

**unesp**



**Universidade Estadual Paulista**

**“Júlio de Mesquita Filho”**



**Instituto de Química**

Campus Araraquara

**Graziely Ferreira Cespedes**

**Sínteses e Estudos dos Diferentes Peptídeos de  
Fusão dos Flavivirus causadores da Dengue**

Araraquara, 2013

**Graziely Ferreira Cespedes**

**Sínteses e Estudos dos Diferentes Peptídeos de  
Fusão dos Flavivirus causadores da Dengue**

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

**Orientador: Prof. Drº Eduardo Maffud Cilli**

Araraquara, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

C422s Céspedes, Graziely Ferreira  
Sínteses e estudos dos diferentes peptídeos de fusão dos  
flavivirus causadores da dengue /  
Graziely Ferreira Céspedes. – Araraquara : [s.n], 2013  
146 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Eduardo Maffud Cilli

1. Biotecnologia. 2. Peptídeos. 3. Fusão. 4. Dengue.  
I. Título.

GRAZIELY FERREIRA CESPEDES

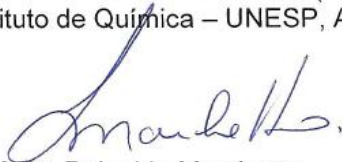
Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutora em  
Biotecnologia.

Araraquara, 16 de setembro de 2013.

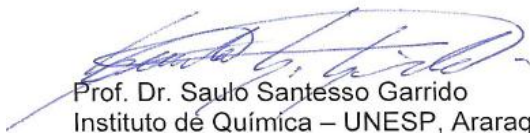
BANCA EXAMINADORA



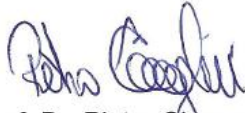
Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



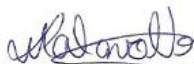
Prof. Dr. Reinaldo Marchetto  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Pietro Ciancaglini  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Malavolta Quaglio  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa – FCMSCSP, São Paulo

## Dados pessoais

Nome Graziely Ferreira Cespedes

Nome em citações bibliográficas: CESPEDES, Graziely Ferreira

Sexo: Feminino

Nascimento: 16/08/1982 - Pereira Barreto/SP – Brasil

## Formação acadêmica/titulação

**2009** Doutorado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Sínteses e Estudos dos Diferentes Peptídeos de Fusão dos Flavivirus causadores da Dengue

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

**2007 –2009** Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Sínteses e Estudos Estrutura/Função de um peptídeos extraído da Rã *Hypsiboas albopunctatus* e Análogos, Ano de obtenção: 2009

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

Bolsista do: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2002 –2005** Graduação em Ciências Biológicas.

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

Título: Estudos eletroforético da LDH em Vertebrados

Orientador: Alfredo di Vito Neto

## Formação complementar

**2005 – 2005** Extensão universitária em Plantas Medicinais em nosso dia a dia

Hortaliças F.

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

**2005 –2005** Extensão universitária em Cultivo e Manutenção de Orquídeas.

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

**2005 –2005** Extensão universitária em Macroinvertebrados Bentônicos Como Indicadores da qualidade da água.

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

**2005 –2005** Extensão universitária em Mamíferos da Mata Atlântica.

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

**2005 – 2005** Extensão universitária em Extração de DNA e Amplificação de Sequência Genômica

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

**2005 –2005** Extensão universitária em Perspectivas da Utilização de Compostos Naturais no manejo de plantas daninhas.

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

**2004 –2004** Extensão universitária em Biologia da Conservação: Ciência da Crise.

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

**2004 –2004** Extensão universitária em Proteção dos Recursos Naturais: Licenciatura e Fiscal.

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

**2003 –2003** Extensão universitária em Bonzai.

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

### **Atuação profissional**

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Vínculo institucional

**2009 – Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutorando, Regime:

Dedicação exclusiva

Projeto de Pesquisa: Sínteses e Estudos dos Diferentes Peptídeos de Fusão dos Flavivirus causadores da Dengue

**2007 –2009** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrando, Regime:

Dedicação exclusiva

Projeto de Pesquisa: Síntese e Estudos Estrutura/Função de um Peptídeo Extraído da Rã *Hypsiboas albopunctatus*

## Atividades

**05/2005 - 06/2006** Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia

*Estágio:*

*Estágio de Iniciação Científica*

2. Ohio State University - OSU

Vínculo institucional

**2012 - 2012** Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

Vínculo institucional

**2005 –2005** Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 72, Regime: Integral

## Áreas de atuação

1. Ciências Biológicas

2. Proteínas

## Projetos

Projetos de pesquisa

**2009 – 2013** Sínteses e Estudos dos Diferentes Peptídeos de Fusão dos Flavivirus causadores da Dengue.

Descrição: A infecção do vírus da dengue depende da sua fusão com a membrana do hospedeiro. Este processo é intermediado pelo peptídeo de fusão que está localizado no domínio II da “glicoproteína E” entre os resíduos 98 a 112, cuja sequência de aminoácidos é: **DRGWGNGCGLFGKGG**. Todos os Flavivirus, incluindo os quatro sorotipos da dengue, apresentam esta sequência em regiões próximas, além de apresentarem alta identidade. O objetivo deste projeto tem por finalidade avaliar as diferenças entre as posições 88-97 a 112-123 dos quatro sorotipos da dengue. Nesta região está contido o peptídeo de fusão, bem como as regiões que o flanqueiam, e que mostraram ser importantes na interação com a membrana. Este estudo foi realizado por meio da síntese, avaliação da interação com modelos de membrana (micelas zwitteriônicas -LPC e vesículas DPPC, PE). Sabendo-se que a exposição destas sequências e consequente fusão da membrana é dependente do pH do meio, as alterações estruturais foram avaliadas em diferentes pHs (5,5 e 7,1). Nestes estudos foram utilizadas as técnicas de Dicroísmo Circular, Fluorescência, Monocamadas de Langmuir e BAM. Somado a isto, utilizamos membranas marcadas na cabeça polar do lipídeo e na posição 6, permitindo por meio da fluorescência avaliar a interação dos peptídeos com esse sistema macromolecular. O aminoácido triptofano foi usado como sonda para analisar a profundidade da inserção em miméticos de membrana. Os resultados mostraram que a SPFS foi útil, obtendo um material com alto índice de pureza. Os estudos de CD demonstraram que os peptídeos do sorotipo 2 e 3 não sofrem

alterações na sua estrutura. As interações peptídeo/miméticos de membranas indicam que todos interagem com as micelas, mas os peptídeos que apresentam maior interação são aqueles contendo a região 112-123. Em contrapartida, nas vesículas marcadas os peptídeos de fusão apresentaram maior interação. Nos estudos com monocamadas de Langmuir e BAM, novamente os peptídeos contendo a região 112-123 apresentam uma maior interação com as monocamadas. Deste modo, os resultados mostram a importância da região posterior ao peptídeo de fusão para a ação de fusão do vírus da dengue.

Integrantes: Graziely Ferreira Cespedes (Responsável); Cilli, E. M.

Financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

#### **2007 – 2009** Síntese e estudos estrutura/função de um peptídeo extraído da rã *Hypsiboas albopunctatus*.

Descrição: Neste trabalho estudaremos a síntese, a relação estrutura-função, a interação com membranas e a atividade biológica do peptídeo da rã *Hypsiboas albopunctatus*. No estudo do modo de ação das macromoléculas, a membrana também é um alvo importante, principalmente por ser a superfície mais externa da célula. Visando um melhor entendimento do seu modo de ação, pesquisas envolvendo as modificações conformacionais de peptídeos em função das variações de pH, força iônica, presença de membranas naturais e artificiais ou modificações a estrutura primária dos peptídeos, são desenvolvidas. Neste caso, a aplicação de métodos espectroscópicos, tais como fluorescência, Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), Ressonância Paramagnética Nuclear (RMN), Espectrometria na região do infra-vermelho (FTIR) e dicroísmo circular (CD), torna-se uma valiosa ferramenta para o enriquecimento do nosso estudo. Desta forma, o objetivo geral deste projeto é enriquecer a valiosa compreensão dos mecanismos de ação dos peptídeos acima descritos e o entendimento da sua interação com membranas.

Integrantes: Graziely Ferreira Cespedes (Responsável); Cilli, E. M.

Financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES

#### **Projeto de extensão**

##### **2012 - 2012** Sínteses e Estudos dos Diferentes Peptídeos de Fusão dos Flavivirus causadores da Dengue.

Descrição: O vírus da dengue está afetando mais de 70 milhões de pessoas por ano. A dengue é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* contaminado com o vírus. A infecção do vírus da dengue depende da sua fusão com a membrana do hospedeiro. Este processo é intermediado pelo peptídeo de fusão que está localizado no domínio II da “glicoproteína E” entre os resíduos 98 a 112, cuja sequência de aminoácidos é: DRGWGNGCGLFGKGG. Todos os Flavivirus, incluindo os quatro sorotipos da dengue, apresentam esta sequência em regiões próximas, além de apresentarem alta identidade. O objetivo deste projeto tem por finalidade avaliar as diferenças entre as posições 88 a 97 e 112 a 123 dos quatro sorotipos da dengue. Nesta região está contido o peptídeo de fusão, bem como as regiões que o flanqueiam, e que mostraram ser importantes na interação com a membrana. As sequências peptídicas foram obtidas através da síntese de peptídeos em fase sólida. Neste projeto será avaliada



a capacidade fusogênica de todos os peptídeos, usando da Transferência de Energia por Ressonância de Förster. (FRET) visando verificar a habilidade de cada um em induzir a mistura lipídica e a permeabilização da membrana de vesículas sintéticas. Somado a isto, e sabendo-se que a exposição destas sequências e consequente fusão da membrana é dependente do pH do meio, os estudos serão avaliadas em diferentes pHs (5,5 e 7,13).

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Doutorado (1);

Integrantes: Graziely Ferreira Cespedes Cilli, E. M. (Responsável); Dennis Bong

Financiador: CAPES - Centro Anhanguera de Promoção e Educação Social-CAPES

### Idiomas

Inglês: Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem.

Espanhol: Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente.

### Produção

Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. CILLI, E. M.; VICENTE, E. F.; CESPEDES, GRAZIELY FERREIRA; BASSO, L. G. M.; LORENZON, E. N.; CASTRO, M. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; COSTA-FILHO, A. J.; CILLI, E. M. Dynamics and Conformational Studies of TOAC Spin Labeled Analogues of Ctx (Ile21)-Ha Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. Plos One, v. 8, p. 60818-, 2013.
2. CESPEDES, GRAZIELY FERREIRA, LORENZÓN, E. N.; VICENTE, E. F.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Mechanism of Action and Relationship Between Structure and Biological Activity of Ctx-Ha, a New Ceratotoxin-like Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. Protein Peptide Letter, v. 19, p. 596-603, 2012.
3. LORENZÓN, E. N.; VICENTE, E. F.; CESPEDES, GRAZIELY FERREIRA; NOGUEIRA, L.G.; BAUADB, T. M; CILLI, E. M. Effects of Dimerization on Structure and Activity of the Antimicrobial Peptide Hylin-c. Biopolymers (New York. Print)., v. 96, p. 469 - 469, 2011.
4. CESPEDES, GRAZIELY FERREIRA; VICENTE, E. F.; JUBILUT, GUITA, N.; NAKAIE, C.R.; CILLI, E. M. Use of FTIR in the obtention of resins and peptides synthesis in solid phase. Química Nova (Impresso), v. 34, p. 589 - 594, 2011.
5. VICENTE, E. F.; CESPEDES, G. F.; CRUSCA JÚNIOR, E.; CASTRO, M.S.; GIANINNI, M. J.; BASSO, L.; COSTA FILHO, A. J.; CILLI, E. M. Conformational Studies Of Toac-Analogues From New Cytolytic Peptide Isolated From *Hypsiboas albopunctatus*. Journal of Peptide Science (Print), v. 16, p. 141 - 142, 2010.
6. CRUSCA JÚNIOR, E.; VICENTE, E. F.; CESPEDES, G. F.; CASTRO, M. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; CILLI, E. M. Studies of an active peptide isolated from *Hyla biobeba* and its synthetic analogues. Amino Acids (Wien), v. 37, p. 44 - 45, 2009.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. LORENZÓN, E. N.; VICENTE, E. F.; CESPEDES, GRAZIELY FERREIRA, NOGUEIRA, L. G.; CILLI, E. M. Efeito dos Espaçadores na Atividade Antimicrobiana das Formas Diméricas da Hylina-c In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu, p.124-124.
2. VICENTE, E. F.; CESPEDES, GRAZIELY FERREIRA; CRUSCA JUNIOR, E.; CASTRO, M. S.; MARCHETTO, R.; GIANNINI, M. J. M. COSTA-FILHO, A. J.; CILLI, E. M. Síntese de Peptídeos em Fase Sólida e Estudos Conformacionais de Peptídeos Análogos contendo TOAC In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu, p.126-126.
3. CESPEDES, GRAZIELY FERREIRA; CASTRO, M. S.; GIANNINI, M. J. M.; CILLI, E. M. Synthesis and Structure/Function Study of a Peptide Extracted from the Frog *Hypsiboas albopunctatus* In: XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia, p.113-113.
4. CRUSCA JUNIOR, E.; VICENTE, E. F.; CESPEDES, GRAZIELY FERREIRA; CASTRO, M. S.; GIANNINI, M. J. M.; CILLI, M. C. Studies Of An Active Peptide Isolated From *Hyla Biobeba* (Hy-B3) And Its Synthetic Analogues In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008, Águas de Lindóia, p.121-121.
5. CESPEDES, GRAZIELY FERREIRA; SACRAMENTO, LUIS VITOR S. DO. Influência da composição da solução nutritiva no cultivo hidropônico de *mentha pulegium* L. In: Sétima Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2005, Campinas. Livro de Resumo. Campinas: CPQBA-Unicamp, 2005. p.19 – 19.

### **Demais produções técnicas**

1. CESPEDES, Graziely Ferreira. As Principais Doenças Transmitidas pela Água, 2005. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
2. CESPEDES, Graziely Ferreira. Propriedades Físicas e Químicas da Água, 2004. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

### **Orientações e Supervisões**

#### **Orientações e supervisões concluídas**

#### **Iniciação científica**

1. Paulo Ricardo Silva Sanches. Síntese de Compostos contendo ácido gálico ligado a aminoácidos e peptídeos: interação com miméticos de membrana e atividade biológica, 2010. Iniciação científica (Química) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### **Eventos**

#### **Participação em eventos**

1. Apresentação de Poster / Paineis na XL Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBQ), 2011. (Congresso) Sínteses e Interação com Modelos de Membrana de Diferentes Peptídeos de Fusão da Dengue.
2. Apresentação de Poster / Paineis na 3rd South American Workshop & International Gregorio Weber Conference on New trends in Advanced Fluorescence Microscopy Techniques, 2011. (Congresso) Synthesis and Interaction with Model Membrane of Different Dengue Virus Serotypes.

3. Apresentação de Poster / Painel na XXXIX Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010. (Congresso) Efeito dos Espaçadores na Atividade Antimicrobiana das Formas Diméricas da Hylina-c.
4. Apresentação de Poster / Painel na 3rd International Workshop on Spectroscopy for Biology, 2010. (Oficina) Estudos das Sínteses Estrutura/Função de um Peptídeo Extraído da rã *Hypsiboas albopunctatus* e Análogos.
5. Apresentação de Poster / Painel na XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010. (Simpósio) Síntese de Peptídeos em Fase Sólida e Estudos Conformacionais de Peptídeos Análogos contendo TOAC.
6. Apresentação de Poster / Painel na XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009. (Congresso) Síntese e Estudo Estrutura Função de um Peptídeo Extraído da rã *Hypsiboas albopunctatus*.
7. Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de novos Fármacos para Doenças Negligenciadas-USP e as Redes Temáticas, Série "Fronteiras do Conhecimento", 2009. (Simpósio).
8. Apresentação de Poster / Painel na XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008. (Congresso) Studies Of An Active Peptide Isolated From *Hyla Biobeba* (Hy-B3) And Its Synthetic Analogues.

