

PPGBRPH
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

IPTSP
INSTITUTO DE PATOLOGIA
TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO
PARASITO – HOSPEDEIRO**

MIKE TELEMACO CONTRERAS COLMENARES

**Análise *in silico* do papel do receptor imune TREM-1 na infecção
pelos Norovírus murino e humano**

Goiânia

2024



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

MIKE TELEMACO CONTRERAS COLMENARES

3. Título do trabalho

Análise *in silico* do papel do receptor imune TREM-1 na infecção pelos Norovírus murino e humano

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Helioswilton Sales De Campos, Professor do Magistério Superior**, em 09/02/2024, às 13:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mike Telemaco Contreras Colmenares, Discente**, em 09/02/2024, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4375958** e o código CRC **A93657C9**.

Referência: Processo nº 23070.001455/2024-08

SEI nº 4375958



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

MIKE TELEMACO CONTRERAS COLMENARES

3. Título do trabalho

Análise *in silico* do papel do receptor imune TREM-1 na infecção pelos Norovírus murino e humano

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Mike Telemaco Contreras Colmenares, Discente**, em 27/02/2024, às 09:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4409121** e o código CRC **30075D09**.

Referência: Processo nº 23070.001455/2024-08

SEI nº 4409121

MIKE TELEMACO CONTRERAS COLMENARES

**Análise *in silico* do papel do receptor imune TREM-1 na infecção
pelos Norovírus murino e humano**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração: Biologia da relação Parasito-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos.

Co-orientadora: Profa. Dra. Marcelle Figueira Marques da Silva Sales

Goiânia

2024

Colmenares, Mike Telemaco Contreras

Análise in silico do papel do receptor imune TREM-1 na infecção pelos Norovírus murino e humano [manuscrito] / Mike Telemaco Contreras Colmenares. - 2024.

CV, 107 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Helioswilton Sales Campos; co-orientadora Dra. Marcelle Figueira Marques da Silva Sales.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2024.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Norovírus. 2. TREM-1. 3. Docking molecular. 4. Imunidade inata. 5. Inflamação. I. Campos, Helioswilton Sales, orient. II. Título.

CDU 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MIKE TELEMACO CONTRERAS COLMENARES - Aos vinte e dois dias do mês de janeiro do ano de 2024 (22/01/2024), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **HELIOSWILTON SALES DE CAMPOS** (IPTSP/UFG), **FÁTIMA RIBEIRO DIAS** (IPTSP/UFG) e **MARCOS VINICIUS DA SILVA** (UFTM)) para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada na Sala de Leitura do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da UFG, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “**Análise in silico do papel do receptor imune TREM-1 na infecção pelos Norovírus murino e humano**”, em nível de MESTRADO, área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, de autoria de **MIKE TELEMACO CONTRERAS COLMENARES**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. **HELIOSWILTON SALES DE CAMPOS**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato Aprovado ou Reprovado:

Banca Examinadora	Aprovado / Reprovado
Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos	Aprovado
Profª. Dra. Fátima Ribeiro Dias	Aprovado
Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva	Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato: Habilitado, cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, na área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 45 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Helioswilton Sales De Campos, Professora do Magistério Superior**, em 22/01/2024, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fatima Ribeiro Dias, Professor do Magistério Superior**, em 22/01/2024, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Vinicius da Silva, Usuário Externo**, em 08/02/2024, às 13:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4321213** e o código CRC **232F8F14**.

Referência: Processo nº 23070.001455/2024-08

SEI nº 4321213

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Mike Telemaco Contreras Colmenares.

Orientador: Helioswilton Sales de Campos, PhD.

Coorientadora: Marcelle Figueira Marques da Silva Sales, PhD.

Membros:

Interno – Dra. Prof. Fátima de Rivero Dias.

Presidente – Dr. Helioswilton Sales de Campos.

Externo à Instituição – Dr. Marcos Vinicius da Silva.

Professores suplentes: Professor Rodrigo Saar e Professora Márcia Alves Dias de Matos.

Data: 22/01/2024

A Meu Criador, à Trindade beatíssima
no céu e na terra. Aos bem-aventurados
que transcenderam a vida e a minha mãe
e irmãozinho.

«É preciso pedir-te mais: porque podes
dar mais, e deves dar mais. Pense nisso»
São José Maria Escrivã

AGRADECIMENTOS

A DEUS todo-poderoso por fazer isto possível, aos bem-aventurados do céu por ajudar-me a cumprir aquela meta que um dia foi inconclusa.

A minha “*Mami Maire*” e meu “*hermanito Enmanuel Jesús*” que são tudo para mim, e a razão pela qual estou fazendo todo isto. Quero lhes dar o melhor. Nunca será suficiente e nunca me cansarei por eles. Vos amo grandemente.

A meu orientador o Professor Ton e à Professora Marcelle por acreditar em mim sem conhecer-me. Pelo apoio e instruções na minha formação profissional. Pelos conselhos, ensinamentos (agudeza e foco no que realmente é importante) e intenção de acompanhar a continuação para ser melhor pessoa. Continuem sendo esses apontadores de profissionais que isso ajuda muito (e aprendi demais) às pessoas que esperam ser um dia melhor, e cada vez melhores. Muito obrigado por saber dirigir, assistir, ouvir, compreender e ajudar. Que DEUS recompense por tudo o que fizeram por este aluno estrangeiro, e multiplique cada dia mais em metas, produtos na ciência, e cuide da saúde de vocês em família.

Aos professores do IPTSP/UFG que participaram na minha formação durante o mestrado; especificamente ao professor Milton quem providenciou os processos para poder cursar o programa do mestrado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da minha bolsa de mestrado.

Aos meus parceiros e coleguinhas do LIMIM (Laboratório de Imunologia de Mucosas e Imunoinformática); Amanda Matos e Pedro Dantas que no início sobrou muito trabalho para eles por meu jeito de ser, e que na caminhada me deram muito apoio e animo para me adaptar nesta nova cultura. Sempre estarei agradeço com vocês, são grandes biotecnologistas, profissionais e pessoas. Também agradeço ao apoio moral do Daniel o do José que chegaram no final no nosso pequeno equipo que agora está crescendo.

Na paróquia universitária São João Evangelista devo agradecer ao seu grande pastor, o Padre Davi Pereira, por acolher-me e criar um espaço para mim, ainda quando não falava bem e não dizia bem as coisas. Tem sido um excelente amigo para me-ouvir e aconselhar-me na vida pessoal e espiritual. Aos meus companheiros da moradia Nathan

e Juliana; e a Dona Isis, por segurar-me nos dias trevosos e cinzas; obrigados meninos por estarem nesses dias e tentar sorrir para mim nos dias difíceis.

Também na distância eu recebi muito apoio da minha família, para vocês muito obrigado; especificamente para minhas tias e tios Soraida, Yenny, Landys e Fernando (Venezuela); a minha prima Sorangel (Colômbia) e seu namorado Luís Perez. Às pessoas que me ajudaram a chegar aqui: Johanna e seu esposo Vicente (Colômbia) e ao Padre William Rosales (Venezuela). Também agradeço a todos aqueles que me prestaram a sua mão desde o exterior: Yendy Carrero (Espanha), Dra Odreman (Venezuela), Gianmary (Venezuela), Gianmar (USA), Mária Angelica (Venezuela), Henry (Espanha), Yoli (Chile), Ricardo (Chile), Fría - Daniela (Venezuela), Luís Alfredo (Venezuela), Greana (Venezuela), Frei Bernardo (Portugal) e Xiomar Bustos (USA).

Aos meus grandes “panas” na Venezuela: Dom Nicanor, Dom Ramón Contreras, o “chamo” Ismael Sanchez e todos os demais que me acompanharam na distância. Para minhas amadas amigas Magalita Moreno, Dalia Bracho, Christina, Amalia Garcias, Luisa de Carrero; muito obrigado pelas suas orações e conselhos sempre me deram para tudo, Deus as abençoe muito minhas velhinhas.

A todos e a todas, Gratidão!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. NOROVÍRUS.....	2
1.1.1. CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA.....	2
1.1.2. GENOMA E PROTEOMA DO NOROVÍRUS.....	2
1.1.2.1. GENOMA VIRAL.....	2
1.1.2.2. PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS.....	4
1.1.2.3. PROTEÍNAS ESTRUTURAIS.....	5
1.1.3. EVOLUÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO NOROVÍRUS.....	8
1.1.4. RESPOSTA IMUNE INATA – ANTIVIRAL.....	10
1.1.5. PATOLOGIA VIRAL.....	13
1.2.1. TREM-1.....	14
1.2.2. TREM-1 EM INFECÇÕES VIRAIS.....	16
1.3. FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
4. MÉTODOS.....	28
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÕES.....	64
8. BIBLIOGRAFIA.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do capsídeo dos calicivírus.....	2
Figura 2.	Organização do genoma do Norovírus humano.....	3
Figura 3.	Proteína VP1 do NoV.....	7
Figura 4.	Diversidade do Norovírus humano (NoV).....	10
Figura 5.	Imunidade inata antiviral dirigida contra infecção pelo NoV humano e murino.....	12
Figura 6.	TREM-1: vias de sinalização.....	15
Figura 7.	Respostas celulares geradas pelos ligantes virais nas células que expressam TREM-1.....	18
Figura 8.	Metodologia utilizada para a obtenção e escolha da sequência proteica para a modelagem das proteínas virais VP1 do NoV GII.4.....	31
Figura 9.	Estratégias e ferramentas que foram utilizadas para as análises de dados.....	36
Figura 10.	Análise transcricional dos genes associados à expressão de <i>Trem1</i> e outros marcadores gênicos na infecção por MNoV em macrófagos murinos RAW264.7.....	39
Figura 11.	Análise transcricional dos genes associados à expressão de <i>Trem1</i> e outros marcadores gênicos na infecção por MNoV em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) de camundongos BALB/c.....	40
Figura 12.	Associação dos genes identificados e analisados em transcriptômica comparando células BMDM e RAW264.7.....	42
Figura 13.	Interface de interação entre o TREM -1 e o segmento P da VP1 de NoV murino (cepa MNV-1).....	45
Figura 14.	Interface de interação entre o murino TREM-3 e o segmento P da VP1 do norovírus murino (MNV-1).....	47
Figura 15.	Árvore filogenética das sequencias genéticas que codificam para a proteína VP1 de NoV GII.4 após de 2010.....	49
Figura 16.	Dinâmicas moleculares das interações entre a proteína VP1 do NoV e o domínio <i>Ig-like</i> do TREM-1.....	51
Figura 17.	Sítios de ligação entre os CDR do receptor TREM-1 com os domínios da proteína antigênica VP1 do NoV.....	55
Figura 18.	Redes de interação genica entre os genes envolvidos na via de TREM-1 e as vias de piroptose e apoptose.....	57
Figura 19.	Teoria proposta da interação do NoV com o receptor TREM.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Indicadores das análises de <i>docking</i> proteína-proteína.....	36
Tabela 2.	Símbolos dos aminoácidos.....	37
Tabela 3.	Estudos encontrados de transcriptômica como antecedentes.....	44
Tabela 4.	Valores de qualidade da modelagem do TREM-3 murino.....	47
Tabela 5.	Parâmetros energéticos e de interação obtidos do docking molecular entre o TREM-1/TREM-3 murino e a VP1 do MNoV.....	48
Tabela 6.	Valores de qualidade da modelagem das proteínas VP1 do NoV GII.4 pelos anos escolhidos.....	51
Tabela 7.	Valores termodinâmicos das interações entre as proteínas VP1 do NoV GII.4 com o receptor TREM-1 durante os anos escolhidos.....	53

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt	<i>Protein kinase B.</i>
CDR	<i>Complementarity determining region.</i>
HBGA	<i>Histo-Blood Group Antigen.</i>
NoV	<i>Norovirus Humano.</i>
Ig-SF	<i>Immunoglobulin Superfamily.</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif.</i>
JAK	<i>Janus kinase.</i>
KDa	<i>Kilodaltons.</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase.</i>
MNoV	<i>Murine norovirus.</i>
NoV	<i>Norovirus.</i>
NS	<i>Non structural.</i>
ORF	<i>Open reading frame.</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern.</i>
PI3k	<i>Phosphatidylinositol 3-kinases.</i>
RdRp	<i>RNA dependent RNA polymerase.</i>
ssRNA	<i>single-stranded RNA.</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription.</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription.</i>
sTREM-1	<i>soluble TREM-1.</i>
TLR	<i>Toll-like receptor.</i>
TLT	<i>TREM-like transcript</i>
TREM	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells.</i>
TREM-1	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 1.</i>
TREM-2	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2.</i>
TREM-3	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 3.</i>
TYROBP	<i>transmembrane immune signaling adaptor.</i>
UTR	<i>Untranslated region.</i>
VPg	<i>Viral protein genome-linked.</i>

RESUMO

Em humanos, o Norovírus (NoV) é uma das principais causas da doença diarreica aguda (DDA). Devido às limitações do cultivo do NoV, alguns aspectos moleculares de sua interação com o sistema imune do hospedeiro são desconhecidos. O *triggering receptor expressed on myeloid cells 1* (TREM-1) está associado à amplificação de respostas inflamatórias e à progressão de infecções, inclusive em algumas doenças virais. Assim, acreditamos que o TREM-1 pode estar envolvido na infecção pelo NoV. Inicialmente, pesquisamos a expressão de *Trem1* e os genes envolvidos na sua via de ativação, em dados de transcriptômica disponibilizados em bancos de acesso públicos. Em modelos de infecção experimental com Norovírus murino (MNoV), a expressão de *Trem1* estava aumentada. Também observamos que existe uma co-expressão do *Trem1* com genes envolvidos na via de piroptose, quando comparado a aqueles da via de apoptose. Diante disso, a interação proteína-proteína *in silico* foi avaliada mediante ensaios de *docking* molecular entre o domínio *Ig-like* de TREM-1 murino com o domínio P da proteína VP1 do MNoV. O TREM-1 murino reconheceu a alça antigênica *C'-D'* conservada que está presente na proteína VP1 do MNoV. Dessa forma, e com base em critérios filogenéticos, diferentes estruturas da proteína VP1 das cepas NoV GII.4 de diferentes anos (1987, 2010, 2012, 2014, 2016 e 2019) foram modeladas. Foram realizadas simulações de *docking* e dinâmica molecular (DM) para determinar a interação *in silico* entre a proteína VP1 do NoV GII.4 e o domínio *Ig-like* do TREM-1 humano. Por fim, foram determinadas as características energéticas dessas interações em servidores on-line. As simulações de DM sugerem que ocorre interação estável entre o TREM-1 humano e a proteína VP1 de NoV, independentemente do ano de isolamento. De forma interessante, observou-se mudança na participação das diferentes regiões determinantes de complementariedade (CDRs) do TREM-1 quando interagiam com os domínios da proteína VP1, destacando principalmente a participação do CDR3. Nossos dados sugerem fortemente o envolvimento do TREM-1 no reconhecimento do NoV e a sua participação na fisiopatologia da DDA provocada por NoV.

Palavras chaves: Norovírus; TREM-1; *docking* molecular; imunidade inata; inflamação.

ABSTRACT

In humans, Norovirus (NoV) is one of the main causes of acute diarrheal disease (ADD). Due to the limitations of NoV cultivation, some molecular aspects of its interaction with the host's immune system remain unknown. The triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) is associated with the amplification of inflammatory responses and the progression of infections, including viral infections. Thus, we believe that TREM-1 may be involved in the NoV infection. Initially, we investigated the expression of *Trem1* and the genes involved in its pathway, in transcriptomic data bank of public domain. In experimental infection with murine Norovirus (MNoV), the expression of *Trem1* was increased. We also observed that there is a co-expression of *Trem1* and genes involved in the pyroptosis pathway, when compared to those in the apoptosis pathway. The *in silico* protein-protein interactions were assessed by molecular docking simulations between the Ig-like domain of murine TREM-1 and the P domain of the MNoV VP1 protein. The murine TREM-1 recognized the conserved C'-D' antigen that is present in the murine VP1. In this regard, and based on phylogenetic criteria, different structures of the VP1 protein of NoV GII.4 strains from different years (1987, 2010, 2012, 2014, 2016 and 2019) were modeled. We performed docking and molecular dynamics (MD) simulations to determine the *in silico* interaction between the VP1 protein of NoV GII.4 and the Ig-like domain of human TREM-1. The DM simulations suggest that there is a basic interaction between human TREM-1 and the NoV VP1 protein, regardless of the year of isolation. Interestingly, we observed changes in the participation of the different complementarity determining regions (CDRs) of TREM-1 when interacting with the domains of the VP1 protein, highlighting the participation of CDR3. Our data strongly suggests the involvement of TREM-1 in the recognition of NoV and its participation in the physiopathology of ADD caused by NoV.

Keywords: Norovirus, TREM-1, molecular docking, innate immunity.

1. INTRODUÇÃO

A diarreia pode ser definida pela ocorrência de três ou mais evacuações pastosas ou líquidas em um período de 24 horas (WHO 2022), o que pode ser um sintoma de infecção gastrointestinal (Nemeth & Pflughaa 2021). Mais especificamente, o quadro clínico da diarreia viral é caracterizado pela eliminação súbita de fezes de consistência alterada (mais de três vezes por dia ou pelo menos 200 g/dia) que pode estar associada a náusea, vômitos, febre ou dor abdominal, com duração inferior a duas semanas (Bellido & Arnedo 2021). Os patógenos virais mais frequentemente associados à doença diarreica aguda (DDA) são os Rotavírus (RV), os Calicivírus, como os Norovírus humanos (NoV) e Sapovírus, bem como os Adenovírus (AdV) entéricos, Astrovírus e alguns Picornavírus (Chiejina & Samant 2021).

A DDA provocada por agentes virais pode afetar grupos etários diferentes com curso clínico que dependerá do estado imune do indivíduo e virulência do vírus. Em crianças de até cinco anos de idade, o RV é o principal agente etiológico, seguido pelo NoV (Rivera 2023). Por outro lado, em adultos, o NoV é responsável pela maioria dos surtos de DDA no mundo todo (Lartey et al. 2020; Chiejina et al. 2021). Os NoV que infectam humanos são transmitidos pela via oro-fecal de diferentes formas: contato pessoa a pessoa, contato com superfícies contaminadas, disseminação por meio do vômito e pela via alimentar (água e alimentos contaminados) (Gaythorpe et al. 2018). Ainda que a DDA provocada por NoV normalmente seja uma doença curta e autolimitada em indivíduos hígidos, ela pode resultar em taxas elevadas de morbi/mortalidade em indivíduos imunossuprimidos (com imunodeficiência primárias e secundárias - AIDS, transplantados, pessoas em tratamento com antineoplásico e em tratamento com esteroides) (Rajagopalan & Yoshikawa 2016). Apesar disso, e principalmente em função das limitações no cultivo do NoV, muitos aspectos ainda precisam ser esclarecidos, destacando-se a interação com o sistema imune do hospedeiro.

1.1 NOROVÍRUS

1.1.1. CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA

A família *Caliciviridae* pertence à ordem *Picornavirales*. Esta família possui dez gêneros que infectam mamíferos: *Bavovírus*, *Lagovírus*, *Minovírus*, *Nacovírus*, *Norovírus*, *Recovirus*, *Salovírus*, *Sapovírus*, *Valovírus* e *Vesivírus* (ICTV, 2022). Os vírions deste grupo apresentam capsídeo que compreende 32 depressões distintas em forma de cálice, o que dá o respectivo nome à família. Devido a sua natureza proteica, os calicivírus têm a característica de serem estáveis no ambiente; especificamente aqueles que tem tropismo pelo intestino os quais são estáveis em meio ácido e resistentes a diferentes métodos de inativação viral (Vinjé et al. 2019).

O protótipo da família *Caliciviridae* é o NoV. Estes vírus possuem aproximadamente 38 nanômetros (nm) de diâmetro com um genoma de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e polaridade positiva (RNAss+), não envelopados e caracterizados por um capsídeo icosaédrico (T=3) composto por 180 proteínas VP1 (**Figura 1**) (Richardson 2013; Tyu 2017; Vinjé et al. 2019).

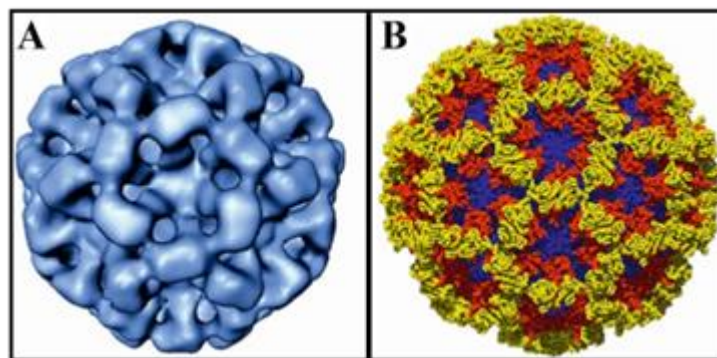


Figura 1: Estrutura do capsídeo dos Calicivírus. (A) Reconstrução de imagem criogênica de partículas recombinantes semelhantes ao Norovírus. (B) Estrutura de raios-X do capsídeo do Norovírus com a proteína VP1. Azul – domínio S, vermelho domínio P1 da proteína VP1 e em amarelo domínio P2 da proteína VP1. **Fonte:** Prasad et al. 1999; com adaptação de Vinjé et al. 2019.

1.1.2. GENOMA E PROTEOMA DO NOROVÍRUS

1.1.2.1. GENOMA VIRAL

O genoma do NoV tem 7,3 ~ 8,5 kilobases (kb) de comprimento composto por 45%-56% de citosina + guanina (C+G) que atua como molécula de RNA mensageiro (mRNA). A extremidade 5' do RNA genômico está covalentemente ligado a uma proteína

codificada pelo vírus conhecida como VPg (NS6), enquanto a extremidade 3' está poliadenilada (Subba-Reddy et al. 2012). Nas extremidades do genoma existem regiões não codificantes (RNC) que são tipicamente curtas (nos NoV murinos [MNoV] o comprimento é de 5 a 78 nucleotídeos (nt) e nos NoV apresenta 48nt). Especificamente, as RNCs geram estruturas secundárias de RNA que são conservadas evolutivamente. Essas estruturas são importantes para as etapas de replicação e tradução da biossíntese viral, além de também atuarem na imunopatogênese viral (Thorne et al. 2012; Smyth et al. 2018; Guo et al. 2023).

Classicamente, o genoma do NoV é dividido em três fases abertas de leitura (*Open reading frame* - ORFs) (**Figura 2**). Inicialmente se encontra a ORF que codifica as proteínas não estruturais (ORF1), em seguida, a que codifica a proteína do capsídeo estrutural principal, conhecida como VP1 (ORF2), e posteriormente, aquela que codifica a proteína VP2 (ORF3) (Malm et al. 2019; Parra 2019). Nos MNoV foi descrito uma quarta ORF (ORF4) que traduz uma proteína denominada fator de virulência 1 (VF1) que uma vez expressa, tem como alvo a mitocôndria; isto faz com que o MNoV tenha uma alta atividade virulenta (Borg et al. 2021).

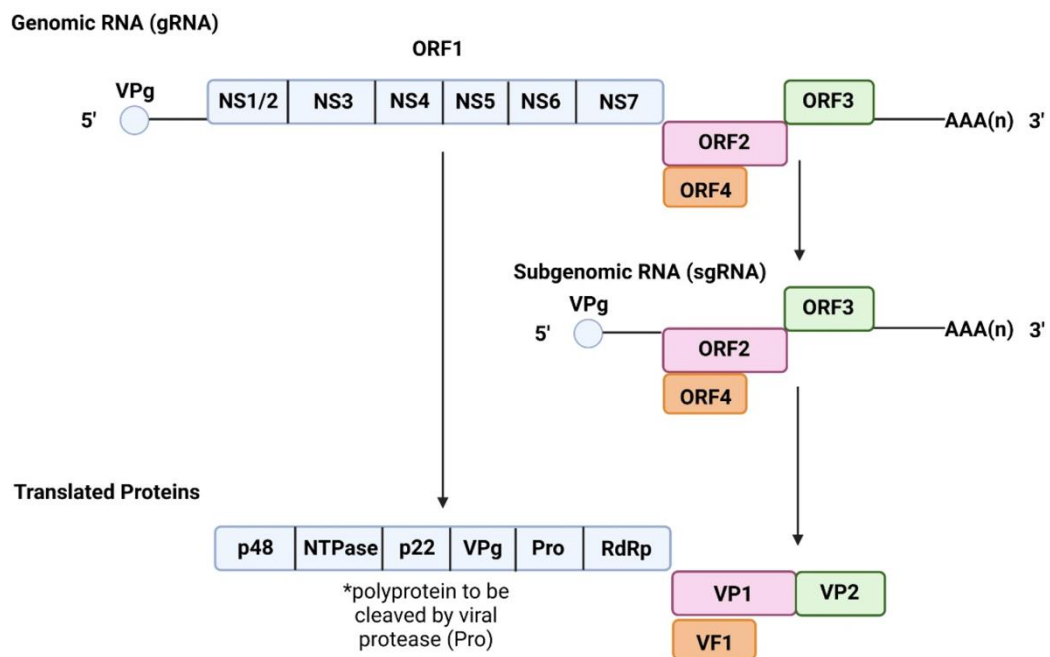


Figura 2: Organização do genoma do Norovírus humano. O genoma está ligado covalentemente na extremidade 5' ao VPg e é poliadenilado na extremidade 3'. Para a produção das proteínas estruturais se geram os sgRNA. No caso das proteínas não estruturais, a poliproteína após é escindida para liberar as distintas proteínas dentro da célula. **Fonte:** Thorne et al. 2016.

1.1.2.2. PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS

A ORF1, codifica um polipeptídeo com uma massa molecular de 200 kDa que posteriormente é clivado pela protease viral em seis peptídeos maduros: NS1/2 (p48), NS3 (NTPase), NS4 (p22), NS5 (VpG), NS6 (protease) e NS7 (RdRp) (Bull et al. 2015).

A proteína NS1-2 contém uma porção N-terminal rica em prolina seguido por um domínio transmembrana, e uma região C-terminal que tem sítios de clivagem por caspases. Uma vez que esta proteína é expressa, ela se distribui no citoplasma da célula infectada, onde interage com a proteína vesicular SNARE e causa a desmontagem do complexo de Golgi. A NS1-2 interfere na sinalização das vias celulares Jak-STAT, MAPK, p53, PI3K-Akt (Lateef et al. 2017). Na infecção pelo MNoV, a NS1-2 também possui ampla distribuição citoplasmática identificada como um padrão microscópico puntiforme, ficando próximo ao centro organizador dos microtúbulos comprometendo a polaridade da célula infectada (Baker et al. 2012).

A proteína NS3 (*2C-Like*, p41(p40) ou *Nucleoside triphosphatase like 2C*) com uma massa molecular 40 kDa, tem função de NTPase. Ela atua como uma helicase e pode hidrolisar nucleotídeos trifosfato na infecção pelo NoV. Além disso, ela atua na síntese do RNA *in vitro* realizada majoritariamente pela atividade da RNA polimerase viral (RdRp) (Pfister & Wimmer 2001; Li et al. 2018). Entretanto, na infecção pelo MNoV, a NS3 está associada ao complexo de replicação viral com atividade NTPase e atividade de chaperona para desestabilizar o dsRNA na presença de magnésio (Mg^{2+}) ou manganês (Mn^{2+}) (Han et al. 2018).

A proteína NS4 possui uma massa molecular de 20-22 kDa e atua sobre a inibição da via secretora celular e a desmontagem do complexo de Golgi (Doerflinger et al. 2017; Hung et al. 2023). Isto leva ao bloqueio do tráfego das vesículas que estão revestidas com as proteínas COPII do retículo endoplasmático (RE) para o Golgi (Roth & Karst 2017). Na infecção pelo MNoV, tem sido demonstrado que a NS4 inibe a remodelação do citoesqueleto de actina em monocamada de células HT-29/B6 (modelo utilizado para mimetizar as uniões aderentes dos epitélios) (Doerflinger et al. 2017).

A VPg (NS6) é uma proteína multifuncional com uma massa molecular de 15,8 kDa composta por 133 aminoácidos que possui a função de recrutar a maquinaria de tradução celular. Ela atua principalmente como um iniciador (*primer*) para os fatores de tradução das células eucariotas 3 e 4 (eIF3 e eIF4E) para iniciar a síntese de RNA

genômico viral (Daughenbaugh et al. 2003; Chung et al. 2014). Outra função da VPg é contribuir na incorporação de nucleotídeos em associação com a atividade da RdRp (McSweeney et al. 2021), assim como recrutar o fator de iniciação eucariótica 4G (eIF4G) do hospedeiro, facilitando a tradução do genoma viral. Foi demonstrado que esta proteína é importante para a indução de uma parada do ciclo celular na fase G₀/G₁ que promove a replicação viral (McSweeney et al. 2021). Nas cepas de MNoV, a VPg aumenta a atividade da proteína RdRp que ajuda na síntese viral (Lee et al. 2018).

A NS6 (3C, pro 3C-like, 3CL^{pro}, ProPol e NS6^{pro}) atua como protease viral. A função principal dessa proteína é o processamento da poliproteína viral (Fernandes et al. 2015). Finalmente, a proteína NS7 tem atividade de RdRp, também denominada Pol, 3Dpol, ProPol e NS7^{pol}. Na proteína RdRp foram identificados seis motivos dentro do domínio de palma, incluindo os motivos C e A, contendo a sequência YGDD presente no sítio ativo. O domínio N-terminal conecta os domínios dos dedos e polegar, enquanto o domínio C-terminal está localizado dentro da fenda do sítio ativo e potencialmente interfere com o RNA iniciador e/ou molde durante a síntese do RNA viral (Han et al. 2017).

1.1.2.3. PROTEÍNAS ESTRUTURAIS

As proteínas estruturais do NoV são as VP1 e VP2 que se originam a partir de um RNA subgenômico (RNAsg) originário das ORF2 e ORF3 no genoma do NoV (Takahashi et al. 2023). A ORF2 codifica para a proteína VP1 (proteína estrutural maior), tem ~530-555 aminoácidos, massa molecular aproximada de 58 kDa, que se divide em duas subunidades (S e P). A sequência da proteína VP1 começa com um pequeno domínio N-terminal entre os aminoácidos 10-49, continuado pelo domínio de revestimento, ou S, que se estende do aminoácido 50 ao 225 com motivos Pro-Pro-Gly, conservados entre os diferentes genogrupos dos NoV (Hardy 2005).

O domínio P (P1 e P2) é o segmento que dá a estabilidade do capsídeo do NoV por gerar contatos intermoleculares entre as subunidades diméricas de diferentes unidades de VP1. O subdomínio P1 compreende os aminoácidos 226-278 e os resíduos 406-520; enquanto o subdomínio P2 compreende os aminoácidos 279-405 (**Figura 3**). Propriamente, os domínios P interagem formando dímeros que aumentam a estabilidade do capsídeo e originam as protuberâncias sobre o vírion, que por sua vez, se estendem do

domínio S para a parte externa do capsídeo e estão localizadas na parte central da proteína estrutural VP1 (Campillay-Véliz et al. 2020). Desta forma, o domínio P desempenha a função de ligante viral por adsorver aos antígenos do grupo histo-sangue humano (HBGAs) usando os mesmos padrões do capsídeo viral, desempenhando papel importante na interação vírus-receptor da célula hospedeira (Vongpunsawad et al. 2013).

Estruturalmente, a proteína VP1 adota três conformações denominadas A, B e C. As subunidades A e B se reúnem em 60 dímeros (denominados A/B), enquanto as subunidades C agrupam-se em 30 dímeros C/C. Estas diferenças conformacionais facilitam a curvatura da partícula viral para formar uma estrutura fechada. Isto é comumente observado em outros vírus icosaédrico, como os membros das famílias *Astroviridae*, *Hepeviridae* e *Nodaviridae* (Leuthold et al. 2016; Devant et al. 2019).

De forma geral, as estruturas cristalografadas do domínio P do MNoV apresentam estruturas terciárias semelhantes às dos domínios P do NoV com uma maior variação estrutural nas alças polipeptídicas na superfície externa do domínio P; correspondendo às regiões móveis entre as várias formas cristalografadas. Mais especificamente, as alças E'-F' foram observadas nas conformações “aberta” e “fechada”. Acredita-se que a troca do estado aberto para fechado, forma um canal na interface do dímero P, que é estabilizado por um bloqueio iônico que induz mudanças estruturais importantes durante a infecção para facilitar a entrada na célula hospedeira (Taube et al. 2010). Como já foi mencionado previamente, a análise da região P2 da VP1 dos NoV determina a diversidade deste vírus (Li et al. 2023). Esta região está diretamente envolvida na geração de variantes associadas às epidemias devido a presença de substituições de aminoácidos (Moeini et al. 2021). A ubiquação destas substituições geralmente fica expostas na superfície do capsídeo viral em todos os NoV. Por esse motivo, a VP1 é a proteína alvo para a ação neutralizante dos anticorpos (Pongan et al. 2018; Campillay et al. 2020).

Por último, a ORF3 que codifica à VP2 (proteína estrutural menor) produz uma proteína de massa molecular de 29 kDa que é essencial para a biossíntese viral. Ela é altamente variável e é a principal responsável pela estabilidade do vírion e a formação do capsídeo. Além disso, a VP2 interage com a VP1 e, por sua vez, aumenta a expressão de proteínas do capsídeo (Mohamed et al. 2018; Liu et al. 2019).

Embora as moléculas de VP2 estejam em menor número no capsídeo, elas parecem desempenhar papel indispensável no ciclo replicativo do NoV, bem como na estabilidade da estrutura de VLPs. A interação entre VP1 e VP2 também pode regular a expressão da proteína do capsídeo (Vongpunsawad et al. 2013). Na ausência de VP1, a VP2 é alocada no núcleo da célula hospedeira após a sua tradução citoplasmática. Nesse sentido, um sinal de localização nuclear específico foi descrito para a ORF3 do NoV, sugerindo que a VP2 desempenha papel na interferência nos processos de transcrição e remodelação da cromatina. Por fim, a VP2 de MNoV também pode ter um papel na modulação da resposta imune do hospedeiro. No entanto, essa possibilidade ainda não foi comprovada para NoV. Portanto, a VP2 parece ser uma proteína estrutural versátil que pode ter muitas funções diferentes no ciclo replicativo e na patogênese do NoV (Liu et al. 2019; Campillay et al. 2020).

