



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DO SEMIÁRIDO

Anete Ferraz Guzzi

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO POLIMORFISMO A122V NA PROTEÍNA
RECEPTORA DE QUIMIOCINA DO TIPO 1 (CXCR1) ASSOCIADO COM
SUSCETIBILIDADE À MASTITE EM BOVINOS**

Petrolina – PE

2017

Anete Ferraz Guzzi

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO POLIMORFISMO A122V NA PROTEÍNA
RECEPTORA DE QUIMIOCINA DO TIPO 1 (CXCR 1) ASSOCIADO COM
SUSCETIBILIDADE À MASTITE EM BOVINOS**

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias como requisito avaliativo para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Eyre Gabriel

Guzzi, Anete Ferraz

G993c

Caracterização *in silico* do polimorfismo A122V na proteína receptora de quimiocina do tipo 1 (CXCR1) associado com suscetibilidade à mastite em bovinos / Anete Ferraz Guzzi. -- Petrolina, 2018.

xiii, 86 f.: il. ;29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2018.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Eyre Gabriel.

Banca examinadora: Dr. João José de Simone Gouveia, Dra. Francine Hiromi Ishikawa.

Referências.

1. Bioinformática. 2. Quimiocina. 3. Mastite - bovinos. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 660.6

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DO SEMIÁRIDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Anete Ferraz Guzzi

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO POLIMORFISMO A122V NA PROTEÍNA
RECEPTORA DE QUIMIOCINA DO TIPO 1 (CXCR 1) ASSOCIADO COM
SUSCETIBILIDADE À MASTITE EM BOVINOS

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias como requisito avaliativo para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovado em: 22 de janeiro de 2018.

Banca examinadora

Prof. Dra. Jane Eyre Gabriel
Orientadora – Presidente da Banca

Prof. Dr. João José de Simoni Gouveia
Membro Interno

Prof. Dra. Francine Hiromi Ishikawa
Membro Externo

*A Deus pela vida,
Aos meus pais.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder sabedoria e forças para alcançar mais essa etapa na minha vida.

Aos meus amados **pais**, Vilson Guzzi e Maria do Carmo Barros Ferraz Guzzi por todo amor e incentivo.

À minha **família** por seu imenso amor, em especial, aos meus irmãos Wellington, Denise e Anderson, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, apoiando-me e incentivando-me. Aos meus sobrinhos por conseguirem me estressar e desestressar ao mesmo tempo, a tia ama muito, Maria Ester, Isaac, Lucas, Pedro, Isadora e Ibraim.

À minha maravilhosa orientadora **Profa. Dra. Jane Eyre Gabriel** pela oportunidade de desenvolver este trabalho, inestimável ajuda, paciência, direcionamento e estímulo. A qual tenho um enorme carinho.

Aos **Professores da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, pelos ensinamentos de grande importância para minha formação, em especial a Professora Dra. Francesca Dias Nobre, por ser esse exemplo de pessoa em caráter e profissionalismo.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, pela oferta do curso e a **secretária Edilene** pela atenção.

Ao meu chefe imediato **Francisco Peixoto de Luna**, pela liberação para execução das disciplinas e atividades durante o mestrado.

Ao **Prof. Dr. João José de Simoni Gouveia e toda equipe** do Laboratório de Genética e Biotecnologia pela atenção prestada.

Ao Prof. Dr. **Hugo Colombarolli Bonfá**, pela auxílio nos cálculos.

Ao grupo **“Bio in bytes”** pelo apoio, em especial ao Felipe Luna, pela ajuda na realização das análises.

Ao grupo **NEPOA** pelo apoio e carinho, especialmente, Anay, Tayla, Tamires, Jane e Isabela.

Às minhas **amigas** Fernanda, Jussara, Emanuella, e ao grupo **“TARKVAM”** pela amizade, em especial, Rosália, Tuane, Vanessa, Maísa e Kelly.

À **Universidade Federal do Vale do São Francisco**, pela concessão da disponibilidade para a realização deste curso.

A todos que me ajudaram, de alguma forma, ao longo deste trabalho.

*“Nada te perturbe, nada te espante,
Tudo passa, Deus não muda,
A paciência tudo alcança;
Quem a Deus tem, nada lhe falta:
Só Deus basta”.*
Santa Tereza D’Ávila

RESUMO

A proteína receptora de quimiocina do tipo 1 (CXCR1) é um polipeptídeo transmembranar que participa no processo imunológico, garantindo a migração das células de defesas, especialmente neutrófilos, até o local de infecção, proporcionando uma rápida ação contra a inflamação. Estudos recentes detectaram um polimorfismo de nucleotídeo único não-sinônimo na região codificante do éxon II c.+365T>C nesse gene, que acarretou na substituição dos aminoácidos alanina (Ala) por valina (Val) na posição 122 da cadeia polipeptídica, resultando em maior suscetibilidade à mastite em vacas. Assim, o presente estudo objetivou prever por análises *in silico* os possíveis efeitos do polimorfismo A122V sobre a estrutura e função da proteína CXCR1 de bovino *Bos taurus*. Neste estudo foram analisadas duas sequências: a) sequência de aminoácidos da proteína CXCR1 não-polimórfica bovina (A7KWG0) selecionada a partir do banco de dados Swiss-Prot, contendo o aminoácido alanina na posição 122 e b) sequência da proteína CXCR1 polimórfica contendo uma substituição de alanina por valina na posição 122 da cadeia polipeptídica. A predição dos impactos do polimorfismo A122V sobre a estabilidade estrutural e funcional das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica foi avaliada pelas ferramentas SIFT, POLYPHEN e I-MUTANT-2. As modelagens tridimensionais dessas proteínas foram realizadas pelos programas integrativos MODELLER/CHIMERA. A qualidade dos modelos preditos foi validada pelas ferramentas QMEANBrane e RAMPAGE. Ainda, as interações da proteína CXCR1 com outras proteínas correlatas foram estimadas no banco de dados STRING/KEGG Pathway. Os resultados demonstraram que o polimorfismo A122V exerceu efeitos toleráveis e não-deletérios sobre a CXCR1 polimórfica, apresentando um modelo estrutural de alfa-hélice típico de uma proteína receptora transmembranar para ambas as proteínas. Embora maiores variações nas distâncias entre os pares de aminoácidos nas posições-alvos tenham sido detectadas na proteína CXCR1 polimórfica, cerca de 98% dos aminoácidos em ambos os modelos foram situados em regiões ditas favoráveis e permitidas nos diagramas de Ramachandran, indicando que tais modelos apresentam alta precisão e qualidade de modelagem. Foi demonstrada interação da proteína CXCR1 com outras 10 proteínas através do banco de dados STRING, as quais participam do processo de migração e sinalização celular. Evidências experimentais sustentam que o polimorfismo de nucleotídeo único A122V na proteína receptora CXCR1 está associado com aumento na incidência de mastite clínica em vacas leiteiras. Assim, as descobertas descritas neste estudo comprovam que a substituição do aminoácido alanina por valina provoca mudanças conformacionais locais na proteína CXCR1 polimórfica, que podem estar diretamente afetando seus mecanismos de enovelamento pós-traducionais e sua função biológica.

Palavra-chave: Bioinformática, Diagrama de Ramachandran, Modeller/Chimera, STRING, I-Mutant.

ABSTRACT

CXC chemokine receptor protein type 1 (CXCR1) is a transmembrane polypeptide that participates in the immune process ensuring the migration of the defensive cells (neutrophils) to the site of infection, providing a rapid action against inflammation. Recent studies have detected a single non-synonymous nucleotide polymorphism in the codon region of exon II c.+365T>C of this gene, which resulted in the replacement of the alanine (Ala) by valine (Val) amino acids at position 122 of the polypeptide chain, promoting greater susceptibility to mastitis in dairy cows. Thus, the present study aimed to predict by *in silico* analysis the possible effects of the A122V polymorphism on the structure and function of CXCR1 protein of bovine *Bos taurus*. In this study two sequences were analyzed: a) amino acid sequence of the bovine non-polymorphic CXCR1 protein (A7KWG0) from the Swiss-Prot database, containing the alanine amino acid at position 122 and b) polymorphic CXCR1 protein sequence, containing a substitution of the alanine by valine at same position in the polypeptide chain. The prediction of the impacts of the A122V polymorphism on the structural and functional stability of non-polymorphic and polymorphic CXCR1 proteins was evaluated by SIFT, POLYPHEN and I-MUTANT-2 tools. The three-dimensional modeling of these proteins was performed by MODELLER/CHIMERA integrative programs. The quality of the predictive models was validated by QMEANBrane and RAMPAGE tools. Furthermore, the interactions of the bovine CXCR1 protein with other targeted proteins were estimated in STRING/KEGG Pathway database. The results demonstrated that the A122V polymorphism exerted tolerable and non-deleterious effects on the polymorphic CXCR1, presenting a typical alpha-helical structural model of a transmembrane receptor protein for both two proteins. Interactions of the CXCR1 protein with another 10 proteins, which participate in the process of cellular migration and signaling, have been demonstrated through the STRING database. Although greater variations in the distances between the amino acid pairs at the targeted positions are detected in the polymorphic protein, about 98% of the amino acids in both models were situated in favorable and allowed regions in the Ramachandran diagrams, indicating that such models present high modeling accuracy and quality. Experimental evidence supports that the A122V single nucleotide polymorphism in the CXCR1 receptor protein is associated with increased incidence of clinical mastitis in dairy cows. Thus, the findings described in this study prove that the substitution of the alanine for valine amino acids causes local conformational changes in the polymorphic CXCR1 protein, which may be directly affecting its post-translational folding mechanisms and its biological function.

Key-words: Bioinformatics, Ramachandran Diagram, Modeller/Chimera, STRING, I-Mutant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	No processo inflamatório ocorre o complexo de sinalização e recrutamento, onde os neutrófilos através dos receptores CXCR1 reagem às quimiocinas CXC. Assim, os neutrófilos atravessam os vasos sanguíneos e se deslocam contra um gradiente de concentração dos peptídeos quimiotáticos em direção ao local de inflamação.....	19
Figura 2:	Parâmetros avaliativos da análise dos modelos alvos gerados a partir do programa Modeller.....	29
Figura 3:	Predição do efeito do polimorfismo A122V sobre a função da proteína CXCR1 bovina.....	35
Figura 4:	Modelos tridimensionais da proteína CXCR1. A e B: formato em fita (“ribbons”) das sequências não-polimórfica e polimórfica, respectivamente. C e D: formato de esfera e bastão (“all atoms”) das sequências não-polimórfica e polimórfica, respectivamente. E e F: formato compactado (“hydrophobicity surface”) das sequências não-polimórfica e polimórfica, respectivamente.....	37
Figura 5:	Alinhamento e sobreposição das estruturas tridimensionais das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica.....	38
Figura 6:	Distâncias entre o par de resíduos de aminoácidos nas posições 121, 122 e 123 em função do polimorfismo A122V nas proteínas CXCR1 não-polimórfica (A e C) e polimórfica (B e D).....	39
Figura 7:	Validação da qualidade dos modelos preditos pela ferramenta QMEANBrane. Estrutura tridimensional e cadeia linear apresentando os resíduos de aminoácidos das proteínas CXCR1 não-polimórfica (A) polimórfica (B).....	41
Figura 8:	Parâmetros avaliativos da qualidade dos modelos tridimensionais preditos para as proteínas CXCR1 não-polimórfica (A) e polimórfica (B) gerados pelo programa QMEANBrane.....	43
Figura 9:	Representação gráfica do diagrama de Ramachandran gerada a partir das proteínas CXCR1 não-polimórfica (A) e polimórfica (B) com os ângulos de restrições em cada parcela e seus elementos estruturais secundários nos quadrantes α -hélice e β -conformação gerada pela ferramenta RAMPAGE.....	45
Figura 10:	Diagrama de dispersão dos resíduos de glicinas, pré-prolina e prolina dos modelos das proteínas CXCR1 não-polimórfica (A) e polimórfica (B) em regiões favoráveis e permitidas.....	46
Figura 11:	Rede de interações da proteína CXCR1 com demais proteínas pelo programa STRING.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número e porcentagem dos resíduos distribuídos nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas a partir dos modelos das proteínas CXCR1 não-polimórfica (n-p) e polimórfica (p) por análises do diagrama de Ramachandran.....	44
Tabela 2: Relação das proteínas interligadas à proteína CXCR1 bovina, breve função, escores e grau de interação gerados pelo programa STRING.....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Mastite: saúde do úbere em vacas leiteiras.....	15
2.2 Famílias e funções biológicas da proteína CXCR1.....	16
2.3 Polimorfismos de um nucleotídeo simples no gene <i>cxcr1</i>	20
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Seleção e busca da sequência de interesse em banco de dados biológicos.....	24
4.2 Análise funcional do polimorfismo A122V na proteína CXCR1.....	24
4.2.1 Predição da tolerância do polimorfismo A122V sobre a proteína CXCR1 bovina por análises de SIFT.....	25
4.2.2 Predição funcional do polimorfismo A122V sobre as proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica por análises no POLYPHEN-2.....	25
4.3 Predição do efeito do polimorfismo A122V sobre a estabilidade da proteína CXCR1.....	26
4.4 Análises de modelagem tridimensional das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica.....	26
4.4.1 Modelagem estrutural das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica utilizando os programas MODELLER/CHIMERA.....	27
4.5 Avaliação da qualidade dos modelos tridimensionais preditos para a proteína CXCR1 não-polimórfica e polimórfica.....	30
4.5.1 Análise da qualidade da modelagem através da ferramenta QMEANBrane.....	30
4.5.2 Avaliação da qualidade estrutural dos modelos preditos das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica pelo programa RAMPAGE...	31
4.6 Interação e correlação da proteína CXCR1 bovina com outras proteínas.....	33
4.6.1 Análise do mapeamento da proteína CXCR1 utilizando o software KEGG PATHWAYS.....	34
5. RESULTADOS.....	35

5.1	Análise funcional do polimorfismo A122V na proteína CXCR1.....	35
5.1.1	Predição para a tolerância do polimorfismo A122V da proteína CXCR1 através da ferramenta SIFT.....	35
5.1.2	Predição do efeito do polimorfismo A122V sobre a função da proteína CXCR1 utilizando a ferramenta Polyphen-2.....	35
5.2	Predição do efeito do polimorfismo A122V sobre a estabilidade da proteína CXCR1.....	36
5.3	Predição das alterações estruturais das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica.....	36
5.4	Validação dos modelos tridimensionais preditos a partir da sequência das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica.....	39
5.4.1	Análise da qualidade da modelagem através da ferramenta QMEANBrane.....	39
5.4.2	Avaliação da qualidade estrutural dos modelos preditos das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica pelo programa RAMPAGE...	43
5.5	Rede de interações e correlações da proteína CXCR1 com demais proteínas.....	47
6.	DISCUSSÃO.....	50
7.	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
	ANEXOS.....	64
	APÊNDICES.....	82

1. INTRODUÇÃO

As quimiocinas participam no processo imunológico garantindo a migração das células de defesas (neutrófilos) até o local de infecção, proporcionando uma rápida ação contra a inflamação (SALLUSTO; BAGGIOLINI, 2008). A ação das quimiocinas é efetivada através da ligação com seus receptores (receptores CXC de quimiocina do tipo -1) presentes na superfície das células, e após reconhecimento e ligação por um processo chamado quimiotaxia, os neutrófilos migram até o local de infecção (ZHOU et al., 2013; DAVID, MORTARI, 2000). Os neutrófilos participam efetivamente no sistema imunológico durante o processo inflamatório, pois nas suas membranas possuem uma série de receptores imunes inatos que recolhem os agentes patológicos causadores de danos ao tecido (FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013; PAWLIK et al., 2015).

O gene *cxcr1* está relacionado com o sistema imunológico inato das quimiocinas (ZHOU et al., 2013). Sendo assim, o polimorfismo no respectivo gene pode ser identificado como potencial marcador para seleção de animais resistentes à mastite, trazendo uma melhor resposta para a produção de leite (PAWLILIK et al., 2015). O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) é a variação genética mais encontrada no código genético, e os SNPs consistem na substituição de um único nucleotídeo na sequência de DNA (KONO et al., 2007). As variações fenotípicas entre indivíduos podem ser influenciadas por alterações herdadas na sequência de DNA, influenciando as características bioquímicas, propensão ao desenvolvimento de doenças e respostas aos estímulos ambientais (LAFRENIERE; MACDONALD, 2013). Informações mostram que algumas vacas têm maior suscetibilidade à mastite, e essa relação pode ser influenciada pela genética do animal (POKORSKA et al., 2016).

De acordo com Pokorska et al. (2016), baseado na análise do polimorfismo do gene *cxcr1*, identificaram polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), na região codificante 365 desse gene, acarretando na alteração (T>C): timina (GTC) por citosina (GCC), ocasionando a substituição de alanina (Ala) por valina (Val) na posição 122 da cadeia polipeptídica. Tal mutação caracteriza-se por ser não-sinônima e segundo Pokorska et al. (2016), poderia resultar na alteração na resposta entre o ligante esse receptor, podendo ser uma razão para o aumento da incidência da mastite observada em vacas com polimorfismo nesse sítio.

A infecção das glândulas mamárias de vacas leiteiras acometidas por mastite é considerada um problema econômico enfrentado pelos produtores, afetando diretamente a produção na indústria leiteira e ocasionando grandes prejuízos (BEECHER et al., 2010; SIMÕES, OLIVEIRA, 2012). Além disso, muitas vezes os animais gravemente afetados pela mastite, precisam ser descartados do rebanho, ocasionando uma redução no rebanho (COSER; LOPES; COSTA, 2012). Contudo, muitos pesquisadores estão em busca de novos métodos para identificar possíveis ações preventivas dessa doença que vem trazendo sérios prejuízos na produção de leite, por exemplo, o uso de marcadores moleculares que possam identificar polimorfismos e associações entre o gene de interesse (*cxcr1*) nas vacas com suscetibilidade à mastite (POKORSKA et al., 2016). Essas informações poderão contribuir para selecionar animais com baixa suscetibilidade à mastite, ocasionando um aumento na produção e qualidade do leite e melhor saúde do úbere das vacas.

Desta forma, esse estudo tem como principal objetivo predizer por análises *in silico* os efeitos do polimorfismo A122V sobre a estrutura, estabilidade e função da proteína receptora de quimiocina do tipo 1 (CXCR1) associado com suscetibilidade à mastite em bovinos (*Bos taurus*), utilizando ferramentas de bioinformática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite: saúde do úbere em vacas leiteiras

A mastite está entre as principais patologias que acomete o rebanho leiteiro, comprometendo o rendimento e a qualidade do leite, e conseqüentemente, reduzindo o lucro para os produtores de produtos lácteos, ela destaca-se por possuir importância econômica como também para a saúde pública (MARTINS et al., 2017). Caracterizada pela inflamação das glândulas mamárias pode ser causada por diversos fatores, sendo os agentes infecciosos, especialmente as bactérias, os principais causadores (HANSEN; SOTO; NATZKE, 2004). Pode ser classificada como clínica ou subclínica; onde na mastite clínica estão evidentes alguns sinais como edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor na glândula mamária, grumos e pus no leite, demonstrando alterações das características biofísicas do leite (HANSEN; SOTO; NATZKE, 2004). Em contraste, na mastite subclínica não são observadas alterações macroscópicas e sim alterações na composição do leite, podendo ser identificadas através de análises, tais como células somáticas no leite, visto que o animal não apresenta sinais visíveis de inflamação nas glândulas mamárias (HANSEN; SOTO; NATZKE, 2004). Pode-se afirmar que a mastite subclínica está presente em boa parte dos rebanhos leiteiros, sendo detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite (Li et al., 2014).

A mastite é caracterizada por uma resposta inflamatória na glândula mamária, motivada por alterações metabólicas e fisiológicas, traumas, e a forma mais frequente é causada por micro-organismos patogênicos ambientais ou contagiosos (BRENAUT et al., 2014). Contudo a efetividade da resposta imunológica do hospedeiro contra esses agentes constitui um fator crucial para não persistência e agravamento da infecção (BRENAUT et al., 2014). Os meios convencionais para prevenir e controlar tal patologia ainda sejam ineficientes, contudo, progressos profiláticos consideráveis são utilizados contra ação de agentes contagiosos, tais como: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, e para a mastite motivada por micro-organismos ambientais, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*. (BI et al., 2016).

A mastite tem grande impacto econômico sobre a produção de leite, visto que são vários os fatores prejudiciais associados à essa patologia, tais como: altos custos no tratamento, baixa produção de leite, rejeite de leite, abate prematuro e

tratamento com uso de antibióticos (COSER; LOPES; COSTA, 2012; SIMÕES; OLIVEIRA, 2012). Outra estratégia utilizada é a resposta imunológica da vaca com o objetivo de aumentar a resistência das glândulas mamárias aos patógenos invasores; a imunidade do úbere é principalmente baseada na resposta inata, e o desfecho clínico da mastite não está apenas relacionado ao agente de infecção, mas também à resposta imunológica da glândula mamária (MAGRO et al., 2017). Contudo, investigar o papel da imunidade inata na glândula mamária é fundamental para compreender melhor a patogênese da mastite, podendo assim ter uma resposta para uma classificação de animais resistentes à essa patologia.

