíveis as hospitalizações pela infecção viral incluem: bebês prematuros ou abaixo do peso (< 2,5 kg), imunocomprometidos (via medicamentosa ou com HIV por exemplo) (HERTZ et al., 1989; WHIMBEY et al., 1995), pessoas com problemas cardiopulmonares (GLEZEN et al., 2000), com anomalias genéticas ou cromossômicas (síndrome de *Down*, por exemplo) (MORI et al., 2014), neoplasias e indivíduos com combinações de todos os quadros listados (WALSH et al., 2004; CILLA et al., 2006; CHEN et al., 2014; WU et al., 2015).

**Figura 2.** Aspectos clínicos e resposta imunológica da infecção por HRSV por faixa etária. A idade é um fator determinante para desenvolver a doença causada por HRSV. As primeiras infecções ocorrem tipicamente logo após o declínio dos títulos de anticorpos maternos, na primeira época de surto de RSV enfrentada por uma criança; este é o momento de grande risco para desenvolver doenças severas do trato respiratório inferior, as quais podem acarretar chiados respiratórios após episódios de bronquiolite na infância tardia. A resposta imunológica amadurece no primeiro e segundo anos de vida, com uma resposta imune inata mais eficiente, aquisição de imunidade  $T_H1$  protetiva e relativo declínio em respostas mediadas por  $T_H2$  e  $T_H17$ . Repetidas infecções com HRSV ocorrem ao longo da vida, porém em adultos saudáveis causam apenas resfriados comuns. No entanto, para aqueles que possuem problemas respiratórios como asma ou doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC), o HRSV pode levar a exacerbações. A imunidade tende a declinar em idade avançada, com a maioria das mortes causadas por HRSV ocorrendo em idosos fragilizados.



Fonte: traduzido e adaptado de Openshaw et al., 2017.

O HRSV não é apenas o maior causador de IRA, como também é um dos agentes que mais levam a hospitalizações devido a IRA severa no mundo todo, ficando atrás apenas das pneumonias bacterianas causadas por pneumococos e *Haemophilus influenzae* tipo B. Estima-se que quase todas as crianças até os dois anos de idade tenham se infectado com HRSV, com cerca de 2% destas requerendo hospitalização. Dados epidemiológicos mostram que o HRSV acomete cerca de 34 milhões de crianças menores que 5 anos de idade por ano, levando a quadros de IRA do trato respiratório inferior grave seguida de hospitalização em cerca de 3,4 milhões de casos. Além disso, a mortalidade deste grupo foi de cerca de 66,000 a 160,000 indivíduos em 2005, com mais de 90% das mortes ocorrendo em países emergentes (HALL et al., 2001; NAIR et al., 2010). Já no grupo dos idosos, os dados são tão alarmantes quanto o supracitado, apresentando um número total de hospitalizações maior que do vírus influenza. Estima-se que 78% das mortes causadas por HRSV sejam de adultos acima de 65 anos de idade, um número que tende a aumentar devido ao envelhecimento das populações, refletindo as mudanças nas estruturas sociais globais (THOMPSON et al., 2003; FALSEY et al., 2005; FLEMING et al., 2015).

Apesar do HRSV infectar boa parte das pessoas logo nos primeiros 6 meses de idade e induzir a produção de níveis significantes de imunoglobulinas, não existe a garantia de imunização para o futuro, sendo frequentes as reinfecções ao longo da vida sem a necessidade de troca antigênica, especialmente nos primeiros anos de vida (WALSH et al., 2004). Os sintomas importantes causados pela infecção por HRSV nos pacientes são originados por dois componentes: o título viral e a exacerbação da resposta imunológica do hospedeiro, sendo geralmente brandos ou inexistentes em indivíduos adultos saudáveis e frequentes e acentuados em indivíduos dos grupos de risco, requerendo hospitalização (DEVINCENZO et al., 2010; UTOKAPARCH et al., 2011).

O aumento da carga viral pode tornar a infecção mais severa, consequentemente causando maior inflamação das vias aéreas, assim como ocorre com outros vírus respiratórios (DEVINCENZO et al., 2010). No entanto, o efeito citopático causado pelo HRSV é relativamente menor do que o observado para influenza por exemplo. Logo, há indícios de que boa parte do dano causado pela infecção ocorra em virtude da resposta imunológica desregulada, cujos indicadores são a infiltração massiva de neutrófilos e eosinófilos e a resposta imune mediada por

células T<sub>H</sub>2 (KIM et al., 1969; EVERARD et al., 1994; JOHNSON et al., 1999; MCNAMARA et al., 2003). Outros efeitos notórios no decorrer da infecção por HRSV são a formação de sincícios entre as células do hospedeiro (originando o nome do vírus) principalmente *in vitro*, obstrução das vias aéreas inferiores (o que agrava os sintomas de indivíduos que possuem asma e doenças pulmonares obstrutivas crônicas – DPOC) e indução de bronquiolite e pneumonia viral grave, levando a deficiência funcional do pulmão, podendo acarretar a morte (SEEMUNGAL et al., 2003; HEWITT et al., 2016). Além disso, a progressão para casos severos da doença pode ter efeitos a longo prazo, existindo indícios de uma correlação direta entre indivíduos que desenvolveram a IRA precocemente e o surgimento de casos de chiados ao respirar e asma no futuro, devido ao desenvolvimento de anormalidades funcionais nos pulmões durante o curso da infecção (CARROLL et al., 2009; SIGURS et al., 2010).

O HRSV pertence ao domínio *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Haploviricotina*, classe *Monjiviricetes*, ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae*, gênero *Orthopneumovirus* (KOONIN et al., 2020), e apresenta morfologia pleomórfica, possuindo nucleocapsídeo helicoidal circundado por um envelope lipídico externo no qual estão embebidas as glicoproteínas de membrana. O vírus possui um genoma de RNA fita simples de polaridade negativa, sem segmentação, com 15,2 kb e dez genes, produzindo dez RNAs mensageiros (mRNA), os quais codificam onze proteínas devido a duas regiões de leitura aberta sobrepostas localizadas no gene M2, produzindo as proteínas M2-1 e M2-2 (COLLINS et al., 1984; COLLINS et al., 1991; GOWER et al., 2005). Desses dez genes, na ordem: 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5', oito codificam proteínas estruturais e dois codificam proteínas não estruturais (NS1 e NS2) relacionadas à evasão de resposta imunológica inata. Das proteínas estruturais, a proteína de matriz (M) e nucleoproteína (N) compõem o nucleocapsídeo, enquanto a fosfoproteína (P) e a RNA polimerase viral (L) constituem o complexo da RNA polimerase. No envelope lipídico estão localizadas as glicoproteínas de membrana, relacionadas com o aumento de permeabilidade, adesão e fusão à célula hospedeira, sendo elas a pequena proteína hidrofóbica (SH), glicoproteína (G, da qual se diferenciam os subtipos virais A e B) e proteína de fusão (F), respectivamente. Por fim, as proteínas M2-1 e M2-2 compõem um importante sistema de regulação do ciclo de replicação viral, encontrado em poucos

vírus desta família, e são responsáveis por impedir a terminação prematura da transcrição e regular a alternância de etapas entre transcrição/tradução, respectivamente (BERTHIAUME et al., 1974; COLLINS et al., 1984; ANDERSON et al., 1985; KNIPE et al., 2001).

## **1. 2. O papel da proteína M2-1 e dgM2-1 na infectividade e replicação viral**

Logo após a fusão da partícula viral com a célula hospedeira, inicia-se a transcrição do genoma viral. A princípio, o complexo da polimerase viral realiza uma transcrição abortiva, iniciando e terminando a transcrição de pequenos trechos do genoma viral, dessa forma produzindo muitas cópias de RNA senso positivo dos genes próximos a extremidade 3'. Portanto, ocorre a geração de um gradiente decrescente de transcritos da extremidade 3' em direção a 5' do genoma (FEARNS et al., 1999; BLONDOT et al., 2012).

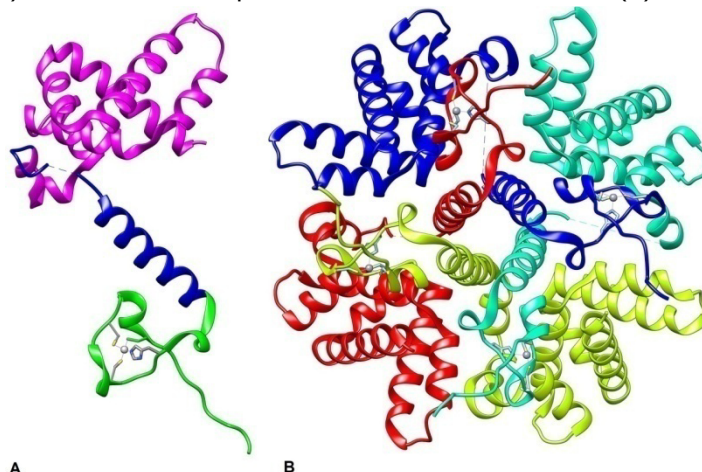
A proteína M2-1 atua no processo de transcrição como um fator de processividade e anti-terminação (COLLINS et al., 1996; HARDY et al., 1998), evitando que a RNA polimerase viral se dissocie precocemente ao chegar no códon de parada, aumentando a eficiência de transcrição principalmente dos genes próximos à extremidade 5' (BLONDOT et al., 2012). Alternativamente, a associação de M2-1 com o replissomo aumenta a atividade replicativa do RNA viral (ASENJO et al., 2012). Dois eventos contribuem para a interação da proteína M2-1 com o complexo nucleocapsídeo. A interação com a proteína N via moléculas de RNA (sendo que a interação com RNA não é sequência específica) e a interação com a proteína P que acontece quando o resíduo Thr108 da proteína P está desfosforilado (ASENJO et al., 2006; ASENJO et al., 2012).

Há evidências de que em alguns *Paramyxoviridae*, uma família relacionada a *Pneumoviridae*, a proteína P exerça duas funções principais: posicionar a proteína L no complexo N-RNA e servir de chaperona para a proteína N recém-sintetizada (CURRAN et al., 1995). Outros estudos sugerem que a proteína P oligomeriza de maneira independente de fosforilação, sendo a mesma desnecessária para a interação P-P, P-N e P-M2-1 (CASTAGNE et al., 2004). A região que compreende os resíduos 100-120 é importante para interagir com M2-1 e a região entre os resíduos 220-240 é importante para a interação com a proteína N (MASON et al., 2003; ESPERANTE et al., 2012).

O mecanismo utilizado para evitar a parada da transcrição não está elucidado ainda, mas algumas hipóteses têm sido postuladas. A proteína M2-1 atua como um fator que evita a parada prematura da transcrição, sendo assim, importante para a transcrição dos mRNA (COLLINS et al., 1996). Ela pode se ligar ao mRNA nascente facilitando a elongação do transcrito, talvez prevenindo que o mRNA se reibridize com o molde ou forme estruturas secundárias que podem desestabilizar o complexo de transcrição. Essa hipótese é sustentada por achados de que o mRNA do RSV co-precipita com a proteína M2-1 em células infectadas com RSV. O efeito do aumento da processividade da M2-1 poderia ocorrer devido ao aumento da afinidade da polimerase pelo RNA genômico molde de uma maneira não específica. Sendo assim, a proteína M2-1 poderia reconhecer sequências GE (do inglês *gene end*) tanto no mRNA como no molde e evitar a liberação do complexo polimerase do molde, favorecendo a reiniciação da sequência GS (do inglês *gene start*) a jusante (CARTEE et al., 2001).

A M2-1 é uma proteína básica de 194 aminoácidos, sendo descrita pela primeira vez como uma fosfoproteína estrutural de membrana (TRAN et al., 2009). A proteína é composta por 40% de  $\alpha$ -hélice, 10% de folha- $\beta$ , 19% de volta  $\beta$  e 31% de estruturas aleatórias, apresentando uma temperatura de fusão (melting) de 55,6 °C (TEIXEIRA et al., 2017). A estrutura cristalográfica da proteína M2-1 mostrou que ela tetrameriza e que essa conformação é a mais estável (KRISSINEL et al., 2007; TANNER et al., 2014). A proteína M2-1 possui quatro regiões distintas (Figura 4): região N-terminal, constituída pelos 32 resíduos iniciais, alguns dos quais se ligam ao zinco (“*zinc finger*”) e atuam no reconhecimento de ácidos nucleicos e consequentemente auxiliam na etapa de transcrição, sendo indispensáveis para a função da proteína (HARDY et al., 1998; TANG et al., 2001; ZHOU et al., 2003); um domínio responsável pela oligomerização (formação dos tetrâmeros) situado entre os resíduos His33 e Gly62; um domínio globular composto por  $\alpha$ -hélices (resíduos 58 a 177) capaz de se ligar à proteína P e RNA; e uma região C-terminal com baixo grau de conservação (TRAN et al., 2009).

**Figura 3.** Representação esquemática do monômero e do tetrâmero formado pelas unidades da proteína M2-1. Estrutura cristalina da proteína M2-1 (4C3B). Uma unidade monomérica da proteína (A) é composta por um domínio de ligação ao zinco (verde), um domínio de oligomerização (azul), um domínio de ligação à proteína P e ao RNA (domínio globular – magenta) e um domínio não estruturado (não mostrado). A forma ativa da proteína é na forma tetramérica (B).



Fonte: Tanner et al., 2014.