História de uma etapa da minha vida escrita por

Nelma Cristina Araújo Zanata

Merece VENCER porque lutou muito para chegar bem aí onde está: percorreu longos caminhos, mudou de país; sentiu saudade, ficou longe, não dormiu, perdeu cabelo (e outras coisas), ganhou experiência, conheceu, dividiu, concedeu, engordou, emagreceu, teve medo, coragem, chorou, sorriu, passou frio, brigou, gritou, mudou a língua, reatou; enfrentou pedras (até nos rins!), tropeçou, expeliu, levantou; duvidou, questionou, acreditou, plantou, colheu, APRENDEU! Mas, ainda não é o fim...

"E isso é o que me caracteriza, e o que me faz seguir vivendo: refazer as asas a cada amanhecer, plantar de novo o amor e acreditar na felicidade como as crianças acreditam em seus sonhos."

Carolina Salcides

"Ainda falta muito para me completar, mas o que tenho por perto  
"Mamãe Ana, Juju e Belha" é o que me faz crer que todo resto se torne  
possível." Eu amo vocês!

Ao meu Amor Renato, mesmo que eu não diga sempre, gostaria de agradecer por cada pequena coisa que você faz por mim, e que tornam meus dias mais suaves. Obrigado por todos esses anos de aprendizagem juntos. Eu amo você!

## Agradecimentos

Quero agradecer a Deus e ao Mestre Jesus, pelo amor imensurável, por nunca me desampararem, pelas provas e oportunidades nesta e em outras vidas. Obrigada senhor Deus, por acreditar em mim.

À Virgem Maria, que tem sido a mão carinhosa e protetora que me envolve em todos os momentos de minha vida.

A você, meu querido pai, que mesmo sem conseguir se expressar, sei o quanto me ama e se orgulha de mim.

À minha eterna princesa Gabriela e príncipe Édipo. Não sei explicar com palavras, mas sei sentir todo o nosso eterno amor.

Às minhas Tias Ferreira, carinhosas, valentes, guerreiras, que sempre lutaram bravamente por cada um de nós e ainda nos ensinaram a ser valentes, Tia Zeca, Tia Teta, Tia Amélia, Tia Bina.

Aos meus avós conhecidos e não conhecidos, mas que se fizeram presente de alguma forma e me presentearam com a maior riqueza da vida, os meus pais.

Aos meus amigos de trabalho: Júlia, Isabelle, Wanessa, Esteban, Paulo, Lentilha, Simone, Saulo, Norival, Anderson, Ana, Camila, Ruth, Matheus.

Aos que moram no meu coração: Maria Inês, Bruninha, Elaine, Julinha, Buiú, Tatinha, Thiago, Celinha, Marcinha, por fazer meus dias melhores, pela simples presença.

Aos meus amigos: Thaty, Felipe e Alicinha, pelo carinho e ajuda.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnologia- CNPq, CAPES e a FAPESP, pelo suporte financeiro.

As “pessoas” da Pós-graduação, que sempre prestativas deixaram muitas vezes de ser funcionárias para serem amigas, obrigada Celinha, Sandra e Wennia.

*“Que as diferentes formas de amor não nos faça desacreditar da nossa, mas sim perceber que é a nossa que nos faz feliz”*

Eduardo Maffud Cilli

"DIFICULDADES preparam pessoas comuns para DESTINOS  
extraordinários..."

Quero agradecer, em especial, ao meu orientador Eduardo, pela grande  
oportunidade de fazer parte da sua equipe de alunos, que me fez crescer  
como cientista e pessoa.

Foram seis anos de convivência,  
e quero agradecer a paciência, os puxões de orelha, os ensinamentos, o  
carinho e a dedicação.



## RESUMO

O vírus da dengue afeta milhões de pessoas a cada ano no mundo todo. O processo de infecção viral pela via endossomal é intermediada pela sequência 98 a 112 (DRGWGNGCGLFGKGG), conhecido como peptídeo de fusão, este segmento faz parte da glicoproteína E, localizado no envelope do vírus. Todos os flavivirus, incluindo os quatro sorotipos da dengue, apresentam esta sequência em regiões próximas, além de apresentarem alta identidade. Apesar de intensas pesquisas e o aumento da incidência de casos da dengue, não existem drogas antivirais específicas, até este momento, para o combate desta doença. Deste modo, a compreensão da interação do vírus com as células hospedeiras é importante na busca de novos fármacos. Neste sentido, este trabalho visou entender melhor o modo de ação do peptídeo de fusão da dengue e a importância de suas regiões laterais. O objetivo deste projeto teve por finalidade avaliar as contribuições das regiões laterais ao peptídeo de fusão, isto é, 88-97 e 113-123, em sua atividade, para os quatro sorotipos da dengue. A obtenção dos peptídeos foi realizada por meio da síntese em fase sólida. Os modelos de membrana utilizados foram micelas zwitteriônicas (LPC) e vesículas (PC ovo e POPG). Sabendo-se que a exposição desta sequência e, conseqüente, fusão da membrana é dependente do pH do meio, os estudos foram realizados em pHs 5,5 e 7,1. Nestes estudos, foram utilizadas as técnicas de Transferência de Energia de Ressonância de Förster (FRET), Dicroísmo Circular, Fluorescência, Monocamadas de Langmuir e BAM. O aminoácido triptofano foi usado como sonda para analisar a profundidade da inserção em miméticos de membrana. Os resultados mostraram que a SPFS foi útil, obtendo os materiais desejados. Avaliando a habilidade fusogênica dos 14 peptídeos estudados, observamos que cada sorotipo apresenta atividade diferente um do outro, sendo que os peptídeos do sorotipo 2 foram os que mais interagiram. Os estudos de interação peptídeo/miméticos de membranas indicaram que todos interagem com as micelas, mas os peptídeos que apresentam maior interação foram aqueles contendo a região posterior ao peptídeo de fusão (113-123). Nos estudos com monocamadas de Langmuir e BAM, novamente os peptídeos contendo a região 113-123 apresentam uma maior interação com as monocamadas. Desta forma, os resultados mostram a importância da região posterior ao peptídeo de fusão na atividade desta molécula. Os resultados com monocamadas também mostraram que os peptídeos promovem uma compactação dos lipídeos da monocamada, indicando, provavelmente, o modo como estes peptídeos promovem a fusão. Somado a isto, os resultados obtidos por BAM indicaram que a adsorção dos peptídeos em pH 7,1 e 5,5 foram diferentes, mostrando que ocorre uma alteração da afinidade com a mudança de pH. Este resultado pode apresentar o “gatilho” que promove a mudança de estrutura da proteína E, promovendo a fusão do vírus.

**Palavras- Chave:** Peptídeo de fusão. FRET. Fluorescência. Vírus da dengue.

## ABSTRACT

Dengue virus affects millions of people worldwide every year. The process of viral infection via endosomal is mediated by the sequence 98-112 (DRGWGNGCGLFGKGG), known as the fusion peptide. This segment is part of the glycoprotein envelope of the virus. All flavivirus, including all four dengue serotypes, contain this fusion sequence and all serotypes present high sequence identity. Although intense researches, the dengue cases have increased and, up to date, there are no specific antiviral drugs to combat this disease. Thus, understanding the virus interaction with host cells is essential for the search and development of new drugs against the dengue virus. Therefore, this study craved a better understanding of the mode of action of the dengue fusion peptide sequence and the importance of its lateral regions. This project aimed to assess the contributions of the lateral regions of the fusion peptide (88-97 and 113-123 sequences) on its activity, for the four dengue serotypes. The synthesis of peptides was performed by solid phase peptide synthesis (SPPS). The membrane models used were zwitterionic micelles (LPC) and vesicles (egg PC and POPG). Since the exposure of this sequence and the resulting membrane fusion is dependent on pH, studies were performed in pH 5.5 and 7.1. In these studies, the techniques of Resonance Energy Transfer Förster (FRET), circular dichroism, fluorescence, Langmuir monolayers and BAM (Brewster angle microscopy) were used. The amino acid and natural fluorophore tryptophan was used as a probe to analyze the insertion depth of the fusion peptide in the membrane mimetic by fluorescence. The results showed that the SPPS was feasible, obtaining the desired materials. Assessing the fusogenic ability of 14 peptides studied, the data indicated that each serotype has different activity and the serotype 2 peptides presented the major interaction. The studies of interaction peptide/membrane mimetic indicated that all peptides interact with micelles. Although, the peptides that containing the region posterior to the fusion peptide (113-123) have greater interactions. The same results were found with these peptides using Langmuir monolayers and BAM. Thus, the results showed the importance of the posterior region of the fusion peptide in the molecule activity. The results also demonstrated that the interaction between peptides and monolayers induced compaction of the lipid monolayer, probably indicating how these peptides promote the fusion. In addition, the results indicated that the adsorption of peptides analyzed by BAM at pH 7.1 and 5.5 were different, indicating that a change occurs in the affinity while the pH is changed. This result may display the "trigger" which promotes the change in protein structure and promoting the virus fusion.

**Keywords:** Fusion peptide. FRET. Fluorescence. Dengue virus.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização do genoma do flavivirus e suas proteínas estruturais e não estruturais.	4
Figura 2 - Estrutura tridimensional da proteína E com seus domínios I, II e III	5
Figura 3 - Sequência de aminoácidos do peptídeo de fusão dos flavivirus.	5
Figura 4 - Esquema do processo de fusão da membrana do vírus da dengue.	6
Figura 5 - Esquema do ciclo de replicação do flavivirus.	7
Figura 6 - Protocolo de Síntese utilizado na síntese dos peptídeos.	14
Figura 7 - Diagrama resumido de Jablonski.	16
Figura 8 - Bicamada plana de uma membrana celular à esquerda e uma vesícula à direita.	18
Figura 9 - Representação esquemática dos vários tipos de vesículas, mostrando o diâmetro e o número de camadas: MLV- vesículas multilamelares, SUV- vesículas unilamelares pequenas, LUV- vesículas unilamelares grandes.	19
Figura 10 - Estrutura química do NBD-PE.	20
Figura 11 - Estrutura química do Rh-DHPE.	20
Figura 12 - Representação do “processo de fusão” ou de “mistura lipídica” durante os experimentos de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET). (A) receptor - Rh-PE e (D) doador - NBD-PE.	20
Figura 13 - Espectros de emissão para o receptor - Rh-PE e doador - NBD-PE antes e depois do processo de fusão.	20

Figura 14 - Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares grandes (MLVs), vesículas unilamelares pequenas (SUVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs). Extraído de <a href="http://www.avantilipids.com">www.avantilipids.com</a>	22
Figura 15 - Estrutura química do POPG.	22
Figura 16- Estrutura química do PC ovo.	22
Figura 17 - 1-palmitoil-2- hidroxil-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC).	23
Figura 18 - Ilustração esquemática do fenômeno de Dicroísmo Circular	24
Figura 19 - Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (A) $\alpha$ -hélice, (B) folha $\beta$ -pregueada e (C) estrutura randômica	25
Figura 20 - Ilustração da estruturação das moléculas durante os diferentes estágios de compressão e isoterma da pressão superficial ( $\pi$ ) versus área (A) por molécula do ácido esteárico	27
Figura 21 - Perfil cromatográfico do peptídeo de fusão com cisteína: (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.	29
Figura 22 - Espectro de massas do Peptídeo de fusão puro com resíduo de cisteína.	30
Figura 23 - Perfil cromatográfico do KRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFRCKK (peptídeo bruto). Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0.045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0.036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.	31
Figura 24 - Perfil cromatográfico do peptídeo de fusão com serina: (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1mL/min e detecção em 220 nm.	32

Figura 25 - Espectro de massas do Peptídeo de Fusão com resíduo de serina – material puro.	33
Figura 26 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-2 (98-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1mL/min e detecção em 220 nm.	34
Figura 27 - Espectro de massas do peptídeo Den-2 (98-123) puro.	35
Figura 28 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-2 (88-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.	35
Figura 29 - Espectro de massas do peptídeo Den-2 (88-123). Massa molecular teórica 3914,56 g/mol, (carga +4) 979, (carga +5) 784 g/mol e (carga +6) 653.	36
Figura 30 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-2 (88-111): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm	36
Figura 31 - Espectro de massas do peptídeo Den-2 (88-111). Massa molecular teórica de 2607,98, (carga+2) 1304, (carga +3) 870, (carga +4) 652 g/mol, (carga +5) 522 g/mol e (carga +6) 435 g/mol.	37
Figura 32 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-3 (98-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.	38
Figura 33 - Espectro de massas do peptídeo Den-3 (98-123) puro.	39
Figura 34 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-3 (88-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.	39
Figura 35 - Espectro de massas do peptídeo Den-3 (88-123) puro.	40

Figura 36 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-3 (88-111): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm	40
Figura 37 - Espectro de massas do peptídeo Den-3 (88-111) puro.	41
Figura 38 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-1 (98-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.	42
Figura 39 - Espectro de massas do peptídeo Den-1 (98-123). Massa molecular teórica de 2671,01 (carga+2) 1336, (carga +3) 891, (carga +4) 668 g/mol.	42
Figura 40 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-1 (88-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.	43
Figura 41 - Espectro de massas do peptídeo Den-1 (88-123). Massa molecular teórica de 3849,37 g/mol, (carga +3) 1284 g/mol, (carga +4) 963 g/mol, (carga +5) 770 g/mol e (carga +6) 642 g/mol.	44
Figura 42 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-1 (88-111): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.	44
Figura 43 - Espectro de massas do peptídeo Den-1 (88-111). Massa molecular teórica de 2585,87 g/mol, (carga+2) 1293 g/mol, (carga +3) 862 g/mol, (carga +4) 647 g/mol.	45
Figura 44 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-4 (98-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H <sub>2</sub> O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.	46
Figura 45 - Espectro de massas do peptídeo Den-4 (98-123). Massa molecular teórica de 2515,72 g/mol, (carga+2) 1258 g/mol, (carga +3) 839 g/mol, (carga +4) 630 g/mol.	46

- Figura 46 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-4 (88-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm. 47
- Figura 47 - Espectro de massas do peptídeo Den-4 (88-123). Massa molecular teórica de 3761,13 g/mol, (carga+2) 1881 g/mol, (carga +3) 1254 g/mol, (carga +4) 941 g/mol e (carga +5) 753 g/mol. 47
- Figura 48 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-4 (88-111): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm. 48
- Figura 49 - Espectro de massas do peptídeo Den-4 (88-111). Massa molecular teórica de 2652,91 g/mol, (carga+2) 1327 g/mol, (carga +3) 855 g/mol, (carga +4) 664 g/mol e(carga +5) 531 g/mol. 48
- Figura 50 - Porcentagem de mistura lipídica do peptídeo de fusão em tampão fosfato e acetato, com o erro padrão indicados com setas de duas pontas. Tampão fosfato em azul e tampão acetato em vermelho. 50
- Figura 51 - Porcentagem de mistura lipídica dos peptídeos do sorotipo do dengue 2 em tampão fosfato e acetato, com o erro padrão indicados com setas de duas pontas. Tampão fosfato em azul e tampão acetato em vermelho. 51
- Figura 52 - Porcentagem de mistura lipídica dos peptídeos do sorotipo do dengue 1 em tampão fosfato e acetato, com o erro padrão indicados com setas de duas pontas. Tampão fosfato em azul e tampão acetato em vermelho. 52
- Figura 53 - Porcentagem de mistura lipídica dos peptídeos do sorotipo do dengue 3 em tampão fosfato e acetato, com o erro padrão indicados com setas de duas pontas. Tampão fosfato em azul e tampão acetato em vermelho. 52

- Figura 54 - Porcentagem de mistura lipídica dos peptídeos do sorotipo do dengue 4 em tampão fosfato e acetato, com o erro padrão indicados com setas de duas pontas.  
Tampão fosfato em azul e tampão acetato em vermelho. 53
- Figura 55 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos de fusão com serina e cisteína. 57
- Figura 56 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão(B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 1. 58
- Figura 57 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 2. 58
- Figura 58 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 3. 59
- Figura 59 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 4. 59
- Figura 60 -Variação da intensidade de fluorescência (A) do comprimento de onda de máxima emissão(B) em função da [LPC] para os peptídeos de fusão com serina e cisteína. 60
- Figura 61 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 1. 60
- Figura 62 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 2. 61
- Figura 63 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 3. 61
- Figura 64 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 4. 62



