

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

DANILO DA SILVA OLIVIER

**Interação entre peptídeos de fusão da dengue e  
membranas modelo: uma visão experimental e  
computacional**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências, Área: Física aplicada à  
Medicina e Biologia.

Ribeirão Preto - SP  
2016

DANILO DA SILVA OLIVIER

**Interação entre peptídeos de fusão da dengue e  
membranas modelo: uma visão experimental e  
computacional**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

**Área de Concentração:**

Física aplicada à Medicina e Biologia.

**Orientador:**

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito.

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho.

**Versão corrigida**

Versão original disponível na FFCLRP - USP

Ribeirão Preto - SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Olivier, Danilo da Silva

Interação entre peptídeos de fusão da dengue e membranas modelo: uma visão experimental e computacional / Danilo da Silva Olivier; orientador Prof. Dr. Amando Siuiti Ito, co-orientador Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho. Ribeirão Preto - SP, 2016.

94 f.:il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Peptídeo de Fusão da Dengue.
2. Membranas Modelo.
3. Simulações por Dinâmica Molecular.
4. vírus da família *Flaviviridae*.
5. Glicoproteína E.

Nome: OLIVIER, Danilo da Silva

Título: Interação entre peptídeos de fusão da dengue e membranas modelo: uma visão experimental e computacional

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

### Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). : \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). : \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). : \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). : \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). : \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*À minha família, pelo apoio incondicional.*

# AGRADECIMENTOS

---

Ao longo da minha trajetória acadêmica e especialmente durante o doutorado contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e instituições as quais gostaria de agradecer.

Inicialmente, gostaria de agradecer aos meus pais pelo incentivo e suporte aos estudos, bem como em outras áreas da minha vida. Obrigado Sr. José Irio e Sra. Izonete por sempre estarem presentes na minha jornada. Agradeço também ao meu irmão Renan pela amizade e incentivo. Agradeço também à Suellen, por me ouvir e dar suporte em todos os momentos de dúvidas, desânimos e sucessos, pelo apoio, carinho e confiança que me deram coragem para continuar caminhando.

Ao Sergio Preza, pela amizade ao longo desses anos, pelas conversas, congressos, viagens e cervejas. Agradeço ainda pelo suporte computacional e científico.

Agradeço também ao André Pavanelli, pela amizade e companheirismo. Pelas sugestões sobre o desenvolvimento desse trabalho, paciência em ler essa Tese, além das incontáveis conversas sobre política, ciência, mercado dentre outras.

Agradeço à Cintia Silva, pela amizade, inúmeras conversas, incentivo e sugestões para escrita da Tese.

Agradeço ao Rafael Pianca, pela amizade e inúmeras conversas. Por suas sugestões e dicas ao longo desses anos todos, além dos maravilhosos almoços e jantares veganos.

Agradeço ao prof. Eduardo Cilli por fornecer parte dos peptídeos utilizados neste trabalho.

Agradeço aos colegas do grupo de Fotobiofísica: Débora, Luciana Mônico, Matheus, Marina, André Amado. Em especial ao colega Wallance Pazin, pelo suporte com alguns experimentos, bem como pelo companheirismo, conversas e

conselhos. Agradeço ainda ao Leonardo Berlim, pela boa conversa, discussões e cafés.

Estendo meus agradecimentos aos funcionários da FFCLRP-USP, bem como aos amigos da graduação e pós-graduação, em especial: Luis (Militar), Luis Felipe, Assuero, Mariana, André (americano), Natália, Éder, Haroldo, Renan, César e Priscilla. Agradecimento especial ao Bruno Favarin, pela ajuda com os experimentos de DSC.

Na USP tive conheci uma pessoa pela qual eu tenho muito respeito e consideração, meu orientador, Prof. Amando Ito, que ao longo dos últimos seis anos me deu a oportunidade de crescer como cientista e pessoa. Incluo ainda à Giusi, por todo o carinho e acolhimento

Não poderia deixar de citar o Prof. Iouri, um exemplo de pesquisador e cidadão, sempre disposto a ajudar.

Agradeço ao Prof. Antônio Costa Filho, que cooperou em diversos momentos na execução desse projeto ao emprestar o cluster para simulações e dar sugestões para o desenvolvimento desse trabalho.

Quero agradecer também à Prof<sup>a</sup> Elizabeth Arêas, que me auxiliou na ida para a Holanda. Gostaria de agradecer imensamente à prof<sup>a</sup> Ilja Voets, pela orientação e amizade; Neus Vilanova, pela ajuda com experimentos, conversas e amizade; ao prof. Albert, pelas conversas e dicas sobre dinâmica molecular e modelagem; Rochan Sinha, pela amizade, conversas, viagens e comidas indianas; Isja, pelo suporte com SAXS; Andreas pela ajuda na preparação de amostras; René Lafleur, pela ajuda com os experimentos de Cryo-TEM; Agradeço ainda aos colegas: Tiana Rado, Craig Plaisance, Barry Fitzgerald, Andris Kuciks e Atanas Atanasov; Aos funcionários da TU/e por todo o suporte durante minha temporada em Eindhoven.

À Rice University pelo acesso ao cluster BlueGene P e Q, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pelo apoio acadêmico.

Aos professores da pós-graduação, ao Ricardo dos Santos e à Nilza Marino da secretaria do Departamento de Física, por estarem sempre dispostos a ajudar e e

tirar as dúvidas; ao Aziani e Renato, pela ajuda com a oficina; ao Julio e André, pelo suporte na organização do laboratório e computadores; ao Adriano, pelo suporte no laboratório.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP, pelo suporte financeiro.

*This research forms part of the research programme of the Dutch Polymer Institute (DPI), project 772a.*

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte deste trabalho.  
Obrigado!

# RESUMO

---

OLIVIER, D. S.<sup>1,2</sup> **Interação entre peptídeos de fusão da dengue e membranas modelo: uma visão experimental e computacional.** 2016. 94 f. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - <sup>1</sup>Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP; <sup>2</sup>Instituto Holandês de Polímeros (DPI), PO Box 902, 5600 AX Eindhoven, Holanda.

A dengue é uma doença viral infecciosa predominante de regiões tropicais e subtropicais que atinge cerca de 400 milhões de pessoas anualmente. Possui quatro sorotipos diferentes do vírus (DEN.I-IV), de modo que a reinfeção por um novo sorotipo pode causar um quadro mais grave da doença: a dengue hemorrágica e a síndrome do choque da dengue. Durante o processo de infecção o vírus passa por duas etapas importantes: a primeira é a entrada dentro da célula hospedeira; a segunda etapa, é a fusão da bicamada lipídica viral com a membrana do endossomo. Ambas as etapas são mediadas pela Glicoproteína E, e é nessa proteína que se encontra o peptídeo putativo de fusão. O peptídeo possui elevado grau de homologia entre todos os membros de *Flaviviridae*. Neste trabalho, avaliamos a interação entre o peptídeo de fusão da dengue II, modificado, e membranas modelo através da combinação de técnicas experimentais (Fluorescência, SAXS, DSC e Cryo-TEM) e simulações por Dinâmica Molecular. Avaliamos a capacidade do peptídeo DEN.II 88-123 em induzir a fusão de vesículas de DMPC, DMPC:DMPG (4:1), bem como de alterar as propriedades das bicamadas lipídicas. Buscamos ainda compreender como sua estrutura secundária é afetada pela interação com as bicamadas lipídicas e qual o posicionamento dele em relação à membrana. Conseguimos mostrar que o peptídeo

é capaz de alterar a cooperatividade lipídica das membranas conforme a composição lipídica e isso pode ser relacionado a capacidade de induzir fusão entre vesículas. Entretanto, os resultados de dinâmica molecular revelaram que o peptídeo não foi capaz de induzir mudanças em parâmetros estruturais tais como: área por lipídio, espessura e parâmetro de ordem da bicamada. Durante a interação o peptídeo ficou preferencialmente na superfície da bicamada, com inserção do resíduo hidrofóbico triptofano entre as cadeias alifáticas. O peptídeo não apresentou uma conformação estrutural preferencial, embora tenha apresentado pequenas proporções de formação de folha- $\beta$  e  $\alpha$ -hélice. Em conjunto, esses resultados podem auxiliar na compreensão do modo de ação dos peptídeos de fusão.

**Palavras-chave:** 1. Peptídeo de Fusão da Dengue. 2. Membranas Modelo. 3. Simulações por Dinâmica Molecular. 4. vírus da família *Flaviviridae*. 5. Glicoproteína E.

# ABSTRACT

---

OLIVIER, D. S.<sup>1,2</sup> **Interaction between dengue fusion peptides and model membranes: an experimental and computational overview.** 2016. 94 f. Thesis (Ph.D. - Postgraduate program in Physics applied to Medicine and Biology) - <sup>1</sup>Faculty of Philosophy, Sciences and Letters, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP; <sup>2</sup>Dutch Polymer Institute (DPI), PO Box 902, 5600 AX Eindhoven, the Netherlands.

Dengue fever is viral infectious disease widespread in tropical and subtropical areas that infects nearly 400 million people annually. There are four different virus serotypes (DEN.I-IV) so that a reinfection by a different serotype may lead to a more severe case of the disease: dengue hemorrhagic fever and the dengue shock syndrome. During the infection cycle, the virus has two important steps: the first one is the entry in the host cell; the second one, is the fusion between the viral lipid bilayer and the endosomal membrane. Both steps are mediated by the E Glycoprotein, that is the host of the putative fusion peptide. The fusion peptide has a high degree of homology among the members of the *Flaviviridae*. In this work, we evaluated the interaction between modified dengue fusion peptide and model membranes through the combination of experiments (fluorescence, SAXS, DSC and Cryo-TEM), and Molecular Dynamics simulations. We evaluated the capacity of the DEN.II 88-123 peptide to promote fusion between vesicles composed by DMPC, DMPC:DMPG (4:1), as well as the ability to perturb the lipid bilayer properties. Moreover, we seek to understand how the secondary structure is affected by interaction with the model membranes and the peptide position in the membrane. We showed that the peptide is able to change the membrane lipid cooperativity depending on the

lipid composition and it may be related to the capacity of fusion induction between vesicles. However, the results revealed that the peptide does not induce changes in the structural parameters such as area per lipid, thickness and bilayer order parameter. The peptide binds to the surface of the lipid bilayer with the insertion of the tryptophan residue into the region of aliphatic chains. The peptide did not have a preferential secondary structure, although it presented a low percentage of  $\beta$ -sheet and  $\alpha$ -helix conformation. Together, these results may help to understand the mode of action of fusion peptides.

**Key-words:** 1. Dengue Fusion Peptide. 2. Model Membranes. 3. Molecular Dynamics. 4. *Flaviviridae* family virus. 5. E Glycoprotein.

# LISTA DE FIGURAS

---

1.1	Estrutura do vírus da dengue. <b>(a)</b> - Organização das Glicoproteínas E para o vírus da dengue. O total de 180 cópias da proteína E envelopam o vírus. Em vermelho está situado o peptídeo putativo de fusão. <b>(b)</b> - Detalhes da estrutura do vírus da dengue. Estruturas em vermelho e amarelo (1-200 Å) apresentam o complexo do capsídeo e RNA; Em verde (201-234 Å), a bicamada lipídica e as regiões transmembrana das proteínas M e E; Ciano (235-249 Å), região dos ectodomínios das proteínas E e M; Em azul(>250 Å), os sítios de glicosilação das proteínas E e M. Figuras adaptadas de PDB: 1K4R [1] e [2]. . . . .	2
1.2	Código genético dos <i>Flavivirus</i> e replicação. Esquema de processamento da poliproteína: em rosa são proteínas estruturais e em branco as não estruturais. Os sítios de clivagens por enzimas do citoplasma (↓), Signalase (◇), Furina (▼) e desconhecido (?) são indicados. Figura adaptada de: Rice 1996[3]. . . . .	3
1.3	Ciclo de vida dos <i>Flavivirus</i> . Figura adaptada de: MUKHOPADHYAY 2005[4]. . . . .	4
1.4	Representação esquemática da Glicoproteína E para o vírus da dengue. (A) visão lateral da Glicoproteína E em relação à bicamada lipídica e (B) visão superior da Glicoproteína E. Figura adaptada de: MUKHOPADHYAY 2005[4]. . . . .	6

1.5	Glicoproteína E dos vírus da dengue II. (A) Conformação pré-fusional dimérica do ectodomínio da Glicoproteína E. (B) Conformação pós-fusional trimérica da Glicoproteína E. Figura adaptada de: MUKHOPADHYAY 2005[4]. . . . .	6
1.6	Peptídeo de fusão da dengue II - DEN.II 88-123 com resíduo triptofano 101 (W101) destacado. Código de cores: verde - resíduos polares carregados; azul - hidrofóbicos; vermelho - polares não carregados. . . . .	8
3.1	Termogramas para vesículas unilamelares de DMPC em presença e ausência de DEN.II 88-123. $\Delta C_p$ é referente ao deslocamento vertical em entre as curvas antes e depois da adição de peptídeos. . . . .	19
3.2	Termogramas para vesículas unilamelares de DMPC:DMPG (4:1) em presença e ausência de DEN.II 88-123. $\Delta C_p$ é referente ao deslocamento vertical em entre as curvas antes e depois da adição de peptídeos. . . . .	20
3.3	Fluorescência estática para o peptídeo em meio aquoso e vesículas constituídas de DMPC, DMPG e PCPG (4:1). . . . .	21
3.4	Decaimento do tempo de vida para o peptídeo viral em diferentes ambientes. . . . .	21
3.5	Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo. (A) Peptídeo viral em solução tampão. (B) Peptídeo em interação com vesículas de DMPC. (C) Peptídeo em interação com vesículas de DMPG. (D) peptídeo em interação com vesículas mistas de PCPG (4:1). A concentração final de lipídio foi de 1mM, com a razão peptídeo:lipídio de 2 mol%. . . . .	23
3.6	A - Curva de SAXS para vesículas de DMPC em presença e ausência do peptídeo de fusão. B - Perfil de densidade eletrônica representando a bicamada lipídica na ausência e presença de peptídeos de fusão. . .	25

3.7	A - Curva de SAXS para vesículas de DMPC:DMPG (4:1) em presença e ausência do peptídeo de fusão. B - Perfil de densidade eletrônica representando a bicamada lipídica na ausência e presença de peptídeos de fusão. . . . .	26
3.8	A - Curva de SAXS para vesículas de DMPG em presença e ausência do peptídeo de fusão. B - Perfil de densidade eletrônica representando a bicamada lipídica na ausência e presença de peptídeos de fusão. . . . .	26
3.9	Crio-Microscopia Eletrônica de Transmissão - Vesículas unilamelares de DMPC:DMPG (4:1) em interação com peptídeos virais da dengue. A e B - Vesículas na ausência de peptídeos ficam espalhadas aleatoriamente. C - Após adição de peptídeos, as vesículas tendem a formar agregados. D e E - Detalhes dos agregados em maior resolução. F - Detalhe de duas vesículas no momento da fusão. . . . .	28
4.1	RMSD da cadeia principal em função do tempo para os sistemas contendo bicamadas lipídicas de DMPC em presença de 1 (A e B), 2 (C e D) ou três (E) peptídeos de fusão DEN.II - 88-123. . . . .	31
4.2	RMSF para os peptídeos virais em interação com bicamada de DMPC. (A) peptídeo para simulações PC-1A e PC-1b, (B) peptídeos P1 e P2 do sistema PC-2A, (C) peptídeos P1 e P2 para simulação PC-2B, (D) peptídeos P1, P2 e P3 para simulação PC-3A. O RMSF foi calculado utilizando como referência o carbono alfa ( $C_\alpha$ ) de cada peptídeo. . . . .	32
4.3	Perfil de Densidade Eletrônica para os sistemas estudados. Parte superior: bicamada lipídica de DMPC e água. Parte inferior: peptídeos de todos os sistemas estudados. . . . .	33
4.4	Área por lipídio para bicamada lipídica de DMPC em presença de um, dois ou três peptídeos. . . . .	35
4.5	Parâmetro de ordem para os átomos 2-14 das cadeias hidrocarbônicas de DMPC na ausência e presença de peptídeos virais. . . . .	36

4.6	Mapa de espessura para bicamada lipídica de DMPC na ausência (A), e presença de um (B), dois (C) e três (D) peptídeos simultaneamente. Cada quadro representa o plano xy da bicamada com a espessura (z) na forma de escala de cores independente. As unidades dos eixos x,y e z são em (nm). . . . .	37
4.7	Mapa de evolução temporal da estrutura secundária para os peptídeos em interação com bicamada lipídica de DMPC. . . . .	39
4.8	Evolução temporal da distância média do resíduo triptofano (W101) em relação à bicamada. A - PC-1A, B - PC-1B, C - PC-2A, D - PC-2B e E - PC-3A. As linhas pontilhadas em azul indicam a espessura da bicamada lipídica, logo, se o peptídeo está entre as linhas, isso significa uma interação com a região hidrofóbica da bicamada. . . . .	41
4.9	<i>Snapshots</i> das simulações por dinâmica molecular em tempos distintos indicando início, meio e final. (A,B e C) indicam a simulação PC-1A, (D,E e F) PC-2A e (G,H e I) PC-3A. Os lipídios são representados na cor cinza, onde as esferas simbolizam a cabeça polar. Os peptídeos são representados nas cores: P1 - verde, P2 - rosa e P3 - laranja. . . . .	42
4.10	RMSD da cadeia principal em função do tempo para os sistemas contendo bicamadas lipídicas de PCPG em presença de um (A e B), dois (C e D) ou três (E e F) cópias do peptídeo de fusão DEN.II - 88-123. . . . .	43
4.11	RMSF para os peptídeos virais em interação com bicamada de DMPC:DMPG. (A) peptídeos P1 para simulações PCPG-1A e PCPG-1B, (B) peptídeos P1 e P2 da simulação PCPG-2A, (C) peptídeos P1 e P2 para simulação PCPG-2B, (D) peptídeos P1, P2 e P3 para simulação PCPG-3A e PCPG-3B. O RMSF foi calculado utilizando como referência o carbono alfa ( $C_\alpha$ ). . . . .	44
4.12	Perfil de Densidade Eletrônica para os sistemas estudados. Parte superior: bicamada lipídica de DMPC:DMPG e água. Parte inferior: peptídeos de todos os sistemas estudados. . . . .	45

4.13	Área por lipídio para bicamada lipídica de PCPG em presença de um, dois e três peptídeos virais. . . . .	46
4.14	Parâmetro de ordem para os átomos 2-14 das cadeias hidrocarbônicas de (A) DMPC e (B) DMPG na ausência e presença de peptídeos virais. 47	47
4.15	Mapa de espessura para bicamada lipídica de PCPG na ausência (A), e presença de um (B), dois (C) e três (D) peptídeos simultaneamente. Cada quadro representa o plano xy da bicamada com a espessura (z) na forma de escala de cores independente. As unidades dos eixos x,y e z são em (nm). . . . .	48
4.16	Mapa de evolução temporal da estrutura secundária para os peptídeos em interação com bicamada lipídica de PCPG. . . . .	50
4.17	Evolução temporal da distância média do resíduo triptofano (W101) em relação à bicamada de DMPC:DMPG. A - PCPG-11, B - PCPG-1B, C - PCPG-2A, D - PCPG-2B, E - PCPG-3A e F - PCPG-3B. As linhas pontilhadas em azul indicam a espessura da bicamada lipídica, logo, se o peptídeo está entre as linhas, isso significa uma interação com a região hidrofóbica da bicamada. . . . .	51
4.18	<i>Snapshots</i> das simulações por dinâmica molecular em tempos distintos indicando início, meio e final. (A,B e C) indicam a simulação PCPG-1A, (D,E e F) PCPG-2A e (G,H e I) PCPG-3A. Os lipídios são representados em cinza (DMPC) e vermelho (DMPG), onde as esferas simbolizam a cabeça polar. Os peptídeos são representados: P1 - verde, P2 - amarelo e P3 - laranja. . . . .	53
B.1	Perfil de densidade eletrônica representando $\rho(z)$ em função da distância z ao centro da bicamada, dado pela equação B.9. Adaptado de Pabst et al. (2000). . . . .	72

# LISTA DE TABELAS

---

2.1	Composição dos sistemas simulados. . . . .	16
3.1	Parâmetros para decaimento do tempo de vida do triptofano (W101) obtidos através de análise global. Unidade de tempo (ns). O erro máximo associado ao tempo foi de 0,03 ns para $\tau_{1,2}$ , e para $\tau_3$ foi de 0,2 ns, enquanto que para os parâmetros $b_n$ foi de 0,01. Cálculo do tempo médio: $\tau_{av} = \frac{\sum_i b_i \tau_i^2}{\sum_i b_i \tau_i}$ . . . . .	22
3.2	Anisotropia de fluorescência para o peptídeo viral em interação com diferentes ambientes. Anisotropia estática ( $r$ ), tempos de correlação rotacional ( $\theta_i$ ), fator pré-exponencial ( $f_i$ ), anisotropia inicial ( $r_0$ ) e anisotropia residual ( $r_\infty$ ). O erro para as medidas de $\theta_1$ foi de 0,01 ns, enquanto que para $\theta_2$ o erro máximo foi de 0,1 ns. Todos os fatores pré-exponenciais ( $f_1$ e $f_2$ ) apresentaram erro de 0,01. . . . .	24
3.3	Parâmetros de ajuste para perfis de densidade eletrônica de vesículas unilamelares de DMPC, DMPC:DMPG (4:1) e DMPG na ausência e presença do peptídeo de fusão DEN.II 88-123. $z_H$ : centro da distribuição gaussiana referente à cabeça polar; $\sigma_H$ : distribuição média de $z_H$ ; $\sigma_C$ : distribuição média das região das cadeias hidrocarbônicas; $\rho_C$ : amplitude da gaussiana relativa à $\sigma_H$ e $\delta B$ : espessura calculada das bicamadas. A concentração final de lipídio foi de 5mM, com a razão peptídeo:lipídio de 2 mol%. . . . .	27
4.1	RMSF médio para peptídeos virais em interação com bicamadas lipídicas de DMPC. Unidade: Å. . . . .	32

# LISTA DE ABREVIATURAS

---

Cryo-TEM	Crio - Microscopia de Transmissão Eletrônica ( <i>Cryogenic Transmission Electron Microscopy</i> )
DM	Dinâmica Molecular
DMPC	Dimiristoil fosfatidil colina
DMPG	Dimiristoil fosfatidil glicerol
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging
NAMD	Nanoscale Molecular Dynamics
PCPG (4:1)	Mistura lipídica de DMPC:DMPG na proporção 4:1
RE	Retículo Endoplasmático
RMSD	Raiz quadrada do desvio quadrático médio ( <i>Root-Mean-Square Deviation</i> )
RMSF	Flutuação do desvio quadrático médio ( <i>Root-Mean-Square Fluctuation</i> )
SAXS	Espalhamento de raios-X à baixo ângulo ( <i>Small-angle X-ray Scattering</i> )
SDS	Dodecil sulfato de sódio ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )

## Aminoácidos

A	Alanina
C	Cisteína
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
L	Leucina
S	Serina
W	Triptofano

# SUMÁRIO

---

<b>Lista de Figuras</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>xviii</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Ciclo de vida dos <i>Flavivirus</i> e o processo de fusão . . . . .	3
1.2 Estrutura da Glicoproteína E . . . . .	4
1.3 Membranas Modelo . . . . .	7
1.4 Peptídeo de Fusão - DEN.II 88-123 . . . . .	7
1.5 Objetivos . . . . .	10
<b>2 Metodologia</b>	<b>11</b>
2.1 Materiais e Métodos experimentais . . . . .	11
2.1.1 Materiais . . . . .	11
2.1.2 Preparação de amostras . . . . .	11
2.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC . . . . .	12
2.1.4 Espectroscopia de Fluorescência e Anisotropia . . . . .	12
2.1.4.1 Fluorescência e Anisotropia de Fluorescência Estática	12
2.1.4.2 Decaimento de Fluorescência e Anisotropia resolvida no tempo . . . . .	13
2.1.5 Crio-Microscopia de Transmissão Eletrônica - Cryo-TEM . . . . .	13
2.1.6 Espalhamento de raio-X à baixo ângulo - SAXS . . . . .	14
2.2 Simulações Computacionais . . . . .	15
2.2.1 Peptídeo de Fusão . . . . .	15

2.2.2	Preparação das bicamadas lipídicas . . . . .	15
2.2.3	Membranas em interação com peptídeos . . . . .	16
2.2.4	Condições de Simulação . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Peptídeo de fusão em interação com membranas modelo</b>	<b>18</b>
3.1	Calorimetria exploratória diferencial - DSC . . . . .	18
3.2	Fluorescência e Anisotropia de Fluorescência . . . . .	19
3.2.1	Fluorescência estática e Decaimento do tempo de vida . . . . .	19
3.2.2	Anisotropia de fluorescência estática e resolvida no tempo . . . . .	22
3.3	Espalhamento de raios-x à baixo ângulo - SAXS . . . . .	24
3.4	Crio-Microscopia Eletrônica de Transmissão - Cryo-TEM . . . . .	27
<b>4</b>	<b>Dinâmica Molecular</b>	<b>29</b>
4.1	Peptídeos virais em interação com bicamada lipídica DMPC . . . . .	30
4.1.1	Estabilidade do Sistema . . . . .	30
4.1.1.1	RMSD e RMSF . . . . .	30
4.1.2	Alterações da Bicamada Lipídica de DMPC . . . . .	33
4.1.2.1	Distribuição de Densidade Eletrônica . . . . .	33
4.1.2.2	Área por Lipídio . . . . .	34
4.1.2.3	Parâmetro de Ordem . . . . .	35
4.1.2.4	Espessura da Bicamada Lipídica . . . . .	36
4.1.3	Modificações Estruturais e Inserção dos Peptídeos de Fusão . . . . .	37
4.1.3.1	Estrutura Secundária . . . . .	38
4.1.3.2	Inserção dos Peptídeos na Bicamada Lipídica de DMPC . . . . .	40
4.2	Peptídeos virais em interação com bicamada lipídica mista de PCPG . . . . .	43
4.2.1	Estabilidade do Sistema . . . . .	43
4.2.1.1	RMSD e RMSF . . . . .	43
4.2.2	Alterações da bicamada lipídica de PCPG (4:1) . . . . .	45
4.2.2.1	Distribuição de Densidade Eletrônica . . . . .	45
4.2.2.2	Área por Lipídio . . . . .	46
4.2.2.3	Parâmetro de Ordem . . . . .	47
4.2.2.4	Espessura da Bicamada Lipídica . . . . .	48

4.2.3	Modificações Estruturais e Inserção dos Peptídeos de Fusão . . .	49
4.2.3.1	Estrutura Secundária . . . . .	49
4.2.3.2	Inserção dos Peptídeos na Bicamada Lipídica de PCPG	51
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões e Perspectivas</b>	<b>59</b>
6.1	Conclusões . . . . .	59
6.2	Perspectivas . . . . .	60
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>61</b>
	<b>Apêndice A - Fluorescência com resolução temporal</b>	<b>69</b>
	<b>Apêndice B - Modelo para obtenção do perfil de densidade eletrônica a partir das curvas de SAXS</b>	<b>71</b>

## INTRODUÇÃO

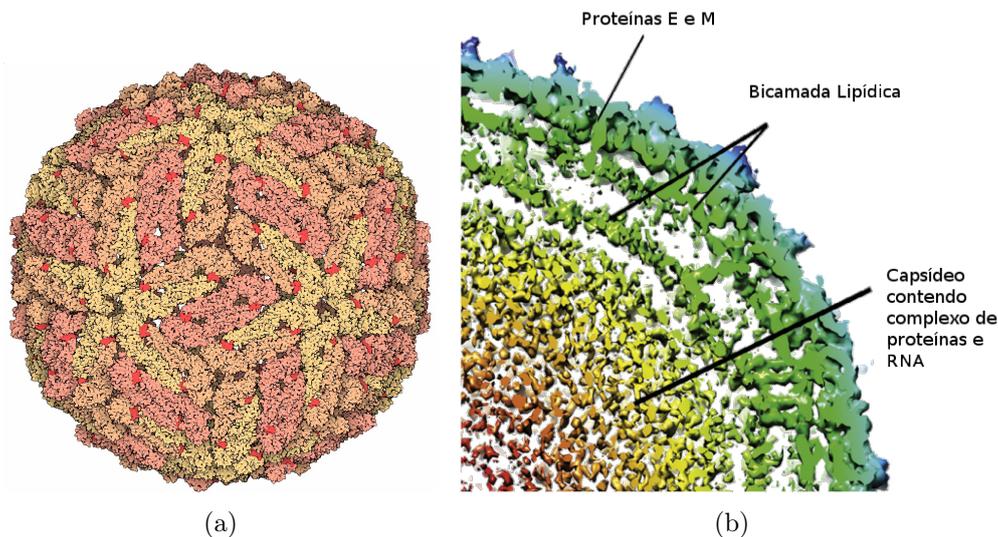
---

A dengue é uma doença viral infecciosa, predominante em áreas tropicais e subtropicais, transmitida pelos mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus*, causada pelo vírus de mesmo nome. É uma doença espalhada por uma área onde vivem 40% da população mundial, sendo que estimativas apontam que cerca de 400 milhões de pessoas são infectadas anualmente em mais de 100 países[5].