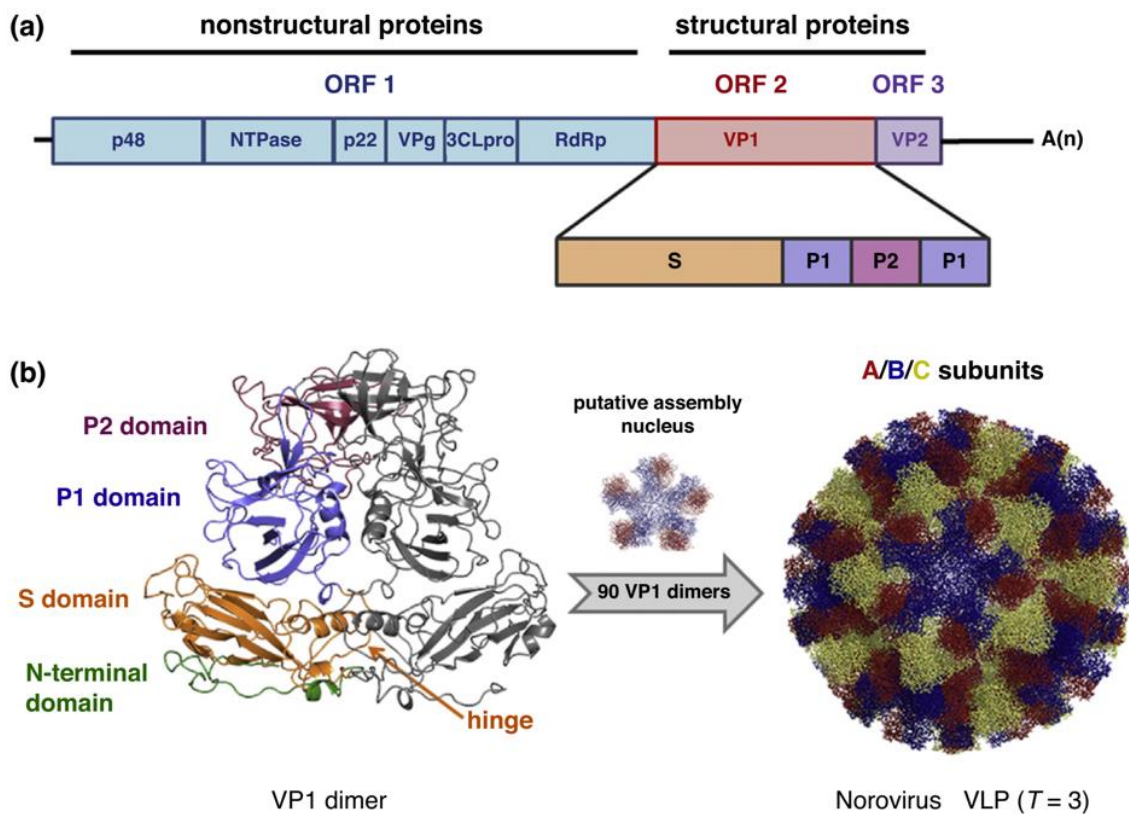


Figura 3: Proteína VP1 do norovírus. (A) proteína VP1 é dividida em domínios de S e P. (B) São ~90 dímeros da proteína VP1 que conformam as partículas semelhantes a vírus (ou *virus like particles* – VLPs) VLP do NoV gerando a estrutura icosaédrica T=3. Os domínios S dos monômeros VP1 constroem uma concha ou casca que envolve o RNA viral na forma de um andaime. **Fonte:** Pogan et al. 2018.

1.1.3. EVOLUÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO NOROVÍRUS

As sequências completas de aminoácidos da proteína VP1 e a região ORF1 da NS7 de NoV são a base da atual classificação genética destes vírus (**Figura 4**) (Chhabra et al. 2019). Recentemente, o grupo de trabalho de classificação de Norovírus (NCWG) propôs uma nomenclatura padronizada universal e um sistema para a genotipagem utilizando a análise filogenética das sequências completas de aminoácidos da proteína VP1 (Rani et al. 2021). Aquelas sequências com diferenças <14,3% são classificadas como cepas; entre 14,3 e 43,8% são classificadas no mesmo genótipo e aqueles com diferenças entre 45 e 61,4% são classificadas no mesmo genogrupo (Zheng et al. 2006). Considerando a classificação atual do NCWG, são descritos dez genogrupos (GI-GX) e 60 genótipos de NoV com base nas sequências genéticas da RdRp e as sequências de aminoácidos da proteína do capsídeo VP1 (Han et al. 2021; Rani et al. 2021). Além dos genogrupos e genótipos, com base em dados parciais de sequenciamento da proteína RdRp, foi proposta a formulação de mais dois grupos P (diversidade genética da sequência que codifica para a polimerase) provisórios e 14 tipos P provisórios aos que já estão estabelecidos (Chhabra et al., 2019). A formulação desses grupos se dá é pelo fato que novas cepas emergentes não se alinham com outros grupos já definidos (Chhabra et al., 2019; Winder et al., 2022).

Até o momento, os genogrupos I, II, IV, VIII e IX foram detectados causando infecção em humanos (Liu et al., 2019). Nesse sentido, destaca-se a prevalência e importância dos genogrupos GI e GII, que são os mais comumente detectados tanto em casos de indivíduos hospitalizados por DDA, como em amostras ambientais (Casillas-Veja et al., 2020). No genogrupo GII, observam-se 27 genótipos, que majoritariamente, são responsáveis por aproximadamente 80% a 90% das infecções em humanos (Arrouzet et al., 2020). Em particular, nas amostras clínicas de indivíduos com DDA, o genótipo GII.4 é o mais comumente detectado mundialmente. Ele é reconhecido por causar a maioria (>80%) dos casos de surtos globais de infecção por NoV e historicamente, responsável pelas seis pandemias causadas por NoV (Netzler et al., 2018). A partir de 2002, tem-se observado o surgimento de novas variantes de GII.4 a cada dois ou quatro anos; dentro das quais são conhecidas como as cepas: Farmington Hills que foi identificada no 2002 (Dingle et al., 2004), a Hunter encontrada no 2004 (Bull et al., 2006), a Den Haag achada no 2006 (Lindsmith et al. 2008), a New Orleans identificada no

2009 (Medici et al. 2015) e a conhecida cepa Sydney descrita a partir do 2012 (Ruis et al. 2020).

Neste sentido, as cepas que conformam o genótipo GII.4 de maior relevância, foram denominadas segundo seu local e ano de detecção. Portanto, as principais cepas reconhecidas por seu impacto na saúde mundial foram as cepas: a Den Haag, New Orleans e Sidney. A cepa Den Haag causou a pandemia de DDA por NoV GII.4 na Europa e nos Estados Unidos durante o inverno de 2006. Esta cepa possui variações de aminoácidos nas regiões S, P1 e P2 na proteína VP1; porém, a maior parte da heterogeneidade foi observada dentro do subdomínio P2, mais especificamente foram variáveis as posições entre os aminoácidos 393 a 395 (Lindesmith et al. 2008). Enquanto a cepa New Orleans NO2009 tem uma ORF1 derivada de um progenitor que já se encontrava circulando nos Países Baixos (Yerseke) desde o ano 2006. Posterior, ela foi detectada em Itália desde o mês do outubro de 2009 até abril de 2013. Esta variante NO2009 substituiu completamente a antiga variante Den Haag 2006 (Medici et al. 2015). Finalmente, a cepa Sidney é uma das mais estudadas e conhecidas. Ela foi identificada entre novembro de 2012 e janeiro de 2013 e se tornou a variante GII.4 mais dominante em pelo menos quatro continentes. Nesta cepa foram encontradas seis substituições nos epítomos A (local 294), C (locais 341, 377), D (local 396), E (local 413) e G (local 359) no domínio antigênico P2, quando comparada a cepa New Orleans (Ruis et al. 2020).

A diversidade genética entre as linhagens GII.4 do NoV é devida, pelo menos em parte, à pressão imunológica. Acredita-se que a deriva gênica levou à geração de diversidade entre as linhagens GII.4 em várias posições, sendo a maioria, localizada no domínio P2 hipervariável (Petronella et al. 2018). Nesse sentido, foram descritos epítomos potenciais que provavelmente estejam mais sujeitos à seleção imune; destacando-se aqueles observados no domínio P2: A (aminoácidos 296-298) e B (393 a 395), localizados em alças na superfície da proteína, que funcionam como epítomos específicos da variante GII.4. O surgimento de novas cepas de GII.4 associadas a surtos epidêmicos de gastroenterite é conhecido por se correlacionar com mutações no domínio P2, sendo identificados nos aminoácidos 352, 357, 368, e 378 (Zakikhany et al. 2012; Tohma et al. 2019; Ao et al. 2023).

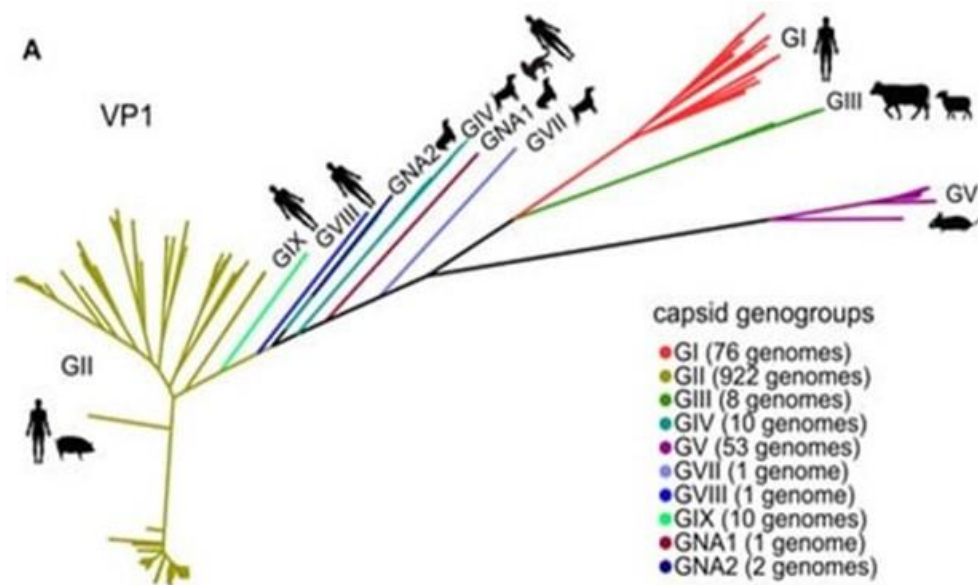


Figura 4: Diversidade do norovírus humano (NoV). A base fundamental da classificação atual do NoV é condicionada pela sequência de aminoácidos da proteína VP1. Evidencia-se na imagem da árvore filogenética que os genogrupos com mais integrantes são os genótipos GI e GII. **Fonte:** Vakulenko et al. 2019.

1.1.4. RESPOSTA IMUNE INATA - ANTIVIRAL

Dois são os eventos necessários para desencadear uma resposta imune inata antiviral eficaz: a) detecção do vírus pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e, b) o início da sinalização de proteínas que regulam a síntese de interferon (IFN) (Seth et al. 2006). Uma vez que ocorre a entrada do vírus no organismo, a ativação do sistema imunológico começa com o reconhecimento dos padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) pelos PRRs (Iretton et al. 2017). Além dos MAMPs, os PRRs podem reconhecer também os padrões moleculares associados ao dano celular ou sinais de perigo (DAMPs) (Roh & Sonh., 2018). Os MAMPs gerados durante a replicação viral incluem as glicoproteínas de superfície, DNA e RNA viral que são detectados no citosol por meio dos receptores semelhantes a *Toll* (TLRs), pelos semelhantes aos que têm repetições ricas em leucina com domínio de oligomerização de nucleotídeos (NLR), aos similares ao gene induzível por ácido retinóico 1 (RLR), os da família que contém o domínio Pyrin-HIN (PYHIN) e o sensor de DNA do citosol cGAS (**Figura 5**) (Wilkins et al. 2010; Amarante et al. 2018; Mutso et al. 2019; Wu et al. 2022).

Quando as proteínas virais são liberadas no citosol, inicialmente são detectadas pela proteína do gene 5 associado à diferenciação do melanoma (MDA5) e a proteína semelhante à Apaf-1 que contém pirina (NLRP6). Essa interação promove a ativação da

proteína sinalizadora antiviral mitocondrial (MAVS), nas mitocôndrias e nos peroxissomos. Por sua vez, a MAVS ativa a quinase 1 que se une à TANK (TBK1) e a quinase inibidora épsilon do fator nuclear- κ B (IKK ϵ) que recrutam e fosforilam os fatores reguladores de interferon 3 e 7 (IRF3/7). Isso resulta em sua dimerização e translocação para o núcleo aumentando a expressão e produção de IFN tipo I e tipo III (Jahun et al. 2021).

Por outro lado, o TLR3 reconhece o RNA de fita dupla (dsRNA) e os TLR7, TLR8 e TLR9 detectam RNA de fita simples (ssRNA) (Zheng et al. 2020). Isto ativa a proteína adaptadora 1 que contém o domínio TIR (TRIF) que induz a atividade de TRAF3 e 6, que por sua vez, ativam os fatores de transcrição IRF3/7 que também resulta na produção de IFN-I (Lester et al. 2014). Além desses, os membros da família de RLR, RIG-I, MDA-5 e LGP2 detectam dsRNA viral e 5'-trifosfato de RNA. Uma vez ativado, o RIG-I, sinaliza a via proteína MAVS para induzir a expressão de genes antivirais via IRF3/7. O RIG-I também é capaz de ativar NF- κ B e, assim, induzir a produção de IFN-I e citocinas inflamatórias (Jacobs et al. 2012). Na família dos NLRs, o NLRP3 tem sido o membro mais estudado na resposta antiviral. Para a expressão deste receptor, os receptores de TNF (TNFR) ou IFN (IFNR) induzem a ativação de NF- κ B, assim como para pro-caspase-1, pro-IL-1 β e pro-IL-18 (Brydges et al. 2013). A ativação do NLRP3 leva à clivagem da pró-caspase-1, que quando ativada (caspase-1), medeia o processo proteolítico de pro-IL-1 β , pro-IL-18 e da gasdermina D (GSDMD), para estabelecer uma resposta inflamatória antiviral (Zhao et al. 2020; Wang et al. 2021).

Como resultado da ativação dos receptores da imunidade inata, observa-se a produção local e sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF- α) induzida pelos fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 e IRF5 e a produção de IFN I/III, pelos fatores IRF3/7 (Vitiello et al. 2020). Os IFNs atuam de forma autócrina ou parácrina via receptores transmembrana (IFNR) para ativar STAT1, STAT2 e IRF9. Este complexo é translocado para o núcleo para controlar a expressão de vários genes estimulados por interferon (ISG) que medeiam um estado antiviral levando à apoptose celular, apresentação de antígenos e expressão de fatores de restrição viral (Samuel 2001). Estes ISGs foram identificados como a proteína 1 de resistência ao Myxovírus (MX1), o IFN-induzível de cadeia dupla dependente de RNA (PKR); o fator de iniciação da tradução eucariótica 2 α -quinase 2 (EIF2AK2), a 2'-5'-oligoadenilato sintase (OAS), proteínas transmembranas induzidas por IFN (IFITM), polipeptídeo 1 que catalisa a enzima que

edita o RNAm da Apolipoproteína B (APOBEC1) e a família de moléculas que contêm motivos tripartites (TRIM) (McNab et al. 2015). Os ISGs são essenciais para montar um estado antiviral dentro de uma célula hospedeira e podem amplificar a atividade de outros componentes da resposta imune na defesa contra vírus (Crosse et al. 2018). Além disso, os IFNs ativam a RNase L do hospedeiro que gera um estado de proteção intracelular para degradar o genoma viral (Jahun et al. 2021).

Até o momento, na infecção pelo NoV as seguintes moléculas parecem estar envolvidas na resposta imune antiviral: MDA5, RIG-I, TLR2 e TLR7, IRF1,3 e 7, IFNI/III (na célula infectada), e as proteínas STAT1/2 (via JAK/STAT) nas células parácrinas que estimulam a produção de ISG para evitar a replicação do NoV.

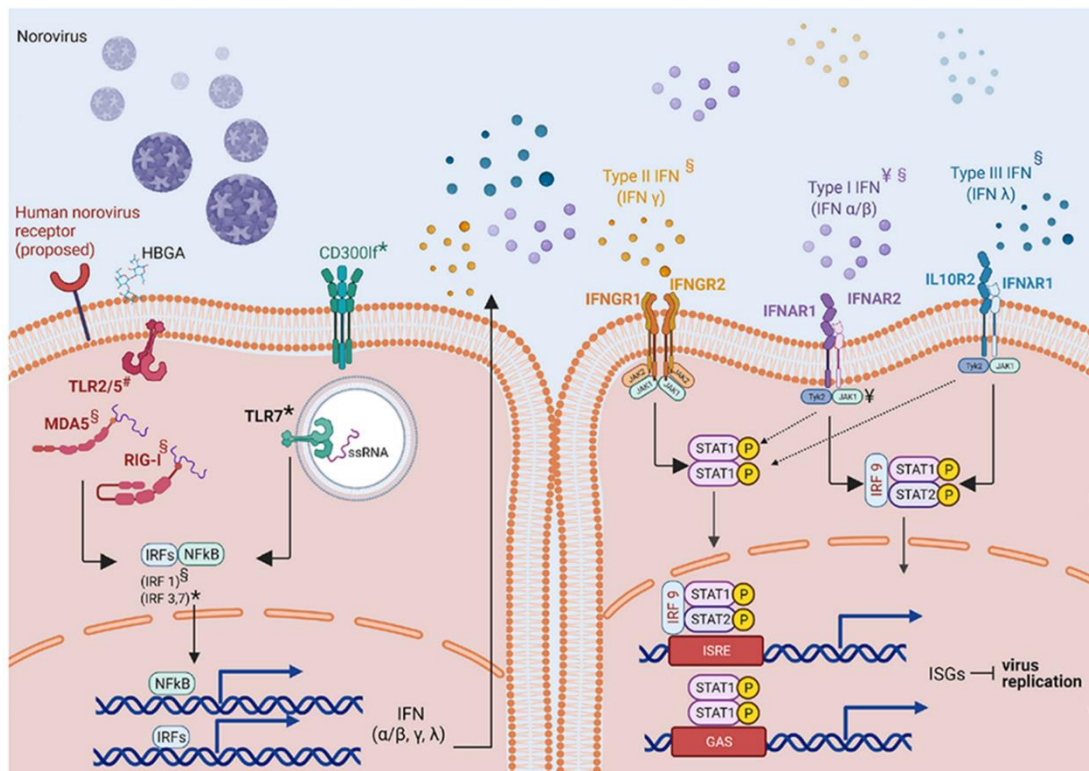


Figura 5: Imunidade inata antiviral dirigida contra infecção pelo NoV humano e murino. Os receptores para os NoV são diferentes, mas uma vez que o vírus infecta a célula alvo ativam as proteínas MDA5 e RIG que levam à produção de interferons (α e β). A ação parácrina desses interferons produzidos pela infecção do NoV induzem uma diminuição de replicação viral no tecido intestinal. **Fonte:** Mboko et al. 2022.

O NoV possui mecanismos importantes da evasão na resposta imune inata e adaptativa. Nesse sentido, é possível destacar os seguintes mecanismos/eventos: 1) a proteína VP2 que impede que os macrófagos infectados aumentem a expressão de

moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) e moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 e CD40, impedindo assim, a indução de mediadores críticos da resposta imune, incluindo células T CD4⁺ e anticorpos antivirais; 2) a VP1 bloqueia a indução de citocinas antivirais críticas em células infectadas, incluindo o IFN-I, aumentando a virulência durante o processo infeccioso; 3) as proteínas não-estruturais p48 e p22, que inibem a tradução proteica nas células do hospedeiro; 4) a proteína NS3 que inibe a indução de IFN ao redistribuir o GEF-H1 do hospedeiro, provavelmente, inibindo a expressão e co-localização dos PRR; 5) as proteínas NS1/2 e NS4 que promovem o desmantelamento do aparelho de Golgi e a interrupção do tráfego retículo endoplasmático-Golgi, prejudicando assim, as vias secretoras celulares utilizadas para a liberação de IFN; 6) a proteína NS1 que promove a persistência viral nas células epiteliais intestinais mediante a neutralização da sinalização dos IFN-III nas células infectadas e, 7) a proteína NS6 que cliva a proteína de união e às poly(A) (PABP) e as proteínas VPg e/ou NS3 além de sequestrar G3BP1 em complexos de replicação, contribuindo potencialmente para o comprometimento da tradução dos ISGs (Jahun et al. 2021).

1.1.5. PATOGÊNESE VIRAL

A falta de um sistema de cultura viável, robusto e reprodutível, durante 50 anos foi uma grande barreira para conhecer melhor os aspectos biológicos do NoV. Nesse sentido, e considerando a mimetização da infecção em humanos, o cultivo de enteróides intestinais é uma alternativa interessante (Nguyen et al. 2010; Estes et al. 2019). Apesar disso, embora este sistema seja cada vez mais utilizado na atualidade, ele não permite esclarecer alguns aspectos como a contribuição de diferentes componentes imunes na infecção viral, por exemplo.

Até o momento, sabe-se que a interação do NoV com o hospedeiro depende, dentre outros fatores, da presença de HBGA no epitélio intestinal (Cantelli et al. 2020). A síntese destes HBGAs requer o uso de várias fucosil e glicosiltransferases codificadas pelos genes *Fut2*, *Fut3* e *Abh*. Os polimorfismos nestes genes variam consideravelmente dependendo da etnia (Nordgren et al. 2019). Como é bem conhecido, a microbiota intestinal também pode expressar HBGA, sugerindo assim, que esta produção poderia servir como fator intermediário na suscetibilidade à infecção pelo NoV (Cannon et al.

2022). Os genótipos distintos de NoV possuem diferenças quanto ao espectro do HBGA ao qual se ligam, portanto, é possível que hospedeiros com uma alta diversidade de HBGA sejam mais susceptíveis à infecção por uma maior variedade de genótipos de NoV (Nordgren et al. 2016).

Por outro lado, os efeitos citopáticos da infecção pelo NoV demonstram que no intestino, ainda que não existam alterações histológicas significativas comparadas com outros patógenos, se tem evidenciado que existe um embotamento e encurtamento das microvilosidades. Alterações das ultraestruturas se tem observado como mitocôndrias aumentadas e pálidas (efeito celular condicionado pelo aumento da matriz intramitocondrial), perda das cristas mitocondriais e transição da identificação eletrodensa até electroesparça por acúmulo de água e espécies reativas de oxigênio, aumento da vacuolização citoplasmática e o surgimento de edema intracelular com leve infiltração inflamatória na lâmina própria. Essas alterações são associadas ao aumento do número de células T citotóxicas intraepiteliais no duodeno de pacientes infectados com NoV até seis dias após o início dos sintomas (Karst 2010).

1.2. TREM-1

Identificado no ano 2000, o receptor foi nomeado *triggering receptor expressed on myeloid cells 1* (TREM-1) por ter sido inicialmente identificado em neutrófilos e em monócitos (Bouchon et al. 2000). Posteriormente, ele foi descrito em células *natural killer* (NK) (Allcock et al. 2003), células dendríticas (Zangi et al. 2012; Wang et al. 2022), macrófagos peritoneais (Bouchon et al. 2001), células de Kupfer (Wu et al. 2012) e linfócitos T (Bleharski et al. 2003). Posteriormente, o TREM-1 também foi identificado em células não imunes como os hepatócitos (Nguyen et al. 2018), células endoteliais (Gibot et al. 2019), células epiteliais do estômago (Schmausser et al. 2008), células epiteliais dos brônquios (Liao et al. 2012), miofibroblastos (Schmausser et al. 2008), células do intestino (Saurer et al. 2017) e da pele (Dräger et al. 2017).

A família gênica do TREM está localizada no cromossomo humano 6p21 e no cromossomo 17C3 em camundongos. Nestes, além de codificar para TREM-1 e TREM-2, também há o TREM-3, com função semelhante ao TREM-1, embora esteja descrito em humanos como um pseudogene. Existem também os transcritos semelhantes ao TREM 1,

2, 3 e 4 (TLT-1/2/3/4) em humanos e em camundongos que são os TREM 1,2, 4 e 6 (TLT-1/2/4/6) (Klesney-Tait et al. 2007; Colonna 2023).

O TREM-1 é uma glicoproteína de membrana de 30 KDa com função de receptor que em sua região extracelular possui 194 aminoácidos (Carrasco et al. 2019). O domínio extracelular possui homologia com membros da superfamília das imunoglobulinas (Ig-SF) e possui o motivo Asp-X-Gly-X-Tyr-X-Cys, que corresponde à assinatura de um domínio Ig do tipo V. Neste segmento, encontram-se as regiões determinantes de complementaridade (CDR) (CDR1- alça BC; CDR2- alça C'C"; CDR3- alça FG) (Kelker et al. 2004), com grande importância no reconhecimento antigênico.

Como outros membros da Ig-SF, o TREM-1 possui uma cauda transmembranar curta, e em função disso, necessita de moléculas acessórias para desencadear a sinalização intracelular. Foi encontrado que proteína adaptadora DAP12 é a que se acopla ao TREM-1, codificada pelo gene *TYROBP/HCST* (Figura 6) (Kiialainen et al. 2005). Ela possui uma região extracelular mínima, constituída principalmente por um resíduo de cisteína que permite a criação de homodímeros de DAP12 que são ligados por pontes dissulfeto que tem um único domínio ITAM para desencadear a resposta intracelular mediada por TREM (Campbell et al. 1999).

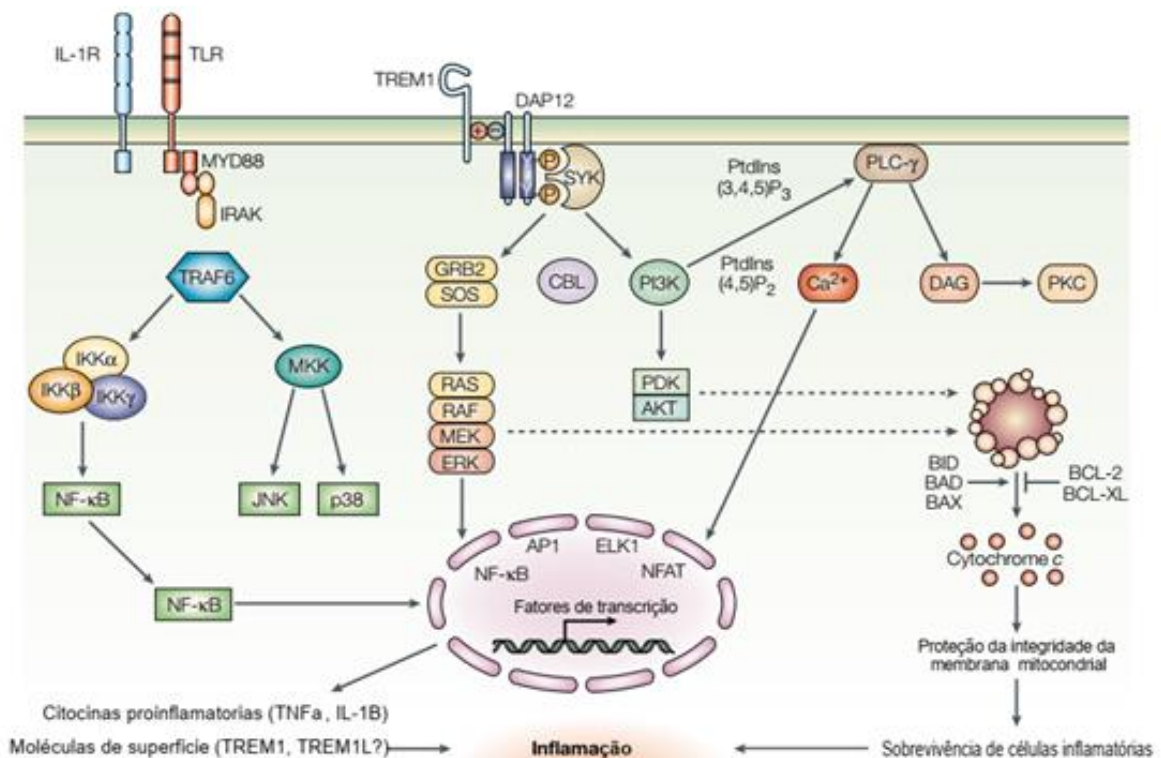


Figura 6: TREM-1: vias de sinalização. O receptor transmite um sinal, ativando as cascatas de fosforilação para gerar a resposta final, a qual é a amplificação da inflamação via transcrição de genes inflamatórios, e mantendo a sobrevivência celular por meio da integridade mitocondrial. **Fonte:** Colonna et al. 2003.

Após a interação do TREM-1 com os seus ligantes, dependendo da célula que o expressa, pequenas variações no perfil de sinalização intracelular podem ser observadas. Apesar de ter sido identificado em células imunes e não imunes, os tipos celulares mais explorados até o momento quanto à sinalização do receptor são monócitos e neutrófilos.

Em monócitos, a ativação das proteínas PLC e ERK, assim como a atividade das proteínas NTAL/LAB/LAT com posterior fosforilação de Grb2, c-Cbl e Sos, já foi descrita. Além disso, ocorre o aumento da concentração intracelular de cálcio. A ativação da via MAPK está associada ao aumento das proteínas p50 e p65/RelA, que são subunidades de NF- κ B (Tessarz et al. 2008). Enquanto na sinalização nos neutrófilos observa-se o recrutamento das proteínas Lyn, Jak2, PKB/Akt, ERK1/2 e NTAL com ativação subsequente dos fatores de transcrição STAT5, STAT3 e p65/RelA, que induzirão a produção de IL-8/CXCL8, mieloperoxidase (MPO), lactoferrina e espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à rápida degranulação de neutrófilos e estimulando a fagocitose. Os efeitos dessa sinalização levam à expressão e produção de quimiocinas (MCP-1/CCL2, MCP-3, MIP-1 α , IL-8) e TNF- α (Haselmayer et al. 2009; Suh et al. 2017).

Quanto à função deste receptor, o TREM-1 é definido como um potente amplificador da resposta inflamatória em sinergia com os receptores TLRs (TLR2, TLR4 e TLR7/8) e NLR (NACHT-LRR) que levam a aumento da sobrevivência da célula inflamada (Arts et al. 2011; Prüfer et al. 2014; Zysset et al. 2016; Liu et al. 2019) e geração das respostas celulares mediadas pela ativação de proteases citoplasmáticas e de membrana (Li et al. 2019). Este estado celular está correlacionado com o mau prognóstico na doença inflamatória intestinal (Prins et al. 2019), sepse (Nathan et al. 2001), artrite reumatoide (Kuai et al. 2009), aterosclerose (Joffre et al. 2016), câncer (Saurer et al. 2017) e fibrose (Peng et al. 2016).

1.2.2. TREM-1 EM INFECÇÕES VIRAIS

Nas infecções virais, tem-se observado que existe aumento da transcrição gênica de *Trem1*, assim como a geração do fragmento solúvel do TREM-1 (sTREM-1) (**Figura 7**) (Roe et al. 2014). Como o TREM-1 é uma glicoproteína integral de membrana, ele é ativado quando entra em contato com seus ligantes. Dessa forma, existe um aumento quantitativo de TREM-1 nas membranas das células que estão sendo ativadas. Geralmente, este processo coincide com um estado de estresse e inflamação celular. Estes processos ativam as diferentes proteases celulares que estão acopladas nas membranas das células, sendo um dos alvos destas enzimas o TREM-1. Portanto, a avaliação de sTREM-1 tem sido utilizada como forma de avaliar o aumento da expressão e atividade celular do receptor em sua forma de membrana (Ford et al. 2009; Han et al. 2018).

Em neutrófilos expostos às glicoproteínas dos vírus Marburg e Ebola observou-se aumento na expressão de *Trem1*, que foi acompanhada pelo aumento na produção das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, MIP-1 α/β , e das proteínas mieloperoxidase e lactoferrina (Mohamadzadeh et al. 2006). Quando células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram expostas à proteína gp41 do vírus da imunodeficiência humana (HIV), observou-se aumento da sobrevivência de macrófagos, sugerindo assim, a utilização do receptor como mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro e como facilitador do processo de replicação viral ao manter a viabilidade celular pela integridade das mitocôndrias (Denner et al. 2013; Campbell et al. 2019). De forma semelhante, utilizando o vírus da hepatite C (HCV) para estimular macrófagos e células de Kupffer (KC), observou-se aumento da expressão de TREM-1. A contribuição do receptor na resposta antiviral foi reforçada quando o receptor foi silenciado, o que reduziu drasticamente a resposta inflamatória a esses vírus demonstrando que o TREM-1 aumenta a sobrevivência da célula em resposta à infecção, gerando maior reservatório viral (Hyun et al. 2019).

Além dos vírus já mencionados, o TREM-1 também foi apontado como importante na infecção causada pelo enterovírus-A71 (EV-A71), principalmente pela indução e co-expressão de *Cxcl3*, *Il1b* e *Il6* após seis horas de infecção (Amrun et al. 2020). Ainda, na infecção pelo vírus da Dengue (DENV), observou-se aumento de sTREM-1, que foi correlacionado com o estado hiper inflamatório característico da infecção causada por esse vírus (Ruiz et al. 2014). Apesar da descrição da

contribuição/participação do TREM-1 na infecção por diferentes vírus, nenhum estudo mostrou, até o momento sua participação na infecção pelo NoV.

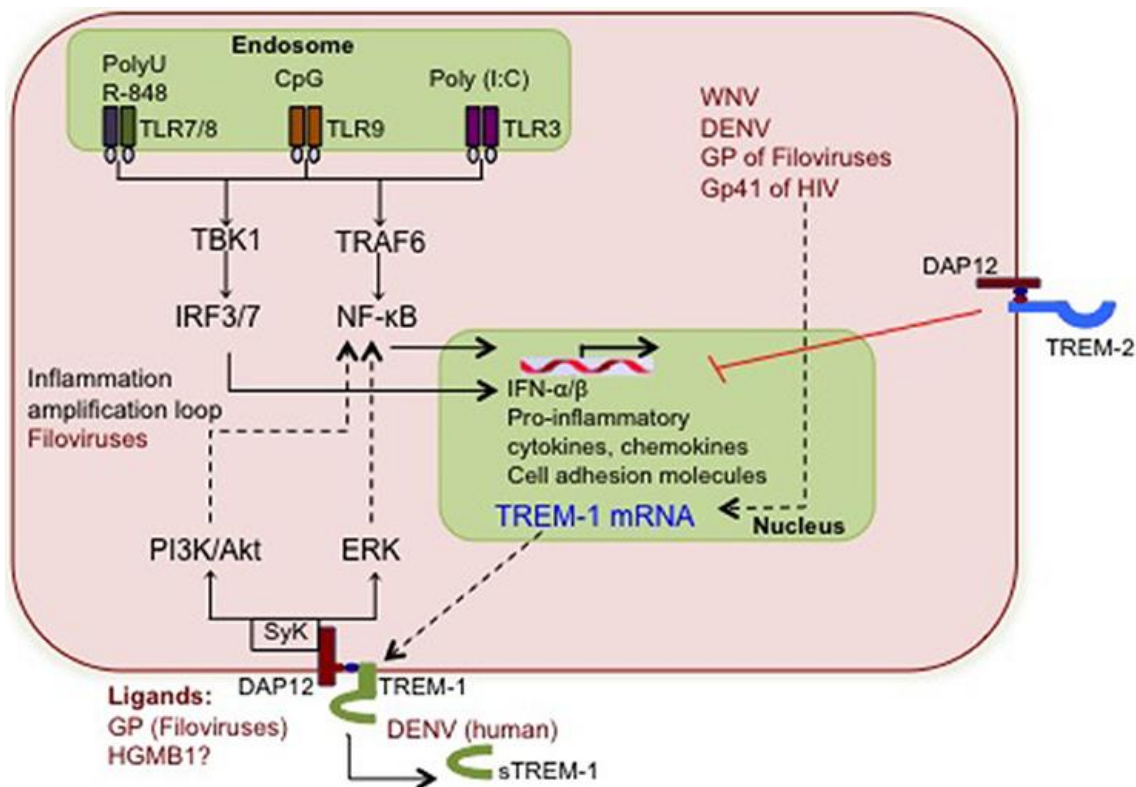


Figura 7: Respostas celulares geradas pelos ligantes virais nas células que expressam TREM-1. Estudos *in vitro* demonstraram que os PAMPs virais têm a capacidade de induzir uma resposta antiviral, e que a ativação da via TREM-1 leva a um aumento na transcrição do gene *Trem1*, principalmente nas primeiras horas de infecção. **Fonte:** Roe et al. 2014.