Figura 65 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos de fusão em solução aquosa pH 7,1. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. 63

Figura 66 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 1 em solução aquosa pH 7,1. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. 64

Figura 67 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 2 em solução aquosa pH 7,1. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. 64

Figura 68 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 3 em solução aquosa pH 7,1. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. 65

Figura 69 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 4 em solução aquosa pH 7,1. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilami 65

Figura 70 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos de fusão em tampão acetato. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. 67

Figura 71 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 1 em tampão acetato. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. 68

Figura 72 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 2 em tampão acetato. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. 68

- Figura 73 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 3 em tampão acetato. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. 69
- Figura 74 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 4 em tampão acetato. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. 69
- Figura 75 - Espectros de CD do peptídeo de fusão em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato. 71
- Figura 76 - Espectros de CD do peptídeo Den-2 (98-123) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato. 72
- Figura 77 - Espectros de CD do peptídeo Den-2 (88-123) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato. 72
- Figura 78 - Espectros de CD do peptídeo Den-2 (88-111) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato. 72
- Figura 79 - Espectros de CD do peptídeo Den-3 (98-123) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato. 73
- Figura 80 - Espectros de CD do peptídeo Den-3 (88-123) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato. 73
- Figura 81 - Espectros de CD do peptídeo Den-3 (88-111) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato. 73
- Figura 82 - Cinéticas de adsorção dos peptídeos estudados em tampão fosfato com concentração de aproximadamente 1,5  $\mu\text{mol/L}$ , na interface líquido-ar. 75
- Figura 83 - Isotermas de pressão superficial versus área da cuba para os peptídeos em subfase de tampão fosfato com concentração de aproximadamente 1,5  $\mu\text{mol/L}$ . 77

- Figura 84 - Cinéticas de adsorção do peptídeo de fusão (98-112) em monocamadas de Langmuir de DPPC. 78
- Figura 85 - Isoterma de pressão superficial versus área por molécula para monocamadas de DPPC em diferentes concentrações do peptídeo de fusão (98-112). 79
- Figura 86 - Cinéticas de adsorção e isotermas de pressão superficial versus área por molécula para monocamadas de DPPC em diferentes concentrações dos peptídeos: (A) Den-2 (98-123); (B) Den-2 (88-123) e (C) Den-2 (88-111). 81
- Figura 87 - Cinéticas de adsorção dos peptídeos estudados em tampão acetato, na interface líquido-ar. 83
- Figura 88 - Isoterma de pressão superficial versus área da cuba para os peptídeos em subfase de tampão acetato. 83
- Figura 89 - Cinéticas de adsorção do peptídeo de fusão em monocamadas de DPPC em baixo empacotamento lipídico. 84
- Figura 90 - Isotermas de pressão superficial versus área por molécula para monocamadas de DPPC em diferentes concentrações do peptídeo de fusão (98-112) em tampão acetato. 85
- Figura 91 - Cinéticas de adsorção e isotermas de pressão superficial versus área por molécula para monocamadas de DPPC e diferentes concentrações em tampão acetato. (A) Den-2 (98-123); (B) Den-2 (88-123); (C) Den-2 (88-111). 87
- Figura 92 - Isoterma em monocamadas de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondentes as diferentes pressões de superfície: (A) 9,5 mN/m, (B) 11,4 mN/m, (C) 12 mN/m e (D) 18 mN/m. 89
- Figura 93 - Cinéticas de adsorção para peptídeo de fusão (98-112) em monocamadas de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 1 mN/m, (B) 5,5 mN/m e (C) 7,5 mN/m. 90

Figura 94 - Isoterma para Peptídeo de fusão (98-112) em monocamada de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressão de superfície: (A) 10 mN/m, (B) 13 mN/m, (C) 16 mN/m e (D) 26 mN/m. 91

Figura 95 - Cinéticas de adsorção para Den-2 (98-123) em monocamadas de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 0,5 mN/m, (B) 7,8 mN/m, (C) 8,6 mN/m e (D) 10,1 mN/m. 93

Figura 96 - Isoterma para Den-2 (98-123) em monocamada de DPPC espalhadas em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressão de superfície: (A) 19 mN/m e (B) 25 mN/m. 94

Figura 97 - Cinéticas de adsorção para Den-2 (88-123) em monocamadas de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 0,5 mN/m; (B) 5,5 mN/m; (C) 6,0 mN/m e (D) 8,0 mN/m. 95

Figura 98 - Isotermas para Den-2 (88-123) em monocamada de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 12 mN/m e (B) 16 mN/m (C) 28 mN/m. 96

Figura 99 - Isotermas para Den-2 (88-111) em monocamada de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 7,8 mN/m, (B) 9,4 mN/m, (C) 12,2 mN/m e (D) 23,7 mN/m. 97

Figura 100 - Isoterma em monocamadas de DPPC espalhadas em tampão acetato. Imagens de BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 8,6 mN/m; (B) 15,4 mN/m; (C) 21 mN/m e (D) 31,8 mN/m. 98

Figura 101 - Isotermas para Peptídeo de fusão (98-112) em monocamada de DPPC espalhadas em tampão acetato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 6,5 mN/m, (B) 7,3 mN/m, (C) 8,9 mN/m, (D) 11 mN/m e (E) 16 mN/m. 99

Figura 102 - Isotermas para Den-2 (98-123) em monocamada de DPPC espalhadas em tampão acetato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 10,3 mN/m, (B) 13,3 mN/m, (C) 16,7 mN/m e (D) 21,2 mN/m. 100

Figura 103 - Isotermas para Den-2 (88-123) em monocamada de DPPC espalhadas em tampão acetato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 11,7 mN/m; (B) 15 mN/m; (C) 21,2 mN/m and (D) 26,8 mN/m. 101

Figura 104 - Isotermas para Den-2 (88-111) em monocamada de DPPC espalhadas em tampão acetato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 4 mN/m, (B) 6 mN/m, (C) 7,2 mN/m e (D) 16,4 mN/m. 102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos peptídeos de fusão de diferentes flavivirus. <a href="http://www.uniprot.org">www.uniprot.org</a> .	8
Tabela 2 - Peptídeos sintetizados	12
Tabela 3 - Sequência dos peptídeos sintetizados do sorotipo 2 da dengue.	30
Tabela 4 - Sequência dos peptídeos sintetizados do peptídeo de fusão.	32
Tabela 5 - Sequência dos peptídeos sintetizados do sorotipo 2 da dengue	34
Tabela 6 - Sequência dos peptídeos sintetizados do sorotipo 3 da dengue.	37
Tabela 7 - Sequência dos peptídeos sintetizados do sorotipo 1 da dengue	41
Tabela 8 - Sequência dos peptídeos sintetizados do sorotipo 4 da dengue	45
Tabela 9 - Estrutura primária e polaridade dos peptídeos	54
Tabela 10 - Valores de emissão de fluorescência do triptofano e das constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) em solução e em LPC.	66
Tabela 11 - Valores de emissão de fluorescência do triptofano e das constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) no detergente LPC e em solução.	70

## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>32</b>
<b>SUMÁRIO DAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS</b>	<b>2</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 <b>Flavivirus</b>	<b>3</b>
1.2 <b>Glicoproteína E</b>	<b>4</b>
1.3 <b>Síntese de Peptídeos</b>	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVO</b>	<b>11</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1 <b>Síntese de Peptídeos</b>	<b>13</b>
3.2 <b>Purificação dos Peptídeos</b>	<b>14</b>
3.3 <b>Espectrometria de massas</b>	<b>15</b>
3.4 <b>Espectroscopia de Fluorescência</b>	<b>16</b>
3.4.1 <b>Estudos de Interação Peptídeos/Vesículas</b>	<b>17</b>
3.5 <b>Transferência de Energia por Ressonância de Foster (FRET)</b>	<b>19</b>
3.5.1 <b>Preparação das Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs) para Análise de Fusão</b>	<b>21</b>
3.6 <b>Estudos de interação peptídeos/micelas</b>	<b>23</b>
3.6.1 <b>Supressão por Acrilamida</b>	<b>23</b>
3.7 <b>Análise estrutural dos peptídeos</b>	<b>24</b>
3.7.1 <b>Dicroísmo Circular</b>	<b>24</b>
3.8 <b>Monocamada de Langmuir</b>	<b>26</b>
3.9 <b>Microscopia no Ângulo de Brewster (BAM)</b>	<b>28</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
4.1 <b>Sínteses e Caracterização dos peptídeos</b>	<b>28</b>
4.2 <b>Fluorescência</b>	<b>49</b>
4.3 <b>Capacidade fusogênica</b>	<b>49</b>
4.4 <b>Estudos em micelas</b>	<b>55</b>
4.4.1 <b>Micelas de LPC</b>	<b>56</b>
4.4.2 <b>Estudos de Supressão de Fluorescência</b>	<b>62</b>
4.5 <b>Análise estrutural dos peptídeos</b>	<b>71</b>
4.5.1 <b>Dicroísmo Circular</b>	<b>71</b>
4.6 <b>Monocamada de Langmuir</b>	<b>74</b>
4.6.1 <b>Interface Ar/Tampão Fosfato</b>	<b>74</b>
4.6.2 <b>Interação dos Peptídeos em Monocamadas de DPPC em Tampão Fosfato</b>	<b>77</b>
4.6.3 <b>Interface Ar/Tampão Acetato</b>	<b>82</b>
4.6.4 <b>Interação dos Peptídeos em Monocamada de DPPC em Tampão Acetato</b>	<b>84</b>
4.7 <b>Microscopia no Ângulo de Brewster (BAM)</b>	<b>88</b>
4.7.1 <b>Monocamada de DPPC</b>	<b>88</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>105</b>

## ABREVIATURAS

### 1. Outras

BAM	Microscopia do ângulo de Brewster
Boc	t-Butiloxicarbonila
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCM	Diclorometano
DIEA	N,N,N-etildiisopropilamina
DMF	Dimetilformamida
Dic	Diisopropilcarbodiimida
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarboxila
FRET	Transferência de Energia por Ressonância de Förster
HBS	Tampão Salino HEPES
HOBt	N-Hidroxibenzotriazol
K <sub>sv</sub>	Constante de Stern-Volmer
LPC	1-palmitoil-2- hidroxí-sn-glicero-3-fosfocolina
LUVs	Vesículas Unilamelares Grandes
NBD-PE	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1, 3-benzoxadiazol-4-yl)
MLV	Vesículas Multilamelares Grandes
Mma	Área mínima por unidade de molécula
PC ovo	L- $\alpha$ -fosfatidilcolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicerofosfatidilglicerol
Rh-DHPE	Lissamine Rhodamine B: 1,2-Dihexadecanoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfoetanolamina
SUVs	Vesículas Unilamelares Pequenas
SPFS	Síntese de Peptídeo em Fase Sólida
SP	Pressão de superfície
TFA	Ácido trifluoroacético
$\Delta\pi$	Variação da pressão de superfície



## 2. Aminoácidos

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Ácido aspártico
Cys (C)	Cisteína
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido Glutâmico
Gly (G)	Glicina
His (H)	Histidina
Ile (I)	Isoleucina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolina
Ser (S)	Serina
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina

## Sumário das Sequências Peptídicas

Nome	Sequência			
	88	98	112	123
<b>Peptídeo de Fusão</b>				
Peptídeo de fusão-Cys	<b>DRGWGNGCGLFGKGG</b>			
Peptídeo de Fusão-Ser	<b>DRGWGNGSGLFGKGG</b>			
<b>Sorotipo 1</b>				
Den-1 (98-123)	<b>DRGWGNGSGLFGKGSLLTSAKFKSVT</b>			
Den-1 (88-123)	ANFVSRRTFV	<b>DRGWGNGSGLFGKGSLLTSAKFKSVT</b>		
Den-1 (88-111)	ANFVSRRTFV	<b>DRGWGNGSGLFGKG</b>		
<b>Sorotipo 2</b>				
Den-2 (98-123)	<b>DRGWGNGSGLFGKGGIVTSAMFRSCK</b>			
Den-2 (88-123)	KRFVSKHSMV	<b>DRGWGNGSGLFGKGGIVTSAMFRSCK</b>		
Den-2 (88-111)	KRFVSKHSMV	<b>DRGWGNGSGLFGKG</b>		
<b>Sorotipo 3</b>				
Den-3 (98-123)	<b>DRGWGNGSGLFGKGSLVTSAKFQSLE</b>			
Den-3 (88-123)	QNYVSKHTYV	<b>DRGWGNGSGLFGKGSLVTSAKFQSLE</b>		
Den-3 (88-111)	QNYVSKHTYV	<b>DRGWGNGSGLFGKG</b>		
<b>Sorotipo 4</b>				
Den-4 (98-123)	<b>DRGWGNGSGLFGKGGVVTSAKFSSSG</b>			
Den-4 (88-123)	QQYISRRDVV	<b>DRGWGNGSGLFGKGGVVTSAKFSSSG</b>		
Den-4 (88-111)	QQYISRRDVV	<b>DRGWGNGSGLFGKG</b>		

# 1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença viral infecciosa não contagiosa. A transmissão se dá pela picada das fêmeas de artrópodes hematófagos como os mosquitos *Aedes aegypti* (vetor principal) e *Aedes albopictus* contaminados pelo vírus, que ao se alimentarem de sangue contaminados, passam a ser um portador e um disseminador do mesmo. Estes mosquitos, uma vez contaminados apresentam o vírus em sua saliva e em seu intestino, e, durante todo o seu ciclo de vida, de 30 a 40 dias, transmitem o vírus todas as vezes que se alimentam (SELIGMAN, 2008). Os vírus podem circular livremente no plasma ou no interior dos monócitos/macrófagos (HALSTEAD, 2005), contaminando as células musculares estriadas, lisas e fibroblastos, bem como em linfonodos locais (FIGUEIREDO, 1998; KOURI, 2006). Desta forma, os principais alvos potenciais para infecções e replicação do vírus da dengue são os monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, hepatócitos, células epiteliais e fibroblastos. Os vírus têm sido encontrados e se reproduzem em uma variedade de células como fígado, baço, linfonodo, timo, rim, pulmão e células da pele (URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2010).

Há quatro diferentes sorotipos da dengue, classificados como: dengue sorotipo 1 (Den-1), dengue sorotipo 2 (Den-2), dengue sorotipo 3 (Den-3) e dengue sorotipo 4 (Den-4). A imunidade ao mesmo sorotipo (homóloga) é permanente, no entanto, a infecção cruzada, ou seja, por sorotipos diferentes (heteróloga) é temporária, podendo ocasionar quadros clínicos mais graves da doença, como a síndrome do choque e a dengue hemorrágica (HALSTEAD, 2005). As formas mais graves da dengue ocorrem devido à reinfeção, na qual os anticorpos existentes anteriormente não neutralizam o segundo vírus (sorotipo diferente), amplificando a infecção e facilitando a penetração nas células do hospedeiro (HALSTEAD, 2005). A maneira como ocorre a forma hemorrágica ainda não está bem definida, mas existem várias hipóteses cuja a de maior aceitação refere-se à denominada “aumento da infecção mediado pelo sistema imune” (fenômeno comum a todas as outras infecções virais). Nesta hipótese, os antígenos do vírus da dengue expressos na membrana macrofágica induzem fenômenos de eliminação imune por linfócitos T auxiliares e citotóxicos. Os macrófagos, ativados pelos linfócitos e lisados pelas células citotóxicas, liberam tromboplastina, iniciando

fenômenos de coagulação e proteases, causadores de lise celular e choque (SIMMONS *et al.*, 2005). Os quatro sorotipos da dengue são capazes de ocasionar complicações como a febre hemorrágica, mas os sorotipos 2 e 3 são os que estão frequentemente associados a severidade da doença (GUZMÁN; KOURI, 2002).