A tetramerização é principalmente mediada pela hélice  $\alpha 1$ , mas também é formada pelo domínio “dedo de zinco” e a face N-terminal do domínio globular. Essa superfície de contato extensa do tetrâmero ( $14.369 \text{ \AA}^2$ ) possibilita uma mudança da energia livre de solvatação de  $-44 \text{ kcal/mol}$ , sugerindo um tetrâmero estável (TANNER et al., 2014). A região N-terminal da proteína tem predomínio de cargas positivas, enquanto a região C-terminal também apresenta alta positividade, mas com quatro resíduos de carga negativa. Entre a hélice de tetramerização e o domínio globular, há uma região (resíduos Lys52-Asp67) na qual se encontram os resíduos Ser58 e Ser61 que são sítios de fosforilação. Alternativamente, a região de interface entre o *zinc finger* e o dgM2-1 possui papel importante no reconhecimento de RNA rico em adeninas (TANNER et al., 2014). Sabendo disso, Leyrat e colaboradores (2014) realizaram estudos de interação entre um nucleotídeo, mais especificamente o AMP (adenosina 5'-monofosfato), e a proteína M2-1 do metapneumovirus, o qual é filogeneticamente próximo do RSV. Os resultados obtidos por esse grupo corroboraram com os de Tanner (2014), revelando que a interface é capaz de abrigar uma molécula de AMP com um  $K_d$  de  $8 \text{ mM}$ , de forma que interações do tipo *stacking* entre a molécula e resíduos de aminoácidos aromáticos do domínio dedo de zinco são estabelecidas (LEYRAT et al., 2014; TANNER et al., 2014).

O grau de fosforilação da proteína P afeta a atividade da proteína M2-1. A fosforilação do resíduo Thr108 da proteína P evita a associação P-M2-1,

consequentemente impedindo a associação de M2-1 ao complexo do nucleocapsídeo, obrigando-o a desempenhar atividade replicativa sobre o RNA viral. Por outro lado, a desfosforilação do resíduo Thr108 de P leva à associação da proteína M2-1 ao complexo, conferindo-o atividade transcricional (ASENJO et al., 2006). Ainda foi observado que a fosforilação dos resíduos S58 e S61 e a desfosforilação dos resíduos Thr56 e Ser58 da proteína M2-1 reduzem a afinidade da proteína ao RNA, o que afeta a sua função (TANNER et al., 2014). Análises de mutação sítio dirigida mostraram que os resíduos Ser58, Ser61, Lys92, Lys150, Arg151 e Lys159 exercem papel fundamental sobre a interação do RNA com a proteína e que os resíduos Arg3, Arg4, Ser58, Ser61, Lys150, Arg151 e Lys159 são importantes para a atividade anti-terminação da proteína (TANNER et al., 2014).

O domínio globular, compreendido entre os resíduos Ser58 e Lys177, é formado por seis 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. A face positiva contém um grande conjunto básico delimitado pelas hélices  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  que contribuem para a interação com o RNA (BLONDOT et al., 2012). Estudos apontam que o domínio globular apresenta alta afinidade por fitas de RNA de polaridade negativa, rica em uracilas (BLONDOT et al., 2012) e por RNA senso positivo, ricas em purinas, especialmente adenina, cuja constante de dissociação dessa interação é de 19,1 nM (TANNER et al., 2014). As hélices  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  podem interagir tanto com a proteína P como com RNA. Já  $\alpha 4$  e  $\alpha 2$  parecem estar envolvidas na ligação específica da proteína P e RNA, respectivamente (BLONDOT et al., 2012). Uma análise de mutação sítio dirigida mostrou que a substituição de Lys92 (hélice  $\alpha 2$  – ligação com RNA) e Arg126 e Thr130 ( $\alpha 4$  – ligação com P) por aspartato, diminuem a transcrição. Similarmente, mutações nos resíduos Lys150, Arg151, Thr160 e Asn163 nas hélices  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  que estão relacionados à ligação de RNA/P, tiveram o mesmo efeito (BLONDOT et al., 2012).

### **1. 3. Moléculas com potencial terapêutico e candidatas a antivirais para interação com a proteína M2-1**

As infecções causadas por RSV são maioria dentre crianças em idade escolar e idosos com idade superior aos 65 anos e persistem como um dos mais sérios

problemas de saúde pública pelo mundo (CHANOCK et al., 1957; DOWELL et al., 1996). Muito se sabe a respeito do ciclo viral e das funções e estruturas das proteínas, logo, existem muitas possibilidades visíveis de intervenção terapêutica. No entanto, até o presente momento, o desenvolvimento de vacinas e terapias antivirais foi infrutífero, quando comparado ao que se conseguiu com outros vírus como influenza, hepatite C e HIV (MUFSON et al., 1973; SIDWELL et al., 2006; HALL et al., 2009; GRIFFITHS et al., 2017). O suporte clínico oferecido aos pacientes hospitalizados permanece sendo a oxigenação e hidratação constantes. Tentativas de imunização vacinal foram iniciadas na década de 1960 e falharam, levando a quadros de indução da própria doença por HRSV e consequente morte de alguns pacientes vacinados (KIM et al., 1969; GRIFFITHS et al., 2017). Atualmente a forma mais eficaz adotada para combater a infecção por HRSV é a administração profilática de anticorpos (palivizumab e derivados), mas também houveram tentativas malsucedidas de uso de antivirais como a ribavirina. Em ambos os casos os medicamentos foram receitados apenas para os grupos de risco, pois os mesmos exibem restrições como o alto custo e a possibilidade de causar efeitos colaterais graves (SIDWELL et al., 2006). Diversos compostos e terapias vem sendo testados clinicamente e novas estratégias de imunização preventiva estão sendo desenvolvidas, como a vacinação materna e pediátrica.

Ainda que vacinas venham a ser licenciadas, existe uma ampla chance de que terapias anti-infecção devam continuar sendo desenvolvidas, já que o agente viral possui elevada taxa de mutação, a qual permite a troca antigênica rápida e consequente evasão da resposta imunológica (AGOTI et al., 2014; GRIFFITHS et al., 2017). Além disso, os grupos de risco muitas vezes apresentam um sistema imunológico ineficiente, o que torna a imunização por vacinas pouco proveitosa, sendo necessária uma intervenção terapêutica ou antiviral adicional. Outro agravante é o nível socioeconômico dos pacientes. Como a maioria das mortes ocorrem em países emergentes, faz-se necessário o desenvolvimento de alguma forma de antiviral eficaz de menor custo e uma possível maneira de alcançar isso seria a busca por compostos naturais com essa propriedade (NAIR et al., 2010; GRIFFITHS et al., 2017).

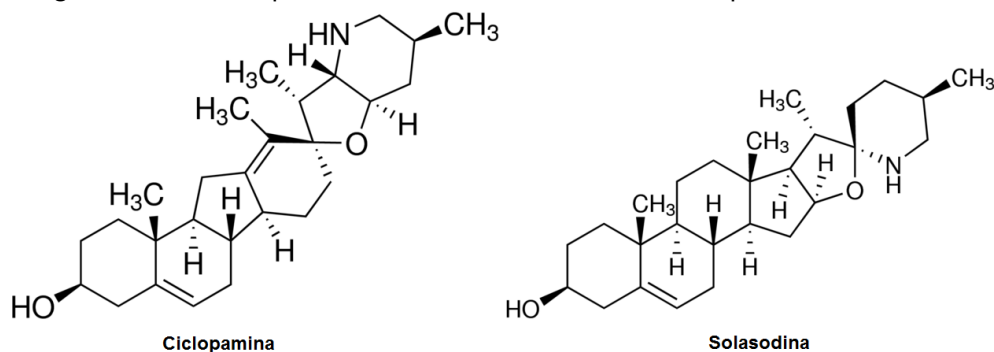
O desenho racional de medicamentos nem sempre produz antimicrobianos eficazes. Estudos mostram que produtos naturais apresentam propriedades farmacêuticas melhores do que compostos gerados aleatoriamente por química

combinatorial. No passado, potentes enzimas foram sintetizadas com sucesso, com atividades antimicrobianas modestas, provavelmente devido ao baixo potencial de absorção celular. Atualmente, diversos trabalhos de síntese e triagem de compostos naturais para a atividade antimicrobiana vem sendo realizados para o desenvolvimento de novos medicamentos. Esses produtos têm sido uma fonte particularmente rica de agentes antimicrobianos como, por exemplo, a obtenção das penicilinas em 1940, das tetraciclinas em 1948 e dos glicopeptídeos, em 1955. A continuidade dos estudos com compostos naturais reafirmou seu uso clínico, inclusive como drogas antivirais (FEHER et al., 2003; BUTLER et al., 2005; HARVEY et al., 2008).

Os alvos escolhidos para serem testados são alcaloides esteroidais, moléculas sintetizadas a partir de alcaloides, uma classe de compostos com distribuição ampla pela natureza, sendo produzidos pela maioria dos seres vivos e, neste caso, por dois vegetais distintos: *Veratrum californicum* (lírio da Califórnia) e plantas da família *Solanaceae* (FRIED et al., 1953; ÖZÇELİK et al., 2011; PATEL et al., 2013; MOUSAVIZADEH et al., 2018). Tais moléculas geralmente são absorvidas com facilidade pelo organismo humano e vem sendo descritas por apresentarem muitas características atrativas para o desenho de novas estratégias terapêuticas. As atividades farmacológicas descritas na literatura evidenciam esse fato. Dentre elas pode-se elencar as seguintes atividades: inseticida, antiparasitária, antifúngica, antibacteriana, anticarcinogênica, antiasmática, analgésica e, principalmente, antiviral (LEVETIN et al., 1999; SINATRA et al., 2010; RUSSO et al., 2013; CUSHNIE et al., 2014; KITTA KOOP et al., 2014; SHI et al., 2014). Alcaloides esteroidais também possuem uma variedade de atividades descritas, similares as demonstradas para os alcaloides (LEVETIN et al., 1999; TAIPALE et al., 2000). Ademais, um composto específico dessa classe foi descrito como um potente inibidor, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, da replicação do HRSV. O composto é a ciclopamina que historicamente foi descoberta em 1957 e pouco tempo depois descrita como um potente agente teratogênico causador de ciclopia, assim como outras moléculas oriundas de *V. californicum* (JAMES, L. F. et al., 2004). No caso do estudo, a proteína M2-1 foi o provável alvo da molécula, o que desencadeou uma desregulação funcional do complexo da RNA polimerase viral, seguida de redução na eficiência de transcrição e consequente redução dos títulos virais ao longo dos experimentos em cultura de células e em modelos animais (BAILLY et al., 2016).

Este achado abre o caminho para exploração dos mecanismos envolvidos nesta possível interação. Além disso, possibilita que sejam testadas outras moléculas estruturalmente similares a ciclopamina, por exemplo a solasodina, outro alcaloide esteroidal que já possui importância farmacológica bem descrita na literatura (PATEL et al., 2013).

**Figura 4.** Estrutura química dos alcaloides esteroidais ciclopamina e solasodina.



Fonte: C. A. BROWNE et al., 1984.

## 2. Objetivos

### 2. 1. Objetivo geral

A proteína M2-1 é imprescindível para a manutenção do ciclo viral do HRSV e atua no processo de transcrição como um fator de processividade e anti-terminação, estabilizando e evitando que a RNA polimerase viral se dissocie precocemente do RNA viral. Visando esta função, foram realizados experimentos de fluorescência para determinar parâmetros termodinâmicos da interação entre dgM2-1 e RNA em diferentes condições de temperatura, pH e força iônica. Por outro lado, a proteína M2-1 (inteira) apresenta um sítio para a ligação de um alcaloide esteroide, a ciclopamina, como demonstrado por Bailly e colaboradores em 2016. Baseando-se neste artigo, o sítio deveria coincidir com uma região importante para a interação da proteína com o RNA no domínio globular, logo, tornando o alcaloide um candidato a antiviral contra a infecção por HRSV. Além disso, existe a possibilidade de que outros compostos estruturalmente similares a ciclopamina exibam papéis semelhantes, como é o caso da solasodina. Sendo assim, um dos objetivos deste trabalho foi verificar se a interação realmente ocorre no domínio globular ou em algum outro sítio, como o de ligação ao AMP, que se situa entre o dgM2-1 e o dedo de zinco do protômero adjacente (LEYRAT et al., 2014; TANNER et al., 2014), possibilitando assim detalhar como ocorre a interação.

### 2. 2. Objetivos específicos

Realizar a transformação de bactérias *Escherichia coli* da linhagem RIL com os vetores que codificam para M2-1 e dgM2-1;

Expressar M2-1 e dgM2-1 em *E. coli* utilizando meio de cultura LB e purificá-las por cromatografia;

Realizar medidas de dicroísmo circular como método de controle de qualidade;

Realizar medidas de supressão de fluorescência do dgM2-1 pelo RNA em 3 diferentes temperaturas (15, 25 e 35 °C);

Realizar medidas de supressão de fluorescência do dgM2-1 pelo RNA em 3 diferentes concentrações de NaCl (0, 150 e 350 mM);

Realizar medidas de supressão de fluorescência do dgM2-1 pelo RNA em 3 diferentes valores de pH (5,0, 6,5 e 8,0);

Verificar a influência da solasodina sobre a interação entre M2-1 e AMP por espectroscopia de fluorescência;

Verificar a influência da ciclopamina sobre a interação entre M2-1 e AMP por espectroscopia de fluorescência;

Realizar o *docking* da solasodina e ciclopamina na proteína M2-1;

### 3. Material e métodos

#### 3. 1. Clonagem e expressão das proteínas

Para a expressão das proteínas de interesse foi utilizada a tecnologia de DNA recombinante, sendo *Escherichia coli* o modelo de estudo. Os genes das proteínas M2-1 e dgM2-1 foram clonados separadamente em vetores de expressão pD441-NHT, com o gene de resistência ao sulfato de canamicina, por serviço de terceiros (ATUM). A princípio, bactérias competentes da linhagem RIL foram transformadas com os vetores adquiridos. As transformações foram feitas por meio de choque térmico, com o uso de gelo e banho térmico. Primeiramente foram adicionados 100 ng de plasmídeo ao tubo contendo as células competentes, o qual foi levado ao gelo por 30 minutos, depois ao banho térmico (42 °C) por 1 minuto e retornará ao gelo por mais 2 minutos. Em seguida, as bactérias foram inoculadas em meio de cultura LB sob agitação. As culturas foram então clarificadas por centrifugação e os pellets formados foram usados para realizar a semeadura em placas de petri contendo meio de cultura solidificado com ágar, 34 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL de sulfato de canamicina. As placas foram incubadas em estufa overnight ou por 16 horas a 37 °C para crescimento das colônias bacterianas.