Diante disso, tem-se aumentado a procura por novas drogas, protocolos terapêuticos e estratégias de controle alternativas; principalmente porque o uso de antibióticos, apesar de ter importante papel no controle da mastite, não pode atuar por si só, sem estar associado a outros recursos, tais como: manejo ambiental e estímulos da resposta imunológica dos hospedeiros (MARTINS et al., 2012). A genética é um dos principais fatores que contribuem para o animal deter a resistência à mastite, exercendo um importante papel na resposta imunológica do hospedeiro à infecção (KLEIN et al., 2012). Diversos genes envolvidos na resposta imunológica de resistência à mastite têm sido indicados como fortes candidatos para determinar essa associação (POKORSKA et al., 2016; VERBEKE et al., 2012; PIGHETTI et al., 2012).

A primeira linha de defesa contra patógenos invasores é o sistema imune inato, onde as células epiteliais mamárias são abundantemente encontradas e funcionam como agentes patogênicos intramamários, e atuam como uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atraem neutrófilos até o local da infecção, além das células dendríticas e dos macrófagos também essenciais para a vigilância imunológica (BUDD; MITCHELL; KEANE, 2016). Quimiocinas participam no processo de manutenção das barreiras epiteliais, agindo em resposta ao tecido durante a inflamação, assim, reduzindo as vias de proliferação bacterianas nas células, permitindo uma maior sobrevivência celular (BUDDA et al., 2016).

2.2. Famílias e funções biológicas da proteína CXCR1

As quimiocinas (citocinas ou quimioatrativas) representam um grande grupo de proteínas de baixo peso molecular (8-20 kDa), e desempenham um papel na

comunicação e migração direcionada dos leucócitos ao local infectado, mas também atuam sobre a hematopoese, angiogênese e oncogênese (DAVID; MORTARI, 2000). As quimiocinas ainda podem ser classificadas como homeostática e pró-inflamatória quanto à sua funcionalidade e aos seus perfis de expressão (ROSSI; ZLOTNIK, 2000). As quimiocinas compreendem quatro subfamílias (CXC, CX3C, CC e C), sendo a CXC uma das maiores subfamílias do grupo das quimiocinas, podendo ser representada pela nomenclatura alfa, caracterizado por um aminoácido variável que se encontra entre as duas cisteínas N-terminais (DAVID; MORTARI, 2000; MURPHY; BAGGIOLINI; CHARO, 2000).

As quimiocinas atuam através da interação com receptores transmembranares (SALLUSTO; BAGGIOLINI, 2008). Estes receptores de quimiocinas têm um N-terminal extracelular, três alças extracelulares, três alças intracelulares e um C-terminal intracelular (DAVID; MORTARI, 2000). A sinalização intracelular é administrada através das proteínas G que se associam aos receptores intracelulares, auxiliando na comunicação e traduções de sinais (ROSSI; ZLOTNIK, 2000). O receptor CXCR1 se liga a interleucina-8 IL8 com alta afinidade, provocando a ativação de neutrófilos e agindo como um poderoso fator quimiotático aos neutrófilos; esta resposta é mediada através sinalização intracelular com a proteína G que resulta no desencadeamento de cascatas de segundos mensageiros intracelulares, culminando na entrada de cálcio, na mobilização de microtúbulos e na ativação celular (BACHELERIE et al., 2014).

Os receptores de quimiocinas são compostos por cerca de 350 aminoácidos e possuem um peso molecular de aproximadamente 40 kDa (MELLADO et al., 2001), contendo sete domínios transmembranares; a região extracelular é constituída pela região N-terminal e por 3 alças extracelulares que atuam na ligação com as quimiocinas; já a região intracelular é formada pela região C-terminal e por 3 alças intracelulares acoplados a proteínas G que intervêm na transdução do sinal (MURDOCH; FINN, 2000; MELLADO et al., 2001).

O receptor CXC é subdividido em dois grupos, os que contêm ácido glutâmico (E), leucina (L), e uma arginina (R) imediatamente antes da primeira cisteína (C), representado por CXC/ELR(+), e aqueles que não contêm esta sequência (ELR), que são chamados de CXC/ELR(-) (ROSSI; ZLOTNIK, 2000). A presença ou não dessa sequência de aminoácidos na estrutura da família dos receptores CXCs tem importância estrutural e funcional, o grupo que contem (ELR), representa atividade

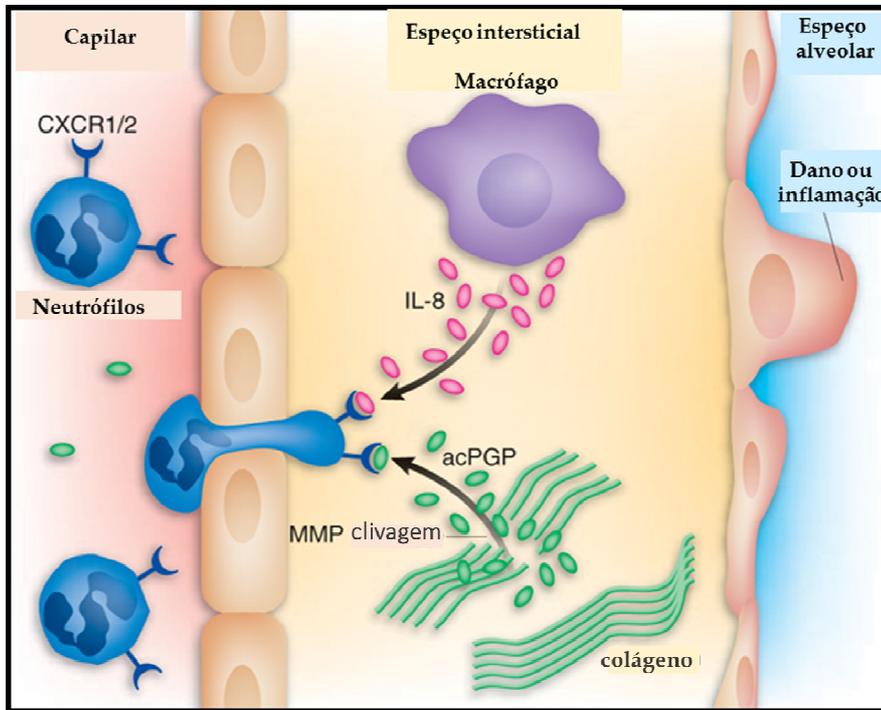
preferencial nos neutrófilos, enquanto que o grupo que não apresentam (ELR) atua principalmente sobre os linfócitos (DAVID; MORTARI, 2000).

Os receptores CXCR1 e CXCR2 são os principais receptores de quimiocinas expressos em neutrófilos, e foram definidos como os primeiros e únicos receptores conhecidos de mamíferos para quimiocinas (CXC/ELR+), incluindo interleucina - 8 (IL-8), que se liga a ambos os receptores com alta afinidade; não se ligando a outro tipo de quimiocina (MURPHY; BAGGIOLINI; CHARO, 2000).

Os neutrófilos são células hematopoiéticas brancas, que participam nos mecanismos de defesa do organismo agindo contra infecções bacterianas (LIU, et al., 2005). Os neutrófilos são ativados através da ligação de IL-8 ao receptor CXCR1, e cerca de 70-90% dos receptores CXCR1 interagem as quimiocinas (DAVID; MORTARI, 2000).

O sistema de defesa desencadeado pelos neutrófilos apresenta papel essencial durante o controle da resposta imunológica de um processo infeccioso devido à sua capacidade de fagocitar micro-organismos (LAHOUASSA et al., 2007; VERBEKE et al., 2015). Quando um tecido está lesionado ou infeccionado, os neutrófilos reagem a quimiocinas CXC, como resposta imunológica, agindo no tecido que sofreu a lesão; tal resposta quimiotática depende da capacidade da IL-8 para engatar em qualquer um dos seus dois receptores, CXCR1 e CXCR2 (ZAJA-MILATOVIC; RICHMOND, 2008). Os CXCR1 e CXCR2 estimulam e prolongam o fluxo de neutrófilos, como pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1. No processo inflamatório ocorre o complexo de sinalização e recrutamento dos neutrófilos através dos receptores CXCR1 que reagem às quimiocinas CXC. Assim, os neutrófilos atravessam os vasos sanguíneos e se deslocam contra um gradiente de concentração dos peptídeos quimiotáticos em direção ao local de inflamação.



Fonte: (HENSON; VANDIVIER, 2006)

Os neutrófilos mobilizados pelas quimiocinas e citocinas desencadeiam respostas imunológicas e inflamatórias nas glândulas mamárias durante o processo pró-inflamatórias, após estimulação bacteriana (*Staphylococcus aureus* e bactérias de tipo Gram -) (LAHOUASSA et al., 2007). Segundo o estudo de Trifilo et al. (2004), foi identificada a ação das quimiocinas como os mediadores primários do recrutamento de leucócitos para locais de infecção e tumores no sistema nervoso central, indicando que a expressão viral da quimiocinas CXC também aumenta a imunidade antiviral e reduz o tamanho de tumores.

2.3. Polimorfismos de um nucleotídeo único no gene *cxcr1*

Mutação não-sinónima é uma alteração de uma única base numa região codificada do gene, referente à uma mudança no aminoácido da proteína correspondente (NG; HENIKOFF, 2006). Uma mutação não-sinônima pode alterar a estrutura e função da proteína, e essa mudança pode acarretar em consequências fenotípicas drásticas (SUNYAEV; RAMENSKY; BORK, 2000; ALANAZI et al., 2011). Levando em conta a frequência de alelo, as variantes estruturais e a descoberta de SNPs em larga escala, as análises comparativas das propriedades estruturais das variantes alélicas de uma proteína detém um papel importante na pré-seleção de candidatos para estudos de associação de doenças e seus efeitos fenotípicos (SUNYAEV; RAMENSKY; BORK, 2000).

Nesse contexto, vários estudos têm sido realizados a fim de identificar polimorfismos que afetam a estrutura e função das proteínas CXCR1. O polimorfismo A122V na proteína CXCR1 foi estudado por Pokorska et al. (2016), que investigaram como a substituição entre esses aminoácidos poderia exercer influências sobre a infecção das glândulas mamárias, a fim de selecionar animais com baixa suscetibilidade à mastite e garantir assim uma maior produção de leite em vacas da raça Holandesa. A substituição dos aminoácidos alanina por valina poderia estar exercendo potencial influência na função dos neutrófilos (essa mudança possivelmente pode modificar a resposta ao ligante) e a resistência a doenças. De acordo com os resultados, foi possível identificar que uma mutação c.+365T>C localizada na região codificante do gene CXCR1 pode ser considerada um potencial candidato a marcador molecular genético, relacionando-o com animais suscetíveis à mastite bovina (POKORSKA et al., 2016). Visto que, uma associação entre a c.+365T>C e a incidência de casos clínicos de mastite demonstrou que os animais com o genótipo CC, tem maiores probabilidade de deterem mastite e os com genótipo TT tem maiores chances de não apresentarem esta doença.

De acordo com Verbeke et al. (2012), cerca de 140 novilhas da raça Holandesa foram genotipadas por sequenciamento de DNA, onde foi realizado o detalhamento dos fenotípicos desses animais, comparando tais resultados com os dados da cultura bacteriológica e a contagem de células somáticas. Dos 16 polimorfismos encontrados, apenas a substituição c.+980A>G foi significativamente associada á mastite subclínica nessas novilhas em lactação precoce, onde o alelo A foi considerado um agente de proteção contra a infecção bacteriana intramamária

pelos principais agentes patológicos, com isso, pode-se deter um controle na seleção de animais com genótipos que ofereçam imunidade e resistência à mastite (VERBEKE et al., 2012).

De acordo com Pighetti et al. (2012), foram identificados 36 SNPs no gene *cxcr1* em uma população de vacas Holandesas; sendo 11 localizados em regiões codificantes do éxons II: 04 polimorfismos que resultaram em alterações de aminoácidos na proteína de interesse, 01 polimorfismo inseriu um códon de parada e 06 polimorfismos foram considerados sinônimos. Pelo menos um dos SNPs apresentou associação com a alteração da função dos neutrófilos, sugerindo que as alterações de aminoácidos na proteína alvo têm potencial para influenciar a atividade da proteína CXCR1 (PIGHETTI et al., 2012). O gene *cxcr1* é altamente polimórfico e apresenta potencial nas implicações à seleção genética e fatores com o aumento do risco de infecção (PIGHETTI et al., 2012).

Um estudo realizado por Pawlik et al. (2015) examinou a resposta imunológica inata e seu papel no trajeto de infecções bacterianas em um total de 554 vacas Holandesas por genotipagem e testes bacteriológicos por ensaios da contagem de células somáticas (SCC) para estimar as diferenças entre animais portadores de distintos genótipos e haplótipos e suscetibilidade à mastite por *Staphylococcus aureus*. Nesse estudo o teste de contagem de células somáticas (SCC) foi significativamente relacionado com o SNP *cxcr1* +472, mas não para *cxcr1* +735; e nenhuma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo de *cxcr1* e a suscetibilidade à mastite por *Staphylococcus aureus* foi encontrada no rebanho estudado (PAWLIK et al., 2015).

Recentemente, o efeito do polimorfismo A122V na proteína CXCR1 previu diferenças no padrão estrutural da proteína não-polimórfica e polimórfica, com a presença de um domínio helicoidal situado entre as posições 100 e 150 apenas na proteína CXCR1 não-polimórfica (GUZZI, et al., 2017). A comparação direta dos resíduos de aminoácidos identificados na posição 122 nas sequências de proteína CXCR1 de humanos (P25024); bovino *Bos taurus* (A7KMG0); bovino *Bos indicus* (A0A023JCG5) e ovino *Ovis aries* (W5QDY9) indicou que todos os resíduos na posição 122 nas sequências de interesse apresentaram variações de aminoácidos e alterações nas propriedades bioquímicas. Os resíduos de aminoácidos encontrados na CXCR1 humana e de ovino foram tirosina (Y) e fenilalanina (F), ambos contendo anéis aromáticos; enquanto nas sequências da CXCR1 bovina foram detectados os

resíduos de aminoácido alanina (A) e valina (V), tipicamente monômeros apresentando grupos R alifáticos (GUZZI et al., 2017).

De acordo com Zhou et al. (2013), o receptor de quimiocina CXCR1 é um excelente marcador genético para a resistência à mastite em bovinos, pois regula a migração de neutrófilos ao local infectado. Foram detectados 4 SNPs do gene *cxcr1* em gado nativo chinês e analisados suas associações com características do leite (ZHOU et al., 2013). Todos os 04 SNPs estudados estavam localizados na região codificante do éxon II; sendo que dois desses SNPs c.337A>G e c.365C>T não-sinônimos [ATC (Isoleucina Ile) > GTC (Valina Val) e GCC (Alanina Ala)> GTC (Valina Val)], indicaram associação significativa com a contagem de células somáticas presentes no leite analisado em vacas leiteiras diagnosticadas com mastite, sugerindo um possível papel desses SNPs na resposta do hospedeiro contra tal patologia (ZHOU et al., 2013).

Recentemente, diferenças entre os genótipos GC/CC e GC/GG forneceram estimativas para efeitos de dominância sobre o gene *cxcr1* em vacas holandesas, tendo em vista que o gene *cxcr1* desempenha um papel fundamental na resistência à mastite e no desempenho do rendimento do leite, essa pesquisa avaliou os efeitos de dominância do gene *cxcr1* +777 para a mastite clínica e as características de produção nesse gado leiteiro empregando o método de genotipagem seletiva (BAGHERI; ZAHMATKESH, 2017). Tais resultados demonstraram que o gene *cxcr1* pode ser um gene candidato valioso para melhorar a resistência à mastite e as características de produção em rebanhos de gado leiteiro com efeitos representativos de dominância (BAGHERI; ZAHMATKESH, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar as consequências do polimorfismo A122V sobre a estabilidade, função e modelagem estrutural da proteína receptora da quimiocina do tipo 1 (CXCR1) de bovino *Bos taurus*, previamente associada com suscetibilidade à mastite em vacas leiteiras, utilizando ferramentas de bioinformática.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar sequências de peptídeos da proteína CXCR1 bovina em banco de dados de informação biológica;
- Predizer o efeito do polimorfismo A122V sobre a função e a estabilidade da proteína CXCR1;
- Realizar a modelagem tridimensional das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica;
- Avaliar a qualidade dos modelos tridimensionais preditos para as proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica;
- Verificar as interações e correlações biológicas da proteína CXCR1 bovina com outras proteínas.

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção e busca da sequência de interesse em banco de dados biológicos

As sequências de aminoácidos da proteína CXCR1 da espécie de bovino (*Bos taurus*) foram obtidas por meio de busca e seleção a partir do banco de dados de informação biológica UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org>). Este banco de dados permite obter dados de sequências de proteínas que foram documentadas ao longo dos anos, virtualmente disponível para acesso público, além de apresentar alto nível de integração com outros bancos de dados (BAIROCH; APWEILER, 2000).

Duas sequências da proteína CXCR1 bovina foram analisadas neste estudo:

a) Sequência CXCR1 não-polimórfica selecionada a partir de uma base de dados de sequência de proteínas não redundante UniProtKB/Swiss-Prot (ID: A7KWG0) e apresentada abaixo

```
>tr|A7KWG0|A7KWG0_BOVIN CXCR1 OS=Bos taurus PE=2 SV=2  
MTIILKDLSNSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVIYALVFL  
LSLLGNSLVMLVILYSRIGRSVTDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWIFGTPLCK  
VASLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRRLTQKRHWVKFICLGIWALSUILALPI  
FIFREAYQPPYSDLVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFTRLRTLFS  
AQMGGKHRAMRVIFAVVLVFLCWLPLYNLVLIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATE  
ILGFLHSCLNPLIYVFIGQKFRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTTL
```

b) Sequência CXCR1 polimórfica contendo uma substituição de alanina por valina na posição 122 da cadeia polipeptídica, como apresentada abaixo.

```
MTIILKDLSNSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVIYALVFL  
LSLLGNSLVMLVILYSRIGRSVTDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWIFGTPLCK  
VVSLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRRLTQKRHWVKFICLGIWALSUILALPI  
FIFREAYQPPYSDLVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFTRLRTLFS  
AQMGGKHRAMRVIFAVVLVFLCWLPLYNLVLIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATE  
ILGFLHSCLNPLIYVFIGQKFRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTTL
```

4.2. Análise funcional do polimorfismo A122V na proteína CXCR1

Após a busca e seleção das sequências no programa Swiss-Prot, foi realizada a análise que prediz o efeito do polimorfismo A122V sobre a proteína CXCR1. Foram utilizadas as ferramentas SIFT (“Sorting Intolerant From Tolerant”) e PolyPhen-2 (“Polymorphism Phenotyping v2”), que prevêm o impacto de uma substituição de aminoácidos sobre a função da proteína com base na homologia de sequência e nas propriedades físicas dos aminoácidos.

4.2.1. Predição da tolerância do polimorfismo A122V sobre a proteína CXCR1 bovina por análises de SIFT

A ferramenta SIFT realiza análises na sequência de aminoácidos com base em diferentes algoritmos e interpreta as sequências homólogas utilizando o banco de dados Swiss-Prot (NG; HENIKOFF, 2003) (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>). O algoritmo SIFT prevê relações com a evolução da proteína, verificando se a substituição de aminoácidos interfere na função da proteína e no fenótipo (NG; HENIKOFF, 2003). Algumas sequências apresentam importância funcional e deverão ser mantidas num alinhamento na família de proteínas (NG; HENIKOFF, 2003). Baseado em alinhamentos múltiplos de sequências, o programa SIFT prevê substituições toleráveis e deletérias para cada posição da sequência (NG; HENIKOFF, 2003). O que irá indicar se o SNP não-sinônimo será prejudicial para a função da proteína é o índice de tolerância, se for inferior a 0,05 prediz para ser intolerante ou deletério; uma pontuação igual ou maior a 0,05 prediz para ser tolerante (KHAN; ANSARI, 2017).

A possível probabilidade de substituição dos aminoácidos gerada a partir desse programa é destacada por diferentes cores: os aminoácidos que estão representados pela cor preta são apolares, na cor verde são polares, na cor vermelha são básicos e na cor azul são ácidos (NG; HENIKOFF, 2001). Apresenta-se também um esquema de letras indicativas, sendo as letras maiúsculas correspondem aos aminoácidos que aparecem no alinhamento da sequência de entrada, enquanto as letras minúsculas resultam da predição de substituição (NG; HENIKOFF, 2001) (ANEXO 1).