Os primeiros casos epidêmicos da dengue ocorreram por volta de 1779 na Ásia, África e América do Norte (SILER, 1926). A primeira referência de surto no Brasil é do ano de 1846, no Rio de Janeiro, alastrando-se pelos demais estados do Brasil, ocasionando uma epidemia explosiva com mais de 3 milhões de casos (FIGUEIREDO, 2003). Em 1991, o sorotipo 2 da dengue causou um grande surto e foram relatados os primeiros casos da forma hemorrágica. No ano de 2001, o sorotipo 3 da dengue foi introduzido no Brasil, ocasionando uma gigantesca epidemia (FIGUEIREDO, 1998; HALSTEAD, 2007). A circulação dos sorotipos 1, 2 e 3, e mais recentemente, a reinserção do sorotipo 4, torna a doença mais preocupante, pelo fato de aumentar o risco de epidemias e as possibilidades de reinfeção, ocasionando formas mais grave da doença, como a síndrome do choque e a dengue hemorrágica. Durante 30 anos, o sorotipo 4 se apresentava extinto no Brasil.

Epidemias da doença têm ocorrido em quase todos os estados do Brasil (KROSCHEWSKI *et al.*, 2008). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, em 2010 houve um aumento de 109 % de casos de dengue registrados no país, em relação ao ano passado. O número de óbitos registrados foi quase duas vezes maior que nos anos anteriores. Até julho de 2011, foram notificados 715.666 casos no país. A região sudeste lidera com 47% dos casos de dengue notificados.

As doenças infecciosas como a dengue são as principais causas de morte na maioria das áreas tropicais e subtropicais do mundo. Apesar das exaustivas campanhas visando à erradicação do vetor responsável pela propagação da doença, a dengue, ainda é um problema mundial de saúde pública. A taxa de letalidade é seis vezes maior do que a considerada aceitável pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e estima-se que 50 a 100 milhões de casos de dengue ocorram anualmente em todo o mundo, sendo que cerca de 500.000 casos evoluem para quadros clínicos mais graves da doença, como a dengue hemorrágica e a síndrome do choque, com letalidade de 10% (HALSTEAD, 2007).

A grande ocorrência do número de casos de dengue no Brasil e demais países está diretamente relacionada com as condições climáticas propícias para o desenvolvimento e proliferação do mosquito vetor. Atualmente, no Brasil, estima-se que ocorra cerca de 50 milhões de casos de infecção por ano. Epidemias da doença têm ocorrido em quase todos os estados do Brasil (KROSCHEWSKI *et al.*, 2008).

O grupo farmacêutico Sanofi Paster trabalha no desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra a dengue há cerca de 20 anos. No ano de 2012, em parceria com a Universidade *Mahidol* e o Ministério da Saúde da Tailândia, foram realizados os primeiros resultados com um protótipo de vacina em crianças na Tailândia. Segundo Sanofi Paster, a vacina candidata ofereceu proteção a três dos quatro sorotipos testados (1, 3 e 4), indicando que ainda existe a necessidade de um estudo mais detalhado do protótipo da vacina. O Instituto Butantan em São Paulo, também apresenta um protótipo de vacina desenvolvida nos EUA, encontrando-se em testes clínicos na fase II, e esperando que a ANVISA libere os ensaios clínicos em humanos (D'ALAMA, 2012).

Apesar das intensas pesquisas nos últimos 30 anos, não existe, até o momento, uma vacina efetiva, nem drogas antivirais específicas que forneçam proteção contra os quatro sorotipos do vírus da dengue. Portanto, tem-se buscado nos últimos anos o entendimento do modo de ação deste vírus, visando o desenvolvimento de tratamentos eficientes.

## 1.1 Flavivirus

O vírus da dengue pertence ao gênero flavivirus - família *Flaviviridae*, que inclui uma variedade de 70 diferentes vírus, sendo que mais de 50% destes estão associados a doenças humanas (KIELIAN; REY, 2006). Na família *Flaviviridae*, além dos quatro sorotipos da dengue, existem outros de importância médica, como o vírus da febre amarela, o da encefalite japonesa, o do Oeste do Nilo e o que causa a encefalite transmitida por carrapatos.

Os flavivirus encontram-se envelopados por uma bicamada lipídica onde estão ancoradas 180 cópias de duas proteínas, denominadas envelope (E) e membrana (M). Estas proteínas envolvem o genoma do RNA e formam o nucleocapsídeo. O genoma do vírus é de fita simples positiva de RNA, que codifica uma poliproteína contendo 3.411

aminoácidos, rearranjada na ordem C- M- E- NS1- NS2A- NS2B- NS3- NS4A- NS4B- NS5 (figura1), a qual é clivada por proteases virais em dez proteínas, após e durante a tradução. Destas dez, apenas três são proteínas estruturais, incluindo (C) capsídeo, (M) e (E). As sete proteínas restantes são não estruturais, incluindo NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, que estão relacionadas com a replicação do vírus dentro da célula hospedeira (SELIGMAN, 2008; NEMÉSIO *et al.*, 2011).

Durante a etapa de tradução é formado um precursor da proteína M, a proteína pré-M, esta proteína durante a sua passagem pelo complexo de Golgi sofre clivagens pela enzima furino protease, promovendo a reorganização da superfície do vírus e resultando na capacidade de induzir a fusão celular. Esse processo de clivagem é de fundamental importância, pois está relacionado com a entrada do vírus dentro da célula hospedeira (KEELAPANG *et al.*, 2004).



Figura 1 - Organização do genoma do flavivírus e suas proteínas estruturais e não estruturais.

## 1.2 Glicoproteína E

A propagação do vírus depende da entrada do seu material genético dentro das células hospedeiras e envolve a etapa de fusão do envelope viral com a membrana celular da célula alvo (SELIGMAN, 2008; KIELIAN; REY, 2006). Esta interação ocorre, principalmente, por meio da glicoproteína E, principal componente proteico do envelope viral e responsável pela interação com a membrana (HARRISON, 2008, HROBOWSKI *et al.*, 2005, FIGUEIREDO, 1999, SELIGMAN, 2008, STAUFFER *et al.*, 2008). A sua estrutura consiste de um complexo dimérico com duas subunidades idênticas e compostas por 495 aminoácidos. A principal estrutura secundária encontrada é a folha  $\beta$ . Esta proteína é subdividida em três regiões distintas (figura 2): domínio I,

região central da molécula e contendo o grupo amino-terminal; domínio II, região responsável pela maior parte das interações entre os dímeros; e o domínio III, que inclui a extremidade carboxi-terminal e tem relação com a virulência de determinadas cepas. Os epítomos da proteína E é que definem a produção de anticorpos específicos para o tipo viral da dengue (FIGUEIREDO, 1999).

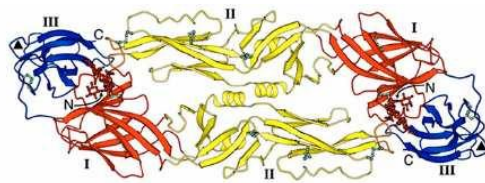


Figura 2 - Estrutura tridimensional da proteína E com seus domínios I, II e III (HARRISON, 2008).

A entrada do vírus requer o contato com a membrana da célula hospedeira, de modo que receptores celulares específicos desencadeiem a entrada do vírus por endocitose.

A etapa de interação entre o vírus e a célula hospedeira emprega um mecanismo de fusão entre a membrana viral e celular, a na qual a sequência de aminoácidos situada entre as posições 98 e 112, domínio II da proteína E, é exposta e se insere na membrana celular (HARRISON, 2008). Essa sequência tem sido nomeada como peptídeo de fusão dos flavivirus, figura 3 (SELIGMAN, 2008; MELO *et al.*, 2009).

98 112  
DRGWGNGCGLFGKGG

Figura 3 - Sequência de aminoácidos do peptídeo de fusão dos flavivirus. [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).

Para que a etapa de fusão aconteça é necessário que ocorra a maturação do vírus, onde os domínios I e III da glicoproteína E e as proteínas estruturais do envelope (E) e de membrana (M) do vírus sofrem alterações conformacionais induzidas pelo baixo pH (<6,6) do endossoma, expondo o peptídeo de fusão. A exposição do peptídeo de fusão no interior do endossoma permite a fusão do envelope viral com a membrana e subsequente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (figura 4). Com a perda do capsídeo, o RNA viral é transcrito e as proteínas virais traduzidas. Essas partículas virais são conduzidas ao retículo endoplasmático rugoso para formação de uma partícula viral, que é direcionado ao complexo de Golgi para alterações pré-traducionais. Após este processo, o vírus é liberado novamente no citoplasma (exocitose), onde sofre maturação novamente, devido ao baixo pH e assim se funde com a membrana celular, liberando o vírus maduro para infectar novas células (figura 5) (STIASNY *et al.*, 2009).

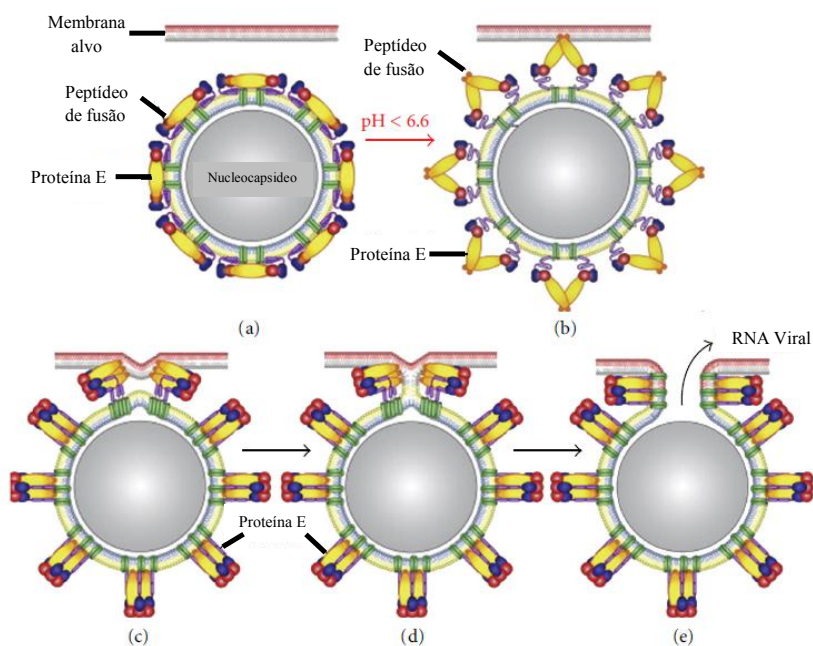


Figura 4 - Esquema do processo de fusão da membrana do vírus da dengue. (a) vírus imaturo; (b) o baixo pH do endossoma desencadeia a maturação do vírus inserindo o peptídeo de fusão na membrana endossomal; (c) formação de um trímero estável, que é dobrado numa estrutura semelhante a grampo; (d) ocorre a hemifusão intermediária entre as membranas externa do vírus e do endossoma; (e) fusão completa da membrana endossomal com a viral, permitindo a liberação do RNA no citoplasma (STIASNY *et al.*, 2009).



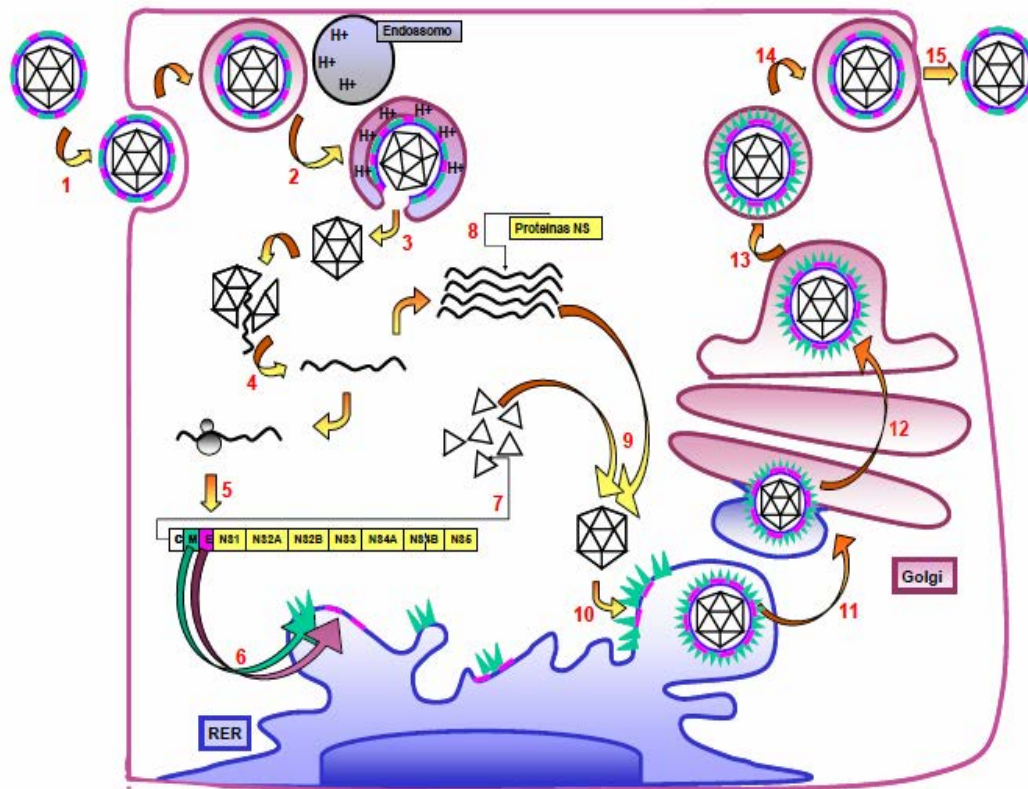


Figura 5 - Esquema do ciclo de replicação do flavivírus. (1) entrada do vírus por endocitose mediada por receptores específicos na célula; (2) fusão do endossoma devido ao baixo pH; (3) liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular; (4) liberação do genoma viral; (5) tradução do RNA; (6) interação das proteínas pré- M (pr-M) e envelope (E) com o retículo endoplasmático rugoso expressado em sua membrana; (7) formação das subunidades do capsídeo; (8) interação das proteínas não estruturais; (9) montagem do nucleocapsídeo; (10) interação do nucleocapsídeo com a membrana do retículo endoplasmático rugoso contendo as proteínas pr-M e E; (11) formação da vesícula contendo a partícula viral imatura que segue para o complexo de Golgi; (12) modificações pré traducionais; (13); migração da vesícula contendo a partícula imatura em direção a membrana celular; (14) maturação; (15) fusão da vesícula contendo o vírus com a membrana celular liberando o vírus para o exterior da célula (MACHADO, 2007).

Todos os membros da família *Flaviridae* apresentam quase 100% de homologia nesta região do peptídeo de fusão, exceto para um único resíduo no meio do peptídeo de fusão no vírus da Encefalite por carrapatos, tabela 1 (SELIGMAN, 2008; STAUFFER *et al.*, 2008), e/ou na extremidade carboxi-terminal.

Tabela 1 - Sequência dos peptídeos de fusão de diferentes flavivirus. [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).

<b>Vírus flavivirus</b>	<b>Vetor</b>	<b>Sequência do peptídeo de fusão</b>
Dengue 1	mosquito	DRGWGNGCGLFGKGS
Dengue 2	mosquito	DRGWGNGCGLFGKGG
Dengue 3	mosquito	DRGWGNGCGLFGKGS
Dengue 4	mosquito	DRGWGNGCGLFGKGG
Febre amarela	mosquito	DRGWGNGCGLFGKGS
Encefalite japonesa	mosquito	DRGWGNGCGLFGKGS
Oeste do Nilo	mosquito	DRGWGNGCGLFGKGS
Encefalite por carrapatos	carrapato	DRGWGNHCGLFGKGS

Somado a isto, Allison 2001 (ALLISON *et al.*, 2001), em seus estudos com proteínas recombinantes mostrou que a substituição na posição 107, do resíduo apolar de Leu por Phe, Thr ou Asp diminui a fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira, sugerindo que este resíduo é importante para etapa de fusão. Adicionalmente, Melo 2009 (MELO *et al.*, 2009), em seus estudos cinéticos descreveu que a alteração do resíduo de Trp na posição 101 do peptídeo de fusão por uma Ala, provoca uma grande diminuição na fusão de miméticos de membrana contendo PC:PG, concluindo que a mutagênese nesta região pode impedir a interação do vírus com sua célula hospedeira. Em outro estudo, envolvendo dois peptídeos da proteína E, regiões de 88 a 123 e 98 a 112 (STAUFFER *et al.*, 2008), foi observado que o peptídeo com a menor sequência promove uma baixa fusão nos miméticos de membrana (PC:colesterol e PC:PG) em relação à sequência maior. Em vista disto, o estudo do peptídeo de fusão existente na proteína E (resíduos 98 a 112), bem como as diferenças nas regiões que o flanqueiam - diferentes para os quatro sorotipos da dengue - pode trazer informações

para desvendar a dinâmica e o modo de ação dessa molécula diante de seu principal alvo, as membranas.