Uma vez obtidas, três colônias de cada placa foram selecionadas visualmente e submetidas a testes de expressão. Os testes de expressão consistiram na inoculação de cada colônia separadamente em 5 mL de meio de cultura LB contendo os dois antibióticos e na posterior comparação entre os períodos pré-indução e pós indução de expressão gênica. A indução de expressão foi realizada *overnight* a 28 °C com a adição de 0,4 mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Alíquotas de cada período testado foram retiradas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (abreviação em inglês – SDS-PAGE), possibilitando determinar quais clones foram os mais adequados a expressar cada uma das proteínas. Os melhores clones foram estocados com 20% de glicerol em freezer -80 °C.

A inoculação dos clones seguiu a mesma lógica do teste de expressão. Um clone apropriado de cada célula transformada com os vetores de M2-1 e dgM2-1 foi adicionado a um *Erlenmeyer* com 50 mL de LB, contendo 34 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL de sulfato de canamicina e colocado para crescer sob agitação a 37 °C até atingir a densidade óptica (DO) de 0,8 unidades de absorbância (ua). Em

seguida foi realizado o rejuvenescimento da cultura, processo no qual foi aumentado o volume da cultura para 1 L, adicionando-se mais antibióticos para manter a concentração inicial, sob as mesmas condições de agitação e temperatura, até atingir a DO de 0,7 ua. Ao chegar nesse grau de turbidez foi realizada a indução da expressão com 0,4 mM de IPTG a 28 °C sob agitação por 16 horas. Nesta última etapa, apenas para a cultura contendo o vetor da M2-1, foi adicionado 50 µM de sulfato de zinco como suplemento, já que a proteína necessita de zinco para o seu *folding* correto.

### **3. 2. Extração e purificação das proteínas**

Transcorrido o período de indução, a cultura foi clarificada por centrifugação a 4000 x g, 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensionado em tampão de lise contendo: i) 800 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 100 mM de L-arginina, 1 mM β-mercaptoetanol (βME), 0,5 mM de inibidor de protease (PMSF) para a proteína M2-1; ii) 800 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 1 mM β-mercaptoetanol e 0,5 mM de inibidor de protease (PMSF) para a proteína dgM2-1. As células ressuspensionadas foram levadas para a etapa de lise por sonicação. O lisado foi então clarificado a 17000 rpm por 50 minutos a 4 °C. O pellet formado foi descartado, enquanto o sobrenadante contendo a fração solúvel de proteínas foi filtrado em filtro com diâmetro de poro de 0,45 µm (Minisart®) e submetido à purificação por cromatografia de afinidade.

As proteínas M2-1 e dgM2-1 foram expressas com cauda de poli-histidina (His<sub>6</sub>) seguida por um sítio de clivagem para TEVP (abreviação em inglês para *Tobacco Etch Virus Protease*), ambas adicionadas a extremidade N-terminal. Logo, foi possível realizar a purificação das proteínas manualmente por cromatografia de afinidade, em resina carregada com níquel. Primeiramente o extrato filtrado obtido da lise foi inserido em uma coluna de cromatografia previamente equilibrada com tampão de equilíbrio contendo 50 mM de TrisHCl, 800 mM de NaCl, 5 mM de imidazol e 1 mM de βME. As etapas de lavagem e eluição ocorreram logo em seguida, com um gradiente de imidazol variando de 10 a 500 mM. Alíquotas de cada uma das etapas de lavagem e eluição foram preparadas para realização de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, com o propósito de determinar o grau de pureza da proteína.

Posteriormente, as amostras contendo as proteínas de interesse foram concentradas até 500  $\mu\text{L}$  (M2-1) ou para 5 mL (dgM2-1) em filtros de centrífuga Amicon® Ultra-15. Essa diferença de volume entre os procedimentos se deve ao processo de clivagem da cauda His<sub>6</sub> ao qual o dgM2-1 é submetido logo em seguida. A clivagem da cauda de poli-histidina se deu com o uso de TEVP, produzida de forma recombinante no próprio CMIB seguindo procedimentos semelhantes de purificação por cromatografia. Durante o processo, o dgM2-1 foi incubado a 17 ° C juntamente com a protease numa razão de 50:1 (dgM2-1/TEV) e dialisado em tampão contendo (50 mM Tris, 0,5 M EDTA e 1 mM DTT – ditioneitol) por 16 horas. A etapa seguinte consistiu em uma nova purificação por cromatografia de afinidade, desta vez com o intuito de separar a proteína clivada da protease (TEVP também contém cauda His<sub>6</sub>, no entanto não possui sítio para clivagem). Terminado esse procedimento, foi realizado novo SDS-PAGE para verificação de pureza e da ocorrência de clivagem, para então concentrar a proteína até 500  $\mu\text{L}$  e submeter a nova metodologia cromatográfica.

O novo processo de purificação, exclusão molecular, também denominada gel filtração, foi realizado em um sistema de purificação automatizado (ÄKTA purifier, GE Healthcare®), com a intenção de aumentar a pureza e melhorar a qualidade da amostra de proteína. Para isso, a coluna de gel filtração foi equilibrada com tampão contendo 50 mM de fosfato, 150 mM de NaCl e 1 mM de  $\beta\text{ME}$  em pH 6,5 e 7,0 para dgM2-1 e M2-1, respectivamente. As eluições foram realizadas com o mesmo tampão e as amostras desta etapa foram coletadas e alíquotas foram submetidas a um novo SDS-PAGE para análise de pureza, para então prosseguir para os experimentos.

### 3. 3. Medidas espectrofotométricas e espectrofluorimétricas

As medidas de espectroscopia de UV/Vis foram obtidas com espectrofotômetro *BioMate™ 3S Spectrophotometer* (ThermoScientific), munido com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Estas medidas foram realizadas para se determinar as concentrações estoque das amostras das proteínas M2-1, dgM2-1, RNA e AMP. No cálculo da concentração das proteínas, foram utilizados os valores dos coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ):  $\epsilon_{280} = 14565 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e  $\epsilon_{280} = 7450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para as proteínas M2-1 e dgM2-1, ambas com His-tag, respectivamente. Para os experimentos entre dgM2-1 e

RNA, foi realizada a clivagem da cauda His<sub>6</sub>, portanto o coeficiente de extinção molar pós clivagem ( $\epsilon_{280pc}$ ) passou a ser equivalente a 5960 M<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>. Já as medidas de fluorescência foram realizadas no equipamento ISS PCI *Photon Counting Spectrofluorometer*, equipado com controlador de temperatura e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

### **3. 3. 1. Preparo das soluções de RNA, solasodina, ciclopamina e AMP.**

A solução estoque de RNA foi preparada em tampão com 50 mM de fosfato de sódio em pH 6,5, 150 mM NaCl, adotando  $\epsilon_{260} = 8100$  M<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup> (ThermoFisher Scientific) por base e a concentração estimada foi de 715 µM. O RNA utilizado foi produzido em leveduras e adquirido através de compra da Sigma Aldrich (código R6625), possuindo tamanho médio de 80 bases.

A solasodina foi adquirida por compra da Santa Cruz Biotechnology enquanto a ciclopamina foi adquirida da empresa Carbo Synth. Ambos os estoques de alcaloides foram preparados em etanol 100%, com concentrações iguais a 5 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente. Devido a ausência de propriedades ópticas na região do UV-Vis, não foi possível estimar os coeficientes de extinção molar de ambas, portanto, todas as concentrações foram mensuradas a partir da razão massa/volume.

A adenosina 5'-monofosfato dissódica (AMP) também foi obtida da empresa Sigma Aldrich (código 01930) e preparada em tampão 50 mM de fosfato de sódio pH 7,0, chegando à concentração de 31 mM, assumindo  $\epsilon_{258} = 15000$  M<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>.

### **3. 3. 2. Titulações fluorimétricas e cálculos para verificação das interações da proteína dgM2-1 com RNA**

As medidas da interação da proteína com o ligante foram realizadas medindo-se os espectros de fluorescência da proteína e da supressão da intensidade dos mesmos após a adição de RNA na solução nas diferentes condições listadas. A cada titulação, a amostra era homogeneizada e eram aguardados 2 minutos até o início da medição. O passo seguinte de titulação era realizado apenas após o alcance da estabilidade entre as medidas da titulação anterior. Além disso, todos os experimentos entre dgM2-1 e RNA foram feitos em duplicata.

Nos experimentos, os fluoróforos intrínsecos do dgM2-1 (tirosinas) foram excitados em  $288 \pm 2,5$  nm e foram coletados os espectros de emissão de fluorescência no intervalo de 295 a  $400 \pm 2,5$  nm. Os espectros coletados resultam da média de 10 acumulações e ao final das medidas todos foram corrigidos no intuito de eliminar efeitos de filtragem interna ocasionados pelo tampão e RNA. Os experimentos foram divididos em três condições distintas: i) variação de temperatura, sendo elas de 15, 25 e 35 °C, a fim de avaliar os parâmetros termodinâmicos da interação dgM2-1/RNA; ii) variação de salinidade (força iônica), em concentrações de 0, 150 e 350 mM NaCl; iii) e por fim variação de pH, sendo 5.0, 6.5 e 8.0. As duas últimas condições foram realizadas com a finalidade de avaliar contribuições eletrostáticas para a formação e estabilização do complexo dgM2-1/RNA.

A intensidade de fluorescência de uma macromolécula pode diminuir devido a uma variedade de interações com outros compostos moleculares: rearranjo molecular, transferência de energia, supressão devido a colisões, dentre outros (LAKOWICZ et al., 2013). A partir do padrão de supressão de fluorescência, utilizando tratamentos matemáticos, pode-se obter parâmetros importantes da interação entre duas moléculas, como a constante de dissociação, parâmetros termodinâmicos e os coeficientes estequiométricos das reações. Logo, os dados de supressão de fluorescência da interação do dgM2-1 com RNA foram analisados utilizando a seguinte equação [94]:

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_{sat}} = \frac{1}{2n[P_T]} \left[ (n[P_T] + [L_T] + K_d) - \sqrt{(n[P_T] + [L_T] + K_d)^2 - 4n[P_T][L_T]} \right] \quad (1)$$

sendo que  $F_0$  e  $F$  são a intensidade de fluorescência na ausência e presença de ligante (RNA), respectivamente,  $F_{sat}$  a medida de fluorescência da proteína saturada com RNA,  $K_d$  a constante de dissociação,  $n$  o número de sítios de ligação,  $[P_T]$  a concentração total de proteína e  $[L_T]$  a concentração total de ligante.

A força de interação entre biomoléculas pode incluir interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e contatos hidrofóbicos (ROSS et al., 1981). Os parâmetros termodinâmicos foram calculados a partir da análise de van't Hoff, na intenção de elucidar a interação entre a dgM2-1 e o RNA. Como a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) não se altera significativamente no intervalo de

temperatura estudado (15, 25 e 35 °C) é possível avaliá-la a partir da equação de van't Hoff:

$$\frac{d}{d\frac{1}{T}} \ln\left(\frac{1}{K_d}\right) = -\frac{\Delta H}{R} \quad (2)$$

sendo  $R$  a constante universal do gases ideais (8,31 kJ.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>) e  $T$  a temperatura (K). O valor de  $\Delta H$  foi obtido a partir da inclinação do gráfico de van't Hoff e as variações na energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) e na entropia ( $\Delta S$ ) foram calculadas a partir das seguintes relações:

$$\Delta G = -RT \ln(K_b) \quad (3)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (4)$$

### 3. 3. 3. Titulações fluorimétricas e cálculos para verificação das interações da proteína M2-1 com AMP, na presença e ausência de solasodina ou ciclopamina.

As medidas fluorimétricas foram realizadas utilizando os mesmos cuidados e padrões das fluorescências entre dgM2-1 e RNA. Isto é, após cada titulação, agitava-se a amostra na cubeta, aguardava-se 2 minutos e realizava-se a medição, a qual era seguida por outra até que fosse atingida a estabilidade. O único triptofano da proteína M2-1 foi excitado em 295 ± 2,5 nm e foram coletados os espectros de emissão de fluorescência no intervalo de 300 a 500 ± 2,5 nm. Os espectros resultam da média de 10 acumulações e ao final das medidas todos foram corrigidos no intuito de eliminar efeitos de filtragem interna ocasionados pelo tampão e AMP. Todas as medições ocorreram a 25 °C, na seguinte ordem: i) primeiramente, um espectro da proteína a 5 µM foi coletado; ii) titulou-se solasodina ou ciclopamina até determinada concentração; iii) titulou-se AMP até chegar na concentração final de aproximadamente 1,27 mM.

O intuito das medidas foi verificar se a solasodina e/ou a ciclopamina poderiam estar afetando a interação entre o AMP e a proteína por meio de alteração na constante de afinidade entre ambos. Além disso, foi realizado um experimento controle,

no qual adicionou-se o mesmo volume de etanol absoluto (solvente dos alcaloides) que nos experimentos envolvendo adição de alcaloides, seguido pelas mesmas titulações de AMP como nos demais. A constante de dissociação entre o AMP e M2-1 nas diferentes condições foi dada pela seguinte equação [94], a qual deriva da equação 1:

$$\frac{F}{F_0} = 1 - (1 - F_{\text{sat}}) \times \left( \frac{(K_d + L_T + P_T) - \left( \sqrt{(K_d + L_T + P_T)^2 - 4 \times L_T \times P_T} \right)}{2 \times P_T} \right), \quad (5)$$

na qual  $F_0$  é a intensidade de fluorescência na ausência de ligante (AMP),  $F$  a fluorescência na presença do mesmo,  $F_{\text{sat}}$  a medida de fluorescência da proteína saturada com AMP,  $K_d$  a constante de dissociação,  $[P_T]$  a concentração total de proteína e  $[L_T]$  a concentração total de ligante.