4.2.2. Predição funcional do polimorfismo A122V sobre as proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica por análises no POLYPHEN-2

PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) é uma ferramenta que prediz o possível impacto de uma substituição de aminoácidos na estrutura e na função da proteína, utilizando considerações físicas e comparativos simples com perfis de conservação (ADZHUBEI et al., 2010). O cálculo da matriz dos perfis dos aminoácidos é realizado através de contagem da posição específica independente (PSIC, “position-specific independent count”). As diferenças de pontuação do PSIC caracterizam se o polimorfismo é prejudicial ou não. Essa pontuação é classificada como provavelmente prejudiciais (2,00), possivelmente prejudiciais (1,50-1,99),

potencialmente prejudiciais (1,25-1,49) ou benignas (0,00-0,99). (KHAN; ANSARI, 2017).

4.3. Predição do efeito do polimorfismo A122V sobre a estabilidade da proteína CXCR1

Para verificar a estabilidade das sequências polimórficas e não-polimórficas da proteína CXCR1, foi utilizado o programa I-Mutant 2.0 (<http://folding.uib.es/imutant/i-mutant2.0.html>). Tal algoritmo prediz automaticamente as alterações na estabilidade da proteína em função de mutações em um único local; esta ferramenta prediz o índice de confiabilidade (RI) para a mudança do aminoácido, sendo de 0-10, onde 0 corresponde a menor confiabilidade e 10 indica maior confiabilidade (BAVA et al., 2004). Prediz também sobre a mudança de energia livre (DDG) calculada subtraindo a mudança de energia livre da proteína mutante da mudança de energia livre da proteína nativa (Kcal/mol), onde valores abaixo de 0 (<0) indicam diminuição da estabilidade da proteína e valores superiores a 0 (>0) indicam aumento na estabilidade da proteína (BAVA et al., 2004). Foi inserida a sequência da proteína CXCR1 no formato FASTA juntamente com substituições de aminoácidos e a posição e a mudança de energia livre (DDG) foram obtidas. De acordo com o programa I-Mutant 2.0, quanto mais negativo o valor da mudança de energia livre (DDG), menor será a estabilidade da proteína (BAVA et al., 2004).

4.4. Análises de modelagem tridimensional das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica

Análises de predição de modelagem comparativa *in silico* das estruturas terciárias e quaternárias das proteínas CXCR1 não-polimórficas e polimórficas foram realizadas através do programa Modeller (WEBB; SALI, 2014).

Antecedendo as análises de modelagem foi realizada uma análise de identificação de possíveis peptídeos sinais na sequência da proteína CXCR1 bovina, através da ferramenta SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webfac/e2.fcgi?jobid=5A1028720000179E6B662219&wait=20>) (PETERSEN, et al., 2011). Essa análise verificou a existência de peptídeo sinal entre os 70 primeiros resíduos de aminoácidos da sequência pesquisada. Os peptídeos sinais estão localizados na extremidade N-terminal e exercem influência na função biológica das proteínas

(JARJANAZI, et al., 2007). Visto que os peptídeos sinal contêm informações que especificam a escolha da via de segmentação, a eficiência da translocação, o tempo de clivagem e até mesmo as funções pós-clivagens, sendo assim, eles podem acarretar consequências na modulação da biogênese proteica (HEGDE; BERNSTEIN, 2006). Além de conter funções clássicas de localização e translocação desses polipeptídeos do retículo endoplasmático, por exemplo no caso das GPCRs, os peptídeos sinal não clivados podem regular a expressão do receptor na membrana plasmática, bem como podem também influenciar no acoplamento da proteína G a esse receptor (SCHÜLEIN et al., 2012). Portanto, quando a sequência analisada apresentar presença de peptídeo sinal, este deverá ser removido. As análises da presença ou não do peptídeo sinal na proteína CXCR1 indicaram a ausência desse peptídeo sinal na sequência de aminoácidos de 0 até 70 nessa proteína (ANEXO 2).

4.4.1. Modelagem estrutural das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica utilizando os programas MODELLER/CHIMERA

O programa Modeller versão 9.17 (“Program for Comparative Protein Structure Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints”) é uma ferramenta de livre acesso (<https://salilab.org/modeller/>), responsável pela modelagem da estrutura comparativa das proteínas, prevendo a estrutura tridimensional de uma dada sequência de proteína com base principalmente no alinhamento de estrutura previamente conhecida (molde) (WEBB; SALI, 2014; MARTÍ-RENOM et al., 2000).

Geralmente, o processo de obtenção de um modelo proteico virtual através da execução da estratégia da modelagem molecular por homologia estrutural envolve quatro etapas principais, entre elas: busca de proteínas homólogas, alinhamento das sequências, construção e otimização dos modelos, e validação dos mesmos (HILLISCH.; PINEDAL; HILGENFELD, 2004).

O primeiro passo na modelagem comparativa é a identificação de estruturas tridimensionais já descritas e depositadas em bancos de dados, que possam atuar como uma base estrutural para a modelagem da sequência-alvo (proteína-alvo). Esta identificação pode ser realizada levando-se em consideração vários aspectos, tais como: conhecimento estrutural, similaridade de função, expressão pelo mesmo grupo de genes, similaridade sequencial ou até correlação evolutiva (DEANE; BLUNDELL, 2003).

Para realizar as análises no programa Modeller, primeiramente utilizou-se o bando de dados NCBI (“National Center for Biotechnology Information”), empregando-se a ferramenta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) para a busca da sequência da proteína CXCR1 no formato FASTA pela seleção da opção “proteína”, e em seguida foi utilizado a opção “Run blast”, selecionando-se as opções: “database protein-protein pdb” e “blasttp (protein-protein blast)”, para apresentar as opções de sequências/modelos alvos. Esse alinhamento com a ferramenta Blast forneceu opções de 74 sequências/modelos alvos (ANEXO 3), dessas opções foram escolhidos os dois modelos com maior identidade em comparação a proteína CXR1 bovina: ID PDB 2LNL referente à estrutura da CXCR1 humana em bicamada fosfolipídica (“structure of human CXCR1 in phospholipid bilayers”) com 79% de identidade; e ID PDB 5LWE referente à cristalografia do receptor quimiocina CC humana do tipo 9 CCR9 em complexo com vercinon (Crystal structure of the human CC chemokine receptor type 9 (CCR9) in complex with vercinon), com 37% de identidade. De acordo com Vitkup et al. (2001), modelos estruturais baseados em >30-35% de identidade de sequência tendem a ter alinhamentos razoavelmente baixos e erros estruturais, enquanto a identidade de sequência mais alta geralmente permite correlacionar diferenças na função em famílias de proteínas com variações estruturais. Neste contexto, os modelos baseados em pelo menos 30% de identidade de sequência são considerados “razoavelmente precisos” (VITKUP et al., 2001). Foram realizados alinhamentos de sequências múltiplas entre a sequência de entrada CXCR1 e as duas opções de sequências-alvo 2LNL e 5LWE, utilizando a ferramenta T-COFFE (<http://tcoffee.org.cat/apps/tcoffee/do:tmcoffee>). O software PSI/TM-Coffee realiza alinhamentos de sequências múltiplas de proteínas combinando extensão de homologia com uma abordagem de alinhamento baseada em consistência, onde a extensão da homologia é realizada através de buscas de “Position Specific Iterative” (PSI) contra uma escolha de bancos de dados redundantes e não-redundantes pela ferramenta BLAST (FLODEN et al., 2016). Neste alinhamento foi possível identificar 102 aminoácidos idênticos na mesma posição das 3 sequências analisadas, representando uma identidade de 33,66% entre elas (ANEXO 4).

O programa de banco de dados PDB (Protein Data Bank) foi utilizado para baixar os modelos alvos (“templates” 2LNL A e 5LWE A), esses modelos foram utilizados para modelagem no programa Modeller, seguindo o passo-a-passo descrito no tutorial, (<https://salilab.org/modeller/tutorial/basic.html>). As análises no

programa Modeller geraram cinco opções de modelos tridimensionais (3D) para cada sequência, foi selecionado o modelo com menor valor de DOPE, que o classifica como um melhor modelo dentre os gerados (Figura 2.)

Figura 2. Parâmetros avaliativos da análise dos modelos alvos gerados a partir do programa Modeller.

```
>> Summary of successfully produced models:
Filename                molpdf      DOPE score   GA341 score
-----
cxc1.B99990001.pdb      2094.37012  -35260.26953  0.99897
cxc1.B99990002.pdb      2047.95056  -35932.75781  0.99709
cxc1.B99990003.pdb      1897.92322  -35737.28125  0.99451
cxc1.B99990004.pdb      2020.39185  -35399.82031  0.99946
cxc1.B99990005.pdb      2178.14990  -36056.46094  0.99848

Total CPU time [seconds] : 151.39

>> Summary of successfully produced models:
Filename                molpdf      DOPE score   GA341 score
-----
cxc1p.B99990001.pdb     2054.92041  -35337.50391  0.99997
cxc1p.B99990002.pdb     2059.75488  -36009.25000  0.99877
cxc1p.B99990003.pdb     2097.88403  -35282.07813  0.99611
cxc1p.B99990004.pdb     1973.84290  -35699.90625  0.99623
cxc1p.B99990005.pdb     1961.69702  -35712.73438  0.99333

Total CPU time [seconds] : 162.95
```

Em seguida, foram analisados os modelos estruturais gerados pelo Modeller, utilizando o programa Chimera. O programa Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>) é altamente extensível para visualização e análise interativa de estruturas moleculares e dados relacionados, incluindo mapas de densidade, montagens supramoleculares, alinhamentos de sequências, resultados de ancoragem, trajetórias e conjuntos conformacionais gerando imagens e animações de alta qualidade. No programa Chimera foram analisados os dois modelos em formato PDB selecionados acima quanto às distâncias entre resíduos de aminoácidos anteriores (posição 121) e posteriores (posição 123) em relação a posição 122 nas sequências das proteínas CXCR1 polimórfica e não-polimórfica. Ainda, tal programa computacional foi empregado para realizar alinhamentos sobrepostos das duas estruturas tridimensionais das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica, permitindo a comparação de similaridades e

diferenças entre duas proteínas ou duas conformações diferentes de uma mesma proteína. O Chimera procurar alinhar duas estruturas, de forma que o maior número de pontos em comum fique sobreposto.

4.5. Avaliação da qualidade dos modelos tridimensionais preditos para a proteína CXCR1 não-polimórfica e polimórfica

4.5.1. Análise da qualidade da modelagem através da ferramenta QMEANBrane

QMEANBrane (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>) é uma versão do QMEAN desenvolvida para avaliar a qualidade local dos modelos tridimensionais de proteínas, especialmente os modelos preditos a partir de sequências de proteínas sabidamente transmembranares (STUDER; BIASINI; SCHWEDE, 2014). A ferramenta QMEANBrane emprega potenciais avaliativos específicos analisados a partir de três segmentos diferentes (membrana, interface e porção solúvel) em um modelo de proteína transmembranar (STUDER; BIASINI; SCHWEDE, 2014). Tais potenciais são aplicados somente nas pontuações locais situados em um intervalo de 0 a 1, sendo 1 considerado um valor satisfatório/bom. Além disso, os escores QMEAN4 e QMEAN6 avaliam as estruturas experimentais, sendo o escore QMEAN4 uma combinação linear de quatro termos de potencial estatístico, já o escore QMEAN6 usa dois termos que avaliam a consistência de características estruturais com previsões de sequências (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2010). Para a normalização, os escores QMEAN de um modelo são comparados às distribuições obtidas a partir de estruturas de alta resolução resolvidas por cristalografia de raios-X (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2010). O resultado de "QMEAN Z-score" fornece uma estimativa do "grau de natureza" das características estruturais observadas em um modelo e indica se o modelo é de qualidade comparável às estruturas experimentais (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2010). Os Z-escores dos termos individuais da função de pontuação indicam quais características estruturais de um modelo exibem desvios significativos do comportamento "nativo" esperado. De acordo com Benkert et al. (2010), o maior Z-escore QMEAN significa melhor concordância com características preditas e energia potencial de força média mais baixa.

Para estimativa da qualidade dos modelos preditos também foram utilizados os seguintes parâmetros: solvatação “solvation”, torção “torsion”, todos átomos “all atom” e C-β. O parâmetro de solvatação refere-se à propensão de um determinado resíduo para uma dada acessibilidade ao solvente em comparação com qualquer outro resíduo (MELO; SANCHEZ; SALI, 2003). O parâmetro de torção está relacionado ao potencial de ângulo de torção de um único resíduo e reflete a propensão de um determinado resíduo para uma dada torção em comparação com qualquer outro resíduo (TOSATTO, 2005). O parâmetro referente a todos átomos indica que as interações em pares são consideradas entre todos os átomos pesados quimicamente distinguíveis (STUDER; BIASINI; SCHWEDE, 2014). O parâmetro de C-β avalia a dobra geral apenas considerando interações em pares entre C-β e a posições dos 20 aminoácidos padrão; no caso de glicina, um representante do C-β, sua posição é construída usando seu eixo dorsal como âncora (STUDER; BIASINI; SCHWEDE, 2014).

Especialmente, a qualidade dos modelos gerados a partir de proteínas transmembranares deve ser executada empregando a QMEANBrane. Assim, os dois modelos das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica foram analisados inicialmente adicionando-se os arquivos dos modelos gerados em formato PDB, em seguida selecionou-se o método (QMEANBrane) para execução das análises. Os resultados foram obtidos através de gráficos destacados por esquema de cores. A cor azul indica maior proximidade ao N-terminal, bem como alta qualidade e alta correlação, bem como a presença de resíduos menos hidrofóbicos. Já a cor vermelha indica maior proximidade ao C-terminal, menor qualidade com presença de resíduos mais hidrofóbicos (KELLEY; STERNBERG, 2009; BENNETT-LOVSEY, et al., 2007).

4.5.2. Avaliação da qualidade estrutural dos modelos preditos das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica pelo programa RAMPAGE

A avaliação estereoquímica dos modelos estruturais foi realizada pela ferramenta RAMPAGE com a construção do diagrama de Ramachandran (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>), que permite a avaliação dos ângulos de torção “phi” ϕ e “psi” ψ , como o intuito de encontrar conformações estáveis, estes podem ser classificados em regiões favoráveis, permitidas e não permitidas (LOVELL et al., 2003). Portanto, quando dois átomos estão ocupando o mesmo

espaço no mesmo tempo, ocorre a colisão estérica, ocasionando uma desorganização e esses resíduos ficam localizados em uma região proibida/não favorável (LOVELL et al., 2003). As regiões não permitidas geralmente envolvem impedimento estérico entre o grupo metileno C- β da cadeia lateral e os átomos da cadeia principal. A glicina tem apenas um átomo de hidrogênio para sua cadeia lateral e, portanto, pode adotar ângulos " ϕ " e " ψ " nos quatro quadrantes do diagrama de Ramachandran. Por isso, ocorre frequentemente, por sua vez, regiões de proteínas onde qualquer outro resíduo seria estericamente impedido (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008). Em contraste, o aminoácido prolina com sua cadeia lateral de anel de 5 membros, conectando C α à cadeia principal-N, mostra um número limitado de combinações possíveis de ψ e ϕ (ANDERSON et al., 2005; TING et al., 2010). Uma estrutura com $\geq 90\%$ de seus resíduos nas regiões mais favorecidas de Ramachandran é considerada tão precisa como uma estrutura cristalina de resolução 2Å (LASKOWSKI et al., 1996). Nos casos em que a estrutura de raios-X da proteína não foi adequadamente refinada, e especialmente para modelos de homologia incorretos ou errados, os ângulos de torção são encontrados nas regiões não permitidas da trama de Ramachandran e esse tipo de desvio geralmente indica problemas com a estrutura (AL-KARADAGHI, 2017).

As interações das cadeias dos polipeptídios descrevem sua rotação em torno das ligações entre N-C α (ϕ) e C α -C (ψ) (AL-KARADAGHI, 2017). O diagrama de Ramachandran fornece uma maneira fácil de verificar a distribuição de ângulos de torção em uma estrutura proteica (AL-KARADAGHI, 2017). Ele também fornece uma visão geral das regiões excluídas, mostrando quais rotações do polipeptídio não são permitidas devido ao impedimento estérico (colisões entre átomos) (AL-KARADAGHI, 2017). O diagrama de Ramachandran gerado a partir de uma determinada proteína pode também servir como um indicador importante da qualidade de suas estruturas tridimensionais (AL-KARADAGHI, 2017).

Os ângulos de torção " ϕ " e " ψ " fornecem a flexibilidade necessária para o esqueleto do polipeptídio para adotar certo dobramento, uma vez que o terceiro ângulo de torção possível dentro da cadeia principal da proteína (chamado ômega, ω) é essencialmente plano e fixado em 180 graus (AL-KARADAGHI, 2017). O ângulo de torção entre o nitrogênio e o carbono alfa é chamado de " ϕ " ϕ ; já o ângulo de torção entre o carbono alfa e a carbonila é chamado de " ψ " ψ (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008). Sabendo-se que os resíduos que se encontram entre

($\phi = 90^\circ$ e $\psi = -90^\circ$) são considerados não-favorecidos (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008).

O diagrama de Ramachandran apresenta variações de cores representadas por regiões no gráfico, as áreas sombreadas em azul-escuro refletem as conformações que não envolvem superposição estérica e, portanto, são inteiramente permitidas (designada de alfa e beta-helicoidal), correspondentes a conformações em que átomos de polipeptídeo se aproximam da soma de “van der Waals”. (LEHNINGER, 2006) As regiões na cor azul-médio correspondem a conformações permitidas em limites extremos de contatos atômicos desfavoráveis. (LEHNINGER, 2006). As áreas de coloração azul-claro refletem conformações que são permitíveis, quando uma pequena flexibilidade é permitida aos ângulos da ligação (regiões não-permitidas) (LEHNINGER, 2006). As conformações julgadas possíveis são aquelas que envolvem pouca ou nenhuma interferência estérica, com base em cálculos usando raios de van der Waals conhecidos e os ângulos das ligações (LEHNINGER, 2006).

4.6. Interação e correlação da proteína CXCR1 bovina com outras proteínas

Para correlacionar a interação funcional da proteína em estudo com outras proteínas, foi utilizado o banco de dados STRING v.10.5 (“Search Tool for Recurring Instances of Neighbouring Genes”) através do site de livre acesso (<http://string-db.org/>). Foi realizada uma pesquisa no banco de dados do site da STRING referente à proteína CXCR1. Esta ferramenta realiza pesquisa on-line em um banco de dados de interação com genes; fornece uma pontuação de confiança, referente ao domínio na estrutura tridimensional da proteína, modelos de homologia, atualizações de dados extensas e conectividade e integração com recursos de terceiros (SZKLARCZYK et al., 2016).

Para cada associação proteína-proteína armazenada no servidor STRING é fornecida uma pontuação (score), representada por uma escala de confiança com pontuação mínima e máxima entre zero (0) e um (1), respectivamente, indicando a probabilidade estimada de que uma dada interação seja biologicamente significativa, específica e reprodutível (SZKLARCZYK, et al., 2016). Na interface gráfica gerada pelo programa STRING a rede de interações das proteínas apresenta os canais de evidências delimitados por traços em diferentes cores: interações conhecidas a partir

de bancos de dados com curadoria são apresentadas na cor azul claro e interações determinadas experimentalmente são apresentadas na cor rosa. Também é possível verificar a presença de interações preditas como genes aproximados na cor verde escura; genes associados funcionais na cor vermelha e a co-ocorrência entre genes na cor azul escuro. Também foram destacadas outras opções, tais como: “textmining”, mineração de texto na cor verde claro; “co-expressão” na cor preta e proteína homóloga na cor lilás (SZKLARCZYK, et al., 2016).

4.6.1. Análise do mapeamento da proteína CXCR1 utilizando o software KEGG PATHWAYS.

O banco de dados do KEGG PATHWAY é uma coleção de diagramas gráficos desenhados manualmente, denominados mapas de vias metabólicas KEGG, que representam vias moleculares para o metabolismo, processamento de informações genéticas, processamento de informações ambientais, outros processos celulares, doenças humanas e desenvolvimento de drogas (KANEHISA et al., 2011). Esta ferramenta é um recurso de banco de dados integrado, onde as suas análises são realizadas através de procedimentos que envolvem informações cruzadas das espécies para ligar o genoma às redes moleculares através do sistema de Ortopedia KEGG, permitindo a integração e interpretação de conjuntos de dados em grande escala (KANEHISA et al., 2011).

Para obtenção dos diagramas de ligações de interações moleculares, através do mapeamento (“Pathway Mapping”), foi submetido à pesquisa o prefixo da espécie em estudo e a proteína subsequente da espécie sem abreviações, e na sequência apareceram os resultados referentes as interações dessa proteína a demais proteínas-alvos “Cytokine-cytokine receptor interaction, Bos taurus (cow)”, demonstrando o detalhado do mapeamento interativo (“http://www.kegg.jp/keggbin/highlight_pathway?scale=1.0&map=bta04060&keyword=cxcr1%20bos%20taurus”).

