UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LEANDRO OLIVEIRA BORTOT

Mecanismos moleculares de reconhecimento das glicosilações do envelope do vírus da Dengue pelas lectinas tipo-C e seus potenciais inibidores

> Ribeirão Preto 2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Mecanismos moleculares de reconhecimento das glicosilações do envelope do vírus da Dengue pelas lectinas tipo-C e seus potenciais inibidores

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica.

Orientado: Leandro Oliveira Bortot

Orientador: Prof. Dr. Antonio Caliri

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 16/05/2018. A versão original encontrase disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

BORTOT, L.O.
Mecanismos moleculares de reconhecimento das glicosilações do envelope do vírus da Dengue pelas lectinas tipo-C e seus potenciais inibidores
DOUTORADO FCFRP/USP 2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Bortot, Leandro Oliveira

Mecanismos moleculares de reconhecimento das glicosilações do envelope do vírus da Dengue pelas lectinas tipo-C e seus potenciais inibidores. Ribeirão Preto, 2018.

127 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica. Orientador: Caliri, Antônio

1. Dengue. 2. Dinâmica molecular. 3. Energia livre.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leandro Oliveira Bortot

Mecanismos moleculares de reconhecimento das glicosilações do envelope do vírus da Dengue pelas lectinas tipo-C e seus potenciais inibidores

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica.

Aprovado em:		
	Banca Examinadora	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	1 1 1 1
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

Dedico esta tese aos meus pais, que me deram todo o apoio necessário, aos professores que me incentivaram e aos amigos que acompanharam.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Antônio Caliri por todas as discussões e pelo companheirismo ao longo dos anos, bem como aos ex colegas de laboratório por todas as experiências vividas: Renata Almeida Garcia Reis, Flávio Henrique Sant'Ana Costa, João Paulo dal Molin, Ricardo Oliveira dos Santos Soares e Rodrigo Antônio Faccioli.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo suporte ao longo do doutorado.

À FAPESP pelo apoio financeiro através do projeto regular de doutorado (processo 2013/00927-7) e pela bolsa BEPE (processo 2016/04958-2), possibilitando minha dedicação intensa à pesquisa ao longo do doutorado.

Ao Professor David van der Spoel por ter me recebido gentilmente em seu grupo de pesquisa na Universidade de Uppsala, Suécia, e aos antigos colegas de grupo durante pouco menos de 1 ano pelo ambiente amigável e estimulante: Zahedeh Bashardanesh, Mohammad Ghahremanpour, Benjamin Schroeder, Nina Fischer, Marie-Madeleine Walz, Samuel Ferrer e Sergio Manzetti.

À USP, Rice University, HPC2N e PDC pelo acesso aos vários recursos computacionais usados ao longo deste trabalho.

Aos meus pais por apoiar a minha carreira na pesquisa.

Aos amigos que me acompanham.

"We choose to go to the Moon! (...) and do the other things, not because they are easy, but because they are hard; because that goal will serve to organize and measure the best of our energies and skills, because that challenge is one that we are willing to accept, one we are unwilling to postpone, and one we intend to win"

–John F. Kennedy, 12 de Setembro de 1962

RESUMO

BORTOT, L.O. Mecanismos moleculares de reconhecimento das glicosilações do envelope do vírus da Dengue pelas lectinas tipo-C e seus potenciais inibidores. 2018. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Dengue é uma doença tropical negligenciada que atualmente ameaca mais da metade de população mundial e representa custo anual de bilhões de dólares para as áreas afetadas. Avanços recentes na elucidação estrutural de proteínas humanas e virais contribuíram para o entendimento do ciclo de replicação viral e das interações vírus-hospedeiro a nível molecular. Em particular, a camada mais externa do vírus é composta por 180 monômeros da glicoproteína do envelope. Cada um desses monômeros apresenta duas glicosilações que são reconhecidas por lectinas cuja atividade depende de Ca²⁺. A interação entre o vírus e essas lectinas favorece a infecção ou o aparecimento de sintomas mais severos. Neste trabalho aplicamos simulações de dinâmica molecular e métodos de estimativa de afinidade para avancar nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares do reconhecimento de glicosilações high-mannose pelas lectinas DC-SIGN e MR, ambas já experimentalmente validadas como alvos biológicos para desenvolvimento de novos antivirais. Adicionalmente, através de virtual screening usando um conjumto de programas de implementação própria e uma biblioteca de moléculas já aprovadas para uso como fármacos, encontramos uma molécula (lohexol) que apresenta alto potencial de interação com ambos os receptores. Embora testes experimentais ainda sejam necessários para validar esse achado, nossos resultados sugerem que essa molécula, e eventualmente moléculas similares, podem agir como inibidor da infecção do vírus da Dengue por um mecanismo duplo.

Palavras-chave: Dengue, Dinâmica molecular, Energia livre

ABSTRACT

BORTOT, L.O. Molecular mechanisms underlying the recognition of the Dengue virus envelope glycosylations by C-Type Lectins and its potential inhibitors. 2018. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Dengue is a tropical neglected disease that currently threatens more than half the world's population and represents a yearly cost of billions of dollars to the affected areas. Recent advances in the elucidation of 3D structures of human and viral proteins has contributed to the understanding of the viral replication cycle and virus-host interactions at the molecular level. In particular, the outermost layer of the virus is composed by 180 monomers of the envelope glycoprotein. Each one of these monomers displays two glycosylations that are recognized by lectins which have Ca²⁺-dependent activity. The interaction between the virus and these lectins favors infection or severe disease onset. In this work we apply molecular dynamics simulations and affinity estimation methods to advance our knowledge about the molecular mechanisms underlying the recognition of the high-mannose glycosylation by the DC-SIGN and MR lectins, both of which are already validated as targets for the development of new antivirals against Dengue. Additionally, by running virtual screening assays using a set of programs implemented by us and a library containing molecules which are already approved to be used as drugs, we found one molecule (Iohexol) which presents high potential of interaction with both receptors. Although experimental testing is still necessary to validate this finding, our results suggest that this molecule, and eventually similar ones, can act as an inhibitor of the Dengue virus infection by a dual mechanism.

Keywords: Dengue, Molecular dynamics, Free energy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da Dengue. A etapa de adesão e entrada está destacada dentro da elipse vermelha. Figura adaptada da referência 15	4
Figura 2:	Dímero da glicoproteína do envelope viral. A proteína está mostrada em cartoon. Os domínios I, II e III estão mostrados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. As glicosilações <i>high-mannose</i> estão mostradas	_
Figura 3:	como <i>sticks</i> verdes. Rotâmeros da ligação do tipo α1,6. Figura extraída da referência 33.	5
Figura 4:	Representação esquemática do processo de <i>trimming</i> e processamento da glicosilação <i>high-mannose</i> inicial, no retículo endoplasmático, até a <i>complex-type</i> no trans-Golgi.	8
Figura 5:	a) Representação esquemática da estrutura completa do DC-SIGN. Os CRDs estão representados em azul e os domínios do pescoço em verde. Figura adaptada da referência 68. b) Estrutura 3D à baixa resolução da	_
Figura 6:	porção extracelular do DC-SIGN. Figura adaptada da referência 72. Estruturas cristalográficas do DC-SIGN. A proteína está mostrada em cartoons verdes, os Ca ²⁺ como esferas azuis e os carboidratos como <i>sticks</i> amarelos. a) O sítio de complexação principal de Ca ²⁺ está destacado pela seta preta. O sítio auxiliar, que complexa dois Ca ²⁺ , está destacado dentro do círculo preto; b) Estrutura do complexo com o fragmento Man ₄ (PDB ID 1SL4) c) Estrutura do complexo com o fragmento Le ^x (PDB ID 1SL5).	11
Figura 7:	a) Representação esquemática da estrutura completa do MR. Adaptado da referência 79. b) Estrutura cristalográfica do CTLD-4 do MR no qual aconteceu troca de domínios entre unidades assimétricas vizinhas no cristal, que estão representados em cores diferentes. Figura adaptada da	12
Figura 8:	 a) Representação esquemática da estrutura completa do CLEC5A. Seu CLTD está mostrado em vermelho, o domínio linker como uma linha e sua hélice transmembrana está em roxo. A interação com DAP12 ocorre dentro da membrana. Figura adaptada da referência 100. b) Estrutura cristalográfica do seu CTLD (PDB ID 2VHF) 	14
Figura 9:	Ciclo termodinâmico esquemático para o método MM/PBSA. O solvente está representado pelo fundo azul e o vácuo pelo fundo preto. Figura adaptada de "AMBER Advanced Tutorials – Tutorial 3"	22
Figura 10:	Força que a mola virtual impõe sobre o sistema receptor–ligante para separá-los durante uma trajetória representativa de simulação de dinâmica molecular dirigida. A força aumenta ao longo to tempo e alcança um máximo, que é a força de ruptura, antes de romper as interações receptor– ligante.	22
Figura 11:	Representação esquemática do método <i>Umbrella Sampling</i> . Linha superior: Amostragem inicial da coordenada de reação através de simulações dirigidas. Linha central: Simulações de amostragem individuais nas quais são aplicados potenciais harmônicos para restringir a amostragem do caminho de reação dentro de cada janela. Linha inferior: Histogramas de amostragem com boa sobreposição. Fonte: " <i>GROMACS</i>	20
	Tutorial – Umbrella Sampling".	24

iii

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
CD	Cluster of Differentiation
CLEC5A	C-type LECtin domain family 5 member A
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CTL	C-Type Lectin
CTLD	C-Type Lectin-like Domain
DAP12	DNAX-Activating Protein of 12 kDa
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-integrin
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
gg	gauche-gauche
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetil Glucosamina
GROMACS	GROningen Machine for Chemical Simulations
gt	gauche-trans
HF	Hartree-Fock
HPC2N	High Performance Computing Center North
ICAM3	InterCellular Adhesion Molecule 3
KTH	Kungliga Tekniska Högskolan
Man	Manose
MBP-A	Mannose Binding Protein-A
MDL-1	Myeloid DAP12-associated Lectin-1
MOPAC	Molecular Orbital PACkage
MR	Mannose Receptor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PDB	Protein DataBank
PDC	Parallel Dator Centrum
PRR	Pattern Recognition Receptor
RESP	Restrained ElectroStatic Potential
RM1	Recife Model 1
tg	trans-gauche
WHAM	Weighted Histogram Analysis Method
ZINC	ZINC Is Not Commercial

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de abreviaturas e siglas	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Dengue	1
1.2. Estrutura e função de glicosilações	5
1.3. Lectinas tipo-C	9
1.3.1. DC-SIGN	9
1.3.2. MR	12
1.3.3. CLFC5A	15
1.4. 1. 1. 1. 4. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1	17 17
 1.4.2. Simulações de dinâmica molecular 1.4.3. MM/PBSA 1.4.4. Forca de Ruptura 	18 21 22
1.4.5. Igualdade de Jarzynski.	23
1.4.6. <i>Umbrella Sampling</i> .	24
5. CONCLUSÕES	25
6. REFERÊNCIAS	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho envolve detalhes moleculares da interação do vírus da Dengue com receptores celulares no contexto do processo de infecção viral. Assim, nesta seção introdutória são abordados os elementos essenciais da doença "Dengue" —fatores determinantes do processo de infecção, receptores celulares e ligantes envolvidos— e todo o ferramental de modelagem molecular relevante para o presente processo investigativo.

1.1. Dengue

Dengue é uma doença viral transmitida por mosquito que atualmente ameaça aproximadamente metade da população mundial. Seus vetores, mosquitos do gênero Aedes entre os quais principalmente o *Aedes aegypt*, são bem adaptados a áreas urbanas de países tropicais e subtropicais. Tal adaptação foi historicamente facilitada pela globalização e atualmente a urbanização descontrolada e o aquecimento global contribuem para a expansão do mosquito para novas áreas¹. A dengue representa não só um problema sanitário para os países afetados, mas também impõe um fardo social e econômico: Foi estimado, por exemplo, que o custo global da Dengue em 2011 foi de 40 bilhões de dólares americanos devido a custos diretos com tratamentos e custos indiretos devido a dias de trabalho produtivo perdidos² No entanto, mesmo assim a Dengue atraiu pouca atenção de indústrias farmacêuticas, sendo atualmente classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma das 17 doenças tropicais negligenciadas³.

O ciclo de transmissão da Dengue usualmente envolve apenas humanos e mosquitos. A fêmea do vetor usa o sangue de vertebrados como fonte de nutrientes para completar o desenvolvimento de seus ovos. Ao picar um animal infectado pelo vírus da Dengue o mosquito é infectado através do seu intestino e, após pouco mais de uma semana, o vírus acumula-se nas suas glândulas salivares. Assim, futuras picadas levarão à inoculação de vírus diretamente no sangue de seu alvo e existe possibilidade de infecção, permitindo o fechamento do ciclo⁴. A grande adaptação dos vetores às áreas urbanas torna os humanos as fontes preferenciais de sangue para o *Aedes spp*. A estratégia de prevenção da Dengue adotada, baseada no controle e eliminação dos vetores, tem como objetivo a interrupção do ciclo de infecção. Apesar da ausência de evidências científicas sobre sua efetividade, falta de otimização e desconhecimento dos riscos para a população, esse procedimento continua sendo empregado⁵.