Como foi mencionado anteriormente, o principal receptor utilizado pelo NoV na infecção de células humanas é o HBGA (Villabruna et al. 2021). Embora a recente descoberta de receptores proteica para os MNoV sugere que, outras moléculas podem estar contribuindo no processo de interação dos NoV com as células do hospedeiro (Taube et al. 2018). Observou-se que diferentes cepas dos MNoVs (CW3, CR6 e S7) utilizavam o receptor CD300lf para fixação, entrada e replicação tanto *in vitro* quanto *in vivo* (roedores) (Taube et al. 2018).

Os vírus que são não envelopados, como os NoV, podem entrar no citosol penetrando diretamente na membrana plasmática, ainda que para isso sejam necessárias interações específicas com as moléculas da célula hospedeira (Thorley et al. 2010). Diferentes tipos de células hematopoiéticas e epiteliais, incluindo células

enteroendócrinas, têm sido selecionadas para estudar a infecção pelo NoV *in vitro* (Graziano et al. 2019). No entanto, devido à falta de um sistema eficiente de cultura de células ou de um modelo animal que mimetize de forma fidedigna a infecção pelo NoV, juntamente com limitações importantes para gerar estoques virais em concentrações suficientes, a melhor compreensão da interação do NoV com possíveis correceptores fica bastante comprometida. O que limita sobretudo a capacidade de identificar o papel biológico de outros receptores nesse contexto (Taube et al. 2012; Bhar & Jones 2019).

O que se conhece da interação viral do NoV é, que a ligação ligante-receptor é relativamente fraca; no caso dos NoV é de 1–5 kcal/mol ou K_d de 0,1–5 mM, quando se ligam a glicosíngolipídeos. Parece que a formação de ligações múltiplas resulta em uma fixação suficientemente forte das partículas virais às membranas celulares. Não entanto, o aumento da avidéz resultante de múltiplos sítios de ligação ao receptor nas partículas virais, muitas vezes garante uma ligação quase irreversível em células suscetíveis e sua consequente infecção. Em teoria, acredita-se que existe uma ligação das proteínas virais em distintas proteínas receptoras, que ainda são desconhecidas. Estas ligações podem estar ativando diferentes vias de sinalização que facilitam o ingresso do vírus na célula (Parveen et al. 2019).

Embora a suscetibilidade à infecção pelo NoV esta correlacionada com a expressão dos HBGAs no intestino do hospedeiro, a ligação do vírus com os HBGA não pode só explicar o tropismo do NoV por estas células (Villabrúna et al. 2021). Embora os HBGAs desempenhem um papel importante no processo de infecção, a incapacidade de infectar produtivamente as células permissivas portadoras de HBGA na sua superfície celular e a recente descoberta de receptores de entrada proteica para os MNoV, sugerem a existência de outros fatores adicionais de ligação e/ou de entrada para os NoV (Taube et al. 2018).

Contudo, a proteína do capsídeo principal VP1 possui a característica desafiante própria dos vírus RNA; que dada as taxas de mutações, especificamente no segmento P2 da proteína VP1 do NoV, estas mudanças se associam à infectividade e antigenicidade do vírus. Anteriormente, foi sugerido que o gene *VP1* de NoV evoluiu rapidamente, resultando em grande divergência de antigenicidade (Saito et al., 2020). Análises filogenéticas mostraram que o GII.4 criou continuamente *clusters* geneticamente diferentes, o que resultou no surgimento de muitas variantes. Em efeito, quando aumentam o número das mutações mudam as especificidades de ligação com os HBGAs, que podem ser reduzidas ou alteradas (Motoya et al. 2017).

O CD300lf murino foi identificado como um receptor para o domínio P da cepa CW3 de MNoV (Nelson et al. 2018). Ainda, o CD300lf murino parece ser suficiente para explicar o tropismo pelas células imunes presentes nos tecidos imunes associados às mucosas (MALT) para MNoV (Orchard et al. 2016).

É importante ressaltar que o CD300 compartilha semelhanças estruturais e evolutivas com outros receptores pertencentes à Ig-SF, como o TREM-1. Nesse sentido, um estudo de transcriptômica que revelava dados provenientes de um modelo de infecção murina pelo MNoV, mostrou um aumento na expressão de genes envolvidos na ativação da via de TREM-1 nas primeiras 12 horas pós-infecção (Levenson et al. 2018), demonstrando que o TREM-1 tem a sua participação nas primeiras etapas da infecção viral. Existem também outras características compartilhadas entre TREM-1 e CD300 que incluem: domínio Ig, homodimerização e heterodimerização do receptor, transdução de sinal intracelular e interações com outras vias de sinalização. Além disso, em função de uma provável ancestralidade molecular, acredita-se que eles poderiam reconhecer ligantes ou classes de ligantes similares (Cannon et al. 2012).

Diante do exposto, fica evidente que aspectos da interação do NoV com o hospedeiro, bem como da provável existência de receptores e/ou vias ainda inexplorados nessa relação. Teoricamente, o sistema imunológico seleciona regiões distais da proteína P2 dos NoV, assim como em alguns resíduos de P1 expostos na superfície, permitindo assim, o escape imune e a amplificação de (novas) cepas (Donaldson et al., 2010). Provavelmente, essas novas cepas contêm epítomos antigênicos e mudanças estruturais inovadoras na proteína do capsídeo, que em conjunto, podem contribuir para o escape da resposta imune e a maneira como eles interagem com os receptores (Donaldson et al. 2010).

Em função do desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, a identificação de interações proteína-proteína (IPP), ampliou a compreensão das funções biológicas e os mecanismos pelos quais as IPP afetam as funções de uma célula. Nas últimas décadas, as abordagens baseadas em aprendizado de máquina (*machine learning*) têm crescido substancialmente, especialmente na análise de sequência de aminoácidos, perfis evolutivos, propriedades físico-químicas e informações de estrutura dos pares de proteínas (Khatun et al. 2020).

As interações IPP entre os receptores das células humanas e as proteínas antigênicas dos vírus são um ponto de entrada crucial para decifrar relações complicadas. Nesse sentido, tem-se buscado desenvolver modelos preditivos com objetivo de acelerar drasticamente a integridade e a solidez da rede IPP humano-vírus, o que contribui para uma melhor compreensão dos mecanismos de infecção viral, descoberta de receptores, investigação de tropismo de células hospedeiras e resposta imune (Lian et al. 2021). Devido às limitações de cultivo do NoV, bem como do papel do TREM-1 na infecção de alguns vírus, abordagens computacionais surgem como alternativas promissoras para elucidar a ocorrência de interações entre o vírus e este receptor.

1.3. FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE VÍRUS E HOSPEDEIRO

1.3.1. TRANSCRIPTÔMICA

O transcriptoma é definido como o conjunto de transcritos de uma célula e ele sofre influência do tipo celular e as condições às quais elas são submetidas. Para obter este perfil, utiliza-se o sequenciamento de RNA (RNAseq) que é uma tecnologia que utiliza sequenciamento de próxima geração de alto rendimento (Behera et al. 2021). A aplicação mais comum de RNAseq é estimar a expressão de genes e transcrições. Esta aplicação é baseada, principalmente, no número de leituras que mapeiam cada sequência de transcrição. As contagens brutas de leitura sozinhas não são suficientes para comparar os níveis de expressão entre as amostras, pois esses valores são afetados por fatores como duração da transcrição, número total de leituras e tendências de sequenciamento (Conesa et al. 2016).

A análise da expressão diferencial requer que os valores obtidos da expressão gênica sejam comparados entre as amostras. Essas abordagens dependem de métodos de normalização que são baseados em contagens totais ou efetivas; e tendem a ter um desempenho ruim quando as amostras têm distribuições de transcritos heterogêneas, ou seja, quando características altamente e diferencialmente expressas podem distorcer a distribuição de contagem (LaRosse et al. 2013).

Como a quantificação de sequências de RNA é baseada em contagens de leitura que são absolutas ou atribuídas às transcrições, as primeiras abordagens para calcular a

expressão diferencial usaram distribuições de probabilidade discretas, como Poisson ou binomial negativa. A distribuição binomial negativa (também conhecida como distribuição gama-Poisson) é uma generalização da distribuição de Poisson, permitindo variação adicional (chamada superdispersão), além da variação esperada da amostragem aleatória de um conjunto de moléculas que são características dos dados de RNA-seq. No entanto, o uso de distribuições discretas não é necessário para análise precisa da expressão diferencial, desde que a variação de amostragem de pequenas contagens de leitura seja levada em consideração (Srivastava et al. 2019). Este tipo de estudo ajuda a identificar quais genes poderiam estar aumentados ou diminuídos sob distintas condições, sejam *in vitro*, *in vivo* ou valores que podem obter-se e estudar *in silico*. Isto seria o reflexo ou o estado de produção gênica e a polarização da atividade das células em estudo.

1.3.2. DOCKING MOLECULAR

Este é um método para estimar a interação entre macromoléculas, como proteínas e moléculas pequenas, como ligantes (Arjmand et al. 2022). O processo de *docking* envolve duas etapas básicas: previsão da conformação do ligante, bem como sua posição e orientação nas estruturas (geralmente referido como pose) e avaliação da afinidade de ligação. Além disso, pode-se obter informações sobre os sítios por comparação da proteína-alvo com uma família de proteínas que compartilham uma função semelhante ou com proteínas co-cristalizadas com outros ligantes (Meng et al. 2011).

Esta técnica pode ser classificada em ensaio rígido e flexível. Existe outra modalidade no ensaio rígido que o ligante pode ser flexível, chamado também semiflexível. O encaixe do corpo rígido produz muitas conformações encaixadas com complementaridade de superfície favorável, seguidas pela reclassificação das conformações, usando a energia livre de aproximação. A orientação inicial do ligante dentro do sítio de ligação é determinada por um método de detecção de clique máximo baseado na compatibilidade de distância. As características são representadas na forma de esferas e são agrupadas como poses. O encaixe é considerado bem-sucedido se a ligação de um ligante em seu sítio ativo estiver mais próxima do que um determinado limite da solução de raios-X (Pagadala et al. 2017).

Para o *docking* molecular, utilizam-se estruturas modeladas das proteínas de interesse. Existem duas abordagens gerais para prever a estrutura de uma proteína de

interesse (o 'alvo'): modelagem baseada em modelo, conhecida como modelagem por homologia, na qual a estrutura previamente determinada de uma proteína relacionada é usada para modelar a estrutura desconhecida do alvo; e modelagem sem modelo, que não depende de semelhança global com uma estrutura no *Protein Data Bank* (PDB) e, portanto, pode ser aplicada às proteínas com novas dobras, conhecida como rosqueamento ou *threading*. As etapas da modelagem baseada em modelo padrão incluem a seleção de um modelo estrutural adequado; alinhamento da sequência alvo com a estrutura do modelo; e modelagem molecular para contabilizar mutações, inserções e deleções presentes no alinhamento alvo-molde. Modelos estreitamente relacionados podem ser detectados usando métodos de pesquisa de sequência única, como BLAST, para varrer as sequências PDB. Para sequências de proteínas alvo que são apenas distantemente relacionadas a proteínas de estrutura conhecida, podem ser necessárias abordagens mais sofisticadas que dependem de vários modelos e executam amostragem conformacional agressiva de estrutura principal (Kuhlman et al. 2019).

Por outro lado, o método de rosqueamento, é um método de reconhecimento de dobras, que seleciona a dobra mais semelhante para uma dada sequência alvo de várias alternativas. Uma análise detalhada das estruturas determinadas até agora mostra que o número de dobras diferentes adotadas pelas estruturas das proteínas é limitado por natureza. Quando a identidade de sequência é inferior a 25%, a chance de se obter modelos homólogos é drasticamente reduzida e, portanto, técnicas de reconhecimento de dobras são usadas para encontrar relações estruturais mais sensíveis. Os métodos de reconhecimento de dobras realizam comparações de estrutura de sequência para procurar uma proteína com uma dobra semelhante ao alvo. A estrutura da proteína assim obtida é usada como modelo para construir um modelo 3D para o alvo. Esses métodos comparam a sequência de consulta com uma biblioteca de dobras conhecidas (Jisna et al. 2021).

Uns dos valores para avaliar o resultado do *docking* molecular é a energia livre de ligação. Os processos físicos que governam a associação de proteínas são as interações de Van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e mudanças entrópicas. Esses processos podem ser modelados com abordagens precisas, mas computacionalmente caras, como a dinâmica molecular (DM). Como alternativa, pode-se usar abordagens empíricas para prever as energias livres de ligação da estrutura tridimensional (3D) do complexo (Vreven et al. 2012).

A estimativa da energia livre de ligação pode ser obtida *in silico* pelo método MM/GBSA que permite analisar as contribuições de energia livre por resíduo. O MM/GBSA calcula a energia livre de acordo com a equação: $\bar{G} = TS_{MM} - \bar{G}_{XBSA} + E_{MM}$. Onde, \bar{G} é a energia livre média prevista, TS_{MM} é a entropia do soluto que pode ser calculada por análise quase harmônica da trajetória ou análise de modo normal (Srinivasan et al. 1998), \bar{G}_{XBSA} são as contribuições polares e não polares das energias livres de solvatação tipicamente obtidas resolvendo a equação PB ou usando o modelo GB. E, o E_{MM} é a energia mecânica molecular média: $E_{MM} = E_{bond} + E_{angle} + E_{torsion} + E_{vdW} + E_{elec}$, onde, estes correspondem à ligação, ângulo, torção, van der Waals e energias eletrostáticas no campo de força da mecânica molecular (Kollman et al. 2000).

O ΔG para associação ligante-proteína pode ser calculado usando a equação: $\Delta G = \bar{G}_{complex} - \bar{G}_{ligand} - \bar{G}_{protein}$. Embora os métodos MM-PB(GB)SA possam ser úteis para reavaliar as poses de ancoragem, eles ignoram a entropia das moléculas de água no local de ligação antes e depois da ligação do ligante e as mudanças estruturais na macromolécula e no ligante após a ligação. Além disso, a precisão dos resultados ΔG depende fortemente de detalhes no método, especialmente as cargas, o método de solvatação contínua, a constante dielétrica, o método de amostragem e as entropias (Genheden & Ryde 2015).

1.3.3. DINAMICA MOLECULAR (DM)

As simulações de DM se baseiam na predição de como cada átomo de uma proteína ou de outro sistema molecular se moverá ao longo do tempo com base em um modelo geral da física que governa as interações intermoleculares. Essas simulações podem capturar uma ampla variedade de processos biomoleculares importantes, incluindo mudança conformacional, união de ligantes e acoplamento de proteínas, revelando as posições de todos os átomos na resolução temporal em nanosegundos (ns). É importante ressaltar que tais simulações também podem prever como as biomoléculas responderão – em nível atômico – com sítios fosforilados, protonação de moléculas ou adição ou remoção de um ligante. Estas simulações são frequentemente usadas em combinação com uma ampla variedade de técnicas experimentais de biologia estrutural que envolve o uso de estrutura obtidas por cristalografia de raios X, microscopia crioeletrônica (crio-EM) e ressonância magnética nuclear (Hollingsworth e Dror, 2018).

O princípio de uma simulação de DM se baseia em prever a força do movimento de cada átomo em um sistema biomolecular com valores físico-químicos definidos como pressão, temperatura, presença de moléculas de água e sais. Pode-se, portanto, usar as leis de Newton para prever a distribuição espacial de cada átomo em função do tempo. A trajetória resultante é, em essência, um filme tridimensional que descreve o nível atômico da configuração de um sistema biológico em todos os pontos durante a simulação em um intervalo de tempo. Como vantagem, tem-se a captura da posição e o movimento de cada átomo em cada ponto do tempo, o que é muito difícil com qualquer técnica experimental. Também pode-se controlar a conformação inicial de uma proteína, quais ligantes estarão ligados a ela, se ela tem alguma modificação estrutural, quais outras moléculas estão presentes em seu ambiente, seu estado de protonação, a temperatura, a voltagem através de uma membrana e assim por diante. Ao comparar simulações realizadas sob diferentes condições, pode-se identificar os efeitos de uma ampla variedade de perturbações moleculares. As forças em uma simulação DM são calculadas usando um modelo conhecido como campo de força da mecânica molecular. Além disso, em uma simulação de DM clássica, nenhuma ligação covalente se forma ou quebra (Mouvet et al. 2022).

Em algumas situações, como aquelas envolvendo o desenvolvimento de ligantes e proteínas, as simulações de DM são usadas simplesmente como um filtro relativamente barato, para obter valores de energia de ligação ou estabilidade de um conjunto de candidatos que as interações *in vivo* não permitirão conhecer. No entanto, simulações são usadas para gerar uma compreensão qualitativa de como uma biomolécula ou medicamento funciona. Geralmente, nestes casos, não está disponível um experimento que pode fornecer todas as mesmas informações que as simulações. Estes experimentos podem, no entanto, ser projetados para testar previsões específicas dessas simulações para mais amplamente validar os resultados da simulação. Por último, mas não menos importante, essas simulações podem gerar hipóteses que levam a novos estudos experimentais (Hollingsworth e Dror, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Mundialmente, o NoV é reconhecido como a principal causa de DDA em adultos com elevada taxa de morbidade. Apesar de sua importância para a saúde pública e do avanço sobre o entendimento dos eventos fisiopatológicos na infecção associada a esse vírus, ainda existem limitações no entendimento das interações com o hospedeiro. Nesse sentido, a escassez de estratégias para estudar o vírus *in vivo/in vitro*, por tratar-se de um vírus fastidioso, limitam sobremaneira o entendimento da resposta imune contra ele, mais especificamente, como ele pode interagir e ser reconhecido pelos receptores imunes. Nesse sentido, a utilização de estratégias de bioinformática pode ajudar na ampliação do conhecimento específico sobre a resposta imune ao NoV.

Recentemente, foi descrito que a proteína VP1 do MNoV utiliza a proteína CD300lf para infectar as células intestinais e realizar a replicação. Como o CD300lf e o TREM-1 compartilham características estruturais e evolutivas, acreditamos que o TREM-1 possa representar componente importante na imunopatologia da infecção pelos MNoV e NoV. Ainda, considerando a função do TREM-1 como amplificador dos sinais intracelulares desencadeados por outros receptores imunes, e consequentemente, da ativação da resposta inflamatória, é possível acreditar que ele possa contribuir nos eventos celulares em resposta à infecção pelo MNoV/NoV. Apesar da detecção direta na expressão de TREM-1 no desenvolvimento e agravamento de infecções virais distintas, existe uma lacuna no conhecimento sobre o estudo do NoV, que até não foi abordada a sua relação com o TREM-1. Dessa forma, avaliar uma possível interação *in silico* entre a proteína estrutural VP1 dos MNoV e NoV e o TREM-1, poderá ampliar o conhecimento específico sobre a fisiopatologia do vírus, bem como servir como base para o desenvolvimento de estratégias de tratamento e/ou vacinas, indisponíveis até o momento para esse vírus.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão gênica de *Trem1* em infecções por MNoV e determinar a interação *in silico* entre o TREM-1 e a proteína VP1 dos MNoV e NoV.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Examinar os dados de transcriptoma provenientes de estudos experimentais disponibilizados em banco de dados públicos referentes a infecção pelo MNoV que avaliaram a expressão de *Trem1/Trem3*, assim como os genes envolvidos na via de ativação de TREM-1 e resposta antiviral.
- Obter sequências da proteína VP1 baseadas na análise filogenética pela diversidade gerada na pressão seletiva do NoV GII.4 nos diferentes surtos mundiais.
- Determinar os sítios de interação entre o TREM-1 com as VP1 em infecção causada por MNoV e NoV mediante ensaios de *docking* molecular e dinâmica molecular.
- Estabelecer as regiões de complementariedade de diversidade (CDRs) que formam parte do receptor TREM-1 murino e humano que contribuam para o reconhecimento de proteínas virais modeladas.
- Determinar a possível contribuição do TREM-1 como correceptor para o NoV e desencadeador das diferentes formas de morte celular.

4. MÉTODOS

4.1. INTERPRETAÇÃO DE DADOS DE TRANSCRIPTÔMICA

Dados referentes à expressão gênica na infecção pelo NoV (MNoV e NoV), foram buscados em bancos de domínio público. Para isso, os seguintes sites foram utilizados: *ArrayExpress* (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>), *Gene Expression Omnibus* (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) e *OMiCC* (<https://omicc.niaid.nih.gov>), com os seguintes critérios de seleção: a) estudos que tivessem o valor da expressão do gene *Trem1* e b) expressão de genes relacionados à via de ativação de TREM-1 (*Actb*, *Akt1*, *Casp1*, *Casp5*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl7*, *Cd40*, *Cd83*, *Cd86*, *Cirp*, *Clec5a*, *Csf2*, *Cxcl3*, *Cxcl8*, *Defb4a*, *Fcgr2a*, *Fcgr2b*, *Fcgr2c*, *Fpr1*, *Grb2*, *Hmgb1*, *Icam1*, *Il10*, *Il18*, *Il1b*, *Il1rl1*, *Il6*, *Irak1*, *Itga5*, *Itgax*, *Itgb1*, *Jak2*, *Lat2*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mpo*, *Myd88*, *Nfkb1*, *Nfkb2*, *Nod2*, *Pglyrp1*, *Sigirr*, *Stat3*, *Stat5a*, *Stat5b*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Tlr8*, *Tnf*, *Trem2*, *Trem11*, *Trem12* e *Tyrobp*) (Tammamo et al. 2017). Além disso, foram considerados os genes que estão classicamente definidos na resposta imune inata antiviral (*Nod1*, *Nod2*, *Nlrc3*, *Nlrc4*, *Nlrc5*, *Nlrp1*, *Nlrp10*, *Nlrp1b*, *Nlrp3*, *Fos*, *Fosb*, *Jun*, *Junb*, *Jund*, *Batf2*, *Memo1*, *Nfkb2*, *Nfkbia*, *Nfkbib*, *Nfkbid*, *Nfkbie*, *Nfkbil1*, *Nfkbiz*, *Nfrkb*, *Traf1*, *Traf2*, *Traf3*, *Traf3ip1*, *Traf3ip2*, *Traf3ip3*, *Traf4*, *Traf5*, *Traf6*, *Traf7*, *Irf1*, *Irf2*, *Irf2bp1*, *Irf2bp2*, *Irf3*, *Irf4*, *Irf5*, *Irf7*, *Irf8*, *Irf9*, *Gsdmd* e *Ciita*).

As Unidades Por Expressão (UPE) de cada gene foram obtidas do arquivo .cvs que era lido em um arquivo .txt e colado em um documento de *Microsoft Excel* ©. Para evitar interpretação errônea dos dados, os valores foram normalizados mediante função logarítmica com base 2 (LOG: gene/2). Para isso, calculou-se o \log_2 (*fold-change*) que é a relação logarítmica dos valores de expressão de um gene ou transcrição sobre duas condições diferentes (tratamento e controle). No mesmo sentido, foi obtido o valor de *p* baseado no valor médio da expressão dos genes para cada condição estudada determinado pelo teste *t* de Student (Dalman et al. 2012). Todos os genes foram representados sob a forma de *Volcano plot* utilizando o programa *TBtools* (Cheng et al. 2023). Também foram agrupados em *clusters* mediante gráficos de Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando o software *OriginsLab* versão 2022. Para a dinâmica de expressão de *Trem1* foi utilizado o teste F de Fisher considerando os dados submetidos ao banco de dados pelos responsáveis por cada estudo. Também o diagrama de *Venn* (<https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/example.html>) foi considerado para apresentar

graficamente um conjunto de genes associados que estiveram coexpressos nos estudos de transcriptômica.

Uma vez que foi identificada a expressão do gene *Trem1*, buscou-se relacionar a expressão dos genes envolvidos em sua via com tipos de morte celular associadas a infecção pelo NoV (piroptose e apoptose). Todos os genes que apareceram como aumentados nas vias da piroptose a apoptose foram submetidos ao servidor *STRING* (https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bFW74pWjdjMI&input_page_show_search=on). As relações de co-expressão se basearam no método meio de confiança (0.400) (estabelecido pelo servidor) para obter os *scores* mínimos de interação. Em seguida, foi utilizado o *Cytoscape* (<https://cytoscape.org/>) para gerar as redes de relação de interação na expressão de *Trem1* e as vias de sinalização que são características nos processos de inflamação. Foi utilizado o valor do $\log_2(\text{fold-change})$ nesta análise para criar associações baseadas nas quantificações da expressão.

Os genes considerados na via da piroptose foram: *Nod1*, *Ripk2*, *Ikkbg*, *Ikbka*, *Ikkbb*, *Nfkbib*, *Nfkbia*, *Nfkb1*, *Rela*, *Il1b*, *Il18*, *Il6*, *Tnf*, *Il8*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Ccl2*, *Ccl5*, *Camp*, *Defa*, *Defb4*, *Defb103*, *Nod2*, *Map3k7*, *Map3k7ip1*, *Map3k7ip2*, *Map3k7ip3*, *Erk*, *Jnk*, *P38*, *Jun*, *Atg16l1*, *Atg5*, *Atg12*, *Gabarap*, *Map1lc*, *Sugt1*, *Sharpin*, *Rbck1*, *Rnf31*, *Xiap*, *Card6*, *Trip6*, *Erbin*, *Birc2*, *Birc3*, *Traf2*, *Traf5*, *Traf6*, *Card9*, *Tnfaip3*, *Mavs*, *Traf3*, *Tbk1*, *Ikkbe*, *Tank*, *Irf3*, *Irf7*, *Ifna*, *Ifnb*, *nlr1*, *Antxr*, *Nlrp1*, *Pycard*, *Casp1*, *Bcl2*, *Bcl2l1* e *Ctsb*; e na via de apoptose foram os genes *Tnfrsf10a*, *Tnfsf10*, *Tnfrsf10b*, *Tnfsf6*, *Tnfrsf6*, *Fadd*, *Tnf*, *Tnfrsf1a*, *Tradd*, *Cflar*, *Casp8*, *Casp10*, *Casp6*, *Casp3*, *Casp7*, *Bid*, *Bax*, *Bak*, *Diablo*, *Sept4*, *Htra2*, *Cyc*, *Apaf1*, *Casp9*, *Prf1*, *Gzmb*, *Tuba*, *Mcl1*, *Actb*, *Spta*, *Lmna*, *Lmnb*, *Parp1*, *Parp2*, *Dffa*, *Dffb*, *Endog*, *Aifm1*, *Ern1*, *Traf2*, *Itrp1*, *Itrp2*, *Itrp3*, *Capn1*, *Capn2*, *Casp12*, *Eif2ak3*, *Eif2s1*, *Atf4*, *Ddit3*, *Ctsb*, *Ctsc*, *Ctsd*, *Ctsf*, *Ctsh*, *Ctsk*, *Ctsl*, *Ctso*, *Ctss*, *Ctsl2*, *Ctsw*, *Ctsz*, *Birc3*, *Xiap*, *Birc5*, *Bcl2l11*, *Bcl2l1*, *Bcl2*, *Daxx*, *Ripk1*, *Dab2ip*, *Map3k5*, *Jnk*, *Bad*, *Jun*, *Fos*, *Tp53*, *Hrk*, *Map3k14*, *Ikbka*, *Ikkbb*, *Ikkbg*, *Nfkbia*, *Nfkb1*, *Rela*, *Ptpn13*, *Gadd45*, *Traf1*, *Bcl2a1*, *Atm*, *Lrdd*, *Tp53aip1*, *Bbc3*, *Pmaip1*, *Casp2*, *Ngfb*, *Ntrk1*, *Il3*, *Il3ra*, *Csf2rb*, *Pik3ca*, *Pik3cb*, *Pik3cd*, *Birc2*, *Parp4*, *Parp3* e *Actg1*. A lista de genes a serem estudados foi obtida do KEGG *pathways* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

4.2. OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS PROTEICAS

Considerando os resultados dos dados da análise transcriptômica, procedeu-se a avaliação de uma possível interação *in silico* entre a proteína antigênica VP1 do MNoV e a isoforma de TREM-1 murino mediante *docking* molecular. Para estimar as interações, o servidor *RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB)* (<https://www.rcsb.org/>) foi usado para procurar os arquivos digitais das estruturas bioquímicas das proteínas-alvo deste ensaio.

Nesse sentido, foi utilizado o arquivo **3LQE**, que é a estrutura 3D do domínio P da proteína VP1 do MNoV cepa CW1 [(GV/MNV1/2002/USA)] obtida por difração de raios-x (Taube et al. 2010). Os critérios que condicionaram a escolha desta estrutura foram: a) qualidade aceitável de resolução: valores de distância molecular até 2.00 Å (Å: Angstrom); b) presença de uma só cadeia nomeada como A ou monômero B e, c) a estrutura cristalografada só tem o domínio P da proteína viral (228–539 aminoácidos) (Kelker et al. 2004). Também foi encontrado o arquivo digital **1U9K** representando a estrutura 3D da proteína TREM-1 de *Mus musculus* obtida por difração de raios-x (Kelker et al. 2004). Os critérios que condicionaram a escolha desta estrutura foram: a) boa qualidade resolução: 1.76 Å; b) presença de uma só cadeia nomeada como B ou monômero B e, c) a estrutura cristalografada só possuía o domínio de imunoglobulina (*Ig like*) (114 aminoácidos [25-133]). Neste domínio da proteína se encontram os CDR: CDR1 N44–N50; CDR2 Q71–79 e CDR3 Y117–V124 (Kelker et al. 2004).

Também foi considerado analisar a isoforma 3 do receptor TREM (TREM-3) por ele mimetizar a atividade de TREM-1 (pró-inflamatória) em camundongos. A estrutura de TREM-3 foi encontrada no banco de dados do *Alphafold* com código **AF-Q9JKE1-F1**. Os critérios que condicionaram a escolha desta estrutura foram: a) região do domínio Ig (183 aminoácidos) e b) Uma confiança da estrutura modelada muito alta (pLDDT>90). Infelizmente, por se tratar de estrutura não cristalografada, não foi possível identificar os CDR de TREM-3 envolvidas no processo de reconhecimento antigênico. Uma vez identificadas as estruturas de interesse, os arquivos foram baixados em formato PDB (.pdb). Nesse momento, pequenas moléculas (metais) e artefatos (símbolos informáticos) que poderiam dificultar o reconhecimento pelos servidores foram removidas.

4.2.1. CONSTRUÇÃO DE ÁRVORES FILOGENÉTICAS A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DE NOV

Como foi observada uma participação do TREM-1 na infecção pelo MNoV, buscou-se avaliar se essa interação também acontecia em humanos. No entanto, como o NoV possui alta diversidade genética entre seus genogrupos e genótipos, foram pesquisadas sequências genéticas que codificam para a proteína VP1 obtidas do genótipo II (GII.4) no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) para posteriormente serem utilizadas no procedimento de modelagem de estruturas proteicas. Como as sequências virais vão surgindo de acordo com os surtos mundiais, não existe uma sequência única padrão, já que elas estão sujeitas a modificações por pressão seletiva com mudanças na combinação dos aminoácidos que as compõe. O resumo das estratégias utilizadas para obtenção das sequências consenso para sua modelagem estão descritas na **Figura 8**.

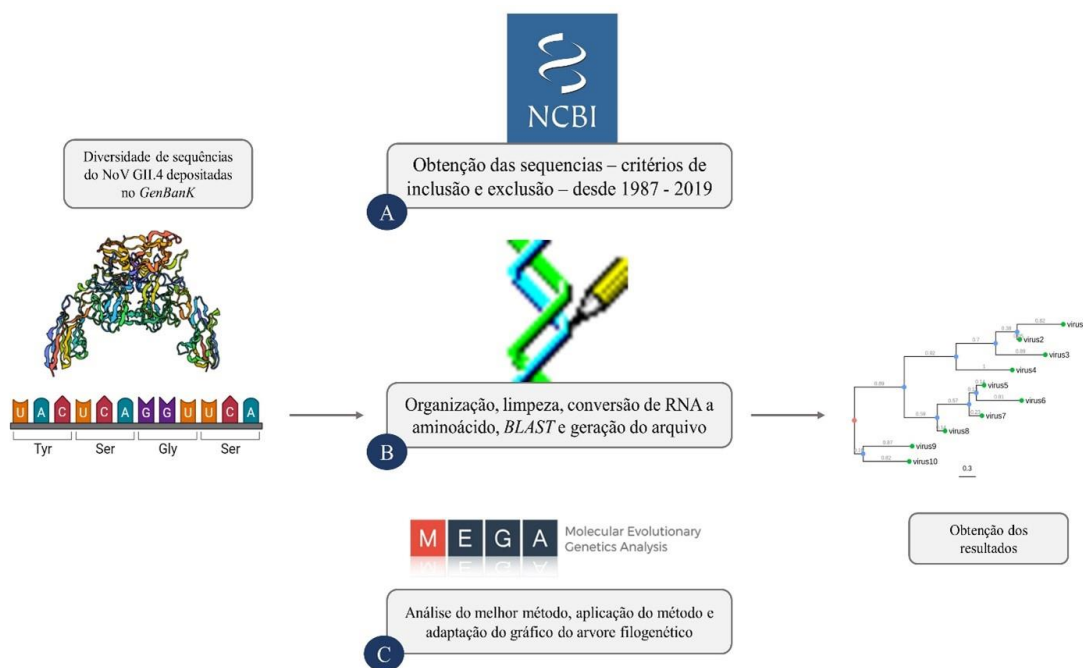


Figura 8: Metodologia utilizada para a obtenção e escolha das sequências proteicas para a modelagem das proteínas virais VP1 do NoV GII.4. Dada a alta diversidade nas sequências disponíveis pela taxa de mutabilidade do NoV, foram aplicados critérios de inclusão e exclusão para a obtenção delas no (A) servidor do NCBI. Estas foram organizadas e transformadas de código genético a tradução proteica no programa (B) *Bioedit*. O Arquivo gerado foi avaliado no (C) programa MEGA para estabelecer o melhor método de análise filogenética. Uma vez obtidos os resultados foram representados em uma árvore com a formação dos *clusters*. **Fonte:** elaboração própria.

Dentre as sequências encontradas, os seguintes critérios foram utilizados para seleção final: 1) sequências completas de genes ORF2 - VP1-NoV - GII-4; 2) sequências

de genes com detalhes de sequenciamento (região, ano e deformação); 3) um representante clonal que faz parte de um grupo de estudo e 4) sequência completa (~1600bp). Os critérios de exclusão foram: 1) genes parciais, genomas incompletos ou menores que ~1600bp; 2) sequências de VP1 de outros genótipos GII; 3) informações publicadas como mRNA; 4) clones dentro do mesmo estudo e 5) sequências carregadas para o NCBI sem identificação do genótipo, local de isolamento, ano do surto epidemiológico e país de localização.