5. RESULTADOS

5.1. Análise funcional do polimorfismo A122V na proteína CXCR1

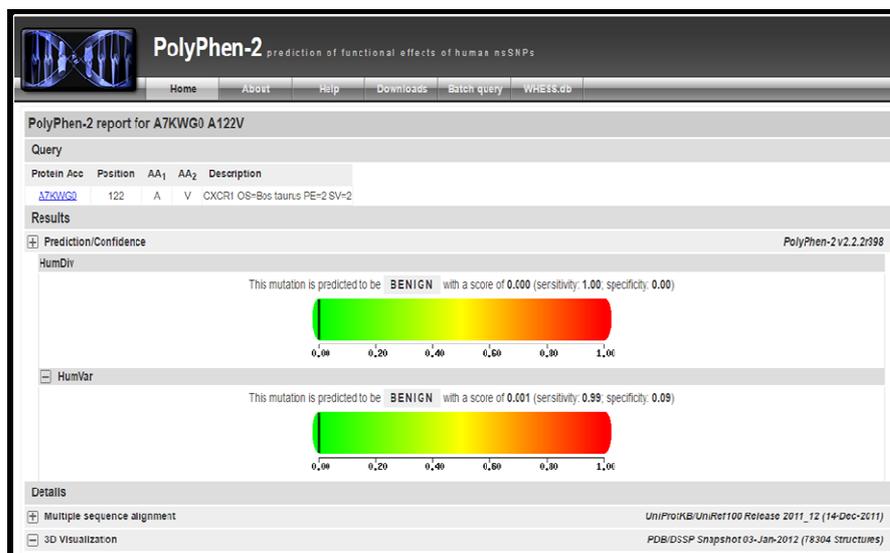
5.1.1. Predição para a tolerância do polimorfismo A122V da proteína CXCR1 através da ferramenta SIFT

Através da ferramenta SIFT foi possível prever o efeito do polimorfismo A122V sobre a análise funcional da proteína CXCR1, indicando que o polimorfismo A122V não apresentou alterações à funcionalidade normal dessa proteína, visto que o resultado encontrado foi “tolerável” com valor da fração de sequências que contém um aminoácido básico ou “seq rep” de 0,94 e valor de escore de probabilidade de tolerância de 0,56 para a substituição por valina (ANEXO 1).

5.1.2. Predição do efeito do polimorfismo A122V sobre a função da proteína CXCR1 utilizando a ferramenta Polyphen-2

O impacto da substituição do aminoácido alanina por valina A122V na função da proteína CXCR1 por análises PolyPhen-2 demonstrou ser "benigno" com valores de escore de 0,000 em nível de divergência (sensibilidade 1,00 e especificidade 0,00) e e 0,001 em nível de variação (sensibilidade 0,99 e especificidade 0,09). Comprovando assim, que o polimorfismo A122V não acarretou prejuízos/não-deletério à função da proteína CXCR1 bovina (Figura 3.).

Figura 3. Predição do efeito do polimorfismo A122V sobre a função da proteína CXCR1 bovina.



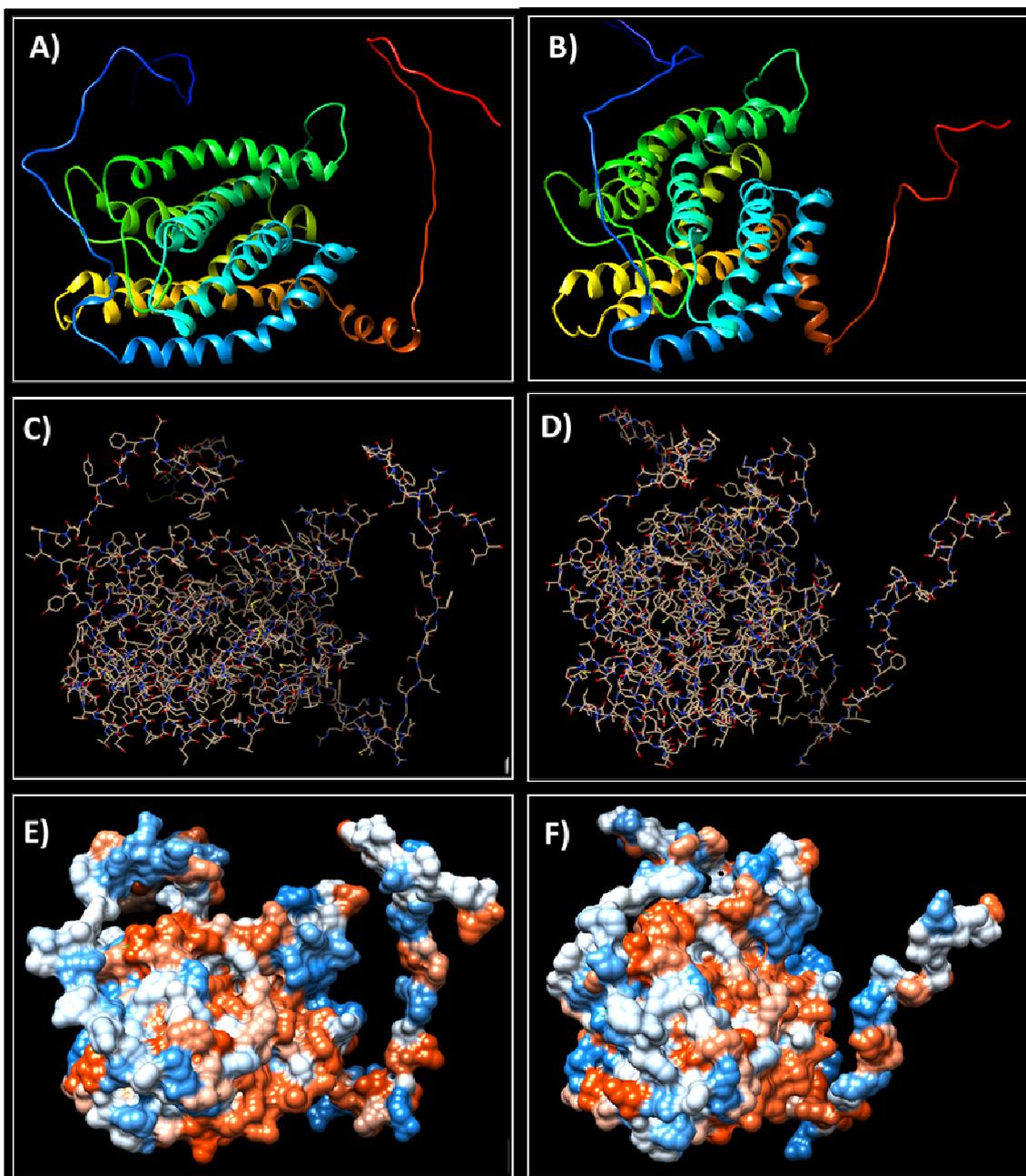
5.2. Predição do efeito do polimorfismo A122V sobre a estabilidade da proteína CXCR1

Análises empregando o programa I-Mutant 2.0 demonstraram que o polimorfismo A122V não alterou a estabilidade da proteína CXCR1. A proteína permaneceu estável em um nível de confiabilidade (RI) de 3 (ANEXO 5A) e com valor de mudança de energia livre (DDG) de 0,28 (ANEXO 5B), indicando maior estabilidade e efeito não-deletério deste nsSNP na estrutura e função da proteína CXCR1 polimórfica.

5.3. Predição das alterações estruturais das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica

As ferramentas Modeller v.9.17 foram utilizadas para analisar se o polimorfismo A122V acarretou alguma alteração na estrutura das proteínas CXCR1 polimórfica e não-polimórfica. Os modelos estruturais preditos para as proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica revelaram estruturas espaciais tridimensionais típicas de um polipeptídeo receptor transmembranar, produzindo um padrão característico de ondas que refletem estruturas helicoidais com quebras nas ondas correspondendo a terminais ou torções de hélice (Figura 4). Os modelos tridimensionais das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica foram gerados nas seguintes conformações: formato em fita (“ribbons”) das sequências não-polimórfica e polimórfica (Figura 4A e B, respectivamente); formato de esfera e bastão (“all atoms”) das sequências não-polimórfica e polimórfica (Figura 4C e D, respectivamente); formato compactado (“hydrophobicity surface”) das sequências não-polimórfica e polimórfica (Figura 4E e F, respectivamente). A sequência de aminoácidos é lida da extremidade N-terminal (resíduos iniciais) para o C-terminal (resíduos finais), e a estrutura terciária apresentada pela conformação em fita está destacada nas cores padrões de um arco-íris (azul, ciano, verde, amarelo e vermelho) nessa ordem, sem obedecer a critérios específicos para colorir os resíduos. Portanto, o N-terminal está representado pela cor azul e o C-terminal pela cor vermelha (Figura 4A e B). Ainda, é preciso destacar que os resíduos na coloração vermelha e azul marcam os pares de resíduos que apresentam as maiores variações de distância nas duas conformações.

Figura 4. Modelos tridimensionais da proteína CXCR1. A e B: formato em fita (“ribbons”) das sequências não-polimórfica e polimórfica, respectivamente. C e D: formato de esfera e bastão (“all atoms”) das sequências não-polimórfica e polimórfica, respectivamente. E e F: formato compactado (“hydrophobicity surface”) das sequências não-polimórfica e polimórfica, respectivamente.



O alinhamento sobreposto das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica demonstrou diferenças no padrão de modelagem nas extremidades C-terminal e N-terminal entre os modelos analisados (Figura 5). Embora o sítio alvo na posição A122V aparentemente demonstra não ter sofrido grandes alterações (destaque em cor verde na Figura 5).

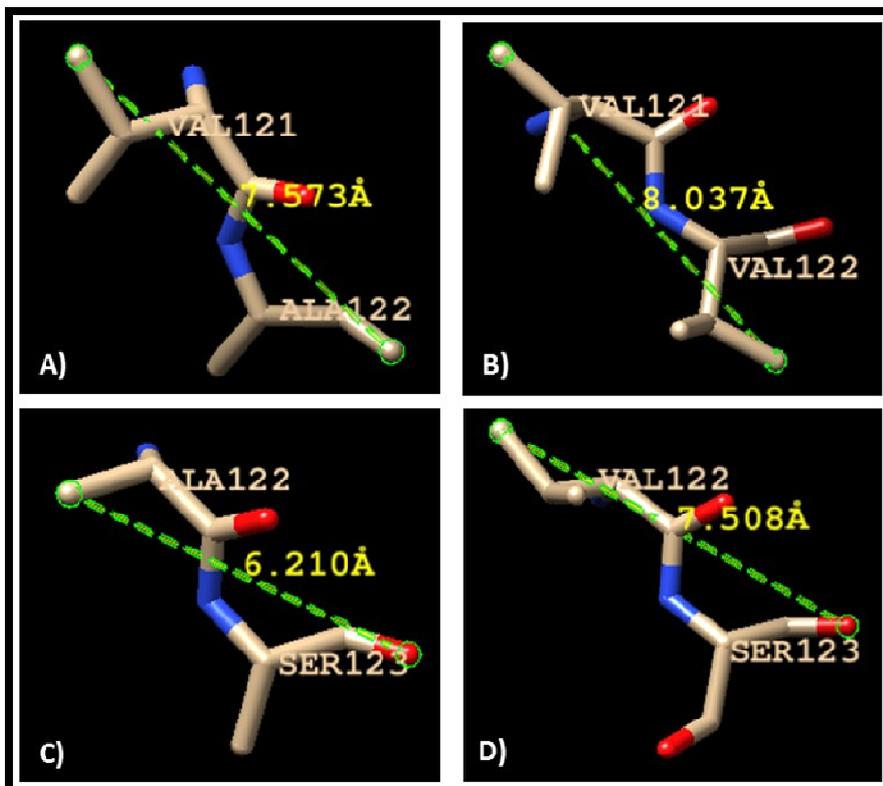
Figura 5. Alinhamento e sobreposição das estruturas tridimensionais das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica.



*Cor cinza (proteína CXCR1 não-polimórfica); cor azul (proteína CXCR1 polimórfica); destacado na cor verde a posição alvo (A122V).

Foram encontradas as diferenças nas distâncias entre os pares de resíduos de aminoácidos na posição Val121 e Ala122 na CXCR1 não-polimórfica de 7,573Å (Figura 6A), enquanto para mesma posição Val121 e Val 122 na CXCR1 polimórfica foi verificado o valor de 8,037Å (Figura 6B), sendo assim, a diferença entre as distâncias entre as duas proteínas de 5,77% (0,464Å). Analisando a distância entre os resíduos de aminoácidos na posição Ala122 e Ser123, foram encontrados valores de 6,210Å para a CXCR1 não-polimórfica (Figura 6C) e 7,508Å para a CXCR1 polimórfica (Figura 6D), verificando-se uma diferença entre tais distâncias de 17,28% (1,298Å).

Figura 6. Distâncias entre o par de resíduos de aminoácidos nas posições 121, 122 e 123 em função do polimorfismo A122V nas proteínas CXCR1 não-polimórfica (A e C) e polimórfica (B e D).



* (A) Distância entre valina (posição 121) e alanina (122), 7,573Å;(B) Distância entre valina (posição 122) e valina (121), 8,037Å; (C) Distância entre alanina (posição 122) e serina (123), 6,210Å;(D) Distância entre valina (posição 122) e serina (123), 7,508Å.

5.4. Validação dos modelos tridimensionais preditos a partir da sequência das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica

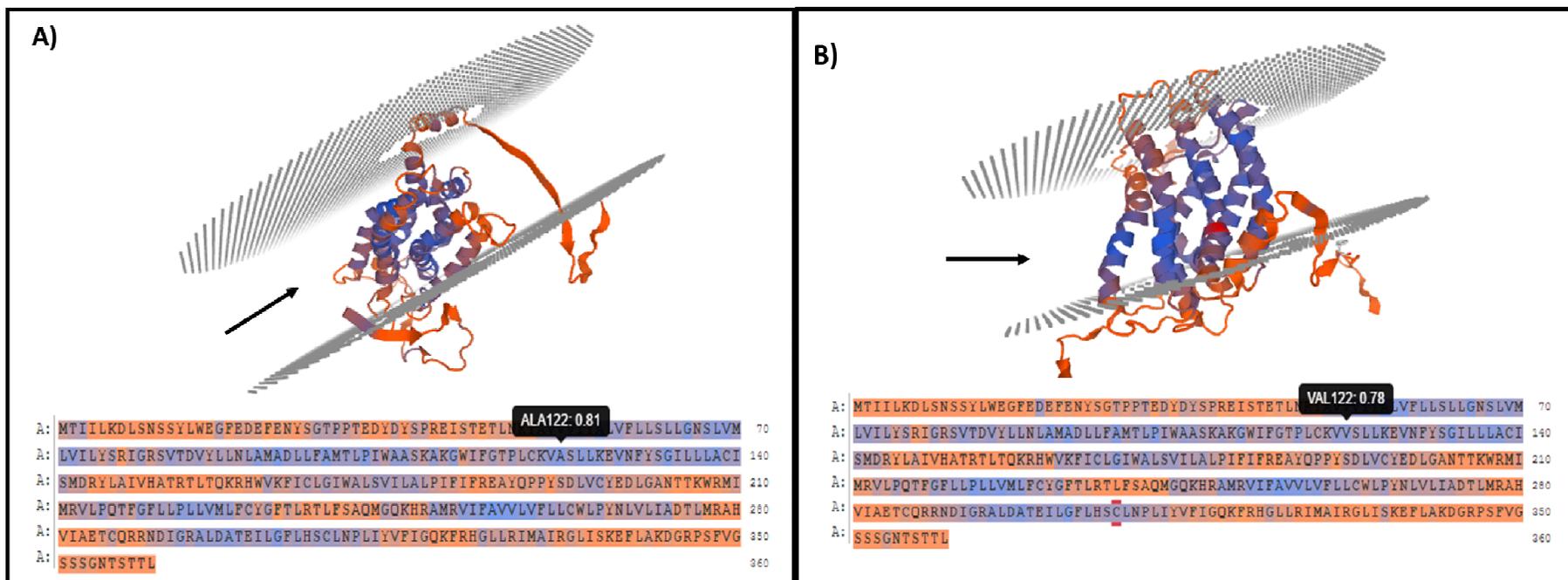
A validação da modelagem é uma etapa muito importante para a predição estrutural das proteínas. Para a validação estrutural dos modelos preditos para as proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica foram utilizados os programas QMEANBrane e RAMPAGE com a obtenção de diagramas de Ramachandran.

5.4.1. Validação dos modelos tridimensionais preditos a partir do programa QMEANBrane

O modelo tridimensional estrutural predito a partir das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica revelou estruturas espaciais tridimensionais em alfa-hélice típica de um polipeptídeo receptor transmembranar (Figura 7). A conformação de

modelagem para ambas as proteínas produziu um padrão característico semelhante a ondas que reflete a estrutura helicoidal, com quebras nas ondas correspondentes a terminações em hélices ou torções (Figura 7). Especialmente, a substituição pontual dos aminoácidos de alanina por valina na posição 122 revelou escores de qualidade local de 0,81 para as proteínas não-polimórfica (Figura 7A) e 0,78 para a polimórfica (Figura 7B), ambas situadas em uma posição altamente conservada e rica em resíduos hidrofóbicos.

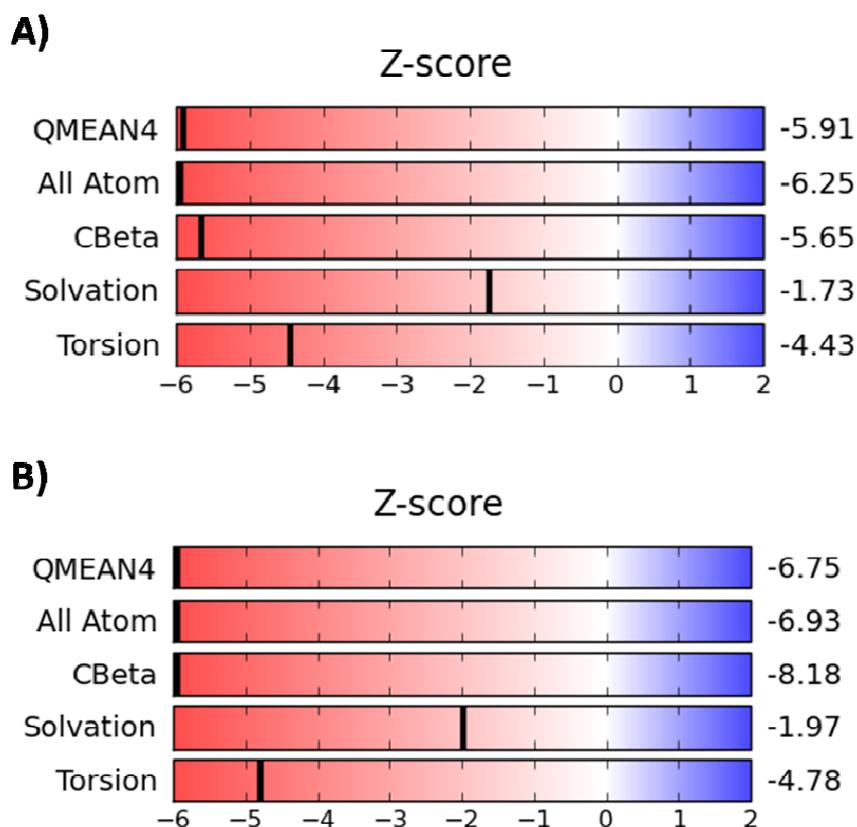
FIGURA 7. Validação da qualidade dos modelos preditos pela ferramenta QMEANBrane. Estrutura tridimensional e cadeia linear apresentando os resíduos de aminoácidos da proteína CXCR1 não-polimórfica (A) polimórfica (B).



*Cor azul indica maior proximidade ao N-terminal, bem como alta qualidade local e rica em de resíduos hidrofóbicos. A cor vermelha indica maior proximidade ao C-terminal, menor qualidade local e maior presença de resíduos hidrofílicos.