A infecção pelo vírus da Dengue pode causar um amplo espectro de manifestações clínicas. Em um dos extremos desse espectro temos infecções assintomáticas. Apesar de esse

ser um cenário desejável do ponto de vista clínico, as infecções assintomáticas representam um desafio para a vigilância epidemiológica porque são invisíveis para o sistema de saúde ao mesmo tempo em que contribuem para epidemias por ainda fazerem parte do ciclo de transmissão viral⁶. Já os casos sintomáticos vão desde sintomas inespecíficos semelhantes à gripe e fortes dores nas articulações, até casos potencialmente fatais classificados pelo Ministério da Saúde conjuntamente como "Dengue grave". Na Dengue grave pode haver extravasamento de plasma que eventualmente leva a hemorragias massivas internas ou externas e ao quadro de choque circulatório⁷.

A maior parte da patogenicidade do vírus da Dengue se deve a sua capacidade de estimular exageradamente o sistema imune do hospedeiro. A superestimulação do sistema imune do hospedeiro leva ao acúmulo de complexos virus–anticorpo nas articulações e vasos, desenvolvimento de autoimunidade contra plaquetas e células endoteliais e liberação exagerada de citocinas pró inflamatórias⁸. Todos esses mecanismos contribuem para os sintomas da Dengue grave. A existência de quatro sorotipos do vírus da Dengue é um fator complicador. O hospedeiro desenvolve imunidade contra o sorotipo específico que o infectou devido a produção de anticorpos. No entanto, eles são não-neutralizantes para os demais sorotipos e, no caso de infecção posterior por um sorotipo diferente, ocorre o fenômeno de infecção aumentada por anticorpo⁹. Como consequência, a infecção e os mecanismos de patogenicidade ocorrem de forma mais rápida e intensa, razão pela qual o risco do desenvolvimento das formas graves da doença é maior caso o paciente já tenha tido Dengue anteriormente¹⁰. Esse fenômeno representa um desafio para o desenvolvimento de vacinas e é razão para maior atenção epidemiológica em regiões nas quais há a presença de mais de um sorotipo simultaneamente¹¹.

Apesar de avanços no desenvolvimento de uma vacina, ainda há barreiras para seu uso em escala populacional nos países afetados. Anos de desenvolvimento da vacina tetravalente Dengvaxia®, do laboratório *Sanofi Pasteur*, culminaram na sua aprovação para uso em alguns países, entre os quais o Brasil em 2015. No entanto, a eficácia demonstrada pela vacina, 60% em média, é muitas vezes considerada baixa para uso em escala populacional¹². A necessidade de três doses e o custo das vacinas dificultam ainda mais sua implementação em programas nacionais de vacinação dos pontos de vista logístico e econômico¹³. Além disso, em Dezembro de 2017 o laboratório *Sanofi Pasteur* concluiu que a vacina dobra a chance de desenvolvimento de Dengue severa em pacientes que nunca tiveram Dengue antes de serem vacinados. A Organização Mundial da Saúde atualmente recomenda que a vacina seja usada apenas em pessoas que já tiveram Dengue¹⁴.

Não há tratamentos específicos para a Dengue. Ao ser admitido no sistema de saúde, o paciente recebe medicamentos para tratar os sintomas da doença —como febres e dores— até que seu organismo consiga eliminar o vírus naturalmente, o que geralmente acontece em menos de duas semanas após a infecção. Nos casos mais graves o paciente é acompanhado diariamente e, caso necessário, é feita internação para hidratação por via intravenosa ou recebimento de transfusões de sangue⁷.

Cada uma das etapas do ciclo de replicação viral pode ser alvo para fármacos. O vírus da Dengue faz parte da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. Trata-se de um vírus que tem uma fita simples de RNA de senso positivo, (+)ssRNA, com cerca de 11 kilobases (kb). Seu ciclo de replicação inicia-se com a adesão do vírus à célula do hospedeiro através de receptores celulares¹⁵. A interação vírus-receptor introduz o vírus na célula através de endocitose mediada por receptor, levando o vírus para lisossomos a fim de que seja destruído (Fig. 1). No entanto, o vírus subverte a maquinaria celular. A diminuição do pH do endossomo ativa o envelope viral, causando uma alteração conformacional que o funde à membrana do endossomo e libera o RNA viral dentro do citosol. O RNA é traduzido diretamente por ribossomos em uma única poliproteína, que é processada por proteases celulares e virais (Fig. 1). O vírus é montado conforme avança do retículo endoplasmático para o Golgi e é finalmente liberado para o ambiente extracelular. As etapas de adesão, entrada, fusão, tradução, processamento, montagem e brotamento viral podem sofrer interferência de fármacos (Fig. 1). Os alvos moleculares para fármacos podem ser elementos virais, como a glicoproteína do envelope ou a protease, ou proteínas da maquinaria celular do hospedeiro, como receptores de superfície ou enzimas da via de glicosilação^{16.} O grande avanço recente na obtenção de estruturas cristalográficas das proteínas estruturais –E, M e C– e não estruturais – NS1, NS3 e NS5- do vírus permitiu um maior entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no ciclo de replicação do vírus, bem como estimulou iniciativas de descoberta racional de fármacos¹⁷.





Figura 1: Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da Dengue. A etapa de adesão e entrada está destacada dentro da elipse vermelha. Figura adaptada da referência 15.

Estudos estruturais têm dado atenção especial às proteínas e à organização do envelope viral por estar exposto ao ambiente extracelular e às células do sistema imune. Seu elemento básico, a glicoproteína do envelope, ou proteína E, foi caracterizado por cristalografia de raios-X^{18,19}. Já o método de crio eletromicroscopia, que permite a visualização em resolução quase atômica de complexos proteicos maiores do que algumas dezenas de nm (nanômetro, unidade equivalente a 10⁻⁹ metros), tem sido usado para investigar como essas proteínas, e outros elementos, se organizam no envelope viral^{20,21}. Especificamente, o envelope é composto por 90 dímeros da proteína E em um arranjo consideravelmente flexível formando um icosaedro com aproximadamente 50nm. A flexibilidade do envelope pode ser ilustrada pelo fato de que existem diferenças estruturais à temperatura ambiente, 28°C²², e à temperatura interna do hospedeiro, 37°C²³. Além disso, a presença de anticorpos contra a glicoproteína do envelope pode alterar significativamente sua organização geral²⁴.

O envelope viral apresenta glicosilações que são reconhecidas por receptores celulares. Cada monômero da glicoproteína do envelope viral tem dois sítios de N-glicosilação em Asn-67 e Asn-153 (Fig. 2). Apesar de o tipo de glicosilação presente em cada um desses sítios variar com o tipo celular usado nos experimentos, há indícios de que o vírus produzido pelas células do mosquito apresentam duas glicosilações do tipo *high-mannose*. Já o vírus produzido por células humanas apresenta pelo menos uma glicosilação *complex-type* enquanto a outra varia entre *high-mannose* e *complex-type*²⁵⁻²⁸. Essas glicosilações são reconhecidas por receptores em células do sistema imune, como lectinas tipo C presentes em células dendríticas e macrófagos^{29,30}. A interação entre o vírus e essas lectinas já foram apontadas como alvos promissores para desenho de fármacos antivirais³¹. Portanto, no tópico seguinte serão abordados a estrutura e função de carboidratos e glicosilações.



Figura 2: Dímero da glicoproteína do envelope viral. A proteína está mostrada em cartoon. Os domínios I, II e III estão mostrados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. As glicosilações *high-mannose* estão mostradas como *sticks* verdes.

1.2. Estrutura e função de glicosilações

Quimicamente, carboidratos são poli-álcoois com uma função cetona ou aldeído. Dependendo do tamanho da cadeia, a carbonila do grupo aldeído ou cetona pode sofrer reação intramolecular com uma das hidroxilas, formando um hemicetal ou hemiacetal heterocíclico. As formas fechadas –isto é, cíclicas– mais comuns são as que tem seis ou cinco átomos como parte do anel e são chamadas de piranoses e furanoses, respectivamente. O carbono da função hemicetal ou hemiacetal é chamado anomérico porque as duas possíveis orientações da sua hidroxila na forma fechada criam dois isômeros chamados de anômeros. Quando o oxigênio da hidroxila do carbono anomérico está mais distante do oxigênio endocíclico o anômero é chamado de β . Anômeros α e β e as formas piranose e furanose se interconvertem em solução porque todas coexistem em equilíbrio tendo a forma aberta como intermediário comum³².

Enzimas polimerizam carboidratos de forma análoga a amino ácidos. Através de um processo enzimático, o grupo hemiacetal ou hemicetal de um monossacarídeo pode reagir com uma das hidroxilas de outro, formando uma ligação glicosídica que resulta em um dissacarídeo e uma molécula de água. Uma vez que a reação pode acontecer em mais de uma hidroxila de um dos substratos, é necessário especificar qual delas está envolvida na ligação glicosídica. Por convenção, os carbonos dos monossacarídeos são numerados a partir da extremidade da molécula que tem o carbono anomérico e as hidroxilas recebem os mesmos números do carbono ao qual estão ligadas. Por exemplo, a nomenclatura do dissacarídeo lactose é β Gal(1,4)Glc: um monossacarídeo de Galactose (Gal) ligado através da forma β de seu hemiacetal, que está no carbono 1, à hidroxila 4 de um monossacarídeo de Glucose (Glc). Ao contrário dos demais biopolímeros encontrados na natureza—DNA, RNA e proteínas—o

processo de polimerização de carboidratos pode gerar moléculas ramificadas, ou seja, um mesmo resíduo de carboidrato pode estar envolvido em mais de duas ligações glicosídicas³².

A ligação do tipo α 1,6 é diferente das demais devido a presença de uma ligação rotacionável extra. O ângulo diedral que descreve a rotação ao dessa ligação, ω , é definido como O6-C6-C5-O5. As três conformações metaestáveis do ângulo ω são chamadas de *gauche-gauche* (gg), *gauche-trans* (gt) e *trans-gauche* (tg) e correspondem ao valor do ângulo ω de -60° (ou 300°), 60° e 180°, respectivamente. Os nomes dos rotâmeros de referem à orientação (*trans* ou *gauche*) em relação aos ângulos diedros ω e O6-C6-C5-C4, respectivamente (Fig. 3) ^{33,34}.



Figura 3: Rotâmeros da ligação do tipo α1,6. Figura extraída da referência 33.

Mecânica molecular não é suficiente para explicar a preferência conformacional de algumas ligações glicosídicas. Além das considerações convencionais feitas no contexto da mecânica molecular, um efeito estereoeletrônico é relevante para o entendimento da estabilidade relativa dos rotâmeros gg, gt e tg: Um dos pares de elétrons solitários (do inglês *"lone pair"*) do oxigênio endocíclico, que corresponde a um orbital não-ligante chamado n, pode interagir com o orbital anti-ligante não ocupado da ligação covalente entre C1 e o oxigênio exocíclico que participa da ligação glicosídica, chamado σ^* . Os rotâmeros *gauche* teriam menor estabilidade do que o *trans* de acordo com considerações estéricas simples. No entanto, a orientação dos orbitais n e σ^* permite que eles formem um orbital molecular estendido que aumenta sua estabilidade. Devido a esse fenômeno os rotâmeros gg e gt tem preferência sobre o rotâmero tg³⁵⁻³⁸.

Carboidratos podem ser covalentemente ligados a proteínas. Além da reação de polimerização entre dois carboidratos, eles também podem ser covalentemente ligados a proteínas através de dois tipos de processo enzimático: N-glicosilação ou O-glicosilação. Na O-glicosilação ocorre polimerização de monossacarídeos com o átomo de oxigênio de cadeias laterais de Serina, Threonina, Tirosina, Hidroxilisina e Hidroxiprolina. A O-glicosilação pode, a partir dai, crescer conforme novos monômeros são adicionados a esse monossacarídeo inicial devido a ação de enzimas. Já no processo de N-glicosilação ocorre polimerização entre

7

um oligossacarídeo previamente construído e o nitrogênio de cadeias laterais de Asparagina ou Treonina³². O processo de glicosilação efetivamente aumenta a diversidade do proteoma e exerce funções diversas como contatos célula–célula, contatos célula–matriz extracelular e pode auxiliar o processo de enovelamento de proteínas³⁹.