O vírus da dengue é membro da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus*, que possui mais de 70 vírus causadores de diversas patologias de grande importância médica, tais como: vírus da febre amarela, encefalite Japonesa, vírus do Oeste do Nilo, dentre outros[6, 3, 7]. Dentro desse gênero o vírus da dengue é o que possui a maior quantidade de casos de infecção e índices de mortalidade. Atualmente conhecemos quatro sorotipos para o vírus da dengue (DEN.I-IV).

A doença pode ser assintomática ou apresentar quadros clínicos de moderados a severos, onde com o aumento da fragilidade e permeabilidade vascular, além de problemas de coagulação levam a chamada dengue hemorrágica, que pode evoluir para a síndrome do choque da dengue[8]. Os quadros mais graves são comuns quando há uma nova infecção por um vírus com sorotipo diferente do contágio anterior, onde os anticorpos já existentes não conseguem neutralizar os vírus e acabam amplificando a doença[9]. A dengue, em sua forma mais agressiva, atinge cerca de 500 mil pessoas por ano com uma taxa de mortalidade de 10%. Ao contrário de outras doenças causadas pelos *Flavivirus*, para a dengue não existe um tratamento ou vacina eficaz contra todos os sorotipos[6].

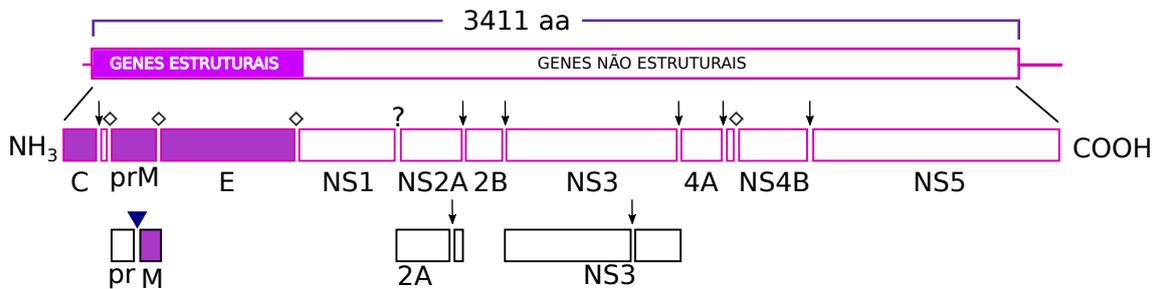
Existem algumas características comuns aos *Flavivirus*: são partículas virais em formato icosaédrico de pequena dimensão ( $\approx 50\text{nm}$ ), onde tem-se um denso núcleo contendo proteínas não estruturais e o material genético viral, uma fita simples positiva de RNA protegidos por proteínas estruturais do capsídeo (C)[3]. Este capsídeo é recoberto por uma bicamada lipídica e acima desta estão situadas as proteínas estruturais: Glicoproteína E (Envelope - 53 kDa) e M (Membrana - 8 kDa) (ver Figura 1.1)[3]. Cada partícula possui 90 homodímeros da Glicoproteína E em arranjo conformacional paralelo à bicamada lipídica viral; Essas proteínas são arranjadas em 30 grupamentos onde os homodímeros são posicionados lado a lado[10].



**Figura 1.1:** Estrutura do vírus da dengue. (a) - Organização das Glicoproteínas E para o vírus da dengue. O total de 180 cópias da proteína E envelopam o vírus. Em vermelho está situado o peptídeo putativo de fusão. (b) - Detalhes da estrutura do vírus da dengue. Estruturas em vermelho e amarelo (1-200 Å) apresentam o complexo do capsídeo e RNA; Em verde (201-234 Å), a bicamada lipídica e as regiões transmembrana das proteínas M e E; Ciano (235-249 Å), região dos ectodomínios das proteínas E e M; Em azul (>250 Å), os sítios de glicosilação das proteínas E e M. Figuras adaptadas de PDB: 1K4R [1] e [2].

O material genético, com aproximadamente 11 mil nucleotídeos, quando codificado gera uma poliproteína contendo 3.411 aminoácidos, que quando processada irá se dividir em 10 proteínas (Figura 1.2). Desse conjunto de proteínas, três são estruturais: Capsídeo (100 aminoácidos), Membrana (75 aminoácidos) e

Glicoproteína E (495 aminoácidos); e outras sete não estruturais que irão auxiliar na replicação do vírus[4, 10].



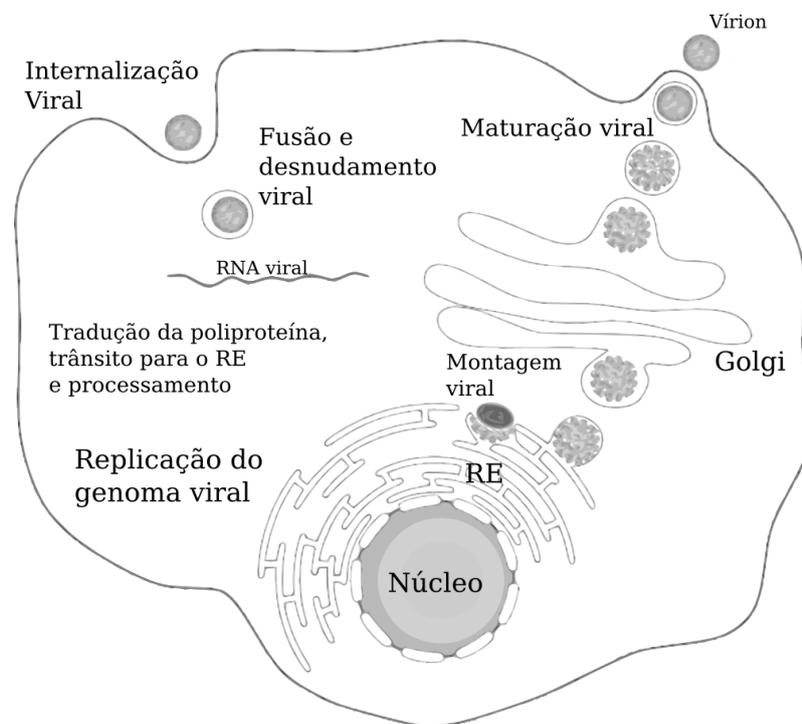
**Figura 1.2:** Código genético dos *Flavivirus* e replicação. Esquema de processamento da poliproteína: em rosa são proteínas estruturais e em branco as não estruturais. Os sítios de clivagens por enzimas do citoplasma (↓), Signalase (◇), Furina (▼) e desconhecido (?) são indicados. Figura adaptada de: Rice 1996[3].

## 1.1 Ciclo de vida dos *Flavivirus* e o processo de fusão

Durante o ciclo de vida dos *Flavivirus* dois processos são de fundamental importância para que este seja bem sucedido: (i) a ligação do vírus com a superfície celular para que ocorra a internalização do vírus; (ii) fusão entre a bicamada lipídica viral e a membrana do endossomo. A Glicoproteína E é responsável pelas etapas de infecção celular e pelo processo de fusão entre a bicamada lipídica viral e membrana do endossomo.

Em seu ciclo de vida (Figura 1.3) o vírus inicialmente é absorvido pela célula através da endocitose mediada pela proteína clatrina. Essa proteína é a mediadora responsável pela formação de uma invaginação da membrana celular que é fechada pela ação da enzima dinâmina, formando assim uma vesícula - ou endossomo - dentro da célula hospedeira[10, 11]. Uma vez dentro do endossomo, onde ambiente é acidificado, a Glicoproteína E sofre um rearranjo conformacional induzido pela protonação de histidinas presentes na Glicoproteína E; essa mudança conformacional é irreversível e expõe o peptídeo de fusão[12, 13].

Com o peptídeo exposto, inicia-se a fusão entre a bicamada lipídica do vírus e a membrana do endossomo com subsequente liberação do capsídeo viral dentro do citoplasma. O desnudamento separa o RNA das proteínas do capsídeo, deste modo a maquinaria celular inicia o processo de tradução do material genético, seguido do transporte para o retículo endoplasmático (RE). No RE ocorre a montagem de partículas virais, onde as novas moléculas de RNA e proteínas são montadas. Posteriormente, partículas virais não infecciosas, imaturas e subpartículas virais são transportadas através do complexo de Golgi, onde sofrem as últimas clivagens por proteases furina se transformando em partículas maduras e infecciosas. Na última etapa, esses vírions são lançados para fora da célula via exocitose[3, 4].



**Figura 1.3:** *Ciclo de vida dos Flavivirus. Figura adaptada de: MUKHOPADHYAY 2005[4].*

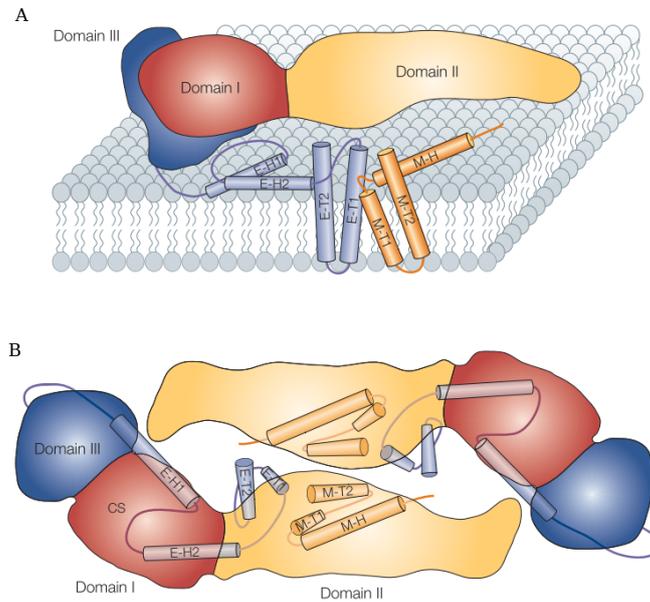
## 1.2 Estrutura da Glicoproteína E

Existem três classes de Glicoproteínas virais de fusão, sendo que a distinção entre elas se dá pela predominância do tipo de estrutura secundária majoritária.

Deste modo, proteínas de Classe I possuem predominantemente estruturas hélice- $\alpha$ , como exemplo o vírus *influenza*; classe II, possuem predominantemente estruturas secundárias formadas por folhas- $\beta$ , como exemplo o vírus da febre amarela e dengue; classe III é uma combinação das classes I e II, possuindo em sua estrutura tanto hélices- $\alpha$  quanto folhas- $\beta$ [14, 15, 16]. Dentre as classes, a Glicoproteína E dos *Flavivirus* são classificadas como classe II. A Glicoproteína E para o vírus da dengue possui regiões transmembranares e um ectodomínio com cerca de 395 resíduos aminoácidos. Quando presente no vírus maduro a Glicoproteína E é formada pela combinação de monômeros em orientação antiparalela, tendo como estrutura quaternária um dímero. Cada subunidade é formada principalmente por fitas  $\beta$  e contém três domínios distintos: DI, DII e DIII que possuem ligações entre si em formato de dobradiças (Figura 1.4 A e B). O domínio DI constitui a porção central da molécula, além de conter a região amino-terminal; o domínio DII possui formato alongado - *finger like* - e está relacionado com a interação entre os dímeros e trímeros formados ao longo do ciclo de vida; e o domínio DIII contém o grupo carboxi-terminal, além de ser um domínio tipo imunoglobulina (*Ig*) - *like*, que é creditado conter sítios receptores-ligantes.

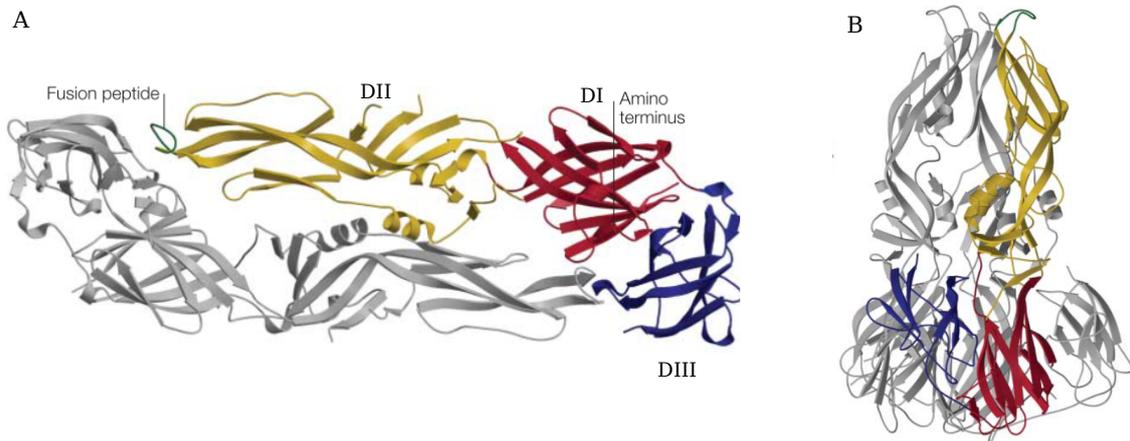
Quando na forma madura o peptídeo de fusão, localizado na extremidade do domínio DII, está protegido por um pacote formado pelos domínios DI e DIII da subunidade complementar. O baixo pH do endossomo modifica o estado de protonação de aminoácidos sensores de pH (H146 e H323), que desestabiliza o estado de dímeros iniciando a dissociação reversível em monômeros (Figura 1.5)[17, 14]. Um rearranjo conformacional na Glicoproteína E formará trímeros com monômeros dispostos paralelamente entre si e perpendicularmente ao plano da bicamada lipídica viral. Nesta conformação o peptídeo de fusão está exposto e pronto para promover a fusão entre a membrana do endossomo e a bicamada lipídica viral.

Uma vez no ambiente interno ao endossomo a Glicoproteína E será responsável por colocar em contato a complexa membrana do endossomo e a bicamada lipídica viral, culminando no processo de fusão, o uso de modelos simplificados se faz necessário. Esses modelos, que tem sido bastante difundido na literatura, compreendem o uso de membranas modelo e de peptídeos responsáveis



**Figura 1.4:** Representação esquemática da Glicoproteína E para o vírus da dengue. (A) visão lateral da Glicoproteína E em relação à bicamada lipídica e (B) visão superior da Glicoproteína E. Figura adaptada de: MUKHOPADHYAY 2005[4].

pela fusão[18, 19].



**Figura 1.5:** Glicoproteína E dos vírus da dengue II. (A) Conformação pré-fusional dimérica do ectodomínio da Glicoproteína E. (B) Conformação pós-fusional trimérica da Glicoproteína E. Figura adaptada de: MUKHOPADHYAY 2005[4].

## 1.3 Membranas Modelo

As biomembranas são uma complexa e fina barreira protetora constituída de lipídios e proteínas que limita a interação entre o interior e exterior celular[20, 21]. Possuem uma permeabilidade seletiva permitindo a passagem de algumas moléculas como por exemplo a água. Além disso, as proteínas que podem estar ancoradas, ou mesmo ser uma proteína integral de membrana irão desempenhar uma série de funções específicas como a passagem de íons para manter o equilíbrio osmótico celular. Os lipídios são moléculas anfifílicas, isto é, possuem uma região que tem maior afinidade com ambientes polares que chamamos de cabeça polar, e outra com menor afinidade, que chamamos de cauda apolar. A variação nas características dos lipídios tais como a presença de carga na cabeça polar: carga líquida zero (zwitteriônicos ou sem cargas), negativa (aniônicos) e positiva (catiônicos); formato da cabeça, tamanho da cauda e possuir ou não insaturações irão modular o tipo de membrana, ou seja, cada biomembrana possui um conjunto de lipídios característicos para cada célula.

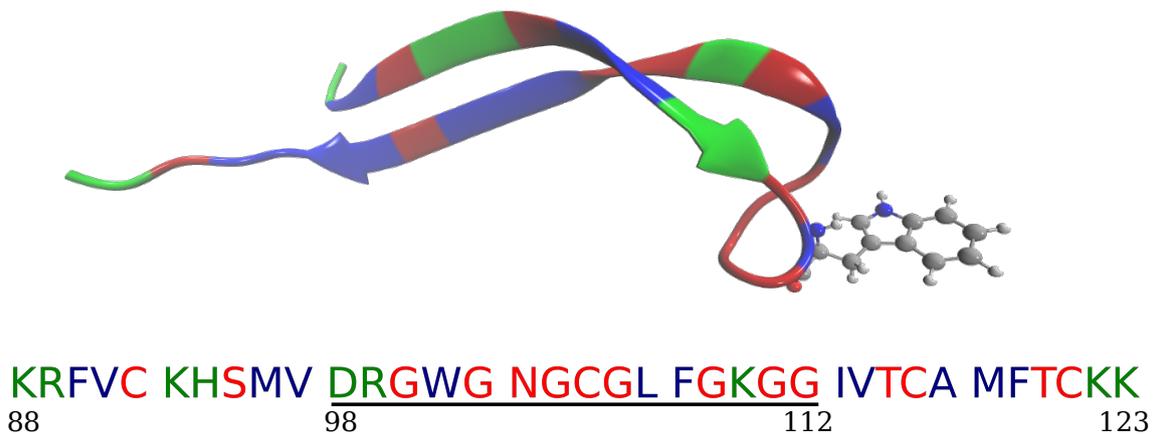
No contexto histórico, a proposição de uma bicamada lipídica foi feita pela primeira vez em 1925 por Gorter e Grendel[21]. Após quase cinco décadas de investigação, Singer e Nicolson propuseram um modelo explicativo para a membrana plasmática contendo lipídios e proteínas, chamado de modelo do mosaico fluido[22].

Os lipídios se agregam espontaneamente em bicamadas lipídicas quando em ambiente aquoso. Essas formações em formato esférico - chamadas de vesículas - são de grande interesse, pois pela facilidade de modulação na escolha dos lipídios acabam por constituir um modelo de membrana simplificado. As vesículas são classificadas quanto ao seu tamanho em pequenas (<100 nm - SUV), grandes (100-1000 nm - LUV) e gigantes (>1000 nm - GUV).

## 1.4 Peptídeo de Fusão - DEN.II 88-123

Para os sorotipos do vírus da dengue e outros membros do gênero dos *Flavivirus* a sequência de aminoácidos entre 98 e 112 - localizada na extremidade do domínio DII - é chamada de *loop* de fusão ou peptídeo de fusão (Figura 1.6). Essa sequência é altamente conservada dentre os membros da mesma família,

apresentando homologia de quase 100%. Entretanto, algumas diferenças locais são encontradas para determinados membros, como por exemplo a encefalite por carrapatos que possui o resíduo aminoácido histidina (H104), no lugar de uma glicina (G104); além de outras mutações encontradas no carboxi-terminal onde podem conter glicinas (G112) ou serinas (S112).



**Figura 1.6:** Peptídeo de fusão da dengue II - DEN.II 88-123 com resíduo triptofano 101 (W101) destacado. Código de cores: verde - resíduos polares carregados; azul - hidrofóbicos; vermelho - polares não carregados.

O peptídeo original, sequência 98-112, assim como mutações tem sido amplamente estudados nos últimos anos como agentes fusogênicos. Mutações realizadas em proteínas trocando o resíduo leucina 107 (L107) mostraram a redução na atividade fusogênica[23]. Utilizando os peptídeos de fusão e vesículas unilamelares, Stauffer et al. (2008) estudaram a influência da composição lipídica, bem como a influência no tamanho da cadeia peptídica para a fusão[24]. Considerando o sorotipo II do vírus da dengue (DEN.II), foram selecionados os resíduos que flanqueiam as regiões amino e carboxi-terminal gerando assim um peptídeo sintético de maior comprimento. Além da mudança no comprimento, todos os resíduos cisteínas foram trocados por serinas, desse modo quebrando a ligação dissulfeto e possibilitando a maior mobilidade do peptídeo. O peptídeo contendo mais aminoácidos - DEN.II 88-123 - apresentou uma maior atividade de fusão quando comparado ao peptídeo com menos resíduos, isto pode ser devido a formação de estruturas  $\beta$  que dão maior estabilidade ao peptídeo viral. A composição

lipídica das membranas modelo também apresentaram influência na interação peptídeo-membrana, indicando que a presença de lipídios negativamente carregados, fosfatidilglicerol (PG), aumentam os índices de fusão quando comparados aos lipídios zwitteriônicos fosfatidilcolina (PC)[24]. Posteriormente, estudos realizados por Melo et al. (2009) indicaram que a presença do resíduo hidrofóbico tripfotano (W101) é fundamental para a conservação do loop de fusão; a justificativa é que o conjunto dos resíduos hidrofóbicos W101, L107 e fenilalanina (F108) ajudam a estabilizar e manter o arranjo conformacional dos resíduos de glicina (G102 e G106). Esta constatação foi verificada pela alteração do resíduo W101 por alalina (A101)[25].

Após o rearranjo conformacional a proteína na conformação pré-fusão expõe um trímero de peptídeos de fusão. Estudos realizados por Pan et al. (2010) avaliaram o índice de fusão de trímeros de peptídeos frente aos peptídeos em monômeros e peptídeos contendo mutantes nas posições 105 e 107[26]. Foi observado que alguns resíduos ficaram na conformação fita- $\beta$  quando na presença de um sistema ternário POPC/POPE/colesterol. Estudos de Allison et al. (2001) corroboraram que a mutação do resíduo L107 diminui a atividade fusogênica e mostraram que a composição em trímeros possui maior índice de fusão do que quando os peptídeos não estão complexados[?]. Ainda em concordância com os estudos anteriores, Mendes et al. (2012) apresentaram dados que indicam uma maior flexibilidade dos peptídeos virais. Os estudos envolvendo fluorescência apresentaram uma preferência do resíduo W101 por ambientes menos polares, sugerindo a sua inserção ao menos que parcial dentro de bicamadas lipídicas e sistemas micelares de SDS[24, 27]. Seguindo as mutações nos resíduos, Mendes et al. mostraram que a mudança de histidina para glicina na posição 104 não teve influência significativa na interação entre os peptídeos e miméticos de membrana. Além disso, não foi observado uma estrutura preferencial para o peptídeo de fusão contendo apenas 12 resíduos[27].

O estado da arte sobre interação de peptídeos virais dos *Flavivirus* com sistemas modelo mostram informações relevantes quanto à alteração de resíduos e a influência dessas mudanças no processo de fusão. Sabemos ainda que há uma determinada seletividade que modula a interação conforme o tipo de lipídio e, além disso, que a formação de trímeros tem maior poder de ação fusogênica do que peptídeos isolados. Entretanto, alguns pontos sobre o mecanismo de fusão ainda não

foram elucidados tais como as mudanças estruturais sofridas pela membrana modelo pela ação do peptídeo viral; ou ainda algumas divergências sobre a conformação preferencial e posicionamento do peptídeo de fusão na presença dos diferentes modelos.

## 1.5 Objetivos

Considerando o estado atual de conhecimento das interações entre os peptídeos virais do gênero dos *Flavivirus* com sistemas modelo, a partir da combinação de dados experimentais e simulações computacionais por dinâmica molecular buscamos preencher as lacunas observadas na literatura. Podemos pontuar os objetivos na seguinte forma:

- Investigar a interação do peptídeo viral DEN.II 88-123 com membranas modelo de composição DMPC, DMPG e mistura de DMPC:DMPG (4:1), aqui chamada de PCPG (4:1).
- Avaliar as propriedades estruturais das bicamadas lipídicas na ausência e presença do peptídeo viral, através de técnicas experimentais de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espalhamento de raio-x a baixo ângulo (SAXS) e simulações por dinâmica molecular (DM);
- Explorar propriedades espectroscópicas do aminoácido triptofano (W101), presente no peptídeo viral com objetivo de obter informações relevantes sobre o microambiente membranar;
- A partir de simulações por dinâmica molecular explorar como a concentração de peptídeos afetam as bicamadas lipídicas de composição: DMPC e PCPG (4:1); avaliar ainda as mudanças conformacionais nos peptídeos pela interação com as bicamadas lipídicas.