### 3. 4. Medidas de dicroísmo circular.

Para os experimentos de dicroísmo circular (abreviado do inglês como *CD*, de *Circular Dichroism*), foi preparada uma amostra de 5,5  $\mu\text{M}$  de dgM2-1 em tampão com 50 mM de tampão fosfato de sódio. O equipamento utilizado foi um Jasco 710 (Jasco, EUA) equipado com uma célula de quartzo de 0,5 mm de caminho óptico. Os espectros de CD na região do ultravioleta distante foram registrados em temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) e diferentes pHs (5,0, 6,5 e 8,0). Os espectros são o resultado de 20 varreduras em um intervalo espectral de 260–200 nm com uma resolução de 0,2 nm em uma velocidade de varredura de  $50 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$  e 1,0 nm de largura de banda espectral. O sinal de CD registrado como miligraus ( $\theta$ ) foi corrigido levando em consideração a contribuição da solução tampão e em seguida expresso em termos de elipticidade molar por resíduo  $[\Theta]$  em unidades de  $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$  usando a seguinte equação:

$$[\Theta] = \frac{\theta(m \text{ deg})}{10[P]l n_R}, \quad (6)$$

sendo que  $[P]$  é a concentração molar da proteína,  $l$  é o comprimento do caminho óptico (cm) e  $n_R$  é o número de resíduos de aminoácidos.

### 3.5. *Docking* Molecular

A fim de complementar as análises experimentais, foram realizados ensaios computacionais de *docking* molecular do complexo formado entre M2-1 e solasodina ou ciclopamina. As simulações de *docking* molecular de ambos os compostos na proteína M2-1 foram orientadas pelos resultados obtidos dos experimentos de espectroscopia de fluorescência. Nesse contexto, utilizou-se a estrutura cristalográfica da proteína M2-1 depositada no *website Protein Data Bank*, código 4C3B (TANNER et al., 2014). Entretanto, algumas regiões flexíveis da proteína estavam ausentes nos cristais, então utilizou-se o servidor *Swiss-Model* (BIASINI et al., 2014) no intuito de reconstruí-las. Por outro lado, os alcaloides tiveram suas estruturas moleculares geradas pelo programa *Gaussian 9* (FRISCH et al., 2009) utilizando o nível de teoria semi-empírico PM6. As estruturas tridimensionais, tanto do tetrâmero como dos alcaloides, foram preparadas utilizando o software *AutoDockTools* (ADT) (MORRIS et al., 1998), com mapas de grade de 0,375 Å de espaçamento e dimensões de 60 × 60 × 60 pontos pelo programa *AutoGrid 4.2* (MORRIS et al., 1998), centralizado no local de ligação do AMP (código de PDB 4CS9) [68] em um dos monômeros de M2-1 devido a simetria rotacional de seu arranjo tetramérico. Para estudar os possíveis sítios de interação entre M2-1 e os alcaloides, foi utilizado o algoritmo genético Lamarckiano (LGA, da abreviação em inglês), totalizando 25 milhões de avaliações de energia de ligação, com RMSD de 2 Å de tolerância para a análise dos agrupamentos e um tamanho de população de 250. Foram gerados 100 diferentes conformeros para cada simulação de *docking*. Por fim, as representações estruturais de todas as moléculas foram geradas pelo software *PyMol* (SCHRODINGER et al., 2010), enquanto as interações foram produzidas pelo software *PoseView* (FRICKER et al., 2004).

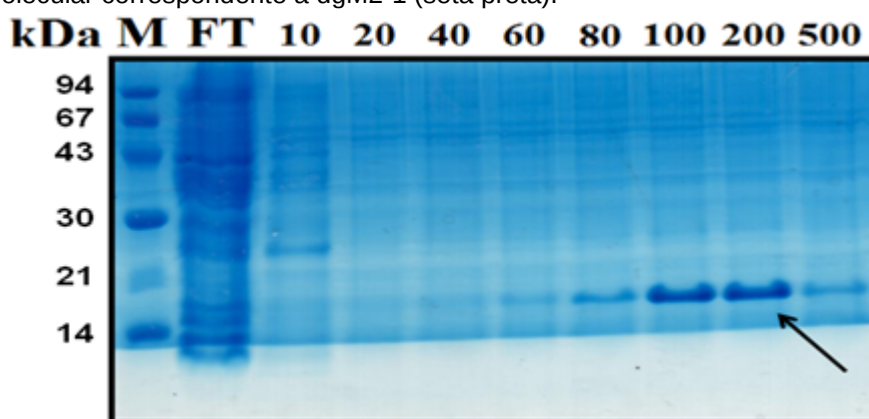
## 4. Resultados e Discussão

### 4. 1. Purificação das proteínas

#### 4. 1. 1. Purificação do dgM2-1

A Figura 5 mostra o resultado obtido por um processo de purificação por cromatografia de afinidade em gradiente crescente na concentração de imidazol. Ao longo do gradiente, nota-se a existência de uma banda de proteína eluída a partir de 60 mM do competidor, com massa molecular similar a da dgM2-1 (aproximadamente 15 kDa) e com boa proporção dgM2-1/contaminantes.

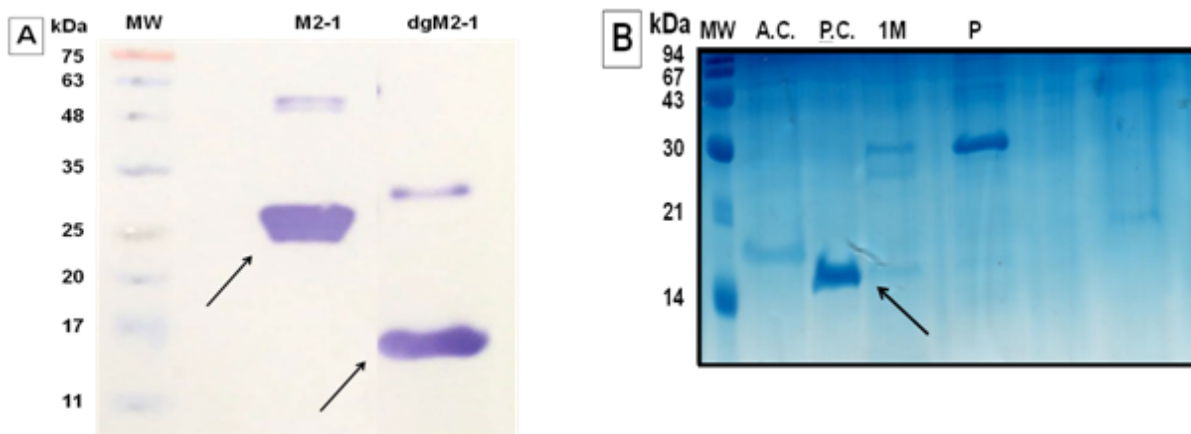
**Figura 5.** SDS-PAGE 15% do processo de purificação da dgM2-1 por cromatografia de afinidade. À esquerda encontram-se os valores de referência para a massa molecular e acima temos: M (marcador de massa molecular), FT (*flow-through*), etapas de lavagem (concentrações de imidazol de 10 a 40 mM) e etapas de eluição (gradiente de 60 a 500 mM de imidazol), evidenciando as bandas com massa molecular correspondente a dgM2-1 (seta preta).



Fonte: autoria própria.

As amostras de eluição foram juntadas, concentradas e foi realizado um *western-blotting* com essa alíquota a fim de confirmar se a proteína purificada realmente era a dgM2-1 (Figura 6). Após a confirmação, a solução com a proteína foi submetida ao processo de clivagem com TEVP para remoção da cauda His<sub>6</sub>. O gel de poliacrilamida que consta na Figura 6 mostra que a clivagem ocorreu, já que se torna evidente a diferença de massa molecular entre a proteína nos estágios de pré e pós clivagem, como previsto. Em seguida, após nova etapa de purificação por afinidade, a proteína sem a cauda deixou a coluna já nas etapas de lavagem, enquanto TEVP e a maioria dos demais contaminantes permaneceram ligados à coluna, sendo removidos posteriormente.

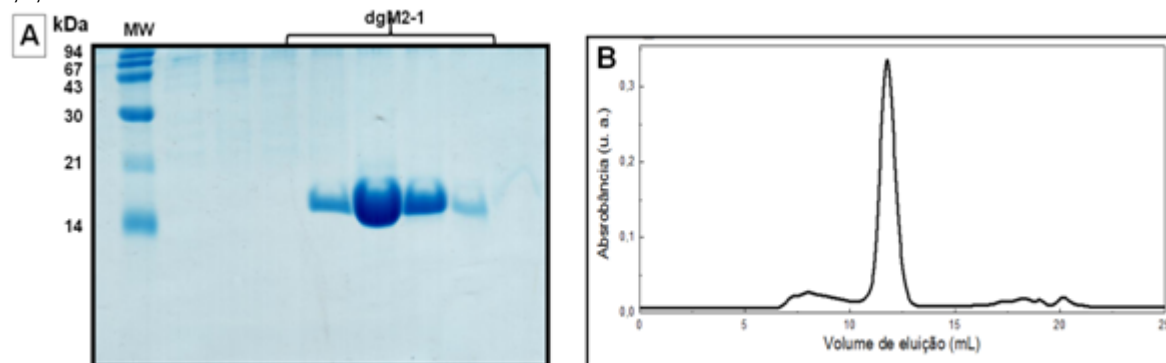
**Figura 6.** Identificação das proteínas de interesse por *Western-blotting* e SDS-PAGE 15 % do processo de clivagem da His<sub>6</sub> do dgM2-1. À esquerda de ambas as imagens se encontram os valores de referência para a massa molecular. Na membrana de nitrocelulose (A) temos, acima, da esquerda para a direita: marcador de massa molecular (MW), amostra de M2-1 purificada e dgM2-1 purificada. A marcação das bandas pelo anticorpo anti-His<sub>6</sub> evidencia que as proteínas obtidas são as de interesse. Em SDS-PAGE 15 % (B), acima e da esquerda para a direita temos: marcador de massa molecular (MW), amostra antes da clivagem com TEVP (A.C.), etapa pós clivagem (P.C.), etapa de lavagem da coluna com 1 M de imidazol (1M) e amostra do que precipitou no saco de diálise durante o processo (P). A diferença de massa molecular entre A.C. e P.C. denota que houve perda de algum fragmento da proteína sob análise, distinção correspondente ao esperado para a cauda His<sub>6</sub> mais sítio de clivagem (aproximadamente 2 kDa).



Fonte: autoria própria.

No intuito de elevar o grau de pureza da dgM2-1 e realizar a troca de tampões, amostras contendo a proteína clivada foram concentradas e submetidas ao processo de purificação por exclusão molecular. A Figura 7 mostra o gel de poliácridamida referente a este processo de purificação. As alíquotas puras foram juntadas, concentradas e utilizadas nos experimentos cabíveis.

**Figura 7.** (A) SDS-PAGE 15 % do processo de purificação do dgM2-1 por exclusão molecular, evidenciando a pureza da proteína. (MW): marcador de massa molecular; (dgM2-1) eluições da proteína de interesse. (B) Cromatograma da purificação por exclusão molecular em tampão com pH 6,5, 50 mM fosfato de sódio e 150 mM NaCl.

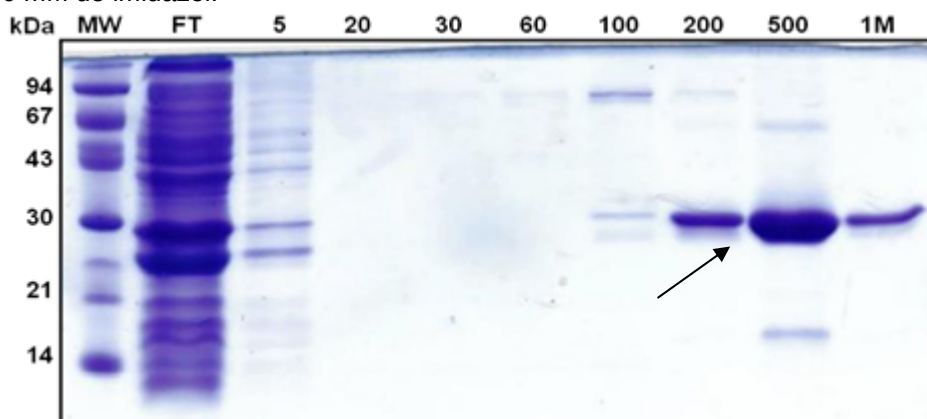


Fonte: autoria própria.

#### 4. 1. 2. Purificação da M2-1

A proteína M2-1 seguiu passos similares aos da purificação da proteína dgM2-1. Como ambas as proteínas possuem função de ligação ao RNA, seus tampões de lise necessitavam de agentes que realizassem uma blindagem da proteína para que se conseguisse separa-los e ao mesmo tempo garantissem a estabilidade das mesmas. Parte da proteína extraída permaneceu nas etapas de *flow-through* e lavagem, mesmo após o estabelecimento de um tempo para interação com a resina em baixa temperatura (10 ° C) sob agitação no *shaker*. Já a eluição da proteína se deu a partir de 100 mM do gradiente de imidazol. A Figura 8 mostra o gel de poliacrilamida 15% que contém as amostras do processo de purificação da M2-1 por afinidade em resina Ni-NTA, no qual fica evidente uma banda marcada na altura de aproximadamente 28 kDa, massa molecular correspondente a teoricamente estipulada para a proteína e corroborada pelo *western-blot* mostrado na Figura 6A.