Apesar das intensas pesquisas nos últimos 30 anos e do aumento do número de casos de dengue, não existem drogas antivirais específicas. Desta forma, é de fundamental importância a compreensão das interações do vírus com suas células hospedeiras. Especificamente, este trabalho visou à descoberta da forma como o peptídeo de fusão se organiza quando inserido ou adsorvido em miméticos de membrana.

Neste sentido, estudamos a sequência entre as posições 88 e 123 da proteína E, que é a responsável pela fusão do vírus com a membrana da célula alvo. A proteína E em pH ácido sofre mudanças conformacionais, expondo os aminoácidos da posição 98 a 112 que interage com a membrana do hospedeiro, permitindo a entrada do material genético do vírus na célula alvo.

Stauffer 2008 (STAUFFER *et al.*, 2008), em seus estudos com dois peptídeos da proteína E, da posição 88 a 123 e 98 a 112, mostrou que o peptídeo com a menor sequência (98 até 112) promove uma baixa fusão nos miméticos de membrana (PC:colesterol e PC:PG) em relação a sequência maior (88 até 123). Deste modo, pretendemos esclarecer como a sequência de aminoácidos do peptídeo de fusão (98 a 112) e suas regiões laterais - à direita (88 a 97) e à esquerda (113 a 123) - são importantes neste processo.

### 1.3 Síntese de Peptídeos

A metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), desenvolvida por Bruce Merrifield, é baseada no crescimento da cadeia peptídica aminoácido por aminoácido, a partir de sua região carboxi-terminal que se encontra ligada covalentemente ao suporte polimérico (resina) (ALBERÍCIO, 2000; MERRIFIELD, 1963). Desta forma, a construção do peptídeo é baseada no crescimento da cadeia peptídica no sentido do aminoácido carboxi-terminal para o aminoácido N-terminal, contrário ao que ocorre no processo de síntese de peptídeos pelos ribossomos.

Os polímeros utilizados na SPFS devem ser insolúveis nos solventes utilizados e inertes nas condições de síntese. Polímeros compostos de poliestireno (apolar) apresentam um alto grau de solvatação em solventes apolares, fator fundamental para permitir a entrada de reagentes através dos poros existentes nas partículas e tornar acessíveis os seus sítios ativos. Na SPFS, o grupo carboxila do último aminoácido da cadeia (primeiro da síntese) é ligado ao suporte polimérico insolúvel através de uma ligação éster para gerar peptídeos carboxila-livre, ou uma ligação amida para produzir peptídeos carboxi-amida, seguindo-se os acoplamentos sucessivos dos demais aminoácidos das sequências.

A formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos é um processo complexo, devido à natureza polifuncional dos aminoácidos. Durante a síntese, todos os grupos funcionais podem sofrer reações, necessitando realizar a proteção específica daqueles que não devem reagir. Dentre os vinte aminoácidos naturais, sete apresentam cadeias laterais que não necessitam de qualquer proteção (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro) e treze que necessitam de protetores (Arg, Tyr, Ser, Thr, His, Gln, Asn, Met, Trp, Asp, Glu, Lys e Cys) durante a síntese. Alguns aminoácidos como Asn, Gln, Met e Trp podem ser utilizados sem proteção ou protegidos.

A estratégia da química Fmoc (9-Fluorenilmetiloxycarboxila) é a mais utilizada atualmente. Esta estratégia tem como protetor temporário da região N-terminal do aminoácido o grupo base lábil Fmoc. A cadeia lateral do aminoácido, se reativa, também necessita ser protegida, no entanto, por grupos estáveis à base empregada, e lábeis ao TFA (ácido utilizado na etapa de clivagem do peptídeo da resina). Entre os protetores mais utilizados, podemos citar os grupos terc-butiloxycarbonila, tritila e terc-butila. Durante o acoplamento, os grupos carboxila livre dos aminoácidos que serão acoplados são ativados com agentes acilantes, tais como: diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-hidroxibenzotriazol (HOBT), para acelerar a reação. O princípio fundamental da maioria dos métodos de acoplamento é a ativação do grupo carboxila que participa da formação da ligação amida ou peptídica. Na ativação, o átomo de carbono tem sua eletrofilicidade aumentada por substituintes eletroceptores ligados diretamente a ele, facilitando o ataque do grupo amino (do aminoácido ligado à resina) que é nucleofílico.

## 2 OBJETIVO

Nosso projeto visou ampliar os estudos realizados por Stauffer e Melo (citados no item 1.2), estudando mais detalhadamente as regiões que flanqueiam o peptídeo de fusão do sorotipo 2 da dengue, buscando obter informações que permitam montar um modelo mais preciso da ação do peptídeo de fusão. Entender exatamente como o vírus infecta a célula é um dos passos fundamentais para o tratamento da doença.

Somado a isto, como as sequências que flanqueiam o peptídeo de fusão para os diferentes sorotipos é diferente, a contribuição destas regiões em cada um dos 4 sorotipos foi avaliada.

1-Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos das posições 88-123 e 98-112 da proteína E dos quatro sorotipos da dengue, bem como o peptídeo de fusão contendo somente a região à esquerda ou à direita da sequência 98 a 112 - peptídeo de fusão (tabela 2). Este estudo visa avaliar as diferenças entre os sorotipos, bem como a importância de cada uma das regiões laterais, na interação com miméticos de membranas de diferentes composições. Para os estudos foram utilizados dois diferentes pHs, o pH do endossoma (pH 5,5) e o do sangue (pH 7,1);

2- Estudos da capacidade de fusão dos peptídeos pela técnica de FRET;

3- Estudos das mudanças conformacionais dos peptídeos sintetizados em solução e em miméticos de membranas (micelas e vesículas), por meio das técnicas de CD e fluorescência;

4- Estudos em monocamadas utilizando BAM dos peptídeos provenientes do vírus sorotipo 2;

5- Estudos das mudanças conformacionais dos peptídeos provenientes do vírus sorotipo 2 nos pHs 5,5 e 7,1, visto que, a alteração de pH é um dos indicadores para a fusão desta região da proteína com o hospedeiro.

Tabela 2 - Peptídeos sintetizados

Nome	Sequência
	88                      98    112    123
<b>Peptídeo de Fusão</b>	
Peptídeo de fusão-Cys	<b>DRGWGNGCGLFGKGG</b>
Peptídeo de Fusão-Ser	<b>DRGWGNGSGLFGKGG</b>
<b>Sorotipo 1</b>	
Den-1 (98-123)	<b>DRGWGNGSGLFGKGSLLTSAKFKSVT</b>
Den-1 (88-123)	ANFVSRRTFV <b>DRGWGNGSGLFGKGSLLTSAKFKSVT</b>
Den-1 (88-111)	ANFVSRRTFV <b>DRGWGNGSGLFGKG</b>
<b>Sorotipo 2</b>	
Den-2 (98-123)	<b>DRGWGNGSGLFGKGGIVTSAMFRSCK</b>
Den-2 (88-123)	KRFVSKHSMV <b>DRGWGNGSGLFGKGGIVTSAMFRSCK</b>
Den-2 (88-111)	KRFVSKHSMV <b>DRGWGNGSGLFGKG</b>
<b>Sorotipo 3</b>	
Den-3 (98-123)	<b>DRGWGNGSGLFGKGSLLTSAKFQSLE</b>
Den-3 (88-123)	QNYVSKHTYV <b>DRGWGNGSGLFGKGSLLTSAKFQSLE</b>
Den-3 (88-111)	QNYVSKHTYV <b>DRGWGNGSGLFGKG</b>
<b>Sorotipo 4</b>	
Den-4 (98-123)	<b>DRGWGNGSGLFGKGGVVTSAKFSSSG</b>
Den-4 (88-123)	QQYISRRDVV <b>DRGWGNGSGLFGKGGVVTSAKFSSSG</b>
Den-4 (88-111)	QQYISRRDVV <b>DRGWGNGSGLFGKG</b>

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Síntese de Peptídeos

Os peptídeos utilizados neste estudo foram obtidos, manualmente, pelo método de SPFS, por meio da estratégia Fmoc (FIELDS; NOBLE, 1990). O protocolo de síntese química consistiu de passos cíclicos de desproteção e do acoplamento, intercalados por lavagens, para a eliminação dos reagentes utilizados e subprodutos obtidos. O acoplamento foi realizado pela ativação dos grupos carboxila do Fmoc-aminoácido acoplante com DIC/HOBt, durante duas horas de agitação utilizando como solvente uma mistura com aproximadamente 20% de DMF (dimetilformamida) em DCM (diclorometano). Nesta etapa, foi usado um excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes acoplantes de 2 vezes em relação ao número de sítios reativos existentes na resina. A desproteção do grupo amino após acoplamento, ou seja, a retirada do grupo Fmoc base-lábil foi realizada por meio da reação com uma solução 20% piperidina/DMF durante 1 e 20 minutos. Entre cada passo foram efetuadas lavagens subsequentes com os solventes orgânicos DMF e DCM (figura 7). A resina utilizada foi a Rink amida própria da química Fmoc/tBu.

Os aminoácidos utilizados durante a síntese foram: Fmoc-Gly, -Leu, -Ile -Val, -Ala, -Met, -Phe; Fmoc-Ser, -Glu, -Thr e -Asp(t-But); Fmoc-Gln, -Cys, -His e -Asn(Trt); Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Arg(Pbf), sendo os grupos tBut (terc-butila), Trt (tritila), Boc (terc-butiloxicarbolina) e Pbf (pentametiladiidrobenzofurano) os protetores das cadeias laterais reativas dos aminoácidos. Todos os aminoácidos, bem como os ativadores DIC e HOBt, foram adquiridos das empresas *NovaBiochem Corp*, *Synpep* e/ou *Advanced Chem Tech*. Os solventes (todos PA) utilizados foram DMF, DCM, adquiridos do laboratório *LabSynth*; e NMP (N-metilpirrolidona) oriundo da empresa *Acros Organics* (USA). O sucesso de cada etapa de acoplamento/desproteção foi monitorado empregando-se o teste de ninidrina (KAISER *et al.*, 1970), sendo que no caso de resultado positivo (cor azul), a reação de acoplamento era repetida utilizando como solvente uma mistura contendo 20% NMP em DCM. No caso de resultado

negativo (cor amarela), a Fmoc-peptidil-resina era desprotegida e o Fmoc-aminoácido seguinte era acoplado. A descrição de um ciclo de síntese está colocada na figura 6.

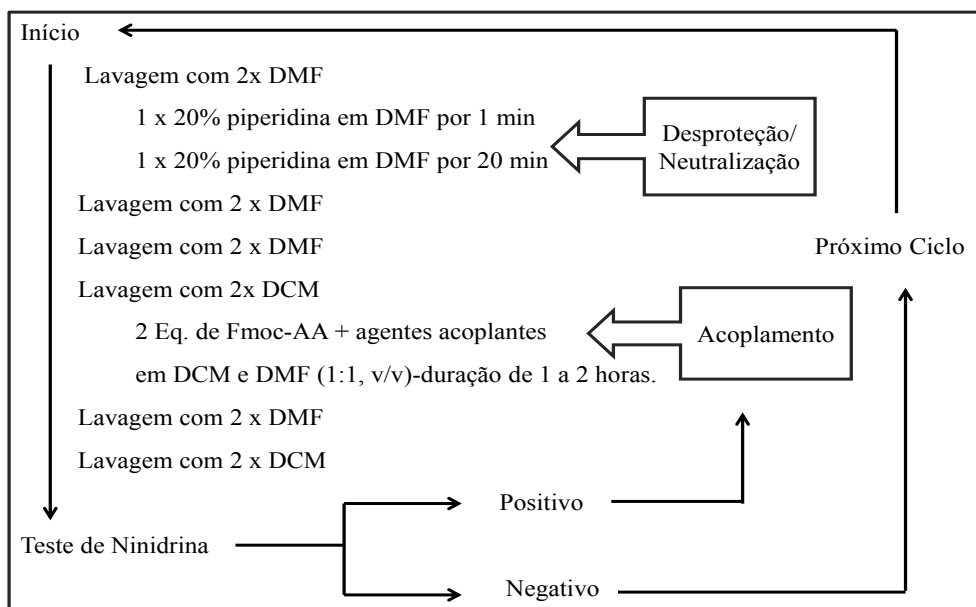


Figura 6 - Protocolo de Síntese utilizado na síntese dos peptídeos.

### 3.2 Purificação dos Peptídeos

A purificação do produto bruto da síntese foi realizada em modo semipreparativo utilizando um CLAE em fase reversa, equipado com coluna C<sub>18</sub> Ultrasphere BECKMAN de tamanho 30,0 x 1,9 cm e um coletor automático da marca *Pharmacia*. Durante a purificação, foram recolhidos tubos de 5 em 5 mL, e a pureza das frações foi determinada por análise analítica em CLAE Shimadzu Corporation, modelo LC- 10A/C-47A (Kyoto, Japão) com uma coluna analítica 25 x 4,6 cm de fase reversa C<sub>18</sub> da marca Kromasil. Os amostras puros foram juntados e liofilizados obtendo-se as frações puras que foram analisadas na mesma coluna acima descrita.

As condições cromatográficas foram:

#### Modo semipreparativo

Solventes: A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O

B: 0,036% TFA/acetonitrila



Gradiente: x-y % solvente B em 90 minutos, onde x e y varia de peptídeo para peptídeo. x = porcentagem de solvente que o peptídeo elui no CLAE analítico – 15 %; y = x + 30%.

Fluxo: 1 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

### **Modo analítico**

Solventes: A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O

B: 0,036% TFA/acetonitrila

Gradiente: 5-95% de solvente B em 30 minutos

Fluxo: 1 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

Após as etapas de purificação, os peptídeos foram caracterizados por espectrometria de massas, confirmando o sucesso das sínteses.

## **3.3 Espectrometria de massas**

As análises dos pesos moleculares dos peptídeos foram realizadas por injeção direta em um aparelho Thermo Scientific LCQ Fleet, no modo ESI (“*electrospray ionization*”), positivo 25 volts, bomba infusão com velocidade 10 µL/min, localizado no instituto de Química.

A técnica baseia-se em um analisador do tipo quadrupolo que ioniza a amostra utilizando um “*electrospray*”. Na interpretação do espectro, utiliza-se a fórmula:

$$MM_{pept.} = \frac{(MM_Z - zMM_{H^+})}{z}$$

Onde  $MM_{pept.}$  é a massa molecular do peptídeo,  $MM_Z$  é a massa molecular quando o peptídeo está ionizado com carga z (z = 1, 2, 3...), z é a quantidade de cargas em que está o peptídeo e  $MM_{H^+}$  é a massa molecular do hidrogênio protonado. Desta forma, foi possível determinar o valor de MM e confirmar a obtenção do peptídeo desejado.

### 3.4 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas fundamentais para o estudo da estrutura e dinâmica de macromoléculas biológicas, especificamente, proteínas e peptídeos. Esta técnica de fluorescência tem a vantagem de utilizar uma pequena quantidade do material, possuindo grande sensibilidade.