## METODOLOGIA

---

Este capítulo é dividido em duas seções: experimental e computacional. Na primeira etapa, apresentamos os materiais e métodos empregados na preparação de amostras, aquisição e análise de dados experimentais. Posteriormente, os métodos computacionais utilizados nas simulações por Dinâmica Molecular (DM), bem como as condições de simulação serão descritos.

### 2.1 Materiais e Métodos experimentais

#### 2.1.1 Materiais

**Lipídios** 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) e 1,ditetradecanoyl-2-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DMPG) adquiridos junto à Avanti Polar Lipids (Alabamaster, AL, USA). **Peptídeos** - Os peptídeos de fusão modificados, DEN.II 88-123, foram adquiridos junto à Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento (Diadema - SP). Os solventes orgânicos utilizados são de qualidade analítica.

#### 2.1.2 Preparação de amostras

As vesículas unilamelares grandes foram preparadas pelo método de extrusão[28]. No preparo, concentrações desejadas de lipídios foram ressuspensos em clorofórmio e secos por fluxo de  $N_2$  para formação de filme na parede dos tubos de ensaio. Para a formação de filmes com alguma fração de lipídios de DMPG, a combinação clorofórmio:metanol (2:1) foi utilizada para formação da suspensão. Após formação do filme, o tubo foi submetido ao vácuo por três horas

para eliminação de resíduos solventes. Em sequência, o filme foi reidratado com tampão Citrato (10 mM, pH 5,5), agitado e aquecido até 40 °C para formação de vesículas multilamelares. Posteriormente, utilizando o mini-extrusor da marca Avanti Polar Lipids obtivemos vesículas unilamelares e de tamanho uniforme através da filtração por 21 vezes em filtro de 50 nm de diâmetro. As vesículas foram utilizadas em um intervalo de tempo de até 7 dias.

### 2.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC

Propriedades termotrópicas da interação peptídeo-membrana foram investigadas através da técnica de DSC, fornecendo informações sobre as mudanças de fase térmicas no empacotamento lipídico induzidas pela presença do peptídeo viral[29]. Neste trabalho estudamos dois sistemas vesiculares: DMPC, DMPC:DMPG (4:1) na presença e ausência do peptídeo de fusão DEN.II 88-123. Mantendo-se a concentração lipídica final em 5 mM, com razão peptídeo/lipídio de 1 mol%, exploramos a região de temperaturas entre 0 e 40 °C. Como controle, medimos as vesículas na ausência de peptídeos e comparamos com as medidas realizadas em presença de peptídeos. O equipamento empregado nos experimentos foi Nano-DSC II - Calorimetry Sciences Corporation - Lindon, Utah, EUA, e as análises das curvas de DSC foram realizadas com o software CpCalc V2.2.0.10. As medidas foram realizadas junto ao Laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada: Sistemas Miméticos de Biomembranas do Departamento de Química da FFCLRP, USP de Ribeirão Preto.

### 2.1.4 Espectroscopia de Fluorescência e Anisotropia

#### 2.1.4.1 Fluorescência e Anisotropia de Fluorescência Estática

Técnicas de espectroscopia fluorescente constituem uma importante ferramenta na análise do micro-ambiente em que uma sonda está inserida[30, 31]. O peptídeo DEN.II 88-123 possui em sua sequência o aminoácido natural triptofano (W101) que é uma sonda fluorescente. As propriedades fluorescentes do triptofano tais como: intensidade, comprimento de onda e anisotropia de fluorescência se alteram conforme a polaridade do meio. Neste contexto, estudamos a interação do peptídeo viral em solução aquosa e na presença de vesículas de DMPC,

DMPC:DMPG (4:1) com razão peptídeo/lipídio de 2 mol% e concentração lipídica de 1 mM. Para a fluorescência estática, as amostras foram excitadas em 280 nm e coletadas em 350 nm. Enquanto que, a anisotropia estática foi coletada na região entre 340-360 nm. Os dados foram adquiridos em um equipamento Hitachi F7000 junto ao Laboratório de Fotobiofísica do Departamento de Física da FFCLRP, USP.

#### **2.1.4.2 Decaimento de Fluorescência e Anisotropia resolvida no tempo**

O decaimento de fluorescência e anisotropia foram medidos usando o método de contagem de fótons únicos com correlação temporal. A fonte de excitação utilizada foi um laser pulsado Tsunami (Spectra Physics) bombeado por um laser de estado sólido Millennia (Spectra Physics). A frequência de pulsos e o comprimento de onda foram ajustados por triplicadores de frequência. A emissão foi detectada por uma fotomultiplicadora Hamamatsu e correlacionadas no tempo com os pulsos de excitação por meio de um conversor tempo-amplitude. O comprimento de excitação foi de 290 nm para o triptofano e adquirido em 350 nm. A análise foi realizada pelo software fornecido pela Edinburgh Instruments, onde os decaimentos de cada amostra foram ajustados em curvas multiexponenciais. Para a anisotropia de fluorescência resolvida no tempo, utilizou-se de um compensador Soleil-Babinet no feixe de excitação e um prisma Glan-Taykis no feixe de emissão. Para obter maiores detalhes sobre o modelo de ajuste veja o Apêndice A. Todos os experimentos envolvendo espectroscopia de fluorescência foram realizados em banho térmico a 40 °C.

#### **2.1.5 Crio-Microscopia de Transmissão Eletrônica - Cryo-TEM**

A partir da Crio-microscopia de transmissão eletrônica medimos amostras de vesículas unilamelares de DMPC:DMPG na presença e ausência de peptídeos virais com razão molar de 2% e concentração final de lipídio de 0,5 mM. Filmes vitrificados foram preparados em um equipamento 'Vitrobot', com temperatura de 22 °C e umidade de 100%. Os filmes vitrificados foram transferidos para um porta amostra criogênico (Gatan 626) e as medidas foram realizadas abaixo de -170 °C em um microscópio Tecnai Sphera operando em 200 kV. Os experimentos foram

realizados no *Institute for Macromolecular and Organic Chemistry*, Eindhoven - Holanda.

### 2.1.6 Espalhamento de raio-X à baixo ângulo - SAXS

O espalhamento de raio-x foi empregado no estudo da estrutura das membranas formadoras das vesículas lipídicas unilamelares na ausência e presença do peptídeo viral DEN.II 88-123[32, 33]. Para realização dos experimentos utilizamos o feixe de brilho elevado ID02 localizado no Sincrotron ESFR, Grenoble - França[34]. O feixe ID02 opera a 12,46 keV, com fluxo de fótons de  $10^{12}s^{-1}$ , comprimento de onda de 0,1 nm. A distância entre amostra e detector foi de 2,86 m, varrendo uma região do vetor q entre 0,064 e 3,85  $nm^{-1}$ . A intensidade de espalhamento é medida em função do vetor de espalhamento:

$$q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad (2.1)$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda do feixe incidente e  $2\theta$  é o ângulo de espalhamento. As amostras com concentração de 5mmol/L de lípidios e razão peptídeo/lipídio de 1 mol% foram medidas utilizando um capilar de 1,9 mm mantido a temperatura de 40 °C. Os diagramas bidimensionais foram normalizados considerando a intensidade absoluta, a função resposta do detector, a distância amostra-detector, e os feixes incidentes e transmitidos[34]. Os dados finais de SAXS foram obtidos a partir da média das 10 melhores medidas, com um total de tempo de exposição de 3 s. Ainda nesta etapa, foram considerados as curvas que sofreram menor dano pela exposição à radiação. De modo semelhante, realizamos as mesmas medidas para a solução tampão, com o objetivo de subtraí-lo das curvas de espalhamento das amostras.

Para o ajuste dos dados experimentais, utilizamos o Programa de análise global (GAP), versão 1.3, fornecido pelo Dr. Georg Pabst, do *Institute of Molecular Bioscience, University of Graz, Áustria*. O modelo usado para ajuste dos diagramas foi baseado na teoria de Caillé modificada (MCT). O ajuste permitiu a obtenção de parâmetros relacionados ao perfil de densidade eletrônica das cabeças polares e das cadeias acílicas dos lípidios nas vesículas. Com estes parâmetros foi possível calcular

a espessura da membrana ( $d_B$ ) através da seguinte equação[35]:

$$d_B = 2(z_H + 2\sigma_H) \quad (2.2)$$

onde,  $z_H$  é a posição da cabeça polar, medida a partir do centro da bicamada, e  $\sigma_H$  corresponde à largura à meia altura da gaussiana da distribuição da densidade eletrônica sobre a região da cabeça polar. Para descrição do modelo de ajuste veja o Apêndice B.

## 2.2 Simulações Computacionais

O estudo computacional foi realizado através de simulações por Dinâmica Molecular para os sistemas peptídeo-membranas modelo.

### 2.2.1 Peptídeo de Fusão

O peptídeo (DEN.II 88-123) de sequência: KRFVC.KHSMV.DRGWG.NGCCG.LFGKGG.IVTCA.MFTCKK, foi extraído da estrutura cristalográfica da Glicoproteína E do vírus da Dengue sorotipo II em sua conformação pós-fusão e seu código PDB é 1Ok8[17]. Na etapa de preparação do peptídeo duas modificações foram realizadas: a primeira foi a mutação de todos os aminoácidos cisteína (C) por serina (S), dando maior mobilidade ao peptídeo, pois elimina a ponte dissulfeto existente; em segundo lugar, modificamos o estado de protonação da histidina para mimetizar o pH do meio onde o vírus é ativo ( $\approx 5,5$ ). Neste estado de protonação o peptídeo viral fica com carga líquida positiva igual a 7 e. As cargas parciais são sempre proporcionais a carga do elétron.

### 2.2.2 Preparação das bicamadas lipídicas

Com o interesse em estudar as diferenças na interação peptídeo-bicamada, preparamos duas membranas com diferente composição lipídica: a primeira bicamada de Dimiristoil fosfatidil colina (DMPC) contendo 64 lipídios por camada. A segunda bicamada é uma mistura de um fosfolipídio carregado negativamente: Dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG) com DMPC. Neste caso, cada monocamada contém 80 lipídios de DMPC e 20 de DMPG, gerando uma razão

DMPC:DMPG (4:1). Para construção de ambos os sistemas utilizou-se o servidor **CHARMM-GUI**[36] que gerou arquivos de entrada contendo as bicamadas já solvatadas e com concentração salina de 150 mM. As membranas foram então simuladas por DM até a estabilização de sua área por cabeça lipídica, parâmetro de ordem e densidade eletrônica, que foram comparados à literatura e analisados conforme proposto por Porasso et al. (2012)[37].

### 2.2.3 Membranas em interação com peptídeos

Após a estabilização da membrana, os sistemas membrana-peptídeo foram construídos variando-se a quantidade de peptídeos ( $N=1,2,3$ ), o tipo de membrana (DMPC ou PCPG) e considerando duas opções para concentração salina: 0 ou 150mM NaCl, conforme apresentado na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1:** *Composição dos sistemas simulados.*

Sistema	Átomos	Pep./Lip.	Nº Água	Íons Na/Cl	Designação
DMPC	34232	-/128	8099	18/18	DMPC
PCPG (4:1)	47152	-/200	8000	62/22	PCPG
DMPC+1Pep.	34661	1/128	6321	18/25	PC-1A
DMPC+2Pep.	35198	2/128	6314	18/34	PC-2A
DMPC+2Pep.	35198	2/128	6314	18/34	PC-2B
DMPC+1Pep.	34733	1/128	6357	-/7	PC-1B
DMPC+3Pep.	35807	3/128	6343	-/21	PC-3A
PCPG+1Pep.	47465	1/200	7839	55/22	PCPG-1A
PCPG+2Pep.	48070	2/200	7846	48/22	PCPG-2A
PCPG+3Pep.	48595	3/200	7853	41/22	PCPG-3A
PCPG+1Pep.	47553	1/200	7883	33/-	PCPG-1B
PCPG+2Pep.	48118	2/200	7890	26/-	PCPG-2B
PCPG+3Pep.	48683	3/200	7897	19/-	PCPG-3B

### 2.2.4 Condições de Simulação

Em todas as simulações aplicamos o *ensemble* NPT ( $T = 318$  K,  $P = 1$  bar), sendo utilizados os banhos de pressão (Nosé-Hoover Langevin) e temperatura (Langevin). As interações eletrostáticas de átomos não ligados foram controladas pelo método Particle-Mesh Ewald (PME) e truncadas em  $12 \text{ \AA}$ , com decaimento a partir de  $10 \text{ \AA}$ . Para realização das simulações o pacote computacional NAMD[38] foi utilizado em conjunto com o campo de força CHARMM 36[39, 40]. A minimização de energia dos sistemas foi realizada para eliminação de maus contatos e, posteriormente, a dinâmica de interação para cada sistema foi monitorada durante 500 ns, com passo de 2 fs. Para análise das simulações, utilizou-se os pacotes de ferramentas LOOS.v2.2.5 e de visualização e análise de sistemas moleculares VMD[41].

## PEPTÍDEO DE FUSÃO EM INTERAÇÃO COM MEMBRANAS MODELO

---

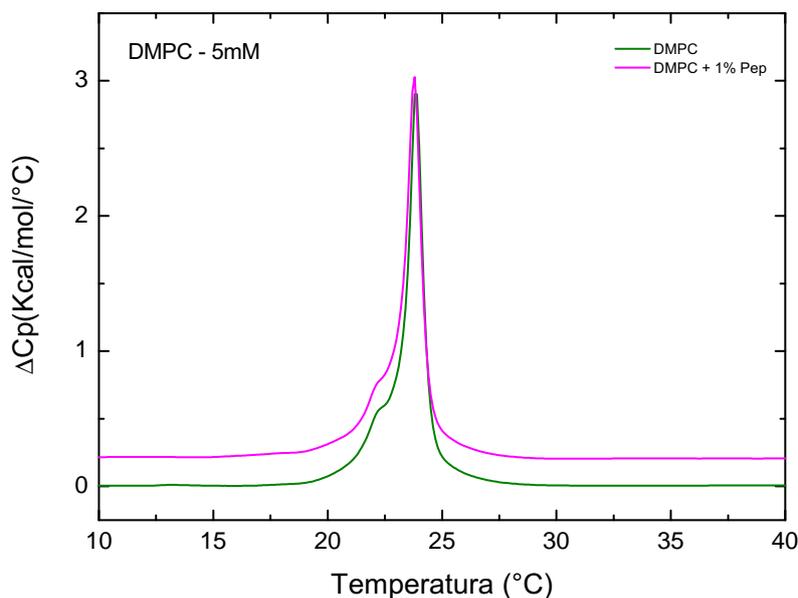
Neste capítulo apresentaremos os resultados experimentais da interação entre o peptídeo de fusão DEN.II 88-123 com vesículas lipídicas unilamelares de DMPC, DMPG e DMPC:DMPG (4:1) - PCPG (4:1).

### 3.1 Calorimetria exploratória diferencial - DSC

Para uma primeira análise quantitativa da interação do sistema peptídeo-membrana modelo, realizamos experimentos de DSC em vesículas unilamelares de DMPC e PCPG (4:1) na presença e ausência de peptídeos.

Na ausência de peptídeos as vesículas de DMPC apresentaram uma temperatura de transição de fase gel ( $L_\beta$ ) para líquido cristalina ( $L_\alpha$ ) de 23,8 °C. Calculando a integral sob a curva de DSC obtém-se a entalpia associada ao sistema. A este pico foi associada uma entalpia de  $4,1 \pm 0,1$  Kcal/mol. A transição de fase gel para líquido cristalina é associada a uma maior ( $L_\beta$ ) ou menor ( $L_\alpha$ ) organização lipídica. A adição de 1% de peptídeo viral não alterou a temperatura de transição, entretanto aumentou a entalpia para  $4,5 \pm 0,1$  Kcal/mol. Para este sistema é possível notar que a interação entre os peptídeos virais pouco alteram a estrutura das bicamadas lipídicas de DMPC (Figura 3.1).

Para vesículas contendo misturas com lipídios negativamente carregados (PCPG), a temperatura para transição entre fases foi  $23,5 \pm 0,3$  °C com uma entalpia de  $5,1 \pm 0,4$  Kcal/mol. Contrário ao sistema com vesículas de DMPC, a adição de peptídeos diminuiu a temperatura do pico de transição entre as fases



**Figura 3.1:** Termogramas para vesículas unilamelares de DMPC em presença e ausência de DEN.II 88-123.  $\Delta C_p$  é referente ao deslocamento vertical em entre as curvas antes e depois da adição de peptídeos.

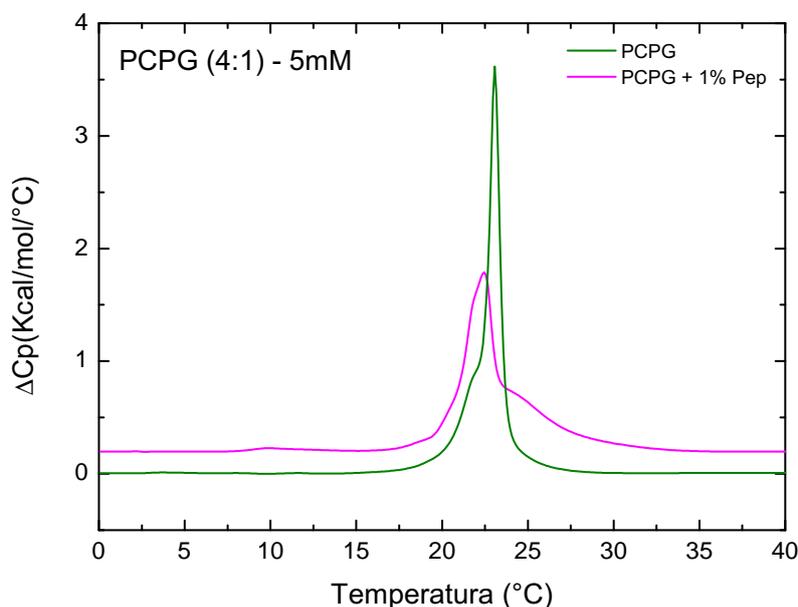
gel e líquido cristalina para  $21,7 \pm 0,8$  °C. No caso do sistema misto não houve mudanças na entalpia ( $5,1 \pm 0,3$  Kcal/mol). Conforme a Figura 3.2 é possível observar uma forte mudança no termograma, indicando que a presença de peptídeos altera o comportamento térmico das membranas.

## 3.2 Fluorescência e Anisotropia de Fluorescência

A presença do resíduo triptofano na posição 101 (W101) do peptídeo viral permite a utilização das técnicas de fluorescência para investigar a interação entre peptídeos e vesículas unilamelares lipídicas. O triptofano é uma sonda fluorescente que por característica intrínseca altera as propriedades de emissão conforme a polaridade do meio[30, 42]. É possível ainda estimar a localização, conformação preferencial e mobilidade rotacional do triptofano através do uso de ferramentas da fluorescência[43, 31, 44].

### 3.2.1 Fluorescência estática e Decaimento do tempo de vida

Através da fluorescência estática, estudamos o ambiente do triptofano (W101) em solução aquosa e em presença de vesículas de DMPC, DMPG e

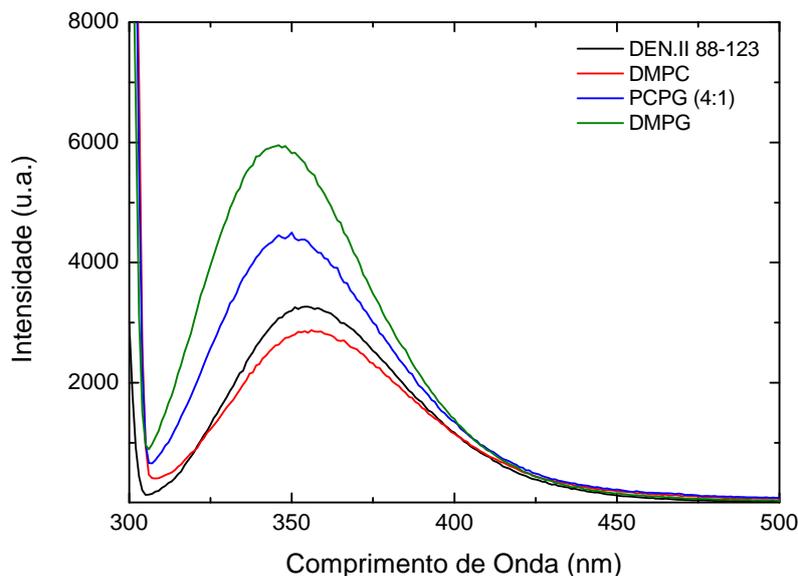


**Figura 3.2:** Termogramas para vesículas unilamelares de DMPC:DMPG (4:1) em presença e ausência de DEN.II 88-123.  $\Delta C_p$  é referente ao deslocamento vertical em entre as curvas antes e depois da adição de peptídeos.

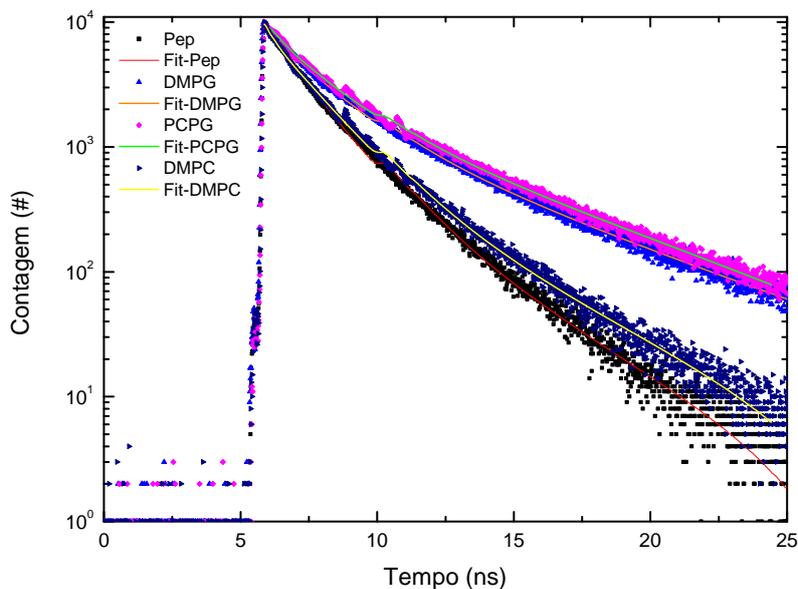
mistura PCPG (4:1). Na Figura 3.3 é possível observar que os espectros de fluorescência se deslocam para menores comprimentos de onda, conforme a presença de lipídios negativamente carregados. A fluorescência tanto em solução aquosa, quanto em vesículas de DMPC apresentou o máximo de emissão em 355 nm, enquanto que na presença de vesículas de PCPG (4:1) houve um deslocamento para 350 nm e para vesículas de DMPG o pico de fluorescência se deu em 346 nm. Este resultado indica que a presença de lipídios negativamente carregados induziu uma maior interação entre peptídeo-vesícula, corroborando com os dados obtidos por Stauffer[24]. O deslocamento espectral para menores comprimentos de onda sugere ainda a exposição do resíduo triptofano a ambientes menos polares, indicando o posicionamento parcial dentro da bicamada lipídica que compõe as vesículas[24, 27, 44].

O resíduo triptofano (W101) apresentou dois perfis distintos de decaimento do tempo de vida: o primeiro grupo quando em ambiente aquoso e na presença de vesículas de DMPC, e o segundo quando em presença de sistemas vesiculares contendo lipídios negativamente carregados DMPG e PCPG (4:1) (Figura 3.4).

Conforme a Tabela 3.1, todas as curvas de decaimento foram ajustadas



**Figura 3.3:** *Fluorescência estática para o peptídeo em meio aquoso e vesículas constituídas de DMPC, DMPG e PCPG (4:1).*



**Figura 3.4:** *Decaimento do tempo de vida para o peptídeo viral em diferentes ambientes.*

por decaimento multi-exponenciais contendo três tempos. As três componentes no decaimento do tempo de vida podem ser associadas a diferentes conformações rotacionais da cadeia lateral do triptofano. O primeiro grupo, cujo tempo médio de decaimento foi menor, apresentou o  $\tau_{av}$  de 1,80 ns para o resíduo em solução tampão e 1,93 ns em presença de vesículas de DMPC. As componentes  $b_n$  para estes tempos

foram semelhantes, assim como os tempos  $\tau_1$  e  $\tau_2$ , observando-se os peptídeos na presença de vesículas de DMPC quando comparado ao peptídeo em meio aquoso. Para o segundo grupo de fosfolipídios, que contém lipídios negativamente carregados, o tempo médio foi maior, com valores de 3,93 ns para PCPG e 3,28 ns para DMPG. Na presença dos lipídios aniônicos os tempos  $\tau_{1-3}$  foram semelhantes, entretanto o peso relativo de cada componente  $b_n$  foi diferente, elevando as contribuições do tempo médio  $b_2$  e diminuindo a contribuição de  $b_3$  para as vesículas de DMPG quando comparadas ao sistema misto PCPG.