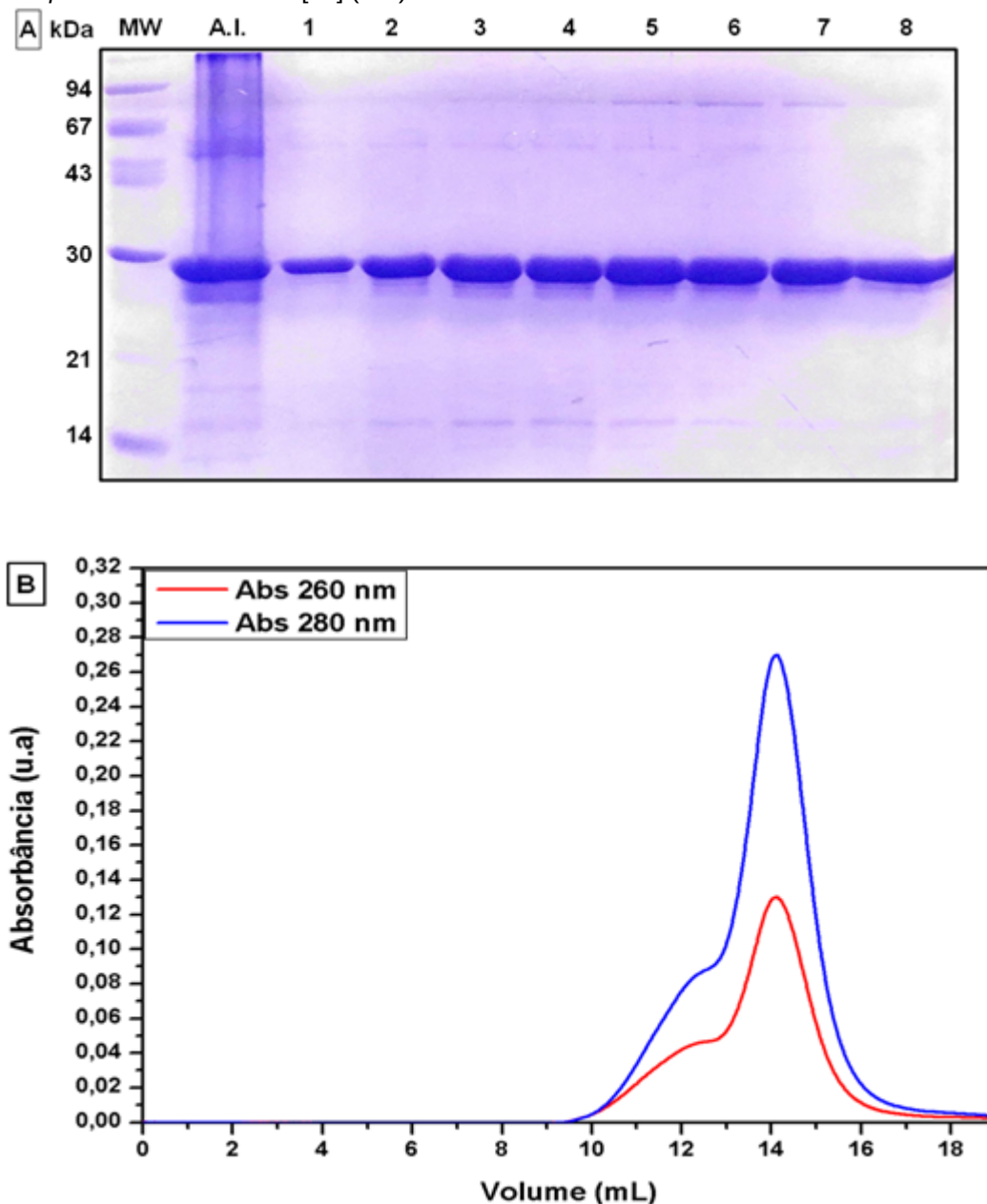
**Figura 8.** SDS-PAGE 15% do processo de purificação da proteína M2-1 por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA. À esquerda temos as massas moleculares como referência. Acima temos: MW (marcador de massa molecular), FT (*flow-through*), de 5 a 500 (concentrações do gradiente de imidazol em  $\mu$ M) e 1M (1 M de imidazol). Nota-se que a proteína de interesse foi eluída a partir de 100 mM de imidazol.



Fonte: autoria própria.

Uma vez juntadas e concentradas as amostras de eluição da proteína M2-1, realizou-se o processo de purificação por cromatografia de exclusão molecular. A Figura 9A mostra o gel de poliacrilamida correspondente ao processo em questão. Ao observar o resultado, nota-se que a proteína foi purificada com alto grau de pureza, além de estar livre de ácidos nucleicos, como ilustrado pelo cromatograma em 8B.

**Figura 9.** SDS-PAGE 15 % do processo de purificação por cromatografia de exclusão molecular em resina *Superdex-200 10/300 GL* (GE-Healthcare Life Sciences<sup>®</sup>). À esquerda: massas moleculares de referência em kDa. Acima: MW (marcador de massa molecular), A.I. (amostra injetada na coluna) e de 1 a 8 (eluições da proteína M2-1) (8-A). Cromatograma obtido do processo de exclusão molecular da proteína M2-1 em tampão com 50 mM de fosfato de sódio em pH 7,0 e 150 mM NaCl, mostrando que a proteína foi purificada livre de contaminantes, tanto proteicos quanto de ácidos nucleicos, uma vez que a razão 260/280 nm foi menor que 1. O "ombro" no pico, no intervalo de volume de 10 a 13 mL, ocorre devido a formação agregados solúveis, assim como ocorre na M2-1 do *Metapneumovirus humano* [68] (8-B).



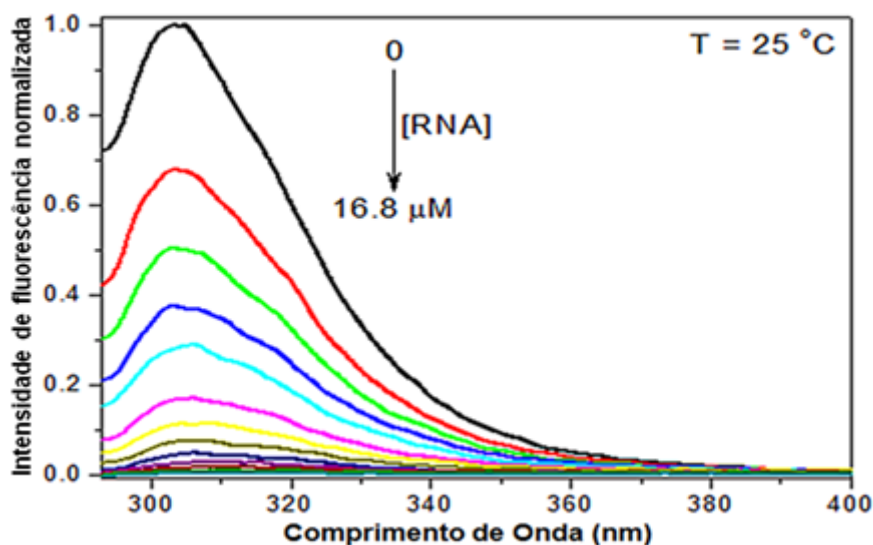
Fonte: autoria própria.

## 4. 2. Experimentos de fluorescência

### 4. 2. 1. Investigação da interação entre dgM2-1 e RNA por espectroscopia de fluorescência

Após a purificação, a proteína dgM2-1 foi submetida a experimentos de interação com RNA, no intuito de investigar quais os fatores que guiam e estabilizam o complexo. Os espectros de emissão de fluorescência foram coletados a 15, 25 e 35 °C e também em diferentes concentrações salinas (0, 150 e 350 mM NaCl) e de pH (5.0, 6.5 e 8.0). Ao titular-se RNA (de 0 a 16,8 µM) na solução contendo dgM2-1 (5,5 µM), percebe-se que há uma supressão na intensidade de fluorescência a cada incremento (Figura 10), efeito que confirma a interferência do ligante sobre o microambiente dos fluoróforos contidos na proteína. As titulações em 15 e 35 °C seguiram o mesmo padrão, por isso não há necessidade de serem mostradas aqui.

**Figura 10.** Espectros de supressão de fluorescência da dgM2-1 (5 µM) pelo RNA a 25 °C. Os fluoróforos intrínsecos do dgM2-1 (tirosinas) foram excitados em 288 nm e foram coletados os espectros de emissão de fluorescência no intervalo de 295 a 400 nm. Ambas as fendas de excitação e emissão utilizadas foram de 0,5 mm.



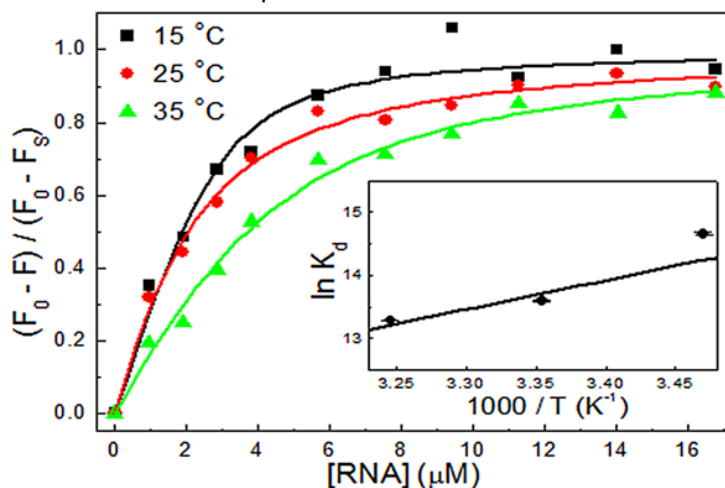
Fonte: autoria própria.

Para analisar as mudanças de sinal de supressão de fluorescência pela concentração de RNA ( $\frac{F_0 - F}{F_0 - F_s}$  vs [RNA]) nos experimentos com variação de temperatura (Figura 11), foi realizado o processo de ajuste da equação 1, contida na metodologia. Esta equação possibilitou obter as curvas de isoterma de ligação, fornecendo os valores de constante de dissociação ( $K_d$ ) e o coeficiente estequiométrico ( $n$ ) para o complexo dgM2-1/RNA, os quais são mostrados na tabela

1. Pela tabela, percebe-se que a afinidade entre dgM2-1 e RNA diminui com a elevação da temperatura, uma vez que valores de  $K_d$  encontrados passavam da ordem de centenas de nanomolar para micromolar conforme esse aumento. Os valores de  $K_d$  encontrados corroboram com os encontrados por Blondot e colaboradores (2012), utilizando RNAs com 10 e 20 nucleotídeos. Além disso, o valor médio de  $n$  ( $\sim 2,25$ ) nas três temperaturas investigadas indica que ao menos dois dgM2-1 ligam-se a uma molécula de RNA.

Uma vez obtidos, os valores de  $K_d$  foram analisados a partir da equação de van't Hoff (Equação 2) a 15, 25 e 35 °C (inserto na Figura 11) e nota-se que neste intervalo de temperatura o gráfico é linear, possibilitando mensurar a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) do sistema a partir da inclinação do ajuste feito. O valor de  $\Delta H$  encontrado foi de  $-45 \pm 10 \text{ kJmol}^{-1}$ , definindo a reação como entalpicamente favorável. Por outro lado, com os valores de  $K_b$  ( $1/K_d$ ), foi possível obter também os valores de variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$  – Equação 3) e consequentemente os valores de variação de entropia ( $T\Delta S$  – Equação 4), sendo em média equivalentes a  $-34,3 \pm 0,5 \text{ kJmol}^{-1}$  e  $-10 \pm 10 \text{ kJmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , respectivamente. Com estes valores, temos que a formação do complexo dgM2-1/RNA é entropicamente desfavorável, já que  $\Delta S < 0$ , e espontânea, devido ao  $\Delta G < 0$ , cujo valor negativo sofre grande influência por conta do  $\Delta H$ , sugerindo um processo de ligação entalpicamente dirigido. Por fim, ambos os valores negativos de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  indicam que as forças de van der Waals e ligações de hidrogênio são importantes interações não covalentes responsáveis pela estabilização do complexo dgM2-1/RNA (ROSS et al., 1981).

**Figura 11.** Variação de supressão de fluorescência do dgM2-1, centrado no pico em 305 nm, em função da concentração de ácido nucleico, com tampão 50 mM fosfato de sódio (pH 6.5) contendo 150 mM de NaCl e 1,0 mM de DTT em 15, 25 e 35 °C. A linha contínua corresponde ao ajuste realizado seguindo a equação 1. O inserto nesta figura trata-se do gráfico de van't Hoff, a partir do qual são obtidos os valores de  $\Delta H$  do complexo formado.



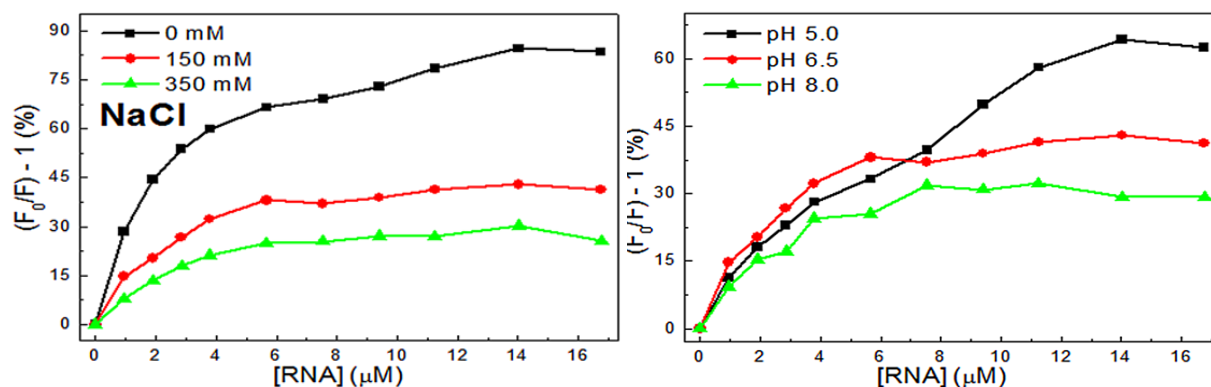
Fonte: autoria própria.