Moléculas que absorvem luz perdem parte desta energia por processos não radioativos (liberando calor), e em alguns casos a energia é liberada na forma de luz, tal fenômeno é conhecido como fluorescência ou fosforescência. Resumidamente, a absorção de energia por certos grupos denominados cromóforos, os faz passar para um estado excitado (singleto excitado  $S_1$ ,  $S_n$ ), ocorrendo em seguida uma emissão de parte desta energia em comprimentos de ondas específicos, voltando para seu estado fundamental (singleto fundamental  $S_0$ ). Quando esta emissão é na forma de luz, é chamada de fluorescência (figura 7).

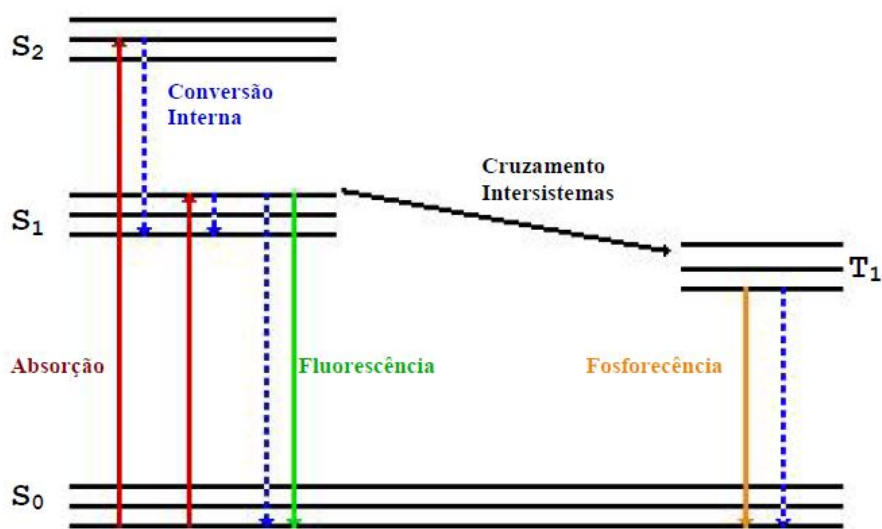


Figura 7 - Diagrama resumido de Jablonski. A absorção de determinada quantidade de energia faz com que um elétron passe do menor estado vibracional do estado fundamental ( $S_0$ ) para um estado vibracional superior do estado excitado  $S_1$  ou  $S_2$  (setas vermelhas). Após passar por processos não radioativos (setas azuis), que conduzem o elétron ao menor nível vibracional do primeiro estado excitado, pode ocorrer a emissão de fluorescência (seta verde). Que é a emissão de um fóton devido ao decaimento do estado  $S_1$  para o estado fundamental  $S_0$ . A relaxação do elétron pode ocorrer pela emissão de um fóton devido ao decaimento de um estado tripleto ( $T_1$ ) para o estado eletrônico fundamental ( $S_0$ ), processo chamado de fosforescência (seta laranja).

Nas análises de fluorescência de macromoléculas, são usados dois tipos de fluoróforos: os fluoróforos intrínsecos (presente nas macromoléculas) e os fluoróforos extrínsecos (fluoróforos adicionados ao sistema). Cada fluoróforo possui comprimento de onda de absorção e de emissão característicos.

Os dados obtidos servem como ferramentas para estudar o ambiente em torno do fluoróforo. Isto é possível, devido à sensibilidade deste componente ao ambiente que os circunda. Portanto, propriedades como comprimento de onda de emissão máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), rendimento quântico ( $\phi_F$ ), tempo de vida do fluoróforo ( $\tau_F$ ), e propriedades de polarização podem ser utilizadas para avaliar as propriedades estruturais dos peptídeos (LAKOWICZ, 1983).

A aquisição dos dados de fluorescência foi realizada em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN. O comprimento de onda de excitação do triptofano, existente nos peptídeos, foi o de 280 nm. O espectro de emissão de fluorescência foi adquirido na faixa de 300 a 500 nm, obtendo-se em cada espectro a intensidade máxima de fluorescência e o comprimento de onda de emissão máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) para cada peptídeo e condição estudada.

Os espectros de fluorescência foram obtidos por meio do uso de uma solução aquosa de 10  $\mu\text{mol/L}$  de peptídeos de volume 600  $\mu\text{L}$ . A concentração das soluções utilizadas nos experimentos de fluorescência foi determinada, inicialmente, pela absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro UV 1601 PC Shimadzu. O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) utilizado foi de  $(5.540 \text{ mol/L})^{-1}$  (MACH *et al.*, 1992). Os estudos foram todos realizados em uma sala com temperatura a 25°C.

Para os estudos deste trabalho utilizamos o tampão acetato pH 5,5 e o tampão fosfato pH 7,1. Os dois tampões foram usados para mimetizar o pH do endossoma e o do sangue, respectivamente.

### 3.4.1 Estudos de Interação Peptídeos/Vesículas

Há 40 anos, o Dr. Alec Bangham (BANGHAM, 1961) observou que fosfolípidos em soluções aquosas organizam-se em bicamadas de maneira a formar estruturas vesiculares, com um compartimento aquoso em seu interior. Tais estruturas foram chamadas de vesículas e, hoje em dia, apresentam numerosas aplicações terapêuticas.

As vesículas são os modelos de membrana mais utilizados para estudar a associação peptídeo/membrana, pois sua forma de bicamada lipídica é muito parecida com a parte lipídica das membranas celulares. Ressaltamos, no entanto, que este sistema macromolecular é mais simples, não possuindo proteínas e carboidratos em sua composição (figura 8).

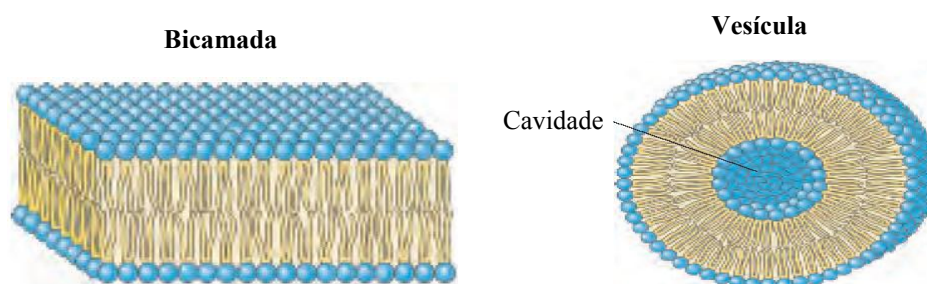


Figura 8 - Bicamada plana de uma membrana celular à esquerda e uma vesícula à direita. (NELSON; COX, 2006).

As vesículas podem ser classificadas de várias formas, conforme a composição química, tamanho e o número de camadas. Algumas das formas de classificação mais usadas são: 1) vesículas multilamelares grandes (MLV): formadas por vários compartimentos aquosos e lipofílicos intercalados, seu diâmetro pode variar de 100 a 5000 nm e o número de camadas pode estar entre 7 e 10; 2) vesículas unilamelares grandes (LUVs): possui um único compartimento interno aquoso e um lipofílico (bicamada lipídica), apresentando diâmetro superior a 50 nm, estas vesículas se caracterizam por terem uma tensão superficial semelhante ao das membranas celulares; 3) vesículas unilamelares pequenas (SUVs), que possuem diâmetro entre 15 e ~50 nm (figura 9) (SANTOS, 2002).

Os fosfolipídios são caracterizados por sua temperatura de transição de fase ( $T_c$ ), na qual a membrana passa de uma fase gel, onde a cadeia hidrocarboneto do lipídio está em estado ordenado, para uma fase de cristal-líquido, onde as moléculas ficam com movimentos mais livres e os substituintes hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados. O comprimento e a saturação da cadeia lipídica influenciam o valor de  $T_c$ . Portanto, diferentes membranas compostas por lipídeos distintos podem exibir diferentes níveis de fluidez na mesma temperatura. (FRÉZARD *et al.*, 2005). A

carga da superfície da vesícula também pode ser manipulada pela introdução de lipídeos neutros, carregados negativamente ou positivamente.

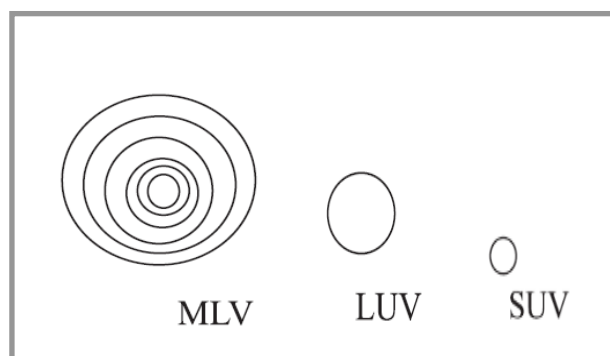


Figura 9 - Representação esquemática dos vários tipos de vesículas, mostrando o diâmetro e o número de camadas: MLV- vesículas multilamelares, SUV- vesículas unilamelares pequenas, LUV- vesículas unilamelares grandes (SANTOS, 2002).

### 3.5 Transferência de Energia por Ressonância de Foster (FRET)

A técnica utilizada para os estudos de fusão foi a Transferência de Energia por Ressonância de Föster (FRET) (FÖSTER, 1959). Esta técnica utiliza o fluoróforo doador 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazó-4-il) (NBD-PE) (figura 10), que transfere sua energia de excitação para um cromóforo, o receptor Rh-PE (figura 11). Quando estes dois fluoróforos estão muito próximos, ou seja, juntos na mesma vesícula marcada, a fluorescência do doador é “suprimida” (*quenched*) pelo receptor. Quando as vesículas marcadas e não marcadas (sem estes fluoróforos) sofrem fusão (figura 12), resulta no aumento no tamanho das vesículas e na distância dos fluoróforos. Desta forma, o doador NBD-PE passa a apresentar uma maior intensidade de fluorescência (OLSON *et al.*, 1979), diminuindo a intensidade de fluorescência do receptor Lissamine Rhodamine B (1,2-Dihexadecanoil-sn-Glicero-3-fosfoetanolamina (Rh-PE) que antes apresentava uma intensidade de fluorescência (figura 13).

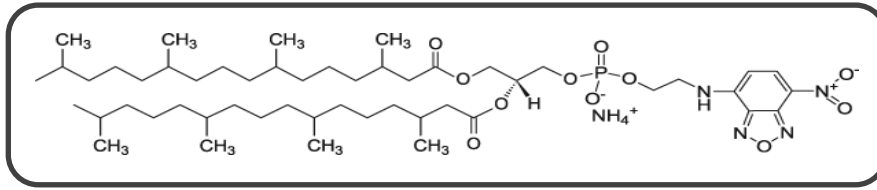


Figura 10 - Estrutura química do NBD-PE. Extraído de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com).

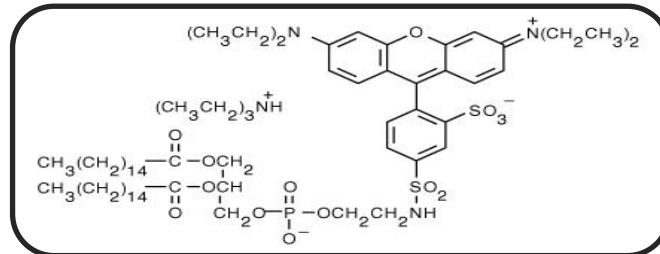


Figura 11 - Estrutura química do Rh-DHPE. Extraído de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com).

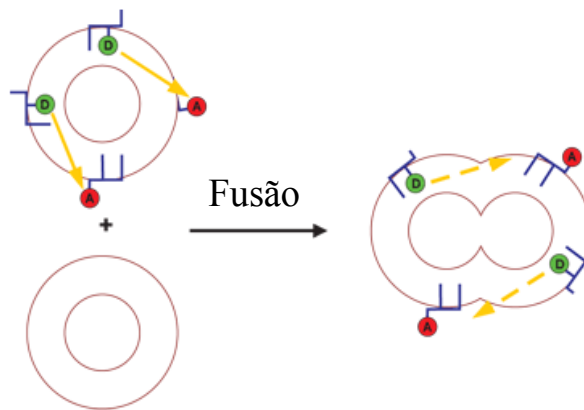


Figura 12 - Representação do “processo de fusão” ou de “mistura lipídica” durante os experimentos de transferência de energia por ressonância de Föster (FRET). (A) receptor - Rh-PE e (D) doador - NBD-PE.

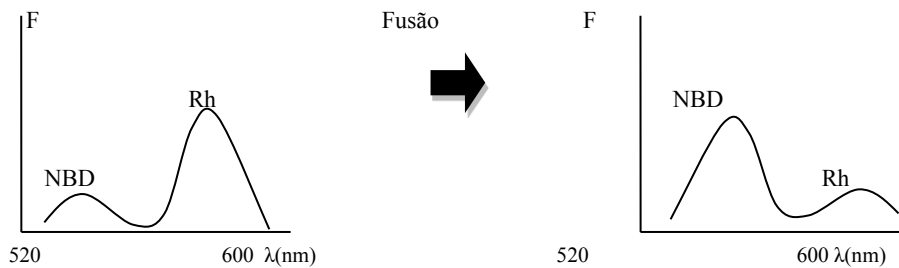


Figura 13 - Espectros de emissão para o receptor - Rh-PE e doador - NBD-PE antes e depois do processo de fusão.

Os experimentos foram feitos no aparelho LS-50B espectrofluorímetro (Perkin Elmer, Waltham, MA) usando  $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$  (“*slit width*” - largura da fenda = 10 nm/10 nm). As vesículas marcadas e não marcadas (1:9) foram adicionadas aos tampões até uma concentração total de lipídeos de 150  $\mu\text{mol/L}$ . A concentração de cada peptídeo foi de 50  $\mu\text{mol/L}$ . Os experimentos foram feitos em triplicata e equilibrados a 25° C. Os lipídeos foram adquiridos da “*Avanti Polar Lipids*” e da *Sigma-Aldrich*.

A atividade fusogênica foi obtida usando a expressão:

$$\% \text{ Fusão} = [(F_t - F_0) / (F_{100} - F_0)] \times 100;$$

onde  $F_t$  é a medida de fluorescência no tempo  $t$ ;  $F_0$  é a fluorescência inicial da mistura lipídica com a adição do peptídeo. Para obter a medida de 100% da mistura lipídica, ou seja, a fusão completa das vesículas  $F_{100}$ , adicionou-se uma solução de triton. A porcentagem de fusão, ou mistura de lipídeos das vesículas, foi realizada a partir da média de três medidas.

### 3.5.1 Preparação das Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs) para Análise de Fusão

Vesículas não marcadas (80%PC de ovo/20% POPG) e vesículas marcadas (81% PC de ovo/15% POPG/2% Rh-DHPE/2% NBD-PE) foram preparadas pelo método de extrusão (TORRES; BONG, 2011). Os lipídeos foram ressuspensos em clorofórmio e evaporados em  $\text{N}_2$  até formar um filme fino aderido na parede do tubo. Este filme foi mantido sob vácuo “*overnight*” para eliminação dos solventes e, posteriormente, o filme foi hidratado com 1 mL de tampão HBS (50 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH=7,0). Para obter-se as vesículas unilamelares grandes (LUVs), figura 14, o filme foi submetido à agitação de 3 minutos no equipamento vortex e ultrasonicado para que as camadas fossem quebradas e o tamanho das vesículas diminuídas (agitação/ repouso). Em outra etapa, a solução acima foi submetida a um sistema de alta

pressão utilizando um extrusor, contendo filtro de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro (*Avanti Polar Lipids*). Para a homogeneização do tamanho das vesículas, foram realizados 35 ciclos de extrusão nas membranas de policarbonato.