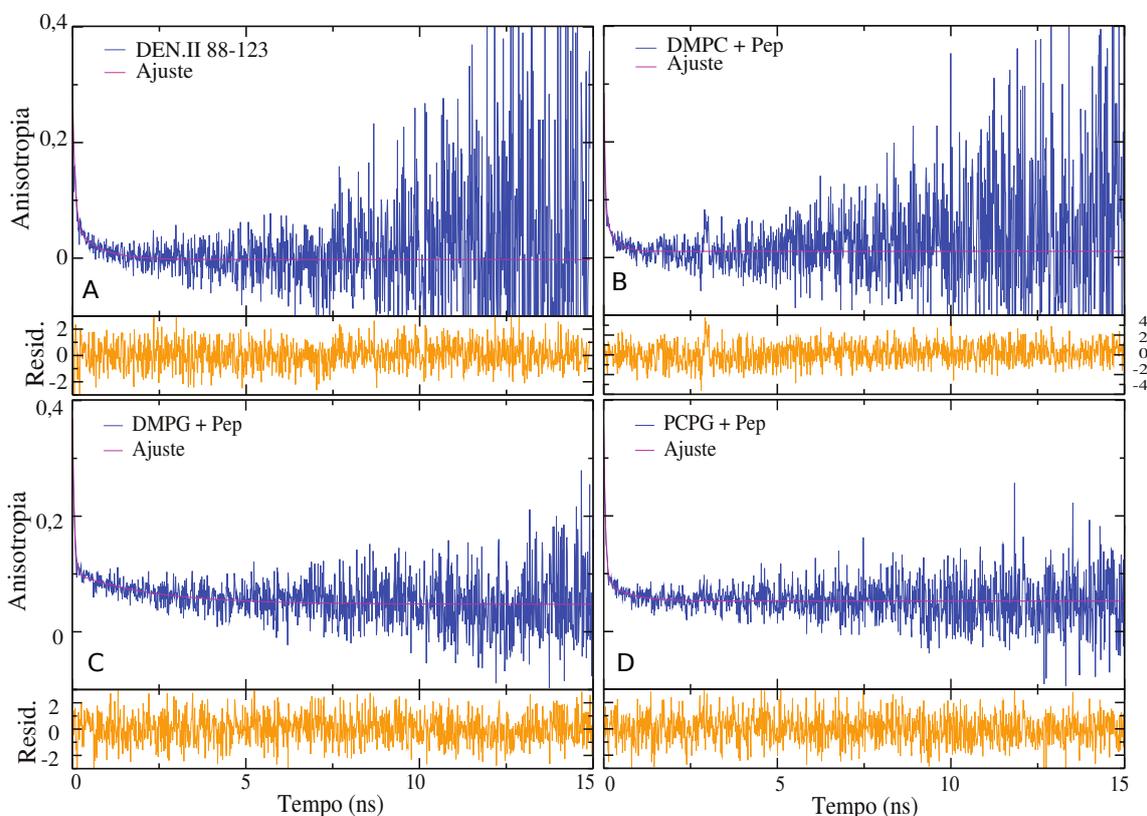
**Tabela 3.1:** Parâmetros para decaimento do tempo de vida do triptofano (*W101*) obtidos através de análise global. Unidade de tempo (ns). O erro máximo associado ao tempo foi de 0,03 ns para  $\tau_{1,2}$ , e para  $\tau_3$  foi de 0,2 ns, enquanto que para os parâmetros  $b_n$  foi de 0,01. Cálculo do tempo médio:  $\tau_{av} = \frac{\sum_i b_i \tau_i^2}{\sum_i b_i \tau_i}$ .

Sistema	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$b_1$	$b_2$	$b_3$	$\tau_{av}$
Tampão	0,27	1,49	3,8	0,28	0,66	0,05	1,80
DMPC	0,26	1,57	4,2	0,32	0,62	0,05	1,93
PCPG (4:1)	0,38	1,91	5,5	0,23	0,50	0,27	3,93
DMPG	0,38	1,74	5,3	0,22	0,61	0,17	3,28

### 3.2.2 Anisotropia de fluorescência estática e resolvida no tempo

Através da anisotropia de fluorescência, analisamos a cinética rotacional do peptídeo em solução aquosa e na presença dos diferentes sistemas vesiculares. A anisotropia de fluorescência estática, medida entre os valores de 340-360 nm, apresentou valores crescentes para o triptofano na presença de vesículas quando comparado ao peptídeo livre em solução (Tabela 3.2). Quando na presença de vesículas de DMPC a anisotropia foi de 0,041, valor duas vezes maior que a anisotropia em solução. Com os sistemas contendo DMPG e PCPG a anisotropia atingiu três vezes o valor obtido em solução aquosa, tendo valores de 0,069 e 0,062 respectivamente. Estes resultados mostram que com adição de vesículas houve uma maior restrição no movimento do resíduo triptofano, indicando ainda uma maior

redução da liberdade rotacional com lipídios carregados negativamente.



**Figura 3.5:** Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo. (A) Peptídeo viral em solução tampão. (B) Peptídeo em interação com vesículas de DMPC. (C) Peptídeo em interação com vesículas de DMPG. (D) peptídeo em interação com vesículas mistas de PCPG (4:1). A concentração final de lipídio foi de 1mM, com a razão peptídeo:lipídio de 2 mol%.

Para a anisotropia com resolução temporal (Figura 3.5), podemos analisar os resultados por partes: a anisotropia residual  $r_{\infty}$  e o tempo de correlação rotacional  $\theta_{1,2}$ . Na Tabela 3.2 podemos verificar que a anisotropia residual vai a zero para o peptídeo em solução aquosa e na presença de DMPC, indicando uma maior movimentação do resíduo triptofano e consequente movimentação do peptídeo viral. É bastante comum que, em ambientes onde há menor viscosidade, estes fluoróforos apresentem anisotropia próxima a zero[45]. Na presença dos sistemas vesiculares de DMPG e PCPG, a anisotropia residual aumentou apresentando valores de 0,056 e 0,048, respectivamente. O decaimento da anisotropia de fluorescência foi ajustado como biexponenciais, onde dois tempos de correlação rotacional foram obtidos. O tempo curto é associado à rotação do grupo fluorescente (W101) em torno da ligação

à macromolécula. O tempo curto é associado à rotação da macromolécula como um todo.

Os valores de tempo de vida, na ordem de sub-nanosegundos, são afetados por efeitos de espalhamento, que são ainda mais pronunciados na presença de vesículas. Outro aspecto importante são as contribuições dos tempos curtos de correlação rotacional que são pouco informativos no cálculo da anisotropia média, quando comparado ao tempo longo de correlação rotacional e anisotropia residual[46]. Os tempos obtidos para o triptofano em solução tampão e vesículas de DMPC foram iguais, considerando a margem de erro de  $\pm 0,1$  ns. Na interação do peptídeo viral com vesículas contendo lipídios negativamente carregados os valores dos tempos de correlação longos ( $\theta_2$ ) aumentam para 1,4 ns (PCPG) e 2,3 ns (DMPG). Os tempos encontrados são similares quando comparados com outros estudos reportados na literatura para peptídeos contendo triptofano[31, 44]. Como o tempo de correlação rotacional de vesículas são tipicamente na ordem de microsegundos, os tempos de correlação são referentes ao movimento de rotação do peptídeo como um todo.

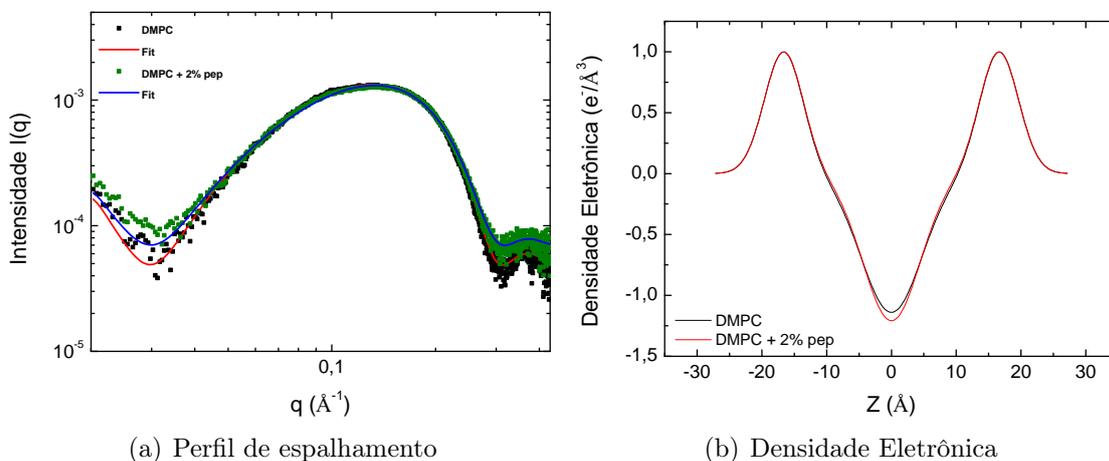
**Tabela 3.2:** *Anisotropia de fluorescência para o peptídeo viral em interação com diferentes ambientes. Anisotropia estática ( $r$ ), tempos de correlação rotacional ( $\theta_i$ ), fator pré-exponencial ( $f_i$ ), anisotropia inicial ( $r_0$ ) e anisotropia residual ( $r_\infty$ ). O erro para as medidas de  $\theta_1$  foi de 0,01 ns, enquanto que para  $\theta_2$  o erro máximo foi de 0,1 ns. Todos os fatores pré-exponenciais ( $f_1$  e  $f_2$ ) apresentaram erro de 0,01.*

Sistema	$r$	$\theta_1(ns)$	$\theta_2(ns)$	$f_1$	$f_2$	$r_0$	$r_\infty$
Tampão	$0,021 \pm 0,002$	0,05	0,6	0,83	0,17	0,34	$0,006 \pm 0,004$
DMPC	$0,041 \pm 0,005$	0,05	0,6	0,85	0,15	0,38	$0,006 \pm 0,002$
PCPG (4:1)	$0,062 \pm 0,003$	0,06	1,4	0,90	0,10	0,37	$0,056 \pm 0,003$
DMPG	$0,069 \pm 0,003$	0,05	2,2	0,86	0,14	0,39	$0,048 \pm 0,003$

### 3.3 Espalhamento de raios-x à baixo ângulo - SAXS

Investigamos as alterações produzidas pela interação dos peptídeos virais sobre as estruturas das bicamadas através de experimentos de espalhamento de raio-X. De modo semelhante aos experimentos de fluorescência, estudamos vesículas

de três composições diferentes: DMPC, DMPC:DMPG (4:1) e DMPG, na ausência e presença do peptídeo viral DEN.II 88-123.

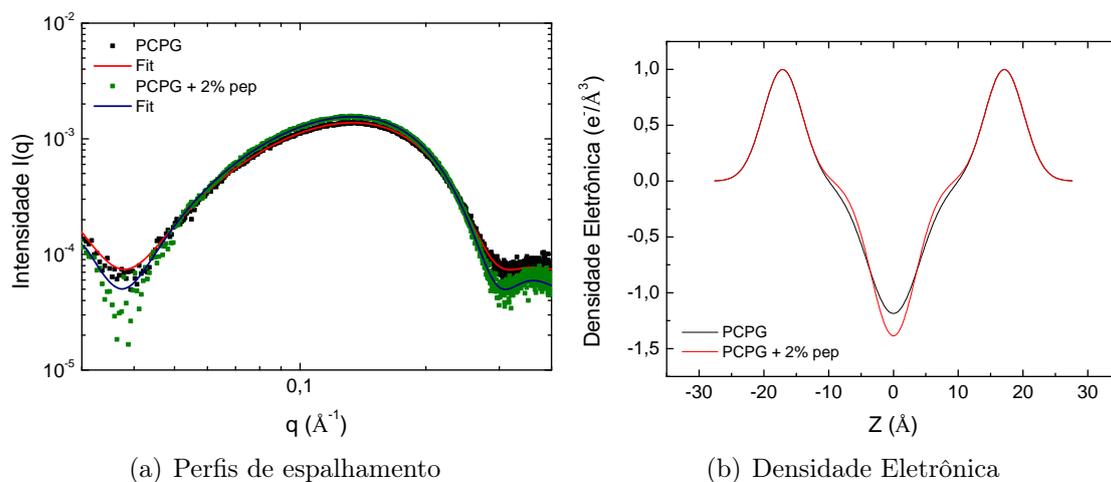


**Figura 3.6:** A - Curva de SAXS para vesículas de DMPC em presença e ausência do peptídeo de fusão. B - Perfil de densidade eletrônica representando a bicamada lipídica na ausência e presença de peptídeos de fusão.

Na Figura 3.6 (a) temos o perfil de espalhamento típico de vesículas unilamelares. A curva de SAXS mostra que na presença do peptídeo viral não houve uma modificação estrutural na bicamada lipídica. Essas curvas refletem a estrutura da bicamada lipídica e, a partir dela é possível obter o perfil de densidade eletrônica para as vesículas de DMPC em presença e ausência de peptídeos como indicado na Figura 3.6 (b). Para obtenção do perfil de densidade aplica-se a transformada de Fourier na curva de espalhamento. O perfil de densidade eletrônica é ajustado por três gaussianas, onde os dois picos representam as cabeças polares e o vale representa as cadeias hidrocarbônicas. Pela Figura 3.6 (b) é possível observar que a espessura da bicamada não foi alterada com adição de peptídeos, entretanto, houve uma alteração na região entre as bicamadas lipídicas, aumentando a densidade eletrônica local.

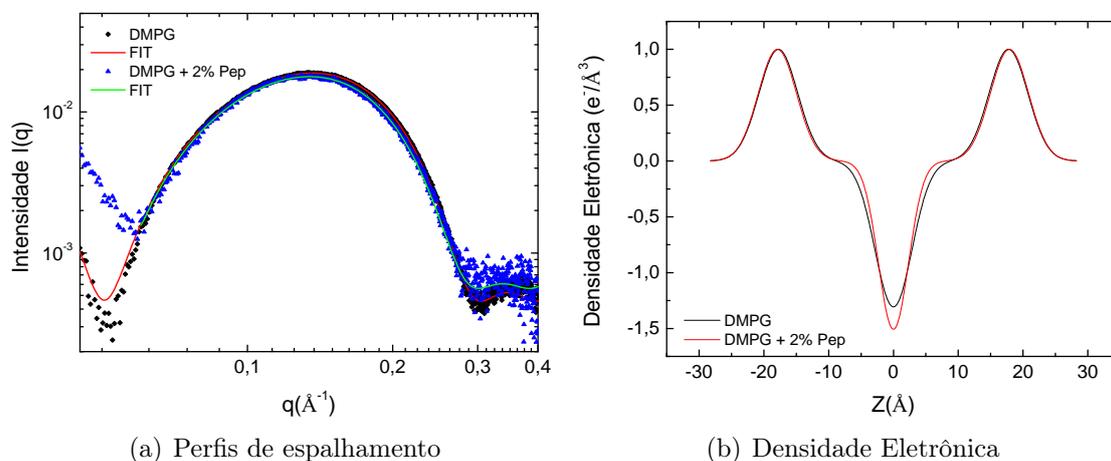
Para o sistema misto, DMPC:DMPG (4:1), a presença de peptídeos virais também não alterou a espessura da bicamada (Figura 3.7). Entretanto, a região da cadeia hidrofóbica sofreu modificações estruturais conforme indicado pelo perfil de densidade eletrônica.

As vesículas unilamelares negativamente carregadas, DMPG, apresentaram uma maior alteração no diagrama de espalhamento (Figura 3.8). Neste caso, o primeiro mínimo foi deslocado para maiores valores de  $q$ . O perfil de densidade



**Figura 3.7:** A - Curva de SAXS para vesículas de DMPC:DMPG (4:1) em presença e ausência do peptídeo de fusão. B - Perfil de densidade eletrônica representando a bicamada lipídica na ausência e presença de peptídeos de fusão.

eletrônica para o DMPG mostra uma transição entre as cabeças polares e as caudas mais abrupta, quando comparada ao sistema de DMPC. Além disso, na presença de peptídeos, houve um aumento na espessura da bicamada lipídica.



**Figura 3.8:** A - Curva de SAXS para vesículas de DMPG em presença e ausência do peptídeo de fusão. B - Perfil de densidade eletrônica representando a bicamada lipídica na ausência e presença de peptídeos de fusão.

Na Tabela 3.3 apresentamos os parâmetros obtidos para caracterizar as bicamadas lipídicas. Como discutido nas Figuras 3.6 e 3.7, vemos na Tabela 3.3 que não houveram mudanças estruturais na bicamada, nem na espessura média para os sistemas com DMPC e DMPC:DMPG (4:1). Para o sistema de DMPG

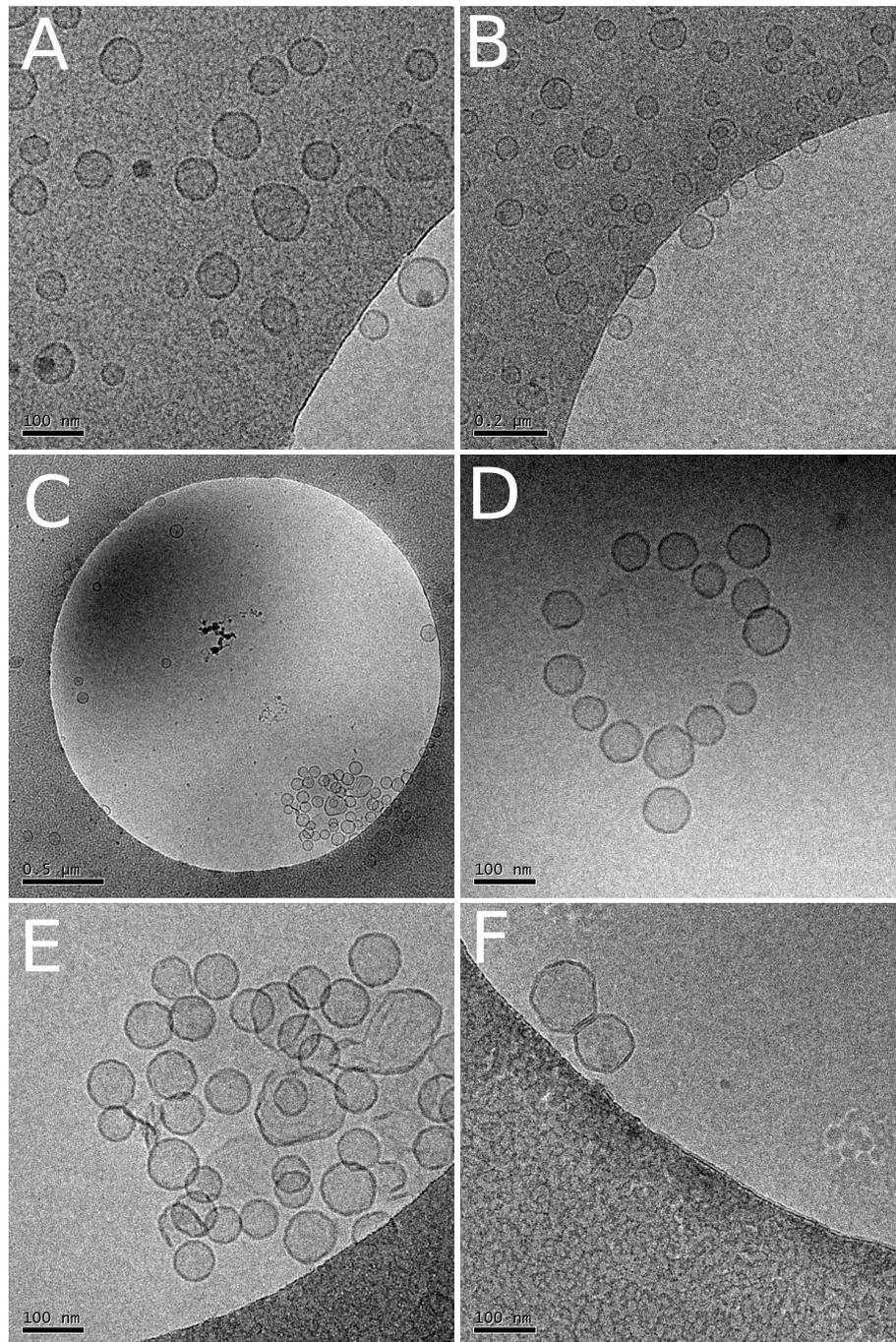
(Figura 3.8), o aumento na espessura da bicamada lipídica se deu principalmente pelo aumento da distribuição em  $z_H$ .

**Tabela 3.3:** Parâmetros de ajuste para perfis de densidade eletrônica de vesículas unilamelares de DMPC, DMPC:DMPG (4:1) e DMPG na ausência e presença do peptídeo de fusão DEN.II 88-123.  $z_H$ : centro da distribuição gaussiana referente à cabeça polar;  $\sigma_H$ : distribuição média de  $z_H$ ;  $\sigma_C$ : distribuição média das região das cadeias hidrocarbônicas;  $\rho_C$ : amplitude da gaussiana relativa à  $\sigma_H$  e  $dB$ : espessura calculada das bicamadas. A concentração final de lipídio foi de 5mM, com a razão peptídeo:lipídio de 2 mol%.

Sistema	$z_H$ (Å)	$\sigma_H$ (Å)	$\sigma_C$ (Å)	$\rho_C$ (e/Å <sup>3</sup> )	$dB$ (Å)
DMPC	16,6 ±0,1	3	4,7 ±0,2	-1,14 ±0,04	45,3 ±0,1
DMPC + Pep.	16,6 ±0,1	3	4,4 ±0,2	-1,21 ±0,04	45,2 ±0,1
PCPG (4:1)	17,2 ±0,1	3	3,5 ±0,1	-1,39 ±0,04	46,3 ±0,1
PCPG (4:1) + Pep.	17,1 ±0,1	3	4,1 ±0,1	-1,19 ±0,02	46,2 ±0,1
DMPG	17,8 ±0,1	3	2,9 ±0,1	-1,31 ±0,03	47,5 ±0,1
DMPG + Pep.	18,2 ±0,1	3	2,4 ±0,2	-1,51 ±0,12	48,4 ±0,1

### 3.4 Crio-Microscopia Eletrônica de Transmissão - Cryo-TEM

Na Figura 3.9 (A e B), apresentamos micrografias de vesículas unilamelares de DMPC:DMPG (4:1) em ambiente aquoso e na ausência de peptídeos virais. As vesículas são aproximadamente esféricas e estão uniformemente espalhadas, tendo o diâmetro médio de 80 nm. A presença do peptídeo viral DEN.II 88-123 induz a fusão entre as vesículas, bem como a formação de clusters vesiculares (Figura 3.9 C, D e E), e na figura 3.9 F, temos uma micrografia do momento imediatamente anterior a fusão. Ao promover a fusão entre vesículas, o diâmetro médio aumentou para 100 nm.



**Figura 3.9:** Crio-Microscopia Eletrônica de Transmissão - Vesículas unilamelares de DMPC:DMPG (4:1) em interação com peptídeos virais da dengue. A e B - Vesículas na ausência de peptídeos ficam espalhadas aleatoriamente. C - Após adição de peptídeos, as vesículas tendem a formar agregados. D e E - Detalhes dos agregados em maior resolução. F - Detalhe de duas vesículas no momento da fusão.

## DINÂMICA MOLECULAR

---

Neste capítulo apresentaremos os resultados referentes as simulações por dinâmica molecular. Um total de 11 sistemas foram simulados, sendo dois tipos de bicamada lipídica: DMPC e um sistema misto de DMPC e DMPG na proporção (4:1), aqui chamado de PCPG. Além da diferença na bicamada, também avaliamos a importância da concentração peptídica, para isso utilizamos de 1 a 3 peptídeos por simulação. Duas simulações foram realizadas para cada sistema peptídeo/bicamada lipídica, onde a concentração salina pode ter valor 0 ou 150 mM - NaCl.

A apresentação dos resultados foram separadas por tipo de bicamada lipídica. As análises dentro de cada grupo (DMPC ou PCPG) foram agrupadas em formato de quadros, onde os sistemas simulados são apresentados simultaneamente. Deste modo podemos comparar a interação de 1, 2 ou 3 peptídeos com cada bicamada. Os resultados são apresentados na ordem: estabilidade dos sistemas estudados, alterações sofridas pela bicamada ao longo da simulação, alterações no(s) peptídeo(s) e interação entre peptídeo-bicamada.

## 4.1 Peptídeos virais na presença da bicamada lipídica de DMPC

### 4.1.1 Estabilidade do Sistema

A avaliação da estabilidade dos sistemas estudados constitui uma etapa importante na análise dos resultados obtidos via simulações. Deste modo, apresentamos análises da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) e da flutuação do desvio quadrático médio (RMSF).

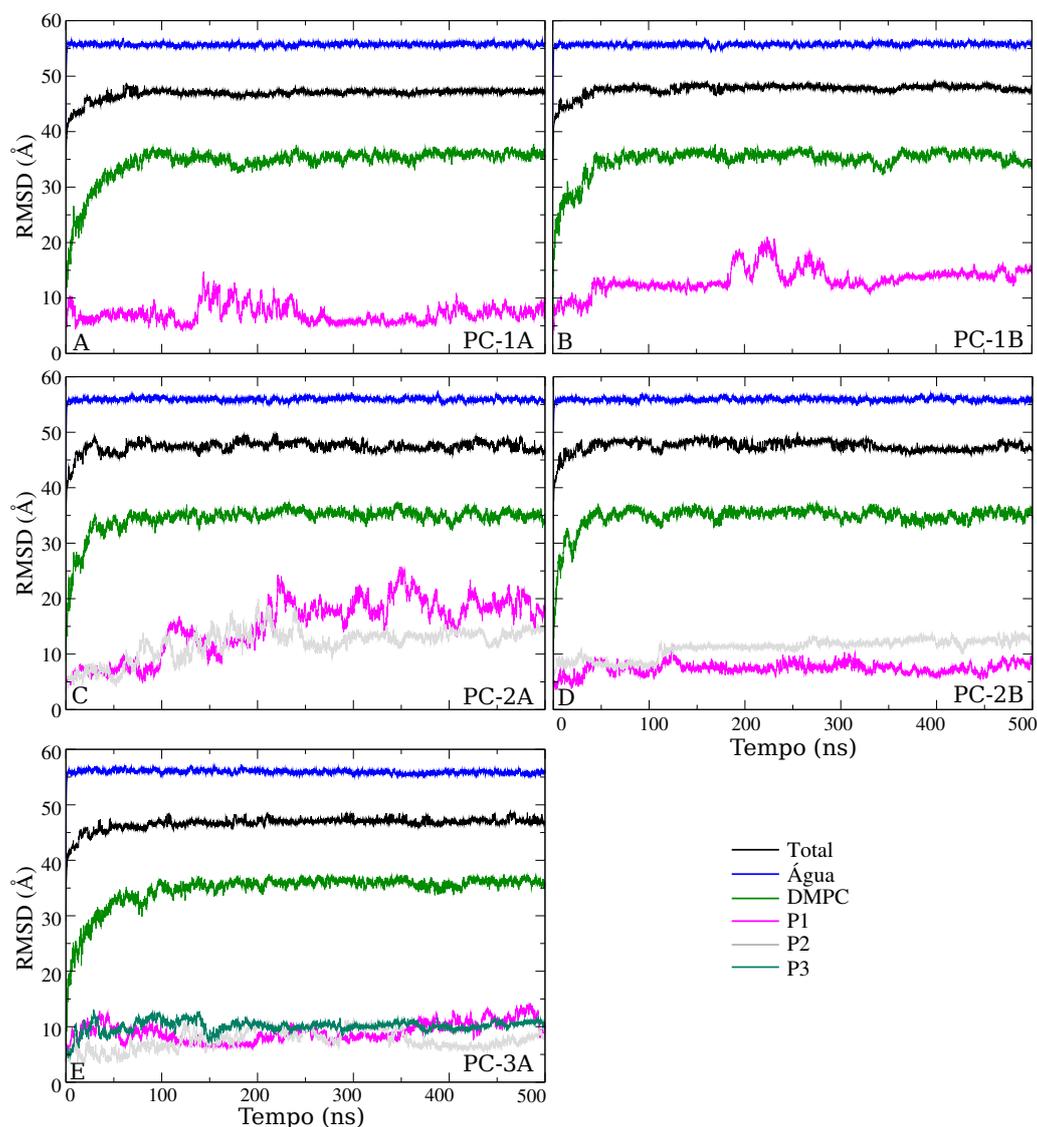
#### 4.1.1.1 RMSD e RMSF

Para conseguir resultados confiáveis através de simulações por dinâmica molecular são necessários alguns cuidados, tais como: campo de força, condições iniciais de simulação e tempo adequados. Longos tempos de simulação são necessários para que possamos ter um espaço de fase satisfatório. A amostragem aliada à estabilidade de um sistema dá maior segurança para comparar dados experimentais e computacionais.