Uma vez identificadas, as sequências foram baixadas no formato FASTA (.Fas). De um total de 1553 sequências da proteína *VP1* do NoV GII.4 disponíveis, apenas 43 foram utilizadas. Considerando uma análise preliminar, as sequências foram separadas em 3 grupos: o primeiro, amostras anteriores ao ano 2000, o segundo, amostras sequenciadas entre os anos 2000 e 2010 e, o terceiro grupo, sequências obtidas após o ano de 2010. As sequências foram então alinhadas (*ClustalW multiple alignment* - Número de bootstraps: 2000), convertidas em proteínas e armazenadas no formato FASTA (.fas) pelo *sequence alignment editor BioEdit*©.

O arquivo gerado foi analisado no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* – MEGA© 11.10.1 (<https://www.megasoftware.net/>) (Tamura et al. 2013). Inicialmente, o programa foi utilizado para encontrar o melhor modelo de estudo para a sequência proteica (ML). O modelo selecionado foi o JTT: *Jones-Taylor-Thornton* (+F) (Wang et al. 2008). Para a construção da árvore filogenética com as sequências proteicas foi utilizado o método estatístico *Maximum Likelihood* (Cole et al. 2014) com um número de 500 para o teste filogenético com o *Methods Bootstrap*. Foi utilizado o modelo JTT com freq (+F), com um raio entre locais com distribuição Gama 5. O método heurístico utilizado foi o *Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI) (Collienne et al. 2021).

4.2.2. MODELAGEM E AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS

De acordo com os resultados obtidos nas árvores filogenéticas, as sequências extraídas do formato FASTA oferecido pelo NCBI foi copiada, em uma média de 530 a 540 aminoácidos. Esta sequência foi colada no servidor *ColabFold: AlphaFold2* usando *MMseqs2* (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=G4yBrceuFbf3>) (Mirdita et al. 2022) para gerar um arquivo PDB (.pdb).

Geralmente, quando os arquivos PDB são obtidos por bases de dados públicos como o PDB (<https://www.rcsb.org/>) ou o UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>), muitas delas já estão revisadas e avaliadas após o processo de cristalografia.

Em função das variações que podem ser observadas nas proteínas virais modeladas, foi necessário avaliar a qualidade da estrutura obtida. Os diferentes arquivos .pdb foram submetidos ao servidor *MOLPROBITY* (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) (Williams et al. 2018), para analisar as características físico-químicas das proteínas obtidas por modelagem. Existe um valor de *cutoff* que se denomina *Mol probity score*, o qual determina a qualidade da modelagem, cujo valor é considerado ideal quando menor que dois (<2).

Enfim, foi escolhido o arquivo **1SMO** (1.47 Å) disponível no PDB que corresponde à proteína cristalografada de TREM-1 de *Homo sapiens* (Kelker et al. 2004) para os ensaios de *docking* molecular na perspectiva da interação humana.

4.3. DOCKING MOLECULAR

Após a obtenção das estruturas em 3D e a definição de quais seriam utilizadas nos ensaios *in silico*, o servidor *online ClusPro* foi utilizado para os ensaios de *docking* molecular em modelo humano e murino (<https://cluspro.bu.edu/signup.php>) (Kozakov et al. 2013; Kozakov et al. 2017, Vajda et al. 2017; Desta et al. 2020). Para cada análise, eram submetidos os arquivos das estruturas: a) a proteína viral VP1 que infecta murinos e humanos (~541 aminoácidos) e b) a região de ligação ao antígeno ou de *Ig-like* dos TREM-1 humano e murino e o TREM-3 murino (~113 aminoácidos).

Uma vez que as poses foram geradas, realizou-se o protocolo de re-ranqueamento, desenvolvido no nosso Laboratório de Imunoinformática e Imunologia de Mucosas (LIMIM). De forma semelhante, este procedimento já foi utilizado em outros estudos (Palacio et al. 2019; Ochoa et al. 2021), como o melhor caminho para selecionar o ensaio ideal que resultaram das predições do *docking* molecular.

O nosso sistema de re-ranqueamento se baseia na pontuação de 6 parâmetros energéticos que são obtidos em servidores *online*. Em cada parâmetro energético é atribuído um valor absoluto dentro de uma escada de 10 pontos. Cada um desses parâmetros energéticos é avaliado separadamente em uma planilha de Excel. Estes parâmetros são: a afinidade de ligação (ΔG -Kcal/mol-1) que é calculada no *Prodigy*

webservice ([//wenmr.science.uu.nl/prodigy/](http://wenmr.science.uu.nl/prodigy/)) (Xue et al., 2016), a afinidade de ligação prevista (Kcal/mol) obtida no *Area-affinity webservice* ([//affinity.cuhk.edu.cn](http://affinity.cuhk.edu.cn)) (Yang et al. 2023), a energia estabilizadora total (KJ/mol) que é prevista no *PPCheck webservice* ([//caps.ncbs.res.in/ppcheck/](http://caps.ncbs.res.in/ppcheck/)) (Sukhwal et al. 2015), a energia livre de ligação do complexo (Kcal/mol) estimada no *HawkDock webservice* ([//cadd.zju.edu.cn/](http://cadd.zju.edu.cn/)) (Weng et al. 2019) e por fim, a menor energia (Kcal/mol) obtida no *Cluspro webservice* junto com a posição do ensaio. A soma dos valores observados nos seis parâmetros diferentes (classificação de posição do *Cluspro*; energia mais baixa do *Cluspro*; afinidade de ligação do *Prodigy*; a afinidade de ligação prevista do *Area-affinity*; a energia estabilizadora total do *PPCheck* e a energia livre de ligação *HawkDock*) ajudaram na escolha da melhor pose, ou seja, com a maior pontuação cumulativa, para a realização da simulação de dinâmica molecular (DM).

4.4. DINAMICA MOLECULAR

Foi empregado o *WebGro webservice* (<https://simlab.uams.edu/index.php>) que utiliza o software GROMACS (Van der Spoel et al.2019). A simulação *in silico* da DM de proteína em água foi realizada com um campo de força GROMOS 43a1, em caixa triclínica com modelo de água SPC (modelo de carga pontual simples estendido) neutralizada e simulando uma concentração de NaCl 0,15M. Os parâmetros de minimização de energia utilizaram um integrador de descida mais íngreme com 10.000 passos. O equilíbrio do número de partículas (N), volume do sistema (V) e temperatura (T) [NVT] e número de partículas (N), pressão do sistema (P) e temperatura (T) [NPT] foi realizado a 310 °K. A pressão foi ajustada em 1 bar com 50 nanossegundos (ns) de simulação, gerando aproximadamente 1000 quadros por simulação. A simulação de cada complexo proteína-proteína foi feita em triplicatas. Os gráficos foram gerados usando *GraphPad Prism* v8.0, utilizando os valores da distância média quadrática mínima (ou RMSD (*Root Mean Square Deviation*)) emitidos pelo *WebGro* para visualização e análise.

4.4. ANÁLISE DAS INTERAÇÕES MOLECULARES

Uma vez escolhidos os ensaios que melhor se ajustaram mediante as simulações do *docking* e dinâmica molecular, o *PPCheck* foi empregado para o cálculo da energia livre estabilizante (uma somatória das energias correspondentes a interações não-covalentes) de cada complexo. Para isso, foram utilizados os descritores apresentados na Tabela 1.

O DIMPLOT (Uchikoga et al. 2010) também foi utilizado para verificar ligações de hidrogênio nos complexos e as interações menos intensas (incluindo as hidrofóbicas, iônicas, de van der Waals e aromáticas). A determinação das interfaces de interação proteína-proteína foi feita com base na combinação dos resultados obtidos com o *PPCheck*, PIC, KFC2 e DIMPLOT. Sendo que os resíduos de aminoácidos foram apresentados por uma única letra, conforme a tabela (**Tabela 2**).

A determinação das poses dos aminoácidos presentes na interface de interação foi avaliada nos servidores *Computational Characterisation of Protein-Protein Interactions* (CCharPPI), *HawkDock*, *Protein Interactions Calculator* (PIC) e *PPCheck*, além do programa DIMPLOT (*LigPlot+ suite v.2*). Eles foram descritos identificando interações importantes com regiões antigênicas presentes nas proteínas que se estavam avaliando. A abordagem metodológica utilizada para o desenvolvimento dessa dissertação está resumida na figura a seguir (**Figura 9**).

Tabela 1. Indicadores das análises de *docking* proteína-proteína

Indicador de interesse	Pontos de corte	Referência
HBOND (potencial de ligações de hidrogênio)	-15 a -1	Andrusier et al. 2007
VDW (energia de Van der Waals)	-200 a -50	Andrusier et al. 2007
ELE (energia eletrostática total)	-60 a 0	Andrusier et al. 2007
PYDOCK_TOT (energia total de ligação)	-60 a -5	Cheng et al. 2007
FA_ATR (força atrativa de van der Waals)	-100 a -20	Chaudhury et al. 2010
DESOLV (energia de dessolvatação)	-30 a 20	Cheng et al. 2007

Fonte: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP do *Docking molecular* rígido proteína-proteína. Elaborado por Matos, 2022. Laboratório de imunologia de mucosas e imunoinformática (LIMIM).

Tabela 2. Símbolos dos aminoácidos

Letra	Aminoácido correspondente	Letra	Aminoácido correspondente
A	Alanina (Ala)	M	Metionina (Met)
B	Asparagina ou Aspartato (Asn/Asp)	N	Asparagina (Asn)
C	Cisteína (Cys)	P	Prolina (Pro)
D	Aspartato ou Ácido aspartático (Asp)	Q	Glutamina (Gln)
E	Glutamato ou Ácido glutâmico (Glu)	R	Arginina (Arg)
F	Fenilalanina (Phe)	S	Serina (Ser)
G	Glicina (Gly)	T	Treonina (Thr)
H	Histidina (Hys)	V	Valina
I	Isoleucina (Isso)	W	Triptofano (Trp)
K	Lisina (Lys)	Y	Tirosina (Try)
L	Leucina (Leu)	Z	Glutamina ou Glutamato

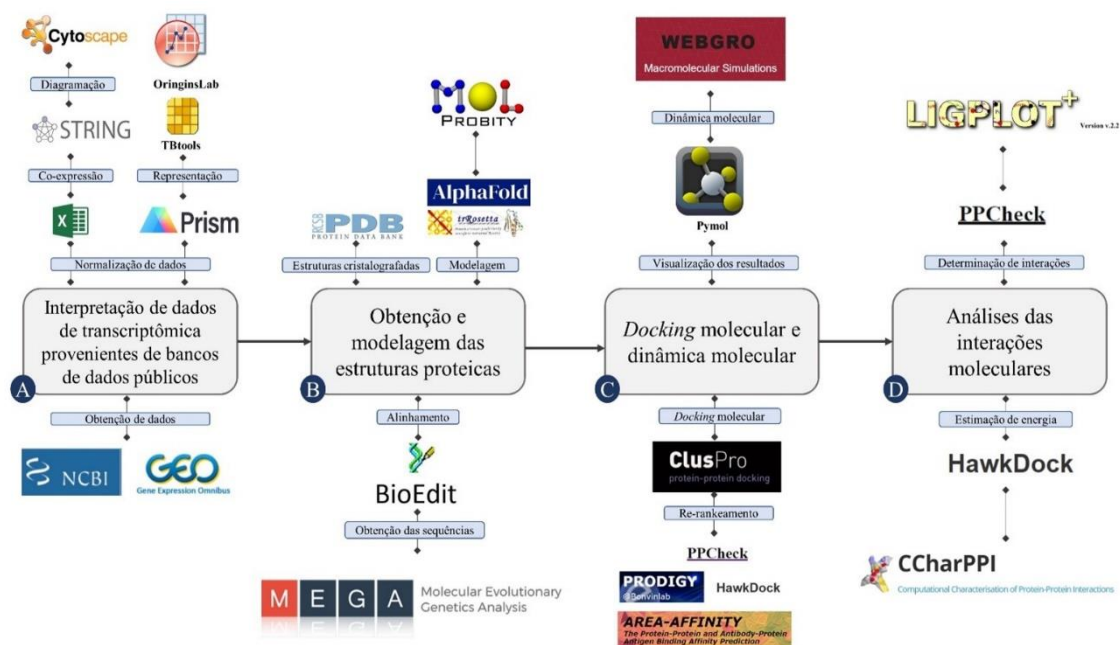


Figura 9: Estratégias e ferramentas que foram utilizadas para as análises de dados. Diversas estratégias foram utilizadas para obter resultados. A evidência começou com o estudo dos dados disponíveis em estudos de transcriptômica onde avaliaram a infecção em células murinas. O *docking* molecular foi então utilizado com o acoplamento da dinâmica molecular para estabelecer as interações dos complexos proteicos modelados. Finalmente, as interações moleculares foram analisadas. **Fonte:** elaboração própria.

5. RESULTADOS

5.1. O GENE *Trem1* ENCONTROU-SE AUMENTADO EM MODELOS EXPERIMENTAIS COM CELULAS DE MURINOS

Na plataforma GEO do NCBI foram achados 53 estudos associados às palavras-chave de escolha: *Norovirus*, *Norovirus infection* and *Norovirus in vitro*. Destes, apenas três cumpriram os critérios de seleção. O GSE183223 (Criss et al, 2021), o GSE150918 (Lin et al, 2020) e o GSE117911 (Hosmillo et al, 2020). Em nenhum dos ensaios que foram feitos em organoides/enteroides 3D foi determinada a expressão de *Trem1*.

Em função disso, buscou-se dados experimentais provenientes de modelos de infecção em murinos para estabelecer critérios de interação entre as duas proteínas (proteína viral VP1 e TREM-1); dos quais só foram achados seis estudos. Dentre eles, apenas dois cumpriram os critérios de seleção - GSE111642 (Levenson et al. 2018), GSE94821 (Enosi et al. 2019).

No estudo GSE94821 (Tabela 3) que foi feito em macrófagos murinos (RAW 264.7) infectados com a cepa MNV-1 CW1 de MNoV; as infecções foram realizadas com 4, 8, 12, 16 e 20 horas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1. A análise dos dados disponíveis mostrou que a expressão dos genes *Trem1* e *Trem3* se encontravam aumentados, comparado com o gene *Trem2* que estava diminuído, que aparentemente, possui atividade antagonica ao TREM-1. Esses dados sugerem a contribuição do TREM-1 e do TREM-3 na fisiopatologia da infecção murina pelo MNoV (**Figura 10A**).

Em seguida, buscou-se avaliar a expressão dos genes envolvidos na via de ativação de TREM-1 nos diferentes tempos de avaliação utilizados no referido estudo. Após 8h de infecção, os seguintes genes estavam aumentados: *Ilb1*, *Cxcl3*, *Cd40*, *Ccl7*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Tnf*, *Icam1*, *Nod2*, *Tlr2*, *Stat5b* e *Myd88* (**Figura 10B**). Além disso, os genes envolvidos na via de TREM-1 foram agrupados utilizando uma análise de componentes principais (PCA). Nas primeiras 4h de infecção, não foram observadas diferenças na expressão dos genes da via de TREM-1 quando comparado ao grupo Mock (simulação da infecção viral). Diferentemente, foi observado nos tempos de 8h e 12h pós início da infecção. Nesses casos, observou-se um comportamento distinto no PCA, que ao analisar os valores quantitativos desta medição, percebe-se que os genes da via de TREM-1

estavam aumentados quando comparados os demais grupos e tempos de medição (**Figura 10C**).

O estudo GSE111642 utilizou BMDM [$> 95\%$ CD11b+] obtidos a partir de tíbias e fêmures de camundongos BALB/c livres de patógenos específicos (**Tabela 3**), infectados com a cepa CW1P3 do MNoV. A expressão gênica dos macrófagos foi avaliada nos tempos 0, 4, 8, 14, 20 e 26 h pós infecção (p.i). Os resultados da nossa análise de transcriptômica são descritos na **Figura 11**. Não evidenciamos o gene *Trem1* aumentado comparado com os demais genes analisados no estudo. No entanto, observamos que o gene *Trem1* se encontrava na distribuição dos genes que estavam reportados como aumentados. E o *Trem2* se agrupou com os genes que estavam diminuídos dentro do gráfico de vulcão (*vulcano plot*) (**Figura 11A**). A seguir, realizou-se a análise da dinâmica da expressão de TREM-1 ao longo dos períodos analisados. Entre 4h e 8h p.i foi observado um pico na expressão de *Trem1* ($F=7,279$, $p=0,003$). Esse valor só foi normalizado 20h p.i. Este comportamento indica que o TREM-1 tem um papel importante nas fases iniciais do processo infeccioso (**Figura 11B**). Quanto às moléculas direta ou indiretamente associadas à atividade de TREM-1, observou-se aumento significativo dos seguintes genes: *Tlr2*, *Cd86*, *Clec5a*, *Icam*, *Tlr9*, *Nod2*, *Tnf*, *Tlr7*, *Tlr8* e *Mapk3* (**Figura 11C**).

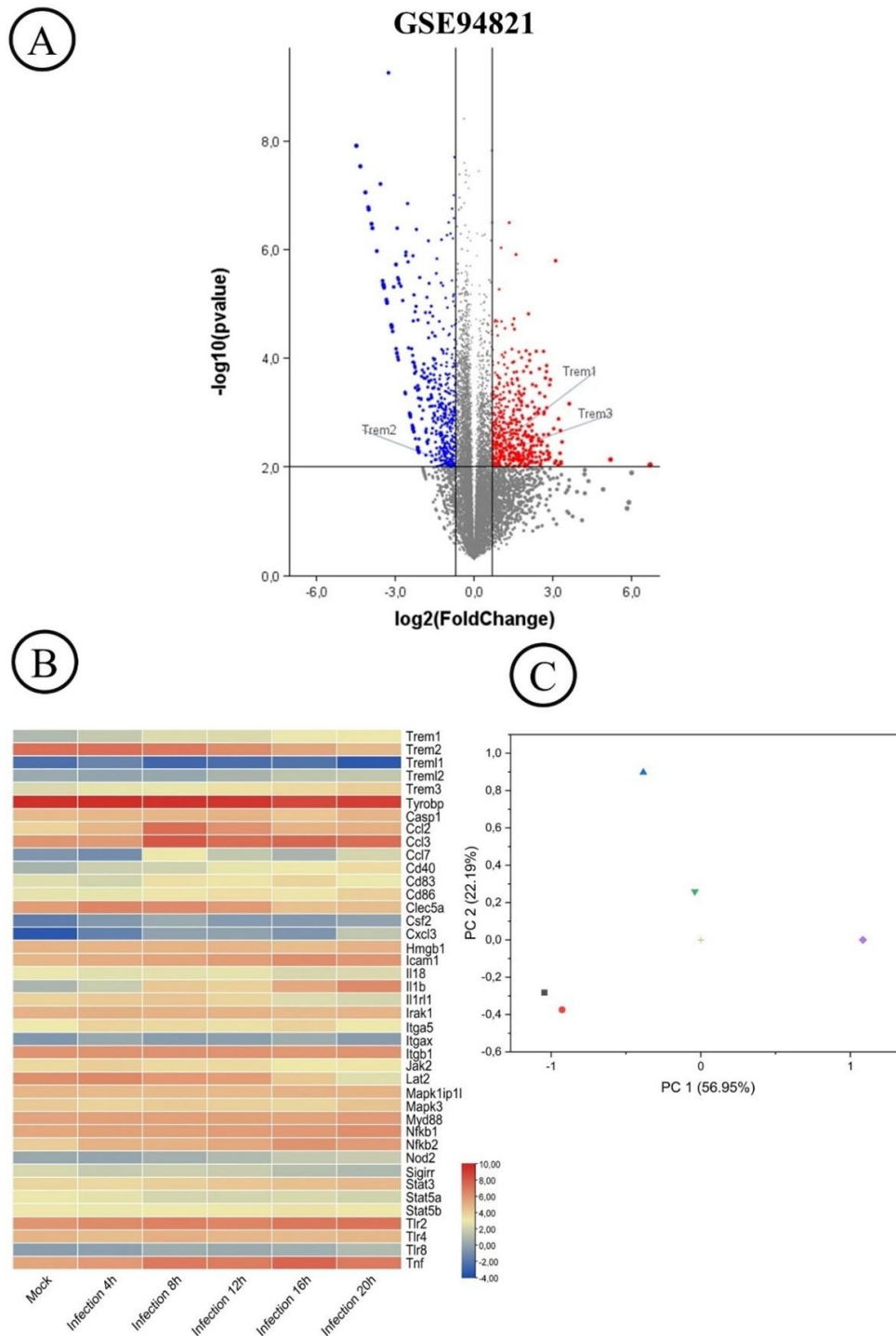
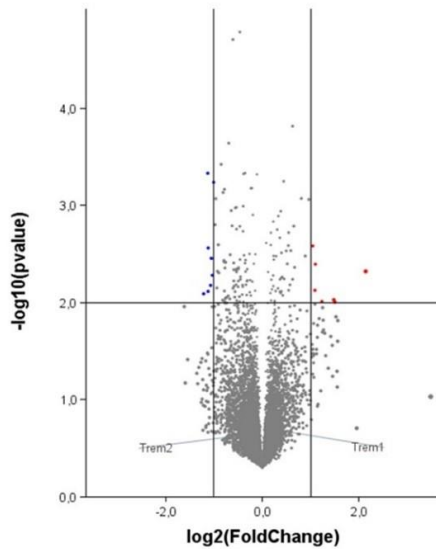


Figura 10: Figura 10: Análise transcricional dos genes associados à expressão de *Trem1* e outros marcadores gênicos na infecção por MNoV em macrófagos murinos RAW 264.7. A) Os genes *Trem1*, *Trem2* e *Trem3* estão representados em um Vulcano plot, onde se mostram todos os genes analisados no estudo GSE94821. Em cor azul se identificam os genes diminuídos (*Downregulated*) e em vermelho os genes aumentados (*Upregulated*). B) Estão representados os genes envolvidos na reposta da via de TREM-1 diagramados em um heatmap considerando os tempos de medição e quantificação dos genes, com uma escada trifásica de cores (vermelho ou aumentado, branco ou não direcionado e azul ou diminuídos). C) A análise de componente principal (*Principal component analysis - PCA*) representa a expressão gênica clusterizada da via de TREM-1 (Quadrado cor cinza: avaliação no estado Mock; círculo cor vermelha: avaliação às 4h; triângulo azul: avaliação às 8h; triângulo verde: avaliação às 12; signo positivo cor beije: avaliação às 16h e losângo cor roxo: avaliação às 20h). **Fonte:** elaboração própria.

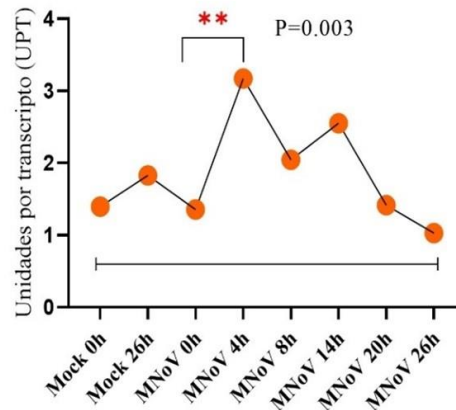
(A)

GSE111642



(B)

Expressão dinâmica de *Trem1* em células BMDM



(C)

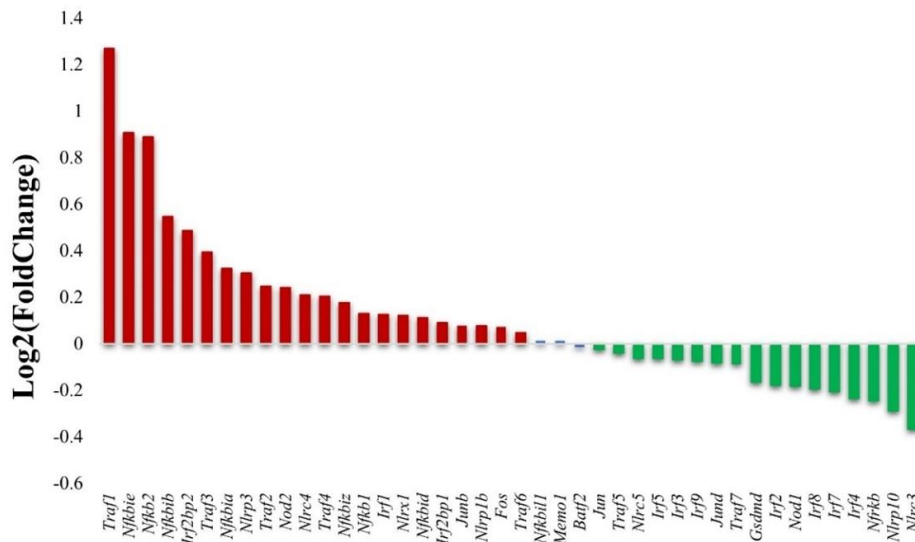


Figura 11: Análise transcricional dos genes associados à expressão de *Trem1* e outros marcadores gênicos na infecção por MNoV em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) de camundongos BALB/c. A) Os genes *Trem1* e *Trem2* estão representados em um Vulcano plot, onde se mostram todos os genes analisados no estudo GSE111642. Em cor azul se identificam os genes diminuídos (*Downregulated*) e em vermelho os genes aumentados (*Upregulated*). B) Se mostra a dinâmica da expressão do gene *Trem1* graficando os valores obtidos nos diferentes tempos de expressão. C) o histograma apresenta os genes associados à resposta antiviral. Em vermelho estão aqueles que foram encontrados aumentados e em verde aqueles que estavam diminuídos.

Via de ativação do TREM-1 *Actb*: Actina- β . *Akt1*: serina/treonina quinase 1. *Casp1*: caspasa 1. *Ccl2*: ligando 2 que se une aos motivos C-C das quimiocinas. *Ccl3*: ligando 3 que se une aos motivos C-C das quimiocinas. *Ccl7*: ligando 7 que se une aos motivos C-C das quimiocinas. *Cd40*: membro 5 da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral. *Cd83*: antígeno de linfócitos B ativado. *Cd86*: antígeno 2 que se liga ao CD28, antígeno B7-2. *Clec5a*: proteína que no domínio 5A contém uma lectina tipo C. *Csf2*: fator estimulante de colônias 2. *Cxcl3*: ligando 3 que se une aos motivos C-X-C das quimiocinas. *Fcgr2b*: receptor Fc γ IIb. *Fpr1*: receptor do peptídeo de Formila 1. *Grb2*: proteína ligada que se une ao receptor do fator de crescimento 2. *Hmgb1*: caixa do grupo de alta mobilidade 1. *Icam1*: molécula de adesão intercelular 1. *Il10*: interleucina. *Il18*: interleucina 18. *Il1b*: interleucina 1 β . *Il1r1*: receptor semelhante da interleucina 1. *Il6*: interleucina 6. *Irak1*: quinase associada ao receptor da interleucina 1. *Iga5*: subunidade α 5 das integrinas. *Itgax*: subunidade α X da integrina. *Itgb1*: subunidade β 1 da integrina. *Jak2*: Janus Quinase 2. *Lat2*: ligante para ativação de células T membro da família 2. *Mapk1*: proteína quinase ativada por mitogênio 1. *Mapk3*: proteína quinase ativada por mitogênio 3. *Myd88*: proteína de resposta primária de diferenciação mielóide. *Nod2*: domínio 2 que se liga na oligomerização de nucleotídeos. *Stat3*: transdutor de sinal e ativador de transcrição 3. *Stat5a*: transdutor de sinal e ativador de transcrição 5A. *Stat5b*: transdutor de sinal e ativador de transcrição 5B. *Tlr2*: Toll like 2. *Tlr3*: Toll like 3. *Tlr4*: Toll like 4. *Tlr7*: Toll like 7. *Tlr8*: Toll like 8. *Tlr9*: Toll like 9. *Tnf*: fator de necroses tumoral. *Trem1*: receptor desencadeante expresso em células mielóides 1. *Trem2*: receptor desencadeador expresso em células mielóides 2. *Trem1l*: receptor desencadeador semelhante 1 expresso em células mielóides. *Trem2l*: receptor desencadeador semelhante expresso em células mielóides. *Tyrobp*: proteína de ligação à tirosina quinase. **Via de resposta antiviral.** *Batf2*: fator de transcrição ATF zíper de leucina básica. *Fos*: proto-oncogene Fos da Subunidade do Fator de Transcrição AP-1. *Gsdmd*: gasdermina D. *Irf1*: fator regulador do interferon 1. *Irf2*: fator regulador do Interferon 2. *Irf2bp1*: proteína de ligação do fator regulador do Interferon. *Irf2bp2*: proteína de ligação do fator regulador do interferon 2. *Irf3*: fator regulador do interferon. *Irf4*: fator regulador do interferon 4. *Irf5*: fator regulador do interferon 5. *Irf7*: fator regulador do interferon 7. *Irf8*: fator regulador de interferon 8. *Irf9*: fator regulador de interferon 9. *Jun*: Jun proto-oncogene, do fator de transcrição AP-1. *JunB*: subunidade do fator de transcrição AP-1. *Jund*: proto-oncogene JunD, subunidade do fator de transcrição AP-1. *Memo1*: mediador da motilidade celular 1. *Nfkb1*: subunidade 1 do fator nuclear κ dos linfócitos B. *Nfkb2*: subunidade 2 do fator nuclear κ dos linfócitos B. *Nfkbia*: inibidor α do NF- κ B. *Nfkbib*: inibidor β do NF- κ B. *Nfkbid*: inibidor δ do NF- κ B. *Nfkbie*: inibidor ϵ do NF- κ B. *Nfkbil1*: inibidor 1 semelhante do NF- κ B. *Nfkbiz*: inibidor ζ do NF- κ B. *Nfrkb*: proteína que se une ao fator nuclear κ dos linfócitos B. *Nlrc3*: proteína 3 da família NLR que tem domínio CARD. *Nlrc4*: domínio CARD da família NLR contendo 4. *Nlrc5*: domínio 5 que contém um domínio CARD da família NLR. *Nlrp10*: proteína 10 que tem um domínio PYRIN que pertence à família NLR. *Nlrp1b*: proteína 1b que tem um domínio PYRIN que pertence à família NLR. *Nlrp3*: proteína 3 que tem um domínio PYRIN que pertence à família NLR. *Nlrx1*: membro X1 da família NLR. *Traf1*: fator associado ao receptor de TNF1. *Traf2*: fator associado ao receptor de TNF2. *Traf3*: fator associado ao receptor de TNF3. *Traf4*: fator associado ao receptor de TNF4. *Traf5*: fator associado ao receptor de TNF5. *Traf6*: fator associado ao receptor de TNF6. *Traf7*: fator associado ao receptor de TNF7. **Fonte:** elaboração própria.

Como na análise transcriptômica foram consideradas diferentes células, as BMDM que são macrófagos primários, e a RAW264.7, que é uma linhagem celular de macrófago imortalizada, procurou-se avaliar se havia um perfil distinto de expressão gênica nestas células. Um total de 42 genes relacionados à resposta antiviral foram encontrados em comum aos dois tipos celulares: *Batf2*, *Fos*, *Gsdmd*, *Irf1*, *Irf2*, *Irf2bp1*, *Irf2bp2*, *Irf3*, *Irf4*, *Irf5*, *Irf7*, *Irf8*, *Irf9*, *Jun*, *Junb*, *Jund*, *Memo1*, *Nfkb1*, *Nfkb2*, *Nfkbia*, *Nfkbib*, *Nfkbid*, *Nfkbie*, *Nfkbil1*, *Nfkbiz*, *Nfrkb*, *Nlrc3*, *Nlrc4*, *Nlrc5*, *Nlrp10*, *Nlrp1b*, *Nlrp3*, *Nlrx1*, *Nod1*, *Nod2*, *Traf1*, *Traf2*, *Traf3*, *Traf4*, *Traf5*, *Traf6* e *Traf7*. Por outro lado, foi observado que os genes envolvidos na resposta antiviral nas células RAW264.7 houve uma maior expressão de genes relacionados a essa atividade, destacando-se os genes: *Ciita*, *Fosb*, *Nlrp1a*, *Traf3ip1*, *Traf3ip2* e *Traf3ip3*. Estes valores são apresentados

na **Figura 12**. Esses resultados sugerem que as diferenças nas vias de ativação celular inflamatória, são dependentes do tipo de célula que está sendo estudado.

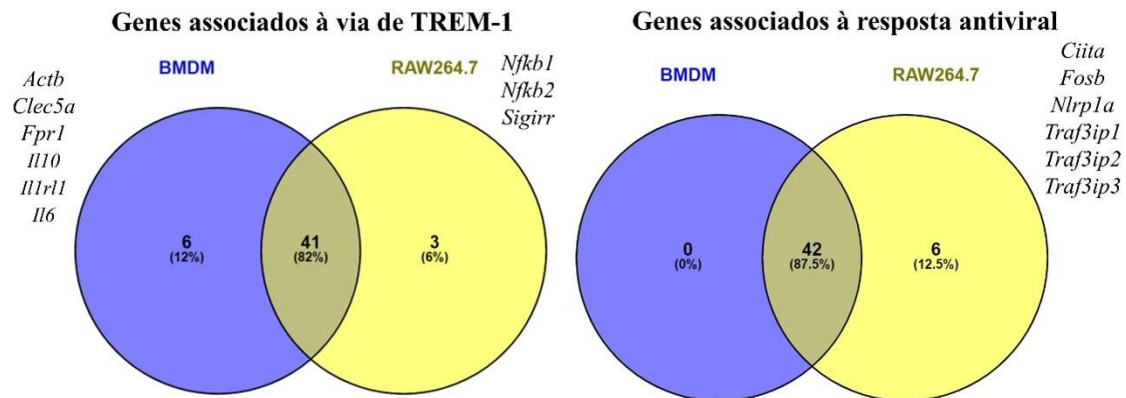


Figura 12: Associação dos genes identificados e analisados em transcriptômica comparando células BMDM e RAW264.7. Um diagrama de Venn foi realizado para estabelecer as semelhanças e diferenças na expressão logarítmica dos genes em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de camundongos (círculos azuis) e macrófagos imortalizados RAW264.7 de camundongos (círculos amarelos). Eventualmente, um número maior de genes expressos diferentemente foi encontrado em análises extraídas de células BMDM ao analisar os genes da via TREM-1, enquanto o maior número de genes foi observado para células RAW264.7 ao comparar genes de resposta antivirais. *Actb*: Actina Beta, *Clec5a*: Domínio 5A que contém lectina do tipo C, *Fpr1*: Receptor de Peptídeo Formil 1, *Il10*: interleucina 10, *Il1rl1*: receptor da interleucina 1b, *Il6*: interleucina 6, *Nfkb1*: Subunidade 1 do Fator Nuclear Kappa B, *Nfkb2*: Subunidade 2 do Fator Nuclear Kappa B, *Sigirr*: Domínio único que contém TIR e Ig, *Acacb*: Acetil-CoA Carboxilase Beta, *Igfbp7*: Proteína Aglutinante de Fator de Crescimento 7, *Pparg*: Receptor Gamma proliferador Ativado pelo Peroxissoma, *Ciita*: Trans ativador do Complexo de Histocompatibilidade Classe II, *Fosb*: FosB Proto-Oncogene, AP-1 Subunidade Fator de Transcrição, *Nlrp1a*: NLR Domínio PYRIN Família Contendo 1, *Traf3ip1*: proteína 1 que interage com Traf3, *Traf3ip2*: proteína 2 que interage com Traf3 e *Traf3ip3*: proteína 3 que interage com Traf3. **Fonte:** elaboração própria.