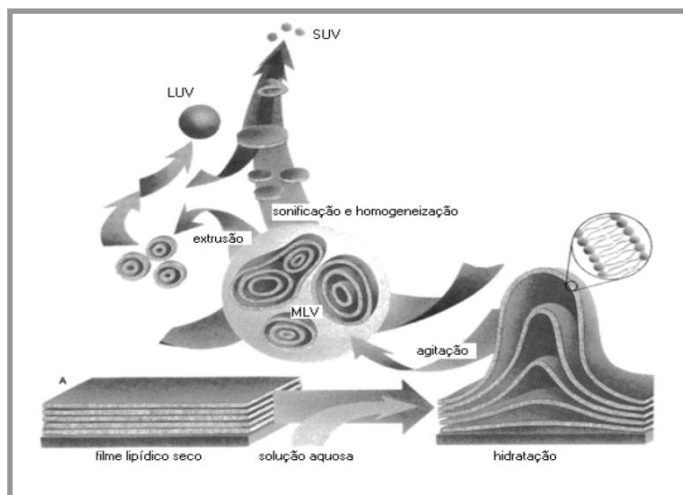


Figura 14 - Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares grandes (MLVs), vesículas unilamelares pequenas (SUVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs). Extraído de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)

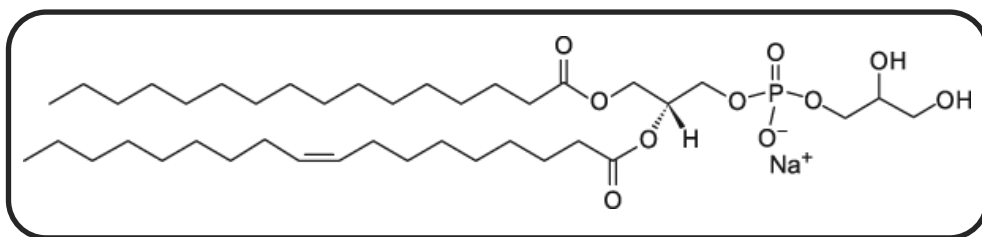


Figura 15 - Estrutura química do POPG. Extraído de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com).

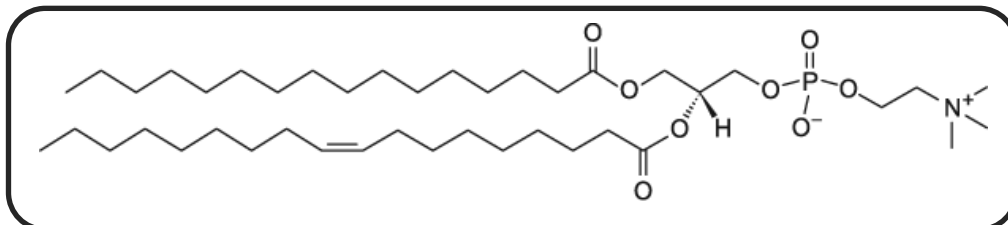


Figura 16- Estrutura química do PC ovo. Extraído de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com).



### 3.6 Estudos de interação peptídeos/micelas

As análises utilizando-se micelas como miméticos de membranas foram feitas por meio da titulação do peptídeo com o detergente zwitteriônico 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (LPC- figura 17), adquirido da *Avanti Polar Lipids*. Os parâmetros usados para analisar o comportamento estrutural dos peptídeos foram o comprimento de onda máxima de emissão ( $\lambda_{\text{max}}$ ) e a razão  $F/F_0$  (fluorescência da amostra/fluorescência na condição inicial). Nestes estudos, soluções estoques dos detergentes foram preparadas em alta concentração (LPC 100 mmol/L) e armazenadas sob refrigeração. As concentrações utilizadas durante a titulação variaram de 0 a 10 mmol/L.

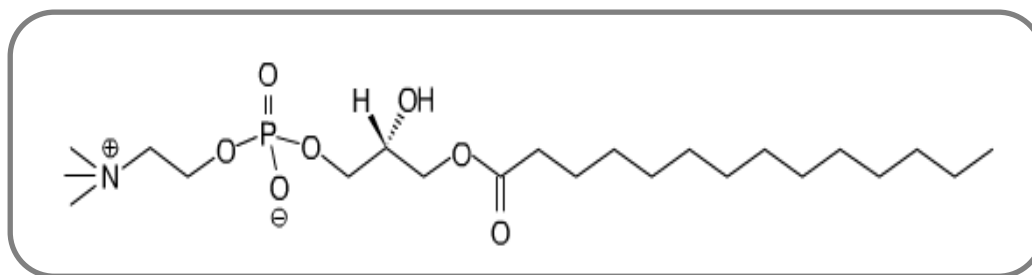


Figura 17 - 1-palmitoil-2- hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (LPC). Extraído de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)

#### 3.6.1 Supressão por Acrilamida

As análises foram realizadas em solução aquosa e na presença de micelas do detergente LPC. A concentração de peptídeo utilizada foi de 10  $\mu\text{mol/L}$  e o volume da solução de 600  $\mu\text{L}$ . A concentração de detergente foi de 10 mmol/L. O aumento da concentração do supressor deu-se pela adição de uma solução de acrilamida (4 mol/L), em alíquotas de 1,5  $\mu\text{L}$  em 1,5  $\mu\text{L}$ , até que a concentração final atingisse 50  $\mu\text{mol/L}$ .

## 3.7 Análise estrutural dos peptídeos

### 3.7.1 Dicroísmo Circular

O Dicroísmo Circular é uma técnica que possibilita visualizar a estrutura secundária de moléculas opticamente ativas, como proteínas e peptídeos. Estas podem apresentar-se em diferentes estruturas secundárias, que são indicadas por bandas elípticas específicas com comprimentos de onda característicos em um intervalo de 260 a 190 nm. Estas moléculas opticamente ativas interagem com a luz polarizada e provocam alteração na luz incidente. Este fenômeno é representado pela medida da diferença de absorção entre a luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, após esta passar através de uma amostra, figura 18. A absorvância da luz circularmente polarizada é medida como elipticidade molar  $[\theta]M$  em  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ .

Em proteínas e em peptídeos, os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD são a ligação amida e as cadeias laterais aromáticas do triptofano, tirosina, fenilalanina e as pontes dissulfeto (MULKERRIN, 1996).

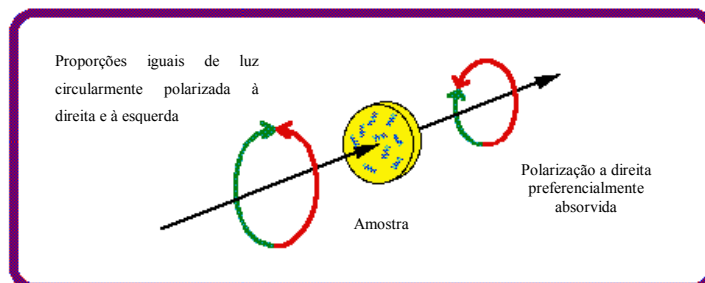


Figura 18 - Ilustração esquemática do fenômeno de Dicroísmo Circular (REYES, 2005).

Devido ao caráter de dupla ligação resultante da coplanaridade dos átomos CONH, a rotação ao redor da ligação O=C-NH da amida é restrita. A rotação é possível, apenas, na ligação entre o átomo de Nitrogênio e do Carbono alfa (HN-C $_{\alpha}$ ), representado pelo ângulo de rotação  $\Phi$  (phi), e na ligação entre o átomo de Carbono alfa e a carbonila (C $_{\alpha}$ -C=O), representado pelo ângulo de rotação  $\Psi$  (psi). Os ângulos específicos phi e psi são os responsáveis pelo espectro de CD característico das estruturas secundárias,  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$  paralela e anti-paralela, vários tipos de dobras  $\beta$  e estrutura randômica. O cromóforo amida apresenta as transições:  $n \rightarrow \pi^*$ , centrada

próximo a 220 nm, com energia de transição menor, e  $\pi \rightarrow \pi^*$  centrada em 190 nm. Quando se dá o enovelamento da proteína, o arranjo tridimensional dos cromóforos afeta a estrutura eletrônica e, concomitantemente, o espectro da proteína ou peptídeo. Para proteínas que apresentam suas estruturas ao acaso, as interações de longa distância são mínimas e seu espectro é composto de duas bandas,  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ . A estrutura  $\beta$  apresenta uma banda  $n \rightarrow \pi^*$  centrada em 215 nm e uma banda  $\pi \rightarrow \pi^*$  centrada em 196 nm. O espectro de uma  $\alpha$ -hélice possui estas mesmas bandas. No entanto, ele é mais complicado, pois nele a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  é desdobrada em  $\pi \rightarrow \pi^*$  (perpendicular), centrada em 191 nm, e  $\pi \rightarrow \pi^*$  (paralela) centrada em 208 nm. A transição  $n \rightarrow \pi^*$  é deslocada para um comprimento de onda de menor energia, centrada em 222 nm. A figura 19 apresenta espectros característicos de CD das estruturas secundárias acima mencionadas.

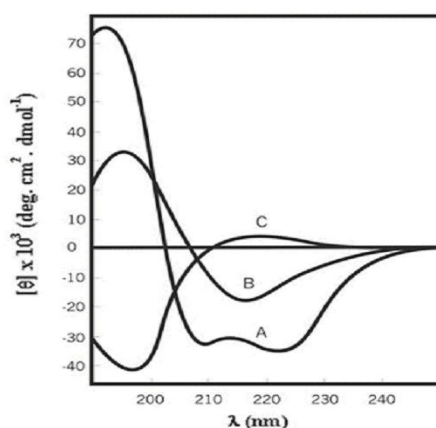


Figura 19 - Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (A)  $\alpha$ -hélice, (B) folha  $\beta$ -pregueada e (C) estrutura randômica (GREENFIELD; FASMAN, 1969).

Os espectros de CD foram adquiridos em um espectropolarímetro Jasco J-715, em celas de 1,0 mm de caminho óptico com 16 varreduras por espectro, com tempo de integração de 3 s por ponto. Para todos os experimentos a leitura, foi feita a cada 0,5 nm. Os estudos de CD foram realizados no Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo-USP, no grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”. Neste estudo, foram preparadas soluções estoques dos diferentes peptídeos em água, para posterior diluição a 80  $\mu\text{mol/L}$  em solução aquosa, com 0; 0,2; 1,8; 3,0 e 5,0 mmol/L de LPC.

### 3.8 Monocamada de Langmuir

Monocamadas de Langmuir são filmes finos, com espessura monomolecular, que se formam sobre uma superfície de uma subfase aquosa. A formação da monocamada dá-se pelo espalhamento de quantidades pequenas de moléculas com características anfifílicas na interface ar-água. A parte hidrofílica da molécula (polar) orienta-se em direção a subfase aquosa e a parte hidrofóbica (apolar) para o ar. A vantagem desta técnica, diferentemente das vesículas, é que elas não apresentam curvatura e ainda se orientam em um empacotamento preciso (BROCKMAN, 1999).

Os filmes de Langmuir foram fabricados em cuba de Langmuir KSV *Instruments* (Finlândia), modelo KSV *Minitrough*, com área superficial de 75 x 323 mm<sup>2</sup> e volume de 45 mL, alocada em uma sala limpa classe 10.000, com temperatura controlada em 23±1 °C. A cuba é equipada com uma prova *Wilhelmy* para medição da pressão de superfície.

Para a obtenção dos filmes de Langmuir, um determinado volume (~ 50 µL) de uma solução do lipídeo DPPC, preparado em clorofórmio, foi espalhado na superfície de uma solução aquosa de pH 7,1 (tampão fosfato) ou 5,5 (tampão acetato). Os dados obtidos foram utilizados como padrão para comparação quando da adição dos peptídeos. Em geral, a concentração da solução estoque lipídica foi de 1 mmol/L. Após a evaporação do solvente, aproximadamente 20 minutos, as barreiras móveis são acionadas, ou seja, se comprimem, (velocidade de 10 mm<sup>2</sup> min<sup>-1</sup>) e obtêm-se as isotermas de pressão superficial ( $\pi$ -A).

Para os estudos de interação dos peptídeos com a monocamada lipídica, antes da compressão do filme superficial, foram realizados experimentos de cinética de adsorção.

Após o filme lipídico estar espalhado e o solvente evaporado, uma pequena alíquota da solução do peptídeo foi injetada na subfase contendo tampão. O processo de adsorção do peptídeo na interface foi monitorado por meio de variações na pressão superficial, em função do tempo. A compressão da monocamada ocorreu apenas após o equilíbrio de adsorção ter sido atingido, de modo a garantir a isoterma  $\pi$ -A do sistema misto.

A formação de agregados ou domínios por esta técnica mostra diversos estágios de compressão do filme (FERREIRA *et al.*, 2005). A figura 20 é ilustrativa e

corresponde a curva de pressão superficial *versus* área por molécula para o ácido esteárico. Os diferentes estágios de empacotamento originam os estados físicos bidimensionais da matéria. Inicialmente, à pressão baixa, as moléculas estão na fase gasosa (G), e apresentam baixo empacotamento e, conseqüentemente, muitos graus de liberdade. Com o aumento da compressão das barreiras, as moléculas passam a interagir, mas ainda com grande área disponível por molécula (estado líquido-expandido) ou com maior contato entre si (estado líquido-condensado).

Com o subsequente aumento da compressão e diminuição da área superficial da cuba, as moléculas são compactadas até o estado de sólido bidimensional, onde as moléculas atingem o máximo empacotamento até que se colapsem e deixam de se organizar como uma monocamada, formando multicamadas aleatórias. A interação de biomoléculas, solubilizadas na subfase com o filme lipídico pode ser então avaliada em função da alteração destes parâmetros obtidos previamente para o lipídeo puro.

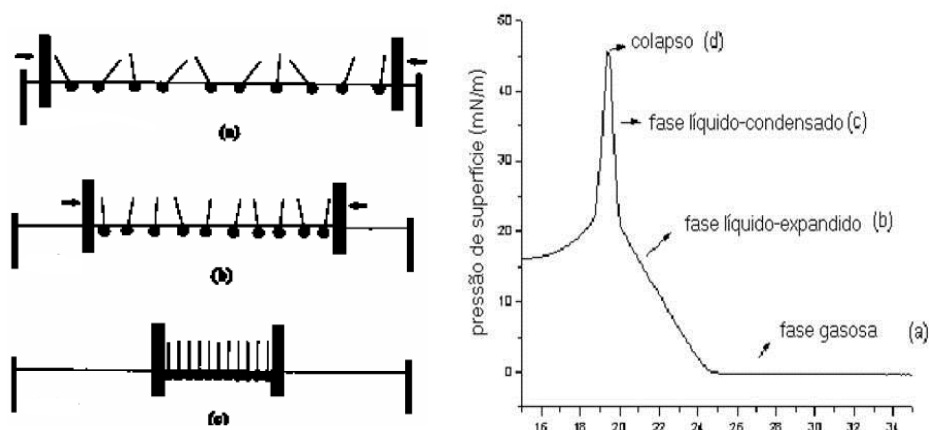


Figura 20 - Ilustração da estruturação das moléculas durante os diferentes estágios de compressão (esquerda) e isoterma da pressão superficial ( $\pi$ ) *versus* área (A) por molécula do ácido esteárico (direita) (PAVINATTO, 2009).

### 3.9 **M**icroscopia no Ângulo de Brewster (BAM)

As imagens de microscopia no ângulo de Brewster foram obtidas com um equipamento *BAM2 Plus System da Nanofilm Technologies* (NFT - Alemanha), usando o mesmo procedimento experimental descrito por Dos Santos Jr. (SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2004). O princípio básico da técnica consiste no fato que uma luz *p*-polarizada ao incidir na superfície da água no ângulo de Brewster, não há reflexão da luz. Sendo assim, nenhuma luz atingirá a câmera, alocada na direção da luz refletida. O ângulo de Brewster é determinado pelo índice de refração de ambos os meios formadores da interface, que neste caso, se tratam da interface água e ar (HÖNING; MÖBIUS,1991; HENÓN; MEUNIER,1991). Se uma monocamada de Langmuir for espalhada nesta interface, o índice de refração será ligeiramente alterado, resultando em alguma reflexão da luz, que atingirá a câmera. Uma imagem da estrutura do filme interfacial será formada pelos contrastes entre regiões sem filme (regiões escuras, onde não ocorreu reflexão) e regiões onde a superfície da água esta recoberta pelo filme monomolecular (regiões claras, onde ocorreu reflexão). No caso destes experimentos, o ângulo de Brewster foi ajustado para a subfase com tampão.