**Tabela 1.** Parâmetros termodinâmicos encontrados para a interação dgM2-1/RNA, sendo que:  $\Delta H^\circ$  (variação de entalpia),  $\Delta G^\circ$  (variação de energia livre de Gibbs) e  $\Delta S^\circ$  (variação de entropia), medidos em três temperaturas distintas. \*

| T (° C) | $K_d$<br>( $\times 10^{-9}$ M) | N             | $\Delta H^\circ$<br>(kJ mol $^{-1}$ ) | $\Delta G^\circ$<br>(kJ mol $^{-1}$ ) | T $\Delta S^\circ$<br>(kJ mol $^{-1}$ K $^{-1}$ ) |
|---------|--------------------------------|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 15      | 430 $\pm$ 180                  |               |                                       | -35,1 $\pm$ 0,7                       | -9 $\pm$ 10                                       |
| 25      | 1240 $\pm$ 180                 | 2,2 $\pm$ 0,6 | -45 $\pm$ 10                          | -33,7 $\pm$ 0,4                       | -11 $\pm$ 10                                      |
| 35      | 1700 $\pm$ 285                 |               |                                       | -34,0 $\pm$ 0,4                       | -11 $\pm$ 10                                      |

\*Experimentos realizados em tampão 50 mM fosfato de sódio, pH 6,5, contendo 150 mM NaCl e 1mM de DTT. Fonte: autoria própria.

**Figura 12.** Variação de supressão de fluorescência centrada no pico de fluorescência em 305 nm como função da concentração de RNA para diferentes condições de força iônica (0, 150, 350 mM NaCl) – à esquerda – e pH (5, 6,5 e 8) a 25 °C, à direita. Ambos os experimentos foram realizados em tampão contendo 50 mM de fosfato de sódio e 1 mM de DTT.

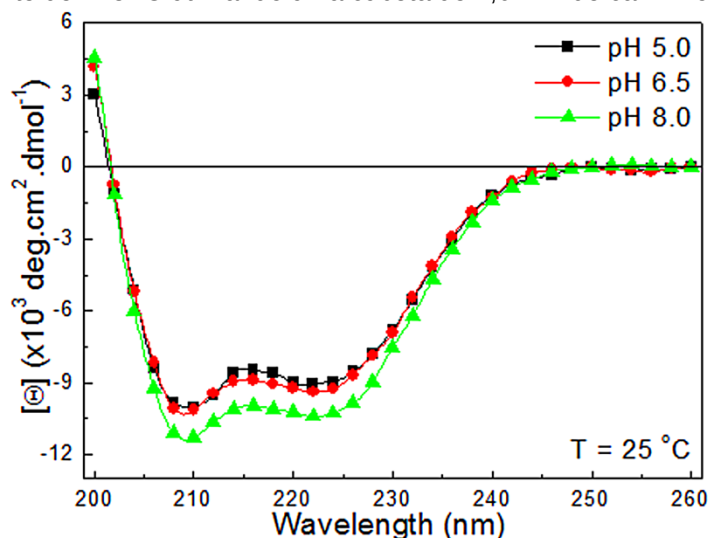


Fonte: autoria própria.

No intuito de verificar a influência de cargas sobre a interação dgM2-1/RNA, foram realizados experimentos de supressão de fluorescência em função da concentração de RNA em condições nas quais variou-se a salinidade e o pH, como mostrado pela Figura 12. Ao analisar o gráfico com variação de salinidade (à esquerda), percebe-se que o aumento na força iônica do tampão faz com que a supressão de fluorescência por parte do ligante seja mitigada. Sendo assim, os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  contidos na solução exercem um papel importante de blindagem eletrostática do sítio de ligação ao RNA da proteína ou vice e versa. Por outro lado, na análise feita sobre o gráfico da direita (Figura 12), nota-se que o aumento na alcalinidade da solução também é determinante para a atenuação da supressão de fluorescência por parte do ácido nucleico. Isso se deve ao fato da aproximação do pH da solução ao ponto isoelétrico (pI) da proteína que equivale a aproximadamente 9,0 (GASTEIGER et al., 2005), o que altera o grau de ionização dos resíduos de aminoácidos básicos, levando a um enfraquecimento das interações eletrostáticas envolvidas na formação do complexo dgM2-1/RNA, as quais são muito importantes para a aproximação entre ambas as partes.

Experimentos de dicroísmo circular (CD) foram utilizados a fim de realizar um controle de qualidade sobre a estrutura secundária do dgM2-1 e demonstrar que não há alteração significativa em sua estrutura nas condições utilizadas durante os experimentos de fluorescência. Os espectros da proteína em diferentes condições de pH apresentaram características similares (Figura 13), portanto, o aumento da alcalinidade ou acidez não muda significativamente o perfil de estruturas secundárias encontradas e consequentemente não estão exercendo nenhuma interferência sobre o processo de interação dgM2-1/RNA observado pela fluorescência.

**Figura 13.** Espectros de dicroísmo circular do dgM2-1 ( $\sim 5,5 \mu\text{M}$ ) na região do ultravioleta distante em 50 mM de tampão fosfato de sódio nos pH 5,0, 6,5 e 8,0. Os espectros foram coletados em temperatura ambiente de  $\sim 25^\circ\text{C}$  utilizando uma cubeta de 1,0 mm de caminho óptico.

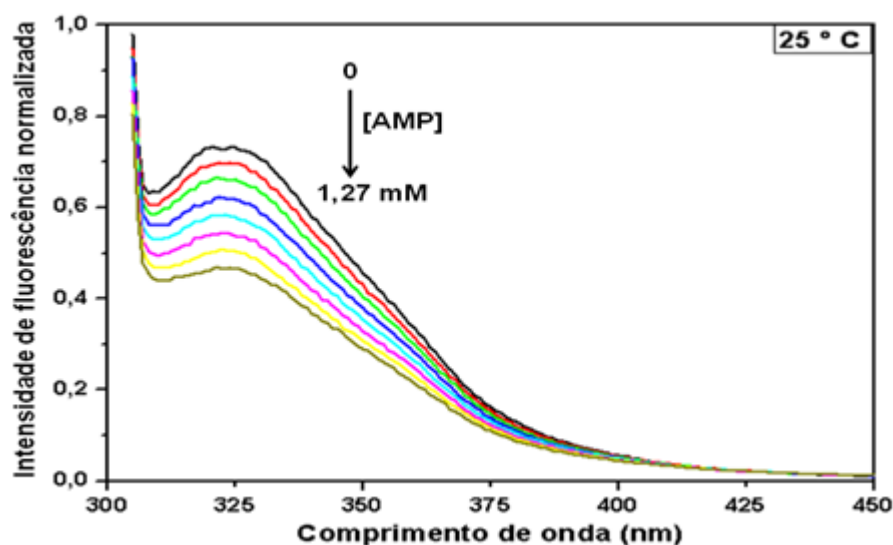


Fonte: autoria própria.

#### 4. 2. 2. Investigação da interação entre M2-1, AMP, solasodina e ciclopamina por espectroscopia de fluorescência

Os dados de supressão de fluorescência da M2-1 pelo AMP estão ilustrados na Figura 14 e mostram que essa molécula, como já descrito na literatura (LEYRAT et al., 2014), interage com a proteína, já que o microambiente dos fluoróforos intrínsecos são perturbados pela adição do ligante.

**Figura 14.** Espectros de supressão de fluorescência da proteína M2-1 ( $5 \mu\text{M}$ ) pelo AMP a  $25^\circ\text{C}$ . Os triptofanos da M2-1 foram excitados em 295 nm e foram coletados os espectros de emissão de fluorescência no intervalo de 305 a 450 nm. Ambas as fendas de excitação e emissão utilizadas foram de 1,0 mm.

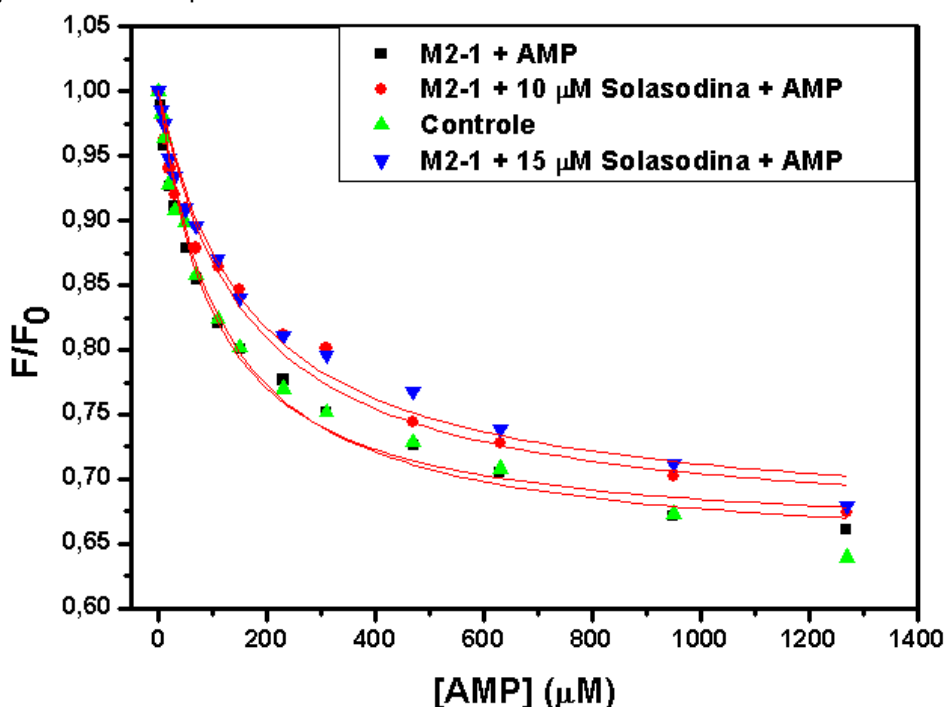


Fonte: autoria própria.

Como descrito neste trabalho, sabe-se que a constante de dissociação entre o RNA e o dgM2-1 a 25 ° C é da ordem de centenas de nanomolar, o que denota uma interação moderada/alta e que necessitaria de uma grande afinidade ou concentração de um provável competidor para deslocar o equilíbrio químico e subjugar o efeito do RNA. Tanto a solasodina quanto a ciclopamina possuem elevada hidrofobicidade, logo não foi possível chegar em concentrações altas em solução a ponto de deslocar o ácido nucleico, além de não ser possível estimar um  $K_d$  entre a proteína e os alcaloides. Sabendo disso, foi estabelecida outra alternativa de verificação, na qual escolheu-se outra região, que é a de ligação do AMP. Esta alternativa exigiria menores concentrações finais de alcaloides durante as titulações, dessa forma prevenindo o efeito de agregação em virtude da concentração. Entretanto, sabe-se que o sítio de ligação ao AMP está situado numa região de interface entre o domínio dedo de zinco e o dgM2-1 (LEYRAT et al., 2014), logo fez-se necessário o uso da proteína M2-1 ao invés do domínio.

Sendo assim, foram realizados experimentos a 25 ° C, em tampão com 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,0 e 150 mM de NaCl, cujas concentrações de M2-1 e AMP foram de 5  $\mu$ M e 0 - 1,27 mM, respectivamente. Para cada experimento envolvendo a solasodina foram realizados ajustes seguindo a equação 5, a partir dos quais foi possível obter as constantes de dissociação entre a proteína e o AMP que foi adicionado em solução. As constantes de dissociação obtidas são de aproximadamente uma centena de micromolar, havendo um aumento significativo do  $K_d$  na presença de solasodina, tanto a 10 quanto a 15  $\mu$ M (tabela 2).

**Figura 15.** Gráficos de supressão de fluorescência da M2-1 (5  $\mu\text{M}$ ) pelo AMP (de 0 a 1,27 mM), centrado no pico em 322 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  295 nm e  $\lambda_{\text{em}}$  305-500 nm), na temperatura de 25 ° C, em tampão 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,0 e 150 mM de NaCl, na presença e ausência de solasodina. No eixo das ordenadas, temos a intensidade de fluorescência relativa, enquanto na abscissa temos a concentração de AMP em  $\mu\text{M}$ .



Fonte: autoria própria.

**Tabela 2.** Valores de  $K_d$  encontrados para o ajuste realizado a cada curva de supressão de fluorescência da M2-1 pelo AMP.

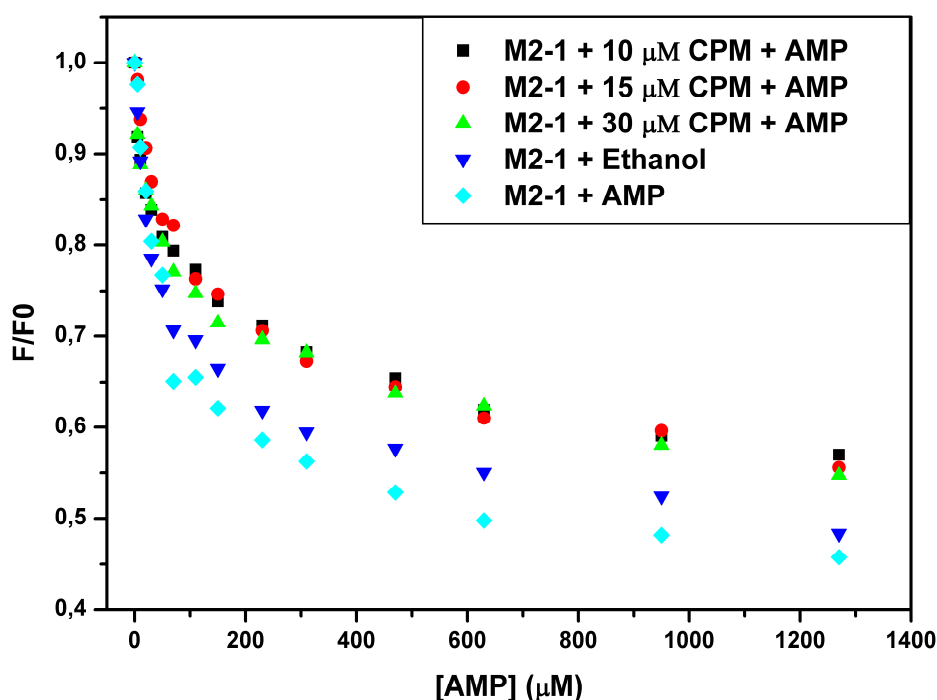
| T = 25 ° C                  | M2-1 + AMP  | M2-1 + 10 $\mu\text{M}$<br>solasodina +<br>AMP | M2-1 + 15 $\mu\text{M}$<br>solasodina +<br>AMP | Controle<br>(etanol) |
|-----------------------------|-------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------|
| $K_d$ ( $\times 10^{-6}$ M) | $100 \pm 9$ | $155 \pm 22$                                   | $163 \pm 17$                                   | $114 \pm 12$         |

Fonte: autoria própria.