A estabilidade de uma simulação pode ser avaliada através da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD - do inglês *Root-Mean-Square Deviation*). Essa medida compara as modificações estruturais no tempo em relação a estrutura inicial. Na Figura 4.1 apresentamos os resultados para todos os sistemas estudados em presença de bicamada lipídica de DMPC, onde é possível observar que a estabilidade foi atingida ao longo da simulação. A bicamada de DMPC, em todas as simulações atingiu a estabilidade nos primeiros 100 ns, enquanto que para os peptídeos houveram pequenas diferenças entre os sistemas. Essas mudanças refletem a interação do peptídeo com a bicamada lipídica e, apesar das flutuações, se mantém estável ao longo da simulação.

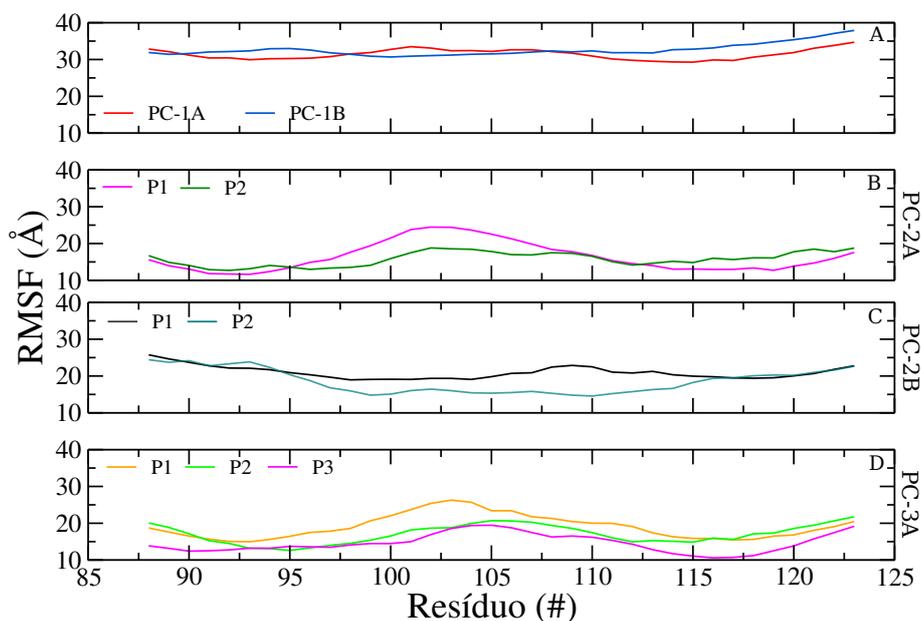
Garantida a estabilidade do sistema, podemos seguir com as análises estruturais. Uma análise relevante para as simulações é a chamada flutuação do desvio quadrático médio (RMSF - do inglês *Root-Mean-Square Fluctuation*). Enquanto o RMSD avalia a mobilidade de um sistema em relação ao tempo, o RMSF avalia a mudança estrutural média no espaço.

Na Figura 4.2 podemos observar que de modo geral todos os peptídeos,



**Figura 4.1:** *RMSD da cadeia principal em função do tempo para os sistemas contendo bicamadas lipídicas de DMPC em presença de 1 (A e B), 2 (C e D) ou três (E) peptídeos de fusão DEN.II - 88-123.*

numerados como P1, P2 e P3, tiveram uma alta mobilidade nas extremidades e na porção central. Para o caso de um peptídeo interagindo com a bicamada de DMPC (Figura 4.2-A) houve pouca mudança estrutural comparando os dois peptídeos. Na simulação PC-2A, os peptídeos apresentaram maior mobilidade na região central, onde está localizado o resíduo triptofano (W101), e essa diferença é relacionada com a maior interação dessa região do peptídeo com a membrana modelo.



**Figura 4.2:** *RMSF para os peptídeos virais em interação com bicamada de DMPC. (A) peptídeo para simulações PC-1A e PC-1b, (B) peptídeos P1 e P2 do sistema PC-2A, (C) peptídeos P1 e P2 para simulação PC-2B, (D) peptídeos P1, P2 e P3 para simulação PC-3A. O RMSF foi calculado utilizando como referência o carbono alfa ( $C_{\alpha}$ ) de cada peptídeo.*

De modo semelhante, os peptídeos referentes ao sistema PC-3A apresentam alta mobilidade na região do triptofano (W101), indicando a sua interação com a bicamada lipídica. Apesar das diferenças entre os peptídeos, os valores médios são semelhantes para todos os sistemas conforme a Tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** *RMSF médio para peptídeos virais em interação com bicamadas lipídicas de DMPC. Unidade: Å.*

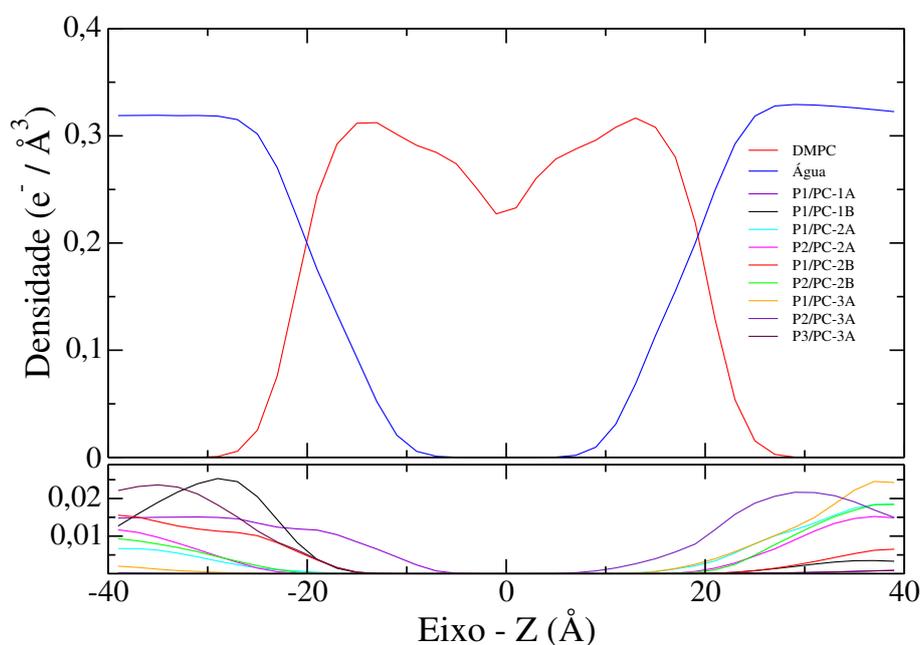
Sistemas	P1	P2	P3
PC-1A	31,4 $\pm$ 0,2		
PC-1B	32,6 $\pm$ 0,2		
PC-2A	16,4 $\pm$ 0,6	15,8 $\pm$ 0,3	
PC-2B	20,9 $\pm$ 0,2	18,6 $\pm$ 0,5	
PC-3A	19,0 $\pm$ 0,5	17,0 $\pm$ 0,4	14,6 $\pm$ 0,4

## 4.1.2 Alterações da Bicamada Lipídica de DMPC

Os peptídeos virais podem perturbar a bicamada lipídica, de modo que apresentamos algumas análises com objetivo de mensurar as alterações sofridas pela bicamada de DMPC.

### 4.1.2.1 Distribuição de Densidade Eletrônica

O perfil de distribuição da densidade eletrônica de um sistema nos permite entender como os componentes estão interagindo. A Figura 4.3 apresenta os resultados para todas as simulações estudadas.



**Figura 4.3:** Perfil de Densidade Eletrônica para os sistemas estudados. Parte superior: bicamada lipídica de DMPC e água. Parte inferior: peptídeos de todos os sistemas estudados.

Na parte superior da Figura 4.3 é possível observar os perfis de densidade da bicamada lipídica e solvente. Nesse caso, foram apresentados apenas uma curva representando a bicamada de DMPC e o solvente pois para todos os sistemas estudados ocorreu a sobreposição das curvas. Pelo perfil de densidade da bicamada de DMPC, é possível dizer que a estrutura média da bicamada ao final da simulação permanece inalterada. Os resultados indicam um mínimo de densidade ( $\approx 0 \text{ \AA}$ ) representando o contato entre as caudas dos lipídios e os máximos ( $\approx \pm 15 \text{ \AA}$ )

representando a região das cabeças polares do lipídios. Na região das cabeças polares há uma certa flutuação média no tempo, por esse motivo o decaimento da densidade é lento. Existe ainda uma faixa de transição entre as moléculas de água e a bicamada lipídica em (-20 a -10 Å) e (10 a 20 Å). Considerando os peptídeos, é evidente da Figura 4.3 que todos estão situados próximo a bicamada, mantendo algum grau de interação e estando situado na interface água/bicamada. As densidades elevadas, sempre abaixo de -20 Å e acima de 20 Å, indicam o posicionamento médio dos peptídeos, sendo que a maioria dos resíduos estão em contato com a água e, em nenhum caso o peptídeo ficou situado inteiramente dentro da região hidrofóbica da bicamada lipídica.

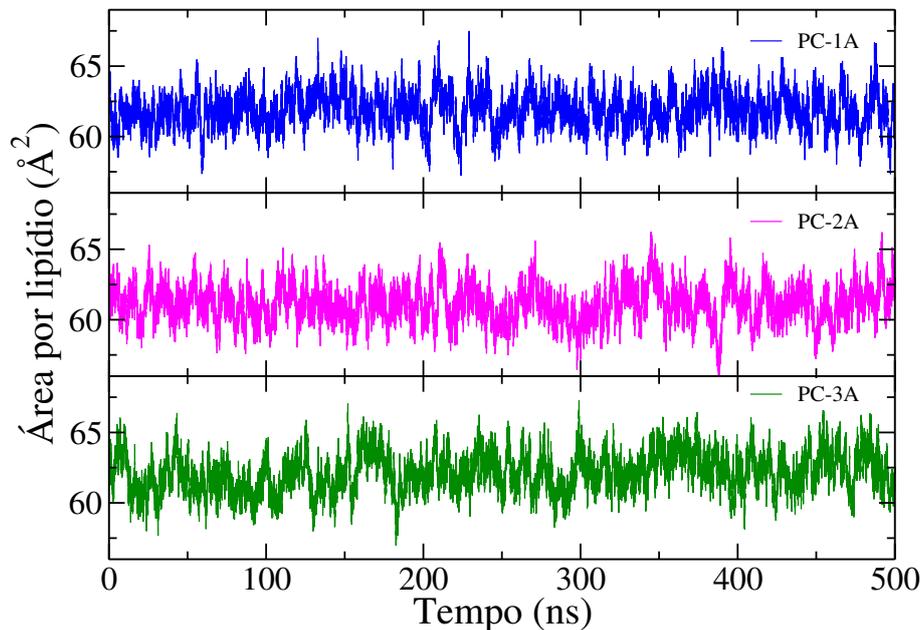
#### 4.1.2.2 Área por Lipídio

Um parâmetro bastante comum para caracterizar bicamadas lipídicas é a área média por cabeça lipídica, ou simplesmente área por lipídio. É possível encontrar na literatura dados experimentais para área por lipídio para diversos modelos de membrana, desde que sejam compostos por um único tipo de lipídio como por exemplo DMPC e DMPG[47, 48]. A obtenção da área por lipídio teórica é realizada multiplicando-se as dimensões da caixa de simulação em x e y, e dividindo pelo número de lipídios da monocamada como segue na equação:

$$A = \frac{x \cdot y}{N} \quad (4.1)$$

Para a escolha das posições x e y é comum a escolha de algum átomo que irá gerar o ponto de coordenada (x,y) e N é o número de lipídios por monocamada. Em nosso caso, sempre escolhemos o átomo de fósforo (P). A área por lipídio para a bicamada de DMPC na ausência de peptídeos foi de  $61,4 \pm 1,5 \text{ \AA}^2$ , valor semelhante ao esperado experimentalmente para o DMPC em 40 °C[47].

Na Figura 4.4 podemos observar que a presença de um ou mais peptídeos não altera o valor médio para área por lipídio ao longo de suas trajetórias. Na presença de um peptídeo os valores foram  $61,9 \text{ \AA}^2$  (PC-1A) e  $62,1 \text{ \AA}^2$  (PC-1B) com erro máximo de  $1,3 \text{ \AA}^2$ . Do mesmo modo para a interação de dois peptídeos, os resultados são semelhantes  $61,9 \text{ \AA}^2$  (PC-2A) e  $60,8 \text{ \AA}^2$  (PC-2B) com erro de  $1,4 \text{ \AA}^2$ . Por fim, com a presença de três peptídeos simultaneamente, PC-3A, a área



**Figura 4.4:** Área por lipídio para bicamada lipídica de DMPC em presença de um, dois ou três peptídeos.

média foi de  $62,1 \pm 1,4 \text{ \AA}^2$ . Estes resultados indicam que apesar da interação entre peptídeo/bicamada observadas pelo perfil de densidade eletrônica, não há mudança significativa na área final mesmo com elevada razão peptídeo/lipídio.

#### 4.1.2.3 Parâmetro de Ordem

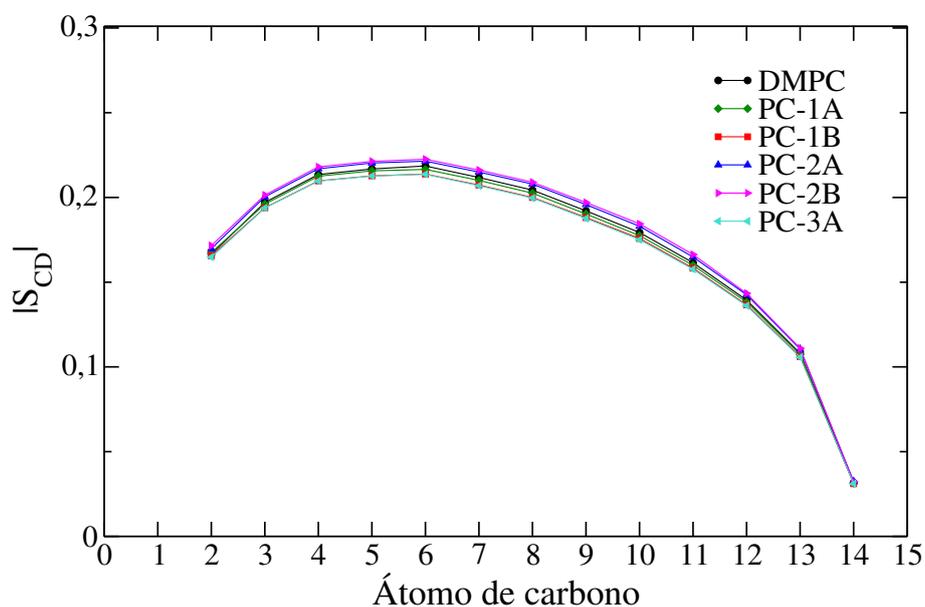
Sabendo-se que a área média não foi alterada com a presença dos peptídeos de fusão, avaliamos o ordenamento estrutural médio das cadeias hidrocarbônicas com relação ao vetor normal à bicamada lipídica através do parâmetro de ordem[49]. O parâmetro de ordem é experimentalmente obtido através de medidas de  $H^2$  NMR, enquanto que computacionalmente é calculado através da equação 4.2:

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle, \quad (4.2)$$

onde  $\theta$  é o ângulo entre o vetor C-H e o vetor normal da bicamada.

A interação entre diferentes razões peptídeo/lipídio não alterou de maneira significativa o ordenamento das cadeias hidrocarbônicas nas bicamadas de DMPC (Figura 4.5). Nas simulações não foram observadas diferenças estatísticas significativas no ordenamento das cadeias hidrocarbônicas na presença e ausência

de peptídeos. Para fins de comparação entre experimentos e simulações, podemos calcular o valor médio do parâmetro de ordem através da média aritmética simples considerando todos os pontos. Todos os sistemas, na presença e na ausência de peptídeo, apresentaram o valor médio de  $0,18 \pm 0,01$ . Os valores foram calculados considerando-se a temperatura da simulação em  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , o que está em acordo com dados experimentais (0,18) para o DMPC na temperatura de  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , bem como outros dados computacionais encontrados na literatura[50, 51].



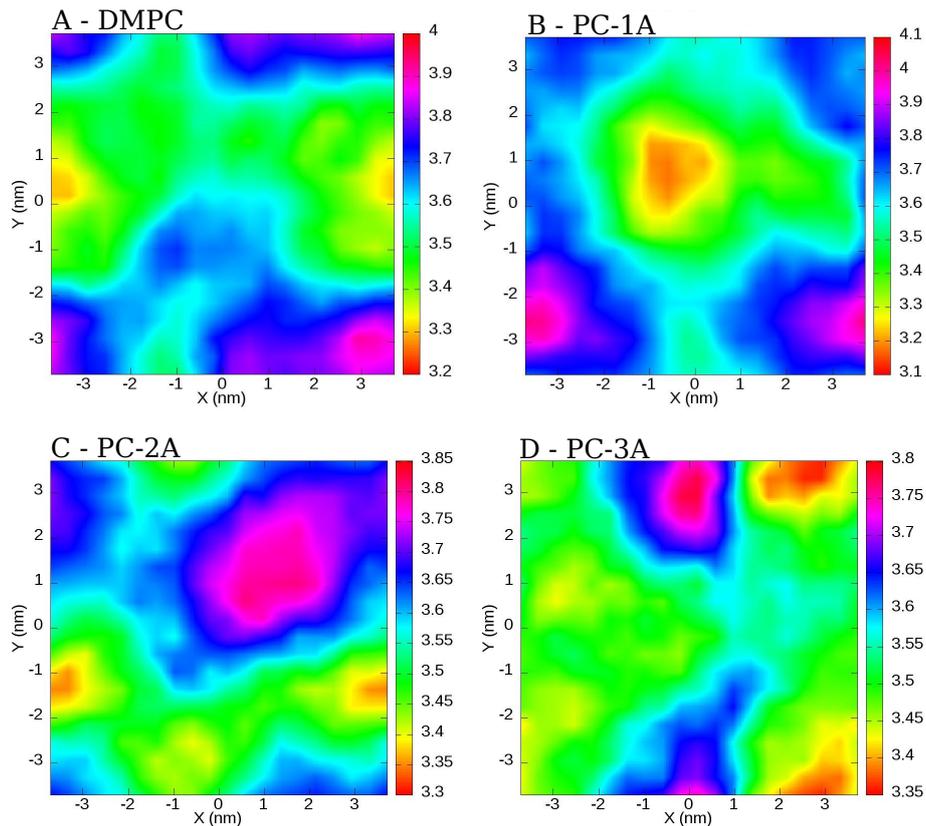
**Figura 4.5:** Parâmetro de ordem para os átomos 2-14 das cadeias hidrocarbônicas de DMPC na ausência e presença de peptídeos virais.

#### 4.1.2.4 Espessura da Bicamada Lipídica

Assim como área por lipídio e parâmetro de ordem, temos na espessura da bicamada lipídica um importante parâmetro a ser avaliado. Resultados de espessura de uma bicamada lipídica bem como o perfil de densidade eletrônica são comparados com dados experimentais obtidos através de SAXS[52]. O cálculo da espessura média obtido a partir das simulações por dinâmica molecular é realizado através da diferença entre os átomos de fósforo (P) da bicamada lipídica. O software GridMat foi empregado no cálculo (para mais informações veja Allen et al. (2009)[53]).

Na Figura 4.6 apresentamos os resultados para espessura média nos 50 ns finais para a bicamada lipídica de DMPC interagindo com diferentes concentrações

de peptídeo. Os valores médios para a bicamada na ausência de peptídeos foi de  $3,6 \pm 0,1$  nm, sendo os mesmos valores obtidos na presença de um e dois peptídeos. Na presença de três peptídeos, o valor médio foi de  $3,5 \pm 0,1$  nm. Estes valores são matematicamente iguais, entretanto, existem variações na espessura da bicamada que foram causadas pela presença dos peptídeos conforme observado na Figura 4.6.



**Figura 4.6:** Mapa de espessura para bicamada lipídica de DMPC na ausência (A), e presença de um (B), dois (C) e três (D) peptídeos simultaneamente. Cada quadro representa o plano  $xy$  da bicamada com a espessura ( $z$ ) na forma de escala de cores independente. As unidades dos eixos  $x, y$  e  $z$  são em (nm).

### 4.1.3 Modificações Estruturais e Inserção dos Peptídeos de Fusão

Os peptídeos ao perturbarem as bicamadas lipídicas podem sofrer mudanças estruturais pelo contato com as membranas modelo. Além disso, em caso de interação pode haver a penetração do peptídeo na membrana. Essas avaliações são apresentadas como estrutura secundária e penetração do peptídeo viral.

### 4.1.3.1 Estrutura Secundária

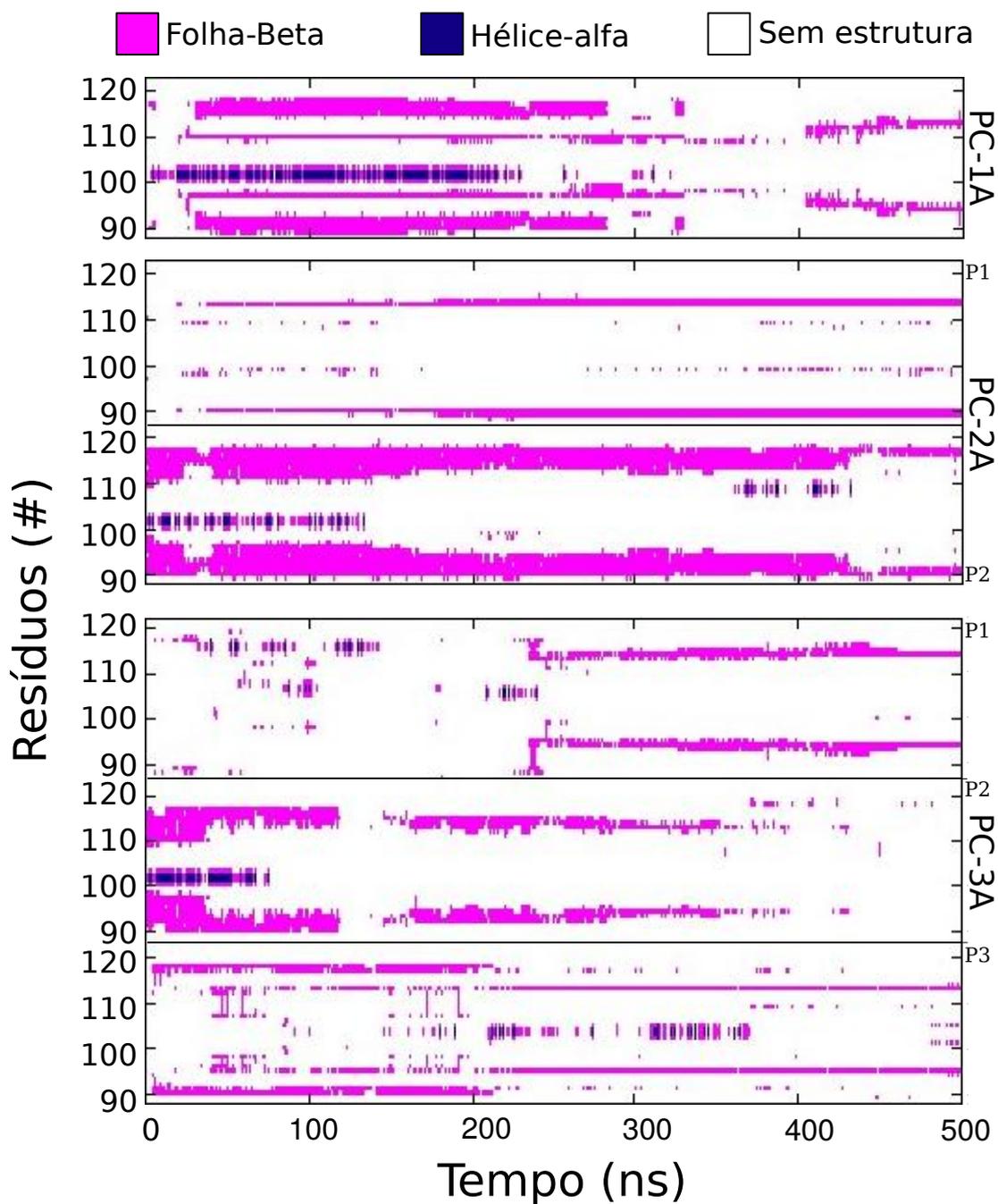
O conjunto de análises estruturais da bicamada: área por lipídio, parâmetro de ordem e espessura, não apresentaram diferença significativa em seus valores médios, indicando que a presença dos peptídeos de fusão possuem pouca influência sobre a estrutura das bicamadas lipídicas de DMPC. Estes dados porém não apresentam informações referentes as modificações sofridas pelos peptídeos ao longo do tempo de simulação. Para avaliar essas mudanças, apresentamos a análise de estrutura secundária e distância peptídeo-bicamada.

A Figura 4.7 apresenta resultados de estrutura secundária para os três sistemas estudados: PC-1A, PC-2A e PC-3A, avaliados usando o algoritmo *Structural Identification* (STRIDE)[54]. Na Figura 4.7, o eixo y representa os resíduos aminoácidos do peptídeo viral e o eixo x a evolução temporal. A estrutura secundária pode ser dividida três grandes grupos: (i) estrutura em fita ou folha- $\beta$ , representados em rosa; (ii) estrutura em hélice- $\alpha$  representadas em azul; (iii) Regiões sem estrutura definida, representadas em branco.