Tabela 3. Estudos encontrados de transcriptômica

Autor, ano e número de acesso	Nome do estudo	Objetivo	Metodologia
<p>Levenson et al. 2018. GSE111642.</p>	<p>Análise transcricional da infecção por MNoV de macrófagos primários derivados da medula óssea (PMBC).</p>	<p>Criar um perfil de expressão por sequenciamento de alto rendimento no contexto de infecção pelo MNoV.</p>	<p>Determinaram a expressão gênica (0h, 4h, 8h, 14h e 22h com simulação às 0h e 26 h) de macrófagos derivados da medula óssea primária de murinos (BMDM) infectados com MNoV-1 usando <i>Illumina</i>® HiSeq 2500.</p>
<p>Enosi et al. 2019. GSE94821.</p>	<p>Sequenciamento de RNA da infecção longitudinal por MNoV em macrófagos de camundongo RAW264.7.</p>	<p>Identificar alterações nas vias biológicas específicas, identificando alterações de transcritos que aumentam ou diminuem com a infecção por MNoV ao longo do tempo.</p>	<p>Fizeram um perfil de expressão em células RAW264.7 infectadas com MNV às 4, 8, 12, 16 e 20 horas; e como controle simulando a infecção às 0h e 20h. A obtenção dos transcritos foram gerados por sequenciamento de RNA usando <i>Illumina</i>® NextSeq500.</p>

5.2. A ESTRUTURA DE TREM-1 MURINO IDENTIFICA UM SEGMENTO ANTIGÊNICO CONSERVADO DO DOMÍNIO P DA PROTEÍNA VP1 DE MNOV

Considerando os resultados das análises de transcriptômica, buscou-se entender se a proteína antigênica VP1 do MNoV poderia interagir com o TREM-1 e o TREM-3 murinos. É importante esclarecer que a utilização de dados exclusivamente provenientes de experimentos com células de origem murina, se dá pelo fato da inexistência desses dados em células humanas.

Para compreender a interação TREM-1 murino e a proteína VP1 do MNoV, a pose escolhida do ensaio de *docking* molecular foi a 0, que apresentou valor da energia livre de ligação de -61,13 kcal/mol e uma energia total estabilizante = -206,99 kJ/mol. A análise pelo *CCharPPI* demonstrou que os dados de interações ficaram dentro dos valores de referência para PYDOCK_TOT, VDW, HBOND, FA_ATR, ELE e DESOLV (**Tabela 5**).

Os resíduos que estiveram identificados na interface de interação foram: R228 M229 V230 D231 L232 P233 V234 I235 Q236 P237 R238 L239 C240 T241 H242 W245 P246 A247 P248 V249 Y250 P280 I281 S282 G283 S284 W285 V286 S287 C288 Q312 D313 G314 L326 E338 Q340 T341 E342 T343 T344 K345 T346 G347 D348 L350 V352 Q392 A393 V394 P395 R396 Q455 E456 F457 S459 W460 F461 S463 N464 F466 T480 L481 D512 I514 para a VP1 murina e, D102 Q104 T106 D107 Y116 H117 P118 P119 N120 N44 I45 M46 K47 Y48 A49 N50 S51 Q52 Q56 R57 P59 K62 E63 P64 L65 T66 L67 V68 V69 T70 Q71 R72 P73 F74 T75 V80 H81 M82 G83 K84 F85 para o TREM-1 murino.

Como pode-se observar na **Figura 14A**, o domínio *Ig-like* do TREM-1 murino parece reconhecer o segmento P2 da proteína VP1 do MNoV (MNV-1), identificado pela cor cinza. Nesse sentido, como o segmento de maior antigenicidade da proteína VP1 do MNoV entra em contacto com o domínio *Ig-like* de TREM-1 murino, buscou-se identificar qual das CDRs interagia com este segmento do vírus.

As seqüências dos CDR de TREM-1 murino são identificadas na **Figura 13A**, da seguinte forma: CDR1 N44–N50 (vermelho); CDR2 Q71–79 (azul ciano) e CDR3 Y117–V124 (violeta). O CDR1 foi quem entrou em contacto direto com a alça antigênica C'-D' que é denominada pela literatura como região conservada da proteína VP1 identificada na cepa murina MNV-1 do MNoV (**Figura 13B**).

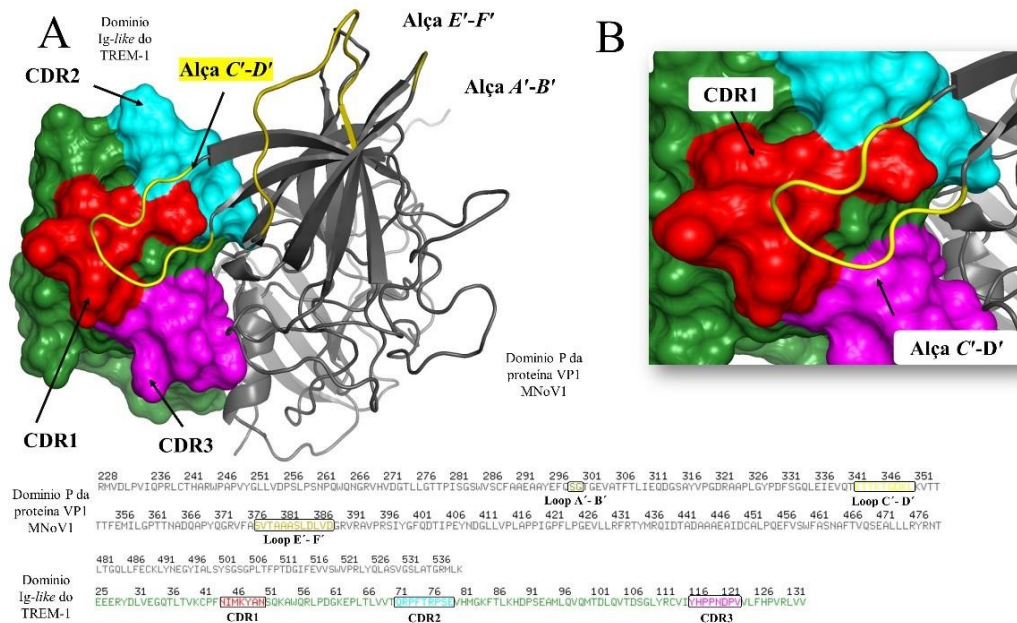


Figura 13: Interface de interação entre o TREM -1 e o segmento P da VP1 de NoV murino (cepa MNV-1). A) Pode-se observar que determinadas regiões e alças da proteína viral podem interagir com o TREM-1 murino. Os segmentos corados em cor amarelo da proteína indicam as alças antigênicas da proteína VP1 do MNV-1. B) Entre as três alças antigênicas reportadas no MNoV, a alça antigênica C'- D' conservada apareceu interagindo com o CDR1 (cor vermelho) do TREM-1 murino (alça cor vinho). **Fonte:** elaboração própria.

Como o TREM-3 possui atividade análoga ao TREM-1 em murinos, procurou-se identificar se essa característica seria suficiente para que essa outra isoforma do receptor também interagisse com a VP1. Para o *docking* molecular entre a proteína antigênica VP1 do MNoV e o TREM-3, o receptor foi modelado já que sua estrutura cristalografada não está disponível. Os valores da qualidade de modelagem da proteína TREM-3 estão descritos na **Tabela 4**. Os resultados sugerem que a estrutura obtida por modelagem no *UniProt* é de excelente qualidade. Dentre os resultados obtidos, destacam-se o *Molprobit* score de 0,71 e um *Clashcore* de 6,62. Além disso, não foram encontradas ligações ruins ou Ramachandran outliers.

Assim como no experimento envolvendo o TREM-1, a pose obtida no *ClusPro* que melhor representou as interações entre TREM-3 e o domínio P da VP1, foi a 0. Essa escolha foi corroborada pela observação dos melhores valores de energia (média: -894,9 e baixa: -1098,1) (**Tabela 5**). Em seguida, foi determinada a energia livre de ligação com o servidor *HawkDock* e o valor observado foi de -113,19 kcal/mol. A análise da interação pelo *PPCheck* mostrou os seguintes valores: energia total estabilizante = -309,67 kJ/mol.

O CCharPPI revelou dados de interações que ficaram dentro do valor de referência que os valores de PYDOCK_TOT, VDW, HBOND, FA_ATR, ELE e DESOLV oferecem (Tabela 5).

Tabela 4. Valores de qualidade da modelagem do TREM-3 murino

Parâmetros	TREM-3
<i>Molprobit score</i>	0.71
<i>Clashcore</i>	6.62
Rotâmeros ruins	0
Rotâmeros favoráveis	89 (98.89%)
Ramachandran outliers	0(0%)
Ramachandran favored	97 (97.22%)
Ligações ruins	0 / 812 (0%)
Ângulos ruins	2 / 1104 (0.18%)

MolProbit score: parâmetros do *MolProbit*. RMSD (*root-mean-square deviation*): desvio médio quadrático.; *Clashcore*: número de átomos sobrepostos. Ramachandran *outliers*: número de resíduos fora das regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran. Ramachandran *favored*: número de resíduo dentro das regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran.

Com os servidores DIMPLOT e PPCheck, pode-se observar que os resíduos que estiveram presentes na interface de interação foram: D231 L232 P233 V234 I235 Q236 P237 R238 L239 C240 T241 H242 P246 A247 P248 V249 Y250 P280 I281 S282 G283 S284 W285 V286 S287 C288 F289 G312 D313 E338 V339 Q340 T341 E342 T343 T344 K345 T346 G347 D348 L350 K351 V352 R392 A393 V394 P395 R396 Q455 E456 F457 V458 S459 W460 A462 S463 N464 F466 R478 N479 T480 I481 T482 D512 G513 I514, para o segmento P da proteína VP1 do MNoV; e, L107 Y108 Q109 C110 V111 L114 D117 N118 V119 I120 I121 L122 R123 Q124 R125 I126 R127 W37 C38 P39 Y40 N41 I42 M43 L44 Y45 S46 V55 R56 S57 H58 G59 S60 P61 A72 D73 F74 Y87 P88 T89 E90 S91 V92 para o TREM-3 murino (**Figura 14**).

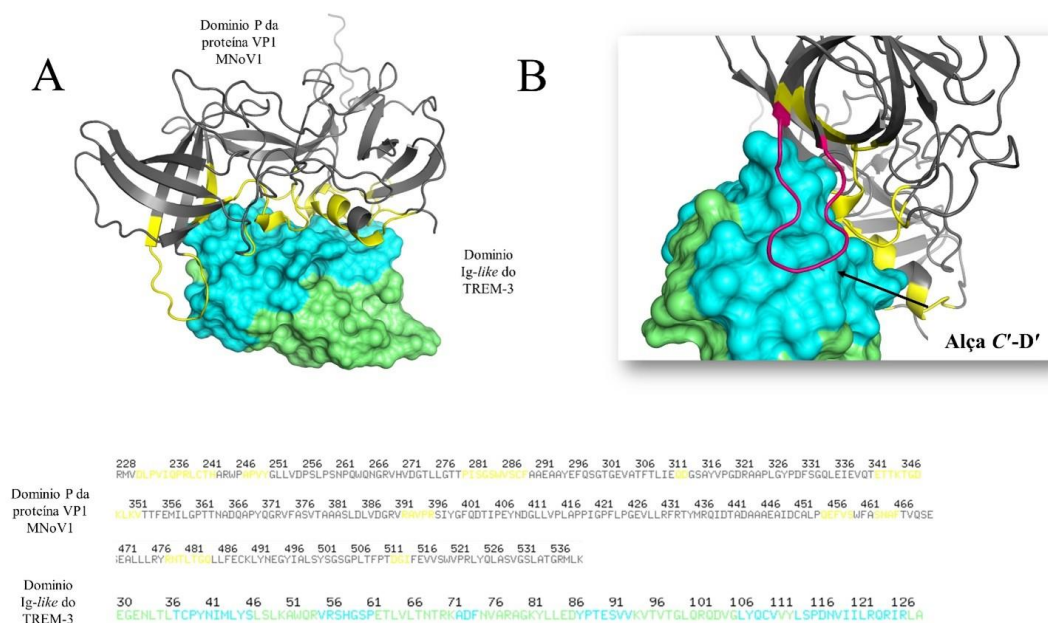


Figura 14: Interface de interação entre o murino TREM-3 e o segmento P da VP1 do norovírus murino (MNV-1). A) Pode-se observar que certas regiões e alças da proteína viral podem interagir com o TREM-3 murino. Amarelo mostra os resíduos do domínio P da proteína VP1 que apareceram interagindo com o TREM-3 murino na interface de interação. B) Ao igual que na interação de TREM-1, a alça C'-D' (cor vinhotinto) foi identificado interagindo. **Fonte:** elaboração própria.

Tabela 5. Parâmetros energéticos e de interação obtidos do docking molecular entre o TREM-1/TREM-3 murino e a VP1 do MNV.

Parâmetros	TREM-1 murino	TREM-3 murino
Ensaio analisado	0	0
Energia mediana	-660,4	-849,9
Energia mais negativa	-741,3	-1098,1
Energia livre de ligação (kcal/mol)	-61,13	-113,19
VDW (-200 a -50)	-117,174	-133,384
HBOND (-15 a -1)	-6,98	-11,39
FA_ATR (-100 a -20)	-63,316	-70,832
ELE (-60 a 0)	-12,407	-17,96
DESOLV (-30 a 20)	-8,298	1,523
PYDOCK_TOT (-60 a -5)	-32,42	-29,775

PYDOCK_TOT: score para energia total de interação; ELE: energia eletrostática total; DESOLV: energia de dessolvatação; HBOND: potencial de ligações de hidrogênio; VDW: energia de van der Waals; FA_ATR: energia atrativa de van der Waals.

5.3. O TREM-1 HUMANO INTERAGE COM A PROTEÍNA VP1 DO NOV GII.4 EM CEPAS PROVENIENTES DE DIFERENTES ANOS/REGIÕES

Após observar interações entre o receptor murino e o domínio P da proteína VP1 do MNoV, buscou-se estudar a possível interação entre a isoforma de TREM-1 humano e a proteína VP1 do NoV. No entanto, há limitações nesta hipótese já que o NoV é um agente viral que sofre mutações constantes pelo fato de ser um vírus RNA de grande variabilidade antigênica. A evolução filogenética deste vírus tem sido observada, principalmente para o genótipo GII.4, que é a mais importante porque causa a maioria dos surtos epidemiológicos em todo o mundo.

Uma árvore filogenética foi projetada com 43 sequências completas de VP1 de NoV genótipo GII.4 (~514 aminoácidos) disponíveis no NCBI para estudar o seu comportamento filogenético. Tomou-se como critério definitivo classificar o resultado em décadas: antes de 2000, as cepas que surgiram entre 2000 e 2010, e as que surgiram depois de 2010. Análises preliminares mostraram que o caráter geográfico não influencia no alinhamento e na divergência das linhagens. A partir do modo de classificação proposto, foi observado um melhor resultado na árvore classificando as sequências a partir do ano 2010 por apresentar uma maior inclusão de sequências segundo a distribuição geográfica.

Um total de 13 sequências constituíram esta árvore. Foi observada a formação de dois *clusters* que derivaram de um ancestral comum: um nó exterior (99) e inferior (nó de 82), o que indica a presença a formação de dois grupos geneticamente distintos. Os valores dos nodos descritos previamente, ou melhor conhecidos como *bootstrapping* ou intervalo de confiança, que provém dos testes estatísticos utilizados nos estudos filogenéticos indicam o número de réplicas utilizadas para comparar as sequências e poder reagrupá-las segundo a ancestralidade das sequências mães; por tanto, valores altos, indica uma ótima abordagem para a classificação das sequências (Felsenstein 1985). Além disso, observou-se um sub-nó com um valor de 84 que é derivado do nó superior. Estes valores mostram claramente que as sequências que foram sequenciadas a partir de 2010 são filogeneticamente divergentes em dois grupos (considerando o ano de identificação). Dessa forma, a árvore foi enraizada com duas sequências de referência: a primeira, sequenciada em 1987 e a última, sequenciada em 2019 (**Figura 15**). Como mencionado anteriormente, o NoV sofre mutações importantes em média a cada 2-3 anos,

principalmente em função da pressão seletiva que é gerada pelo sistema imune sobre este patógeno, especificamente no genótipo GII.4. Por este motivo, considerou-se este critério para a seleção das cepas a serem modeladas. As linhas vermelhas na árvore filogenética indicam as sequências de referência (a primeira e última sequenciada) e as linhas amarelas indicam o genótipo escolhido como representante do salto evolutivo a cada 2 anos, derivado de cada grande *cluster* para levar em conta a diversificação deste genótipo. Ou seja, ao todo, seis sequências utilizadas para a modelagem de proteínas, devido a ausência de estruturas cristalografadas para cada surto.

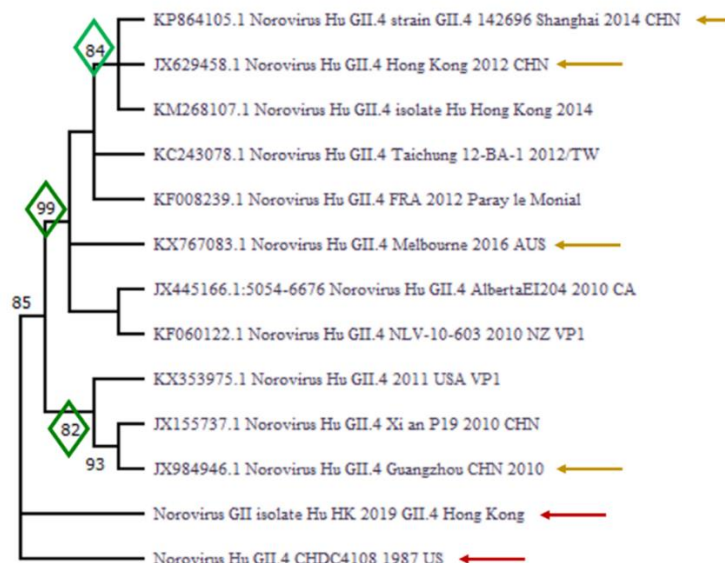


Figura 15: Árvore filogenética das sequências genéticas que codificam para a proteína VP1 de NoV GII.4 após de 2010. usou-se algoritmos para criar uma matriz de distâncias em pares estimadas usando o modelo JTT. Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,1625)). Esta análise envolveu 13 sequências de aminoácidos. Havia um total de 540 posições no conjunto de dados final. **Fonte:** elaboração própria.

5.3.2. MODELAGEM DAS PROTEINAS VIRAIS DO NOV

Uma vez selecionadas as sequências de aminoácidos com base nos anos de estudo (1987 *GenBank* ID: ACT76148.1; 2010 *GenBank* ID: AGC66783.1; 2012 *GenBank* ID: AFV99155.1; 2014 *GenBank* ID: ALQ43926; 2016 *GenBank* ID: ANP93428.1 e 2019 *GenBank* ID: QEL43936.1) elas foram copiadas no servidor de modelagem *Alphafold*. Ao obter as estruturas modeladas elas foram avaliadas utilizando o *Molprobity Score*. Os valores obtidos são descritos na **Tabela 6**. O valor aceitável e adequado de *Molprobity Score* para cada modelagem é de <2. As modelagens feitas nesta pesquisa demonstraram que os arquivos que foram preditos podem ser confiáveis para os ensaios de *docking*

molecular com o propósito de simular a da interação das proteínas antigênicas virais com o domínio *Ig-like* do receptor TREM-1 humano.

Tabela 6. Valores de qualidade da modelagem das proteínas VP1 do NoV GII.4 pelos anos escolhidos.

Parâmetros	1987	2010	2012	2014	2016	2020
<i>Molprobit</i> score	0.99	0.93	0.93	0.85	0.75	0.93
<i>Clashcore</i>	1.1	0.97	0.85	0.37	0.37	0.37
Rotâmeros ruins	0 (0%)	1 (0,22%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (0,66%)
Rotâmeros favoráveis	454 (100%)	455 (99,91%)	456 (99,13%)	457 (99,13%)	454 (98,91%)	445 (97,80%)
Ramachandran outliers	4 (0,74%)	3 (0,56%)	1 (0,19%)	3 (0,56%)	1 (0,19%)	0 (0%)
Ramachandran favored	521 (97,02%)	523 (97,21%)	522 (97,03%)	520 (96,65%)	524 (97,40%)	515 (95,72%)
Ligações ruins	0/4279 (0%)	0/4286 (0%)	0/4290 (0%)	0/4294 (0%)	0/4282 (0%)	0/4272 (0%)

MolProbit score: parâmetros do *MolProbit*. RMSD (*root-mean-square deviation*): desvio médio quadrático.; *Clashcore*: número de átomos sobrepostos. Ramachandran *outliers*: número de resíduos fora das regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran. Ramachandran *favored*: número de resíduo dentro das regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran.

5.3.3. O TREM-1 HUMANO INTERAGE COM AS PROTEÍNAS MODELADAS VP1 DE NOROVÍRUS HUMANO GII.4

Foram feitos seis ensaios de *docking* molecular para avaliar de forma longitudinal a interação entre a proteína VP1 do NoV GII.4 e o domínio de *Ig-like* da isoforma TREM-1 de humanos. Dentro de cada *docking* foram utilizadas as seguintes poses para cada ano: sete para o ano 1987, um para o ano 2010, oito para 2012, seis para 2014, dois para os anos de 2016 e 2019. Os valores energéticos obtidos nos servidores *online* por cada ensaio demonstraram valores ótimos/adequados (mais negativos) para esses ensaios que foram escolhidos, sendo este o critério para realizar as simulações de dinâmica molecular (DM) (**Tabela 7**).

Cada simulação por ano na DM foi avaliada em triplicatas com o propósito de evitar atribuir interações que não estivessem acontecendo. Em cada simulação, o valor dos RMSD, expresso em nanômetros (nm), foi semelhante nos complexos proteicos dos anos 1987, 2010, 2012, 2014 e 2019, onde a maioria esteve abaixo de 0,66 nm (6,6 Å) com valores entre 0,46 e 0,56 nm (4,6 e 5,6 Å) (**Figura 16**). É sabido que valores elevados do RMSD (não existem valores de referência para este indicador) ou valores flutuantes

(picos elevados) indicam maior separação entre as estruturas estudadas, mediado por mudanças conformacionais no tempo do ensaio. Nos nossos resultados demonstramos que durante o tempo definido para cada simulação (50 ns), os complexos estiveram ligados ou muito próximos um do outro, sugerindo assim que houve interação e que ela foi estável.

Nos ensaios com as VP1 provenientes dos anos 2010 e 2012, apesar de estáveis por boa parte do tempo de simulação, pelo menos uma das replicatas apresentou ao final da curva aumento no valor de RSMD. Apenas para a simulação com a proteína viral de 2016, duas das três simulações (replicata) apresentaram valores de RMSD superiores a 1,50 nm. Só uma das replicatas mostraram valores de RMSD estáveis e compatíveis com o observado nas outras simulações dos outros anos.

Sugerindo assim, que poderia existir uma interação entre TREM-1 humano e a VP1 do NoV. De igual forma, os valores de interação obtidos com o servidor *PPCheck*, mostraram que cada uma das simulações avaliadas estava dentro dos limites de referência preconizados para complexos já conhecidos, indicando que os ensaios de *docking* molecular podem ser um reflexo do que acontece naturalmente quando o vírus entra em contato com as células do sistema imune em humanos (**Tabela 7**).

Tabela 7. Valores de qualidade da modelagem das proteínas VP1 do NoV GII.4 pelos anos escolhidos.

Variáveis termodinâmicas	1987	2010	2012	2014	2016	2019
Ensaio analisado	6	1	8	6	2	2
Energia mais baixa (Kcal/mol)	-870.4	-838.3	-839.9	-770.9	-851.5	-827.5
Afinidade de ligação (ΔG -Kcal/mol ⁻¹)	-14.7	-14.3	-14.8	-14.0	-14.0	-13.4
Energia livre de ligação do complexo (Kcal/mol)	-101.64	-81.25	-107.17	-113.24	-101.86	-92.76
Energia estabilizadora total (KJ/mol)	-444.44	-396.76	-438.31	-481.25	-428.83	-489.20
Energia de ligação prevista (Kcal/mol)	-10.432	-9.849	-10.324	-9.986	-9.338	-9.851
Simulação RMSD 1 (nm)	0.5427	0.6572	0.5173	0.5857	0.6584	0.5756
Simulação RMSD 2 (nm)	0.4885	0.5452	0.6409	0.4908	0.6070	0.5194
Simulação RMSD 3 (nm)	0.5085	0.7505	0.7005	0.4497	1.7030	0.4943
PYDOCK_TOT (-60 a -5)	-50.165	-14.06	-48.502	-46.133	-33.456	-37.577
VDW (-200 a -50)	-139.10	-107.64	-139.07	-124.55	-106.62	-103.68
HBOND (-15 a -1)	-20.07	-82.95	-18.03	-11.8	-15.95	-16.95
FA_ATR (-100 a -20)	-98.158	-38.579	-94.76	-91.849	-83.901	-85.374
ELE (-60 a 0)	-27.035	-19.285	-27.149	-36.442	-24.881	-25.306
DESOLV (-30 a 20)	-9.219	-8.53	-7.446	2.765	2.088	-1.904

PYDOCK_TOT: *Score* para energia total de interação; ELE: energia eletrostática total; DESOLV: energia de dessolvatação; HBOND: potencial de ligações de hidrogênio; VDW: energia de van der Waals; FA_ATR: energia atrativa de van der Waals.

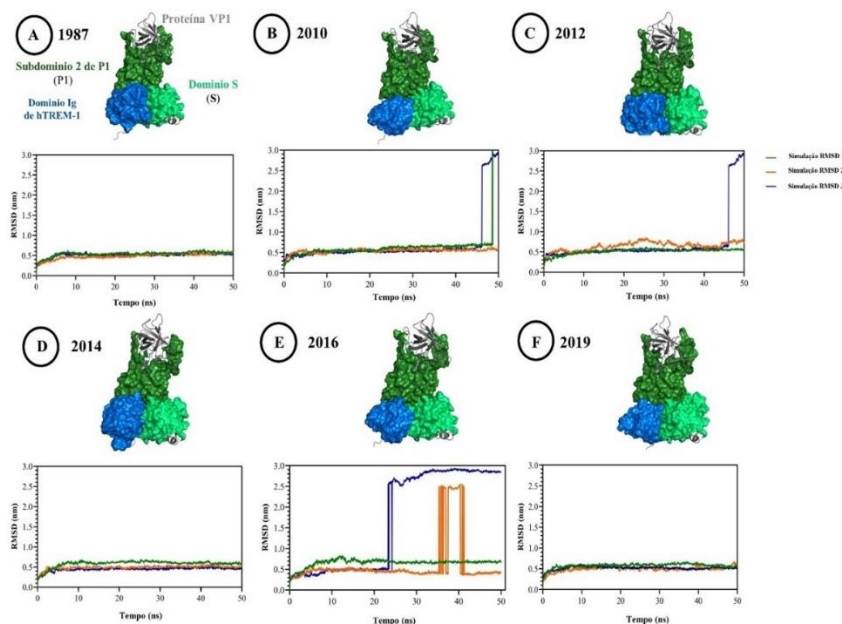


Figura 16: Dinâmicas moleculares das interações entre a proteína VP1 do NoV e o domínio Ig-like do TREM-1. Se representaram os valores dos RMSD de cada dinâmica molecular em nanômetros durante 50 nanosegundos dos dockings moleculares dos anos 1987, 2010, 2012, 2014, 2016 e 2019. Cada simulação foi representada com linealidade por uma cor diferente (1 simulação em verde, 2 simulação em laranja e a 3 simulação em azul escuro). **Fonte:** elaboração própria.

A seguir, são descritas as interações entre os domínios da proteína viral VP1 com o respectivos CDR, bem como os aminoácidos, e a distância das pontes de hidrogênio (PH) dentro de cada interface. Inicialmente, na interação do ano 1987 observou-se a identificação do domínio S pelo CDR3 e do subdomínio 2 da P1 pelo CDR1 destacam-se os resíduos da proteína VP1 os seguintes: R201 T219 K225 P226 F227 T228 V229 P230 I231 H459 E463 A465 P466 Q468 L474 R475 V477 N478 P479 V47 D480 T481 G482 R483 V484 I48 D49 P50 Y513 F514 R515 F516 D517 S518 W519 W51 I52 R536 R537 A538 L539 N54 N55 F56 V57 Q58 A59 P60 G61 E63 D84 N86 P87 Y88 L89 S90 H91 L92 S93 R94 M95 Y96 e para TREM-1 foram G109 L110 Q112 C113 V114 I115 Q117 K120 E121 P122 H123 M124 L125 F126 D127 R128 I129 R130 R131 V132 E26 E27 K28 Y29 E30 L31 T36 L37 D38 V39 K40 C41 D42 Y43 T44 L45 E46 K47 F48 A49 K53 Q56 I58 R59 D60 G61 E62 M63 P64 Y90 D92 H93 G94 L95 R97. Foram encontrados PH entre os aminoácidos T44B com L539A (3,28 Å) e R537 (2,69 Å), o aminoácido E46B com R536A (2,72 Å), o E121B com a W51A (2,92 Å), a D55A com a R537A (2,76 Å) e R128B com a P87A (2,923Å) (**Figura 17A**).

Já na interação de 2010, encontrou-se que o domínio S foi identificado pelo CDR2 e o subdomínio 2 da P1 pelo CDR1, os aminoácidos envolvidos na interface da proteína VP1 foram: Q106 I108 P10 S11 12 G13 S14 L151 E152 P153 A15 C200 R201 V202 L203 I231 R476 V478 N479 P480 D481 T482 G483 R484 V485 L486 D49 Y514 R516 F517 D518 S519 W51 I52 G535 R536 R537 R538 A539 L540 N54 N55 F56 V57 Q58 A59 P60 G61 G62 E63 N86 P87 Y88 A8 H91 L92 N9 e para o TREM-1: Y111 Q112 C113 H123 M124 L125 F126 D127 R128 I129 R130 V132 V133 T134 K135 E26 E27 K28 Y29 E30 L31 K32 E33 Q35 L37 D38 V39 K40 C41 D42 Y43 T44 L45 E46 F48 W55 K75 N76 S77 H78 P79 V80 I86 E88 D89 Y90 H91 D92 H93 G94 L95 L96 R97 V98. Foram encontrados os seguintes PH entre os aminoácidos: D42B com R516A (2,17Å), T43B com Y514A (2,92Å) e o S77B com Y88A (2,83Å) (**Figura 17B**).

Na interface de interação do ano de 2012, observou-se que o domínio S foi identificado pela CDR3 e o subdomínio 2 do domínio P1 pelo CDR1. Os resíduos envolvidos da proteína VP1 foram: R201 T219 T224 L225 P226 F227 S228 V229 P230 V231 Y460 E464 A466 P467 Q469 L475 R476 V478 479ASN V47 P480 D481 T482 G483 R484 V485 I48 D49 P50 Y514 F515 R516 F517 D518 S519 W51 W520 I52 R536 R537 R538 A539 L540 N54 N55 F56 V57 Q58 A59 P60 G61 E63 D84 86ASN P87 Y88 L89 S90 H91 L92 A93 R94 M95 Y96 e para TREM-1: S108 G109 L110 Q112 V114

I115 E121 P122 H123 M124 L125 F126 D127 R128 I129 R130 V132 E26 E27 K28 Y29 E30 D38 V39 K40 C41 D42 Y43 W44 L45 E46 K47 F48 A49 Q56 I58 R59 60ASP G61 E62 M63 P64 Y90 H91 D92 H93 G94 L95 R97. Foram encontrados os seguintes PH entre os aminoácidos: E46B com R537A (2,73Å), T44B com R538A (2,71Å), E121B com W51A (2,91Å) e N55A (2,87Å), R128B com P87A (2,82Å) e a M124B com Y88A (2,88Å) (**Figura 17C**)

A interface de interação referente ao ano 2014 mostrou que o domínio S foi identificado pela CDR3 e o subdomínio 2 da P1 pelo CDR1. Os resíduos encontrados na proteína viral VP1 foram: R201 L215 V216 P217 P218 T219 V220 E221 T224 K225 P226 F227 S228 V229 P230 V231 L232 T233 E236 Y460 Q463 E464 V478 N479 P480 D481 T482 G483 R484 V485 D49 P50 P511 N512 G513 Y514 F515 R516 F517 D518 S519 W51 I52 G535 R536 R537 R538 P539 L540 N55 V57 Q58 A59 P60 P87 Y88 S90 H91 L92 R94 M95 e para o TREM-1 foram G109 L110 Y111 Q112 I115 Q117 P118 P119 K120 E121 P122 H123 M124 L125 F126 D127 R128 I129 R130 I131 E26 E27 K28 Y29 V39 K40 C41 D42 Y43 T44 L45 E46 K47 F48 I58 R59 D60 G61 E62 M63 P64 Y90 H91 D92 H93 G94 L95 L96. Nesta interface foram observados os PH entre os resíduos K47B com o E464A (2,75Å), o D42B com o H92A (2,86Å), K121B com o R516A (2,48Å) e a R128B com a R538A (2,57Å) (**Figura 17D**).

Para o ano 2016, o domínio S foi identificado pelo CDR2 e o subdomínio 2 do domínio P1 pelas regiões de CDR1 e CDR3. Os aminoácidos identificados na interface por parte da proteína viral foram: Q106 I108 P10 A110 S11 D12 13GLY S14 I151 E152 P153 A15 A16 V19 R201 L203 I231 R476 V478 N479 P480 D481 T482 G483 R484 V485 L486 D49 Y514 F515 R516 D518 W51 I52 G533 T534 G535 R536 R537 R538 A539 L540 N54 N55 F56 V57 Q58 N86 P87 Y88 L89 A8 H91 N9 para o TREM-1: Y111 Q112 C113 H123 M124 L125 F126 D127 R128 I129 R130 V132 V133 T134 K135 E26 E27 K28 Y29 E30 I31 K32 Q35 L37 D38 V39 K40 C41 D42 Y43 T44 L45 E46 K47 F48 W55 N76A S77 H78 P79 I86 L87 E88 D89 Y90 H91 D92 H93 G94 L95 R97 V98 R99. As PH identificados foram nas interações entre os resíduos E46B e T44B com T514A (2,82 e 2,83Å); na Y43 com a R516A (2,76Å), L125B com R538A (2,84Å) mais dois com a A423 (3,21 Å e 3,06Å) (**Figura 17E**).

Finalmente, com a VP1 de 2019, o domínio S foi identificado pela região CDR2 e o subdomínio 2 do domínio P1 pelas regiões CDR1 e CDR3. Os resíduos achados na interface de interação da proteína viral foram: Q106 I108 P10 S11 D12 G13 S14 I151

E152 P153 T15 A16 R201 V202 L203 T204 E21 F227 T228 I231 R476 V478 N479 P480 D481 T482 G483 R484 V485 D49 N512 Y514 R516 F517 D518 S519 W51 I52 G535 R536 R537 R538 V539 L540 N54 N55 F56 V57 Q58 P60 6E3 P87 Y88 H91 N9 e para o TREM-1: M100 V101 L103 Y111 Q112 C113 H123 L125 F126 D127 R128 I129 L131 V132 V133 T134 K135 E26 E27 K28 Y29 E30 I31 K32 E33 G34 Q35 T36 L37 D38 V39 K40 C41 D42 Y43 T44 L45 E46 F48 W55 N76 S77 H78 P79 V80 Q81 I86 L87 E88 D89 Y90 D92 G93 G94 L95 L96 R97 V98 R99. Foram encontrados os PH entre as T44B com a P480A (2,12Å); enquanto a E127B gerou PH com a R448A (2,70Å) (**Figura 17F**).