O processo de N-glicosilação ocorre no lúmen do retículo endoplasmático (Fig. 4). Inicialmente um carboidrato precursor é adicionado à proteína e processado em uma glicosilação que tem nove resíduos de Manose (Man) e dois de N-AcetilGlucosamina (GlcNAc), GlcNAc₂Man₉. Conforme a proteína glicosilada avanca do retículo plasmático para a rede cis-Golgi ocorre o processo de trimming, no qual enzimas presentes no retículo endoplasmático podem remover resíduos de Manose que fazem ligação do tipo α 1-2 no oligossacarídeo inicial. Uma vez que o processamento de glicosilações é dinâmico e não está sujeito a controles rígidos na célula, todas as moléculas de GlcNAc₂Man₉ a GlcNAc₂Man₅ podem existir simultaneamente e são coletivamente chamadas de glicosilação do tipo high*mannose*³². Do ponto de vista estrutural, os casos extremos —GlcNAc₂Man₅ e GlcNAc₂Man₉ -----são inequivocamente definidos porque nenhuma ou todas as Manoses que fazem ligações α1-2 foram removidas enquanto os casos intermediários —GlcNAc₂Man₈ a GlcNAc₂Man₆ são heterogêneos porque há várias formas possíveis de remover resíduos de Manose da glicosilação inicial³². Adicionalmente, do ponto de vista conformacional, já que todas as glicosilações high-mannose tem duas ligações do tipo α 1-6, há quatro possíveis combinações de rotâmeros mais estáveis: gg-gg, gg-gt, gt-gg e gt-gt^{40,41}.

Glicosilações *high-mannose* podem ser processadas conforme a proteína avança para a rede trans-Golgi (Fig. 4). Já na parte medial do Golgi pode ocorrer adição de moléculas de Glucose à glicosilação *high-mannose*, dando origem ao tipo de glicosilação conhecido como híbrida. Além disso, o *trimming* das Manoses pode continuar e outros açúcares podem ser ligados à Glucose, criando as glicosilações *complex-type*. Trata-se de um grupo grande e diverso de glicosilações que exerce várias funções, geralmente como sinalização celular através de contatos célula–célula e célula–matriz, estabilização de proteínas e controle fino da atividade enzimática. O aparato enzimático necessário para processar as glicosilações *high-mannose* completamente até *complex-type* está ausente ou é incompleto em patógenos como vírus, bactérias, fungos e protozoários³². Por isso, enquanto células humanas têm majoritariamente glicosilações *complex-type* em sua superfície, glicosilações *high-mannose* são reconhecidas como um Padrão Molecular Associado a Patógeno (PAMP, do inglês *"Pathogen-Associated Molecular Pattern"*) por células do sistema imune. O reconhecimento desses PAMPs por Receptores Reconhecedores de Padrões (PRRs, do inglês *"Pattern Recognition Receptors"*) ativa imediatamente as vias bioquímicas da imunidade inata,

causando inflamação e início da resposta imune adaptativa para geração de anticorpos contra o patógeno específico^{42,43}.



Figura 4: Representação esquemática do processo de *trimming* e processamento da glicosilação *high-mannose* inicial, no retículo endoplasmático, até a *complex-type* no trans-Golgi.

Carboidratos são as macromoléculas biológicas com maior potencial de armazenamento de informação na natureza. Eles superam o potencial de armazenamento de informação dos ácidos nucleicos e amino ácidos devido à grande variabilidade de formas através das quais dois monômeros podem se ligar para formar ligações glicosídicas, incluindo a possibilidade de ramificações³².

A variedade de monômeros disponíveis é muito maior nos carboidratos. Assim, monossacarídeos formam glicanas da mesma forma que letras formam palavras numa língua que é chamada de "glico código"⁴⁴. Proteínas especializadas em reconhecer carboidratos, chamadas genericamente de "lectinas", fazem a leitura do glico código e transduzem a informação química presente nas glicosilações em função biológica através de uma série de mecanismos específicos de cada grupo de lectinas⁴⁵. Em particular, Lectinas Tipo-C (CTL, do inglês "*C-Type Lectins*") reconhecem as glicosilações presentes no envelope do vírus da Dengue e contribuem para a patogenicidade da doença⁴⁶. Detalhes sobre são discutidos a seguir.

1.3. Lectinas tipo-C

A família das Lectinas Tipo-C (CTL, do inglês "*C-Type Lectins*") é a maior e mais diversa família de lectinas presente em animais. Seu nome, "Tipo-C", vem de sua característica principal de ter um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD, do inglês "*Carbohydrate Recognition Domain*") que complexa até quatro Ca²⁺ e que tem atividade lectínica Ca²⁺-dependente. Atualmente considera-se que a família CTL é parte da superfamília de proteínas que tem Domínios de Lectina Tipo-C (CTLD, do inglês "*C-Type Lectin-like Domain*"). Os membros da superfamília CTLD estão subdivididos em 17 grupos e não necessariamente complexam Ca²⁺ ou carboidratos apesar de terem o domínio CTL. Em células da linhagem mielóide, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, são encontrados apenas os grupos II, V e VI⁴⁷⁻⁴⁹.

Neste trabalho foi considerado um representante de cada um desses grupos que tem relevância na infecção pelo vírus da Dengue, a saber: DC-SIGN (do inglês, "*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*"), CLEC5A (do inglês "*C-type LECtin domain family 5 member A*") e MR (do inglês "*Mannose Receptor*"), respectivamente.

1.3.1. DC-SIGN

O receptor DC-SIGN (do inglês, "*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*"), também chamado de CD209 (do inglês, "*Cluster of Differentiation 209*"), é expresso em células dendríticas e está envolvido em processos de adesão celular, regulação da resposta imune e reconhecimento de moléculas endógenas e exógenas⁵⁰. Ele se organiza em *nanoclusters* na superfície celular e, após ser estimulado pela complexação de seus ligantes, sofre internalização rápida por mecanismo dependente de clatrina. O complexo DC-SIGN–ligante é levado para compartimentos proteolíticos onde o ligante, possivelmente um patógeno como o vírus da dengue, é processado para ser apresentado a linfócitos T no processo chamado de "apresentação de antígenos" que é crucial para a continuidade da resposta imune. É interessante notar que esse receptor passa por reciclagem; após acidificação da vesícula para onde o complexo DC-SIGN–ligante vai, o receptor perde afinidade pelos seus ligantes, que são liberados, enquanto o receptor volta íntegro para a parte externa da membrana celular⁵¹.

Além de sua atividade endocítica, DC-SIGN tem a capacidade de induzir diferentes padrões de resposta imune de acordo com os carboidratos presentes nas estruturas que reconhece⁵². Em particular, ao reconhecer glicosilações do tipo *high-mannose*, sua porção intracelular desencadeia cascatas de sinalização celular que resultam na produção de citocinas

pró-inflamatórias através da ativação Raf-1 e NF-κB⁵³. Por outro lado, o reconhecimento de antígenos que apresentam glicosilação *complex-type* com Fucose terminal suprime a resposta inflamatória através do desmonte do complexo de sinalização intracelular na cauda citoplasmática do DC-SIGN⁵⁴. Esse receptor também está envolvido no desenvolvimento de processos alérgicos⁵⁵.

Foi observado que o DC-SIGN é o principal receptor usado pelo vírus da Dengue para infectar células dendríticas, que são seu alvo primário. Células THP-1, que não expressam DC-SIGN e não são infectadas pelo vírus da Dengue, foram usadas para validar o papel específico do receptor na infecção. O gene do DC-SIGN foi transfectado para essas células, que passaram a expressá-lo e a serem infectadas. A quantidade de células infectadas é proporcional à quantidade de DC-SIGN presente na superfície das células THP-1 transfectadas. Anticorpos anti-DC-SIGN foram capazes de diminuir a infecção das células THP-1 transfectadas e de células dendríticas imaturas em até 90%²⁹. Apesar de ainda haver dúvidas a respeito do mecanismo exato através do qual DC-SIGN leva à internalização do vírus^{56,57}, o papel essencial e específico das glicosilações do envelope viral no processo de entrada do vírus em células que expressam DC-SIGN foi demonstrado pelo fato de que vírus mutantes que não apresentam glicosilações não conseguem infectar tais células⁵⁸ e pela capacidade de agentes complexadores de carboidratos inibirem a infecção de células que expressam DC-SIGN⁵⁹. Além de seu envolvimento na Dengue, o receptor DC-SIGN está envolvido nas infecções por outros patógenos. Por isso, inibidores do DC-SIGN tem sido procurados na literatura⁶⁰ usando abordagens como glicodendrímeros^{61,62}, glicomiméticos^{63,64} e pequenas moléculas sintéticas^{65,66}.

Há bastante informação estrutural sobre o receptor DC-SIGN devido ao grande interesse terapêutico sobre ele. O receptor completo tem 404 resíduos de amino ácido, sendo 37 da cauda citoplasmática, 21 em uma hélice transmembrana, 198 divididos em oito domínios repetidos chamados de "pescoço" e, finalmente, o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD, do inglês "*Carbohydrate Recognition Domain*") com 124 resíduos e uma porção C-terminal desorganizada com 24 resíduos (Fig. 5a). Na superfície celular o receptor é encontrado como tetrâmeros estabilizados pelas repetições das hélices do pescoço^{67,68}, que formam uma estrutura do tipo haste rígida ligada de forma flexível aos CRDs⁶⁹. Uma consequência de tal flexibilidade entre os CRDs e o pescoço é que, conforme revelado por uma estrutura obtida por crio-microscopia eletrônica, apenas dois CRDs do receptor tetramérico interagem simultaneamente com as glicosilações do envelope viral⁷⁰. A estrutura a baixa resolução de toda a porção extracelular do receptor foi modelada através do uso combinado de espalhamento de raios-x a baixo ângulo e da avaliação do seu comportamento hidrodinâmico^{71,72} (Fig. 5b). Adicionalmente, foi demonstrado que a tetramerização das repetições do domínio do pescoço é dependente de pH, o que pode ser o mecanismo responsável pela perda de afinidade entre o receptor e seus ligantes ao ocorrer acidificação das vesículas após endocitose⁷².



Figura 5: a) Representação esquemática da estrutura completa do DC-SIGN. Os CRDs estão representados em azul e os domínios do pescoço em verde. Figura adaptada da referência 68.
b) Estrutura 3D à baixa resolução da porção extracelular do DC-SIGN. Figura adaptada da referência 72.

A estrutura do seu CRD é composta pelo *fold* conservado das CTL complexando o total de três Ca²⁺, sendo um deles no sítio principal, que está envolvido na complexação de açúcares, e dois deles em um mesmo sítio, chamado de auxiliar⁷³ (Fig. 6a). Os resíduos diretamente envolvidos na complexação do Ca²⁺ são Glu-347, Asn-349, Glu-354, Asn-365 e Asp-366. Os mesmos resíduos formam uma rede de ligações de hidrogênio com um dos resíduos de manose do carboidrato que está complexado ao receptor, que é chamada de "manose principal". O DC-SIGN tem um sítio de reconhecimento de carboidratos bastante extenso e que pode reconhecer vários padrões de carboidratos⁷⁴.

Experimentos de g*lycan array*, nos quais a afinidade do receptor por centenas de padrões de carboidrato diferentes é avaliada simultaneamente, elucidaram as propriedades de reconhecimento molecular do DC-SIGN. Além da afinidade relativa por diferentes glicosilações do tipo *high-mannose*, foi detectada ligação específica a glicosilações *complex-type* com fucose terminal como os antígenos sanguíneos A e B e Lewis a, b, x e y⁷⁵. Um par de estruturas cristalográficas do DC-SIGN complexando dois tetrassacarídeos –um fragmento da glicosilação *high-mannose* (PDB ID 1SL4) (Fig. 6b) e outro que contém o padrão *complex-type* Lewix x (PDB 1SL5) (Fig. 6c)– revelam os detalhes dessas interações⁷⁵. Estruturas cristalográficas de complexos entre DC-SIGN e inibidores glicomiméticos mostram que os mecanismos de interação receptor-carboidrato podem ser explorados por inibidores^{76,77}.



Figura 6: Estruturas cristalográficas do DC-SIGN. A proteína está mostrada em cartoons verdes, os Ca²⁺ como esferas azuis e os carboidratos como *sticks* amarelos. a) O sítio de complexação principal de Ca²⁺ está destacado pela seta preta. O sítio auxiliar, que complexa dois Ca²⁺, está destacado dentro do círculo preto; b) Estrutura do complexo com o fragmento Man₄ (PDB ID 1SL4) c) Estrutura do complexo com o fragmento Le^x (PDB ID 1SL5).

É interessante notar que as glicosilações que o DC-SIGN reconhece mantêm-se consideravelmente flexíveis mesmo após a formação do complexo. Em uma estrutura cristalográfica obtida usando um fragmento grande da glicosilação *high-mannose*, contendo seis resíduos de manose, foi possível resolver a densidade eletrônica de apenas três deles. Isso é compatível com valores altos para o fator de temperatura nos resíduos de carboidrato que não estão diretamente ligados ao Ca²⁺ principal em outras estruturas, indicando movimento ou heterogeneidade estrutural nesses pontos da estrutura dos açúcares complexados. A existência de heterogeneidade estrutural é reforçada pela observação, por cristalografia de raios-x, de que é possível haver mais de um modo de interação dos carboidratos no sítio de complexação do DC-SIGN⁷⁸.