O mesmo procedimento de ajuste para obtenção dos  $K_d$  não foi aplicado aos experimentos envolvendo a ciclopamina, pois os dados não apresentavam o mesmo grau de confiabilidade que o anterior. Logo, o intuito da Figura 16 é apenas de mostrar que os experimentos com a ciclopamina seguem a mesma tendência de interferência no  $K_d$  entre M2-1 e AMP, assim como ocorre nos experimentos com a solasodina. O perfil dos gráficos (figuras 14 e 15) mostra que a supressão da fluorescência da M2-1 pelo AMP é atenuada na presença dos alcaloides, sugerindo que eles competem pelo sítio de ligação mesmo estando em baixa concentração. Além disso, fica evidente, pelos resultados dos experimentos controle, que a

presença do solvente dos alcaloides (etanol) não interfere nos valores observados, sugerindo que os próprios alcaloides que exercem o papel chave na atenuação de supressão. Os valores de  $K_d$  encontrados para cada curva nos experimentos envolvendo a solasodina estão expressos na tabela 2.

**Figura 16.** Gráficos de supressão de fluorescência da M2-1 (5  $\mu\text{M}$ ) pelo AMP (de 0 a 1,27 mM), centrado no pico em 322 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  295 nm e  $\lambda_{\text{em}}$  305-500 nm), na temperatura de 25 ° C, em tampão 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,0 e 150 mM de NaCl, na presença e ausência de ciclopamina. No eixo das ordenadas, temos a intensidade de fluorescência relativa, enquanto na abscissa temos a concentração de AMP em  $\mu\text{M}$ .



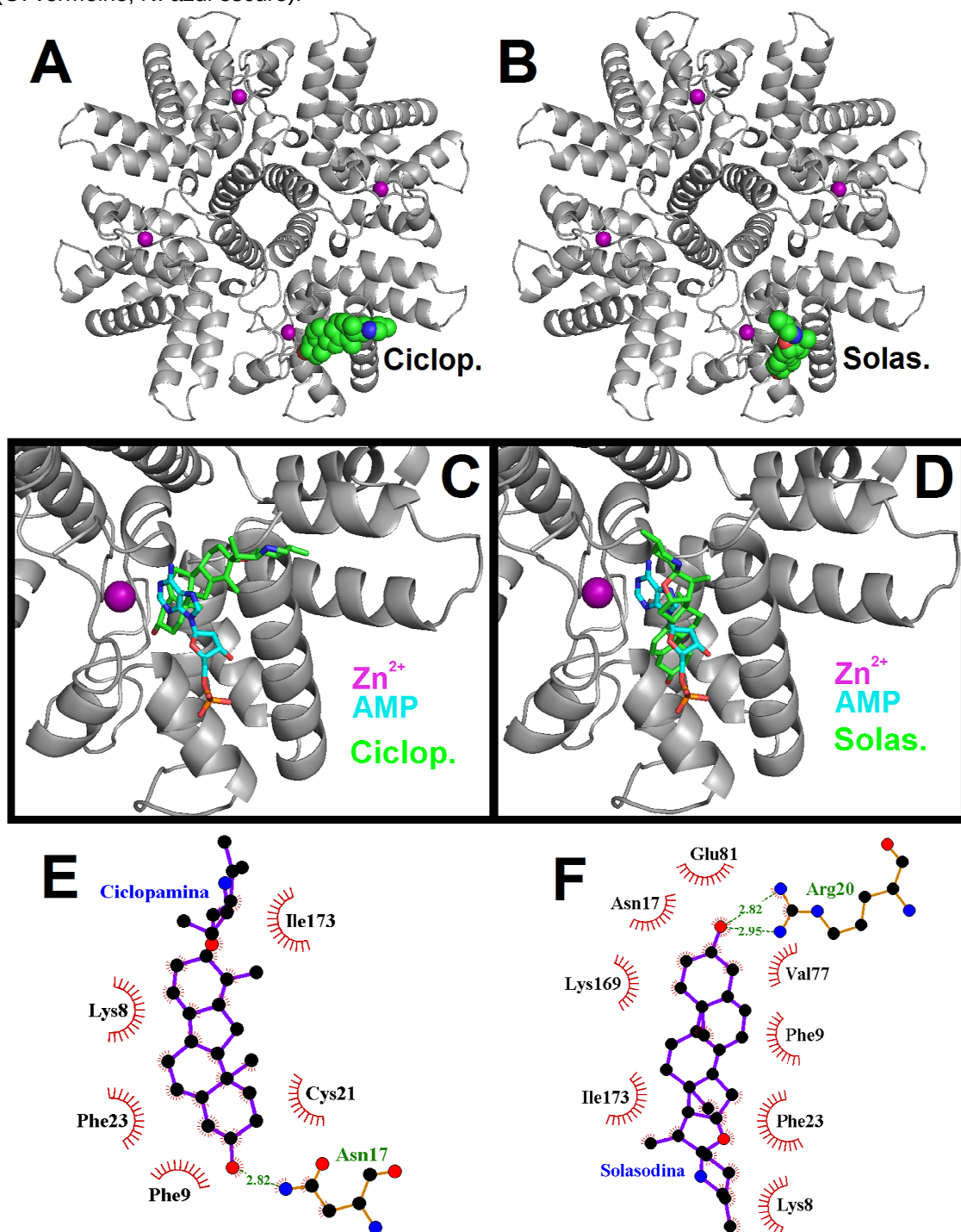
Fonte: autoria própria.

Finalmente, os resultados demonstraram que ambos os alcaloides esteroidais foram capazes de interferir na interação M2-1/AMP, indicando que a interação entre M2-1/alcaloides possa estar ocorrendo no sítio do AMP também, não se limitando ao sítio do RNA como sugerido por Bailly e colaboradores. Logo, caso essas moléculas de fato apresentem alguma atividade anti-HRSV, a mesma possivelmente estará relacionada ao impedimento do reconhecimento de caudas poli A em RNAs nascentes durante a etapa de transcrição. Entretanto, maiores estudos serão necessários para confirmar essa hipótese.

#### 4.3. Simulações de *docking* molecular entre M2-1 e alcaloides esteroidais

As simulações de *docking* molecular de ambos os compostos na proteína M2-1 foram orientadas pelos resultados obtidos dos experimentos de espectroscopia de fluorescência. Os resultados dos ensaios estão expressos na Figura 17, na qual observa-se o posicionamento de ambos os alcaloides esteroidais em uma cavidade situada entre os domínios dgM2-1 e o dedo de zinco de monômeros adjacentes. Para chegar a tal resultado foram selecionados os confôrmeros de menor energia de ligação dos agrupamentos mais populosos. Ao comparar os alcaloides, percebe-se que existem alguns resíduos em comum envolvidos em suas respectivas interações, sendo eles: Lys8, Phe9, Phe23 e Ile173, os quais são classificados como hidrofóbicos, com exceção da lisina que é um aminoácido polar básico. Analisando especificamente o *docking* da ciclopamina (Figuras 16 C e E), nota-se que seu posicionamento na interface ocorre perpendicularmente ao do AMP, entretanto ocorre predomínio de contatos hidrofóbicos com os resíduos Lys8, Phe9, Cys21, Phe23 e Ile173 e apenas uma ligação de hidrogênio com cadeia lateral da Asn17. Por outro lado, nas figuras 16D e F, observa-se que a solasodina se posiciona de maneira similar ao AMP em seu sítio, mas também apresenta predomínio de contatos hidrofóbicos (Lys8, Phe9, Asn17, Phe23, Val77, Glu81, Lys169 e Ile173) e apenas 2 ligações de hidrogênio, ambas com os nitrogênios da cadeia lateral do resíduo Arg20.

**Figura 17.** Modelagem do tetrâmero da proteína M2-1 e *docking* molecular da ciclopamina e solasodina. (A e B) Representação em *cartoon* da proteína M2-1, na qual observam-se os átomos de zinco (esferas roxas) e os alcaloides (representação de esferas) posicionados na região de interface interdomínio dgM2-1/dedo de zinco de monômeros adjacentes. Os recortes tridimensionais C e D destacam a sobreposição da ciclopamina e solasodina, respectivamente, no sítio de ligação ao AMP. Neste caso, todos os ligantes estão representados em modelo de palitos. Por fim, E e F são representações bidimensionais do mesmo sítio de interação, nas quais observa-se a presença de ligações de hidrogênio (linhas tracejadas verdes) e contatos hidrofóbicos (cílios vermelhos), também detalhando quais aminoácidos de M2-1 estão envolvidos na interação com os alcaloides esteroidais (O: vermelho; N: azul escuro).



Fonte: autoria de Caruso, I. P.

## 5. Conclusões

Ambas as proteínas, tanto M2-1 quanto seu domínio globular, foram produzidas de maneira solúvel e com elevado grau de pureza. Com os resultados obtidos por *western blotting* comprovou-se que as proteínas purificadas eram as de interesse.

A partir dos resultados obtidos pelos experimentos de titulação por fluorescência entre dgM2-1 e RNA torna-se evidente que existe interação relativamente alta, na razão de duas moléculas de proteína para uma de RNA, caracterizada por ser uma interação espontânea e dirigida entalpicamente. Ademais, os parâmetros termodinâmicos apontam que forças de van der Waals e ligações de hidrogênio desempenham um papel importante na estabilização do complexo formado pela proteína e os ácidos nucleicos. Por outro lado, os experimentos em diferentes condições de salinidade e pH evidenciaram uma importante contribuição eletrostática para a formação do complexo. Logo, o microambiente celular na qual M2-1 desempenha sua função, mais especificamente os corpos de inclusão, devem possuir condições que favoreçam este tipo de interação, como valores de pH e/ou salinidade mais baixos (RINCHEVAL et al., 2017).

Os resultados referentes aos experimentos entre M2-1 e AMP corroboram com o que já foi publicado na literatura, revelando que realmente ocorre interação entre ambos (LEYRAT et al., 2014). No entanto, reporta-se neste trabalho que a solasodina e, possivelmente, a ciclopamina, foram capazes de interferir nesta interação, indicando que a interação entre M2-1/alcaloides possa estar ocorrendo no sítio do AMP também, na região de interface dgM2-1/dedo de zinco, não se limitando ao sítio do RNA, como sugerido por Bailly e colaboradores (2016). Portanto, a atuação de alcaloides esteroidais sobre o ciclo viral, caso estes venham a se tornar candidatos a antivirais, provavelmente estará relacionada ao impedimento do reconhecimento de caudas poli A em RNAs nascentes ao longo da transcrição. Entretanto, mais estudos são necessários para complementar estes dados, no intuito de verificar como os alcaloides em questão interferem na ligação do RNA, dentro do dgM2-1, ou do AMP, na interface dgM2-1/dedo de zinco, para descrever mecanismos envolvidos no processo replicativo viral e propor novas abordagens no combate ao RSV.

## Referências

- AGOTI, C. N. et al. Rapid spread and diversification of respiratory syncytial virus genotype ON1, Kenya. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 6, p. 950, 2014.
- ANDERSON, L. J. et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 4, p. 626-633, 1985.
- ASENJO, A. et al. Phosphorylation of the human respiratory syncytial virus N protein provokes a decrease in viral RNA synthesis. **Virus research**, v. 163, n. 1, p. 396-400, 2012.
- ASENJO, A.; CALVO, E.; VILLANUEVA, N. Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein at threonine 108 controls its interaction with the M2-1 protein in the viral RNA polymerase complex. **Journal of general virology**, v. 87, n. 12, p. 3637-3642, 2006.
- AUSAR, S. F. et al. Analysis of the thermal and pH stability of human respiratory syncytial virus. **Molecular pharmaceutics**, v. 2, n. 6, p. 491-499, 2005.
- BAILLY, B. et al. Targeting human respiratory syncytial virus transcription anti-termination factor M2-1 to inhibit in vivo viral replication. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.
- BECKETT, D. Measurement and analysis of equilibrium binding titrations: a beginner's guide. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2011. p. 1-16.
- BERTHIAUME, L.; JONCAS, J.; PAVILANIS, V. Comparative structure, morphogenesis and biological characteristics of the respiratory syncytial (RS) virus and the pneumonia virus of mice (PVM). **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v. 45, n. 1-2, p. 39-51, 1974.
- BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W252-W258, 2014.
- BLONDOT, M. 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, 2012.
- BROWNE, C. A. et al. Isolation of teratogenic alkaloids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 336, n. 1, p. 211-220, 1984.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Natural product reports**, v. 22, n. 2, p. 162-195, 2005.

CARROLL, K. N. et al. Season of infant bronchiolitis and estimates of subsequent risk and burden of early childhood asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 4, p. 964-966, 2009.

CARTEE, T. L.; WERTZ, G. W. Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection. **Journal of virology**, v. 75, n. 24, p. 12188-12197, 2001.

CASTAGNE, 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, 2004.