Para os anos analisados, encontramos que existe uma variação na forma com a qual o NoV interage com o TREM-1. A CDR envolvida na maioria dos casos foi a CDR3, seguida pela CDR1. Outro dado importante foi o padrão de reconhecimento contínuo dos domínios S e P1 ao longo dos anos, pois é conhecido que estes domínios são conservados, em comparação ao domínio P2. Esta característica de reconhecimento de domínios conservados corresponde a receptores da imunidade inata. Isto sugere, portanto, que o TREM-1 pode ser considerado como um correceptor para o NoV.

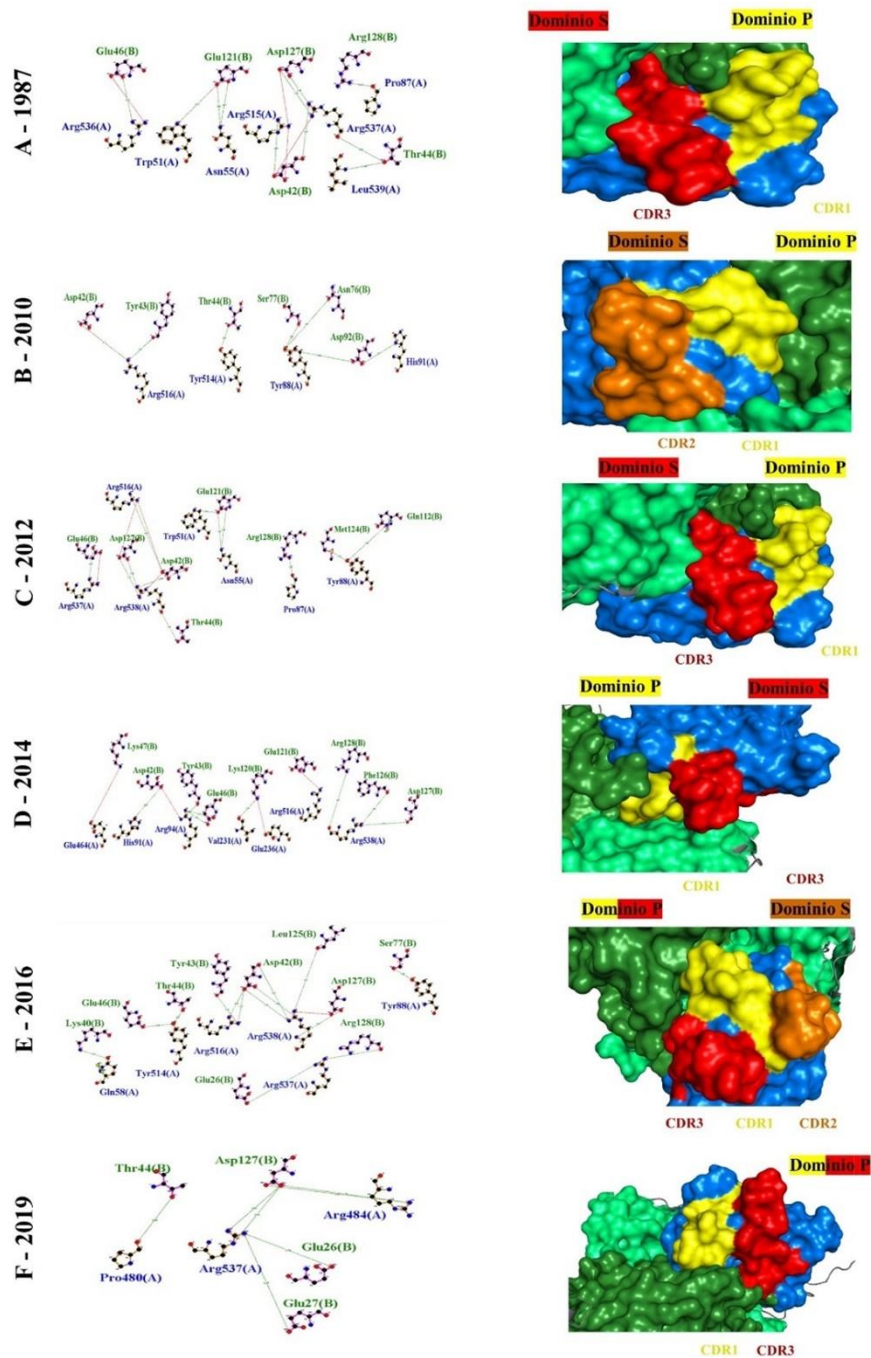


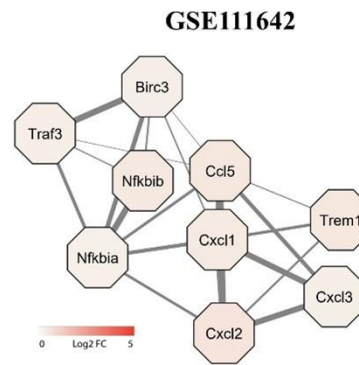
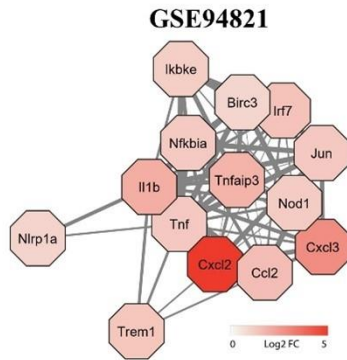
Figura 17: Sítios de ligação entre os CDR do receptor TREM-1 com os domínios da proteína antígeno VP1 do NoV. Se identificaram os sítios de interação nos quais o TREM-1 estava interagindo com a proteína VP1. Nos diferentes anos foi observado que o CDR1 (cor amarelo), CDR2 (cor laranja) e CDR3 (cor vermelha) entra em contato com os domínios S (cor verde menta) e domínio P (cor verde floresta). Foi observado que o CDR3 é aquele que se encontra com maior frequência na interação. Assim mesmo, foi observado que os aminoácidos que formam parte dos CDR geram PH com os aminoácidos que formam parte dos domínios S e P da proteína VP1.

5.4. ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE REDES DE INTERAÇÃO GENICA

Em função da participação do TREM-1 na amplificação do processo inflamatório, buscou-se analisar redes de interação gênica entre a expressão do receptor com os genes mais expressos nas vias de apoptose e piroptose. Após de uma infecção viral as células sofrem alterações morfológicas e fisiológicas que resultam em morte celular por vias distintas (Ashida et al., 2011). Dessa forma, foram consideradas as duas vias de morte celular mais esperadas nesse contexto, apoptose e piroptose, já que o efeito citopático gerado pela infecção por NoV é a indução da morte celular (Bok et al. 2009).

Utilizando novamente os dados provenientes dos estudos de transcriptômica dos modelos murinos, foram considerados 69 genes envolvidos na via da piroptose e 108 genes envolvidos na via do apoptose. A contribuição desses genes foi analisada com o grau de evidência que são citados dentro de um mesmo processo celular e segundo os ensaios *in vitro* onde eles estão coexpressos, utilizando o servidor STRING. Como evidenciado na figura 18, os genes que são expressos e codificam as proteínas da via da piroptose estavam majoritariamente relacionados com a expressão de *Trem1*; mais especificamente, para os genes *Il1b*, *Ccl5*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Tnf* e *Ccl2*. Por outro lado, os genes associados a via de apoptose não tiveram relação com o aumento da expressão de *Trem1*, nesse sentido, o principal gene relacionado foi o *Tnf*. Os resultados se apresentam na Figura 18.

Genes da piroptose



Genes da apoptose

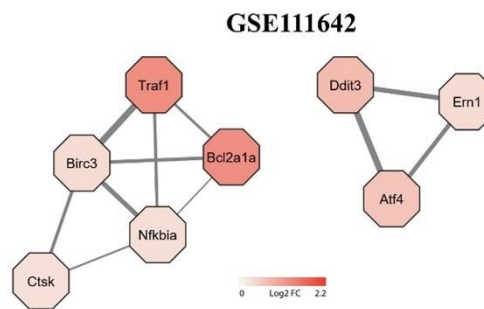
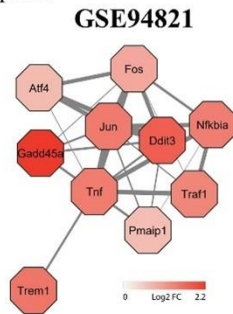


Figura 18: Redes de interação gênica entre os genes envolvidos na via de TREM-1 e as vias de piroptose e apoptose. Se-apresentam dois dias de morte celular, piroptose e apoptose. Utilizaram-se os estudos de transcriptômica para relacionar a expressão de *Trem1* com genes aumentados nestas vias. O gradiente de aumento da expressão foi representado com vermelha. Um aumento na sua intensidade demonstra que seu aumento foi relacionado com o aumento da expressão de Trem1. As redes se apresentam mediante setas em cor cinza. O número de redes representa a co-expressão, é dizer, que tem sido encontrado (ambos genes) citados na bibliografia científica e que tem sido encontrados achados em resultados de ensaios biológicos, assim como sua proximidade biológica. **GSE94821:** Estudo do Enosi e cols, 2029 e **GSE111642:** estudo do Levenson e cols 2018.

6. DISCUSSÃO

A nossa abordagem inicialmente contou com a análise de dados provenientes de estudos de transcriptômica disponíveis em servidores de domínio público. Um aumento na expressão dos genes *Trem1* e *Trem3* em um modelo *in vitro* foi demonstrado em células RAW 264.7, utilizando a cepa murina MNV-1. Esta evidência coincide com o achado de Amrun e cols (2020), que avaliaram a relação entre o TREM-1 e um outro vírus (EV-A71), que também possui tropismo intestinal. Ao mostrar uma expressão do gene *Trem1* no curso temporal da infecção, o perfil transcriptômico (RNA-seq) de PBMCs infectadas com EV-A71 demonstrou diferenças importantes no perfil de expressão do receptor que estavam diretamente correlacionadas com a virulência da cepa. De forma semelhante ao que foi descrito no estudo do Levenson e colaboradores no ano 2018, Amrun e cols mostraram mediante análises da expressão de vias de sinalização, que os genes envolvidos na via de ativação de TREM-1 estavam aumentados, principalmente nas amostras obtidas dos pacientes com o pior prognóstico clínico na infecção por EV-A71. Este aumento também foi associado com um aumento da carga viral e expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias como *Cxcl3*, *Il1b*, *Il6* e *Ccl2*. Posteriormente, utilizando o peptídeo LP17 (bloqueador de TREM-1), eles observaram que a participação do receptor tinha maior importância nas primeiras horas de infecção. Este dado está em acordo com os obtidos no presente estudo que observou aumento de TREM-1 nas primeiras 8 horas de infecção. O mesmo comportamento foi encontrado por Levenson e cols utilizando BMDM, onde nas primeiras 4 horas existe um aumento dos genes envolvidos na via de TREM-1, demonstrado por uma análise de enriquecimento dos grupos gênicos ou *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA). Isto demonstra a importância do TREM-1 na imunopatologia viral, destacando-se nas primeiras horas do processo infeccioso.

No presente estudo também observamos maior expressão de genes que codificam para produção de citocinas que são importantes na resposta antiviral como *Il1b* e *Tnf* (Enosi et al 2020). Apesar das diferenças quanto à origem das células e comportamento do vírus, é notória a contribuição e o papel do TREM-1 quando ele é expresso nas células RAW 264.7 e BMDM, onde sua ativação é associada ao aumento da expressão de moléculas cruciais ao processo inflamatório, como as quimiocinas CXCL2 e CXCL3. Estas moléculas, conhecidas como quimiocinas são proteínas pequenas 8–10 kDa, que tem sido relacionada com a quimioatração de neutrófilos, migração e a resposta inflamatória

pelas células nos sítios das lesões (Al-Alwan et al. 2013; Qu et al. 2023). Assim como também foi observado um aumento na expressão genica de proteínas que mediam a resposta inflamatória como *Nfkb* e *Myd88*.

O modelo de infecção em murinos, embora apresente limitações, tem auxiliado na compreensão das interações entre o MNoV e o hospedeiro. Dessa forma, o fato de utilizar estudos de transcriptômica com base em modelos *in vitro* utilizando macrófagos murinos permite associar eventos celulares, já que existem similaridades estruturais entre o NoV e o MNoV (Taube et al., 2010) a análise de dados de transcriptômica em macrófagos ganha relevância ainda maior, especialmente na infecção causada por um vírus com tropismo para essa célula que está presente no MALT (Grau et al. 2017) que é o sítio próximo da infecção entérica pelo NoV. Apesar da relação entre TREM-1 e outros vírus já ter sido identificada (Mohamadzadeh et al. 2006; Denner et al. 2013; Ruiz et al. 2014; Roe et al. 2014; Campbell et al. 2019; Hyun et al. 2019; Amrun et al. 2020), nenhum estudo havia mostrado até o momento, uma relação direta entre esse receptor e o NoV.

Considerando que a interação do CD300lf foi descrita na infecção utilizando o MNoV, e com base nos resultados de análise transcriptômica, realizamos um estudo da interação do receptor TREM-1 murino com o segmento P da proteína VP1 murina. O domínio P possui três alças antigênicas importantes que são reconhecidas pelo sistema imune, a alça A'-B' (aminoácidos da posição 299 a 300), a alça C'-D' (aminoácidos da posição 342 ao 350) conhecido também como a alça conservada, e a alça E'-F' (aminoácidos 378 ao 388) ou alça variável (Taube et al. 2010). O uso da estrutura do domínio P da proteína VP1 do MNoV se justifica pelo fato do modelo murino ser aceito para mimetizar a infecção do NoV (Wobus et al. 2006).

Na interface de interação obtida pelo ensaio do *docking* molecular entre ambas as estruturas, foi evidenciado que 60% dos aminoácidos que estão presentes no segmento P2 da proteína VP1 do MNoV interagem com o CDR1 do domínio Ig do TREM-1. Uma das características da região P2 é que corresponde à sequência hipervariável da proteína VP1, demonstrando que esse é o domínio principal para ligação dos receptores celulares (Tan et al. 2005). Embora, na interação entre o CD300lf e o segmento viral P2 do MNoV tenha sido descrita uma interação entre CDR3 e C'-C' do CD300lf (Nelson et al. 2018). Nossos resultados mostraram uma interação com a porção CDR1 de TREM-1 com a região C'-D' dos segmentos P2 da VP1. É necessário ressaltar que os CDRs são definidos

como estruturas terciárias que estão presentes em anticorpos e proteínas da Ig-SF que interagem com os antígenos. Cada CDR tem entre 100 e 115 aminoácidos individualmente. A interação inicial do antígeno com esta estrutura é necessária para desencadear uma resposta imune celular e humoral. Dentre eles, o CDR que oferece a maior variabilidade é o CDR3 devido à sua hipermutabilidade e ao número de aminoácidos presentes (Dermody et al. 2009; Kunik et al. 2012). Nesse sentido, Piña (2009) demonstrou em monócitos humanos estimulados com LPS, que embora o CDR1 não gere uma resposta inflamatória exacerbada, a ativação dessa região no TREM-1 gera respostas celulares e produção de citocinas. Dessa forma, é possível sugerir que o TREM-1 murino reconhece segmentos conservados utilizando o CDR1.

Além da contribuição do TREM-1 murino, o TREM-3, que em humanos se codifica como um pseudogene, possui função importante em camundongos. Ele mimetiza as atividades do TREM-1 em camundongos, como amplificador do processo inflamatório (Chung et al. 2002). Diante disso, é natural que o TREM-3 também fosse testado quanto à contribuição na interação com o MNoV por ter sido observado como um gene aumentado no estudo de transcriptômica de Enosi e cols (Enosi et al., 2019). Infelizmente, como a estrutura do TREM-3 não está cristalografada, ela precisou ser modelada no UNIPROT para realizarmos algumas análises. O valor da energia livre de ligação foi melhor do que o observado para o TREM-1. Adicionalmente, o TREM-3 reconhece a VP1 também na porção da alça C-D' da VP1. A ausência de estrutura cristalografada de TREM-3 inviabiliza fazer algumas comparações com o TREM-1, como por exemplo, identificar quais CDRs estão envolvidos na identificação das moléculas e a quantidade de aminoácidos envolvidos no processo. Apesar disso, como a mesma porção da proteína viral que interage com o TREM-1 parece ser a que interage com o TREM-3, podemos inferir que a região CDR1 é que está envolvida no processo de reconhecimento da proteína viral em murinos.

Como foi observada a interação entre as proteínas virais do MNoV com o TREM-1 e o TREM3 murinos, procuramos observar a interação no modelo humano. No presente estudo, em função da quantidade de sequências existentes do NoV, precisamos definir quais seriam utilizadas. Dessa forma, utilizou-se a primeira cepa sequenciada, denominada cepa Bistol (1987), e as demais obtidas nos anos de 2010, 2012, 2014, 2016 e 2019 mediante análises filogenéticas.

Nos testes de cada ano encontramos o reconhecimento de segmentos conservados da proteína VP1 do NoV, como os segmentos S e P1 pelo TREM-1 humano, o que sugere que os segmentos conservados não sofreram ao longo do tempo modificações em suas sequências permitindo a identificação por receptores da imunidade inata (Li et al. 2021). Da mesma forma, as simulações de DM mostraram que esta ligação pode ocorrer espontaneamente e de forma estável na natureza. No *docking* molecular observou-se a presença frequente dos aminoácidos que fazem parte da região CDR3 do TREM-1 na interação com a proteína viral VP1, mais especificamente com o segmento conservado P1. Estes dados sugerem fortemente que, além do TREM-1 poder estar envolvido na imunopatogênese gerada pela infecção por NoV, ele pode atuar como um co-receptor viral. De forma semelhante, outro estudo do nosso grupo, mostrou que a região CDR3 do TREM-1 é a principal envolvida no reconhecimento de outros ligantes como Tag7 (PGLYRP1), actina, HMGB1, eCIRP e Hsp70 e (Matos et al., 2023).

As diferenças observadas na participação das regiões de CDR quando comparados os resultados do receptor murino e humano, pode, pelo menos em parte, estar relacionada a diversidade das cepas do vírus. Por um lado, o MNoV é utilizado em ambientes controlados em animais livres de patógenos específicos, o que por si só, já caracteriza grande divergência sobre o padrão de infecção observado em humanos. Por outro lado, em humanos, existe um genogrupo principal (GII.4) de infecção, que a cada dois-três anos é submetida a pressão seletiva, gerando assim, uma diversidade de cepas do mesmo genótipo com distribuição global. De forma semelhante, além da evidência mostrada nos ensaios de DM, também demonstramos um aumento da energia livre de ligação nas interações ao longo dos anos, o que sugere fortemente que essa interação aconteça efetivamente em humanos. Isto reforça a possibilidade do TREM-1 atuar como correceptor viral na infecção pelo NoV.

Se por um lado, os dados do presente estudo sugerem que o TREM-1 possa atuar como correceptor na infecção pelo NoV, por outro, o perfil de interação com os CDRs e a ativação de vias de sinalização associadas ao receptor, podem estar associadas a aspectos fundamentais da fisiopatologia da infecção pelo vírus, tais como: sobrevivência celular como mecanismo de evasão do sistema imune (Yuan et al. 2014; Gibot et al 2019) e o aumento na produção de TNF- α pela interação dos CDR2 e CDR3 (Piña 2009).

Nesse sentido, buscou-se estabelecer uma relação entre o TREM-1 e o processo de morte celular induzida pelo MNoV para fazer uma extrapolação do que poderia acontecer no modelo humano. Utilizando novamente os dados de transcriptômica, nossas redes de interação mostraram uma associação no aumento da expressão do gene de *Trem1* com genes envolvidos na via de piroptose. Uma das associações mais interessantes foi com o gene da *Il1b*. Esses dados estão em acordo com o estudo de Dubois e cols (2019) que demonstrou que macrófagos derivados de camundongos *Stat1*^{-/-} apresentam ativação do inflamassoma durante a infecção pelo MNoV. Mesmo após indução da resposta inflamatória intracelular, foi observado um aumento da atividade da Gasdermina D (GSDMD) e uma maior produção de IL-1 β , resultando em morte celular por piroptose.

Desta forma, pode-se sugerir que durante a infecção pelo NoV, a ativação de TREM-1 também pode resultar na ativação de inflamassoma e a consequente morte celular por piroptose que é mais retardada quanto à apoptose em termos de tempo (Taabazuinget al., 2017). Tal fato, é reforçado pela expressão de genes associados a integridade da membrana mitocondrial e ao aumento da sobrevivência celular, sugerindo um evento orquestrado pela atividade deste receptor ao induzir a expressão das proteínas antiapoptóticas da família BCL2, como foi demonstrado em macrófagos infectados com HIV (Yuhan et al. 2017). Diante disso, podemos acreditar que o NoV utiliza os macrófagos intestinais como sítio replicativo, gerando períodos de latência nos pacientes infetados, como já foi demonstrado anteriormente em MNoV, junto com a amplificação da resposta imune (Hassan et al. 2020). Em outros vírus de importância para a saúde pública, observa-se morte celular induzida por outros mecanismos. Por exemplo, no caso do Rotavírus, observa-se com mais frequência a indução de apoptose e necroptose (Mukhopadhyay et al., 2022). Na infecção pelo Astrovírus, a ativação da caspase 8 parece ser fundamental na indução do apoptose (Guix et al., 2044). Já na infecção do EV-A71, que também tem uma relação com expressão do TREM-1 e um tropismo intestinal, os tipos de morte celular foram a apoptose e a autofagia (Hu et al., 2023).

Apesar da piroptose ter se relacionado mais com a atividade de *Trem1* do que a apoptose, é necessário destacar que a piroptose é um tipo de morte celular. Nossos dados sugerem uma dinâmica importante na interação do NoV com humanos. Em um primeiro momento, existe uma liberação de moléculas pró-inflamatórias, em seguida, observa-se o processo de contra regulação com liberação de moléculas anti-inflamatórias, razão pela qual se explica as manifestações leves durante a doença controlada e sua rápida remissão

(Glass et al, 2009). Assim, podemos sugerir que o TREM-1 pode ajudar no primeiro momento como um amplificador da resposta pro-inflamatória, utilizando os diferentes CDR da sua estrutura bioquímica contribuindo no processo de ativação de vias celulares.

Estudos que visem esclarecer aspectos sobre a interação do NoV com o hospedeiro, principalmente aqueles envolvendo a interação do vírus com o sistema imune, são de grande importância já que servem como base para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas ou profiláticas. O NoV é conhecido por ser um vírus fastidioso, ou seja, não é facilmente cultivado *in vitro*. Apesar disso, modelos experimentais, especialmente envolvendo camundongos, têm sido usados para ajudar a ampliar o conhecimento específico da interação deste vírus com o organismo hospedeiro. No entanto, essas estratégias apresentam algumas limitações e nem sempre os dados obtidos em modelos murinos são representativos do que acontece em seres humanos. Diante disso, estratégias que utilizam ferramentas de bioinformática são essenciais para esclarecer melhor aqueles aspectos fundamentais dessa complexa relação entre o vírus e diferentes mecanismos de interação com o hospedeiro.

Partindo da identificação do CD300lf como receptor da infecção por MNoV (Graziano et al., 2020); e a relação evolutiva e molecular que tem com o TREM-1 (Colonna 2023), acreditamos que este último possa potencialmente reconhecer os mesmos ligantes que o CD300 reconhece (glicoproteínas e lipídios). Assim, é viável assumir que o TREM-1 também pode interagir com o NoV e contribuir para o resultado de sua infecção. Nossos resultados mostram que o TREM-1 parece possuir importante e direto papel na fisiopatologia da infecção provocada pelo NoV, especialmente nos períodos iniciais da infecção. Em função da identificação de sítios de interação nos CDR do receptor com regiões conservadas do vírus, acreditamos que o TREM-1 possa servir como um possível correceptor, que está em acordo com a teoria proposta do uso de diferentes receptores na entrada do NoV nas células (Williams et al., 2021).

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse estudo são inéditos, já que até o momento não existem estudos que observaram a interação entre TREM-1 e NoV, principalmente, utilizando as estratégias do presente estudo. Em função da preservação temporal da interação entre o TREM-1 e o NoV, acreditamos que o receptor possa servir como correceptor para este vírus, além dos aspectos imunes propriamente ditos. Apesar das limitações associados ao cultivo do NoV, abordagens *in silico*, como as utilizadas nesse estudo, são fundamentais e têm grande impacto sobre o conhecimento específico da interação do vírus com o organismo humano. Acreditamos que nossos resultados possam auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que tenham como alvo a modulação da atividade do TREM-1 e, conseqüentemente, ajudem a minimizar os impactos sobre a saúde pública, bem como melhorar a evolução clínica dos casos que evoluem com pior prognóstico.

Por fim, podemos inferir que a interação dos domínios conservados S e P do NoV com o domínio Ig do receptor TREM-1 podem gerar três efeitos principais: A) estimular a expressão de genes proinflamatórios nas primeiras etapas da infecção, o que aumenta a migração de células do sistema imune para o sítio inflamatório; B) favorecer a replicação (curto prazo) e latência (longo prazo) do NoV em macrófagos (M ϕ) e, C) como foi evidenciado nos cálculos das interações intermoleculares, se pode considerar o receptor TREM-1 como um bom candidato de possível receptor na infecção pelo NoV (**Figura 19**).

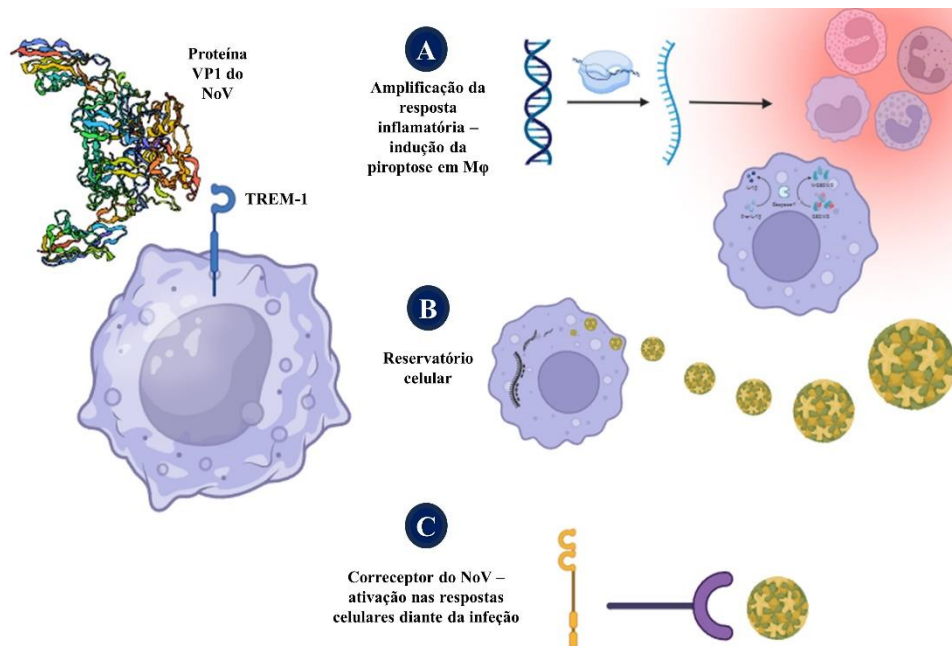


Figura 19: Teoria proposta da interação do NoV com o receptor TREM. Se propõe que a proteína VP1 do NoV do GII.4 pode ter interação com TREM-1 que está presente na superfície dos Macrófagos (Mφ) que estão residenciados no MALT. Esta interação traz como consequência a ativação da via de TREM-1 que age como um importante amplificador da resposta imune inata – resposta antiviral (A). A análise de transcriptômica mostrou um aumento da via da piroptose, o que aumenta a produção de mediadores inflamatórios. Posterior que acontece a primeira interação entre o NoV e o Mφ, (B) a ativação de TREM-1 induz um aumento da integridade da mitocôndria que mantém a supervivência celular o que permite agir ao Mφ como um reservatório celular. E dada a identificação na interação de TREM-1 pelos CDR2 e CDR3 com os domínios conservados S e P1 da proteína VP1 do NoV GII.4 (C) e a sua proximidade evolutiva com o CD300 se traz TREM-1 como um possível correceptor viral na infecção pelo NoV. **Fonte:** feita no Biorender.com.

10. REFERÊNCIAS

1. Afework, D.T., Shumie, M.K., Endalew, G.F. et al. Pooled prevalence and genetic diversity of norovirus in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Virology* 19, 115 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01835-w>.
2. Al-Alwan LA, Chang Y, Mogas A, Halayko AJ, Baglolle CJ, Martin JG, Rousseau S, Eidelman DH, Hamid Q. Differential roles of CXCL2 and CXCL3 and their receptors in regulating normal and asthmatic airway smooth muscle cell migration. *J Immunol.* 2013 Sep 1;191(5):2731-41. doi: 10.4049/jimmunol.1203421. Epub 2013 Jul 31. PMID: 23904157; PMCID: PMC3748335.
3. Allcock RJ, Barrow AD, Forbes S, Beck S, Trowsdale J. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *Eur J Immunol.* 2003 Feb;33(2):567-77. doi: 10.1002/immu.200310033. PMID: 12645956.
4. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol.* 2018 Oct 16;9:2379. doi: 10.3389/fimmu.2018.02379. PMID: 30459758; PMCID: PMC6232773.
5. Amrun SN, Tan JLL, Rickett NY, Cox JA, Lee B, Griffiths MJ, Solomon T, Perera D, Ooi MH, Hiscox JA, Ng LFP. TREM-1 activation is a potential key regulator in driving severe pathogenesis of enterovirus A71 infection. *Sci Rep.* 2020 Mar 2;10(1):3810. doi: 10.1038/s41598-020-60761-5. PMID: 32123257; PMCID: PMC7052206.
6. Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins.* 2007 Oct 1;69(1):139-59. doi: 10.1002/prot.21495. PMID: 17598144.
7. Ao Y, Lu L, Xu J. Emergence of GII.4 Sydney[P16]-like Norovirus-Associated Gastroenteritis, China, 2020-2022. *Emerg Infect Dis.* 2023 Sep;29(9):1837-1841. doi: 10.3201/eid2909.230383. PMID: 37610173; PMCID: PMC10461682.
8. Arias, Juan Miguel, Elihu Paternina, and Daniel Barragán. "Physical adsorption on solids: thermodynamic aspects." *Química Nova* 32 (2009): 1350-1355.
9. Arjmand B, Hamidpour SK, Alavi-Moghadam S, Yavari H, Shahbazbadr A, Tavirani MR, Gilany K, Larijani B. Molecular Docking as a Therapeutic Approach for Targeting Cancer Stem Cell Metabolic Processes. *Front Pharmacol.* 2022 Feb 21;13:768556. doi: 10.3389/fphar.2022.768556. Erratum in: *Front Pharmacol.* 2022 May 02;13:892656. PMID: 35264950; PMCID: PMC8899123.
10. Arrouzet CJ, Ellis K, Kambhampati A, Chen Y, Steele M, Lopman B. Population-Level Human Secretor Status Is Associated With Genogroup 2 Type 4 Norovirus Predominance. *J Infect Dis.* 2020 May 11;221(11):1855-1863. doi: 10.1093/infdis/jiz693. PMID: 31900482; PMCID: PMC7213563.

11. Arts RJ, Joosten LA, Dinarello CA, Kullberg BJ, van der Meer JW, Netea MG. TREM-1 interaction with the LPS/TLR4 receptor complex. *Eur Cytokine Netw.* 2011 Mar;22(1):11-4. doi: 10.1684/ecn.2011.0274. PMID: 21393102.
12. Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa C. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *J Cell Biol.* 2011 Dec 12;195(6):931-42. doi: 10.1083/jcb.201108081. Epub 2011 Nov 28. PMID: 22123830; PMCID: PMC3241725.
13. Baker ES, Luckner SR, Krause KL, Lambden PR, Clarke IN, Ward VK. Inherent structural disorder and dimerisation of murine norovirus NS1-2 protein. *PLoS One.* 2012;7(2):e30534. doi: 10.1371/journal.pone.0030534. Epub 2012 Feb 7. PMID: 22347381; PMCID: PMC3274520.
14. Behera S, Voshall A, Moriyama EN. Plant Transcriptome Assembly: Review and Benchmarking. In: Helder I. N, editor. *Bioinformatics [Internet]*. Brisbane (AU): Exon Publications; 2021 Mar 20. Chapter 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK569566/> doi: 10.36255/exonpublications.bioinformatics.2021.ch7
15. Bellido-Blasco JB, Arnedo-Pena A. Epidemiology of Infectious Diarrhea. *Encyclopedia of Environmental Health.* 2011;659-671. doi:10.1016/B978-0-444-63951-6.00689-6
16. Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, Sieling PA, Stenger S, Colonna M, Modlin RL. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol.* 2003 Apr 1;170(7):3812-8. doi: 10.4049/jimmunol.170.7.3812. PMID: 12646648.
17. Bok K, Prikhodko VG, Green KY, Sosnovtsev SV. Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. *J Virol.* 2009 Apr;83(8):3647-56. doi: 10.1128/JVI.02028-08. Epub 2009 Feb 11. PMID: 19211757; PMCID: PMC2663291.
18. Borg C, Jahun AS, Thorne L, Sorgeloos F, Bailey D, Goodfellow IG. Murine norovirus virulence factor 1 (VF1) protein contributes to viral fitness during persistent infection. *J Gen Virol.* 2021 Sep;102(9):001651. doi: 10.1099/jgv.0.001651. PMID: 34491891; PMCID: PMC8567427.
19. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 2000 May 15;164(10):4991-5. doi: 10.4049/jimmunol.164.10.4991. PMID: 10799849.
20. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature.* 2001 Apr 26;410(6832):1103-7. doi: 10.1038/35074114. PMID: 11323674.
21. Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):911-22. doi: 10.1038/nri2436. PMID: 18989317; PMCID: PMC7097711.
22. Brocard M, Lu J, Hall B, Borah K, Moller-Levet C, Georgana I, Sorgeloos F, Beste DJV, Goodfellow IG, Locker N. Murine Norovirus Infection Results in Anti-inflammatory Response Downstream of Amino Acid Depletion in Macrophages. *J Virol.* 2021 Sep 27;95(20):e0113421. doi: 10.1128/JVI.01134-21. Epub 2021 Aug 4. PMID: 34346771; PMCID: PMC8475529.