1.3.2. MR

O Receptor de Manose (MR, do inglês "*Mannose Receptor*"), também conhecido como CD206, é membro do grupo VI da superfamília CTLD, caracterizado por ter vários CRDs com atividade lectínica dependente de Ca²⁺. Esse receptor é expresso em macrófagos, células dendríticas imaturas e alguns tipos de células endoteliais⁷⁹ e está envolvido na remoção de glicoproteínas endógenas potencialmente danosas da circulação e no reconhecimento, fagocitose e processamento de ligantes destinados ao processo de apresentação de antígenos⁸⁰. Assim como o DC-SIGN, esse receptor endocítico também passa por reciclagem, isto é, ao se envolver no processo de endocitose ele perde afinidade por seu ligante em pH ácido e retorna para a membrana celular, onde volta a reconhecer seus ligantes⁸¹.

Foi demonstrado que o MR é essencial para a infecção produtiva de macrófagos pelo vírus da Dengue e que a interação entre o receptor e o vírus da Dengue ocorre através das glicosilações do envelope viral. Células 3T3, que não expressam MR e não são infectadas pelo vírus da dengue, tornam-se suscetíveis à infecção após serem transfectadas com o gene do MR humano. Além disso, anticorpos anti-MR diminuem a produção de vírus e o número de macrófagos infectados em aproximadamente 80%³⁰. Ligantes com alta afinidade especificamente pelo MR tem sido buscados para fazer a entrega de moléculas diretamente para células apresentadoras de antígeno a fim de desenvolver vacinas mais eficientes e seguras⁸², entrega de fármacos a células específicas⁸³ e realização de exames de imagem⁸⁴.

O receptor completo é formado por um domínio rico em cisteínas, um domínio de fibronectina tipo II, oito CTLDs em sequência, uma hélice transmembrana e uma região intracelular para sinalização (Fig. 7a). Através de ensaios de ligação a açúcares usando formas truncadas do receptor foi determinado que os CTLDs 1–3 tem afinidade baixa por carboidratos e que os CTLDs 4–8 são necessários e suficientes para a atividade lectínica. Dentro desse fragmento, CTLD 4 é o único domínio que tem afinidade relevante por monossacarídeos de Manose, Fucose, N-Acetil Glucosamina e Glucose quando isolado dos demais. Embora o CTLD 4 isolado tenha qualitativamente a mesma afinidade por carboidratos do que o receptor inteiro, a presença dos CTLDs 5 e 7 são necessárias para atingir a alta afinidade do receptor completo, provavelmente porque estabelecem interações adicionais com os ligantes multivalentes e porque orientam os domínios da forma correta⁸⁵.

De forma geral o mecanismo de complexação de carboidratos no CTLD 4 do MR é similar ao observado para o DC-SIGN. A atividade lectínica é dependente de Ca²⁺ e do pH em ambos porque resíduos ao redor do Ca²⁺ principal participam da interação com os açúcares, incluindo coordenação direta do Ca²⁺ pelas hidroxilas do carboidrato⁸⁶. Em pH ácido, como das vesículas para onde o receptor vai junto com seus ligantes, há perda de afinidade pelo Ca²⁺ devido a protonação de resíduos ácidos que o complexam. Isso causa perda da afinidade pelo ligante e uma mudança conformacional na qual o CTLD 4, inicialmente ativo e resistente à ação de proteases na presença de Ca2+, torna-se inativo e é lisado por proteases em pH ácido. Apesar de evidências indiretas de que o CTLD 4 do MR complexe dois Ca²⁺, alinhamentos de sequência indicam que os sítios de complexação de Ca²⁺ auxiliares presentes em outros membros da família estão ausentes no MR⁸⁷. A localização de um possível sítio auxiliar de Ca²⁺ no MR foi avaliada através de mutagênese e de um modelo estrutural construído com base numa proteína com 28% de identidade, a MBP-A (do inglês "Mannose Binding Protein-A") de rato. No entanto, foi concluído que, caso o MR realmente ligue dois Ca²⁺, o sítio através do qual no cátion adicional é complexo é único dentro da família⁸⁸.

A estrutura 3D do CTLD 4, que corresponde aos resíduos 626–768 da proteína completa, foi determinada por cristalografia de raios-X (PDB IDs 1EGG e 1EGI). Apesar de estas estruturas cristalográficas terem dado uma importante contribuição para o entendimento conformacional das CTLs, há um inconveniente importante: Ocorreu troca de domínios (do inglês, "domain swap") entre membros de duas unidades assimétricas diferentes no cristal. Especificamente, os resíduos 708-728 da proteína em uma unidade assimétrica se projetam para longe do centro da estrutura e participam da composição do domínio de seu vizinho de simetria (Fig. 7b). Embora esse fenômeno seja biologicamente relevante para o mecanismo de ação de algumas proteínas⁸⁹, trata-se de um artefato induzido pelas condições de cristalização uma vez que o CTLD 4 do MR é monomérico em solução. Sua estrutura geral, incluindo o sítio de complexação do Ca²⁺ principal, é muito similar a outras CTL como DC-SIGN. Os resíduos que complexam o Ca²⁺ principal são Glu-725, Asn-727, Asn-728, Asn-747 e Asp-748. O possível sítio de complexação do Ca²⁺ auxiliar, predito com base em evidências indiretas, não foi observado. No entanto, sua ausência nas estruturas cristalográficas não exclui totalmente a possibilidade de sua existência uma vez que a troca de domínios pode ter afetado a organização da região onde ele estaria⁹⁰. Recentemente estruturas cristalográficas dos quatro domínios N-terminais do MR, a saber o domínio rico em cisteínas, fibranectina tipo II e CTLDs 1–2, mostrou que o CTLD-1 não complexa Ca²⁺ e que o CTLD-2 complexa apenas o Ca²⁺ principal⁹¹.





Figura 7: a) Representação esquemática da estrutura completa do MR. Adaptado da referência 79. **b)** Estrutura cristalográfica do CTLD-4 do MR no qual aconteceu troca de domínios entre unidades assimétricas vizinhas no cristal, que estão representados em cores diferentes. Figura adaptada da referência 90.

1.3.3. CLEC5A

O receptor CLEC5A (do inglês "*C-type LECtin domain family 5 member A*"), também conhecido como MDL-1 (do inglês, "*Myeloid DAP12-associated Lectin-1*"), é membro do grupo V da superfamília CTLD, caracterizado por ter um domínio do tipo CTLD que não tem atividade lectínica e não liga Ca²⁺. Esse receptor é expresso em várias populações de células do sistema imune, como células dendríticas imaturas, macrófagos e neutrófilos. Ao interagir com seus ligantes, como o vírus da Dengue, o receptor CLEC5A inicia cascatas de sinalização intracelular através de sua interação com a proteína adaptadora DAP12 (do inglês, "*DNAX-Activating Protein of 12 kDa*") que resultam na produção de citocinas que amplificam a resposta imune⁹².

Foi demonstrado que CLEC5A interage com o vírus da Dengue, aumentando a adesão de vírus a células 293T transfectadas com o gene do receptor. Manana, um polímero grande e heterogêneo composto por Manose, e o monossacarídeo Fucose diminuem a adesão do vírus a essas células em até 50%. Ao contrário do DC-SIGN e MR, a interação CLEC5Avírus não induz endocitose e infecção, mas sim a ativação de cascatas de sinalização intracelular, iniciadas pela fosforilação de DAP12, que resultam na liberação de citocinas próinflamatórias. Em macrófagos, tanto o silenciamento do gene que codifica o receptor CLEC5A quanto o uso de anticorpos anti-CLEC5A diminuem a fosforilação de DAP12 e liberação de citocinas pró-inflamatórias sem causar impacto na replicação viral ou quantidade de células infectadas. Uma característica interessante da inibição do CLEC5A é que secreção de Interferon- α , uma citocina que estimula a resposta imune contra vírus, não é afetada. *In* vivo, esses anticorpos diminuem o extravasamento de líquido e hemorragia causados pela infecção do vírus da Dengue em camundongos imunocomprometidos. Enquanto 100% desses camundongos imunocomprometidos morrem 14 dias após a infecção se não forem tratados, o uso de anti-CLEC5A leva a uma taxa de sobrevivência de 50% e permite a eliminação total do vírus da circulação em 23 dias⁹³. Apesar do reconhecimento do potencial terapêutico da inibição do CLEC5A para alívio dos sintomas de Dengue severa^{94,95} e de complicações de outras infecções como pelos vírus Influenza⁹⁶ e Vírus da Encefalite Japonesa⁹⁷, ainda não tentativas publicadas de encontrar pequenas moléculas que possam ser usadas como inibidores.

A despeito das importantes consequências da interação entre CLEC5A e o vírus da Dengue, a afinidade entre eles é baixa⁹⁸. Recentemente foi proposto que o CLEC5A interage com vírus previamente aderidos à célula através de receptores de alta afinidade, como MR e DC-SIGN. Nesse contexto, foi demonstrado que o bloqueio da interação entre o vírus e MR ou DC-SIGN é suficiente para inibir a amplificação da resposta imune iniciada pelo CLEC5A⁹⁹. Além disso, não se conhece o mecanismo da interação entre CLEC5A e o

16

vírus da Dengue; apesar de evidências indicando que o reconhecimento se daria através das glicosilações do envelope, não foi detectada afinidade da CLEC5A por nenhum carboidrato de dois painéis contendo representantes de glicosilações comuns na natureza, incluindo as presentes no vírus da Dengue¹⁰⁰.

O receptor completo tem uma sequência curta de resíduos, uma hélice transmembrana, um domínio *linker* e o domínio CTLD (Fig. 8a), cuja estrutura 3D foi resolvida por cristalografia de raios-X (PDB ID 2YHF). Na superfície celular o CLEC5A forma homodímeros independentemente da presença de DAP12 e há evidências de que a dimerização ocorra pelo domínio *linker* possivelmente através de formação de pontes dissulfeto entre duas cadeias. A estrutura do seu CTLD segue o *fold* conservado da superfamília (Fig. 8b), sendo que as maiores diferenças entre CLEC5A e os receptores DC-SIGN e MR estão, conforme esperado, concentradas na região que está envolvida com complexação de Ca²⁺ e carboidratos nos outros receptores. Tal região, chamada de *"loop* maior" na família CTLD, é mais curta no CLEC5A: contém 12 resíduos, entre 149 e 160, em comparação com 20 no DC-SIGN, entre 336 e 355. Dois resíduos ácidos do sítio de complexação de Ca²⁺ conservado na família são hidrofóbicos no CLEC5A, explicando a sua falta de afinidade por esse cátion. Além disso, enquanto não há interações via cadeia principal entre o *loop* maior e o restante da estrutura no DC-SIGN, no CLEC5A dois resíduos estão envolvidos na formação de folha β com o núcleo da estrutura¹⁰⁰.



Figura 8: a) Representação esquemática da estrutura completa do CLEC5A. Seu CLTD está mostrado em vermelho, o domínio linker como uma linha e sua hélice transmembrana está em roxo. A interação com DAP12 ocorre dentro da membrana. Figura adaptada da referência 100.
b) Estrutura cristalográfica do seu CTLD (PDB ID 2YHF).

1.4. Modelagem molecular

Uma grande variedade de métodos computacionais pode ser classificado como modelagem molecular. A seguir descrevemos aqueles que foram aplicados ao longo desta tese.

1.4.1. Docking e Virtual Screening

Docking, ou docagem molecular, é um método que tem como objetivo determinar a melhor forma através da qual um complexo receptor–ligante pode se formar a partir das estruturas do receptor e do ligante isolados. Apesar da grande variedade de algoritmos e programas disponíveis, a base do método é a geração de complexos candidatos que obedecem restrições estéricas. Isso é feito através de algoritmos de busca que variam a conformação do ligante e a atribuição de um valor de *score* a cada uma dessas "poses" — nome dado às estruturas geradas via *docking*. Ao fim da busca uma seleção de poses representativas com bons valores de *score* e modos de interação diversos são reportados através de análise estatística¹⁰¹.

Idealmente, os valores de *score* teriam alta correlação com a afinidade observada experimentalmente e conseguem diferenciar claramente ligantes que tem alta afinidade pelo receptor daqueles que tem baixa afinidade. No entanto, enquanto os algoritmos usados atualmente conseguem gerar poses que reproduzem bem resultados experimentais, as funções de *score* ainda são um fator limitante, sendo comum a ausência de correlação entre *score* e afinidade experimental ou a presença de resultados falsos-positivos, ou seja, bons valores de *score* serem atribuídos a poses diferentes do que seria experimentalmente observado ou poses de ligantes que não tem afinidade pelo receptor serem reportadas como tendo bons valores de *score*¹⁰².

Quando o *docking* é usado de forma massiva através de bibliotecas que contém milhares ou até milhões de estruturas de moléculas candidatas a ligantes, o método passa a ser chamado de *virtual screening* ou triagem virtual. Embora sofra das mesmas limitações do *docking* em relação à função de *score* usada, atualmente a triagem virtual é ferramenta corriqueira na academia e na indústria nas etapas iniciais de iniciativas de descoberta ou desenho de fármacos¹⁰³. É considerado uma forma rápida e barata de reduzir o número de moléculas a serem testadas experimentalmente de milhões para centenas ou até dezenas¹⁰⁴.