CHANOCK, R.; ROIZMAN, B.; MYERS, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): isolation, properties and characterization. **American Journal of Epidemiology**, v. 66, n. 3, p. 281-290, 1957.

CHEN, Y.; WILLIAMS, E.; KIRK, M. Risk factors for acute respiratory infection in the Australian community. **PloS one**, v. 9, n. 7, 2014.

CILLA, G. et al. Risk factors for hospitalization due to respiratory syncytial virus infection among infants in the Basque Country, Spain. **Epidemiology & Infection**, v. 134, n. 3, p. 506-513, 2006.

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**, v. 93, n. 1, p. 81-85, 1996.

COLLINS, P. L. The molecular biology of human respiratory syncytial virus (RSV) of the genus Pneumovirus. In: **The paramyxoviruses**. Springer, Boston, MA, p. 103-162, 1991.

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.

COLLINS, P. L.; HUANG, Y. T.; WERTZ, G. W. Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes. **Journal of virology**, v. 49, n. 2, p. 572-578, 1984.

COLLINS, P. L.; MELERO, J. A. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. **Virus research**, v. 162, n. 1-2, p. 80-99, 2011.

CURRAN, J; MARQ, J; KOLAKOFSKY, D. An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. **Journal of virology**, v. 69, n. 2, p. 849-855, 1995.

CUSHNIE, T. T.; CUSHNIE, B.; LAMB, A. J. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 5, p. 377-386, 2014.

DELGADO, M. F. et al. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. **Nature medicine**, v. 15, n. 1, p. 34, 2009.

DEVINCENZO, J. P. et al. Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 182, n. 10, p. 1305-1314, 2010.

DOWELL, S. F. et al. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 174, n. 3, p. 456-462, 1996.

ESPERANTE, S. A.; PARIS, G.; DE PRAT-GAY, G. Modular unfolding and dissociation of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein P and its interaction with the M2-1 antiterminator: a singular tetramer-tetramer interface arrangement. **Biochemistry**, v. 51, n. 41, p. 8100-8110, 2012.

EVERARD, M. L. et al. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. **Archives of disease in childhood**, v. 71, n. 5, p. 428-432, 1994.

FALSEY, A. R. et al. Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 2, p. 389-394, 1995.

FALSEY, A. R. et al. Respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in older adults with moderate to severe influenza-like illness. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 12, p. 1873-1881, 2014.

FALSEY, A. R. et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 17, p. 1749-1759, 2005.

FEARNS, R.; COLLINS, P. L. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 5852-5864, 1999.

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 43, n. 1, p. 218-227, 2003.

FLEMING, D. M. et al. Modelling estimates of the burden of Respiratory Syncytial virus infection in adults and the elderly in the United Kingdom. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 443, 2015.

FRICKER, Patrick C.; GASTREICH, Marcus; RAREY, Matthias. Automated drawing of structural molecular formulas under constraints. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 44, n. 3, p. 1065-1078, 2004.

FRIED, J.; KLINGSBERG, A. The structure of jervine. III. Degradation to nitrogen-free derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 75, n. 20, p. 4929-4938, 1953.

FRISCH, M.J.; Trucks, G.W.; Schiegell, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R. Gaussian 09, Revision A.02; **Gaussian, Inc.**: Wallingford, CT, USA, 2009.

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: The proteomics protocols handbook. **Humana press**. p. 571-607, 2005.

GLEZEN, W. P. et al. Impact of respiratory virus infections on persons with chronic underlying conditions. **Jama**, v. 283, n. 4, p. 499-505, 2000.

GOWER, T. L. et al. RhoA signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology. **Journal of virology**, v. 79, n. 9, p. 5326-5336, 2005.

GRIFFITHS, C.; DREWS, S. J.; MARCHANT, D. J. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 277-319, 2017.

HALL, C. B. et al. Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. **Infection and immunity**, v. 33, n. 3, p. 779-783, 1981.

HALL, C. B. et al. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. **Journal of pediatrics**, v. 99, n. 1, p. 100-103, 1981a.

HALL, C. B. Prospects for a respiratory syncytial virus vaccine. **Science**, v. 265, n. 5177, p. 1393-1395, 1994b.

HALL, C. B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. **New England journal of medicine**, v. 344, n. 25, p. 1917-1928, 2001.

HALL, C. B.; DOUGLAS JR, R. Gordon; GEIMAN, Joyce M. Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 141, n. 1, p. 98-102, 1980.

HALL, C. B.; GORDON DOUGLAS JR, R.; GEIMAN, Joyce M. Quantitative shedding patterns of respiratory syncytial virus in infants. **Journal of Infectious Diseases**, v. 132, n. 2, p. 151-156, 1975.

HALL, Caroline Breese et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 6, p. 588-598, 2009.

HARDY, R. W.; WERTZ, G. W. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 520-526, 1998.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HEIKKINEN, T. et al. Transmission of respiratory syncytial virus infection within families. In: **Open forum infectious diseases**. Oxford University Press, p. ofu118, 2015.

HERTZ, M. I. et al. Respiratory syncytial virus-induced acute lung injury in adult patients with bone marrow transplants: a clinical approach and review of the literature. **Medicine**, v. 68, n. 5, p. 269-281, 1989.

HEWITT, R. et al. The role of viral infections in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. **Therapeutic advances in respiratory disease**, v. 10, n. 2, p. 158-174, 2016.

JAMES, L. F. et al. Biomedical applications of poisonous plant research. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3211-3230, 2004.

JOHNSON, T. R.; GRAHAM, B. S. Secreted respiratory syncytial virus G glycoprotein induces interleukin-5 (IL-5), IL-13, and eosinophilia by an IL-4-independent mechanism. **Journal of virology**, v. 73, n. 10, p. 8485-8495, 1999.

KIM, H. W. et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. **American journal of epidemiology**, v. 89, n. 4, p. 422-434, 1969.

KIM, Y. et al. Relating plaque morphology to respiratory syncytial virus subgroup, viral load, and disease severity in children. **Pediatric research**, v. 78, n. 4, p. 380-388, 2015.

KITTAKOOP, P.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S. Alkaloids as important scaffolds in therapeutic drugs for the treatments of cancer, tuberculosis, and smoking cessation. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 2, p. 239-252, 2014.

KNIPE, D. M. et al. Fields Virology. **Lippincott Williams & Wilkins**, v. 48, p. D49-53, 2001.

KOONIN, Eugene V. et al. Global organization and proposed megataxonomy of the virus world. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 2, 2020.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K.. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of molecular biology**, v. 372, n. 3, p. 774-797, 2007.

LAKOWICZ, J. R. (Ed.). **Principles of fluorescence spectroscopy**. Springer Science & Business Media, 2013.

LEVETIN, E. et al. **Plants and society**. Dubuque, Iowa: WCB/McGraw-Hill, 1999.

LEYRAT, C. et al. Drastic changes in conformational dynamics of the antiterminator M2-1 regulate transcription efficiency in Pneumovirinae. **Elife**, v. 3, p. e02674, 2014.

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, 2003.

MCNAMARA, P. S. et al. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Archives of disease in childhood**, v. 88, n. 10, p. 922-926, 2003.

MORI, M. et al. Risks and prevention of severe RS virus infection among children with immunodeficiency and Down's syndrome. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 8, p. 455-459, 2014.

MORRIS, Garrett M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of computational chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, J. A.; BLOUNT JR, R. E.; SAVAGE, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 92, n. 3, p. 544-549, 1956.

MOUSAVIZADEH, F.; MEYER, D.; GIANNIS, A. Synthesis of C-Nor-D-homosteroidal alkaloids and their derivatives. **Synthesis**, v. 50, n. 08, p. 1587-1600, 2018.

MUFSON et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection among infants and children in Chicago. **American Journal of Epidemiology**, v. 98, n. 2, p. 88-95, 1973.

NAIR, H. et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1545-1555, 2010.

OKIRO, E. A. et al. Factors associated with increased risk of progression to respiratory syncytial virus-associated pneumonia in young Kenyan children. **Tropical Medicine & International Health**, v. 13, n. 7, p. 914-926, 2008.

OPENSHAW, P. J. M. et al. Protective and harmful immunity to RSV infection. **Annual review of immunology**, v. 35, p. 501-532, 2017.

ÖZÇELİK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 4, p. 396-402, 2011.

PARAMORE, L. C. et al. Economic impact of respiratory syncytial virus-related illness in the US. **Pharmacoeconomics**, v. 22, n. 5, p. 275-284, 2004.

PARROTT, R. H. et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, DC: II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. **American Journal of Epidemiology**, v. 98, n. 4, p. 289-300, 1973.

PATEL, K.; SINGH, R. B.; PATEL, D. K. Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of solasodine: A concise report of current scientific literature. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 2, p. 92-98, 2013.

PAYNTER, S. Humidity and respiratory virus transmission in tropical and temperate settings. **Epidemiology & Infection**, v. 143, n. 6, p. 1110-1118, 2015.

QUINTANA, Mário. **Caderno H**. Globo Livros, 1994.

RINCHEVAL, V. et al. Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2017.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096-3102, 1981.

RUSSO, P. et al. Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 13, p. 1686-1693, 2013.

SCHRODINGER, L. L. C. The PyMOL molecular graphics system. **Version**, v. 1, n. 5, p. 0, 2010.

SEEMUNGAL, T.; WEDZICHA, J. A. Viral infections in obstructive airway diseases. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 9, n. 2, p. 111-116, 2003.

SHI, Q. I. U. et al. Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 6, p. 401-406, 2014.

SIDWELL, R. W.; BARNARD, D. L. Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. **Antiviral research**, v. 71, n. 2-3, p. 379-390, 2006.

SIGURS, N. et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. **Thorax**, v. 65, n. 12, p. 1045-1052, 2010.

SINATRA, R. S.; JAHR, J. S.; WATKINS-PITCHFORD, J. M. **The essence of analgesia and analgesics**. Cambridge University Press, 2010.

TAIPALE, J. et al. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 1005-1009, 2000.

TANG, R. S. et al. Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein function and virus viability. **Journal of virology**, v. 75, n. 23, p. 11328-11335, 2001.

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**, v. 111, n. 4, p. 1580-1585, 2014.

TEIXEIRA, T. S. P. et al. Biophysical characterization of the interaction between M2-1 protein of HRSV and quercetin. **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 63-71, 2017.

THOMPSON, W. W. et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. **Jama**, v. 289, n. 2, p. 179-186, 2003.

TRAN, T. et al. The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. **Journal of virology**, v. 83, n. 13, p. 6363-6374, 2009.

UTOKAPARCH, S. et al. The relationship between respiratory viral loads and diagnosis in children presenting to a pediatric hospital emergency department. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 30, n. 2, p. e18-e23, 2011.

WALSH, E. E.; PETERSON, D. R.; FALSEY, A. R. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in elderly persons. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 2, p. 233-238, 2004.

WEBER, M. W. et al. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection leading to hospital admission in children in the Western Region of The Gambia. **International journal of epidemiology**, v. 28, n. 1, p. 157-162, 1999.

WHIMBEY, E. et al. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adult patients with leukemia. **Clinical infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 376-379, 1995.

WU, A. et al. Incidence and risk factors for respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections among children in the remote highlands of Peru. **PloS one**, v. 10, n. 6, 2015.

YANG, L. et al. Age-specific epidemic waves of influenza and respiratory syncytial virus in a subtropical city. **Scientific reports**, v. 5, p. 10390, 2015.

ZHOU, H.; CHENG, X.; JIN, H. Identification of amino acids that are critical to the processivity function of respiratory syncytial virus M2-1 protein. **Journal of virology**, v. 77, n. 9, p. 5046-5053, 2003.

### ANEXO A – Desenvolvimento da Equação 1

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

$$[P] = [P]_T - [PL]$$

$$[L] = [L]_T - [PL]$$

$$K_D = \frac{([P]_T - [PL])([L]_T - [PL])}{[PL]}$$

$$K_D[PL] = [P]_T[L]_T - ([P]_T + [L]_T)[PL] + [PL]^2$$

$$[PL]^2 - ([P]_T + [L]_T + K_D)[PL] + [P]_T[L]_T = 0$$

$$[PL] = \frac{([P]_T + [L]_T + K_D) - \left( \left( -([P]_T + [L]_T + K_D) \right)^2 - 4[P]_T[L]_T \right)^{1/2}}{2}$$

$$\bar{Y} = \left( \frac{([P]_T + [L]_T + K_D) - \left( \left( -([P]_T + [L]_T + K_D) \right)^2 - 4[P]_T[L]_T \right)^{1/2}}{2} \right) // [P]_T$$

$$\bar{Y} = \frac{F - F_0}{F - F_s}$$

$$\frac{F - F_0}{F_0 - F_{sat}} \div \frac{F_0}{F_0} = \left( \frac{([P]_T + [L]_T + K_D) - \left( \left( -([P]_T + [L]_T + K_D) \right)^2 - 4[P]_T[L]_T \right)^{1/2}}{2} \right) // [P]_T$$

$$\frac{\frac{F}{F_0} - 1}{1 - F_{sat}} = \left( \frac{([P]_T + [L]_T + K_D) - \left( \left( -([P]_T + [L]_T + K_D) \right)^2 - 4[P]_T[L]_T \right)^{1/2}}{2} \right) // [P]_T$$

$$\frac{F}{F_0} - 1 = (1 - F_{\text{sat}}) \left( \frac{([P]_T + [L]_T + K_D) - \left( \left( -([P]_T + [L]_T + K_D) \right)^2 - 4[P]_T[L]_T \right)^{\frac{1}{2}}}{2} \right) // [P]_T$$

$$\frac{F}{F_0} = 1 - (1 - F_{\text{sat}}) \left( \frac{([P]_T + [L]_T + K_D) - \left( \left( -([P]_T + [L]_T + K_D) \right)^2 - 4[P]_T[L]_T \right)^{\frac{1}{2}}}{2[P]_T} \right)$$

Fonte: BECKETT, D., 2011.