23. Brydges SD, Broderick L, McGeough MD, Pena CA, Mueller JL, Hoffman HM. Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies. *J Clin Invest.* 2013 Nov;123(11):4695-705. doi: 10.1172/JCI71543. PMID: 24084736; PMCID: PMC3809806.
24. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis.* 2005 Jul;11(7):1079-85. doi: 10.3201/eid1107.041273. PMID: 16022784; PMCID: PMC3371806.
25. Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2006 Feb;44(2):327-33. doi: 10.1128/JCM.44.2.327-333.2006. PMID: 16455879; PMCID: PMC1392656.
26. Campbell GR, To RK, Spector SA. TREM-1 Protects HIV-1-Infected Macrophages from Apoptosis through Maintenance of Mitochondrial Function. *mBio.* 2019 Nov 12;10(6):e02638-19. doi: 10.1128/mBio.02638-19. PMID: 31719184; PMCID: PMC6851287.
27. Campillay-Véliz CP, Carvajal JJ, Avellaneda AM, Escobar D, Covián C, Kalergis AM, Lay MK. Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response. *Front Immunol.* 2020 Jun 16;11:961. doi: 10.3389/fimmu.2020.00961. PMID: 32612600; PMCID: PMC7308418.
28. Campillay-Véliz CP, Carvajal JJ, Avellaneda AM, et al. Proteínas do Norovírus Humano: Implicações no Ciclo Replicativo, Patogênese e Resposta Imunológica do Hospedeiro. *Frente Immunol.* 2020;11:961. Publicado em 16 de junho de 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.00961.
29. Cannon JL, Seabolt MH, Xu R, Montmayeur A, Suh SH, Diez-Valcarce M, Bucardo F, Becker-Dreps S, Vinjé J. Gut Microbiome Changes Occurring with Norovirus Infection and Recovery in Infants Enrolled in a Longitudinal Birth Cohort in Leon, Nicaragua. *Viruses.* 2022 Jun 27;14(7):1395. doi: 10.3390/v14071395. PMID: 35891376; PMCID: PMC9323674.
30. Cannon, J.P., O'Driscoll, M. & Litman, G.W. Specific lipid recognition is a general feature of CD300 and TREM molecules. *Immunogenetics* 64, 39–47 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00251-011-0562-47>
31. Cantelli CP, Fumian TM, Malta FC, da Cunha DC, Brasil P, Nordgren J, Svensson L, Miagostovich MP, de Moraes MTB, Leite JPG. Norovirus infection and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol.* 2020 Aug;82:104280. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104280. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32165242.
32. Capece G, Gignac E. Norovirus. [Updated 2021 Aug 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513265/>
33. Carrasco K, Boufenzler A, Jolly L, Le Cordier H, Wang G, Heck AJ, Cerwenka A, Vinolo E, Nazabal A, Kriznik A, Launay P, Gibot S, Derive M. TREM-1 multimerization is essential for its activation on monocytes and neutrophils. *Cell Mol Immunol.* 2019 May;16(5):460-472. doi: 10.1038/s41423-018-0003-5. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29568119; PMCID: PMC6474208.

34. Casillas-Vega N, Flores-Rodríguez F, Sotelo-Coronado I, Vera-García ME, García-Heredia A, Rivas-Estilla AM, Lozano-Sepúlveda SA, García S, Flores-Arechiga A, Heredia N. Norovirus Is the Most Frequent Cause of Diarrhea in Hospitalized Patients in Monterrey, Mexico. *Pathogens*. 2020 Aug 19;9(9):672. doi: 10.3390/pathogens9090672. PMID: 32824952; PMCID: PMC7559510.
35. Cates JE, Vinjé J, Parashar U, Hall AJ. Recent advances in human norovirus research and implications for candidate vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2020 Jun;19(6):539-548. doi: 10.1080/14760584.2020.1777860. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32500763.
36. Chaudhury S, Lyskov S, Gray JJ. PyRosetta: a script-based interface for implementing molecular modeling algorithms using Rosetta. *Bioinformatics*. 2010 Mar 1;26(5):689-91. doi: 10.1093/bioinformatics/btq007. Epub 2010 Jan 7. PMID: 20061306; PMCID: PMC2828115.
37. Chen C, Wu Y, Li J, Wang X, Zeng Z, Xu J, Liu Y, Feng J, Chen H, He Y, Xia R. TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining. *Mol Plant*. 2023 Nov 6;16(11):1733-1742. doi: 10.1016/j.molp.2023.09.010. Epub 2023 Sep 22. PMID: 37740491.
38. Chen Y, Hall A, Kirk M. Norovirus Disease in Older Adults Living in Long-Term Care Facilities: Strategies for Management. *Curr Geriatr Rep*. 2017;6(1):26-33.
39. Cheng TM, Blundell TL, Fernandez-Recio J. pyDock: electrostatics and desolvation for effective scoring of rigid-body protein-protein docking. *Proteins*. 2007 Aug 1;68(2):503-15. doi: 10.1002/prot.21419. PMID: 17444519.
40. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, Wang Q, White PA, Katayama K, Vennema H, Koopmans MPG, Vinjé J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol*. 2019 Oct;100(10):1393-1406. doi: 10.1099/jgv.0.001318. Erratum in: *J Gen Virol*. 2020 Aug;101(8):893. PMID: 31483239; PMCID: PMC7011714.
41. Chiejina M, Samant H. Viral Diarrhea. [Updated 2021 Jul 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470525/>.
42. Chung DH, Seaman WE, Daws MR. Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17. *Eur J Immunol*. 2002 Jan;32(1):59-66. doi: 10.1002/1521-4141(200201)32:1<59::AID-IMMU59>3.0.CO;2-U. PMID: 11754004.
43. Chung L, Bailey D, Leen EN, et al. Norovirus translation requires an interaction between the C Terminus of the genome-linked viral protein VPg and eukaryotic translation initiation factor 4G. *J Biol Chem*. 2014;289(31):21738-21750. doi:10.1074/jbc.M114.550657.
44. Cohen R, Raymond J, Gendrel D. Antimicrobial treatment of diarrhea/acute gastroenteritis in children. *Arch Pediatr*. 2017 Dec;24(12S):S26-S29.
45. Cole SR, Chu H, Greenland S. Maximum likelihood, profile likelihood, and penalized likelihood: a primer. *Am J Epidemiol*. 2014 Jan 15;179(2):252-60. doi: 10.1093/aje/kwt245. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24173548; PMCID: PMC3873110.

46. Collienne L, Gavryushkin A. Computing nearest neighbour interchange distances between ranked phylogenetic trees. *J Math Biol.* 2021 Jan 25;82(1-2):8. doi: 10.1007/s00285-021-01567-5. PMID: 33492606; PMCID: PMC7835203.
47. Colonna M. TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jun;3(6):445-53. doi: 10.1038/nri1106. PMID: 12776204.
48. Colonna, M. The biology of TREM receptors. *Nat Rev Immunol* 23, 580–594 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00837-1>
49. Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S. et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol* 17, 13 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>
50. Coutsias EA, Seok C, Dill KA. Using quaternions to calculate RMSD. *J Comput Chem.* 2004 Nov 30;25(15):1849-57. doi: 10.1002/jcc.20110. PMID: 15376254.
51. Criss ZK 2nd, Bhasin N, Di Rienzi SC, Rajan A, Deans-Fielder K, Swaminathan G, Kamyabi N, Zeng XL, Doddapaneni H, Menon VK, Chakravarti D, Estrella C, Yu X, Patil K, Petrosino JF, Fleet JC, Verzi MP, Christakos S, Helmuth MA, Arimura S, DePinho RA, Britton RA, Maresso AW, Grande-Allen KJ, Blutt SE, Crawford SE, Estes MK, Ramani S, Shroyer NF. Drivers of transcriptional variance in human intestinal epithelial organoids. *Physiol Genomics.* 2021 Nov 1;53(11):486-508. doi: 10.1152/physiolgenomics.00061.2021. Epub 2021 Oct 6. PMID: 34612061; PMCID: PMC8616596.
52. Crosse KM, Monson EA, Beard MR, Helbig KJ. Interferon-Stimulated Genes as Enhancers of Antiviral Innate Immune Signaling. *J Innate Immun.* 2018;10(2):85-93. doi: 10.1159/000484258. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29186718; PMCID: PMC5969054.
53. da Silva Ribeiro de Andrade J, Fumian TM, Leite JPG, de Assis MR, Fialho AM, Mouta S, Santiago CMP, Miagostovich MP. Norovirus GII.17 Associated with a Foodborne Acute Gastroenteritis Outbreak in Brazil, 2016. *Food Environ Virol.* 2018 Jun;10(2):212-216. doi: 10.1007/s12560-017-9326-0. Epub 2017 Nov 17. PMID: 29150772.
54. Dalman, M.R., Deeter, A., Nimishakavi, G. et al. Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. *BMC Bioinformatics* 13 (Suppl 2), S11 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S2-S11>
55. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.* 2003;22(11):2852-2859. doi:10.1093/emboj/cdg251.
56. de Oliveira Matos A, Dos Santos Dantas PH, Colmenares MTC, Sartori GR, Silva-Sales M, Da Silva JHM, Neves BJ, Andrade CH, Sales-Campos H. The CDR3 region as the major driver of TREM-1 interaction with its ligands, an in silico characterization. *Comput Struct Biotechnol J.* 2023 Apr 13;21:2579-2590. doi: 10.1016/j.csbj.2023.04.008. PMID: 37122631; PMCID: PMC10130352.
57. Debbink K, Donaldson E, Lindesmith L, Baric R. Genetic mapping of a highly variable norovirus GII.4 blockade epitope: potential role in escape from human herd immunity. *J Virol.* 2012;86(2):1214-1226. doi:10.1128/JVI.06189-11

58. Denner J, Eschricht M, Lauck M, Semaan M, Schlaermann P, Ryu H, et al. (2013) Modulation of Cytokine Release and Gene Expression by the Immunosuppressive Domain of gp41 of HIV-1. *PLoS ONE* 8(1): e55199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055199>.
59. Dermody TS, Kirchner E, Guglielmi KM, Stehle T. Immunoglobulin superfamily virus receptors and the evolution of adaptive immunity. *PLoS Pathog.* 2009 Nov;5(11):e1000481. doi: 10.1371/journal.ppat.1000481. Epub 2009 Nov 26. PMID: 19956667; PMCID: PMC2777377.
60. Desta IT, Porter KA, Xia B, Kozakov D, Vajda S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure.* 2020 Sep; 28 (9):1071-1081. doi
61. Devant JM, Hofhaus G, Bhella D, Hansman GS. Heterologous expression of human norovirus GII.4 VP1 leads to assembly of T=4 virus-like particles. *Antiviral Res.* 2019 Aug;168:175-182. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.05.010. Epub 2019 May 27. PMID: 31145925.
62. Dingle, K. E. 2004. Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes. 2004. *J. Clin. Microbiol.* 42:3950-3957.
63. Doerflinger S.Y., Cortese M., Romero-Brey I., Menne Z., Tubiana T., Schenk C., White P.A., Bartenschlager R., Bressanelli S., Hansman G.S., et al. Membrane alterations induced by nonstructural proteins of human norovirus. *PLoS Pathog.* 2017;13:e1006705. doi: 10.1371/journal.ppat.1006705.
64. Doerflinger SY, Cortese M, Romero-Brey I, Menne Z, Tubiana T, Schenk C, White PA, Bartenschlager R, Bressanelli S, Hansman GS, Lohmann V. Membrane alterations induced by nonstructural proteins of human norovirus. *PLoS Pathog.* 2017 Oct 27;13(10):e1006705. doi: 10.1371/journal.ppat.1006705. PMID: 29077760; PMCID: PMC5678787.
65. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Mar;8(3):231-41. doi: 10.1038/nrmicro2296. Epub 2010 Feb 2. PMID: 20125087; PMCID: PMC7097584.
66. Dräger S, Kalies K, Sidronio TB, Witte M, Ludwig RJ, Bieber K. Increased TREM-1 expression in inflamed skin has no functional impact on the pathogenesis of cutaneous disorders. *J Dermatol Sci.* 2017 Oct;88(1):152-155. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.05.016. Epub 2017 May 30. PMID: 28610717.
67. Du, Z., Su, H., Wang, W. et al. The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. *Nat Protoc* 16, 5634–5651 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00628-9>
68. Dubois H, Sorgeloos F, Sarvestani ST, Martens L, Saeys Y, Mackenzie JM, Lamkanfi M, van Loo G, Goodfellow I, Wullaert A. Nlrp3 inflammasome activation and Gasdermin D-driven pyroptosis are immunopathogenic upon gastrointestinal norovirus infection. *PLoS Pathog.* 2019 Apr 24;15(4):e1007709. doi: 10.1371/journal.ppat.1007709. PMID: 31017981; PMCID: PMC6502405.
69. Estes MK, Ettayebi K, Tenge VR, Murakami K, Karandikar U, Lin SC, Ayyar BV, Cortes-Penfield NW, Haga K, Neill FH, Opekun AR, Broughman JR, Zeng XL, Blutt SE, Crawford SE, Ramani S, Graham DY, Atmar RL. Human Norovirus Cultivation in Nontransformed Stem Cell-Derived Human Intestinal

- Enteroid Cultures: Success and Challenges. *Viruses*. 2019 Jul 11;11(7):638. doi: 10.3390/v11070638. PMID: 31336765; PMCID: PMC6669637.
70. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, Neill FH, Blutt SE, Zeng XL, Qu L, Kou B, Opekun AR, Burrin D, Graham DY, Ramani S, Atmar RL, Estes MK. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*. 2016 Sep 23;353(6306):1387-1393. doi: 10.1126/science.aaf5211. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27562956; PMCID: PMC5305121.
71. Family - Caliciviridae, Editor(s): Andrew M.Q. King, Michael J. Adams, Eric B. Carstens, Elliot J. Lefkowitz, *Virus Taxonomy*, Elsevier, 2012, Pages 977-986, ISBN 9780123846846, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00084-7>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123846846000847>)
72. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985 Jul;39(4):783-791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x. PMID: 28561359.
73. Fernandes H, Leen EN, Cromwell H Jr, Pfeil MP, Curry S. Structure determination of Murine Norovirus NS6 proteases with C-terminal extensions designed to probe protease-substrate interactions. *PeerJ*. 2015 Feb 26;3:e798. doi: 10.7717/peerj.798. PMID: 25755927; PMCID: PMC4349150.
74. Ford JW, McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol*. 2009 Feb;21(1):38-46. doi: 10.1016/j.coi.2009.01.009. Epub 2009 Feb 21. PMID: 19230638; PMCID: PMC2723941.
75. Ford-Siltz LA, Tohma K, Parra GI. Understanding the relationship between norovirus diversity and immunity. *Gut Microbes*. 2021 Jan-Dec;13(1):1-13. doi: 10.1080/19490976.2021.1900994. PMID: 33783322; PMCID: PMC8018473.
76. Fu L, Han L, Xie C, Li W, Lin L, Pan S, Zhou Y, Li Z, Jin M, Zhang A. Identification of Extracellular Actin As a Ligand for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Signaling. *Front Immunol*. 2017 Aug 7;8:917. doi: 10.3389/fimmu.2017.00917. PMID: 28824642; PMCID: PMC5545922.
77. Gapsys, V., Yildirim, A., Aldeghi, M. et al. Accurate absolute free energies for ligand–protein binding based on non-equilibrium approaches. *Commun Chem* 4, 61 (2021). <https://doi.org/10.1038/s42004-021-00498-y>
78. Gaythorpe KAM, Trotter CL, Lopman B, Steele M, Conlan AJK. Norovirus transmission dynamics: a modelling review. *Epidemiol Infect*. 2018;146(2):147-158. doi:10.1017/S0950268817002692
79. Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov*. 2015 May;10(5):449-61. doi: 10.1517/17460441.2015.1032936. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25835573; PMCID: PMC4487606.
80. Gibot S, Jolly L, Lemarié J, Carrasco K, Derive M, Boufenzer A. Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Inhibitor Targeted to Endothelium Decreases Cell Activation. *Front Immunol*. 2019 Oct 1;10:2314. doi: 10.3389/fimmu.2019.02314. PMID: 31632399; PMCID: PMC6779727.

81. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2009 Oct 29;361(18):1776-85. doi: 10.1056/NEJMra0804575. PMID: 19864676; PMCID: PMC3880795.
82. Grau KR, Roth AN, Zhu S, Hernandez A, Colliou N, DiVita BB, Philip DT, Riffe C, Giasson B, Wallet SM, Mohamadzadeh M, Karst SM. The major targets of acute norovirus infection are immune cells in the gut-associated lymphoid tissue. *Nat Microbiol.* 2017 Dec;2(12):1586-1591. doi: 10.1038/s41564-017-0057-7. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29109476; PMCID: PMC5705318.
83. Graziano VR, Alfajaro MM, Schmitz CO, Filler RB, Strine MS, Wei J, Hsieh LL, Baldrige MT, Nice TJ, Lee S, Orchard RC, Wilen CB. CD300lf Conditional Knockout Mouse Reveals Strain-Specific Cellular Tropism of Murine Norovirus. *J Virol.* 2021 Jan 13;95(3):e01652-20. doi: 10.1128/JVI.01652-20. PMID: 33177207; PMCID: PMC7925115.
84. Guix S, Bosch A, Ribes E, Dora Martínez L, Pintó RM. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. *Virology.* 2004 Feb 20;319(2):249-61. doi: 10.1016/j.virol.2003.10.036. PMID: 14980485; PMCID: PMC7127648.
85. Guo J, Zhu Y, Ma X, Shang G, Liu B, Zhang K. Virus Infection and mRNA Nuclear Export. *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 9;24(16):12593. doi: 10.3390/ijms241612593. PMID: 37628773; PMCID: PMC10454920.
86. Han JC, Li QX, Fang JB, Zhang JY, Li YQ, Li SZ, Cheng C, Xie CZ, Nan FL, Zhang H, Li ZX, Jin NY, Zhu GZ, Lu HJ. GII.P16-GII.2 Recombinant Norovirus VLPs Polarize Macrophages Into the M1 Phenotype for Th1 Immune Responses. *Front Immunol.* 2021 Nov 18;12:781718. doi: 10.3389/fimmu.2021.781718. PMID: 34868056; PMCID: PMC8637406.
87. Han KR, Alhatlani BY, Cho S, Lee JH, Hosmillo M, Goodfellow IG, Kim KH, Yang JM. Identification of amino acids within norovirus polymerase involved in RNA binding and viral replication. *J Gen Virol.* 2017 Jun;98(6):1311-1315. doi: 10.1099/jgv.0.000826. Epub 2017 Jun 22. PMID: 28640742.
88. Han KR, Lee JH, Kotiguda GG, Jung KH, Chung MS, Kang S, Hwang S, Kim KH. Nucleotide triphosphatase and RNA chaperone activities of murine norovirus NS3. *J Gen Virol.* 2018 Nov;99(11):1482-1493. doi: 10.1099/jgv.0.001151. Epub 2018 Sep 28. PMID: 30265237; PMCID: PMC7011751.
89. Han L, Fu L, Peng Y, Zhang A. Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Signaling: Protective and Pathogenic Roles on Streptococcal Toxic-Shock-Like Syndrome Caused by *Streptococcus suis*. *Front Immunol.* 2018 Mar 21;9:577. doi: 10.3389/fimmu.2018.00577. PMID: 29619033; PMCID: PMC5871666.
90. Han L, Fu L, Peng Y, Zhang A. Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Signaling: Protective and Pathogenic Roles on Streptococcal Toxic-Shock-Like Syndrome Caused by *Streptococcus suis*. *Front Immunol.* 2018 Mar 21;9:577. doi: 10.3389/fimmu.2018.00577. PMID: 29619033; PMCID: PMC5871666.
91. Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Dec 1;253(1):1-8. doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.031. Epub 2005 Sep 6. PMID: 16168575.

92. Haselmayer P, Daniel M, Tertilt C, Salih HR, Stassen M, Schild H, Radsak MP. Signaling pathways of the TREM-1- and TLR4-mediated neutrophil oxidative burst. *J Innate Immun.* 2009;1(6):582-91. doi: 10.1159/000231973. Epub 2009 Jul 30. PMID: 20375613.
93. He M, Jiang Z, Li S, He P. Presence of poly(A) tails at the 3'-termini of some mRNAs of a double-stranded RNA virus, southern rice black-streaked dwarf virus. *Viruses.* 2015;7(4):1642-1650. Published 2015 Mar 31. doi:10.3390/v7041642
94. Hodinka RL. Point: is the era of viral culture over in the clinical microbiology laboratory? *J Clin Microbiol.* 2013 Jan;51(1):2-4. doi: 10.1128/JCM.02593-12. Epub 2012 Oct 10. PMID: 23052302; PMCID: PMC3536207.
95. Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron.* 2018 Sep 19;99(6):1129-1143. doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.011. PMID: 30236283; PMCID: PMC6209097.
96. Hosmillo M, Chaudhry Y, Nayak K, Sorgeloos F, Koo BK, Merenda A, Lillestol R, Drumright L, Zilbauer M, Goodfellow I. Norovirus Replication in Human Intestinal Epithelial Cells Is Restricted by the Interferon-Induced JAK/STAT Signaling Pathway and RNA Polymerase II-Mediated Transcriptional Responses. *mBio.* 2020 Mar 17;11(2):e00215-20. doi: 10.1128/mBio.00215-20. PMID: 32184238; PMCID: PMC7078467.
97. Hosmillo M, Chaudhry Y, Nayak K, Sorgeloos F, Koo BK, Merenda A, Lillestol R, Drumright L, Zilbauer M, Goodfellow I. Norovirus Replication in Human Intestinal Epithelial Cells Is Restricted by the Interferon-Induced JAK/STAT Signaling Pathway and RNA Polymerase II-Mediated Transcriptional Responses. *mBio.* 2020 Mar 17;11(2):e00215-20. doi: 10.1128/mBio.00215-20. PMID: 32184238; PMCID: PMC7078467.
98. <https://bioparasitohospedeiro.iptsp.ufg.br/p/37354-dissertacoes-e-teses-defendidas-em-2021>
99. Hu K, Onintsoa Diarimalala R, Yao C, Li H, Wei Y. EV-A71 Mechanism of Entry: Receptors/Co-Receptors, Related Pathways and Inhibitors. *Viruses.* 2023 Mar 18;15(3):785. doi: 10.3390/v15030785. PMID: 36992493; PMCID: PMC10051052.
100. Hyun J, McMahon RS, Lang AL, Edwards JS, Badilla AD, Greene ME, et al. (2019) HIV and HCV augments inflammatory responses through increased TREM-1 expression and signaling in Kupffer and Myeloid cells. *PLoS Pathog* 15(7): e1007883. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007883>.
101. Ireton RC, Wilkins C, Gale M Jr. RNA PAMPs as Molecular Tools for Evaluating RIG-I Function in Innate Immunity. *Methods Mol Biol.* 2017;1656:119-129. doi: 10.1007/978-1-4939-7237-1_6. PMID: 28808965.
102. Jacobs SR, Damania B. NLRs, inflammasomes, and viral infection. *J Leukoc Biol.* 2012 Sep;92(3):469-77. doi: 10.1189/jlb.0312132. Epub 2012 May 10. Erratum in: *J Leukoc Biol.* 2012 Nov;92(5):1123. PMID: 22581934; PMCID: PMC4046246.
103. Jahun AS, Goodfellow IG. Interferon responses to norovirus infections: current and future perspectives. *J Gen Virol.* 2021 Oct;102(10):001660. doi: 10.1099/jgv.0.001660. PMID: 34698626; PMCID: PMC8604187.

104. Jan Vinjé, Mary K. Estes, Pedro Esteves, Kim Y. Green, Kazuhiko Katayama, Nick J. Knowles, Yvan L'Homme, Vito Martella, Harry Vennema, Peter A. White and ICTV Report Consortium. 2019, ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae, *Journal of General Virology*, 100, 1469–1470.
105. Jisna, V.A., Jayaraj, P.B. Protein Structure Prediction: Conventional and Deep Learning Perspectives. *Protein J* 40, 522–544 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10930-021-10003-y>.
106. Joffre J, Potteaux S, Zeboudj L, Loyer X, Boufenzer A, Laurans L, Esposito B, Vandestienne M, de Jager SC, Hénique C, Zlatanova I, Taleb S, Bruneval P, Tedgui A, Mallat Z, Gibot S, Ait-Oufella H. Genetic and Pharmacological Inhibition of TREM-1 Limits the Development of Experimental Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Dec 27;68(25):2776-2793. doi: 10.1016/j.jacc.2016.10.015. PMID: 28007141.
107. Jones MK, Grau KR, Costantini V, Kolawole AO, de Graaf M, Freiden P, Graves CL, Koopmans M, Wallet SM, Tibbetts SA, Schultz-Cherry S, Wobus CE, Vinjé J, Karst SM. Human norovirus culture in B cells. *Nat Protoc*. 2015 Dec;10(12):1939-47. doi: 10.1038/nprot.2015.121. Epub 2015 Oct 29. PMID: 26513671; PMCID: PMC4689599.
108. Karst SM. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses*. 2010 Mar;2(3):748-81. doi: 10.3390/v2030748. Epub 2010 Mar 23. PMID: 21994656; PMCID: PMC3185648.
109. Katpally U, Voss NR, Cavazza T, Taube S, Rubin JR, Young VL, Stuckey J, Ward VK, Virgin HW 4th, Wobus CE, Smith TJ. High-resolution cryo-electron microscopy structures of murine norovirus 1 and rabbit hemorrhagic disease virus reveal marked flexibility in the receptor binding domains. *J Virol*. 2010 Jun;84(11):5836-41. doi: 10.1128/JVI.00314-10. Epub 2010 Mar 24. PMID: 20335264; PMCID: PMC2876586.
110. Kelker MS, Debler EW, Wilson IA. Crystal structure of mouse triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.76 Å. *J Mol Biol*. 2004 Dec 10;344(5):1175-81. doi: 10.1016/j.jmb.2004.10.009. PMID: 15561137.
111. Kelker MS, Foss TR, Peti W, Teyton L, Kelly JW, Wüthrich K, Wilson IA. Crystal structure of human triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.47 Å. *J Mol Biol*. 2004 Sep 24;342(4):1237-48. doi: 10.1016/j.jmb.2004.07.089. PMID: 15351648.
112. Khatun MS, Shoombuatong W, Hasan MM, Kurata H. Evolution of Sequence-based Bioinformatics Tools for Protein-protein Interaction Prediction. *Curr Genomics*. 2020;21(6):454-463. doi:10.2174/1389202921999200625103936.
113. Kiialainen A, Hovanec K, Paloneva J, Kopra O, Peltonen L. Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS. *Neurobiol Dis*. 2005 Mar;18(2):314-22. doi: 10.1016/j.nbd.2004.09.007. PMID: 15686960.
114. Kilic T, Koromyslova A, Malak V, Hansman G. Atomic Structure of the Murine Norovirus Protruding Domain and Soluble CD300lf Receptor Complex. *J Virol*. 2018 May 14;92(11):e00413-18. doi: 10.1128/JVI.00413-18. PMID: 29563286; PMCID: PMC5952153.

115. Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M. The TREM receptor family and signal integration. *Nat Immunol*. 2006 Dec;7(12):1266-73. doi: 10.1038/ni1411. PMID: 17110943.
116. Knoblich K, Park S, Lutfi M, van 't Hag L, Conn CE, Seabrook SA, Newman J, Czabotar PE, Im W, Call ME, Call MJ. Transmembrane Complexes of DAP12 Crystallized in Lipid Membranes Provide Insights into Control of Oligomerization in Immunoreceptor Assembly. *Cell Rep*. 2015 May 26;11(8):1184-92. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.045. Epub 2015 May 14. PMID: 25981043; PMCID: PMC4449314.
117. Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipinski, and Sudhir Kumar. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*: (2013)30 2725-2729.
118. Kollman PA, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, Lee M, Lee T, Duan Y, Wang W, Donini O, Cieplak P, Srinivasan J, Case DA, Cheatham TE 3rd. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc Chem Res*. 2000 Dec;33(12):889-97. doi: 10.1021/ar000033j. PMID: 11123888.
119. Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella S, Xia B, Hall DR, Vajda S. How good is automated protein docking? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2013 Dec; 81(12):2159-66. Pdf
120. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorney D, Yueh C, Beglov D, Vajda S. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*. 2017 Feb;12(2):255-278.
121. Kuai J, Gregory B, Hill A, Pittman DD, Feldman JL, Brown T, Carito B, O'Toole M, Ramsey R, Adolfsson O, Shields KM, Dower K, Hall JP, Kurdi Y, Beech JT, Nanchahal J, Feldmann M, Foxwell BM, Brennan FM, Winkler DG, Lin LL. TREM-1 expression is increased in the synovium of rheumatoid arthritis patients and induces the expression of pro-inflammatory cytokines. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Nov;48(11):1352-8. doi: 10.1093/rheumatology/kep235. Epub 2009 Aug 27. PMID: 19713442.
122. Kuemmel, A., Alflen, A., Schmidt, L.H. et al. Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 in lung cancer. *Sci Rep* 8, 10766 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28971-0>
123. Kuhlman, B., Bradley, P. Avanços na previsão e design da estrutura de proteínas. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20 , 681–697 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0163-x>
124. Kunik V, Peters B, Ofran Y. Structural consensus among antibodies defines the antigen binding site. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(2):e1002388. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002388. Epub 2012 Feb 23. PMID: 22383868; PMCID: PMC3285572.
125. LaRossa R. Transcriptome. Academic Press. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. 2013, 101-103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01553-9>.
126. Lartey BL, Quaye O, Damanka SA, Agbemabiese CA, Armachie J, Dennis FE, Enweronu-Laryea C, Armah GE. Understanding Pediatric Norovirus Epidemiology: A Decade of Study among Ghanaian Children. *Viruses*. 2020 Nov

- 18;12(11):1321. doi: 10.3390/v12111321. PMID: 33217894; PMCID: PMC7698731.
127. Lateef Z, Gimenez G, Baker ES, Ward VK. Transcriptomic analysis of human norovirus NS1-2 protein highlights a multifunctional role in murine monocytes. *BMC Genomics*. 2017 Jan 5;18(1):39. doi: 10.1186/s12864-016-3417-4. PMID: 28056773; PMCID: PMC5217272.
128. Lee JH, Park BS, Han KR, Biering SB, Kim SJ, Choi J, Seok JH, Alam I, Chung MS, Kim HM, Hwang S, Kim KH. Insight Into the Interaction Between RNA Polymerase and VPg for Murine Norovirus Replication. *Front Microbiol*. 2018 Jul 3;9:1466. doi: 10.3389/fmicb.2018.01466. Erratum in: *Front Microbiol*. 2019 Jan 31;10:32. PMID: 30038601; PMCID: PMC6046605.
129. Lester SN, Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J Mol Biol*. 2014 Mar 20;426(6):1246-64. doi: 10.1016/j.jmb.2013.11.024. Epub 2013 Dec 3. PMID: 24316048; PMCID: PMC3943763.
130. Leuthold MM, Koromyslova AD, Singh BK, Hansman GS. Production of Human Norovirus Protruding Domains in *E. coli* for X-ray Crystallography. *J Vis Exp*. 2016 Apr 19;(110):53845. doi: 10.3791/53845. PMID: 27167457; PMCID: PMC4941939.
131. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Aug 4;6(1):291. doi: 10.1038/s41392-021-00687-0. PMID: 34344870; PMCID: PMC8333067.
132. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Aug 4;6(1):291. doi: 10.1038/s41392-021-00687-0. PMID: 34344870; PMCID: PMC8333067.
133. Li J, Zhang L, Zou W, Yang Z, Zhan J, Cheng J. Epidemiology and genetic diversity of norovirus GII genogroups among children in Hubei, China, 2017-2019. *Virol Sin*. 2023 Jun;38(3):351-362. doi: 10.1016/j.virs.2023.04.002. Epub 2023 Apr 6. PMID: 37030436; PMCID: PMC10311278.
134. Li TF, Hosmillo M, Schwanke H, Shu T, Wang Z, Yin L, Curry S, Goodfellow IG, Zhou X. Human Norovirus NS3 Has RNA Helicase and Chaperoning Activities. *J Virol*. 2018 Feb 12;92(5):e01606-17. doi: 10.1128/JVI.01606-17. PMID: 29237842; PMCID: PMC5809735. Hung CH, Yen JB, Chang PJ, Chen LW, Huang TY, Tsai WJ, Tsai YC. Characterization of Human Norovirus Nonstructural Protein NS1.2 Involved in the Induction of the Filamentous Endoplasmic Reticulum, Enlarged Lipid Droplets, LC3 Recruitment, and Interaction with NTPase and NS4. *Viruses*. 2023 Mar 22;15(3):812. doi: 10.3390/v15030812. PMID: 36992520; PMCID: PMC10053803.
135. Li Z, Wu F, Xu D, Zhi Z, Xu G. Inhibition of TREM1 reduces inflammation and oxidative stress after spinal cord injury (SCI) associated with HO-1 expressions. *Biomed Pharmacother*. 2019 Jan;109:2014-2021. doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.159. Epub 2018 Nov 26. PMID: 30551457.
136. Lian X, Yang X, Yang S, Zhang Z. Current status and future perspectives of computational studies on human-virus protein-protein interactions. *Brief Bioinform*. 2021 Sep 2;22(5):bbab029. doi: 10.1093/bib/bbab029. PMID: 33693490.

137. Liao R, Sun TW, Yi Y, Wu H, Li YW, Wang JX, Zhou J, Shi YH, Cheng YF, Qiu SJ, Fan J. Expression of TREM-1 in hepatic stellate cells and prognostic value in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2012 Jun;103(6):984-92. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02273.x. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22417086; PMCID: PMC7685080.
138. Lin SC, Qu L, Ettayebi K, Crawford SE, Blutt SE, Robertson MJ, Zeng XL, Tenge VR, Ayyar BV, Karandikar UC, Yu X, Coarfa C, Atmar RL, Ramani S, Estes MK. Human norovirus exhibits strain-specific sensitivity to host interferon pathways in human intestinal enteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Sep 22;117(38):23782-23793. doi: 10.1073/pnas.2010834117. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32907944; PMCID: PMC7519316.
139. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendu J, Baric R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.* 2003 May;9(5):548-53. doi: 10.1038/nm860. Epub 2003 Apr 14. PMID: 12692541.
140. Liu L, Guan H, Zhang Y, Wang C, Yang G, Ruan S, Zhao H, Han X. The prevalence of non-GII.4 norovirus genotypes in acute gastroenteritis outbreaks in Jinan, China. *PLoS One.* 2018 Dec 28;13(12):e0209245. doi: 10.1371/journal.pone.0209245. PMID: 30592717; PMCID: PMC6310239.
141. Liu Z, Zhang M, Shen Z, Chen H, Zhang W, Xu X, Lai Z, Sun W, Zhao Z, Zhang J. The coordinating role of the human norovirus minor capsid protein VP2 is essential to functional change and nuclear localization of the major capsid protein VP1. *Arch Virol.* 2019 Apr;164(4):1173-1180. doi: 10.1007/s00705-019-04192-2. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30810804.
142. Liu Z, Zhang M, Shen Z, Chen H, Zhang W, Xu X, Lai Z, Sun W, Zhao Z, Zhang J. The coordinating role of the human norovirus minor capsid protein VP2 is essential to functional change and nuclear localization of the major capsid protein VP1. *Arch Virol.* 2019 Apr;164(4):1173-1180. doi: 10.1007/s00705-019-04192-2. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30810804.
143. Liu, Q., Johnson, E.M., Lam, R.K. et al. Peripheral TREM1 responses to brain and intestinal immunogens amplify stroke severity. *Nat Immunol* 20, 1023–1034 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0421-2>.
144. Lochridge VP, Hardy ME. A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization. *J Virol.* 2007 Nov;81(22):12316-22. doi: 10.1128/JVI.01254-07. Epub 2007 Sep 5. PMID: 17804495; PMCID: PMC2168968.
145. Lochridge VP, Hardy ME. A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization. *J Virol.* 2007 Nov;81(22):12316-22. doi: 10.1128/JVI.01254-07. Epub 2007 Sep 5. PMID: 17804495; PMCID: PMC2168968.
146. Maiorov VN, Crippen GM. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *J Mol Biol.* 1994 Jan 14;235(2):625-34. doi: 10.1006/jmbi.1994.1017. PMID: 8289285.
147. Malm M, Vesikari T, Blazevic V. Simultaneous Immunization with Multivalent Norovirus VLPs Induces Better Protective Immune Responses to Norovirus Than Sequential Immunization. *Viruses.* 2019 Nov 2;11(11):1018. doi: 10.3390/v11111018. PMID: 31684058; PMCID: PMC6893631.