1.4.2. Simulações de dinâmica molecular

Um dos métodos mais versáteis dentro da modelagem molecular é a simulação de dinâmica molecular, que essencialmente requer três ingredientes para obter seu resultado final: *i*) estrutura 3D da macromolécula de interesse, geralmente obtida por cristalografia de raios-X ou ressonância magnética nuclear; *ii*) campo de forças, constituído por um conjunto de equações e parâmetros previamente calibrados para reproduzir alguma referência como dados experimentais ou cálculos quânticos; *iii*) instruções específicas de simulação e análise, que detalham quais procedimentos o programa de simulação deve executar, quais condições físico-químicas considerar e qual tipo de informação extrair dos resultados brutos, chamados de trajetória¹⁰⁵.

Dessa forma, torna-se possível usar a estrutura inicial para resolver as equações do movimento de Newton iterativamente segundo as energias calculadas pelo campo de forças para descrever a evolução conformacional da macromolécula a partir de seus movimentos em escala atômica frente a diferentes condições ou estímulos. Simulações de dinâmica molecular foram usadas para, por exemplo, identificar mecanismos alostéricos em proteínas¹⁰⁶, verificar alterações conformacionais induzidas por ligantes¹⁰⁷, avaliar efeitos do *crowding* macromolecular¹⁰⁸, investigar propriedades mecânicas e dinâmicas de vírus inteiros¹⁰⁹, caracterizar mecanismos de interação receptor–ligante¹¹⁰ e descrever o funcionamento de canais transmembrana na presença da bicamada lipídica¹¹¹. Simulações de dinâmica molecular também são usadas em conjunto com outras técnicas de modelagem para, por exemplo, refinamento de modelos 3D obtidos por algoritmos de predição de estrutura¹¹² e refinamento de poses *docking*¹¹³.

O cerne do método de simulação de dinâmica molecular, que é exposto a seguir, tem-se mostrado robusto apesar de constantes inovações nos modelos e algoritmos disponíveis^{114,115}: Um volume de simulação é definido ao redor da estrutura 3D inicial do soluto, ao qual são adicionadas moléculas de água para considerar os efeitos do solvente e íons em quantidade suficiente para neutralizar as cargas do soluto e atingir a força iônica desejada. A partir daí é possível alimentar as equações do campo de forças escolhido com as coordenadas iniciais de cada átomo que compõe o sistema para calcular a energia potencial de cada um deles. De forma geral, a energia potencial total do sistema, U, é a soma das contribuições covalentes e não-covalentes (Eq. 1). Tradicionalmente, enquanto a contribuição covalente é constituída pela energia devido ao estiramento de ligações covalentes, dobramento de ângulos planares e torção de ângulos diedros (Eq. 2), a contribuição não-covalente é a soma das interações eletrostática e de dispersão entre os átomos (Eq. 3).

$$U = U_{covalente} + U_{n\tilde{a}o-covalente}$$
(1)

$$U_{covalente} = U_{ligações} + U_{\hat{a}ngulos} + U_{diedros}$$
(2)

$$U_{n\tilde{a}o-covalente} = U_{eletrostática} + U_{dispersão}$$
(3)

Mais especificamente, a energia potencial proveniente do estiramento de ligações é modelada por um potencial harmônico que descreve como o comprimento de cada ligação, *b*, está deformado em relação ao seu comprimento de repouso, b_0 . A constante de mola k_b fornece a escala energética para tal estiramento (Eq. 4).

$$U_{ligações} = \sum_{ligações} \frac{1}{2} k_b (b - b_0)^2$$
(4)

De forma análoga, o dobramento de ângulos planares é modelado por um potencial harmônico que descreve como cada ângulo planar, θ , está distorcido em relação a seu valor de repouso, θ_0 . A escala energética é dada pela constante de mola k_{θ} (Eq. 5).

$$U_{\hat{a}ngulos} = \sum_{\hat{a}ngulos} \frac{1}{2} k_{\theta} (\theta - \theta_0)^2$$
(5)

Já a torção dos ângulos diedros ϕ é modelada por funções periódicas com diferentes multiplicidades *n* e ângulo de deslocamento de fase ϕ_s . A escala energética é dada pelas constantes k_{ϕ} (Eq. 6).

$$U_{diedros} = \sum_{diedros} \frac{1}{2} k_{\phi} [1 + \cos(n\phi - \phi_s)]$$
(6)

No caso das contribuições não-covalentes, as interações eletrostáticas entre cada par de átomos *i* e *j* é modelada pelo potencial de Coulomb de acordo com a permissividade elétrica do vácuo, ϵ_0 , a carga parcial de cada átomo, q_i e q_j , e a distância entre eles, r_{ij} (Eq. 7). A contribuição das interações de dispersão, presentes mesmo na ausência completa de carga, são modeladas pelo potencial de Lennard-Jones, que tem como parâmetros a energia de interação ϵ entre o par de átomos e a distância na qual a energia de interação σ entre eles é zero. A energia varia em função da distância r_{ij} entre os átomos (Eq. 8).

$$U_{eletrostática} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$
(7)

$$U_{dispersão} = 4 \epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{6} \right]$$
(8)

A partir das equações previamente descritas, que modelam a energia potencial do sistema em função das coordenadas atômicas, a força F_i que atua sobre cada átomo i pode ser calculada como o negativo do gradiente espacial da energia potencial (Eq. 9) e, a

19

partir da força, a aceleração a_i que cada átomo experimenta naquele instante do tempo é calculada (Eq. 10). O último passo do algoritmo básico da dinâmica molecular é atualizar a posição de cada átomo segundo um pequeno intervalo de tempo Δt pré-determinado, que é da escala de femtossegundos, isso é, 10^{-15} segundos. Assim, cada átomo tem sua posição e velocidade atualizadas através das equações do movimento de Newton de acordo com a aceleração que está experimentando no instante atual da simulação. Por fim, após a posição e velocidade de cada átomo ter sido atualizada, o tempo atual da simulação é incrementado Δt (Eq. 11) e o ciclo se fecha; a energia potencial é recalculada com as novas coordenadas e velocidades para dar prosseguimento à construção da trajetória. A simulação termina após um número pré-determinado de passos, usualmente na escala de milhões, e dezenas de simulações podem ser necessárias para que se consiga um único resultado pontual.

$$\vec{F}_i = -\nabla U \tag{9}$$

$$\vec{a}_{i} = \frac{d^{2}\vec{r}_{i}}{dt^{2}} = \frac{\vec{F}_{i}}{m_{i}}$$
(10)

$$t_{atual} = t_{anterior} + \Delta t \tag{11}$$

Apesar do funcionamento básico do algoritmo ser essencialmente o descrito acima, há muitos outros aspectos na implementação dos programas de dinâmica molecular que contribuem para a robustez do método, como controle de temperatura e pressão, otimizações nos cálculos para diminuir o tempo de execução, paralelização para permitir uso simultâneo de grande quantidades de núcleos de processamento e desenvolvimento de modelos mais complexos para melhorar a qualidade dos resultados^{114,115}.

Uma quantidade central para o entendimento do comportamento de uma ampla variedade de sistemas é a diferença de energia livre, ΔG , entre dois estados porque revela a probabilidade de transição entre eles. Ao definirmos o estado final como "complexado" — aquele no qual receptor e ligante interagem formando um complexo— e o estado inicial como "dissociado" —no qual receptor e ligante estão separados e não há interação significativa entre eles— o valor de $\Delta G_{interação}$ reflete a afinidade entre receptor e ligante. Há vários métodos para fazer esse cálculo, que frequentemente é um dos computacionalmente mais custosos entre as aplicações de simulações de dinâmica molecular¹¹⁶. A seguir discutimos alguns desses métodos.

1.4.3. MM/PBSA

O método MM/PBSA (do inglês, "*Molecular Mechanics / Poisson-Boltzmann Surface Area*") usa informações apenas dos estados complexado e dissociado para calcular a diferença de energia livre entre eles. Isso é feito através da soma de duas contribuições energéticas (Eq.12): *i*) interações moleculares entre receptor e ligante e *ii*) diferenças de solvatação entre receptor e ligante complexados e livres (Eq. 13). As contribuições da interação direta entre receptor e ligante são calculadas no vácuo como a diferença de entalpia e de entropia vibracional entre os estados complexado e dissociado de acordo com os modelos de mecânica molecular convencionais (Eq. 14)¹¹⁷.

Por outro lado, as diferenças de energia livre de solvatação para uma dada molécula ou complexo são calculadas como a soma das contribuições da polar, que corresponde às interações eletrostáticas soluto–solvente, e apolar, correspondendo à energia necessária para abrir uma cavidade no solvente e às interações de dispersão soluto–solvente (Eq. 15). Enquanto o termo de solvatação polar é calculado resolvendo-se numericamente e equação de Poisson-Boltzmann para modelar a transição da molécula ou complexo do vácuo, modelado como um meio contínuo cuja constante dielétrica ε é 1, para a água, modelado como um solvente contínuo com ε =80 (Eq.16). O termo apolar é calculado como uma relação linear empírica com a área de superfície acessível ao solvente, *A*, através do termo de tensão superficial γ e um termo de correção *c* (Eq. 17)¹¹⁸. A relação entre todos os termos e $\Delta G_{interação}$ pode ser visualizada através de um ciclo termodinâmico (Fig. 9).

$$\Delta G_{interação} = \Delta G_{interação}^{vácuo} + \Delta G_{solvatação}$$
(12)

$$\Delta G_{solvatação} = \Delta G_{solvatação}^{complexo} - \left(\Delta G_{solvatação}^{receptor} + \Delta G_{solvatação}^{ligante} \right)$$
(13)

$$\Delta G_{interação}^{vácuo} = \Delta H^{vácuo} - T \Delta S_{vibracional}^{vácuo}$$
(14)

$$\Delta G_{solvatação} = \Delta G_{solvatação}^{polar} + \Delta G_{solvatação}^{apolar}$$
(15)

$$\Delta G_{solvatacão}^{polar} = \left(G_{\epsilon=80} - G_{\epsilon=1} \right) \tag{16}$$

$$\Delta G_{solvatacão}^{apolar} = \gamma A_{exposta} + c \tag{17}$$



Figura 9: Ciclo termodinâmico esquemático para o método MM/PBSA. O solvente está representado pelo fundo azul e o vácuo pelo fundo preto. Figura adaptada de "*AMBER Advanced Tutorials – Tutorial 3*".

Trajetórias obtidas por simulações de dinâmica molecular podem ser pósprocessadas usando o método MM/PBSA. Isso permite o cálculo de diferenças de energia livre de interação a partir de uma amostragem conformacional detalhada, melhorando a convergência e qualidade dos resultados. Devido a limitações do método MM/PBSA —como não considerar o efeito da participação de moléculas de água como pontes para interações receptor–ligante e complicações na escolha ou interpretação de parâmetros devido ao uso misto de modelagem molecular e eletrostática contínua— os valores de energia livre calculados geralmente não são absolutos, isto é, não podem ser comparados diretamente com as afinidades receptor–ligante observadas experimentalmente¹¹⁹. Mesmo assim, a combinação de simulações de dinâmica molecular e MM/PBSA tem sido aplicada com sucesso a casos de desenho e descoberta de fármacos devido a sua versatilidade, precisão e custo computacional relativamente baixo para calcular valores de $\Delta G_{interação}$ relativos, isso é, que indicam corretamente a ordem de afinidade de uma série de ligantes por um receptor¹²⁰ e que descrevem a contribuição de cada resíduo do receptor para a afinidade por seus ligantes¹²¹.

1.4.4. Força de Ruptura

Simulações de dinâmica molecular dirigidas (do inglês, "Steered Molecular Dynamics") fora do equilíbrio podem ser usadas para definir uma mola virtual, isso é, um potencial harmônico, que conecta o receptor e o ligante e cujo comprimento de repouso aumenta durante a simulação a uma taxa constante. Conforme o comprimento de equilíbrio da mola aumenta ele torna-se maior do que a distância de equilíbrio entre receptor e ligante. Isso leva ao acúmulo de força na mola até o ponto em que as interações moleculares são rompidas. A força de ruptura, definida como a força máxima que a mola impõe sobre o complexo durante a simulação dirigida (Fig. 10), tem sido usada recentemente como um estimador de afinidade relativa altamente correlacionado com $\Delta G_{interação}$ experimentalmente observado¹²²⁻¹²⁴.



Figura 10: Força que a mola virtual impõe sobre o sistema receptor—ligante para separá-los durante uma trajetória representativa de simulação de dinâmica molecular dirigida. A força aumenta ao longo to tempo e alcança um máximo, que é a força de ruptura, antes de romper as interações receptor—ligante.

1.4.5. Igualdade de Jarzynski

Além da força de ruptura, simulações dirigidas permitem que calculemos o trabalho feito pela mola sobre o sistema. No limite de baixa velocidade de *pulling*, ou seja, alongamento da mola lento, tem-se um processo no equilíbrio e o trabalho feito pela mola sobre o sistema é igual a $-\Delta G_{interação}$, onde o sinal negativo está presente porque durante a simulação dirigida estamos indo do estado final, complexado, para o inicial, dissociado. No entanto, tal processo lento demandaria muito tempo de simulação. Em aplicações reais a mola alonga-se rápido demais e o processo ocorre fora do equilíbrio. Como consequência, os valores de trabalho calculados a partir dessas trajetórias podem ser mais negativos do que - $\Delta G_{interação}$ porque há dissipação de energia durante a simulação^{125,126}.