Parâmetros avaliativos gerados através da análise do QMEANBrane entre os modelos tridimensionais das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica são apresentados na Figura 8. A estimativa dos valores de Z-escores QMEAN4 e QMEAN6 para a proteína CXCR1 não-polimórfica foi de -5,91 e -4,97, respectivamente. Nesta perspectiva, o modelo predito para a sequência polimórfica da proteína CXCR1 demonstrou valores de Z-escores QMEAN4 e QMEAN6 de -6,75 e -5,44, respectivamente. As interações entre todos os átomos pesados quimicamente distinguíveis na estrutura secundária local foram -6,25 e -6,93 para CXCR1 não-polimórfica e polimórfica, respectivamente, bem como valores de interações entre as posições C- β dos 20 aminoácidos padrões, em particular glicina, foram -5,65 e -8,18 para os modelos CXCR1 não-polimórficos e polimórficos preditos, respectivamente. A solvatação calculada pela contagem de átomos circundantes em torno de todos os átomos pesados quimicamente distinguíveis que não pertencem ao próprio resíduo analisado foi de -1,73 para CXCR1 não-polimórfica e -1,97 para o modelo de CXCR1 polimórfico. Os ângulos de torção ϕ / ψ centrais de três aminoácidos consecutivos com base na identidade dos aminoácidos envolvidos foram de -4,43 e -4,78 para os modelos CXCR1 não-polimórfico e polimórfico preditos, respectivamente. Com base nos parâmetros avaliativos acima descritos, em particular os valores de QMEAN4 e QMEAN6, esses achados indicam que os modelos 3D preditos das sequências da proteína CXCR1, particularmente a sequência polimórfica, apresentou baixa qualidade local de modelagem devido a baixos escores fortemente negativos obtidos a partir desses modelos.

Figura 8. Parâmetros avaliativos da qualidade dos modelos tridimensionais preditos para as proteínas CXCR1 não-polimórfica (A) e polimórfica (B) gerados pelo programa QMEANBrane.



5.4.2. Por análises dos diagramas de Ramachandran através do programa RAMPAGE.

Os resultados utilizando o diagrama de Ramachandran revelaram que dos 360 resíduos identificados, 334 (93,3%) estavam situados em regiões favoráveis, 17 (4,7%) estavam em regiões permitidas e 07 (2%) estavam em regiões não-permitidas, provando que o modelo tridimensional predito para a proteína CXCR1 não-polimórfica é satisfatoriamente aceitável (Tabela 1, Figuras 9A e 10A, ANEXO 6A).

Os resultados utilizando o diagrama de Ramachandran revelaram que dos 360 resíduos identificados, 330 resíduos (92,2%) estavam situados em regiões favoráveis, 21 (5,8%) estavam em regiões permitidas e 07 (2%) estavam em regiões

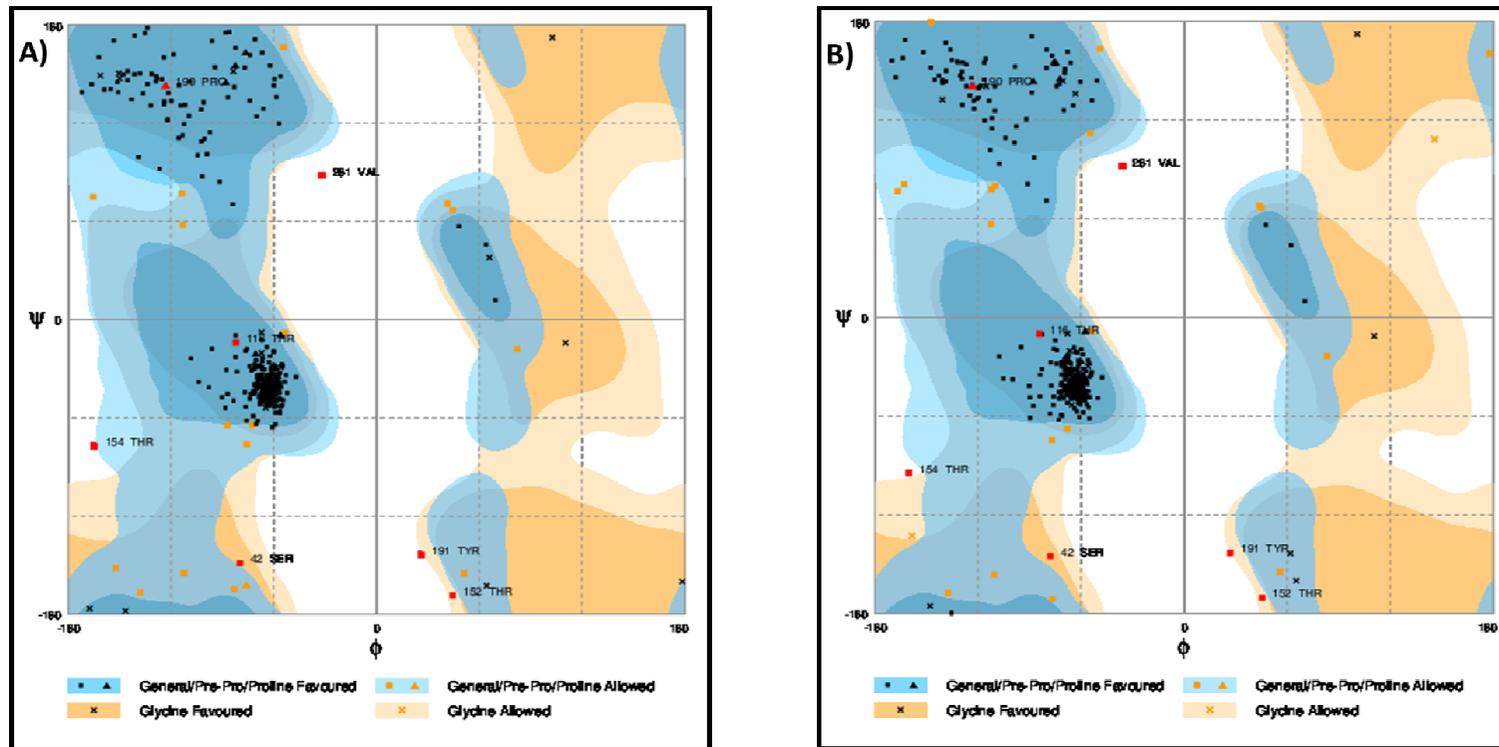
não-permitidas, provando que o modelo predito para a proteína CXCR1 polimórfica também é satisfatoriamente aceitável (Tabela 1, Figuras 9B e 10B, ANEXO 6B).

Tabela 1. Número e porcentagem dos resíduos distribuídos nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas a partir dos modelos da proteína CXCR1 não-polimórfica (n-p) e polimórfica (p) por análises do diagrama de Ramachandran.

Modelo	Regiões favoráveis		Regiões permitidas		Regiões não-permitidas	
	Nº resíduo	% resíduo	Nº resíduo	% resíduo	Nº resíduo	% resíduo
CXCR1 n-p	334	93,3	17	4,7	07	2,0
CXCR1 P	330	92,2	21	5,8	07	2,0

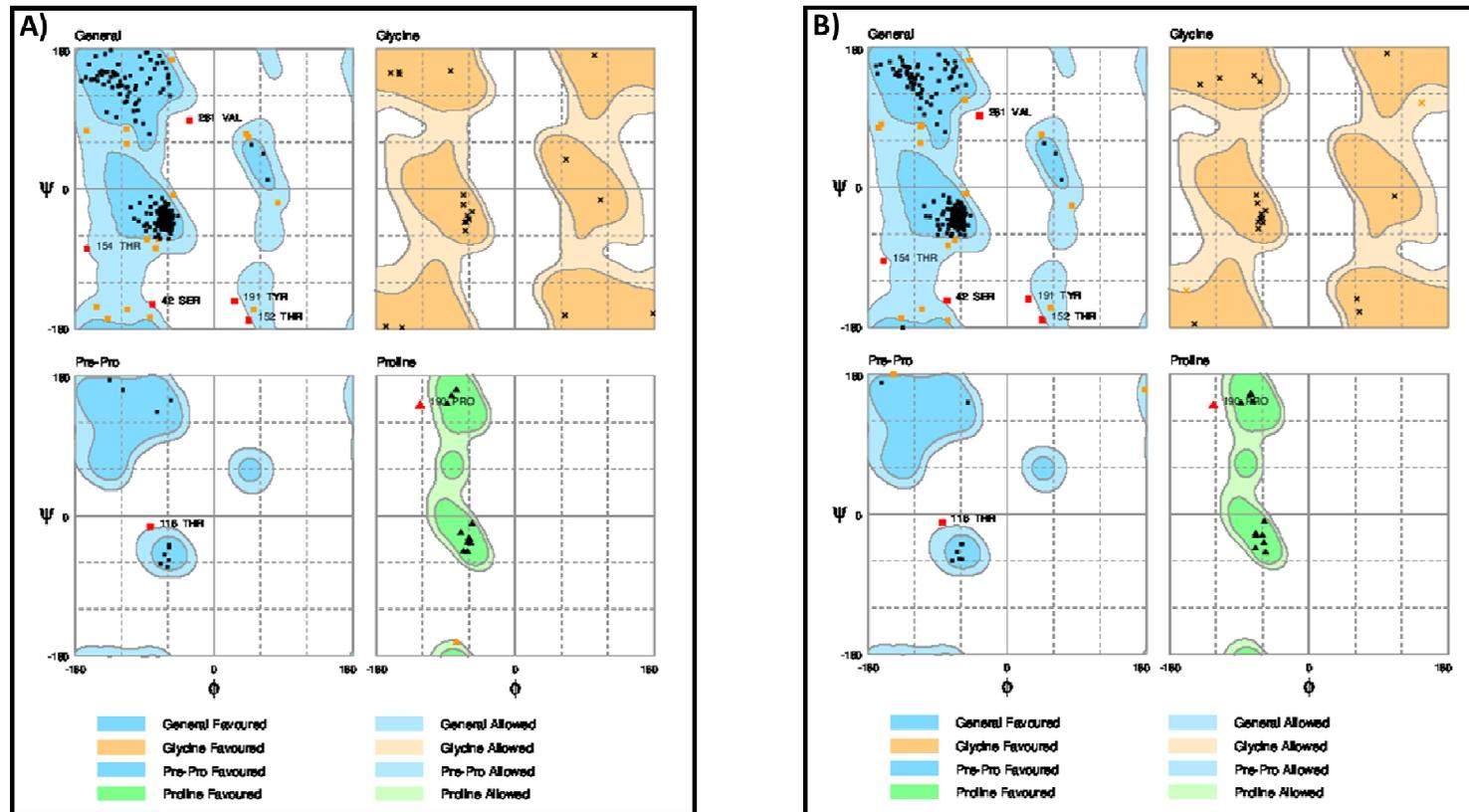
* O número total de resíduos de aminoácidos na proteína CXCR1 é 360 aminoácidos.

Figura 9. Representação gráfica do diagrama de Ramachandran gerada a partir das proteínas CXCR1 com os ângulos de restrições em cada parcela e seus elementos estruturais secundários nos quadrantes α -hélice e β -conformação gerada pela ferramenta RAMPAGE. Proteínas CXCR1 não-polimórfica (A) e polimórfica (B).



* Resíduos de pré-prolina e prolina identificados em quadrados e triângulos na cor preta com sombreamento de azul mais intenso estão presentes em regiões favoráveis. Resíduos de pré-prolina e prolina identificados em quadrados e triângulos na cor laranja com sombreamento azul menos intenso estão em regiões permitidas. Resíduos de glicina identificados em asterisco na cor preta com sombreamento na cor laranja mais intenso estão em regiões favoráveis. Resíduos de glicina identificados em asterisco na cor laranja com sombreamento em laranja menos intenso estão presentes em regiões permitidas. O eixo horizontal mostra valores ϕ , enquanto a vertical mostra valores ψ . Cada ponto no diagrama mostra os ângulos para um aminoácido. Observe que a contagem começa no canto esquerdo de -180 e se estende a +180 para os eixos vertical e horizontal; permitindo uma distinção clara das regiões caracterizadas por α -hélices e β -conformações.

Figura 10. Diagrama de dispersão dos resíduos de glicinas, pré-prolina e prolina dos modelos da proteína CXCR1 não-polimórfica (A) e polimórfica (B) em regiões favoráveis e permitidas.



*Diagrama de dispersão sobreposto em gráfico demonstrado às regiões favorecidas e permitidas dos resíduos de glicina, pré-prolina e prolina representados por diferentes cores. As propensões específicas para glicina, pré-prolina e prolina são analisadas em parcelas separadas do diagrama de Ramachandran. Os resíduos de glicina que estão nas regiões favoráveis aparecem destacados na cor laranja mais intensa. Os resíduos de pré-prolina que estão nas regiões favoráveis aparecem destacados na cor azul mais intensa. Os resíduos de prolina que estão nas regiões favoráveis aparecem destacados na cor verde mais intensa. Os resíduos de glicina que estão nas regiões permitidas aparecem destacados na cor laranja menos intensa. Os resíduos de pré-prolina que estão nas regiões permitidas aparecem destacados na cor azul menos intensa. Os resíduos de prolina que estão nas regiões permitidas aparecem destacados na cor verde menos intensa.

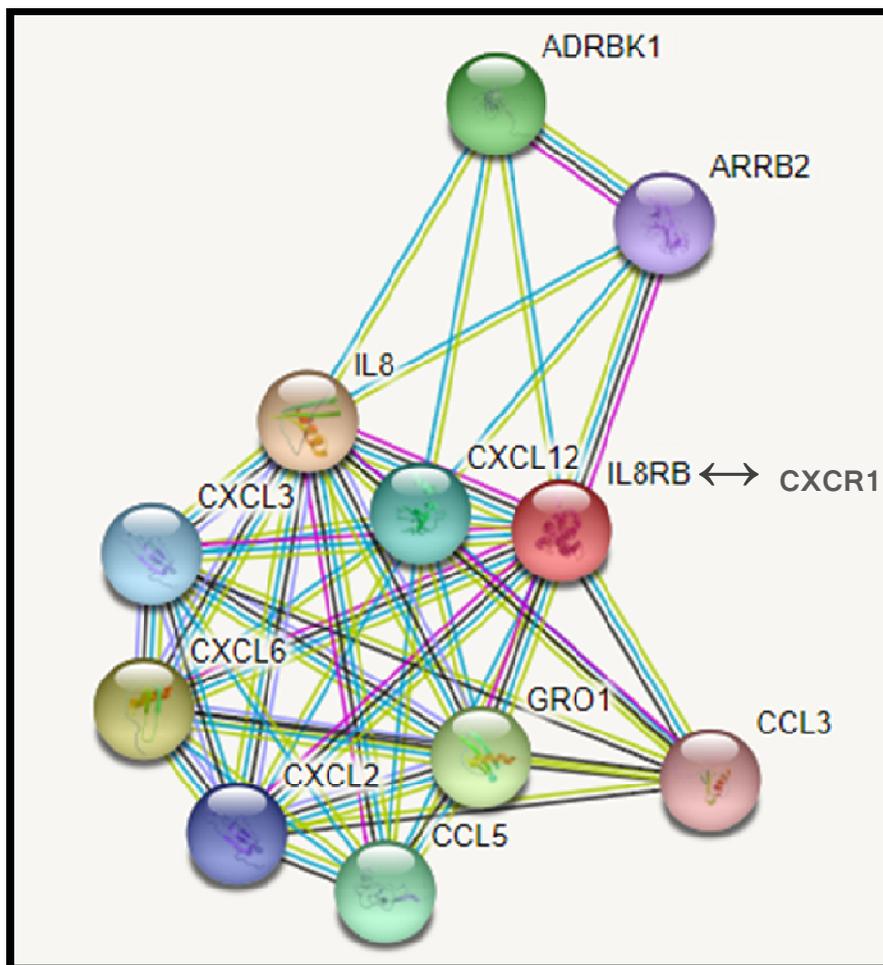
5.5. Rede de interações e correlações da proteína CXCR1 com demais proteínas

De acordo com o resultado obtido pelo banco de dados STRING, foi possível verificar que essa ferramenta ainda não apresenta disponibilidade da sequência da proteína CXCR1 bovina. Então, tais análises foram realizadas a partir da proteína receptora de quimiocina CXC do tipo 2 bovina (“C-X-C chemokine receptor type 2”), designada IL8RB, que apresenta-se altamente similar a sequência de interesse.

Através desta ferramenta foi possível identificar a correlação e interação da proteína IL8RB com outras 10 proteínas (Figura 11, Tabela 2): interleucina-8 IL-8 (“Interleukin-8”); domínio da quimiocina CXCL6 (“C-X-C motif chemokine 6”); proteína reguladora de crescimento beta GRO1 homóloga (“Growth-regulated protein homolog beta”); receptor beta-adrenérgico quinase 1 ADRBK1 (“Beta-adrenergic receptor kinase 1”); domínio da quimiocina CC 5 CCL5 (“C-C motif chemokine 5”); precursor 1 do fator derivado das células estromais CXCL12 (“Stromal cell-derived factor 1 precursor”); precursor do ligante 2 da quimiocina CXCL3 (“Chemokine C-X-C motif ligand 2 precursor”); proteína reguladora do crescimento homóloga gama CXCL2 (“Growth-regulated protein homolog gamma”); Beta-arrestina-2 ARRB2 (“Beta-arrestin-2”); precursor-3 do domínio da quimiocina - C 3 CCL3 (“-C motif chemokine 3 precursor”) (ANEXO 7).

Os escores obtidos a partir das interações da proteína de interesse IL8RB com a proteína IL-8 foram 0,997, sendo o maior valor de escore obtido, seguida das demais, CXCL6 (0,948); GRO1 (0,946); ADRBK1 (0,946); CCL5 (0,936); CXCL12 (0,933); CXCL3 (0,929); CXCL2 (0,927); ARRB2 (0,925); CCL3 (0,923) (Tabela 2). Os escores são representados por uma escala com pontuação mínima e máxima entre zero (0) e um (1), respectivamente, e indicam que quanto maior o valor do escore maior será seu grau de similaridade.

Figura 11. Rede de interações da proteína IL8RB (similar a proteína CXCR1) com demais proteínas pelo programa STRING.



* Na interface gráfica gerada pelo programa STRING das à rede de interações das proteínas apresenta os canais de evidências delimitados por traços em diferentes cores: interações conhecidas a partir de bancos de dados com curadoria são apresentadas na cor azul claro e interações determinadas experimentalmente são apresentadas na cor rosa. Também é possível verificar a presença de interações preditas como genes aproximados na cor verde escura; genes associados funcionais na cor vermelha e co-ocorrência entre genes na cor azul escuro. Também foram destacadas outras opções, tais como: "textmining", mineração de texto na cor verde claro; "co-expressão" na cor preta e proteína homóloga na cor lilás.

Tabela 2. Relação das proteínas interligadas à proteína CXCR1 bovina, breve função, escores e grau de interação gerados pelo programa STRING.

Ligante	Breve função gerada automaticamente pelo servidor	Escore	Grau de interação de acordo com cores geradas
IL-8	Fator quimiotático que atrai neutrófilos, basófilos e células T	0,997	Bancos de dados com curadoria; Determinado experimentalmente; Textmining; Co-expressão
CXCL6	Apresenta propriedades quimiotáticas e angiogênicas, com forte atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	0,948	Bancos de dados com curadoria; Determinado experimentalmente; Textmining; Co-expressão
GRO1	-	0,946	Bancos de dados com curadoria; Determinado experimentalmente; Textmining; Co-expressão
ADRBK1	Regulador chave da sinalização LPAR1	0,946	Bancos de dados com curadoria; Textmining
CCL5	Promove a atração das quimiocinas para monócitos sanguíneos; Liberação de histamina a partir de basófilos e ativação dos eosinófilos; Ativação de vários receptores de quimiocinas, incluindo CCR1, CCR3, CCR4 e CCR5	0,936	Bancos de dados com curadoria; Textmining
CXCL12	-	0,933	Bancos de dados com curadoria; Textmining
CXCL3	-	0,929	Bancos de dados com curadoria; Textmining; Co-expressão
CXCL2	-	0,927	Bancos de dados com curadoria; Determinado experimentalmente; Textmining; Co-expressão
ARRB2	Regulação da sinalização do receptor acoplado da proteína-G mediada pelo agonista	0,925	Bancos de dados com curadoria; Determinado experimentalmente; Textmining; Co-expressão
CCL3	Monokine com propriedades inflamatórias e quimiocinéticas	0,923	Bancos de dados com curadoria; Textmining; Co-expressão

* Interações conhecidas: bancos de dados por curadoria; determinadas experimentalmente. Outras opções: "textmining"; co-expressão

6. DISCUSSÃO

A sequência da proteína CXCR1 bovina contendo o polimorfismo A122V foi submetida a análises por ferramentas de Bioinformática para inferir eventuais alterações na sua estabilidade estrutural e funcional, demonstrando que esse polimorfismo exerce efeito benigno, aceitável, tolerável e não-deletério sobre esta proteína (Figura 3 e ANEXOS 1 e 5). Vários estudos concluíram que SIFT e PolyPhen são úteis para priorizar as mudanças associadas à perda de função proteica, porém possuem baixa especificidade para prever o ganho de função proteica, devendo ser interpretada com cautela para apoiar/refutar patogenicidade ou funcionalidade de uma variante não-sinônima (GNAD et al., 2013, MIOSSGE et al., 2015). Assim, o efeito não-deletério pode indicar um polimorfismo não prejudicial, não letal aos animais portadores, o que poderia resultar em animais capazes de sobreviver com tal polimorfismo A122V sem gerar grandes prejuízos a integridade do mesmo, podendo sugerir ganho de função desse polimorfismo, embora Pokorska et al. (2016) tenham associado esse polimorfismo com maior suscetibilidade à mastite em vacas leiteiras.