148. Mboko WP, Chhabra P, Valcarce MD, Costantini V, Vinjé J. Advances in understanding of the innate immune response to human norovirus infection using organoid models. *J Gen Virol.* 2022 Jan;103(1):10.1099/jgv.0.001720. doi: 10.1099/jgv.0.001720. PMID: 35077345; PMCID: PMC8984994.
149. Mboko WP, Chhabra P, Valcarce MD, Costantini V, Vinjé J. Advances in understanding of the innate immune response to human norovirus infection using organoid models. *J Gen Virol.* 2022 Jan;103(1):10.1099/jgv.0.001720. doi: 10.1099/jgv.0.001720. PMID: 35077345; PMCID: PMC8984994.
150. McSweeney AM, Young VL, Ward VK. Norovirus VPg Binds RNA through a Conserved N-Terminal K/R Basic Patch. *Viruses.* 2021;13(7):1282. Published 2021 Jun 30. doi:10.3390/v13071282
151. Medici MC, Tummolo F, Grazia S, Calderaro A, Conto F, Terio V, Chironna M, Bonura F, Pucci M, Bányai K, Martella V, Giammanco GM. Epidemiological dynamics of norovirus GII.4 variant New Orleans 2009. *J Gen Virol.* 2015 Sep;96(9):2919-2927. doi: 10.1099/vir.0.000204. Epub 2015 May 29. PMID: 26025873.
152. Medvedev A, Viswanathan P, May J, Korba B. Regulation of human norovirus VPg nucleotidylation by ProPol and nucleoside triphosphate binding by its amino terminal sequence in vitro. *Virology.* 2017 Mar;503:37-45. doi: 10.1016/j.virol.2017.01.003. Epub 2017 Jan 20. PMID: 28110248.
153. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2011 Jun;7(2):146-57. doi: 10.2174/157340911795677602. PMID: 21534921; PMCID: PMC3151162.
154. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods.* 2022 Jun;19(6):679-682. doi: 10.1038/s41592-022-01488-1. Epub 2022 May 30. PMID: 35637307; PMCID: PMC9184281.
155. Moeini H, Afridi SQ, Donakonda S, Knolle PA, Protzer U, Hoffmann D. Linear B-Cell Epitopes in Human Norovirus GII.4 Capsid Protein Elicit Blockade Antibodies. *Vaccines (Basel).* 2021 Jan 14;9(1):52. doi: 10.3390/vaccines9010052. PMID: 33466932; PMCID: PMC7830539.
156. Mohamadzadeh M, Coberley SS, Olinger GG, Kalina WV, Ruthel G, Fuller CL, Swenson DL, Pratt WD, Kuhns DB, Schmaljohn AL. Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 on human neutrophils by marburg and ebola viruses. *J Virol.* 2006 Jul;80(14):7235-44. doi: 10.1128/JVI.00543-06. PMID: 16809329; PMCID: PMC1489070.
157. Mohamed FF, Ktob GKF, Ismaeil MEA, Ali AAH, Goyal SM. Phylogeny of bovine norovirus in Egypt based on VP2 gene. *Int J Vet Sci Med.* 2018;6(1):48-52. Published 2018 Apr 13. doi:10.1016/j.ijvsm.2018.04.005
158. Motoya T, Nagasawa K, Matsushima Y, et al. Molecular Evolution of the VP1 Gene in Human Norovirus GII.4 Variants in 1974-2015. *Front Microbiol.* 2017;8:2399. Published 2017 Dec 5. doi:10.3389/fmicb.2017.02399
159. Mouvet F, Villard J, Bolnykh V, Rothlisberger U. Recent Advances in First-Principles Based Molecular Dynamics. *Acc Chem Res.* 2022 Feb 1;55(3):221-230. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00503. Epub 2022 Jan 13. PMID: 35026115.

160. Mukhopadhyay U, Patra U, Chandra P, Saha P, Gope A, Dutta M, Chawla-Sarkar M. Rotavirus activates MLKL-mediated host cellular necroptosis concomitantly with apoptosis to facilitate dissemination of viral progeny. *Mol Microbiol.* 2022 Apr;117(4):818-836. doi: 10.1111/mmi.14874. Epub 2022 Jan 12. PMID: 34954851.
161. Mutso M, Liu X, Merits A, Mahalingam S. Analysis of Functional Virus-generated PAMP RNAs Using IFN α/β ELISA Assay. *Bio Protoc.* 2019 Jun 20;9(12):e3282. doi: 10.21769/BioProtoc.3282. PMID: 33654797; PMCID: PMC7854115.
162. Nathan, C., Ding, A. TREM-1: A new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nat Med* 7, 530–532 (2001). <https://doi.org/10.1038/87846>
163. Natunen T, Martiskainen H, Sarajärvi T, Helisalmi S, Pursiheimo JP, Viswanathan J, Laitinen M, Mäkinen P, Kauppinen T, Rauramaa T, Leinonen V, Alafuzoff I, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M. Effects of NR1H3 genetic variation on the expression of liver X receptor α and the progression of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013 Nov 20;8(11):e80700. doi: 10.1371/journal.pone.0080700. PMID: 24278306; PMCID: PMC3835410.
164. Nelson C, Wilen C, Dai Y, Orchard R, Kim A, Stegeman R, Hsieh L, Smith T, Virgin H, Fremont D. Structural basis for murine norovirus engagement of bile acids and the CD300lf receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Sep 25;115(39):E9201-E9210. doi: 10.1073/pnas.1805797115. Epub 2018 Sep 7. PMID: 30194229; PMCID: PMC6166816.
165. Nemeth V, Pflieger N. Diarrhea. [Updated 2021 Nov 29]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448082/>
166. Netzler NE, Enosi Tuipulotu D, White PA. Norovirus antivirals: Where are we now? *Med Res Rev.* 2019 May;39(3):860-886. doi: 10.1002/med.21545. Epub 2018 Dec 25. PMID: 30584800; PMCID: PMC7168425.
167. NGUYEN, Minh Tue, et al. Cell Culture Models of Human Norovirus: the End of the Beginning?. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 2017, vol. 45, no 2, p. 93-100.
168. Nguyen-Lefebvre AT, Ajith A, Portik-Dobos V, Horuzsko DD, Arbab AS, Dzutsev A, Sadek R, Trinchieri G, Horuzsko A. The innate immune receptor TREM-1 promotes liver injury and fibrosis. *J Clin Invest.* 2018 Nov 1;128(11):4870-4883. doi: 10.1172/JCI98156. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30137027; PMCID: PMC6205377.
169. Nordgren J, Sharma S, Kambhampati A, Lopman B, Svensson L. Innate Resistance and Susceptibility to Norovirus Infection. *PLoS Pathog.* 2016 Apr 26;12(4):e1005385. doi: 10.1371/journal.ppat.1005385. PMID: 27115484; PMCID: PMC4845991.
170. Nordgren J, Svensson L. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. *Viruses.* 2019 Mar 6;11(3):226. doi: 10.3390/v11030226. PMID: 30845670; PMCID: PMC6466115.
171. Ochoa R, Palacio-Rodriguez K, Clemente CM, Adler NS. dockECR: Open consensus docking and ranking protocol for virtual screening of small molecules. *J Mol Graph Model.* 2021 Dec;109:108023. doi: 10.1016/j.jmgm.2021.108023. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34555725; PMCID: PMC8442548.

172. Origin(Pro), Version Number (e.g. "Version 2022"). OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.
173. Pagadala, N.S., Syed, K. & Tuszynski, J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev* 9, 91–102 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>.
174. Palacio-Rodríguez, K., Lans, I., Cavasotto, C.N. et al. Exponential consensus ranking improves the outcome in docking and receptor ensemble docking. *Sci Rep* 9, 5142 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41594-3>.
175. Pappas N, Roux S, Hölzer M, Lamkiewicz K, Mock F, Marz M, Dutilh BE. Virus Bioinformatics. *Encyclopedia of Virology*. 2021:124–32. doi: 10.1016/B978-0-12-814515-9.00034-5. Epub 2021 Mar 1. PMID: PMC7567488.
176. Peng L, Zhou Y, Dong L, Chen RQ, Sun GY, Liu T, Ran WZ, Fang X, Jiang JX, Guan CX. TGF- β 1 Upregulates the Expression of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 in Murine Lungs. *Sci Rep*. 2016 Jan 7;6:18946. doi: 10.1038/srep18946. PMID: 26738569; PMCID: PMC4704059.
177. Petronella N, Ronholm J, Suresh M, Harlow J, Mykytczuk O, Corneau N, Bidawid S, Naseri N. Genetic characterization of norovirus GII.4 variants circulating in Canada using a metagenomic technique. *BMC Infect Dis*. 2018 Oct 17;18(1):521. doi: 10.1186/s12879-018-3419-8. PMID: 30333011; PMCID: PMC6191920.
178. Pettengill MA, van Haren SD, Levy O. Soluble mediators regulating immunity in early life. *Front Immunol*. 2014 Sep 24;5:457. doi: 10.3389/fimmu.2014.00457. PMID: 25309541; PMCID: PMC4173950.
179. Pfister T, Wimmer E. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol*. 2001 Feb;75(4):1611-9. doi: 10.1128/JVI.75.4.1611-1619.2001. PMID: 11160659; PMCID: PMC114070.
180. Phillips MC. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2014 Aug 29;289(35):24020-9. doi: 10.1074/jbc.R114.583658. Epub 2014 Jul 29. PMID: 25074931; PMCID: PMC4148835.
181. Pogan R, Dülfer J, Uetrecht C. Norovirus assembly and stability. *Curr Opin Virol*. 2018 Aug;31:59-65. doi: 10.1016/j.coviro.2018.05.003. Epub 2018 May 30. PMID: 29857940.
182. Pogan R, Schneider C, Reimer R, Hansman G, Uetrecht C. Norovirus-like VP1 particles exhibit isolate dependent stability profiles. *J Phys Condens Matter*. 2018;30(6):064006. doi:10.1088/1361-648X/aaa43b
183. Prasad B, Hardy M, Dokland T, Bella J, Rossmann M. X-Ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*. 1999;286:287–290. doi: 10.1126/science.286.5438.287.
184. Prins MM, Verstockt B, Ferrante M, Vermeire S, Wildenberg ME, Koelink PJ. Monocyte TREM-1 Levels Associate With Anti-TNF Responsiveness in IBD Through Autophagy and Fc γ -Receptor Signaling Pathways. *Front Immunol*. 2021 Mar 15;12:627535. doi: 10.3389/fimmu.2021.627535. PMID: 33790898; PMCID: PMC8005579.
185. Prüfer S, Weber M, Sasca D, Teschner D, Wölfel C, Stein P, Stassen M, Schild H, Radsak MP. Distinct signaling cascades of TREM-1, TLR and NLR in neutrophils and monocytic cells. *J Innate Immun*. 2014;6(3):339-52. doi:

- 10.1159/000355892. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24281714; PMCID: PMC6741579.
186. Prystajecy N, Brinkman FS, Auk B, Isaac-Renton JL, Tang P. Personalized genetic testing and norovirus susceptibility. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2014 Jul;25(4):222-4. doi: 10.1155/2014/708579. PMID: 25285128; PMCID: PMC4173944.
187. Qu X, Dou B, Yang R, Tan C, Chen H, Wang X. C-X-C Motif Chemokine 3 Promotes the Inflammatory Response of Microglia after *Escherichia coli*-Induced Meningitis. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 21;24(13):10432. doi: 10.3390/ijms241310432. PMID: 37445610; PMCID: PMC10341832.
188. Rajagopalan S, Yoshikawa TT. Norovirus Infections in Long-Term Care Facilities. *J Am Geriatr Soc.* 2016 May;64(5):1097-103. doi: 10.1111/jgs.14085. PMID: 27225361.
189. Rani, M. , Rajyalakshmi, S. , Pakalapaty, S. , Kammilli, N. . Norovirus Structure and Classification. In: Mózsik, G. , editor. *Norovirus* [Internet]. London: IntechOpen; 2021 [cited 2023 Jan 09]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/77224> doi: 10.5772/intechopen.98216
190. Read CB, Kuijper JL, Hjorth SA, Heipel MD, Tang X, Fleetwood AJ, Dantzler JL, Grell SN, Kastrop J, Wang C, Brandt CS, Hansen AJ, Wagtmann NR, Xu W, Stennicke VW. Cutting Edge: identification of neutrophil PGLYRP1 as a ligand for TREM-1. *J Immunol.* 2015 Feb 15;194(4):1417-21. doi: 10.4049/jimmunol.1402303. Epub 2015 Jan 16. PMID: 25595774; PMCID: PMC4319313.
191. Richardson C, Bargatzte RF, Goodwin R, Mendelman PM. Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis. *Expert Rev Vaccines.* 2013 Feb;12(2):155-67. doi: 10.1586/erv.12.145. PMID: 23414407.
192. Rigsby RE, Parker AB. Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochem Mol Biol Educ.* 2016 Sep 10;44(5):433-7. doi: 10.1002/bmb.20966. Epub 2016 May 31. PMID: 27241834.
193. Rivera-Dominguez G, Ward R. Pediatric Gastroenteritis. [Updated 2023 Apr 3]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499939/>.
194. Rocha-Pereira J, Kolawole AO, Verbeken E, Wobus CE, Neyts J. Post-exposure antiviral treatment of norovirus infections effectively protects against diarrhea and reduces virus shedding in the stool in a mortality mouse model. *Antiviral Res.* 2016 Aug;132:76-84. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.05.022. Epub 2016 May 29. PMID: 27252124; PMCID: PMC6053263.
195. Roe K, Gibot S, Verma S. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1): a new player in antiviral immunity? *Front Microbiol.* 2014 Nov 26;5:627. doi: 10.3389/fmicb.2014.00627. PMID: 25505454; PMCID: PMC4244588.
196. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* 2018 Aug 13;18(4):e27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27. PMID: 30181915; PMCID: PMC6117512.
197. Roth AN, Karst SM. Norovirus mechanisms of immune antagonism. *Curr Opin Virol.* 2016 Feb;16:24-30. doi: 10.1016/j.coviro.2015.11.005. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26673810; PMCID: PMC4821668.

198. Ruis C, Lindesmith LC, Mallory ML, Brewer-Jensen PD, Bryant JM, Costantini V, Monit C, Vinjé J, Baric RS, Goldstein RA, Breuer J. Preadaptation of pandemic GII.4 noroviruses in unsampled virus reservoirs years before emergence. *Virus Evol.* 2020 Nov 21;6(2):veaa067. doi: 10.1093/ve/veaa067. PMID: 33381305; PMCID: PMC7751145.
199. Ruiz-Pacheco JA, Vivanco-Cid H, Izaguirre-Hernández IY, Estrada-García I, Arriaga-Pizano L, Chacón-Salinas R, Fonseca-Coronado S, Vaughan G, Tovar KR, Rivera-Osorio MP, Escobar-Gutiérrez A. TREM-1 modulation during early stages of dengue virus infection. *Immunol Lett.* 2014 Mar-Apr;158(1-2):183-8. doi: 10.1016/j.imlet.2014.01.003. Epub 2014 Jan 18. PMID: 24447863.
200. Ryu W. Other Positive-Strand RNA Viruses. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses.* 2017;177-184. doi:10.1016/B978-0-12-800838-6.00013-8
201. Saito M, Tsukagoshi H, Ishigaki H, Aso J, Ishii H, Okayama K, Ryo A, Ishioka T, Kuroda M, Saruki N, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid (VP1) region in human norovirus genogroup II genotype 3. *Heliyon.* 2020 May 3;6(5):e03835. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03835. PMID: 32395646; PMCID: PMC7205756.
202. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):778-809, table of contents. doi: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001. PMID: 11585785; PMCID: PMC89003.
203. Sang S, Yang X. Evolutionary dynamics of GII.17 norovirus. *PeerJ.* 2018 Feb 1;6:e4333. doi: 10.7717/peerj.4333. PMID: 29404222; PMCID: PMC5797681.
204. Saurer L, Zysset D, Rihs S, Mager L, Gusberti M, Simillion C, Lugli A, Zlobec I, Krebs P, Mueller C. TREM-1 promotes intestinal tumorigenesis. *Sci Rep.* 2017 Nov 1;7(1):14870. doi: 10.1038/s41598-017-14516-4. PMID: 29093489; PMCID: PMC5665947.
205. Schmausser B, Endrich S, Beier D, Moran AP, Burek CJ, Rosenwald A, Rieckmann P, Müller-Hermelink HK, Eck M. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) expression on gastric epithelium: implication for a role of TREM-1 in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol.* 2008 Apr;152(1):88-94. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03608.x. PMID: 18321350; PMCID: PMC2384064.
206. Seth, R., Sun, L. & Chen, Z. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* **16**, 141–147 (2006). <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310019>.
207. Smyth RP, Negroni M, Lever AM, Mak J, Kenyon JC. RNA Structure-A Neglected Puppet Master for the Evolution of Virus and Host Immunity. *Front Immunol.* 2018 Sep 19;9:2097. doi: 10.3389/fimmu.2018.02097. PMID: 30283444; PMCID: PMC6156135.
208. Srinivasan, Jayashree, et al. "Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate– DNA helices." *Journal of the American Chemical Society* 120.37 (1998): 9401-9409.
209. Srivastava A, George J, Karuturi R. Transcriptome Analysis. Academic Press. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology.* 2019. 792-805. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20161-1>.

210. Straub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, Valdez CO, Bruckner-Lea CJ, Gerba CP, Abbaszadegan M, Nickerson CA. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis.* 2007 Mar;13(3):396-403. doi: 10.3201/eid1303.060549. PMID: 17552092; PMCID: PMC2725917.
211. Subba-Reddy CV, Yunus MA, Goodfellow IG, Kao CC. Norovirus RNA synthesis is modulated by an interaction between the viral RNA-dependent RNA polymerase and the major capsid protein, VP1. *J Virol.* 2012 Sep;86(18):10138-49. doi: 10.1128/JVI.01208-12. Epub 2012 Jul 11. Retraction in: *J Virol.* 2017 Nov 30;91(24):null. PMID: 22787222; PMCID: PMC3446604.
212. Subramanian S, Pallati PK, Rai V, Sharma P, Agrawal DK, Nandipati KC. Increased expression of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in the population with obesity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring).* 2017 Mar;25(3):527-538. doi: 10.1002/oby.21714. Epub 2017 Jan 23. Erratum in: *Obesity (Silver Spring).* 2019 Mar;27(3):513-515. PMID: 28111922; PMCID: PMC5323323.
213. Subramanian S, Pallati PK, Sharma P, Agrawal DK, Nandipati KC. Significant association of TREM-1 with HMGB1, TLRs and RAGE in the pathogenesis of insulin resistance in obese diabetic populations. *Am J Transl Res.* 2017 Jul 15;9(7):3224-3244. Erratum in: *Am J Transl Res.* 2019 Dec 15;11(12):7656-7659. PMID: 28804542; PMCID: PMC5553874.
214. Suh HC, Benoukraf T, Shyamsunder P, Yin T, Cao Q, Said J, Lee S, Lim R, Yang H, Salotti J, Johnson PF, Madan V, Koeffler HP. LPS independent activation of the pro-inflammatory receptor Trem1 by C/EBP ϵ in granulocytes. *Sci Rep.* 2017 Apr 25;7:46440. doi: 10.1038/srep46440. PMID: 28440307; PMCID: PMC5404328.
215. Sukhwal A, Sowdhamini R. PPCheck: A Webserver for the Quantitative Analysis of Protein-Protein Interfaces and Prediction of Residue Hotspots. *Bioinformatics and biology insights.* 2015;9:141-51.
216. Taabazuing CY, Okondo MC, Bachovchin DA. Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. *Cell Chem Biol.* 2017 Apr 20;24(4):507-514.e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.03.009. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28392147; PMCID: PMC5467448.
217. Takahashi T, Kimura R, Shirai T, Sada M, Sugai T, Murakami K, Harada K, Ito K, Matsushima Y, Mizukoshi F, Okayama K, Hayashi Y, Kondo M, Kageyama T, Suzuki Y, Ishii H, Ryo A, Katayama K, Fujita K, Kimura H. Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) Region and VP1 Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6. *Viruses.* 2023 Jul 1;15(7):1497. doi: 10.3390/v15071497. PMID: 37515184; PMCID: PMC10383674.
218. Tamarro A, Derive M, Gibot S, Leemans JC, Florquin S, Dessing MC. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol Ther.* 2017 Sep;177:81-95. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.043. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28245991.
219. Taube S, Perry JW, Yetming K, Patel SP, Auble H, Shu L, Nawar HF, Lee CH, Connell TD, Shayman JA, Wobus CE. Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine

- noroviruses. *J Virol.* 2009 May;83(9):4092-101. doi: 10.1128/JVI.02245-08. Epub 2009 Feb 25. PMID: 19244326; PMCID: PMC2668497.
220. Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol Lett.* 2008 Mar 15;116(2):111-6. doi: 10.1016/j.imlet.2007.11.021. Epub 2007 Dec 26. PMID: 18192027.
221. Thorne L, Bailey D, Goodfellow I. High-resolution functional profiling of the norovirus genome. *J Virol.* 2012 Nov;86(21):11441-56. doi: 10.1128/JVI.00439-12. Epub 2012 Aug 22. PMID: 22915807; PMCID: PMC3486310.
222. Tohma K, Lepore CJ, Gao Y, Ford-Siltz LA, Parra GI. Population Genomics of GII.4 Noroviruses Reveal Complex Diversification and New Antigenic Sites Involved in the Emergence of Pandemic Strains. *mBio.* 2019 Sep 24;10(5):e02202-19. doi: 10.1128/mBio.02202-19. PMID: 31551337; PMCID: PMC6759766.
223. Turnbull IR, Colonna M. Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nat Rev Immunol.* 2007 Feb;7(2):155-61. doi: 10.1038/nri2014. Epub 2007 Jan 15. PMID: 17220916.
224. Uchikoga N, Hirokawa T. Analysis of protein-protein docking decoys using interaction fingerprints: application to the reconstruction of CaM-ligand complexes. *BMC Bioinformatics.* 2010 May 11;11:236. doi: 10.1186/1471-2105-11-236. PMID: 20459766; PMCID: PMC2873953.
225. Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, Kozakov D. New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 2017 Mar; 85(3):435-444.
226. Vakulenko YA, Orlov AV, Lukashev AN. Patterns and Temporal Dynamics of Natural Recombination in Noroviruses. *Viruses.* 2023 Jan 28;15(2):372. doi: 10.3390/v15020372. PMID: 36851586; PMCID: PMC9961210.
227. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark E, Berendsen H. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry.* 2005;26(16):1701-18.
228. Van Loben Sels JM, Green KY. The Antigenic Topology of Norovirus as Defined by B and T Cell Epitope Mapping: Implications for Universal Vaccines and Therapeutics. *Viruses.* 2019 May 10;11(5):432. doi: 10.3390/v11050432. PMID: 31083353; PMCID: PMC6563215.
229. Villabruna N, Schapendonk C, Aron G, Koopmans M, de Graaf . Human Noroviruses Attach to Intestinal Tissues of a Broad Range of Animal Species. *J Virol.* 2021 Jan 13;95(3):e01492-20. doi: 10.1128/JVI.01492-20. PMID: 33115870; PMCID: PMC7925106.
230. Vinjé J, Estes MK, Esteves P, Green KY, Katayama K, Knowles NJ, L'Homme Y, Martella V, Vennema H, White PA, Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *J Gen Virol.* 2019 Nov;100(11):1469-1470. doi: 10.1099/jgv.0.001332. PMID: 31573467; PMCID: PMC7011698.
231. Vitiello GAF, Ferreira WAS, Cordeiro de Lima VC, Medina TDS. Antiviral Responses in Cancer: Boosting Antitumor Immunity Through Activation of Interferon Pathway in the Tumor Microenvironment. *Front*

- Immunol. 2021 Dec 2;12:782852. doi: 10.3389/fimmu.2021.782852. PMID: 34925363; PMCID: PMC8674309.
232. Vongpunsawad S, Venkataram Prasad BV, Estes MK. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J Virol*. 2013;87(9):4818-4825. doi:10.1128/JVI.03508-12
233. Vongpunsawad S, Venkataram Prasad BV, Estes MK. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J Virol*. 2013 May;87(9):4818-25. doi: 10.1128/JVI.03508-12. Epub 2013 Feb 13. PMID: 23408637; PMCID: PMC3624303.
234. Vreven T, Hwang H, Pierce BG, Weng Z. Prediction of protein-protein binding free energies. *Protein Sci*. 2012 Mar;21(3):396-404. doi: 10.1002/pro.2027. Epub 2012 Feb 2. PMID: 22238219; PMCID: PMC3375440.
235. Wang B, Kumar V, Olson A, Ware D. Reviving the Transcriptome Studies: An Insight Into the Emergence of Single-Molecule Transcriptome Sequencing. *Front Genet*. 2019 Apr 26;10:384. doi: 10.3389/fgene.2019.00384. PMID: 31105749; PMCID: PMC6498185.
236. Wang C, Yang T, Xiao J, Xu C, Alippe Y, Sun K, Kanneganti TD, Monahan JB, Abu-Amer Y, Lieberman J, Mbalaviele G. NLRP3 inflammasome activation triggers gasdermin D-independent inflammation. *Sci Immunol*. 2021 Oct 22;6(64):eabj3859. doi: 10.1126/sciimmunol.abj3859. Epub 2021 Oct 22. PMID: 34678046; PMCID: PMC8780201.
237. Wang HC, Li K, Susko E, Roger AJ. A class frequency mixture model that adjusts for site-specific amino acid frequencies and improves inference of protein phylogeny. *BMC Evol Biol*. 2008 Dec 16;8:331. doi: 10.1186/1471-2148-8-331. PMID: 19087270; PMCID: PMC2628903.
238. Wang YK, Wang J, Hua F, Shen YL, Han L, You JY, Wei W, Zhang CY, Liu XD, Zhang Q. TREM-1 Modulates Dendritic Cells Maturation and Dendritic Cell-Mediated T-Cell Activation Induced by ox-LDL. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 May 21;2022:3951686. doi: 10.1155/2022/3951686. PMID: 35637975; PMCID: PMC9148251.
239. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10, 57–63 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
240. Weber B, Schuster S, Zysset D, Rihs S, Dickgreber N, Schürch C, Riether C, Siegrist M, Schneider C, Pawelski H, Gurzeler U, Ziltener P, Genitsch V, Tacchini-Cottier F, Ochsenbein A, Hofstetter W, Kopf M, Kaufmann T, Oxenius A, Reith W, Saurer L, Mueller C. TREM-1 deficiency can attenuate disease severity without affecting pathogen clearance. *PLoS Pathog*. 2014 Jan;10(1):e1003900. doi: 10.1371/journal.ppat.1003900. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24453980; PMCID: PMC3894224.
241. Weng G, Wang E, Wang Z, Liu H, Zhu F, Li D, et al. HawkDock: a web server to predict and analyze the protein-protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic acids research*. 2019;47(W1):W322-w30.
242. Weng G, Wang E, Wang Z, Liu H, Zhu F, Li D, Hou T. HawkDock: a web server to predict and analyze the protein-protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W322-W330. doi: 10.1093/nar/gkz397. PMID: 31106357; PMCID: PMC6602443.

243. Wilkins C, Gale M., Jr Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr Opin Immunol.* 2010;22:41–47.
244. Williams AN, Sherman MB, Smith HQ, Taube S, Pettitt BM, Wobus CE, Smith TJ. Multiple Signals in the Gut Contract the Mouse Norovirus Capsid To Block Antibody Binding While Enhancing Receptor Affinity. *J Virol.* 2021 Oct 27;95(22):e0147121. doi: 10.1128/JVI.01471-21. Epub 2021 Sep 1. PMID: 34468172; PMCID: PMC8549501.
245. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, Verma V, Keedy DA, Hintze BJ, Chen VB, Jain S, Lewis SM, Arendall WB 3rd, Snoeyink J, Adams PD, Lovell SC, Richardson JS, Richardson DC. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.* 2018 Jan;27(1):293-315. doi: 10.1002/pro.3330. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29067766; PMCID: PMC5734394.
246. Winder N, Gohar S, Muthana M. Norovirus: An Overview of Virology and Preventative Measures. *Viruses.* 2022 Dec 16;14(12):2811. doi: 10.3390/v14122811. PMID: 36560815; PMCID: PMC9781483.
247. Winder N, Gohar S, Muthana M. Norovirus: An Overview of Virology and Preventative Measures. *Viruses.* 2022 Dec 16;14(12):2811. doi: 10.3390/v14122811. PMID: 36560815; PMCID: PMC9781483.
248. Winder N, Gohar S, Muthana M. Norovirus: An Overview of Virology and Preventative Measures. *Viruses.* 2022 Dec 16;14(12):2811. doi: 10.3390/v14122811. PMID: 36560815; PMCID: PMC9781483.
249. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW 4th. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol.* 2006 Jun;80(11):5104-12. doi: 10.1128/JVI.02346-05. PMID: 16698991; PMCID: PMC1472167.
250. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW 4th. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol.* 2006 Jun;80(11):5104-12. doi: 10.1128/JVI.02346-05. PMID: 16698991; PMCID: PMC1472167.
251. Wu QS, Xuan ZL, Liu JY, Zhao XT, Chen YF, Wang CX, Shen XT, Wang YX, Wang L, Hu Y. Norovirus shedding among symptomatic and asymptomatic employees in outbreak settings in Shanghai, China. *BMC Infect Dis.* 2019 Jul 8;19(1):592. doi: 10.1186/s12879-019-4205-y. PMID: 31286917; PMCID: PMC6613243.
252. Xue L, Rodrigues J, Kastritis P, Bonvin A, Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics.* 2016;32(23):3676-8.
253. Yang YX, Huang JY, Wang P, Zhu BT. AREA-AFFINITY: A Web Server for Machine Learning-Based Prediction of Protein-Protein and Antibody-Protein Antigen Binding Affinities. *Journal of chemical information and modeling.* 2023;63(11):3230-7.
254. Yi Y, Wang S, Wang X, et al. Identification of Human Norovirus GII.3 Blockade Antibody Epitopes. *Viruses.* 2021;13(10):2058. Published 2021 Oct 13. doi:10.3390/v13102058.
255. Yip JLK, Balasuriya GK, Spencer SJ, Hill-Yardin EL. The Role of Intestinal Macrophages in Gastrointestinal Homeostasis: Heterogeneity and

- Implications in Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;12(5):1701-1718. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.08.021. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34506953; PMCID: PMC8551786.
256. Yokoyama S. ABCA1 and biogenesis of HDL. *J Atheroscler Thromb*. 2006 Feb;13(1):1-15. doi: 10.5551/jat.13.1. PMID: 16505586.
257. Yuan L, Fung TS, He J, Chen RA, Liu DX. Modulation of viral replication, apoptosis and antiviral response by induction and mutual regulation of EGR and AP-1 family genes during coronavirus infection. *Emerg Microbes Infect*. 2022 Dec;11(1):1717-1729. doi: 10.1080/22221751.2022.2093133. PMID: 35727266; PMCID: PMC9262369.
258. Yuan Z, Syed MA, Panchal D, Joo M, Colonna M, Brantly M, Sadikot RT. Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1)-mediated Bcl-2 induction prolongs macrophage survival. *J Biol Chem*. 2014 May 23;289(21):15118-29. doi: 10.1074/jbc.M113.536490. Epub 2014 Apr 7. PMID: 24711453; PMCID: PMC4031561.
259. Yuan, Z., Fan, X., Staitieh, B. et al. HIV-related proteins prolong macrophage survival through induction of Triggering receptor expressed on myeloid cells-1. *Sci Rep* 7, 42028 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep42028>
260. Zachos NC, Kovbasnjuk O, Foulke-Abel J, In J, Blutt SE, de Jonge HR, Estes MK, Donowitz M. Human Enteroids/Colonoids and Intestinal Organoids Functionally Recapitulate Normal Intestinal Physiology and Pathophysiology. *J Biol Chem*. 2016 Feb 19;291(8):3759-66. doi: 10.1074/jbc.R114.635995. Epub 2015 Dec 16. PMID: 26677228; PMCID: PMC4759158.
261. Zangi L, Klionsky YZ, Yarimi L, Bachar-Lustig E, Eidelstein Y, Shezen E, Hagin D, Ito Y, Takai T, Reich-Zeliger S, Lask A, Milstein O, Jung S, Shinder V, Reisner Y. Deletion of cognate CD8 T cells by immature dendritic cells: a novel role for perforin, granzyme A, TREM-1, and TLR7. *Blood*. 2012 Aug 23;120(8):1647-57. doi: 10.1182/blood-2012-02-410803. Epub 2012 Jul 9. PMID: 22776817.
262. Zhao C, Zhao W. NLRP3 Inflammasome-A Key Player in Antiviral Responses. *Front Immunol*. 2020 Feb 18;11:211. doi: 10.3389/fimmu.2020.00211. PMID: 32133002; PMCID: PMC7040071.
263. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 2006 Mar 15;346(2):312-23. doi: 10.1016/j.virol.2005.11.015. Epub 2005 Dec 15. PMID: 16343580.
264. Zheng, W., Xu, Q., Zhang, Y. et al. Toll-like receptor-mediated innate immunity against herpesviridae infection: a current perspective on viral infection signaling pathways. *Virol J* 17, 192 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01463-2>
265. Zhong MF, Zhao JM (2016) Diagnostic values of plasma CD64 and sTREM-1 for pediatric pneumonia. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 18:599–602.
266. Zhu S, Watanabe M, Kirkpatrick E, Murray AB, Sok R, Karst SM. Regulation of Norovirus Virulence by the VP1 Protruding Domain Correlates with B Cell Infection Efficiency. *J Virol*. 2015 Dec 30;90(6):2858-67. doi: 10.1128/JVI.02880-15. PMID: 26719276; PMCID: PMC4810633.

267. Zysset D, Weber B, Rihs S, Brasseit J, Freigang S, Riether C, Banz Y, Cerwenka A, Simillion C, Marques-Vidal P, Ochsenbein AF, Saurer L, Mueller C. TREM-1 links dyslipidemia to inflammation and lipid deposition in atherosclerosis. *Nat Commun.* 2016 Oct 20;7:13151. doi: 10.1038/ncomms13151. PMID: 27762264; PMCID: PMC5080444.
268. Mboko WP, Chhabra P, Valcarce MD, Costantini V, Vinjé J. Advances in understanding of the innate immune response to human norovirus infection using organoid models. *J Gen Virol.* 2022 Jan;103(1):10.1099/jgv.0.001720. doi: 10.1099/jgv.0.001720. PMID: 35077345; PMCID: PMC8984994.
- 269.