Ao executarmos várias realizações independentes da simulação dirigida que separa receptor e ligante podemos calcular o trabalho feito pela mola em cada uma delas e, assim, construir uma distribuição de trabalho fora do equilíbrio. De acordo com a Igualdade de Jarzynski é possível usar a distribuição de trabalho fora do equilíbrio para obter $\Delta G_{interação}$ de equilíbrio desde que um número suficientemente grande de realizações independentes seja feita ¹²⁷ (Eq.7).

$$e^{-\beta\Delta G} = \langle e^{-\beta W} \rangle \tag{7}$$

Apesar de a validade da Igualdade de Jarzynski já ter sido verificada experimentalmente¹²⁸, ainda há poucas aplicações computacionais para cálculo de $\Delta G_{interação}$ em sistemas de interesse biológico¹²⁹. Isso possivelmente ocorre porque o número de simulações dirigidas independentes que são necessárias para calcular $\Delta G_{interação}$ com acurácia é dependente da velocidade de *pulling*. Dessa forma, o custo computacional para aplicá-la pode

ser proibitivamente alto; foi reportado, por exemplo, que o uso da Igualdade de Jarzynski para calcular o perfil de energia livre de ligantes atravessando uma proteína de canal implica custo computacional 10 vezes maior do que *Umbrella Sampling*, um método já bem estabelecido¹³⁰.

1.4.6. Umbrella Sampling

Outro método que utiliza simulações dirigidas para calcular $\Delta G_{interação}$ é conhecido como *Umbrella Sampling*. Inicialmente são feitas simulações dirigidas para separar o complexo receptor–ligante a fim de construir o "caminho de reação" ao longo de uma "coordenada de reação" espacial, que geralmente é a distância entre receptor e ligante definida de forma específica para cada sistema (Fig. 11, parte superior). A partir daí, pontos ao longo do caminho de reação, que representam o sistema receptor–ligante com diferentes distâncias de separação, são selecionados e amostrados em simulações independentes nas quais potenciais harmônicos são usados para manter a coordenada de reação espacial dentro de uma série de janelas discretas (Fig. 11, parte central), isso é, simulações dirigidas nas quais o comprimento de repouso da mola é constante para cada janela¹³¹. A diferença de energia livre é calculada através do método de análise de histogramas ponderados (WHAM, do inglês "*Weighted Histogram Analysis Method*")¹³², que calcula a distribuição de probabilidade ao longo da coordenada de reação espacial considerando o efeito do potencial harmônio, chamado de potencial influenciador (do inglês, "*biasing potential*"), aplicado para restringir a amostragem às janelas discretas¹³³ (Fig. 11, parte inferior).



Figura 11: Representação esquemática do método Umbrella Sampling. Linha superior:
 Amostragem inicial da coordenada de reação através de simulações dirigidas. Linha central:
 Simulações de amostragem individuais nas quais são aplicados potenciais harmônicos para restringir a amostragem do caminho de reação dentro de cada janela. Linha inferior:
 Histogramas de amostragem com boa sobreposição. Fonte: "GROMACS Tutorial – Umbrella Sampling".

5. CONCLUSÕES

Nossa investigação sobre os mecanismos moleculares do reconhecimento das glicosilações do envelope do vírus da Dengue pelas CTLs expressas nas células do sistema imune teve início com o papel do Ca²⁺ em tal interação. Inicialmente verificamos que é possível identificar os sítios de complexação de Ca²⁺ já conhecidos do DC-SIGN através de simulações de dinâmica molecular nas quais os cátions presentes na sua estrutura cristalográfica foram removidos e há CaCl₂ mantido em solução. A especificidade e adequação dessa metodologia foi validada pela ausência de identificação de sítios de complexação de Ca²⁺ em simulações envolvendo o CLEC5A, que sabidamente não liga cálcio⁹².

A priori lidamos com o fato de que existem resultados conflitantes na literatura a respeito do número de Ca²⁺ que o CTLD-4 do MR complexa. Enquanto alinhamentos de sequência com outras proteínas da família^{87,88} e a estrutura cristalográfica do CTLD-2⁹¹ sugerem que o CTLD-4 complexe apenas o Ca²⁺ principal, há evidências indiretas de que ele possa complexar dois Ca²⁺, sendo um deles no sítio principal e o outro em um sítio auxiliar diferente de todos os outros membros da família^{87,88}. Construímos um modelo do complexo do CTLD-4 do MR e a glicosilação high-mannose com base na sua estrutura cristalográfica sem ligante e que apresenta o artefato de troca de domínios (PDB ID 1EGG). As interações MRmanose que observamos são totalmente consistentes com dados de ressonância magnética nuclear⁸⁸, validando o modelo construído. Além disso, simulações com CaCl₂ na solução identificaram apenas o sítio de complexação principal de Ca²⁺ e não foi possível estabilizar um possível sítio auxiliar a partir de dados da literatura^{87,88} mesmo usando simulações dirigidas e com restrições de posição. Finalmente, a dinâmica conformacional do CTLD-4 do MR complexando um Ca²⁺ foi muito similar ao DC-SIGN complexando três Ca²⁺, sugerindo que esse é o estado saturado de Ca²⁺ de ambas as lectinas. Assim, nosso trabalho fornece evidência extra de que o CTLD-4 do MR complexa apenas um Ca²⁺.

De acordo com nossos resultados, a complexação de Ca²⁺ ao DC-SIGN e MR tem três efeitos: *i*) diminuição da energia potencial do complexo receptor—cátion; *ii*) diminuição local da flexibilidade da proteína nos *loops* que complexam Ca²⁺; e *iii*) estabilização estrutural do sítio de reconhecimento de carboidratos na sua conformação ativa. Assim, este trabalho fornece detalhes a nível molecular que enriquecem a hipótese já existente na literatura de que a complexação de Ca²⁺ às CTLs atua como um mecanismo liga/desliga^{73-75,78,86-88}. Isso é particularmente relevante considerando a atividade endocítica do DC-SIGN e MR e a capacidade de ambos retornarem para a membrana celular após abandonar seus ligantes nas vesículas ácidas, onde a protonação dos resíduos ácidos do sítio principal leva à perda de

conformacional que faz perder afinic

afinidade por Ca²⁺ e, por consequência, alteração conformacional que faz perder afinidade pelo ligante. Quando retorna ao ambiente extracelular, elas podem ligar Ca²⁺ novamente e recuperar sua atividade lectínica.

As diversas simulações e análises executados neste trabalho possibilita-nos propor uma nova hipótese para explicar o papel do Ca²⁺ nas CTLs: É aceito atualmente que o Ca²⁺ principal participa diretamente da interação com açúcar e contribui para a estabilidade do complexo ao ser coordenado pelas hidroxilas do carboidrato^{73-75,78,86-88}. No entanto, as contribuições para a energia livre de interação que calculamos pelo método MM/PBSA sugerem que a interação direta carboidrato–Ca²⁺ é, na verdade, desfavorável à formação do complexo devido à penalidade determinada pela dessolvatação do Ca²⁺ principal. Propomos aqui que sua presença no sítio principal é importante porque, além de estabilizar o sítio de complexação de carboidratos na sua conformação ativa, ele altera as propriedades físicoquímicas desse sítio e faz com que seus resíduos tenham maior afinidade pelo carboidrato. Nossos achados foram reproduzidos para valores de constante dielétrica interna de 1 a 8 para três complexos lectina-carboidrato: DC-SIGN-Man₄, DC-SIGN-Le^x, MR-Man₄, mostrando robusta consistência quantitativa. Além disso, nossa hipótese é suportada por simulações de dinâmica molecular nas quais as moléculas de água são tratadas explicitamente. A análise da densidade local do solvente nessas simulações aponta que a complexação de carboidratos precisa deslocar pelo menos duas moléculas de água que estão firmemente ligadas ao Ca²⁺ por fazerem parte da sua primeira camada de solvatação e, ao mesmo tempo, participarem de redes de ligação de hidrogênio com os resíduos do sítio principal. A penalidade de dessolvatação do Ca²⁺ principal deve, ainda, ser levada em conta para o desenho de potenciais inibidores das CTLs: é desejável desenhar inibidores que não exijam a remoção das moléculas de água de solvatação ou, quando isso não for possível, é preciso garantir que as interações CTL–ligante compensem esse custo de dessolvatação.

Simulações de dinâmica molecular do DC-SIGN e MR em complexo com os fragmentos da glicosilação *high-mannose* Man₅ e Man₉ permitiram a identificação de resíduos específicos que estão envolvidos no reconhecimento desses açúcares através de uma combinação de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio: Phe-313, Glu-344, Glu-347, Glu-358, Ser-360, Asn-362, Asn-365 para DC-SIGN; e His-692, Leu-694, Glu-725, Tyr-729, Glu-737, Glu-733, Asn-747, Ile-749 e His-753 para MR. Nossas simulações revelaram, ainda, que há muitas ligações de hidrogênio transientes entre as lectinas e os carboidratos, isso é, que se formam e se rompem várias vezes. Isso está de acordo com a ideia geral de que carboidratos fazem várias interações de baixa afinidade intrínseca com seus receptores¹⁶⁵. Além disso, os resíduos envolvidos no reconhecimento dos fragmentos Man₅ e Man₉ são diferentes para o DC-SIGN, porém são os mesmos para MR. Isso está de acordo com a já

conhecida capacidade que o DC-SIGN tem de induzir padrões de ativação celular diferentes ao reconhecer as glicosilações *high-mannose* ou *complex-type*^{50,51}. Nossos resultados indicam que a capacidade que o DC-SIGN tem de distinguir padrões de glicosilação é ainda mais profunda do que as diferenças entre *high-mannose* e *complex-type*, sendo capaz de diferenciar diferentes tamanhos da glicosilação *high-mannose*.

Essa capacidade do DC-SIGN foi explorada mais profundamente através do uso combinado de simulações de dinâmica molecular, MM/PBSA, simulações dirigidas para cálculo de força de ruptura, *Umbrella Sampling* e igualdade de Jarzynski para avaliar a afinidade relativa do receptor por todos os possíveis rotâmeros da glicosilação *high-mannose* GlcNAc₂Man₅ completa. Nossos dados fornecem evidências de que o receptor tem a capacidade de diferenciar pelo menos alguns rotâmeros da mesma glicosilação através do reconhecimento através de conjuntos de resíduos diferentes para cada rotâmero. Essa observação sugere que este pode ser a base do mecanismo molecular que explica a capacidade do DC-SIGN induzir respostas celulares específicas que variam entre patógenos⁵⁰⁻⁵². Essa capacidade de diferenciar carboidratos minimamente diferentes pode implicar em diferentes sinais transduzidos para a célula, dando maior plasticidade e especificidade à resposta imune. Por outro lado, o mecanismo de reconhecimento de açúcares robusto mostrado pelo MR é consistente com a ativação celular de forma independente do patógeno detectado.

Exploramos, adicionalmente, um aspecto mais fundamental e metodológico ao aplicar e comparar os métodos *Umbrella Sampling* e igualdade de Jarzynski para estimar a diferença de energia livre de interação lectina–carboidrato. Apesar de ter sido possível obter o mesmo resultado através dos dois métodos, o custo computacional da igualdade de Jarznski foi quase o dobro daquele do *Umbrella Sampling*. Contudo, de acordo com nossa experiência, o custo computacional da igualdade de Jarzynski pode ser menor do que o do *Umbrella Sampling* em sistemas que demoram muito tempo pra atingir o equilíbrio.

Por fim, fizemos ensaios de *virtual screening* usando uma biblioteca de moléculas aprovadas para uso como drogas pelo FDA e um conjunto de programas e *scripts* de implementação própria. Nossa implementação teve como objetivo paralelizar a execução do *software* AutoDock Vina e calcular as métricas de número de ligações de hidrogênio por resíduo e área enterrada por resíduo para cada pose. Demonstramos que, através da combinação dessas métricas, é possível usar o conhecimento sobre o mecanismo de reconhecimento de substratos naturais para filtrar os resultados do *virtual screening*. Isso possibilita a seleção de moléculas promissoras que tenham um mecanismo de interação similar aos substratos naturais em termos dos resíduos do receptor envolvidos na interação. É interessante destacar que todas as melhores moléculas encontradas são carboidratos ou seus análogos. A aplicação futura do mesmo método a outros alvos nos dirá se isso é um artefato

devido ao grande número de doadores e receptores de hidrogênio nessas moléculas ou se, de fato, podemos considerar esse resultado como uma validação de nosso protocolo de filtragem do *virtual screening*. Após refinamento com dinâmica molecular e estimativa da afinidade relativa usando MM/PBSA a molécula Iohexol, um agente de contraste para exames de imagem, foi identificada como a mais promissora para uso contra a infecção do vírus da Dengue por ter alto potencial de interação tanto com o DC-SIGN quanto com o MR. Assim, para continuidade desta investigação a seleção de mais moléculas a partir no nosso ensaio de *virtual screening* e o teste experimental da sua capacidade de inibição de infecção do vírus da Dengue poderá contribuir de forma importante para a descoberta de *leads* contra essa doença.