Os modelos estruturais preditos para as proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica revelaram estruturas espaciais tridimensionais típicas de um polipeptídeo receptor transmembranar, produzindo um padrão característico de ondas que refletem estruturas helicoidais com quebras nas ondas correspondendo a terminais ou torções de hélice (Figuras 4 e 5). Os segmentos transmembranares geralmente caracterizam-se como uma alfa hélice única de uma proteína transmembranar termodinamicamente estável, contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos no interior da bicamada, bem como no interior da maioria das proteínas de estrutura conhecida. A grande maioria das proteínas transmembranares em células eucarióticas e na membrana plasmática bacteriana é constituída por alfa-hélices transmembranares, sendo tais proteínas excelentes transdutores de sinal, onde cada proteína responde a um sinal extracelular ativando uma cascata de reações intracelulares (ALBERTS et al., 2002; LODISH et al., 2000). A ligação de hidrogênio entre as ligações peptídicas é maximizada se a cadeia de polipeptídeo formar uma alfa-hélice regular à medida que atravessa a bicamada, e é assim que a grande maioria dos segmentos que abrangem a membrana de cadeias polipeptídicas cruza a bicamada (ALBERTS et al., 2002). Assim, o segmento transmembranar de

uma proteína de membrana é muitas vezes mais do que apenas uma âncora hidrofóbica, tendo em vista que a sequência de aminoácidos hidrofóbicos pode conter informações que medeiam importantes interações proteína-proteína (ALBERTS et al., 2002). Além disso, KROGH et al. (2001) descreveram e validaram um novo método de predição de topologia de proteína de membrana TMHMM (“Transmembrane Protein Hidden Markov Model”) baseado em um modelo de Markov. O alto grau de precisão desse método permitiu prever 97-98% das proteínas de membrana integralmente confiáveis em uma grande coleção de genomas, portanto, foi estimado que as proteínas transmembranares alfa-hélices constituem 20-30% de todas as proteínas sequenciados codificadas no genoma (KROGH et al., 2001).

As análises das distâncias entre os pares de aminoácidos nas posições alvos sofreram alterações, demonstrando que o modelo tridimensional da proteína CXCR1 polimórfica apresentou maiores diferenças nas distâncias em comparação com a sequência não-polimórfica (Figura 6). De acordo com Jones et al. (2012), um par de resíduos é considerado um resíduo espacialmente próximo em uma estrutura tridimensional, se seus átomos estiverem separados por uma distância mínima de pelo menos 6Å. De acordo com Cohen et al. (2009), as cadeias laterais dos aminoácidos, arginina, ácido glutâmico, valina e de leucina não são simétricas em relação às interações de seus grupos principais. Sabendo-se também que um escore DOPE abaixo de menos um (<1), como observado na Figura 2, indica que a distribuição das distâncias dos pares de átomos no modelo se assemelha aquela encontrada em uma grande amostra de estruturas proteicas conhecidas (YANG et al., 2012). A partir das descobertas aqui descritas, é razoável esperar que mudanças conformacionais provocadas por diferenças na rotação da cadeia entre pares de aminoácidos afetem naturalmente o padrão de modelagem local e estrutural, bem como a funcionalidade biológica da proteína CXCR1 polimórfica. Ainda assim, as proteínas de membranas são pouco discutidas, visto que a sua complexidade demanda cautela devida à carência de informações das mesmas em bancos de dados, existindo a necessidade de depositar achados experimentais adicionais sobre estrutura tridimensional das proteínas transmembranares.

A qualidade pontual dos modelos estruturais preditos para as proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica analisados pelo programa QMEANBrane revelaram alta qualidade pontual dos modelos preditos (Figura 7). O polimorfismo

A122V parece não ter afetado a qualidade estrutural local da proteína polimórfica, especialmente, pois é sabido que os resíduos de aminoácidos analisados, alanina e valina, apresentam propriedades bioquímicas semelhantes, ambos são hidrofóbicos, apolares, ligados a cadeia alifática (AL-KARADAGHI, 2017). Entretanto, ambos os modelos tridimensionais preditos para as sequências das proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica revelaram valores fortemente negativos para parâmetros avaliativos em relação à qualidade e precisão da modelagem estrutural global/total (Figura 8). Especialmente para proteínas de membrana, tais descobertas são absolutamente esperadas, uma vez que as ferramentas de Bioinformática ainda apresentam limitações, quando aplicadas em modelos de segmento transmembranar (STUDER; BIASINI; SCHWEDE, 2014). Curiosamente, foram preditos valores fortemente mais negativos de Z-QMEAN para o modelo predito para a proteína CXCR1 carreando o polimorfismo A122V (Figura 8B), sugerindo que a substituição de um aminoácido alanina com cadeia de menor tamanho por um aminoácido valina com cadeia de maior tamanho poderia impedir interações estéricas durante os mecanismos de dobramento dessa proteína. Enquanto isso, a análise da qualidade dos modelos estruturais predito para as proteínas CXCR1 não-polimórfica e polimórfica analisadas pelo diagrama de Ramachandran demonstrou que 98% dos resíduos de aminoácidos dos dois modelos analisados estão localizados em regiões conformacionais ditas favoráveis e permitidas para o caso geral (todos os aminoácidos, exceto glicina, prolina e pré-prolina) (Figuras 9 e 10, Tabela 1). Contudo, os resíduos de glicina não apresentam uma cadeia lateral, permitindo alta flexibilidade na cadeia polipeptídica, tornando os ângulos de rotação proibidos mais acessíveis, é por isso que a glicina é frequentemente encontrada em regiões de alças ("loops"), onde a cadeia de polipeptídeo precisa dar uma volta brusca (AL-KARADAGHI, 2017). Outro resíduo com propriedades especiais é a prolina, que em contraste com a glicina repara os ângulos de torção com certo valor muito próximo ao de uma extensão vertente β (AL-KARADAGHI, 2017), frequentemente encontrado no final de hélices funcionando como um "disruptor de hélices" (AL-KARADAGHI, 2017). A parcela de pré-prolina no diagrama de Ramachandran ainda não é bem compreendida, visto que é um estado do aminoácido que precede a prolina e tem um perfil de distribuição no diagrama de Ramachandran particularmente restrito em função: a) da presença de uma grande faixa horizontal excluída a $-40^\circ < \psi < 50^\circ$, que restringe as regiões alfa-L e alfa; b) do deslocamento superior da região alfa-L, e c) da presença de uma pequena parcela

de baixa densidade abaixo da região beta, denominada região ζ (região Z) (SCHIMMEL; FLORY, 1968; HO; BRASSEUR, 2005). Assim, embora diferenças notáveis nas distâncias entre os pares de resíduos de aminoácidos tenham sido inferidas em função do polimorfismo A122V (Figura 6), ambos os modelos da proteína CXCR1 preditos demonstraram com segurança uma excelente qualidade local e uma precisão estrutural aceitável. Recentemente, Guzzi et al. (2017), examinando o padrão de estrutura secundária da proteína bovina CXCR1 carregando o polimorfismo A122V, revelaram a ausência de um domínio de alfa hélice entre as posições 100 e 150. Visto que a substituição de alanina com elevada propensão para formação de alfa-hélice por a valina tem maior propensão para formar beta-conformação pode ser responsável por essa ausência na estrutura secundária dessa proteína (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008). Notavelmente, diversas funções das proteínas estão diretamente associadas às suas estruturas tridimensionais apropriadas como consequência das interações físicas entre seus resíduos de aminoácidos.

O programa STRING revelou a forte interação metabólica da proteína CXCR1 (IL8RB) bovina com outras proteínas-alvos (Figura 11 e Tabela 2). Tais resultados parecem ser razoavelmente esperados, visto que a IL-8 medeia suas ações através de dois receptores de superfície celular CXCR1 e CXCR2, desempenhando um importante papel no recrutamento dos neutrófilos, sugerindo um possível aumento na resposta imunológica (WILLIAMS et al., 2000). Wuyts et al. (1997) demonstraram que a proteína CXCL6, também conhecida como proteína quimiotática de granulócitos humanos 2 (GCP-2), após a tradução celular modifica-se para substituir IL-8 em ratos, e esse processo induz o aumento dos níveis de cálcio, contribuindo para um maior estímulo dos receptores CXCR1 e CXCR2 celulares, demonstrando que a GCP-2 se liga a ambos os receptores de IL-8, tornando-se assim um importante mediador complementar da resposta inflamatória. Visto que, as proteínas CXCL6 possuem propriedades quimiotáticas e angiogênicas, bem como apresentam uma forte atividade antibacteriana durante a infecção local devido à sua associação à superfície da bactéria e consequente ruptura das membranas bacterianas (LINGE et al., 2008). A proteína GRO, responsável pelo controle do crescimento celular, pertence a família de ligantes das quimiocinas, existindo 3 subtipos diferentes GRO- α , GRO- β e GRO- γ também descritos como CXCL1, CXCL2 e CXCL3, respectivamente (LIAN et al., 2016). Assim, a proteína GRO1 pertence a uma família

de gene codificante de proteínas secretoras associadas à resposta inflamatória com atividade reguladora do crescimento celular (ANISOWICZ et al., 1988; HASKILL et al., 1990). A proteína ADRBK1 é um membro ubíquo da família receptora da quinase acoplada à proteína G (GRK: “G protein-coupled receptor kinase 2”) e parece funcionar como um andaime na sinalização celular, envolvido na regulação da quimiotaxia, bem como na interação, estabilização e estimulação das citocinas (PENELA et al., 2008; LI et al., 2009). Seo et al. (2009), encontraram fortes associações entre os receptores CCL3 e CCL5 em humanos e roedores, demonstrando que as quimiocinas expressas por células dendríticas ativadas estavam relacionadas à migração de células mononucleares. Ainda, os receptores CCL3 e CXCL12 apresentam função de migração de células mononucleares diante de uma inflamação crônica, visto que o receptor CXCL12 é um forte quimioatrativo de linfócitos e monócitos (NANKI et al., 2000; BERGE et al., 2010). O receptor β -arrestina apresenta funções como transdutores de sinal GPCR, ligando-se diretamente a várias proteínas envolvidas na transdução de sinal, incluindo proteínas da família Src quinases e componentes das cascatas de quinase MAP ERK1/2 e JNK3; as β -arrestinas também facilitam a ativação da MAP quinase estimulada por GPCR e as quinases MAP ativadas migram para locais específicos dentro da célula; assim, a sua ligação a GPCRs pode iniciar uma segunda onda de sinalização e representar um novo mecanismo de transdução de sinal GPCR (LUTTRELL; LEFKOWITZ, 2002). Contudo, o ligante IL-8 e os receptores CXCL2, CXCL3 e CCL3 apresentaram efeito superantígeno para *Staphylococcus*, induzindo uma forte resposta pró-inflamatória em vacas leiteiras (KUROISHI et al., 2003). Nesse contexto, a proteína CXCR1 e suas proteínas-alvos correlacionadas, tais como IL-8, CXCL6, GRO1, ADRBK1, CCL5, CXCL12, CXCL3, CXCL2, ARRB2 e CCL3, desempenham papéis importantes na resposta inflamatória aguda e no tráfico de células envolvidas no sistema imunológico.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados preditos a partir do emprego de ferramentas de Bioinformática, pode-se concluir que:

- a) A substituição do aminoácido alanina por valina na proteína CXCR1 exerceu influência tolerável e não-deletéria na sua estabilidade e função da proteína em estudo.
- b) Maiores diferenças foram detectadas nas distâncias entre os pares de resíduos de aminoácidos em função do polimorfismo A122V sobre a estrutura tridimensional da proteína CXCR1 polimórfica.
- c) A análise da qualidade dos modelos tridimensionais demonstrou uma tendência a menor qualidade local no modelo predito para a proteína CXCR1 polimórfica, mesmo com a maior parte de seus aminoácidos situados em regiões favoráveis e permitidas.
- d) A proteína CXCR1 apresentou uma forte interação com outras proteínas correlatas e associadas ao processo de recrutamento e migração das células imunológicas ao local infectado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANAZI, M.; ABDULJALEEL, Z.; KHAN, W.; WARSY, A. S.; ELROBH, M.; KHAN, Z.; AMRI, A. AL.; BAZZI, M. D. *In Silico* Analysis of Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) in Human β -Globin Gene. **Plos One**, v. 6, n. 10, p.25876-25887, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Cell Biology**, 4 ed. Nova Iorque: Garland Science 2002.

AL-KARADAGHI, S. **KEMM15**: Lecture note in structural bioinformatics: A practical guide. Disponível em: <<http://ndpia.se/wp-content/uploads/2016/12/Lecture-note-in-structural-bioinformatics.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2017.

ANDERSON, R. J.; WENG, Z.; CAMPBELL, R. K.; JIANG, X. Main-chain conformational tendencies of amino acids. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 60, n. 4, p.679-689, 2005.

ANISOWICZ, A.; ZAJCHOWSKI, D.; STENMANT, G.; SAGER, R. Functional diversity of gro gene expression in human fibroblasts and mammary epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n.24, p. 9645-9649, 1988.

BAGHERI, M.; ZAHMATKESH, A. Estimation of dominance effects related to mastitis and production traits for CXCR1 gene using logistic regression analysis in dairy cattle. **Agri Gene**, v.3 p.63-66, 2017.

BAIROCH, A.; APWEILER, R. The swiss-prot protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.1, p.45–48, 2000.

BAVA, K. A.; GROMIBA, M. M.; UEDAIRA, H.; KITAJIMA, K.; SARAI, A. PROTherm, version 4.0: thermodynamic database for proteins and mutants. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.120-121, 2004.

BEECHER, C.; DALY, M.; CHILDS, S.; BERRY, D. P.; MAGEE, D. A.; MCCARTHY, T. V.; GIBLIN, L. Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. **Bio Med Central Genetics**, v.99, p.1-9, 2010.

BENNETT-LOVSEY, R. M.; HERBERT, A. D.; STERNBERG, M. J.; KELLEY, L. A. Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 70, n. 3, p.611-625, 2007.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p.343-350, 2010.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Bioquímica. Sp: **Ganabara Koogan**, 589 p. 2008.

BI, Y.; WANG, Y. J.; QIN, Y.; VALLVERDÚ, R. G.; GARCÍA, J. M.; SUN, W.; LI, S.; CAO, Z. Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. **Plos One**, v.11, n.5, p.1-13, 2016.

BORGE, M.; NANNINI, P. R.; GALLETTI, J. G. MORANDE, P. E.; ÁVALOS, J. S.; BEZARES, R. F.; GIORDANO, M.; GAMBERALE, R. CXCL12-induced chemotaxis is impaired in T cells from patients with ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica**, v. 95, n. 5, p.768-775, 2010.

BUDDA, S. A.; GIRTON, A.; HENDERSON, J. G.; ZENEWICZ, L. A. Transcription Factor HIF-1 α Controls Expression of the Cytokine IL-22 in CD4 T Cells. **The Journal of Immunology**, v.197, n.7, p.2646-2652, 2016.

BUDD, K. E.; MITCHELL, J.; KEANE, O. M. Lineage associated expression of virulence traits in bovine-adapted *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Microbiology**, v. 189, p.24-31, 2016.

BRENAUT, P.; LEFÈVRE, L.; RAU, A.; LALOË, D.; PISONI, G.; MORONI, P.; BEVILACQUA, C.; MARTIN, P. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Research**, v.45, n.1, p.16-20, 2014.

COHEN, M.; POTAPOV, V.; SCHREIBER, G. Four distances between pairs of amino acids provide a precise description of their interaction. **PLoS Comput Biol**. v. 5, n. 8, e1000470, 2009.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. Mastite bovina: controle e prevenção. **Boletim Técnico Universidade Federal de Lavras Departamento de Medicina Veterinária UFLA**, Lavras, n. 93, p.5, 2012.

DAVID, J.; MORTARI, M. Chemokine receptors A brief overview. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.1, p. 105–125, 2000.

DEANE, C. M. ; BLUNDELL, T. L. Protein comparative modelling and drug discovery. In WERMUTH, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. London: **Elsevier Academic Press**, 2003.

FLODEN, E.; TOMMASO, P. D.; CHATZOU, M.; MAGIS, C.; NOTREDAME, C.; CHANG, J-M. PSI/TM-Coffee: a web server for fast and accurate multiple sequence alignments of regular and transmembrane proteins using homology extension on reduced databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p.339-343, 2016.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 3, p.638-650, 2013.

GUZZI, A. F.; OLIVEIRA, F. S. DE L.; AMARO, M. M. DE S.; TAVARES FILHO, P. F. GABRIEL, J. E. Predicting the effects of the single nucleotide polymorphism A122V on CXC chemokine receptor type 1 of *Bos taurus* (*Artiodactyla: Bovidae*) cattle by *in silico* analyses. **Biotemas**, v.30, n. 4, p. 1-6, 2017.

GNAD, F.; BAUCOM, A.; MUKHYALA, K.; MANNING, G.; ZHANG, Z. Assessment of computational methods for predicting the effects of missense mutations in human cancers. **Bio Med Central Genetics**. v.14, n.3, p.1-13, 2013.

HANSEN, P. J.; SOTO, P.; NATZKE, R. P. Mastitis and fertility in cattle. Possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.51, n. 4, p.294-301, 2004.

HASKILL, S.; PEACE, A.; MORRIS, J.; SPORN, S. A.; ANISOWICZ, A.; LEE, S. W.; SMITH, T.; MARTIN, G.; RALPH, P.; SAGER, R. Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.87, n.19, p. 7732-7736, 1990.

HEGDE, R. S.; BERNSTEIN, H. D. The surprising complexity of signal sequences. **Trends In Biochemical Sciences**, v. 31, n. 10, p.563-571, 2006.

HENSON, P. M.; VANDIVIER, R. W. The matrix degrades, neutrophils invade. **Nature Medicine**, v. 12, n. 3, p.280-281, 2006.

HO, B. K; BRASSEUR, R. The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. **Bmc Structural Biology**, v. 5, n. 14, p.1-11, 2005.

HILLISCH, A.; PINEDA, L. F.; HILGENFELD, R. Utility of homology models in the drug discovery process. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 15, p.659-669, 2004.

JARJANAZI, H.; SAVAS, S.; PABALAN, N.; DENNIS, J. W.; OZCELIK, H. Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 70, n. 2, p.394-403, 2007.

JONES, D. T.; BUCHAN, D. W.; COZZETTO, D.; PONTIL, M. PSICOV: precise structural contact prediction using sparse inverse covariance estimation on large multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v.28, n.2, p.184–190, 2012.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; SATO, Y.; FURUMICHI, M.; TANABE, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 1, p.109-114, 2011.

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p.363-371, 2009.

KHAN, I.; ANSARI, I. A. Prediction of a highly deleterious mutation E17K in AKT-1 gene: An *in silico* approach. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p.260-266, 2017.

KLEIN, R. C.; FABRES-KLEIN, M. H.; BRITO, M. A. V. P.; FIETTO, L. G.; RIBON, A. DE O. B. Staphylococcus aureus of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. **Veterinary Microbiology**, v.160, n.1-2, p.183-188, 2012.

KONO, H.; YUASA, T.; NISHIUE, S.; YURA, K. ColiSNP database server mapping nsSNPs on protein structures. **Nucleic Acids Research**, Japan, v. 36, p.409-413, 2007.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p.567-580, 2001.

KUROISHI, T.; KOMINE, K.-I.; ASAI, K.-I.; KOBAYASHI, J.; WATANABE, K.; YAMAGUCHI, T.; KAMATA, S.-I.; KUMAGAI, K. Inflammatory Responses of Bovine Polymorphonuclear Neutrophils Induced by Staphylococcal Enterotoxin C via Stimulation of Mononuclear Cells. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, n. 6, p.1011-1018, 2003.

LAFRENIERE, P.; MACDONALD, K. A post-genomic view of behavioral development and adaptation to the environment. **Developmental Review**, v. 33, n. 2, p.89-109, 2013.

LAHOUASSA, H.; MOUSSAY, E.; RAINARD, P.; RIOLLET, C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **Cytokine**, v. 38, p. 12–21, 2007.

LASKOWSKI, R. A.; RULLMANN, J.A.; MACARTHUR, M. W.; KAPTEIN, R.; THORNTON, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **J Biomol NMR**, v. 4, n. 8, p.283-291, 1996.

LEHNINGER, A. L. Lehninger princípios de bioquímica. 4.ed SP: **Sarvier**, 2006.