A interação de um peptídeo (PC-1A) com a bicamada lipídica de DMPC apresentou mudanças na estrutura secundária do peptídeo. Os aminoácidos se agruparam em proporções diferentes nas três estruturas. Formações de folha- $\beta$  foram observadas ao longo das simulações. O peptídeo apresentou formação de hélice- $\alpha$  em sua região central durante os primeiros 200 ns de simulação. Apesar de manter uma pequena quantidade de resíduos em formação de folha- $\beta$ , a maior parte do peptídeo, ao final da simulação, apresentou ausência de estrutura.

Para o segundo caso (PC-2A), vamos dividir em dois peptídeos: P1 e P2. P1 apresenta uma fina faixa de formação de folha- $\beta$  ao longo da simulação. Não houve formação de hélice- $\alpha$ , e a maioria dos resíduos estão com ausência de conformação definida. O peptídeo P2 apresenta uma larga faixa de formação de folha  $\beta$  ao longo da simulação, com ausência de estrutura secundária definida na porção central do peptídeo e aumentando em porcentagem ao final da dinâmica. Regiões pontuais apresentaram formações hélice- $\alpha$ .

Para o sistema contendo três peptídeos simultaneamente (PC-3A), vamos dividi-los em: P1, P2 e P3. Nessa formação os peptídeos apresentaram uma grande variação nas estruturas. P1 apresenta traços de formações de folha- $\beta$ , com



**Figura 4.7:** Mapa de evolução temporal da estrutura secundária para os peptídeos em interação com bicamada lipídica de DMPC.

consolidação de uma fina estrutura a partir de 250 ns e estendendo-se até o final da dinâmica. P2 perde a formação de folha- $\beta$  ao longo da dinâmica, finalizando com ausência de formação de estrutura secundária. Por último, P3 apresentou uma fina formação de folha- $\beta$  ao longo da simulação. Na porção central, apresentou formação

de hélice e, majoritariamente ausência de conformação definida.

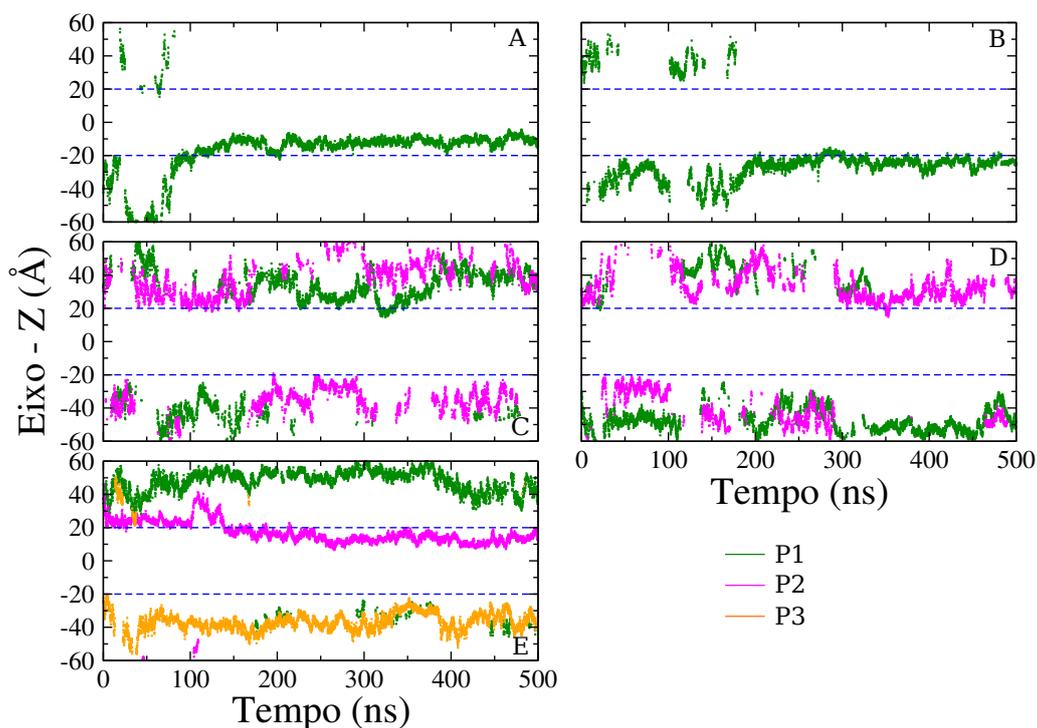
De modo geral, os peptídeos quando na presença da bicamada de DMPC apresentaram estruturas condizentes com os três grandes grupos. A formação de folha- $\beta$  foi observada em todos os peptídeos, enquanto que a formação de hélice- $\alpha$  foi pontual. Majoritariamente a ausência de estrutura secundária foi observada nos peptídeos.

#### 4.1.3.2 Inserção dos Peptídeos na Bicamada Lipídica de DMPC

Uma análise das distâncias entre peptídeo-membrana é fundamental para avaliar se houve ou não penetração na bicamada lipídica. Para este fim, avaliamos as distâncias entre o resíduo triptofano (W101) e o centro das bicamadas lipídica de DMPC ao longo da simulação. A escolha do triptofano, se deve ao fato de ter sido citado como fundamental para que ocorra a fusão de membranas[25]. Além disso esses valores podem auxiliar no entendimento dos resultados obtidos via fluorescência.

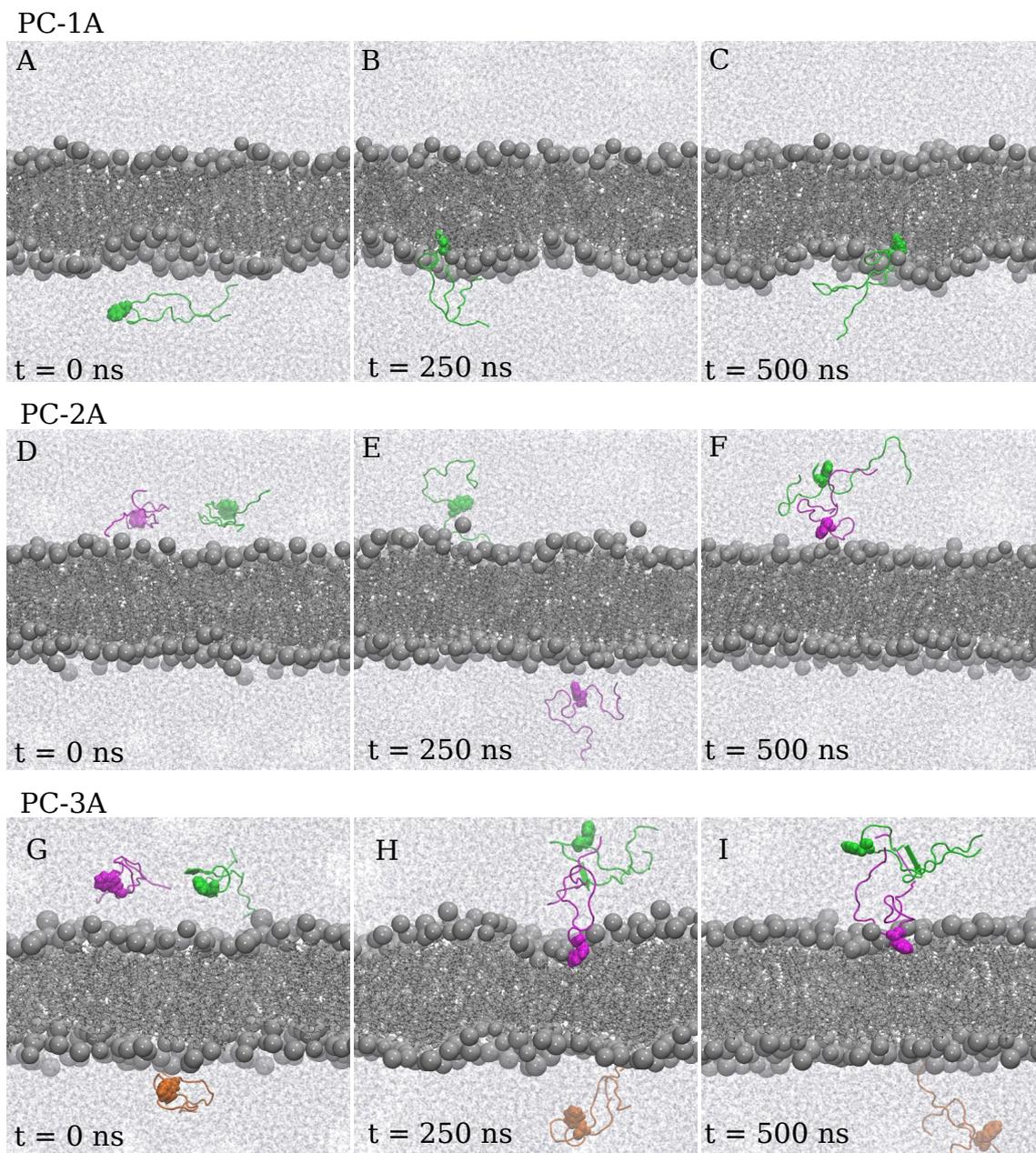
Na Figura 4.8 apresentamos os gráficos avaliando a evolução temporal da distância entre o peptídeo viral e a bicamada lipídica. Em ambas as simulações contendo um peptídeo (A e B), houve interação do resíduo triptofano com a bicamada, sendo que para o sistema PC-1A houve penetração na região hidrofóbica, enquanto que, no sistema PC-1B o triptofano fica situado na região das cabeças polares. Nas simulações entre dois peptídeos e a bicamada de DMPC (C e D), não houve penetração do resíduo triptofano na região hidrofóbica. Em alguns momentos da simulação, o resíduo triptofano se posiciona na região das cabeças polares, entretanto, em seu posicionamento médio ele está exposto à água. Para o último caso onde há a presença de três peptídeos (E), apenas um peptídeo irá penetrar a bicamada lipídica com o resíduo triptofano. Durante essas simulações foram observados momentos onde os peptídeos interagem com a bicamada através dos resíduos alanina nas posições (88, 122 e 123), essa pode ser a razão pela qual o resíduo triptofano não interagiu com a bicamada lipídica.

Por fim, apresentamos *snapshots* (Figura 4.9) das simulações em três momentos distintos: início (0 ns), meio ( $\approx$  200-300 ns) e final (500 ns). Estes resultados complementam os dados apresentados na Figura 4.8, pois indicam o



**Figura 4.8:** Evolução temporal da distância média do resíduo triptofano (W101) em relação à bicamada. A - PC-1A, B - PC-1B, C - PC-2A, D - PC-2B e E - PC-3A. As linhas pontilhadas em azul indicam a espessura da bicamada lipídica, logo, se o peptídeo está entre as linhas, isso significa uma interação com a região hidrofóbica da bicamada.

posicionamento do resíduo triptofano, bem como as regiões das cabeças polares e caudas hidrofóbicas.



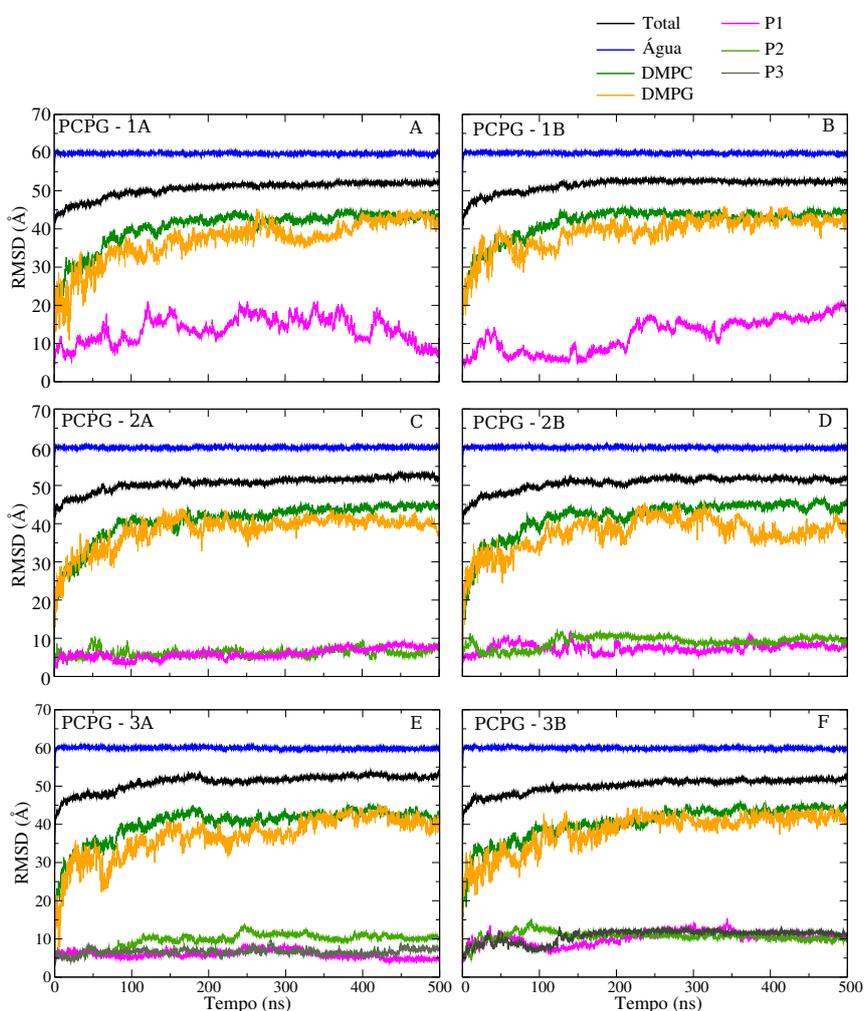
**Figura 4.9:** Snapshots das simulações por dinâmica molecular em tempos distintos indicando início, meio e final. (A,B e C) indicam a simulação PC-1A, (D,E e F) PC-2A e (G,H e I) PC-3A. Os lipídios são representados na cor cinza, onde as esferas simbolizam a cabeça polar. Os peptídeos são representados nas cores: P1 - verde, P2 - rosa e P3 - laranja.

## 4.2 Interação de peptídeos virais com bicamada lipídica mista de DMPC:DMPG (4:1)

### 4.2.1 Estabilidade do Sistema

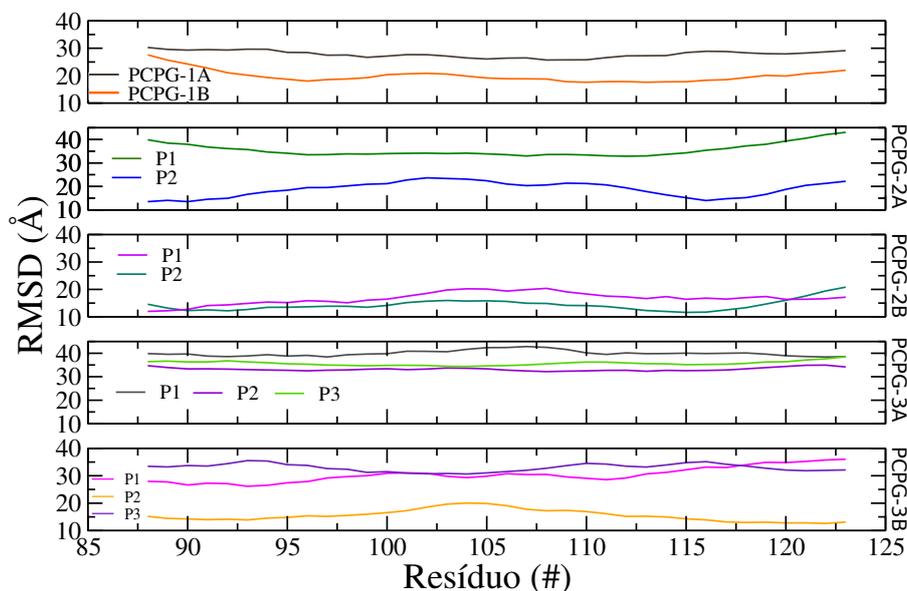
De modo semelhante à seção anterior iniciamos as análises das simulações contendo o peptídeo viral na presença de bicamadas mistas pela avaliação da estabilidade com RMSD e RMSF.

#### 4.2.1.1 RMSD e RMSF



**Figura 4.10:** RMSD da cadeia principal em função do tempo para os sistemas contendo bicamadas lipídicas de PCPG em presença de um (A e B), dois (C e D) ou três (E e F) cópias do peptídeo de fusão DEN.II - 88-123.

A avaliação dos RMSD para os sistemas contendo misturas lipídicas de PCPG indicam estabilidade ao final das simulações, conforme mostrado na Figura 4.10. Considerando os componentes separadamente, temos nos lipídios (DMPC e DMPG) um maior tempo médio para atingir a estabilidade ( $\approx 200$  ns), com valores de RMSD médios próximos entre si. O RMSD para a água atingiu a estabilidade rapidamente, enquanto que na avaliação do sistema total o equilíbrio só foi atingido aos 100 ns. Os peptídeos nos sistemas PCPG-1A e PCPG-1B não convergiram para um único valor, enquanto que para as simulações contendo dois (PCPG-2A e PCPG-2B) e três (PCPG-3A e PCPG-3B) peptídeos simultaneamente se mantiveram estáveis ao longo de toda a simulação.



**Figura 4.11:** *RMSF para os peptídeos virais em interação com bicamada de DMPC:DMPG. (A) peptídeos P1 para simulações PCPG-1A e PCPG-1B, (B) peptídeos P1 e P2 da simulação PCPG-2A, (C) peptídeos P1 e P2 para simulação PCPG-2B, (D) peptídeos P1, P2 e P3 para simulação PCPG-3A e PCPG-3B. O RMSF foi calculado utilizando como referência o carbono alfa ( $C_{\alpha}$ ).*

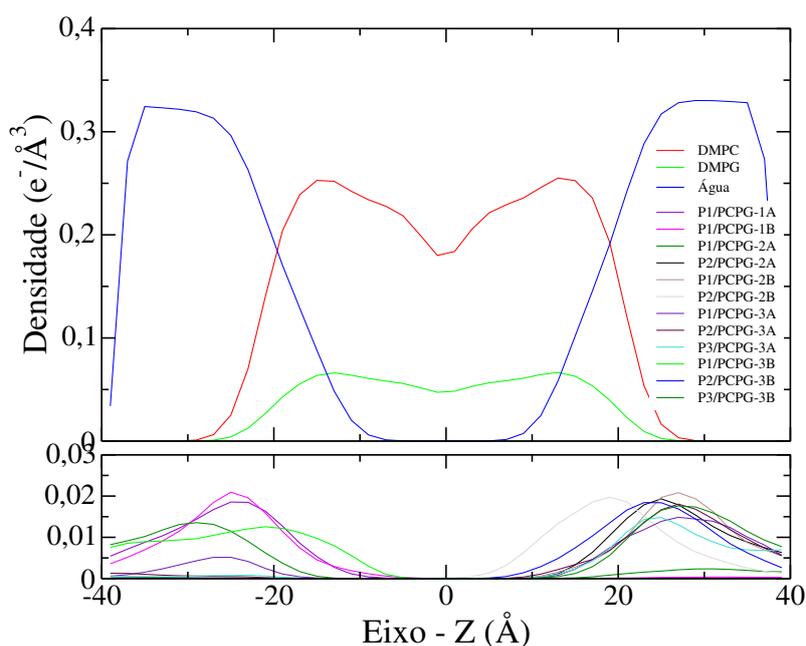
O padrão de RMSF observado para os monômeros indicam que a mudança estrutural sofrida pelos peptídeos foram semelhantes para todos os resíduos aminoácidos, conforme Figura 4.11. Para os sistemas contendo dois peptídeos simultaneamente, o peptídeo P2 do sistema PCPG-2A apresentou maior mudança estrutural na região central do peptídeo em relação aos resíduos iniciais (88-90) e finais (115-117). No sistema PCPG-2B, ambos os peptídeos apresentaram mudanças

similares, com maior restrição nos resíduos iniciais e finais. Quando agrupados em três unidades, os valores médios de RMSF foram uniformes para todos os resíduos dentro de um mesmo peptídeo.

## 4.2.2 Alterações da bicamada lipídica de PCPG (4:1)

As modificações estruturais sofridas pela bicamada lipídica mista são apresentadas de modo semelhante aos sistemas contendo apenas lipídios de DMPC. Neste caso, é importante ressaltar que a mistura lipídica deixa a bicamada com uma carga líquida negativa de -40 devido aos lipídios de DMPG. Essa carga pode influenciar a interação peptídeo/bicamada, pois o peptídeo viral possui uma carga líquida positiva de +7.

### 4.2.2.1 Distribuição de Densidade Eletrônica

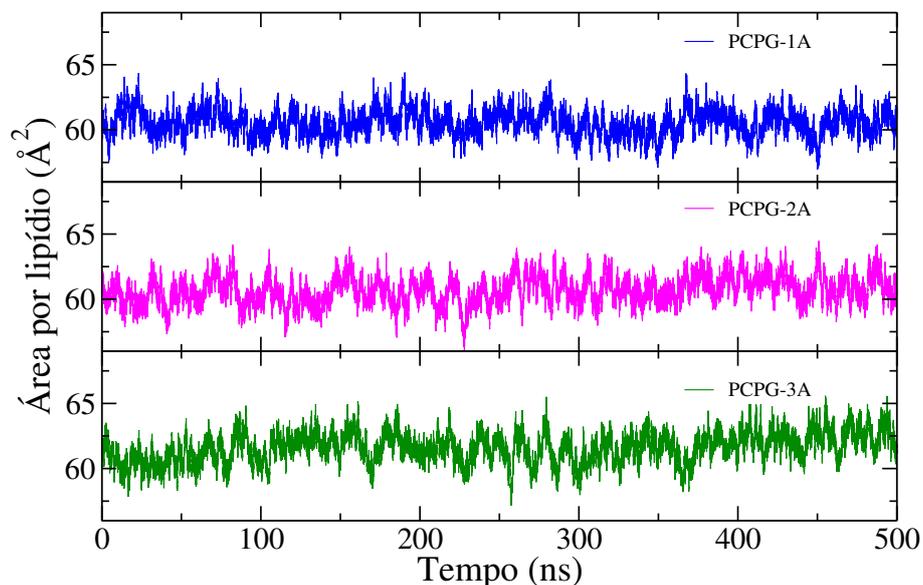


**Figura 4.12:** Perfil de Densidade Eletrônica para os sistemas estudados. Parte superior: bicamada lipídica de DMPC:DMPG e água. Parte inferior: peptídeos de todos os sistemas estudados.

A partir do perfil de densidade eletrônica podemos avaliar como os componentes do sistema interagem ao longo da simulação. Na Figura 4.12 é possível observar que tanto os lipídios de DMPC quanto DMPG mantiveram-se na formação

de bicamada lipídica e possuem uma diferença de intensidade devido a diferença de proporção na construção da bicamada. Através dos máximos de intensidade para os lipídios em ( $\approx \pm 15\text{\AA}$ ), é possível afirmar que ao longo da simulação as cabeças polares de ambos os lipídios (DMPC e DMPG) permaneceram na mesma região. A água por sua vez forma uma região de sobreposição com a bicamada de (-20 a -10  $\text{\AA}$ ) e (10 a 20  $\text{\AA}$ ). Além disso, não houve penetração de moléculas de água na região hidrofóbica da bicamada que compreende ( $\approx \pm 10\text{\AA}$ ). Os peptídeos ficaram em contato com a bicamada lipídica tendo máximo de densidade eletrônica mais próximo da bicamada lipídica ( $\approx \pm 25\text{\AA}$ ), enquanto que para o caso das bicamadas contendo apenas DMPC, os máximos são em  $\approx \pm 35\text{\AA}$ . Como explicação para essa mudança podemos usar as forças eletrostáticas agindo sobre os componentes do sistema.

#### 4.2.2.2 Área por Lipídio



**Figura 4.13:** Área por lipídio para bicamada lipídica de PCPG em presença de um, dois e três peptídeos virais.

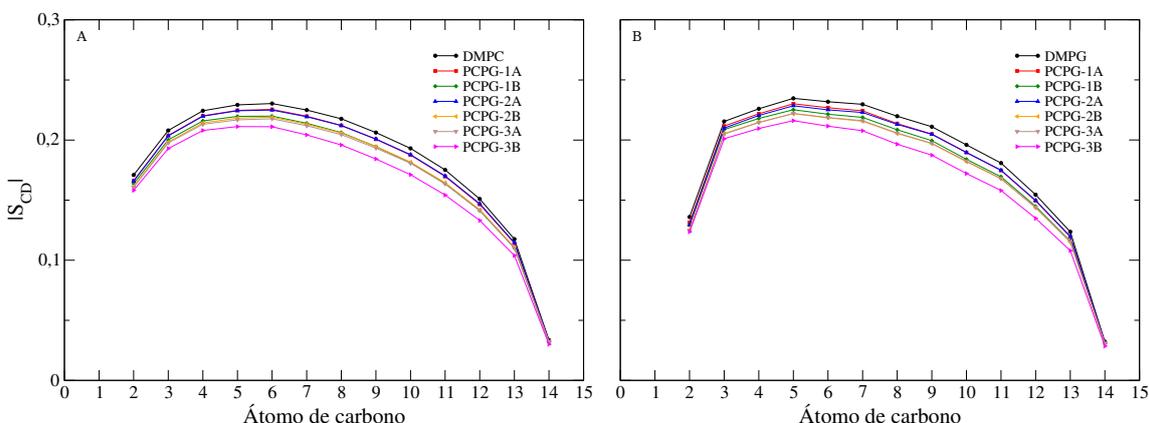
É comum encontrarmos na literatura dados estruturais tais como área e espessura para sistemas contendo apenas um tipo de lipídio. Entretanto, o mesmo não acontece tão frequentemente para misturas lipídicas, neste caso utilizamos uma média ponderada entre os valores obtidos experimentalmente para DMPC e DMPG

em conjunto com critérios para identificar a equilíbrio da bicamada lipídica[37]. O valor médio da área por lipídio da bicamada de PCPG (4:1) obtido foi de  $59,9 \pm 1,2 \text{ \AA}$ .

Na Figura 4.13 apresentamos os gráficos contendo a evolução temporal da área por lipídio da bicamada de PCPG em presença de quantidades crescente de peptídeos. Podemos notar que de modo semelhante aos sistemas contendo bicamadas de DMPC, não houve mudanças significativas ao longo das simulações. Neste caso, as áreas médias foram de:  $60,5 \pm 1,0 \text{ \AA}$  (PCPG-1A),  $60,7 \pm 1,1 \text{ \AA}$  (PCPG-2A) e  $61,6 \pm 1,2 \text{ \AA}$  (PCPG-3A).