6. REFERÊNCIAS

1. MESSINA, Jane P. et al. The many projected futures of dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 230, 2015.

2. SELCK, Frederic W.; ADALJA, Amesh A.; BODDIE, Crystal R. An estimate of the global health care and lost productivity costs of dengue. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 11, p. 824-826, 2014.

3. HORSTICK, Olaf; TOZAN, Yesim; WILDER-SMITH, Annelies. Reviewing dengue: still a neglected tropical disease?. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003632, 2015.

4. GUZMAN, Maria G.; HARRIS, Eva. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453-465, 2015.

5. ACHEE, Nicole L. et al. A critical assessment of vector control for dengue prevention. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003655, 2015.

6. DUONG, Veasna et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 47, p. 14688-14693, 2015.

7. MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. 2013.

8. ROTHMAN, Alan L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532, 2011.

9. DEJNIRATTISAI, Wanwisa et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 745-748, 2010.

10. GUZMAN, Maria G.; ALVAREZ, Mayling; HALSTEAD, Scott B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Archives of virology**, v. 158, n. 7, p. 1445-1459, 2013.

11. KWAN, Tsz Ho et al. Assessing the risk of dengue virus transmission in a non-endemic city surrounded by endemic and hyperendemic areas. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 55, p. 99-101, 2017.

12. CAPEDING, Maria Rosario et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1358-1365, 2014.

13. CONSTENLA, Dagna; CLARK, Samantha. Financing dengue vaccine introduction in the Americas: challenges and opportunities. **Expert review of vaccines**, v. 15, n. 4, p. 547-559, 2016.

14. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Updated Questions and Answers related to information presented in the Sanofi Pasteur press release on 30 November 2017 with regards to the dengue vaccine Dengvaxia. Disponível em http://www.who.int/immunization/diseases/ dengue/q_and_a_dengue_vaccine_dengvaxia/en/

15. STIASNY, Karin; HEINZ, Franz X. Flavivirus membrane fusion. Journal of general virology, v. 87, n. 10, p. 2755-2766, 2006.

16. LIM, Siew Pheng et al. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. **Antiviral research**, v. 100, n. 2, p. 500-519, 2013.

17.PERERA, Rushika; KUHN, Richard J. Structural proteomics of dengue virus. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.

18. MODIS, Yorgo et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, p. 6986-6991, 2003.

19. MODIS, Yorgo et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313, 2004.

20. KUHN, Richard J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.

21. LI, Long et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1830-1834, 2008.

22. ZHANG, Xinzheng et al. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 17, p. 6795-6799, 2013.

23. FIBRIANSAH, Guntur et al. Structural changes in dengue virus when exposed to a temperature of 37 C. **Journal of virology**, v. 87, n. 13, p. 7585-7592, 2013.

24. LOK, Shee-Mei et al. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 15, n. 3, p. 312, 2008.

25. YAP, Sally SL et al. Dengue Virus Glycosylation: What Do We Know?. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1415, 2017.

26.DEJNIRATTISAI, Wanwisa et al. Lectin switching during dengue virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 12, p. 1775-1783, 2011.

27. BRYANT, Juliet E. et al. Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated Aedes aegypti mosquitoes. **Virology**, v. 366, n. 2, p. 415-423, 2007.

28. MONDOTTE, Juan A. et al. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. **Journal of virology**, v. 81, n. 13, p. 7136-7148, 2007.

29. TASSANEETRITHEP, Boonrat et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 7, p. 823-829, 2003.

30. MILLER, Joanna L. et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. e17, 2008.

31. IDRIS, Fakhriedzwan; MUHARRAM, Siti Hanna; DIAH, Suwarni. Glycosylation of dengue virus glycoproteins and their interactions with carbohydrate receptors: possible targets for antiviral therapy. **Archives of virology**, v. 161, n. 7, p. 1751-1760, 2016.

32. STANLEY, Pamela et al. Essentials of glycobiology. Varki, A, 2009.

33. KIRSCHNER, Karl N.; WOODS, Robert J. Solvent interactions determine carbohydrate conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10541-10545, 2001.

34. NISHIDA, Yoshihiro et al. 1H NMR Analyses of Rotameric Distribution of C5-C6 bonds of D-Glucopyranoses in Solution. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 239-250, 1988.

35. TVAROŠKA, Igor et al. Quantum mechanical and NMR spectroscopy studies on the conformations of the hydroxymethyl and methoxymethyl groups in aldohexosides. **Carbohydrate research**, v. 337, n. 4, p. 353-367, 2002.

36. TVAROŠKA, Igor; CARVER, Jeremy P. Ab initio molecular orbital calculation of carbohydrate model compounds. 6. The gauche effect and conformations of the hydroxymethyl and methoxymethyl groups. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, n. 15, p. 2992-2999, 1997.

37. MIURA, Nobuaki et al. A theoretical study of α -and β -D-glucopyranose conformations by the density functional theory. **Chemical physics letters**, v. 419, n. 4-6, p. 326-332, 2006.

38. ROCKWELL, Glen D.; GRINDLEY, T. Bruce. Effect of solvation on the rotation of hydroxymethyl groups in carbohydrates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 42, p. 10953-10963, 1998.

39. GUPTA, Ramneek; BRUNAK, Søren. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. In: **Biocomputing 2002**. 2001. p. 310-322.

40. BALAJI, Petety V.; QASBA, Pradman K.; RAO, V. S. R. Molecular dynamics simulations of high-mannose oligosaccharides. **Glycobiology**, v. 4, n. 4, p. 497-515, 1994.

41. YAMAGUCHI, Takumi et al. Exploration of Conformational Spaces of High Mannose Type Oligosaccharides by an NMR Validated Simulation. **Angewandte Chemie**, v. 126, n. 41, p. 11121-11124, 2014.

42. MAHLA, Ranjeet Singh et al. Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 248, 2013.

43. ZIPFEL, Cyril. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 4, p. 414-420, 2009.

44. GABIUS, Hans-Joachim et al. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. **Trends in biochemical sciences**, v. 36, n. 6, p. 298-313, 2011.

45. AMBROSI, Moira; CAMERON, Neil R.; DAVIS, Benjamin G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycocode. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 3, n. 9, p. 1593-1608, 2005.

46. MCGREAL, Eamon P.; MILLER, Joanna L.; GORDON, Siamon. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. **Current opinion in immunology**, v. 17, n. 1, p. 18-24, 2005.

47. GEIJTENBEEK, Teunis BH; GRINGHUIS, Sonja I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 7, p. 465, 2009.

48. OSORIO, Fabiola; E SOUSA, Caetano Reis. Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 651-664, 2011.

49. CAMBI, Alessandra; KOOPMAN, Marjolein; FIGDOR, Carl G. How C type lectins detect pathogens. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 4, p. 481-488, 2005.

50. GARCIA-VALLEJO, Juan J.; VAN KOOYK, Yvette. The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men. **Trends in immunology**, v. 34, n. 10, p. 482-486, 2013.

51. ŠVAJGER, Urban et al. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigenuptake molecule that guides dendritic cells in immunity. **Cellular signalling**, v. 22, n. 10, p. 1397-1405, 2010.

52. VAN KOOYK, Yvette; GEIJTENBEEK, Teunis BH. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 697, 2003.

53. GRINGHUIS, Sonja I. et al. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter pylori. **Nature immunology**, v. 10, n. 10, p. 1081, 2009.

54. GRINGHUIS, Sonja I. et al. Fucose-specific DC-SIGN signalling directs T helper cell type-2 responses via IKKε-and CYLD-dependent Bcl3 activation. **Nature communications**, v. 5, p. 3898, 2014.

55. HSU, Shih-Chang et al. Functional interaction of common allergens and a C-type lectin receptor, dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), on human dendritic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 11, p. 7903-7910, 2010.

56. LOZACH, Pierre-Yves et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23698-23708, 2005.

57. NAVARRO SANCHEZ, Erika et al. Dendritic cell specific ICAM3 grabbing non integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito cell derived dengue viruses. **EMBO reports**, v. 4, n. 7, p. 723-728, 2003.

58. ALEN, Marijke MF et al. Crucial role of the N-glycans on the viral E-envelope glycoprotein in DC-SIGN-mediated dengue virus infection. **Antiviral research**, v. 96, n. 3, p. 280-287, 2012.

59. ALEN, Marijke MF et al. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. **Virology**, v. 387, n. 1, p. 67-75, 2009.

60. ANDERLUH, Marko et al. DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 7, p. 992-1007, 2012.

61. VARGA, Norbert et al. A multivalent inhibitor of the DC-SIGN dependent uptake of HIV-1 and Dengue virus. **Biomaterials**, v. 35, n. 13, p. 4175-4184, 2014.

62. LUCZKOWIAK, Joanna et al. Pseudosaccharide functionalized dendrimers as potent inhibitors of DC-SIGN dependent Ebola pseudotyped viral infection. **Bioconjugate chemistry**, v. 22, n. 7, p. 1354-1365, 2011.

63. GARBER, Kathleen CA et al. A general glycomimetic strategy yields non-carbohydrate inhibitors of DC-SIGN. **Chemical Communications**, v. 46, n. 36, p. 6747-6749, 2010.

64. PROST, Lynne R. et al. Noncarbohydrate glycomimetics and glycoprotein surrogates as DC-SIGN antagonists and agonists. **ACS chemical biology**, v. 7, n. 9, p. 1603-1608, 2012.

65. MANGOLD, Shane L.; PROST, Lynne R.; KIESSLING, Laura L. Quinoxalinone inhibitors of the lectin DC-SIGN. **Chemical science**, v. 3, n. 3, p. 772-777, 2012.

66. BORROK, M. Jack; KIESSLING, Laura L. Non-carbohydrate inhibitors of the lectin DC-SIGN. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 42, p. 12780-12785, 2007.

67. QUAN, D. Yu et al. Autonomous tetramerization domains in the glycan-binding receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. **Journal of molecular biology**, v. 387, n. 5, p. 1075-1080, 2009.

68. DOS SANTOS, Ália et al. Oligomerization domains in the glycan binding receptors DC SIGN and DC SIGNR: Sequence variation and stability differences. **Protein Science**, v. 26, n. 2, p. 306-316, 2017.

69. MENON, Sindhu et al. Binding-site geometry and flexibility in DC-SIGN demonstrated with surface force measurements. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 28, p. 11524-11529, 2009.

70. POKIDYSHEVA, Elena et al. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 485-493, 2006.

71. FEINBERG, Hadar et al. Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 2, p. 1327-1335, 2005.

72. TABARANI, Georges et al. DC-SIGN neck domain is a pH-sensor controlling oligomerization SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 32, p. 21229-21240, 2009.

73. FEINBERG, Hadar et al. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. **Science**, v. 294, n. 5549, p. 2163-2166, 2001.

74. MITCHELL, Daniel A.; FADDEN, Andrew J.; DRICKAMER, Kurt. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR subunit organization and binding to multivalent ligands. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p. 28939-28945, 2001.

75. GUO, Yuan et al. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 11, n. 7, p. 591, 2004.

76. THÉPAUT, Michel et al. Structure of a glycomimetic ligand in the carbohydrate recognition domain of C-type lectin DC-SIGN. Structural requirements for selectivity and ligand design. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 7, p. 2518-2529, 2013.

77. SUTKEVICIUTE, Ieva et al. Unique DC-SIGN clustering activity of a small glycomimetic: a lesson for ligand design. **ACS chemical biology**, v. 9, n. 6, p. 1377-1385, 2014.

78. FEINBERG, Hadar et al. Multiple modes of binding enhance the affinity of DC-SIGN for high mannose N-linked glycans found on viral glycoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 6, p. 4202-4209, 2007.

79. EAST, Lucy; ISACKE, Clare M. The mannose receptor family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1572, n. 2-3, p. 364-386, 2002.

80. TAYLOR, Philip R.; GORDON, Siamon; MARTINEZ-POMARES, Luisa. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. **Trends in immunology**, v. 26, n. 2, p. 104-110, 2005.

81. ENGERING, Anneke J. et al. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. **European journal of immunology**, v. 27, n. 9, p. 2417-2425, 1997.

82. HE, Li-Zhen et al. Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 10, p. 6259-6267, 2007.

83. AZAD, Abul K.; RAJARAM, Murugesan VS; SCHLESINGER, Larry S. Exploitation of the macrophage mannose receptor (CD206) in infectious disease diagnostics and therapeutics. **Journal of cytology & molecular biology**, v. 1, n. 1, 2014.

84. AZAD, Abul K.; SCHLESINGER, Larry S. Mannose receptor (CD206)-mediated imaging in sentinel lymph node localization. **Clinical and Translational Imaging**, v. 3, n. 3, p. 237-245, 2015.