LI, X.; MACLEOD, R.; DUNLOP, A. J.; EDWARDS, H. V.; ADVANT, N.; GIBSON, L. C. D.; DEVINE, N. M.; BROWN, K. M.; ADAMS, D. R.; HOUSLAY, M. D.; BAILLIE, G. S. A scanning peptide array approach uncovers association sites within the JNK/ β arrestin signalling complex. **Febs Letters**, v. 583, n. 20, p.3310-3316, 2009.

LI, N.; RICHOUX, R.; BOUTINAUD, M.; MARTIN, P.; GAGNAIRE, V. Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. **Dairy Science Technology**, v.94, n. 6, p.517-538, 2014.

LIAN, S.; ZHAI, X.; WANG, X.; ZHU, H.; ZHANG, S.; WANG, W.; WANG, Z.; HUANG, J. Elevated expression of growth-regulated oncogene-alpha in tumor and stromal cells predicts unfavorable prognosis in pancreatic cancer. **Medicine**, v. 95, n. 30, p.4328-4329, 2016.

LINGE, H. M.; COLLIN, M.; NORDENFELT, P.; MÖRGELIN, M.; MALMSTEN, M.; EGESTEN, ARNE. The Human CXC Chemokine Granulocyte Chemotactic Protein 2 (GCP-2)/CXCL6 Possesses Membrane-Disrupting Properties and Is Antibacterial. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p.2599-2607, 2008.

LIU, Y.; YANG, S.; LIN, A. A.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; SU, B. Molecular Evolution of **CXCR1**, a G Protein-Coupled Receptor Involved in Signal Transduction of Neutrophils. **Journal of Molecular Evolution**, v.61, n. 5, p.691–696, 2005.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.; **Molecular Cell Biology**, 4 ed. New York: W. H. Freeman 2000.

LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDALL III, W. B.; BAKKER, P. I. W. DE.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure

validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 50, n. 3, p.437-450, 2003.

LUTTRELL, L. M.; LEFKOWITZ, R. J. The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. **Journal of Cell Science**, v.115, 455-465, 2002.

MAGRO, G.; BREVINI, T. A. I.; MAGLIE, M. de.; MINOZZI, G.; SCANZIANI, E.; PICCININI, R. An explant of heifer mammary gland to study the immune response of the organ. **Research In Veterinary Science**, v.114, p.44-50, 2017.

MARTINS, M. F.; ARAUJO, I. I. M.; FONSECA, I.; ARBEX, W. A.; SILVA, M. V. G. B. Marcadores moleculares: uma ferramenta para a melhoria da qualidade do leite. O Girolando. p. 34-35, 2012.

MARTINS, C. M. M. R.; PINHEIRO, E. S. C.; GENTILINI, M.; BENAVIDES, M. L.; SANTOS, M. V. Efficacy of a high free iodine barrier teat disinfectant for the prevention of naturally occurring new intramammary infections and clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.5, p.3930-3939, 2017.

MARTÍ-RENOM, M. A.; STUART, A.C.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v.29, p.291-325, 2000.

MELLADO, M.; RODRÍGUEZ-FRADE, J. M.; MAÑES, S.; MARTÍNEZ-A, C. Chemokine signaling and functional responses: The Role of Receptor Dimerization and TK Pathway Activation. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p.397-421, 2001.

MELO, F.; SÁNCHEZ, R.; SALI, A. Statistical potentials for fold assessment. **Protein Science**, v. 11, n. 2, p.430-448, 2003.

MIOSGE, L. A.; FIELD, M. A.; SONTANI, Y.; CHO, V.; JOHNSON, S.; PALKOVA, A.; BALAKISHNAN, B.; LIANG, R.; ZHANG, Y.; LYON, S.; BEUTLER, B.; WHITTLE, B.; BEUTLER, E. M.; ENDERS, A.; GOODNOW, C.C.; ANDREWS, T. D. Comparison of predicted and actual consequences of missense mutations. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 112, n. 37, p.5189-5198, 2015.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3032-3043, 2000.

MURPHY, P.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I. F. International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. **Pharmacol Reviews**, v.52, n.1, p.145-76, 2000.

NANKI, T.; HAYASHIDA, K.; EL-GABALAWY, H. S. SUSON, S.; SHI, K.; GIRSCHICK, H. J.; YAVUZ, S.; LIPSKY, P. E. Stromal Cell-Derived Factor-1-CXC Chemokine Receptor 4 Interactions Play a Central Role in CD4+ T Cell Accumulation in Rheumatoid Arthritis Synovium. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 11, p.6590-6598, 2000.

NG, P. C.; HENIKOFF, S. Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. **Genome Research**, v. 11, n. 5, p.863-874, 2001.

Ng, P.C.; HENIKOFF, S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n.13, p.3812-3814, 2003.

NG, P. C.; HENIKOFF, S. Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function. **Annual Reviews Genomics Human Genetics**, v. 7, n. 1, p.61-80, 2006.

PAWLIK, A.; SENDER, G.; KAPERA, M.; KORWIN-KOSSAKOWSKA, A. Experimental immunology Association between interleukin 8 receptor α gene (CXCR1) and mastitis in dairy cattle. **Central European Journal of Immunology**, v. 2, p.153-158, 2015.

PENELA, P.; MURGA, C.; RIBAS, C.; SALCEDO, A.; JURADO-PUEYO, M.; RIVAS, V.; AYMERICH, I.; MAYOR, F. JR. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in migration and inflammation. **Archives of Physiology And Biochemistry**, v.114, n.3, p.195-200, 2008.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p.785-786, 2011.

PIGHETTI, G. M.; KOJIMA, C. J.; WOJAKIEWICZ, L.; RAMBEAUD, M. The bovine CXCR1 gene is highly polymorphic. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, n. 1-2, p.464-470, 2012.

POKORSKA, J.; DUSZA, M.; KUŁAJ, D.; ŻUKOWSKI, K.; MAKULSKA, J. Single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and its association with clinical mastitis incidence in Polish Holstein-Friesian cows. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, p.1-8,2016.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annual Reviews Immunology**, v.18, p.217-242, 2000.

SALLUSTO, F.; BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature Immunology**. v.9, n.9, p.949–952, 2008.

SCHÜLEIN, R.; WESTENDORF, C.; KRAUSE, G.; ROSENTHAL W. Functional significance of cleavable signal peptides of G protein-coupled receptors. **European Journal Of Cell Biology**, v. 91, n. 4, p.294-299, 2012.

SCHIMMEL, P. R.; FLORY, P. J. Conformational energies and configurational statistics of copolypeptides containing L-proline. **Journal of Molecular Biology**, v.34, p.105–120, 1968.

SEO, K. S.; PARK, J. Y.; DAVIS, W. C.; FOX, L.K.; MCGUIRE, M. A.; PARK, Y. HO.; BOHACH, G. A. Superantigen-mediated differentiation of bovine monocytes into dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 4, p.606-616, 2009.

SIMÕES, T. V. M. D.; OLIVEIRA, A. A. Mastite bovina: considerações e impactos econômicos, Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. p.25

(Documentos/Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953;170).Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf> Acesso em: 10/09/2016.

SUNYAEV, S.; RAMENSKY, V.; BORK, P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 5, p.198-200, 2000.

STUDER, G.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Assessing the local structural quality of transmembrane protein models using statistical potentials (QMEANBrane). **Bioinformatics**, v. 30, n. 17, p.505-511, 2014.

SZKLARCZYK, D.; MORRIS, J. H.; COOK, H.; KUHN, M.; WYDER, S.; SIMONOVIC, M.; SANTOS, A.; DONCHEVA, N. T.; ROTH, A.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; MERING, C. V. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 1, p.362-368, 2016.

TING, D.; WANG, G.; MITRA, R.; JORDAN, M.I.; DUNBRACK, R. L. Neighbor-Dependent Ramachandran Probability Distributions of Amino Acids Developed from a Hierarchical Dirichlet Process Model. **Plos Computational Biology**, v. 6, n. 4, p.763-744, 2010.

TOSATTO, S. C. E. The Victor/FRST Function for Model Quality Estimation. **Journal of Computational Biology**, v. 12, n. 10, p.1316-1327, 2005.

TRIFILO, M. J.; MONTALTO-MORRISON, C.; STILES, L. N.; HURST, K. R.; HARDISON J. L.; MANNING J. E.; MESTRES P. S.; PISTA T. E. CXC Chemokine Ligand 10 Controls Viral Infection in the Central Nervous System: Evidence for a Role in Innate Immune Response through Recruitment and Activation of Natural Killer Cells. **Journal of Virology**. California, p. 585-594, 2004.

WEBB, B.; SALI, R. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons**. v.54, p.5.6.1-5.6.37, 2014.

WILLIAMS, E. J.; HAQUE, S.; BANKS, C.; JOHNSON, P.; SARSFIELD, P.; SHERON, N. Distribution of the interleukin-8 receptors, CXCR1 and CXCR2, in inflamed gut tissue. **The Journal of Pathology**, v. 192, n. 4, p.533-539, 2000.

WUYTS, A.; VAN OSSELAER, N.; HAELENS, A.; SAMSON, I.; HERDEWIJN, P.; BEN-BARUCH, A.; OPPENHEIM, J. J.; PROOST, P.; DAMME, J. V. Characterization of Synthetic Human Granulocyte Chemotactic Protein 2: Usage of Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 and in Vivo Inflammatory Properties†. **Biochemistry**, v. 36, n. 9, p.2716-2723, 1997.

VERBEKE, J.; PIEPERS, S.; PEELMAN, L. J.; VAN POUCKE, M.; DE VLIEGHER, S. Pathogen-group specific association between CXCR1 polymorphisms and subclinical mastitis in dairy heifers. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p.341–351, 2012.

VITKUP, D.; MELAMUD, E.; MOULT, J.; SANDER, C. Completeness in structural genomics. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 6, p.559-566, 2001.

YANG, Z.; LASKER, K.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; WEBB, B.; HUANG, C. C.; PETTERSN, E. F.; GODDARD, A. D.; MENG, E. C.; SALI, A.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An integrated modeling system. **Journal of Structural Biology**, v. 179, n. 3, p.269-278, 2012.

ZAJA-MILATOVIC, S.; RICHMOND, A. CXC chemokines and their receptors: A case for a significant biological role in cutaneous wound healing. **Histology and Histopathology**, v. 23, n.11, p.1399-1407, 2008.

ZHOU, L.; WANG, H. M.; JU, Z. H.; ZHANG, Y.; HUANG, J. M.; QI, C.; HOU, M. H.; NA, L. G.; ZHONG, J. F.; WANG, F. Q. Association of novel single nucleotide polymorphisms of the CXCR1 gene with the milk performance traits of Chinese native cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p.2725-2739, 2013.

ANEXOS

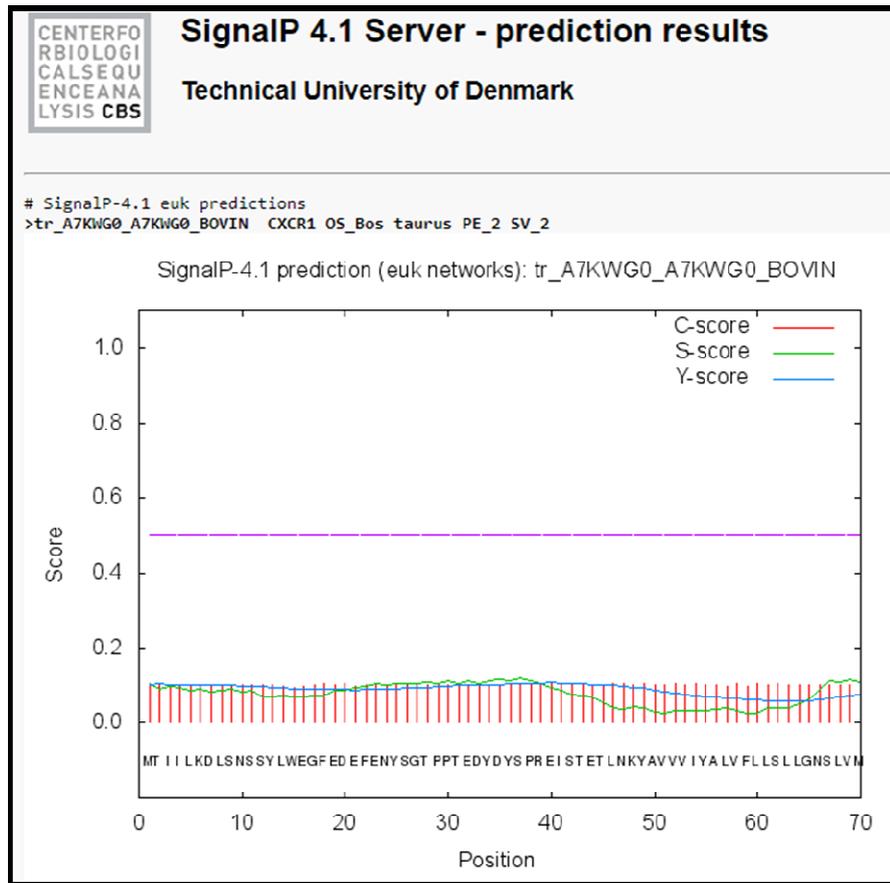
ANEXO 1. Resultado da predição funcional do polimorfismo A122V na proteína CXCR1 em *Bos taurus* através da ferramenta SIFT.

Predictions for positions 101 through 200

Threshold for intolerance is 0.05.
 Amino acid color code: nonpolar, uncharged polar, basic, acidic.
 Capital letters indicate amino acids appearing in the alignment, lower case letters result from prediction.
 'Seq Rep' is the fraction of sequences that contain one of the basic amino acids. A low fraction indicates the position is either severely gapped or unalignable and has little information. Expect poor prediction at these positions.

Predict Not Tolerated	Position	Seq Rep	Predict Tolerated
d h g n e w c s r y k p q t a f	101V	0.97	i MVL
h w d n g r y q e k e s p f t a	102M	0.97	i l MV
h q w d p n e c r s k g y a t f m	103L	0.97	V L I
d h g w n r e q c k p s m f a	104V	0.97	T Y i VL
	105I	0.97	w p C d m e k q g R N t S v a l H f I Y
w	106L	0.97	c m f i y h v p L q R G e a d k N T S
c w d f m i	107Y	0.97	v g p s n a l t H e Y Q K R
	108S	0.97	w d c P g n q e k R m S h t F a y L I V
w	109R	0.97	c f m y i H v p l G q a T d N S e R K
	110I	0.97	C w d m p f g l n s v H t y e a l Q R k
w f y m h i r c l q e k	111G	0.97	v d p n a T G S
w d h y g	112R	0.97	n f c e q m p S k R t l a I V
w f y h c r e l i q g k d v p n a M	113S	0.97	S T
w	114V	0.97	m y f h c r q k p l t i n s g a e V D
w g h d y n r q e k f s c p m a l	115T	1.00	I T V
	116D	0.94	m i c v w r l h p q t k a f e s Y g n D
d h g n w e r c s y k q p t a f m	117V	0.94	i VL
d h n g e r k c q p s t a w m	118Y	0.94	i V f Y L
w	119L	0.94	c y p m f v H q t a e r i k s g d L N
y w v t s r q p n m k i h g f e d c a	120L	0.94	L
w m f i y	121N	0.94	h c l r q v k e p t d N s g A
h d w p q e n c r s k y a t f	122L	0.94	G M V I L
y w v t s r q p n m l k i h g f e d c	123A	0.94	A
w	124M	0.94	c y f h i r v p t q k l s a n g M e D
h w d n y r e c q k p t s g	125A	0.94	f m v i A L
h c g r n k s w p e q D t	126D	0.94	y a v m F i L

ANEXO 2. Predição da presença de peptídeos sinais nos primeiros 70 aminoácidos da proteína transmembranar CXCR1 bovina.



ANEXO 3: Resultado do alinhamento da sequência da proteína CXCR1 bovina gerando 74 opções de sequências/modelos alvos fornecidas pela ferramenta BLAST.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of Human Cxcr1 In Phospholipid Bilayers	483	483	85%	8e-173	79%	2LNL A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Human Cc Chemokine Receptor Type 9 (ccr9) In Complex With Vercirmon	204	204	78%	7e-63	37%	5LWE A
<input type="checkbox"/> Chain A, Xfel Structure Of Human Angiotensin Receptor	165	165	76%	4e-47	33%	4YAY A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Human Angiotensin Receptor In Complex With Inverse Agonist Olmesartan At 2.8a Resolution	164	164	76%	1e-46	34%	4ZUD A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of A Nanobody-bound Viral Gpcr Bound To Human Chemokine Cx3cd1	154	154	82%	2e-43	35%	4XT1 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Cc Chemokine Receptor 5 (ccr5) In Complex With High Potency Hiv Entry Inhibitor 5p7-ccl5	152	152	84%	4e-42	29%	5UIW A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Ccr5 Chemokine Receptor	152	152	84%	5e-42	29%	4MBS A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Cxcr4 And Viral Chemokine Antagonist Vmip-ii Complex (psi Community Target)	133	206	81%	2e-34	37%	4RWS A
<input type="checkbox"/> Chain A, The 2.5 A Structure Of The Cxcr4 Chemokine Receptor In Complex With Small Molecule Antagonist It1t	132	206	81%	3e-34	38%	3ODU A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Cxcr4 Chemokine Receptor In Complex With A Small Molecule Antagonist It1t In I222 Spacegroup	132	206	81%	3e-34	38%	3OE6 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Cxcr4 Chemokine Receptor In Complex With A Cyclic Peptide Antagonist Cvx15	132	205	81%	3e-34	38%	3OE0 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Active Mu-opioid Receptor Bound To The Agonist Bu72	119	119	80%	6e-31	29%	5C1M A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of Cc Chemokine Receptor 2 With Orthosteric And Allosteric Antagonists	123	199	86%	7e-31	35%	5T1A A
<input type="checkbox"/> Chain A, The Crystal Structure Of Nociceptin/orphanin Fq Peptide Receptor (nop) In Complex With C-35 (psi Community Target)	121	121	76%	1e-30	30%	5DHG A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of The N/ofq Opioid Receptor In Complex With A Peptide Mimetic	121	121	76%	1e-30	30%	4EA3 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Xfel Structure Of Human Angiotensin Ii Type 2 Receptor (monoclinic Form) In Complex With Compound 1 (n-benzyl-n-(2-ethyl-4-oxo-3-[f2]- (2h-tetrazol-5-yl))1,1'-biphen	117	117	78%	3e-29	30%	5UNF A

Continuação do Anexo 3.

<input type="checkbox"/> Chain B, Structure Of Apelin Receptor In Complex With Aqonist Peptide	116	116	75%	6e-29	28%	5VBL_B
<input type="checkbox"/> Chain A, 1.8 Å Structure Of The Human Delta Opioid 7tm Receptor (psi Community Target)	113	113	81%	1e-27	30%	4N6H_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Synchrotron Structure Of The Human Delta Opioid Receptor In Complex With A Bifunctional Peptide (psi Community Target)	112	112	76%	2e-27	30%	4RWA_A
<input type="checkbox"/> Chain A, The Human P2y1 Receptor In Complex With Bptu	105	105	77%	5e-25	24%	4XNV_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Zebrafish Lysophosphatidic Acid Receptor Lpa6	105	105	51%	1e-24	34%	5XSZ_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of The Delta Opioid Receptor Bound To Naltrindole	97.4	97.4	53%	5e-22	31%	4EJ4_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Mu-opioid Receptor Bound To A Morphinan Antagonist	96.7	129	78%	8e-22	29%	4DKL_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of The Human Kappa Opioid Receptor In Complex With Jdtic	94.4	94.4	60%	7e-21	29%	4DJH_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Turkey Beta1 Adrenergic Receptor With Stabilising Mutations And Bound Cyanopindolol	87.8	87.8	76%	3e-19	28%	2VT4_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Turkey Beta1 Adrenergic Receptor With Stabilising Mutations And Bound Partial Agonist Dobutamine (Crystal Dob92)	87.0	87.0	77%	6e-19	28%	2Y00_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Thermostabilised Beta1-adrenoceptor With Rationally Designed Inverse Agonist 7-methylcyanopindolol Bound	83.6	83.6	77%	9e-18	27%	5A8E_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Ultra-thermostable Beta1-adrenoceptor With Cyanopindolol Bound	83.6	83.6	77%	1e-17	27%	4BVN_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Human Protease-activated Receptor 1 (par1) Bound With Antagonist Vorapaxar At 2.2 Angstrom	79.3	79.3	52%	6e-16	30%	3VW7_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Human Ox2 Orexin Receptor Bound To The Insomnia Drug Suvorexant	75.1	75.1	50%	2e-14	30%	4S0V_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of A Thermostabilised Human Protease-activated Receptor-2 (par2) In Ternary Complex With Fab3949 And Az7188 At 4.0 Angstrom Resolution	73.9	73.9	51%	3e-14	28%	5NJ6_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of A Thermostabilised Human Protease-activated Receptor-2 (par2) In Complex With Az8838 At 2.8 Angstrom Resolution	73.9	73.9	51%	4e-14	28%	5NDD_A
<input type="checkbox"/> Chain A, N-terminal T4 Lysozyme Fusion Facilitates Crystallization Of A G Protein Coupled Receptor	72.4	72.4	84%	5e-14	25%	4GBR_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of Beta2 Adrenoceptor Bound To BI167107 And An Engineered Nanobody	73.6	73.6	72%	6e-14	25%	4LDE_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of Beta2 Adrenoceptor Bound To Carazolol And Inactive-state Stabilizing Nanobody, Nb60	73.6	73.6	72%	6e-14	25%	5JQH_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of Beta2 Adrenoceptor Bound To A Covalent Agonist And An Engineered Nanobody	72.4	72.4	72%	1e-13	26%	4QKX_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Solution Conformation Of Substance P In Water Complexed With Nk1r	68.2	68.2	81%	2e-12	25%	2KS9_A

Continuação do Anexo 3.