#### 4.2.2.3 Parâmetro de Ordem

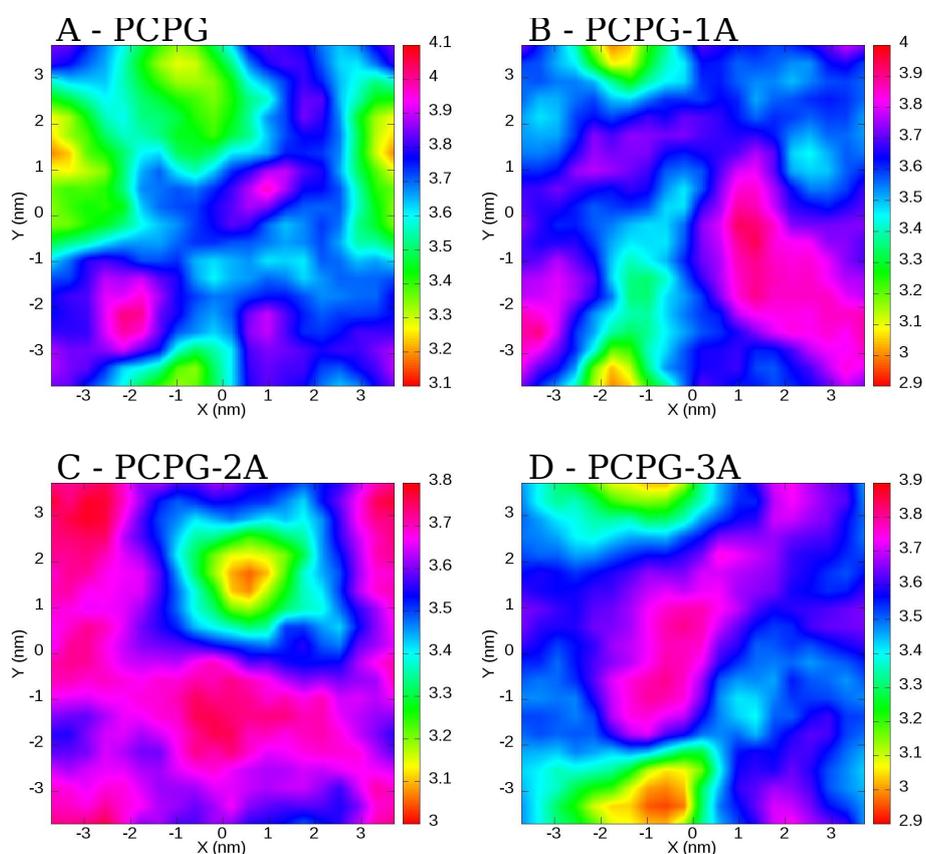
O ordenamento das cadeias hidrocarbônicas de DMPC e DMPG foi semelhante para ambos os lipídios. Na Figura 4.14, temos uma diferença aparente entre as curvas do parâmetro de ordem, entretanto, os valores médios não foram alterados ao longo da simulação. Para o sistema PCPG-1A o valor médio foi de  $0,18 \pm 0,01$ , enquanto que para PCPG-1B foi de  $0,17 \pm 0,01$ . Resultados semelhantes foram observados para PCPG-2A ( $0,18 \pm 0,01$ ) e PCPG-2B ( $0,17 \pm 0,01$ ). Para os sistemas contendo três peptídeos simultaneamente, ambos os valores foram de  $0,17 \pm 0,01$ . Esses valores são comparáveis aos dados experimentais em DMPC ( $0,18$ ) e os resultados computacionais observados para os sistemas na presença de bicamada lipídica de DMPC.



**Figura 4.14:** Parâmetro de ordem para os átomos 2-14 das cadeias hidrocarbônicas de (A) DMPC e (B) DMPG na ausência e presença de peptídeos virais.

#### 4.2.2.4 Espessura da Bicamada Lipídica

A avaliação da espessura da bicamada de PCPG na ausência e presença dos peptídeos virais é apresentada na Figura 4.15. Não foram observadas mudanças no valor médio da espessura após a interação com os peptídeos, tendo o valor médio de  $3,6 \pm 0,1$  nm. Embora o valor médio da espessura seja igual para todos os sistemas, houve uma diferença na distribuição da espessura devido a interação dos peptídeos e flutuações termodinâmicas.



**Figura 4.15:** Mapa de espessura para bicamada lipídica de PCPG na ausência (A), e presença de um (B), dois (C) e três (D) peptídeos simultaneamente. Cada quadro representa o plano  $xy$  da bicamada com a espessura ( $z$ ) na forma de escala de cores independente. As unidades dos eixos  $x, y$  e  $z$  são em (nm).

### 4.2.3 Modificações Estruturais e Inserção dos Peptídeos de Fusão

As modificações na estrutura secundária dos peptídeos virais, bem como o inserção do peptídeo na bicamada são avaliadas nesta seção.

#### 4.2.3.1 Estrutura Secundária

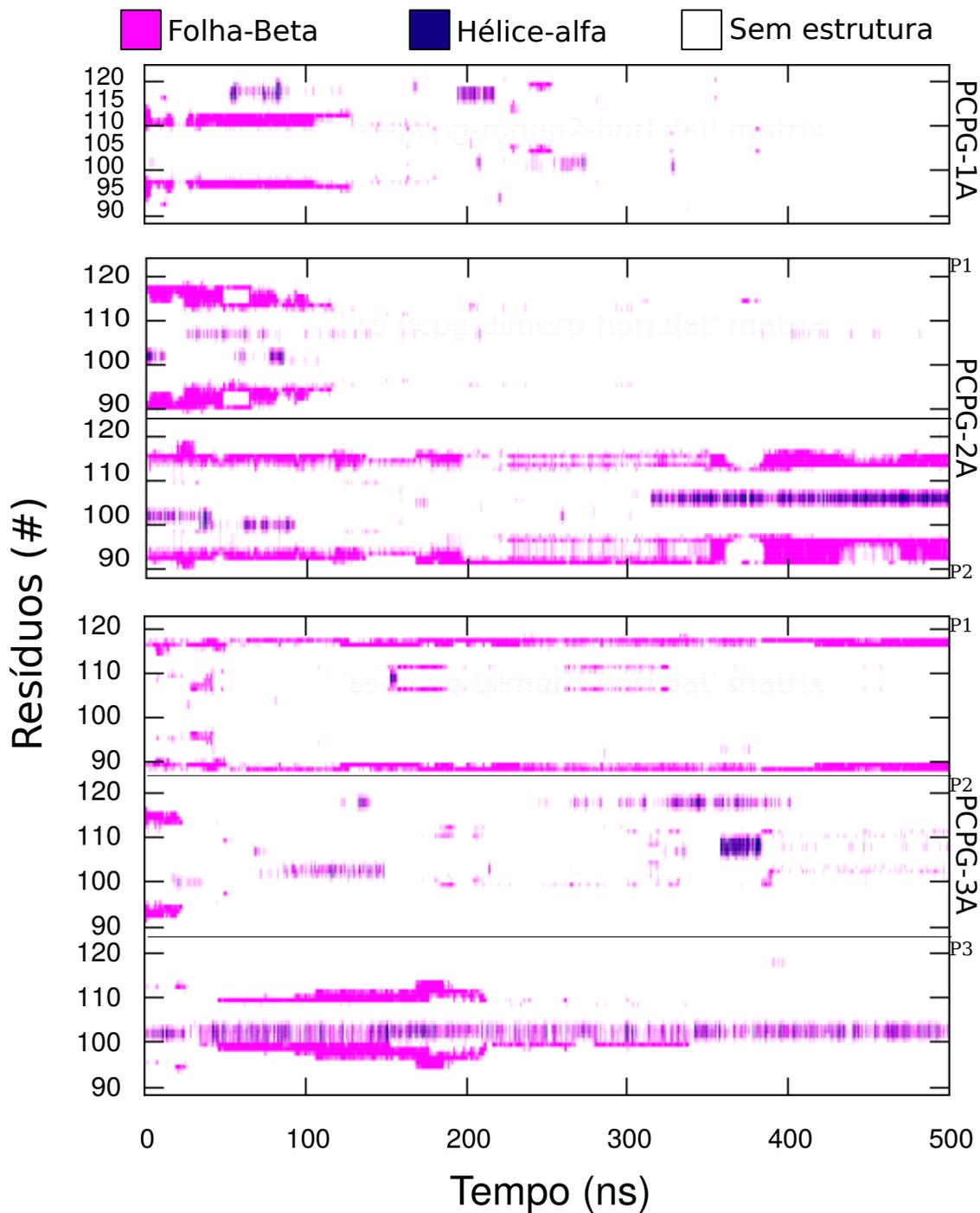
Para estas análises seguiremos o mesmo código de cores e estruturas já apresentados anteriormente.

Como podemos observar na Figura 4.16, o peptídeo no sistema PCPG-1A apresenta formação de folha  $\beta$  no início da dinâmica, com posterior perda de conformação. Foram observados traços de formações hélice- $\alpha$ . Entretanto, a ausência de estrutura secundária foi predominante para esse sistema.

Para o sistema PCPG-2A, podemos dividir em dois peptídeos: P1 e P2. O peptídeo P1 iniciou a simulação com formação de folha- $\beta$ , além de ausência de conformação definida na porção central (resíduos 97-112) e extremidades. A partir de 100 ns de simulação a ausência de estrutura secundária foi predominante, com traços eventuais de formações de folha- $\beta$ . O peptídeo P2 apresentou formação de folha- $\beta$  durante todo o tempo de simulação, com formação de hélice- $\alpha$  na porção central durante os 200 ns finais da simulação. Ao longo da simulação o peptídeo apresentou regiões sem estrutura definida.

O sistema contendo três peptídeos (PCPG-3A), pode ser dividido em três: P1, P2 e P3. P1 apresentou uma fina faixa de formação de folha- $\beta$  ao longo da simulação. Poucos pontos apresentam formação de hélice-, sendo predominante a ausência de estrutura secundária. O peptídeo P2 perde a formação de folha- $\beta$  logo no início da simulação e continua sem conformação definida, apresentando traços de folha- $\beta$  e hélice- $\alpha$  ao longo do tempo. O peptídeo P3 apresentou formação de folha  $\beta$  até aproximadamente 200 ns. Além disso, em sua região central os resíduos tendem a formar hélices. O componente majoritário é a ausência de formação de estrutura secundária.

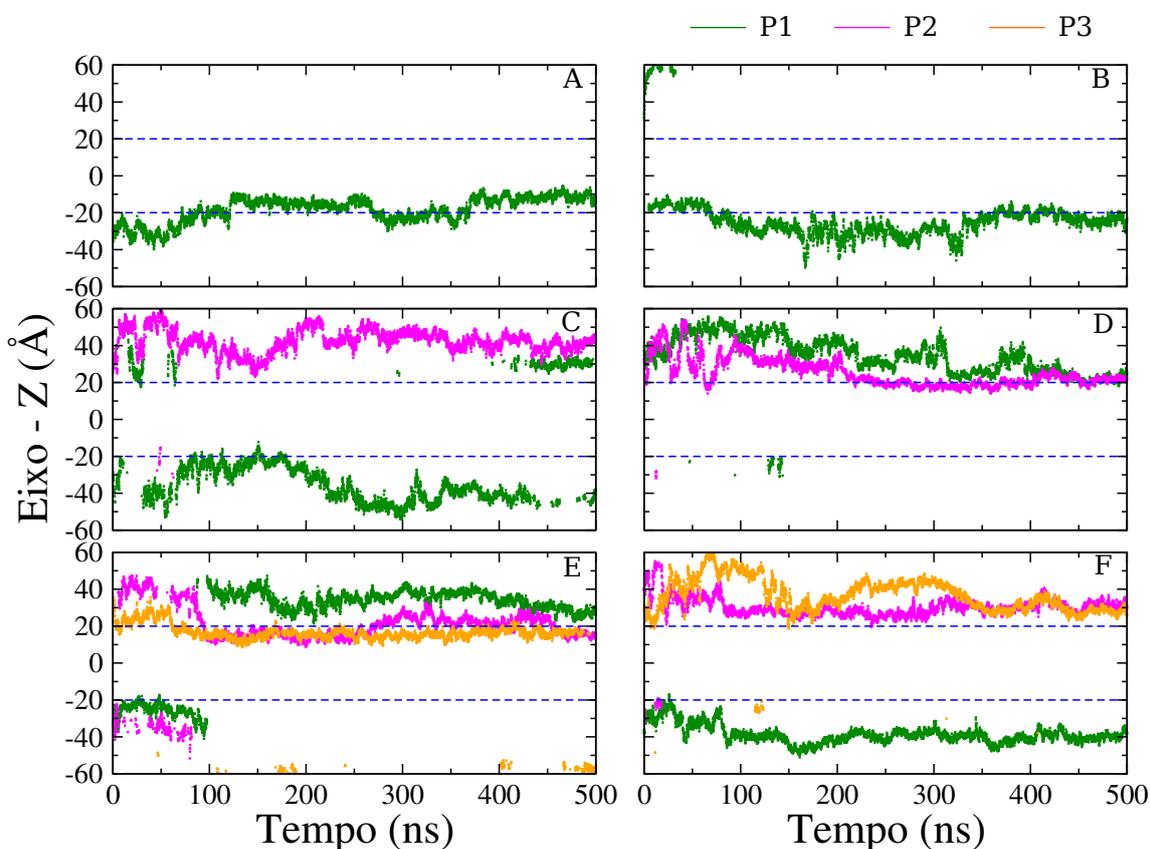
Quando na presença de bicamadas lipídicas de PCPG, os peptídeos tendem a apresentar menores proporções de formações de folha- $\beta$ .



**Figura 4.16:** Mapa de evolução temporal da estrutura secundária para os peptídeos em interação com bicamada lipídica de PCPG.

### 4.2.3.2 Inserção dos Peptídeos na Bicamada Lipídica de PCPG

A Figura 4.17 apresenta a interação e inserção do resíduo triptofano (W101) para os sistemas em presença de bicamada de PCPG. Nos sistemas contendo monômeros (PCPG-1A e PCPG-1B), o triptofano apresentou flutuação na profundidade de inserção. Para o sistema PCPG-1A (A), o resíduo permanece posicionado dentro da região hidrofóbica da bicamada lipídica ao final da simulação, enquanto que para o sistema PCPG-1B (B), houve uma flutuação na posição do resíduo, alternando entre a superfície da membrana e exposições ao ambiente aquoso.

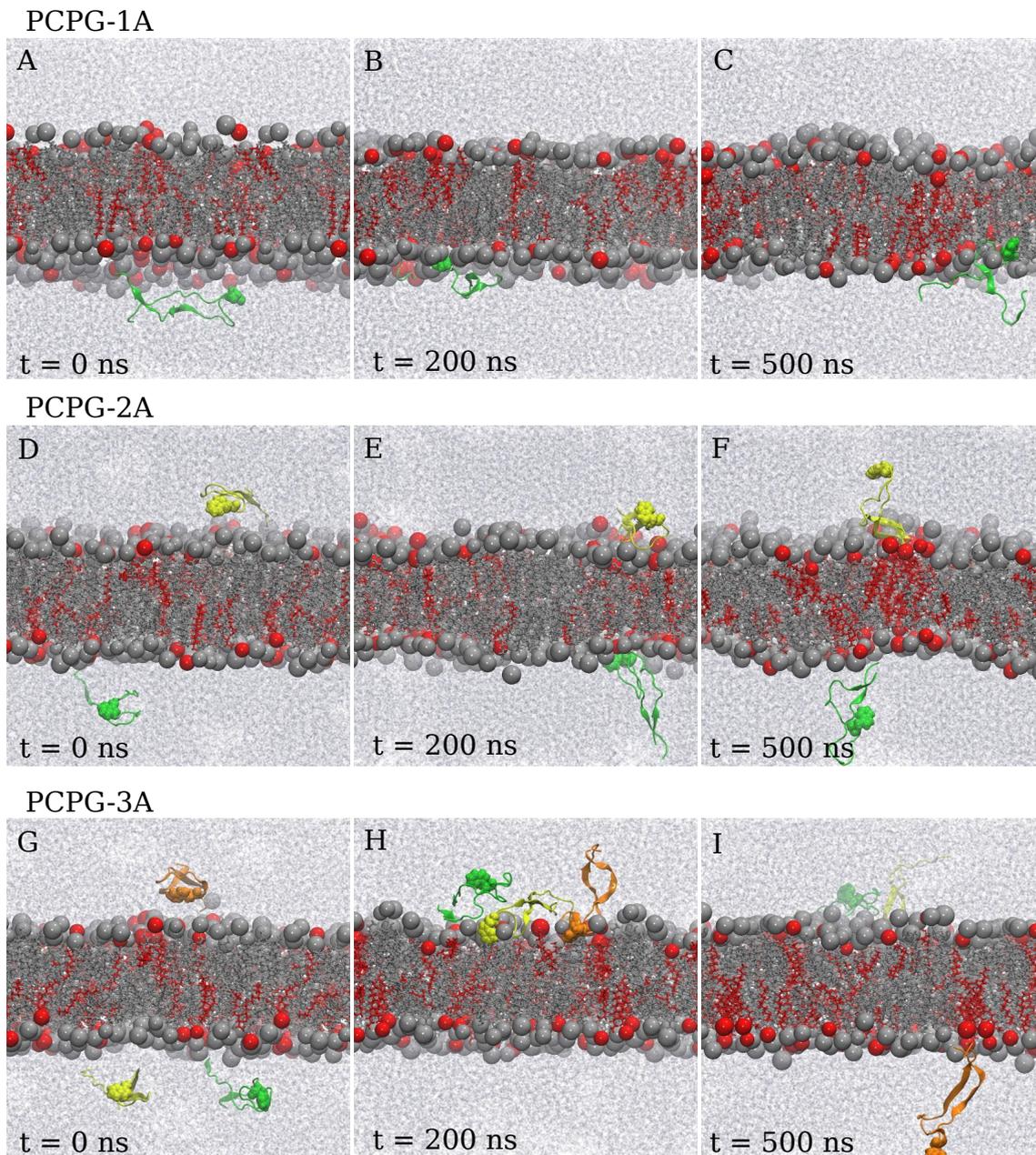


**Figura 4.17:** Evolução temporal da distância média do resíduo triptofano (W101) em relação à bicamada de DMPC:DMPG. A - PCPG-11, B - PCPG-1B, C - PCPG-2A, D - PCPG-2B, E - PCPG-3A e F - PCPG-3B. As linhas pontilhadas em azul indicam a espessura da bicamada lipídica, logo, se o peptídeo está entre as linhas, isso significa uma interação com a região hidrofóbica da bicamada.

Os sistemas contendo dois peptídeos simultaneamente (C e D), apresentaram resultados divergentes entre si. Para PCPG-2A, na média, o resíduo triptofano está exposto ao ambiente aquoso, enquanto que o sistema PCPG-2B, os resíduos

ficam posicionados na região das cabeças polares. Além disso, o resíduo W101 para o peptídeo P1 mantém o posicionamento na superfície da bicamada por mais tempo ( $\approx 250$  ns), quando comparado ao triptofano do peptídeo P2 que somente se posiciona nas cabeças polares ao final do tempo de simulação. A presença de três peptídeos virais (E e F), gerou resultados semelhantes aos observados para o caso contendo dois peptídeos. O sistema PCPG-3A, exibe o posicionamento de dois resíduos triptofanos dos peptídeos P2 e P3 na interface entre cabeça polar/cauda hidrofóbica, enquanto que o sistema PCPG-3B os resíduos triptofanos dos peptídeos não interagem diretamente com a bicamada ao longo das simulações.

Por fim, apresentamos *snapshots* (Figura 4.18) das simulações em três momentos distintos: início (0 ns), meio ( $\approx 200$ -300 ns) e final (500 ns).



**Figura 4.18:** *Snapshots das simulações por dinâmica molecular em tempos distintos indicando início, meio e final. (A,B e C) indicam a simulação PCPG-1A, (D,E e F) PCPG-2A e (G,H e I) PCPG-3A. Os lipídios são representados em cinza (DMPC) e vermelho (DMPG), onde as esferas simbolizam a cabeça polar. Os peptídeos são representados: P1 - verde, P2 - amarelo e P3 - laranja.*

## DISCUSSÃO

---

Nesse trabalho buscamos compreender como o peptídeo de fusão da dengue II (DEN.II 88-123) afeta e é afetado pela interação com membranas modelo. Pela combinação das técnicas experimentais, bem como pelas simulações por dinâmica molecular, observamos que os peptídeos de fusão interagem com as vesículas unilamelares/bicamadas lipídicas de diferentes constituição.

Utilizando a técnica de calorimetria (DSC) avaliamos a mudança na cooperação lipídica de vesículas unilamelares compostas por DMPC e DMPC:DMPG (4:1) na ausência e presença do peptídeo viral. Em ambos os sistemas o peptídeo DEN.II 88-123 interagiu com as membranas causando uma perturbação nas bicamadas. Para a interação com vesículas de DMPC houve um aumento na entalpia de 0,4 kcal/mol, sem, no entanto, alterar a temperatura de transição de fase. Por outro lado, o sistema contendo a mistura lipídica sofreu uma queda na temperatura de transição de 23,5 °C para 21,7 °C, mantendo a entalpia em 5,1 kcal/mol.

A emissão de fluorescência para o resíduo triptofano (W101) do peptídeo viral mostrou que a presença de lipídios negativamente carregados (DMPG) influencia na interação, sugerindo uma maior inserção do resíduo triptofano na região das cadeias hidrofóbicas da bicamada lipídica. Este efeito que é observado através do deslocamento de comprimentos de onda para valores menores foi verificado na presença de vesículas de DMPG (346 nm) e misturas lipídicas de PCPG (350 nm), mas não houve deslocamento quando o peptídeo estava em água ou vesículas de DMPC (355 nm). Pela anisotropia de fluorescência estática constatamos que há um aumento nos valores na seguinte ordem: DMPG (0,069) > PCPG (0,062)

> DMPC (0,041) > tampão (0,021). Esses dados revelam que na presença das vesículas o peptídeo está com menor liberdade rotacional e conseqüentemente o resíduo triptofano também. Podemos ainda afirmar que, apesar de não haver deslocamento espectral para emissão de fluorescência na presença de vesículas de DMPC, o peptídeo encontra-se de alguma forma ligado as vesículas. Isso pode ser afirmado pela alteração dos valores de entalpia observados nos experimentos de DSC em conjunto com a diminuição de liberdade rotacional encontrada pela anisotropia de fluorescência. Avaliando o decaimento da fluorescência podemos confirmar a influência dos lipídios negativamente carregados para a interação do peptídeo-bicamada lipídica. Os tempos médios de decaimento para o peptídeo em tampão e na presença de vesículas de DMPC foram próximos (tampão - 1,80 ns e DMPC - 1,93 ns), enquanto que para vesículas contendo DMPG foram PCPG - 3,93ns e DMPG - 3,28ns. Assim vemos claramente que há uma divisão em dois grupos: um contendo a presença de lipídios aniônicos e outro com a ausência. A mudança nas componentes temporais pode ser explicada pelo caminho que um resíduo triptofano excitado voltará ao estado fundamental e está diretamente relacionada com as taxas de decaimento radiativo e não-radiativo como explicado por Chen[55], enquanto que a existência de três tempos de vida distintos é relacionada a diferentes conformações rotacionais do triptofano[31, 44]. Esses resultados são complementares aos apresentados por Stauffer[24] e Mendes[27], que mostraram que a presença de cargas negativas nos modelos de membrana aumentaram a interação. Pela dinâmica molecular conseguimos ver através do perfil de densidade eletrônica que há uma maior proximidade entre peptídeo-bicamada lipídica nas presença da bicamada de PCPG comparada ao DMPC.

A combinação experimental de DSC e espectroscopia de fluorescência nos permitiu mostrar que há interação entre o peptídeo viral e as bicamadas lipídicas, entretanto a interação não representa evidências da capacidade fusogênica. Geralmente os peptídeos inteferem na estrutura das bicamadas lipídicas e induzem a fusão entre vesículas em menor porcentagem quando comparados ao vírus inteiro[18, 24, 26, 56]. Isso pode ser explicado pela diferença em tamanho do peptídeo quando comparado à glicoproteína inteira, que, evidentemente terá outras regiões com capacidade de auxiliar no processo de fusão. Em nosso caso, o processo de

fusão foi avaliado por técnicas de espalhamento dinâmico de luz e combinados com crio-microscopia de transmissão eletrônica. As vesículas de DMPC na ausência e presença de 1 mol% de peptídeo não tiveram diferença significativa no raio, tendo um valor médio de 39 nm. Para os sistemas contendo mistura lipídica PCPG, o raio médio foi de 41.6 nm na ausência para 48,9 nm na presença de peptídeos (dados não apresentados). Observando que as vesículas mistas apresentaram diferença significativa no tamanho, realizamos experimentos de cryo-TEM para avaliar o que de fato ocorre com as vesículas, pois a técnica de DLS não distingue entre formação de agregados vesiculares e fusão entre vesículas. Constantamos que na ausência de peptídeos as vesículas tem um diâmetro médio de 80 nm e ficam espalhadas uniformemente. Quando são adicionados peptídeos as vesículas tendem a formar agregados e, além disso, fundem-se formando vesículas com diâmetro maior ( $\approx 100$  nm).

A literatura propõe que os peptídeos são capazes de perturbar as bicamadas lipídicas de diversos modos[19, 57, 58] tais como: alterar a fase termodinâmica do sistema[59] ou ainda induzir alterações de área[60]. Entretanto, essas informações normalmente são relacionadas aos peptídeos de classe I, que possuem estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice. Deste modo, buscamos verificar se a ação do peptídeo da dengue, classificado como classe II, foi capaz de alterar alguma propriedade estrutural na bicamada lipídica tais como espessura ou área.

Combinamos dados experimentais de SAXS com simulações computacionais para avaliar as mudanças na espessura da bicamada lipídica pura e após adição de peptídeos. Como exposto acima, os resultados de SAXS mostraram que o peptídeo não foi capaz de alterar a espessura das bicamadas de DMPC e PCPG, mantendo respectivamente os valores médios de 4,5 nm e 4,6 nm na ausência e presença dos peptídeos. Para a dinâmica molecular foram observados os valores médios de espessura de  $3,6 \pm 0,1$  nm para todos os sistemas de DMPC e PCPG. Pela dinâmica podemos ainda observar que embora o valor médio da espessura permaneceu constante, houve flutuações locais devido a interação com o peptídeo viral. Devemos ainda ressaltar que a aparente diferença entre os valores experimentais e computacionais é devida aos critérios utilizados. Na simulação escolhemos o átomo de fósforo para fazer o cálculo da espessura média, enquanto que

no experimento consideramos uma gaussiana centrada na cabeça polar para estimar o resultado.