85. TAYLOR, Maureen E.; BEZOUSKA, K.; DRICKAMER, K. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 1719-1726, 1992.

86. HITCHEN, Paul G.; MULLIN, Nicholas P.; TAYLOR, Maureen E. Orientation of sugars bound to the principal C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. **Biochemical Journal**, v. 333, n. 3, p. 601-608, 1998.

87. MULLIN, Nicholas Paul; HALL, Kersten T.; TAYLOR, Maureen E. Characterization of ligand binding to a carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 45, p. 28405-28413, 1994.

88. MULLIN, Nicholas P.; HITCHEN, Paul G.; TAYLOR, Maureen E. Mechanism of Ca2+ and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 9, p. 5668-5681, 1997.

89. LIU, Yanshun; EISENBERG, David. 3D domain swapping: as domains continue to swap. **Protein science**, v. 11, n. 6, p. 1285-1299, 2002.

90. FEINBERG, Hadar et al. Structure of a C-type carbohydrate recognition domain from the macrophage mannose receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 28, p. 21539-21548, 2000.

91. HU, Zhenzheng et al. Structural Insights into the pH-Dependent Conformational Change and Collagen Recognition of the Human Mannose Receptor. **Structure**, v. 26, n. 1, p. 60-71. e3, 2018.

92. CHEUNG, Ricky et al. Activation of MDL-1 (CLEC5A) on immature myeloid cells triggers lethal shock in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 11, 2011.

93. CHEN, Szu-Ting et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. **Nature**, v. 453, n. 7195, p. 672, 2008.

94. WU, Ming-Fang et al. CLEC5A is critical for dengue virus–induced inflammasome activation in human macrophages. **Blood**, v. 121, n. 1, p. 95-106, 2013.

95. HUANG, Ya-Lang et al. CLEC5A is critical for dengue virus-induced osteoclast activation and bone homeostasis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 94, n. 9, p. 1025-1037, 2016.

96. TENG, Ooiean et al. CLEC5A-mediated enhancement of the inflammatory response in myeloid cells contributes to influenza virus pathogenicity in vivo. **Journal of virology**, v. 91, n. 1, p. e01813-16, 2017.

97. CHEN, Szu-Ting et al. CLEC5A regulates Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002655, 2012.

98. TUNG, Yen-Ting et al. Nanostructured electrochemical biosensor for th0065 detection of the weak binding between the dengue virus and the CLEC5A receptor. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 6, p. 1335-1341, 2014.

99. LO, Yen-Lung et al. Dengue virus infection is through a cooperative interaction between a mannose receptor and CLEC5A on macrophage as a multivalent hetero-complex. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0166474, 2016.

100. WATSON, Aleksandra A. et al. Structural flexibility of the macrophage dengue virus receptor CLEC5A implications for ligand binding and signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 27, p. 24208-24218, 2011.

101. TAYLOR, Richard D.; JEWSBURY, Philip J.; ESSEX, Jonathan W. A review of proteinsmall molecule docking methods. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 16, n. 3, p. 151-166, 2002.

102. WARREN, Gregory L. et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 20, p. 5912-5931, 2006.

103. CHENG, Tiejun et al. Structure-based virtual screening for drug discovery: a problemcentric review. **The AAPS journal**, v. 14, n. 1, p. 133-141, 2012.

104. SHOICHET, Brian K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862, 2004.

105. HERTIG, Samuel; LATORRACA, Naomi R.; DROR, Ron O. Revealing atomic-level mechanisms of protein allostery with molecular dynamics simulations. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 6, p. e1004746, 2016.

106. CHIAPPORI, Federica et al. Molecular mechanism of allosteric communication in Hsp70 revealed by molecular dynamics simulations. **PLoS computational biology**, v. 8, n. 12, p. e1002844, 2012.

107. GAO, Cen; DESAPHY, Jeremy; VIETH, Michal. Are induced fit protein conformational changes caused by ligand binding predictable? A molecular dynamics investigation. **Journal of computational chemistry**, v. 38, n. 15, p. 1229-1237, 2017.

108. FEIG, Michael et al. Crowding in Cellular Environments at an Atomistic Level from Computer Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 34, p. 8009-8025, 2017.

109. FREDDOLINO, Peter L. et al. Molecular dynamics simulations of the complete satellite tobacco mosaic virus. **Structure**, v. 14, n. 3, p. 437-449, 2006.

110. MORTIER, Jérémie et al. The impact of molecular dynamics on drug design: applications for the characterization of ligand–macromolecule complexes. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 6, p. 686-702, 2015.

111. KOLDSØ, Heidi et al. Permeation, Gating, and Modulation of the TRPA1 Channel in Long-Timescale Molecular Dynamics Simulations. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 3, p. 466a, 2017.

112. RAVAL, Alpan et al. Refinement of protein structure homology models via long, all atom molecular dynamics simulations. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 80, n. 8, p. 2071-2079, 2012.

113. OKIMOTO, Noriaki et al. High-performance drug discovery: computational screening by combining docking and molecular dynamics simulations. **PLoS computational biology**, v. 5, n. 10, p. e1000528, 2009.

114. ADCOCK, Stewart A.; MCCAMMON, J. Andrew. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chemical reviews**, v. 106, n. 5, p. 1589-1615, 2006.

115. SALOMON FERRER, Romelia; CASE, David A.; WALKER, Ross C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 3, n. 2, p. 198-210, 2013.

116. PEREZ, Alberto et al. Advances in free-energy-based simulations of protein folding and ligand binding. **Current opinion in structural biology**, v. 36, p. 25-31, 2016.

117. GENHEDEN, Samuel; RYDE, Ulf. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert opinion on drug discovery**, v. 10, n. 5, p. 449-461, 2015.

118. MASSOVA, Irina; KOLLMAN, Peter A. Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding. **Perspectives in drug discovery and design**, v. 18, n. 1, p. 113-135, 2000.

119. HOU, Tingjun et al. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. **Journal of chemical information and modeling**, v. 51, n. 1, p. 69-82, 2010.

120. KUHN, Bernd et al. Validation and use of the MM-PBSA approach for drug discovery. **Journal of medicinal chemistry**, v. 48, n. 12, p. 4040-4048, 2005.

121. HOU, Tingjun; YU, Ron. Molecular dynamics and free energy studies on the wild-type and double mutant HIV-1 protease complexed with amprenavir and two amprenavir-related inhibitors: mechanism for binding and drug resistance. **Journal of medicinal chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1177-1188, 2007.

122. TAM, Nguyen Minh; NGUYEN, Minh Tho; NGO, Son Tung. Evaluation of the absolute affinity of neuraminidase inhibitor using steered molecular dynamics simulations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 77, p. 137-142, 2017.

123. MAI, Binh Khanh; LI, Mai Suan. Neuraminidase inhibitor R-125489–a promising drug for treating influenza virus: steered molecular dynamics approach. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 410, n. 3, p. 688-691, 2011.

124. THAI, Nguyen Quoc et al. Screening potential inhibitors for cancer target LSD1 from natural products by steered molecular dynamics. **Molecular Simulation**, v. 44, n. 4, p. 335-342, 2018.

125. HUMMER, Gerhard; SZABO, Attila. Free energy reconstruction from nonequilibrium single-molecule pulling experiments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 7, p. 3658-3661, 2001.

126. PARK, Sanghyun et al. Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. **The Journal of chemical physics**, v. 119, n. 6, p. 3559-3566, 2003.

127. JARZYNSKI, Christopher. Nonequilibrium equality for free energy differences. **Physical Review Letters**, v. 78, n. 14, p. 2690, 1997.

128. COLLIN, Delphine et al. Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies. **Nature**, v. 437, n. 7056, p. 231, 2005.

129. XIONG, Hui et al. Free energy calculations with non-equilibrium methods: applications of the Jarzynski relationship. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 116, n. 1-3, p. 338-346, 2006.

130. BAŞTUĞ, Turgut et al. Potential of mean force calculations of ligand binding to ion channels from Jarzynski's equality and umbrella sampling. **The Journal of chemical physics**, v. 128, n. 15, p. 04B614, 2008.

131. SOUAILLE, Marc; ROUX, Benoît. Extension to the weighted histogram analysis method: combining umbrella sampling with free energy calculations. **Computer physics communications**, v. 135, n. 1, p. 40-57, 2001.

132. KUMAR, Shankar et al. The weighted histogram analysis method for free energy calculations on biomolecules. I. The method. **Journal of computational chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1011-1021, 1992.

133. ZHANG, Haiyang et al. Cooperative binding of cyclodextrin dimers to isoflavone analogues elucidated by free energy calculations. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 13, p. 7163-7173, 2014.

134. WEIS, William I. et al. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. **Science**, v. 254, n. 5038, p. 1608-1615, 1991.

135. PEARLMAN, David A. et al. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1-3, p. 1-41, 1995.

136. ROCHA, Gerd B. et al. Rm1: A reparameterization of am1 for h, c, n, o, p, s, f, cl, br, and i. **Journal of computational chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1101-1111, 2006.

137. STEWART, James JP. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 4, n. 1, p. 1-103, 1990.

138. VAN DER SPOEL, David et al. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005.

139. BERENDSEN, Herman JC; VAN DER SPOEL, David; VAN DRUNEN, Rudi. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1-3, p. 43-56, 1995.

140. LINDORFF LARSEN, Kresten et al. Improved side chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 8, p. 1950-1958, 2010.

141. KIRSCHNER, Karl N. et al. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. Carbohydrates. **Journal of computational chemistry**, v. 29, n. 4, p. 622-655, 2008.

142. WANG, Junmei et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157-1174, 2004.

143. MARK, Pekka; NILSSON, Lennart. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 43, p. 9954-9960, 2001.

144. HESS, Berk et al. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of computational chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.

145. MIYAMOTO, Shuichi; KOLLMAN, Peter A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of computational chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952-962, 1992.

146. DARDEN, Tom; YORK, Darrin; PEDERSEN, Lee. Particle mesh Ewald: An N \cdot log (N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of chemical physics**, v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993.

147. BUSSI, Giovanni; DONADIO, Davide; PARRINELLO, Michele. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of chemical physics**, v. 126, n. 1, p. 014101, 2007.

148. BERENDSEN, Herman JC et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of chemical physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984.

149. NOSÉ, SH [Ubar] ICHI. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. **Molecular Physics**, v. 100, n. 1, p. 191-198, 2002.

150. HOOVER, William G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. **Physical review A**, v. 31, n. 3, p. 1695, 1985.

151. PARRINELLO, Michele; RAHMAN, Aneesur. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied physics**, v. 52, n. 12, p. 7182-7190, 1981.

152. MILLER III, Bill R. et al. MMPBSA. py: an efficient program for end-state free energy calculations. **Journal of chemical theory and computation**, v. 8, n. 9, p. 3314-3321, 2012.

153. GOHLKE, Holger et al. Rigidity theory-based approximation of vibrational entropy changes upon binding to biomolecules. **Journal of chemical theory and computation**, v. 13, n. 4, p. 1495-1502, 2017.

154. PAN, Dabo et al. Computational study on the drug resistance mechanism of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase mutants to BMS-791325 by molecular dynamics simulation and binding free energy calculations. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 154, p. 185-193, 2016.

155. KUMARI, Rashmi et al. g_mmpbsa—A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. Journal of chemical information and modeling, v. 54, n. 7, p. 1951-1962, 2014.

156. TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

157. IRWIN, John J.; SHOICHET, Brian K. ZINC– a free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of chemical information and modeling**, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2005.

158. HUB, Jochen S.; DE GROOT, Bert L.; VAN DER SPOEL, David. g_wham—A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 12, p. 3713-3720, 2010.

159. WURZBURG, Beth A.; TARCHEVSKAYA, Svetlana S.; JARDETZKY, Theodore S. Structural changes in the lectin domain of CD23, the low-affinity IgE receptor, upon calcium binding. **Structure**, v. 14, n. 6, p. 1049-1058, 2006.

160. HAMELBERG, Donald; MCCAMMON, J. Andrew. Standard free energy of releasing a localized water molecule from the binding pockets of proteins: double-decoupling method. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 24, p. 7683-7689, 2004.

161. LI, Zheng; LAZARIDIS, Themis. Thermodynamic contributions of the ordered water molecule in HIV-1 protease. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 22, p. 6636-6637, 2003.

162. BARILLARI, Caterina et al. Classification of water molecules in protein binding sites. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 9, p. 2577-2587, 2007.

163. MICHEL, Julien; TIRADO-RIVES, Julian; JORGENSEN, William L. Energetics of displacing water molecules from protein binding sites: consequences for ligand optimization. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 42, p. 15403-15411, 2009.

164. GRAVES, Alan P. et al. A Perspective on Water Site Prediction Methods for Structure Based Drug Design. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 17, n. 23, p. 2599-2616, 2017.

165. COLLINS, Brian E.; PAULSON, James C. Cell surface biology mediated by low affinity multivalent protein–glycan interactions. **Current opinion in chemical biology**, v. 8, n. 6, p. 617-625, 2004.

166. ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 673, 2004.