<input type="checkbox"/> Chain A, Human Endothelin Receptor Type-b In The Ligand-free Form	67.0	110	66%	8e-12	30%	5GLI A
<input type="checkbox"/> Chain A, Human Endothelin Receptor Type-b In Complex With Et-1	66.6	109	66%	9e-12	30%	5GLH A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of A Receptor_1	66.6	109	66%	1e-11	30%	5XPR A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of A Methylated Beta2 Adrenergic Receptor- Fab Complex	66.2	66.2	78%	1e-11	22%	3KJ6 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Human Beta2 Adrenoceptor	65.9	65.9	78%	1e-11	23%	2R4R A
<input type="checkbox"/> Chain R, Crystal Structure Of The Beta2 Adrenergic Receptor-qs Protein Complex	66.6	66.6	72%	1e-11	23%	3SN6 R
<input type="checkbox"/> Chain A, Structures Of The Human OX1 Orexin Receptor Bound To Selective And Dual Antagonists	65.1	65.1	45%	4e-11	33%	4ZJ8 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Human Beta2 Adrenoceptor	63.9	63.9	72%	4e-11	23%	2R4S A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of Bovine Rhodopsin (Dark Adapted)	63.9	63.9	76%	6e-11	24%	1JFP A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Bovine Rhodopsin With Beta-Ionone	63.9	63.9	76%	6e-11	24%	3OAX A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of T94i Rhodopsin Mutant	63.9	63.9	75%	6e-11	24%	5DYS A
<input type="checkbox"/> Chain A, Night Blindness Causing G90d Rhodopsin In The Active Conformation	62.8	62.8	76%	1e-10	23%	4BEZ A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of A Mutant Bovine Rhodopsin In Hexagonal Crystal Form	62.4	62.4	76%	1e-10	23%	3C9M A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of A Rhodopsin Stabilizing Mutant Expressed In Mammalian Cells	62.4	62.4	76%	1e-10	23%	2J4Y A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Constitutively Active E113qN2c_D282c Rhodopsin Mutant With Bound Galphact Peptide	62.4	62.4	75%	2e-10	24%	2X7Z A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Light-Activated Constitutively Active N2c.M257y.D282c Rhodopsin Mutant In Complex With A Peptide Resembling The C-Terminus Of The Gal	62.0	62.0	76%	2e-10	23%	4A4M A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Lumi Intermediate Of Squid Rhodopsin	57.4	57.4	68%	7e-09	25%	4VW3 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Squid Rhodopsin	57.4	57.4	68%	8e-09	25%	2Z1Y A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Squid Rhodopsin	57.8	57.8	68%	8e-09	25%	2Z73 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of The Human D4 Dopamine Receptor In Complex With Nemonapride	52.4	84.7	55%	4e-07	36%	5W1U A
<input type="checkbox"/> Chain A, Cholesterol Bound Form Of Human Beta2 Adrenergic Receptor	52.0	89.0	74%	6e-07	25%	3D4S A

Continuação do Anexo 3.

<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Squid Rhodopsin	57.8	57.8	68%	8e-09	25%	2Z73 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of The Human D4 Dopamine Receptor In Complex With Nemonapride	52.4	84.7	55%	4e-07	36%	5W1U A
<input type="checkbox"/> Chain A, Cholesterol Bound Form Of Human Beta2 Adrenergic Receptor	52.0	89.0	74%	6e-07	25%	3D4S A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Chimeric Protein Of 5-ht2b-bril In Complex With Ergolamine	51.6	51.6	60%	6e-07	25%	4IB4 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structural Insights Into The Extracellular Recognition Of The Human Serotonin 2b Receptor By An Antibody	51.6	51.6	60%	7e-07	26%	5TUD A
<input type="checkbox"/> Chain A, High Resolution Crystal Structure Of Human B2-adrenergic G Protein- Coupled Receptor	51.6	89.0	73%	7e-07	25%	2RH1 A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of The Human P2y12 Receptor In Complex With An Antithrombotic Drug	51.6	51.6	30%	7e-07	27%	4NTJ A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of A Nanobody-stabilized Active State Of The Beta2 Adrenoceptor	51.6	89.0	73%	7e-07	25%	3P0G A
<input type="checkbox"/> Chain A, Irreversible Antagonist-beta2 Adrenoceptor Complex	49.3	85.9	69%	4e-06	26%	3PDS A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Rhodopsin Bound To Arrestin By Femtosecond X-ray Laser	49.7	49.7	75%	4e-06	23%	4ZVJ A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Rhodopsin Bound To Visual Arrestin Determined By X-ray Free Electron Laser	49.7	49.7	75%	4e-06	23%	5W0P A
<input type="checkbox"/> Chain C, Crystal Structure Of Rhodopsin Bound To Visual Arrestin Determined By X-ray Free Electron Laser	49.7	49.7	75%	4e-06	23%	5W0P C
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of The Lsd-bound 5-ht2b Receptor	45.8	45.8	55%	4e-05	27%	5TVN A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of The M4 Muscarinic Acetylcholine Receptor (m4-mt4l) Bound To Tiotropium	40.4	40.4	23%	0.002	32%	5DSG A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of The Human M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Bound To Antagonist Tiotropium	38.9	38.9	21%	0.009	27%	5CXV A
<input type="checkbox"/> Chain A, Ar55 Solubilised In Sds Micelles	29.3	29.3	15%	1.0	30%	2LOT A

ANEXO 4. O software PSI/TM-Coffee realizou o alinhamento de sequências múltiplas nas três sequências: sequência de entrada (tr/A7KWG0) da proteína CXCR1 e nas outras sequências geradas na busca na plataforma BLAST com maior identidade (2LNL_A e 5LWE_A)



*saída gráfica colorida de acordo com a previsão da topologia transmembranar onde os resíduos amarelos estão preditos no circuito interno, vermelho em hélice transmembranar e azul no circuito externo.

ANEXO 5: Descrição da análise I-Mutant v2.0 (5A e 5B)

ANEXO 5A: Resultado do índice de confiabilidade (RI) referente ao polimorfismo CXCR1 em bovinos *Bos taurus*.

```
*****
**                                     **
**               I-Mutant v2.0         **
**   Predictor of Protein Stability Changes upon Mutations   **
**                                     **
*****

SEQ File: fileseq.txt

Position  WT  NEW  Stability  RI  pH  T
         122  A   V   Increase  3  7.0  25

WT: Aminoacid in Wild-Type Protein
NEW: New Aminoacid after Mutation
RI: Reliability Index
T: Temperature in Celsius degrees
pH: -log[H+]

*****
*                                     *
* Capriotti E, Fariselli P and Casadio R (2005). I-Mutant2.0: predicting *
* stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *
* Nucl. Acids Res. 33: W306-W310. *
* http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant2.0/I-Mutant2.0.cgi *
*                                     *
*****
```

ANEXO 5B: Descrição da análise de DDG referente à estabilidade do polimorfismo CXCR1 em bovinos *Bos taurus*.

```
*****
**                                     **
**               I-Mutant v2.0               **
**   Predictor of Protein Stability Changes upon Mutations   **
**                                     **
*****

SEQ File: fileseq.txt

Position WT NEW  DDG  pH  T
      122  A  V  0.28  7.0  25

WT: Aminoacid in Wild-Type Protein
NEW: New Aminoacid after Mutation
DDG: DG(NewProtein)-DG(WildType) in Kcal/mol
     DDG < 0: Decrease Stability
     DDG > 0: Increase Stability
T: Temperature in Celsius degrees
pH: -log[H+]

*****
*                                     *
* Capriotti E, Fariselli P and Casadio R (2005). I-Mutant2.0: predicting *
* stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *
* Nucl. Acids Res. 33: W306-W310. *
* http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant2.0/I-Mutant2.0.cgi *

```

ANEXO 6A. Avaliação dos resíduos gerados pelo diagrama de Ramachandran do modelo predito para a proteína CXCR1 não-polimórfica

Evaluation of residues

```
Residue [ 18 :PHE] (-152.20,-151.83) in Allowed region
Residue [ 38 :PRO] (-76.00,-162.06) in Allowed region
Residue [ 40 :GLU] (-53.23, -8.10) in Allowed region
Residue [ 46 :LEU] ( 44.60, 66.66) in Allowed region
Residue [ 81 :SER] (-112.52,-154.95) in Allowed region
Residue [ 112 :TRP] (-137.78,-166.56) in Allowed region
Residue [ 148 :ILE] (-87.03, -64.69) in Allowed region
Residue [ 182 :ILE] (-75.75, -76.29) in Allowed region
Residue [ 185 :GLU] ( 51.23,-155.07) in Allowed region
Residue [ 192 :SER] (-112.95, 57.94) in Allowed region
Residue [ 198 :GLU] (-54.24, 166.31) in Allowed region
Residue [ 203 :ASN] ( 41.55, 70.72) in Allowed region
Residue [ 213 :VAL] (-72.29, -64.36) in Allowed region
Residue [ 238 :LEU] (-113.45, 76.79) in Allowed region
Residue [ 242 :GLN] (-165.40, 74.82) in Allowed region
Residue [ 278 :ARG] ( 82.38, -17.99) in Allowed region
Residue [ 280 :HIS] (-82.97,-164.84) in Allowed region
Residue [ 42 :SER] (-79.65,-148.78) in Outlier region
Residue [ 116 :THR] (-82.08, -14.09) in Outlier region
Residue [ 152 :THR] ( 44.63,-168.55) in Outlier region
Residue [ 154 :THR] (-164.65, -77.17) in Outlier region
Residue [ 190 :PRO] (-123.08, 143.01) in Outlier region
Residue [ 191 :TYR] ( 26.28,-143.73) in Outlier region
Residue [ 281 :VAL] (-31.76, 87.78) in Outlier region
Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 334 ( 93.3%)
Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 17 ( 4.7%)
Number of residues in outlier region : 7 ( 2.0%)
```

RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell.

ANEXO 6B. Avaliação dos resíduos gerados pelo diagrama de Ramachandran do modelo predito para a proteína CXCR1 polimórfica

Evaluation of residues

```
Residue [ 17 :GLY] (-158.34,-132.82) in Allowed region
Residue [ 28 :THR] (-147.21, 179.44) in Allowed region
Residue [ 35 :ASP] (-162.97, 80.98) in Allowed region
Residue [ 40 :GLU] ( -53.74, -8.37) in Allowed region
Residue [ 46 :LEU] ( 44.87, 66.72) in Allowed region
Residue [ 81 :SER] (-110.40,-156.39) in Allowed region
Residue [ 112 :TRP] (-137.39,-167.53) in Allowed region
Residue [ 182 :ILE] ( -76.86, -74.57) in Allowed region
Residue [ 185 :GLU] ( 55.90,-154.66) in Allowed region
Residue [ 192 :SER] (-112.41, 56.94) in Allowed region
Residue [ 198 :GLU] ( -48.90, 163.16) in Allowed region
Residue [ 203 :ASN] ( 43.94, 68.05) in Allowed region
Residue [ 238 :LEU] (-112.12, 77.92) in Allowed region
Residue [ 239 :PHE] ( -67.87, -67.78) in Allowed region
Residue [ 241 :ALA] ( -54.67, 112.12) in Allowed region
Residue [ 242 :GLN] (-166.65, 76.65) in Allowed region
Residue [ 278 :ARG] ( 83.30, -23.49) in Allowed region
Residue [ 280 :HIS] ( -76.72,-170.99) in Allowed region
Residue [ 343 :ASP] (-109.92, 80.04) in Allowed region
Residue [ 344 :GLY] ( 145.82, 108.42) in Allowed region
Residue [ 345 :ARG] ( 177.77, 160.42) in Allowed region
Residue [ 42 :SER] ( -77.80,-145.24) in Outlier region
Residue [ 116 :THR] ( -84.23, -9.95) in Outlier region
Residue [ 152 :THR] ( 45.46,-170.37) in Outlier region
Residue [ 154 :THR] (-160.08, -94.62) in Outlier region
Residue [ 190 :PRO] (-123.18, 140.99) in Outlier region
Residue [ 191 :TYR] ( 26.92,-143.03) in Outlier region
Residue [ 281 :VAL] ( -35.93, 91.87) in Outlier region
Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 330 ( 92.2%)
Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 21 ( 5.9%)
Number of residues in outlier region : 7 ( 2.0%)
```

RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell.

ANEXO 7: Representação das possíveis interações da proteína CXCR1 e de demais proteínas-alvos através da ferramenta STRING.

Your Input:		Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining (Homology)	Score
● IL8RB	<i>C-X-C chemokine receptor type 2 ; Receptor for interleukin-8 which is a powerful neutrophil chemotactic factor. Binding of IL-8 to the receptor causes activation of neutrophils. This response is mediated via a G-protein that activates a phosphatidylinositol-calcium second messenger system. Binds to IL-8 with high affinity. Also binds with high affinity to CXCL3, GRO/MGSA and NAP-2 (By similarity) (360 aa)</i>								
Predicted Functional Partners:									
● IL8	<i>Interleukin-8 ; IL-8 is a chemotactic factor that attracts neutrophils, basophils, and T-cells, but not monocytes. It is also involve...</i>				●	●	●	●	0.997
● CXCL6	<i>C-X-C motif chemokine 6 ; Chemotactic for neutrophil granulocytes. Signals through binding and activation of its receptors (CX...</i>				●	●	●	●	0.948
● GRO1	<i>Growth-regulated protein homolog beta (153 aa)</i>				●	●	●	●	0.946
● ADRBK1	<i>Beta-adrenergic receptor kinase 1 ; Specifically phosphorylates the agonist-occupied form of the beta-adrenergic and closely r...</i>						●	●	0.946
● CCL5	<i>C-C motif chemokine 5 ; Chemoattractant for blood monocytes, memory T-helper cells and eosinophils. Causes the release of ...</i>						●	●	0.936
● CXCL12	<i>Stromal cell-derived factor 1 precursor (89 aa)</i>						●	●	0.933
● CXCL3	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 precursor (104 aa)</i>					●	●	●	0.929
● CXCL2	<i>Growth-regulated protein homolog gamma (98 aa)</i>				●	●	●	●	0.927
● ARR2	<i>Beta-arrestin-2 ; Functions in regulating agonist-mediated G-protein coupled receptor (GPCR) signaling by mediating both rece...</i>				●	●	●	●	0.925
● CCL3	<i>C-C motif chemokine 3 precursor ; Monokine with inflammatory and chemokinetic properties. Binds to CCR1, CCR4 and CCR5 (...</i>				●	●	●	●	0.923

ANEXO 8: Detalhamento da rede de interação da proteína receptora CXCR1 e demais proteínas-alvos utilizando a ferramenta KEGG PATHWAY

KEGG PATHWAY		
Ligantes	Via	Detalhamento
IL8	bta04060 - Cytokine-cytokine receptor interaction	KEGG Orthology (KO) [BR:bta00001]
	bta04062 - Chemokine signaling pathway	Environmental Information Processing Signal transduction 04072 Phospholipase D signaling pathway [PATH:bta04072] 100125580 CXCR1;
	bta04072 - Phospholipase D signaling pathway	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1 K05050 CXCR2; C-X-C chemokine receptor type 2;
	bta04144 - Endocytosis	Signaling molecules and interaction 04060 Cytokine-cytokine receptor interaction [PATH:bta04060] 100125580 CXCR1; Cellular Processes Transport and catabolism 04144 Endocytosis [PATH:bta04144] 100125580 CXCR1; Organismal Systems Immune system 04062 Chemokine signaling pathway [PATH:bta04062] 100125580 CXCR1; G protein-coupled receptors [BR:bta04030] Class A. Rhodopsin Family Chemokine CXC Chemokine 100125580 CXCR1; Cytokine receptors [BR:bta04050] Chemokine receptors CXC Chemokine 100125580 CXCR1; CD molecules [BR:bta04090] Proteins 100125580 CXCR1.

Continuação do Anexo 8.

Ligantes	Via	KEGG PATHWAY	Detalhamento
ILRB8	bta04060 - Cytokine-cytokine receptor interaction	KEGG Orthology (KO) [BR:bta00001]	
	bta04062 - Chemokine signaling pathway	Environmental Information Processing Signal transduction 04072 Phospholipase D signaling pathway	
	bta04072 - Phospholipase D signaling pathway		
	bta04144 - Endocytosis		
ARRB2	-		-
CXCL6	-		-
GRO1	-		-
CXCL3	-		-
CXCL2	-		-

Continuação do Anexo 8.

Ligantes	Via	KEGG PATHWAY	Detalhamento
CXCL12	bta04060 - Cytokine-cytokine receptor interaction	KEGG Orthology (KO) [BR:bta00001]	
	bta04062 - Chemokine signaling pathway		Environmental Information Processing Signal transduction 04064 NF-kappa B signaling pathway 613811 (CXCL12)
	bta04064 - NF-kappa B signaling pathway		
	bta04360 - Axon guidance		Signaling molecules and interaction 04060 Cytokine-cytokine receptor interaction 613811 (CXCL12)
	bta04670 - Leukocyte transendothelial migration		Organismal Systems Immune system 04670 Leukocyte transendothelial migration 613811 (CXCL12) 04672 Intestinal immune network for IgA production 613811 (CXCL12) 04062 Chemokine signaling pathway 613811 (CXCL12)
	bta04672 - Intestinal immune network for IgA production		
	bta05200 - Pathways in câncer		Human Diseases Cancers 05200 Pathways in cancer 613811 (CXCL12)
	bta05323 - Rheumatoid arthritis		Immune diseases 05323 Rheumatoid arthritis 613811 (CXCL12)
			Cytokines [BR:bta04052] Chemokines CXC chemokine Family 613811 (CXCL12)
			Glycosaminoglycan binding proteins [BR:bta00536] Heparan sulfate/Heparin Chemokines (General comment) Chemokine presentation, transcellular transport, signal transduction 613811 (CXCL12)

Continuação do Anexo 8.

Ligantes	Via	KEGG PATHWAY	Detalhamento
CCL5	bta04060 - Cytokine-cytokine receptor interaction		KEGG Orthology (KO) [BR:bta00001]
	bta04062 - Chemokine signaling pathway		Environmental Information Processing Signal transduction 04668 TNF signaling pathway 327712 (CCL5)
	bta04620 - Toll-like receptor signaling pathway		
	bta04621 - NOD-like receptor signaling pathway		Signaling molecules and interaction 04060 Cytokine-cytokine receptor interaction 327712 (CCL5)
	bta04623 - Cytosolic DNA-sensing pathway		
	bta04668 - TNF signaling pathway		Organismal Systems Immune system 04620 Toll-like receptor signaling pathway
	bta05020 - Prion diseases		
	bta05142 - Chagas disease (American trypanosomiasis)		
	bta05164 - Influenza A		
	bta05168 - Herpes simplex infection		
	bta05323 - Rheumatoid arthritis		

Continuação do Anexo 8.

Ligantes	Via	KEGG PATHWAY	Detalhamento
CCL3	bta04060 - Cytokine-cytokine receptor interaction	KEGG Orthology (KO) [BR:bta00001]	
	bta04062 - Chemokine signaling pathway		Environmental Information Processing Signaling molecules and interaction 04060
	bta04620 - Toll-like receptor signaling pathway		Cytokine-cytokine receptor interaction 100297044
	bta05132 - Salmonella infection		Organismal Systems Immune system 04620
	bta05142 - Chagas disease (American trypanosomiasis)		Toll-like receptor signaling pathway 100297044 04062
	bta05323 - Rheumatoid arthritis		Chemokine signaling pathway 100297044
			Human Diseases Immune diseases 05323
			Rheumatoid arthritis 100297044
			Infectious diseases 05132
			Salmonella infection 100297044 05142
			Chagas disease (American trypanosomiasis) 100297044
			Cytokines [BR:bta04052] Chemokines CC chemokine Family 100297044
			Glycosaminoglycan binding proteins [BR:bta00536] Heparan sulfate/Heparin Chemokines (General comment) Chemokine presentation, transcellular transport, signal transduction 100297044

APÊNCIDE