Outra característica estrutural importante associada à fusão entre membranas é o parâmetro de ordem para as caudas hidrofóbicas[61, 62]. A inserção de um peptídeo viral na superfície da bicamada lipídica altera a curvatura da membrana e juntamente modifica o parâmetro de ordem. Como exemplo temos o peptídeo de fusão da influenza que após a ligação com bicamadas de DMPC aumentaram os valores para o parâmetro de ordem[61, 60]. Contrariando essa regra, nossos resultados obtidos via dinâmica molecular não apresentaram diferença estatística para o valor médio do parâmetro de ordem do DMPC ou da mistura lipídica PCPG na presença ou ausência dos peptídeos virais da dengue.

Na última avaliação estrutural da bicamada observamos que o aumento da razão molar peptídeo/lipídio não teve qualquer influência na área média por lipídio, obtendo valores de  $61,4 \pm 1,5 \text{ \AA}^2$  (DMPC), enquanto que para PCPG foi de  $59,9 \pm 1,2 \text{ \AA}^2$  na ausência de peptídeos. Na presença de um ou mais peptídeos, os valores médios para a área ficaram dentro da margem de erro, deste modo não houve aumento das áreas.

Quando na presença de bicamadas lipídicas os peptídeos de fusão podem adotar diferentes estruturas secundárias, sendo a grande maioria classificados como  $\alpha$ -hélices[62, 57]. Entretanto, existem ainda peptídeos que possuem a estrutura secundária em estruturas- $\beta$ , ou ainda sem estrutura definida[18]. É importante ressaltar que a conformação final do peptídeo pode ser atrelada ao ambiente em que se encontra, e peptídeos de fusão - geralmente ricos em resíduos glicina - possuem uma elevada flexibilidade[63]. O peptídeo DEN.II 88-123 não apresentou uma única característica quando na presença de bicamada de DMPC e PCPG. Nas simulações com bicamadas de DMPC o peptídeo apresentou uma pequena porcentagem de formação de estruturas- $\beta$ , de acordo com o que poderia ser esperado quando ligado na Glicoproteína E. Entretanto, a maior porcentagem indica a ausência de estrutura definida. Resultados semelhantes foram observados para os peptídeos na presença de bicamadas de PCPG, com uma tendência a apresentar formações de  $\alpha$ -hélice quando simulados em dímeros e trímeros. Peptídeos contendo apenas 12 resíduos,  $FLA_G$  e  $FLA_H$ , na presença de bicamada lipídica de POPE apresentaram ausência

de conformação definida, conforme reportado por Mendes e colaboradores[27]. Pan e colaboradores verificaram que peptídeos sintéticos da encefalite transmitida por carrapatos na presença de bicamadas de POPC/POPE/Colesterol apresentaram cerca de 35% dos resíduos em formação de estrutura- $\beta$ [26]. Em nosso caso, todas as simulações apresentaram elevadas proporções onde não há estrutura definida (coil - amarelo), entretanto, para as simulações na presença de DMPC, houve uma maior tendência em formações de folhas  $\beta$ , enquanto que na presença de PCPG, a tendência de formações de  $\alpha$  hélices são predominantes.

Após a ligação com as membranas lipídicas os peptídeos podem ter alguma afinidade para penetração na bicamada como sugerido pelos resultados de fluorescência. Pelo perfil de densidade eletrônica vimos que os peptídeos permaneceram na interface membrana-água. Entretanto, alguns resíduos hidrofóbicos aromáticos tais como o triptofano (W101) possuem certa preferência por ambientes com menor polaridade. Avaliando a profundidade de penetração do triptofano em DMPC podemos notar que ele possui uma tendência a ficar posicionado entre as cabeças polares e o início das caudas hidrofóbicas. Resultados semelhantes foram encontrados para os peptídeos na presença de PCPG. Os valores numéricos encontrados para a profundidade máxima são de aproximadamente 10 Å e esses resultados correspondem aos valores propostos por Stauffer que o resíduo triptofano estaria a 12 Å de profundidade a partir da superfície das membranas[24]. São semelhantes ainda aos dados reportados por Mendes, onde o anel indol do triptofano está próximo à superfície das bicamadas[27].

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

---

### 6.1 Conclusões

Neste trabalho investigamos a interação entre o peptídeo de fusão da dengue II (DEN.II 88-123) e membranas modelo. Como membranas modelo consideramos as vesículas unilamelares grandes (experimentos) e bicamadas lipídicas (simulações) compostas por: DMPC e DMPC:DMPG (4:1).

Os resultados mostraram que o peptídeo viral induz a fusão entre vesículas que contenham o lipídio aniônico DMPG em sua composição, mas não nas compostas apenas por DMPC. Apesar de não induzir a fusão em todos os tipos de vesículas estudados o peptídeo interagiu com todos os modelos de membrana, tendo uma maior intensidade de interação com as bicamadas de PCPG, provavelmente devido à interação de cargas. Mostramos que o peptídeo não foi capaz de alterar as propriedades da bicamada: área por cabeça lipídica, espessura e parâmetro de ordem para as cadeias hidrofóbicas. Entretanto, os experimentos de DSC indicaram que a mudança na cooperação lipídica causada pelos peptídeos sobre as bicamadas lipídicas depende da composição lipídica das vesículas. Além disso, os resultados de cryo-TEM mostraram que na presença de peptídeos, as vesículas de PCPG tendem a formar agregados e, além disso, fundem-se formando vesículas com aumento de diâmetro maior ( $\approx 100$  nm). mecanismo de indução da fusão pode estar atrelado ao tipo de perturbação causado nas bicamadas compostas por PCPG, que não são observadas em bicamadas de DMPC. Em relação ao posicionamento do peptídeo, mostramos que o mesmo encontra-se na superfície das bicamadas lipídicas com inserção do resíduo hidrofóbico triptofano entre as cabeças polares e as caudas

hidrofóbicas. Observamos ainda que, embora o peptídeo apresente alguns resíduos em formação de folha- $\beta$  e  $\alpha$ -hélices, existe uma maior porcentagem de resíduos sem estrutura definida.

## 6.2 Perspectivas

Com o presente trabalho conseguimos avançar no entendimento das interações entre peptídeos de fusão de classe II e bicamadas lipídicas. Entretanto, dois pontos são de grande relevância para a proposição de um modelo de ação:

- Quais as diferenças entre as modificações estruturais ocorridas nas bicamadas lipídicas de PCPG e DMPC na presença do peptídeo viral?
- A formação de um trímero de peptídeos forçados a manter a estrutura- $\beta$  seria capaz de gerar outras modificações estruturais nas bicamadas lipídicas?

Essas questões poderiam trazer uma luz ao mecanismo de indução de fusão promovido pelos peptídeos virais. Uma forma de avaliar esses sistemas seriam através da combinação de experimentos e simulações computacionais. Experimentalmente, pode-se utilizar a técnica de DSC para avaliar uma possível mudança na transição de fase lipídica. Poderiam também ser realizados experimentos de visualização de mudanças estruturais induzidas nas membranas modelo, por meio de sondas fluorescentes inseridas nas bicamadas lipídicas, utilizando técnicas como FLIM (fluorescence lifetime imaging). Computacionalmente, pode-se utilizar a dinâmica molecular modelada em *Coarse-Grained* para construção de uma bicamada lipídica maior e utilização de maior quantidade de peptídeos. Desse modo, poderíamos acessar maiores tempos de simulação e avaliar as possíveis mudanças induzidas pelos peptídeos. O seguinte ponto, a estrutura em trímeros, seria avaliado com o objetivo de compreender melhor a interação da glicoproteína com a bicamada lipídica.

Além das questões levantadas, algumas análises complementares dos resultados computacionais podem trazer novas informações, tais como, avaliação da mudança na hidratação da bicamada após a interação com o peptídeo e mudança na curvatura da bicamada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

---

- [1] GOODSSELL, D. Dengue Virus. *RCSB Protein Data Bank*, v. 17, n. 6, p. 403, jul 2008. ISSN 1234-432X.
- [2] LOK, S.-M. The Interplay of Dengue Virus Morphological Diversity and Human Antibodies. *Trends in Microbiology*, Elsevier Ltd, xx, p. 1–10, dec 2015. ISSN 0966842X.
- [3] RICE, C. Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields virology*, 1996.
- [4] MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews. Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 13–22, jan 2005. ISSN 1740-1526.
- [5] BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 496, n. 7446, p. 504–507, apr 2013. ISSN 0028-0836.
- [6] MALAVIGE, G. N. et al. Dengue viral infections. *Postgraduate medical journal*, v. 80, n. 948, p. 588–601, oct 2004. ISSN 0032-5473.
- [7] SEEMA; JAIN, S. K. Molecular mechanism of pathogenesis of dengue virus: Entry and fusion with target cell. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, v. 20, n. 2, p. 92–103, jul 2005. ISSN 0970-1915.
- [8] MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical microbiology reviews*, v. 22, n. 4, p. 564–81, oct 2009. ISSN 1098-6618.

---

\*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- [9] HALSTEAD, S. B. et al. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25â27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine*, v. 23, n. 7, p. 849–856, jan 2005. ISSN 0264410X.
- [10] SMIT, J. M. et al. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*, v. 3, n. 2, p. 160–171, 2011. ISSN 19994915.
- [11] McPherson PS, Ritter B, W. B. *Clathrin-Mediated Endocytosis*. In: *Madame Curie Bioscience Database*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6479/>>.
- [12] ALLISON, S. L. et al. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of virology*, v. 69, n. 2, p. 695–700, feb 1995. ISSN 0022-538X.
- [13] HARRISON, S. C. The pH sensor for flavivirus membrane fusion. *The Journal of cell biology*, v. 183, n. 2, p. 177–9, out. 2008. ISSN 1540-8140.
- [14] KIELIAN, M. Class II virus membrane fusion proteins. *Virology*, v. 344, n. 1, p. 38–47, 2006. ISSN 00426822.
- [15] WHITE, J. M. et al. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, v. 43, n. 3, p. 189–219, 2008. ISSN 1040-9238.
- [16] BACKOVIC, M.; JARDETZKY, T. S. Class III viral membrane fusion proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 19, n. 2, p. 189–196, 2009. ISSN 0959440X.
- [17] MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, v. 427, n. 6972, p. 313–9, jan 2004. ISSN 1476-4687.
- [18] EPAND, R. M. Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1614, n. 1, p. 116–121, 2003. ISSN 00052736.
- [19] KILLIAN, J. A.; NYHOLM, T. K. M. Peptides in lipid bilayers: the power of simple models. *Current opinion in structural biology*, v. 16, n. 4, p. 473–9, aug 2006. ISSN 0959-440X.

- [20] HEIMBURG, T. *Thermal Biophysics of Membranes*. [S.l.]: Wiley, 2008. (Tutorials in Biophysics). ISBN 9783527611607.
- [21] GORTER, E.; GREDEL, F. on Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *The Journal of experimental medicine*, v. 41, n. 4, p. 439–43, 1925. ISSN 0022-1007.
- [22] SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L.; OTHERS. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, v. 175, n. 23, p. 720–731, 1972. ISSN 0036-8075.
- [23] ALLISON, S. L. et al. Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E. *Journal of virology*, v. 75, n. 9, p. 4268–4275, 2001.
- [24] STAUFFER, F. et al. Interaction between dengue virus fusion peptide and lipid bilayers depends on peptide clustering. *Molecular membrane biology*, v. 25, n. 2, p. 128–38, feb 2008. ISSN 0968-7688.
- [25] MELO, M. N. et al. Interaction of the Dengue virus fusion peptide with membranes assessed by NMR: The essential role of the envelope protein Trp101 for membrane fusion. *Journal of molecular biology*, Elsevier Ltd, v. 392, n. 3, p. 736–46, sep 2009. ISSN 1089-8638.
- [26] PAN, J. et al. Synthetic fusion peptides of tick-borne encephalitis virus as models for membrane fusion. *Biochemistry*, v. 49, n. 2, p. 287–96, jan 2010. ISSN 1520-4995.
- [27] MENDES, Y. S. et al. The structural dynamics of the flavivirus fusion Peptide-membrane interaction. *PloS one*, v. 7, n. 10, p. e47596, jan 2012. ISSN 1932-6203.
- [28] OLSON, F. et al. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *BBA - Biomembranes*, v. 557, n. 1, p. 9–23, 1979. ISSN 00052736.

- [29] JELESAROV, I.; BOSSHARD, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, v. 12, p. 3–18, 1999.
- [30] ITO, a. S. et al. Structure-activity correlations of melanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies. *Biochemistry*, v. 32, n. 45, p. 12264–72, nov 1993. ISSN 0006-2960.
- [31] ENGELBORGHIS, Y. The analysis of time resolved protein fluorescence in multi-tryptophan proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 57, n. 11, p. 2255–2270, sep 2001. ISSN 13861425.
- [32] BRZUSTOWICZ, M. R.; BRUNGER, A. T. X-ray scattering from unilamellar lipid vesicles. *Journal of Applied Crystallography*, International Union of Crystallography, v. 38, n. 1, p. 126–131, jan. 2005. ISSN 0021-8898.
- [33] SU, C.-J. et al. Peptide-induced bilayer thinning structure of unilamellar vesicles and the related binding behavior as revealed by X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1828, n. 2, p. 528 – 534, 2013. ISSN 0005-2736.
- [34] SZTUCKI, M.; Di Cola, E.; NARAYANAN, T. Instrumental developments for anomalous small-angle X-ray scattering from soft matter systems. *Journal of Applied Crystallography*, International Union of Crystallography, v. 43, n. 6, p. 1479–1487, 2010. ISSN 00218898.
- [35] PABST, G. et al. Membrane thickening by the antimicrobial peptide PGLa. *Biophysical journal*, v. 95, n. 12, p. 5779–5788, 2008. ISSN 00063495.
- [36] JO, S. et al. CHARMM-GUI membrane builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophysical journal*, Biophysical Society, v. 97, n. 1, p. 50–58, jul 2009. ISSN 1542-0086.
- [37] PORASSO, R. D. R.; CASCALES, J.; López Cascales, J. J. A criterion to identify the equilibration time in lipid bilayer simulations. *Papers in Physics*, v. 4, n. October, p. 1–10, nov 2012. ISSN 1852-4249.

- [38] PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of computational chemistry*, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, v. 26, n. 16, p. 1781–802, dec 2005. ISSN 0192-8651.
- [39] KLAUDA, J. J. B. et al. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *The journal of physical chemistry. B*, v. 114, n. 23, p. 7830–43, jun 2010. ISSN 1520-5207.
- [40] SAPAY, N.; TIELEMAN, D. P. P. Combination of the CHARMM27 force field with united-atom lipid force fields. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, 2010.
- [41] HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996. ISSN 02637855.
- [42] SOUTO, a. L.; ITO, a. S. Tryptophan fluorescence studies of melanotropins in the amphiphile-water interface of reversed micelles. *European biophysics journal : EBJ*, v. 29, n. 1, p. 38–47, jan 2000. ISSN 0175-7571.
- [43] Soares Macêdo, Z.; FURQUIM, T. a.; ITO, a. S. Estimation of average depth of penetration of melanotropins in dimyristoylphosphatidylglycerol vesicles. *Biophysical chemistry*, v. 59, n. 1-2, p. 193–202, mar 1996. ISSN 0301-4622.
- [44] ZANIN, L. M. P. et al. Interaction of a synthetic antimicrobial peptide with model membrane by fluorescence spectroscopy. *European biophysics journal : EBJ*, v. 42, n. 11-12, p. 819–31, dec 2013. ISSN 1432-1017.
- [45] LAKOWICZ, J. R. (Ed.). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006. ISBN 978-0-387-31278-1.
- [46] ITO, A. S. et al. Fluorescence depolarization analysis of thermal phase transition in DPPC and DMPG aqueous dispersions. *Journal of Luminescence*, Elsevier, v. 158, p. 153–159, 2015. ISSN 00222313. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231314005602>>.

- [47] KUČERKA, N.; NIEH, M.-P.; KATSARAS, J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1808, n. 11, p. 2761–71, nov 2011. ISSN 0006-3002.
- [48] PAN, J. et al. Molecular structures of fluid phase phosphatidylglycerol bilayers as determined by small angle neutron and X-ray scattering. *Biochimica et biophysica acta*, Elsevier B.V., v. 1818, n. 9, p. 2135–48, sep 2012. ISSN 0006-3002.
- [49] VERMEER, L. S. et al. Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with <sup>2</sup>H NMR experiments. *European biophysics journal : EBJ*, v. 36, n. 8, p. 919–31, nov 2007. ISSN 0175-7571.
- [50] PETRACHE, H. I.; DODD, S. W.; BROWN, M. F. Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by (<sup>2</sup>H) NMR spectroscopy. *Biophysical journal*, v. 79, n. 6, p. 3172–92, 2000. ISSN 0006-3495.
- [51] GURTOVENKO, A. A. et al. Cationic DMPC/DMTAP Lipid Bilayers: Molecular Dynamics Study. *Biophysical Journal*, Elsevier, v. 86, n. 6, p. 3461–3472, 2004. ISSN 00063495.
- [52] SACHS, J. N.; PETRACHE, H. I.; WOOLF, T. B. Interpretation of small angle X-ray measurements guided by molecular dynamics simulations of lipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 126, n. 2, p. 211–223, dec 2003. ISSN 00093084.
- [53] ALLEN, W. J.; LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. GridMAT-MD: a grid-based membrane analysis tool for use with molecular dynamics. *Journal of computational chemistry*, v. 30, n. 12, p. 1952–8, oct 2009. ISSN 1096-987X.
- [54] FRISHMAN, D.; ARGOS, P. *Knowledge-based protein secondary structure assignment*. 1995. 566–579 p.
- [55] CHEN, Y.; BARKLEY, M. D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry*, v. 37, n. 28, p. 9976–9982, 1998. ISSN 00062960.

- [56] SCHIBLI, D. J.; WEISSEHORN, W. Class I and class II viral fusion protein structures reveal similar principles in membrane fusion. *Molecular Membrane Biology*, v. 21, n. 6, p. 361–371, 2004. ISSN 0968-7688.
- [57] TAMM, L. K. et al. Structure and function of membrane fusion peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, v. 66, n. 4, p. 249–260, 2002. ISSN 00063525.
- [58] NIEVA, J. L.; AGIRRE, A. Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1614, n. 1, p. 104–115, 2003. ISSN 0005-2736.
- [59] EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Relationship between the infectivity of influenza virus and the ability of its fusion peptide to perturb bilayers. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 202, n. 3, p. 1420–1425, 1994. ISSN 0006-291X.
- [60] LAGÛE, P.; ROUX, B.; PASTOR, R. W. Molecular dynamics simulations of the influenza hemagglutinin fusion peptide in micelles and bilayers: conformational analysis of peptide and lipids. *Journal of molecular biology*, v. 354, n. 5, p. 1129–41, dec 2005. ISSN 0022-2836.
- [61] HAN, X. et al. Interaction of Mutant Influenza Virus Hemagglutinin Fusion Peptides with Lipid Bilayers: Probing the Role of Hydrophobic Residue Size in the Central Region of the Fusion Peptide. *Biochemistry*, v. 38, n. 45, p. 15052–15059, nov. 1999. ISSN 0006-2960.
- [62] TAMM, L. K.; HAN, X. Viral Fusion Peptides: A Tool Set to Disrupt and Connect Biological Membranes. *Bioscience Reports*, v. 20, n. 6, p. 501–518, 2000. ISSN 01448463.
- [63] PÉCHEUR, E. et al. Peptides and Membrane Fusion: Towards an Understanding of the Molecular Mechanism of Protein-Induced Fusion. *Journal of Membrane Biology*, v. 167, n. 1, p. 1–17, jan. 1999. ISSN 0022-2631.

- [64] PABST, G. et al. Structural information from multilamellar liposomes at full hydration: Full  $q$ -range fitting with high quality x-ray data. *Physical Review E*, v. 62, n. 3, p. 4000–4009, set. 2000. ISSN 1063-651X.

## FLUORESCÊNCIA COM RESOLUÇÃO TEMPORAL

---

A técnica de fluorescência com resolução temporal permite estudar o decaimento fluorescente de fluoróforos com relação ao tempo. Uma amostra ao ser excitada por um pulso de luz eleva uma população de moléculas ao seu estado excitado. Sendo a taxa de variação populacional no estado excitado proporcional ao número de moléculas ( $n(t)$ ) num tempo  $t$  após a excitação:

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(k_f + k_{nr})n(t) \quad (\text{A.1})$$

onde  $k_f$  é a taxa de decaimento por emissão fluorescente, e  $k_{nr}$  é a taxa de decaimento não radiativo. Realizando a integração sobre a equação A.1 temos um decaimento exponencial da população no estado excitado:

$$n(t) = n(0)\exp(-t/\tau) \quad (\text{A.2})$$

onde o tempo de vida  $\tau$  é representado por:

$$\tau = (k_f + k_{nr})^{-1} \quad (\text{A.3})$$

Em experimentos de fluorescência observamos a intensidade da fluorescência em função do tempo, de modo que as curvas de decaimento do tempo de vida podem ser ajustadas com expressões exponenciais, em casos mais simples, e multi-exponenciais para os casos mais complexos como por exemplo o resíduo

---

aminoácido triptofano:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t\tau_i) \quad (\text{A.4})$$

onde  $\tau_i$  são os tempos de vida de decaimento,  $\alpha_i$  são os fatores pré-exponenciais e  $n$  é o número de exponenciais para o ajuste da curva de decaimento. Os fatores pré-exponenciais podem ser normalizados de modo a representarem a fração de moléculas emisoras com determinado tempo de vida.

Nos casos onde existem mais de um tempo de decaimento, pode-se calcular o tempo de vida médio para o decaimento a partir da equação:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int_0^{\infty} tI(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt} = \frac{\sum_j \alpha_j \tau_j^2}{\sum_j \alpha_j \tau_j} \quad (\text{A.5})$$

## MODELO PARA OBTENÇÃO DO PERFIL DE DENSIDADE ELETRÔNICA A PARTIR DAS CURVAS DE SAXS

---

A técnica de espalhamento de raio-X à baixo ângulo é uma método para determinação estrutural de sistemas de partículas em termos do tamanho médio ou forma das partículas. A partícula espalhadora pode ser um único objeto ou um aglomerado de objetos tais como átomos. O ajuste das curvas de SAXS foi realizado utilizando a teoria de Caillé modificada (MCT), de acordo com o exposto por Pabst et al. 2000[64]. A partir deste ajuste, pode-se obter os parâmetros relacionados ao perfil de densidade eletrônica das cabeças polares e das caudas hidrofóbicas dos lipídios nas vesículas conforme a expressão:

$$I(q) \propto \frac{S(q)|F(q)|^2}{q^2} \quad (\text{B.6})$$

onde  $S(q)$  está relacionado a interação entre as partículas, também conhecido como fator de estrutura;  $F(q)$  relacionado ao fator de forma da partícula e da distribuição eletrônica; e  $q$  correspondendo ao módulo do vetor espalhamento, relacionando ao ângulo de espalhamento,  $2\theta$ , e ao comprimento de onda,  $\lambda$ , por:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \text{sen}(\theta) \quad (\text{B.7})$$

O fator de forma caracteriza a distribuição de densidade eletrônica, sendo

apresentando como a transformada de Fourier:

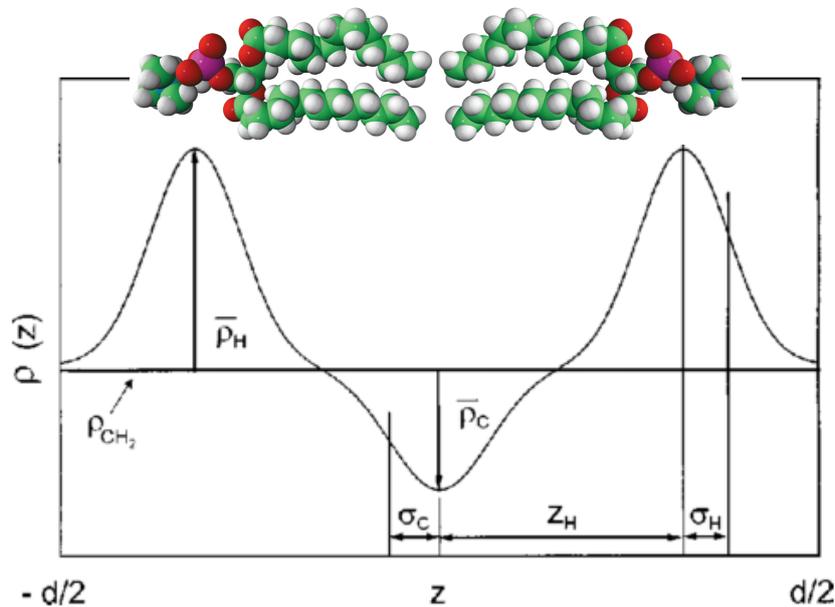
$$f(q) = \int \rho(z) \exp(iqz) dz \quad (\text{B.8})$$

para um perfil de densidade  $\rho$  ao longo do eixo  $\mathbf{z}$ . Aplicando a transformada inversa da eq. B.8 permite calcular a função densidade eletrônica  $\rho(z)$  a partir da intensidade espalhada.

Para modelar bicamadas lipídicas podemos considerar a soma de duas Gaussianas, representando as cabeças polares e o terminal metila respectivamente:

$$\rho(z) = \rho_{CH_2} + (\rho_h - \rho_{CH_2}) \left[ \exp\left(-\frac{(Z - Z_H)^2}{2\sigma_H^2}\right) + \exp\left(-\frac{(Z + Z_H)^2}{2\sigma_H^2}\right) \right] + (\rho_c - \rho_{CH_2}) \exp\left(-\frac{Z^2}{2\sigma_H^2}\right) \quad (\text{B.9})$$

onde a densidade eletrônica das cabeças polares são definidas por  $\rho_H$  e das cadeias hidrocarbônicas por  $\rho_C$ . A posição dos picos das Gaussianas são definidas por  $Z_i (i = H, C; z_c = 0)$ , com desvio padrão  $\rho_i$ .



**Figura B.1:** Perfil de densidade eletrônica representando  $\rho(z)$  em função da distância  $z$  ao centro da bicamada, dado pela equação B.9. Adaptado de Pabst et al. (2000).