## 4 **R**ESULTADOS E **D**ISCUSSÃO

### 4.1 **S**ínteses e **C**aracterização dos peptídeos

Primeiramente, foi sintetizado o peptídeo de fusão do vírus da dengue, que vai da posição 98 a 112 da proteína E (DRGWGNGCGLFGKGG), com resíduo de cisteína na posição 105. Esta sequência é semelhante em todos os outros quatro sorotipos. A escala inicial foi de 0,2 mmol, com massa da resina de 294 mg (grau de substituição da resina= 0,68 mmol).

Com o fim da síntese, tendo o último resíduo de aminoácido acoplado, um tratamento com solução de 20% piperidina/DMF removeu o grupo protetor Fmoc que estava ligado e protegendo o grupo  $\alpha$ -amino.

Em seguida, separamos o peptídeo da resina por meio do procedimento de clivagem, resultando após a etapa de clivagem, extração e liofilização, um material branco floculoso (peptídeo bruto), com massa de 245 mg e 62% de grau de pureza por CLAE (figura 21). Dos 245 mg, 81 mg foram purificados. O perfil cromatográfico do peptídeo puro está representado na figura 21. A massa final obtida após as etapas de síntese, clivagem e purificação foi de 18 mg. Esta etapa foi repetida inúmeras vezes.

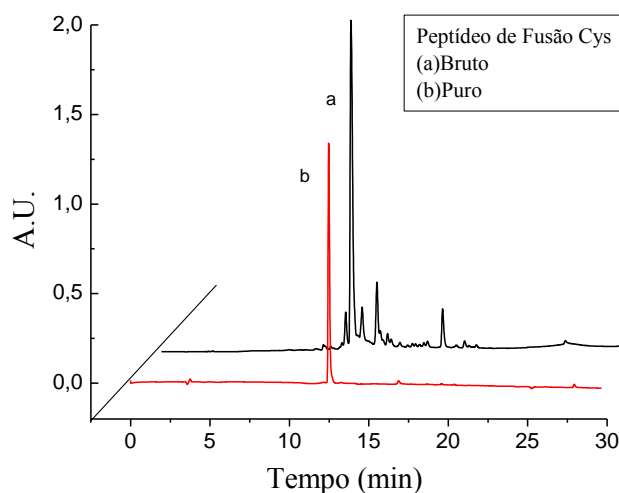


Figura 21 - Perfil cromatográfico do peptídeo de fusão com cisteína: (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

A caracterização do peptídeo foi realizada por meio da espectrometria de massas, a qual apresentou resultados condizentes com o teórico. O espectro do peptídeo de fusão com resíduo de Cys (figura 22) com massa teórica de 1480,62 g/mol apresentou pico majoritário de 741,31 (carga+2). Este valor confirma o sucesso da síntese e do material obtido.

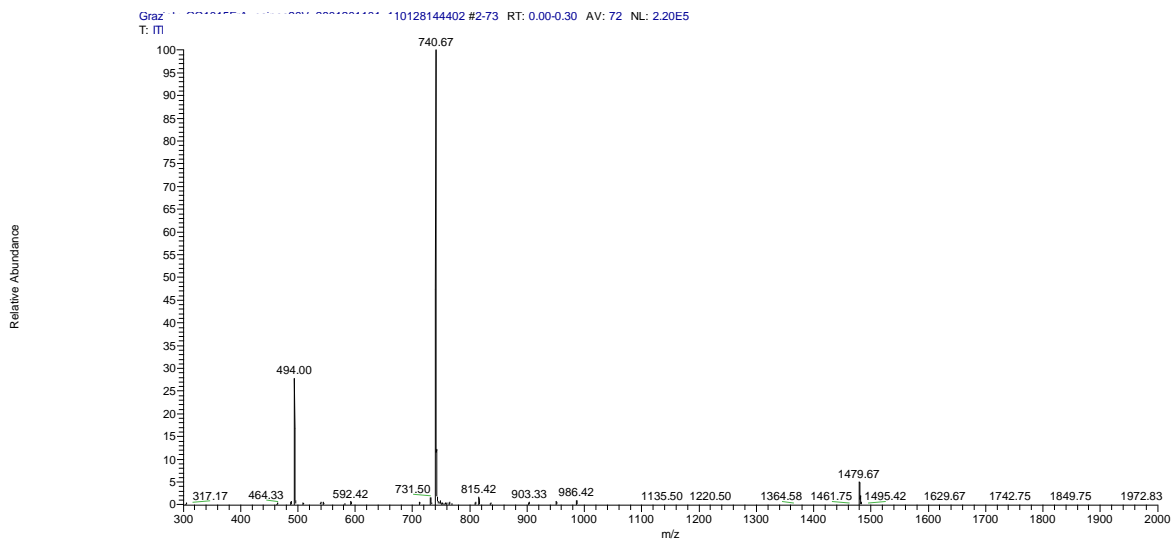


Figura 22 - Espectro de massas do Peptídeo de fusão puro com resíduo de cisteína.

Em seguida foram sintetizados os peptídeos do sorotipo 2 da dengue, contendo as regiões que flanqueiam o peptídeo de fusão, que é um dos sorotipos mais estudados (STAUFFER *et al.*, 2008) – tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos peptídeos sintetizados do sorotipo 2 da dengue.

DENGUE SOROTIPO 2
SEQUÊNCIA
<b>DRGWNGCGLFGKGG</b> IIVTCAMFRCKK
KRFVCKHSMV <b>DRGWNGCGLFGKGG</b>
KRFVCKHSMV <b>DRGWNGCGLFGKGG</b> IIVTCAMFRCKK

Durante a síntese, ocorreu dificuldades no acoplamento de diversos resíduos de aminoácidos, o que promoveu o aparecimento de diversos contaminantes no produto final. Este fato pode ser observado na figura 23, onde o material obtido da síntese do peptídeo maior (com 36 resíduos) apresentou diversos picos.



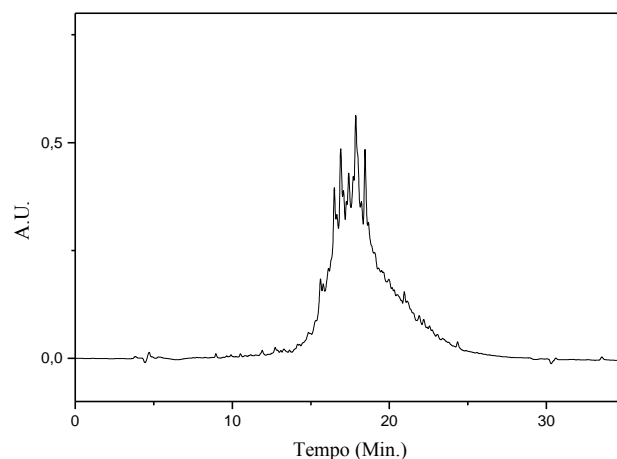


Figura 23 - Perfil cromatográfico do KRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFRCKK (peptídeo bruto). Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0.045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0.036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

Devido ao baixo rendimento na purificação do material (dados não mostrados), mesmo com uma nova síntese, vimos a necessidade de utilizar resinas com grau de substituição menor do que as utilizadas anteriormente. Resinas com menor grau de substituição poderiam promover menor agregação entre as cadeias peptídicas, diminuindo a dificuldade de síntese. Desta forma, a resina rink-BAR (benzylamine resin rink) de grau de substituição igual a 0,34 mmol, foi utilizada, portanto, duas vezes menor que a empregada anteriormente. Mesmo com esta alteração, os peptídeos sintetizados não apresentaram bons resultados.

Devido a este problema, a substituição dos resíduos de cisteína, com cadeia lateral (SH) por resíduos de serina (OH), por apresentarem uma estrutura/polaridade semelhante, foram realizadas. Tal substituição evita a formação de dímeros ou ciclos, o qual acreditamos ter sido o motivo do baixo rendimento e do baixo grau de pureza dos peptídeos.

Inicialmente, para avaliar se esta substituição não afetaria a atividade do peptídeo, principalmente na cisteína contida no peptídeo de fusão, a síntese desse peptídeo foi realizada substituindo o resíduo de cisteína por serina (tabela 4). O peptídeo de fusão, que vai da posição 98 a 112 da proteína E foi substituído na posição 105 de um resíduo de cisteína por serina (DRGWGNGSGLFGKGG). A escala inicial de

síntese foi de 0,15 mmol, com massa da resina de 417 mg (grau de substituição da resina= 0,36 mmol). Após a etapa de clivagem, extração e liofilização, foi obtido o peptídeo bruto, com massa de 136,4 mg e 90% de grau de pureza por CLAE. Dos 136,4 mg, 100 mg foram purificados. A massa final obtida após as etapas de síntese, clivagem e purificação foi de 27 mg (figura 24).

Tabela 4 - Sequência dos peptídeos sintetizados do peptídeo de fusão.

DENGUE PEPTÍDEO DE FUSÃO	
NOME	SEQUÊNCIA
Cisteína	<b>DRGWNGCGLFGKGG</b>
Serina	<b>DRGWNGSGLFGKGG</b>

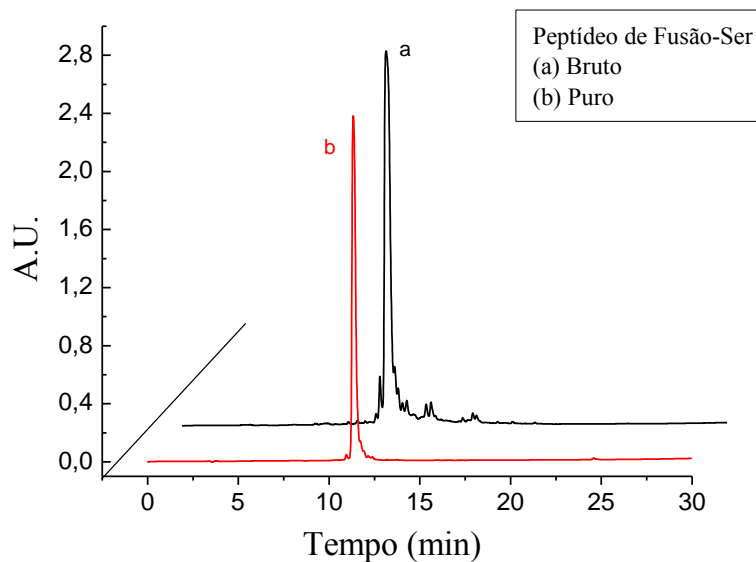


Figura 24 - Perfil cromatográfico do peptídeo de fusão com serina: (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1mL/min e detecção em 220 nm.

O espectro de massas (figura 25) confirmou a obtenção do material desejado (massa teórica de 1464,56 g/mol) apresentando picos de 733 (carga+2) e 488 (carga+3).

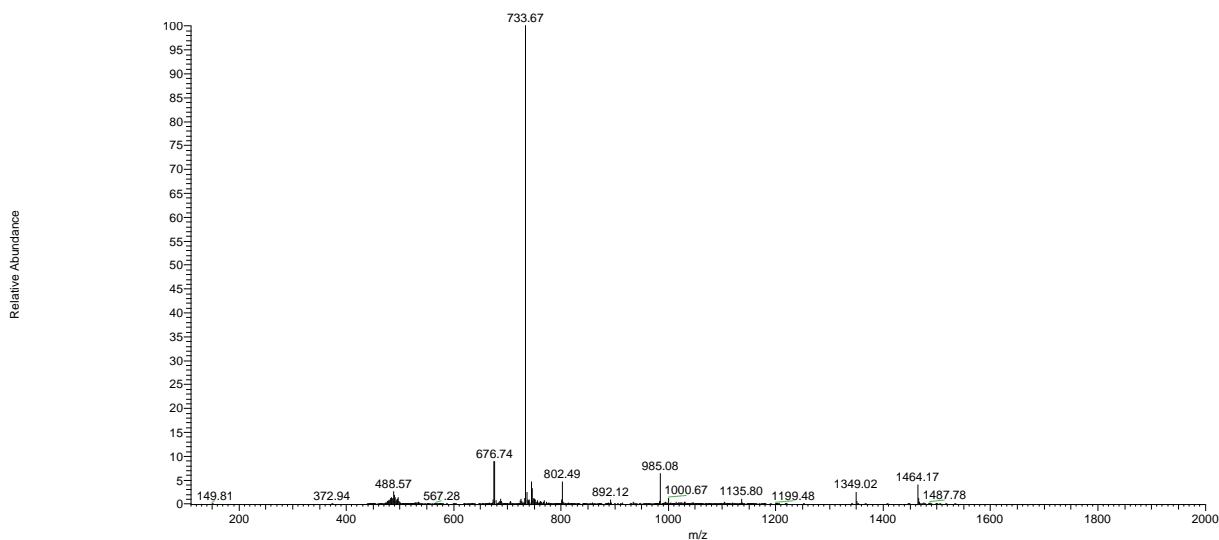


Figura 25 - Espectro de massas do Peptídeo de Fusão com resíduo de serina – material puro.

Com a alteração do resíduo de Cys por Ser, os peptídeos provenientes do sorotipo 2 do vírus da dengue foram novamente sintetizados. Dois dos três peptídeos sintetizados começaram na posição 123 até a posição 98. Neste ponto, a síntese foi interrompida e dividida em duas partes. A clivagem desta resina originou a sequência Den-2 (98-123) (posição 98 até 123) e a outra parte foi estendida até a posição 88 da sequência, dando o peptídeo Den-2 (88-123) (posição 88 até 123). A terceira sequência sintetizada apresentou a sequência da posição 111 até a 88, dando origem ao peptídeo Den-2 (88-111).

O peptídeo Den-2 (98-123), tabela 5, foi obtido por meio da clivagem de 400 mg de resina, resultando ao final das etapas de clivagem e extração de 208 mg do peptídeo bruto liofilizado com 60 % do grau de pureza. Foram purificados 106 mg deste material, resultando uma massa de 13,8 mg (figura 26). O rendimento comparativamente com as sínteses anteriores foi ótimo, obtendo-se material com massa e grau de pureza superior.

Ressaltamos que, o uso de Ser no lugar das Cys (92, 116, 121) já tinham sido utilizadas por Stauffer (STAUFFER *et al.*, 2008), validando estas substituições.

Tabela 5 - Sequência dos peptídeos sintetizados do sorotipo 2 da dengue

DENGUE SOROTIPO 2	
NOME	SEQUÊNCIA
Den-2 (98-123)	<b>DRGWNGSGLFGKGSLLTSAKFKSVT</b>
Den-2 (88-123)	ANFVSRRTFV <b>DRGWNGSGLFGKGSLLTSAKFKSVT</b>
Den-2 (88-111)	ANFVSRRTFV <b>DRGWNGSGLFGKGS</b>

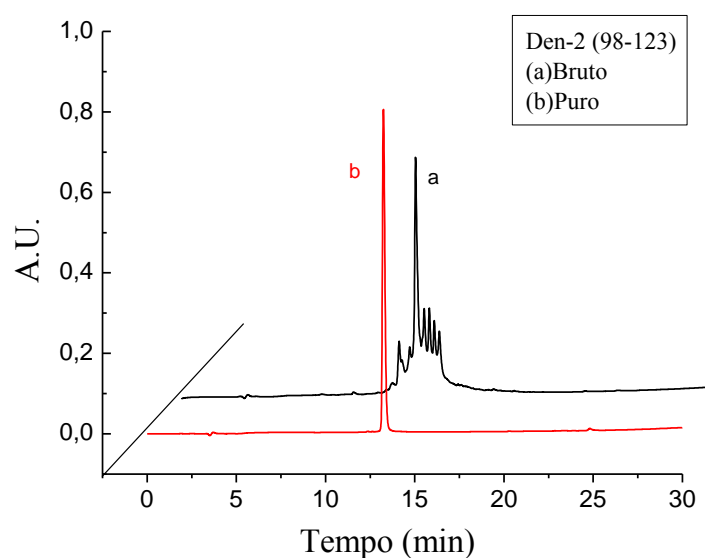


Figura 26 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-2 (98-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1mL/min e detecção em 220 nm.

O espectro de massas do peptídeo Den-2 (98-123) com massa 2714,10 g/mol apresentou picos de (carga+2) 1357, (carga +3) 905, (carga +4) 679 g/mol e (carga +5) 543 g/mol (figura 27). Estes dados confirmaram o sucesso da síntese.

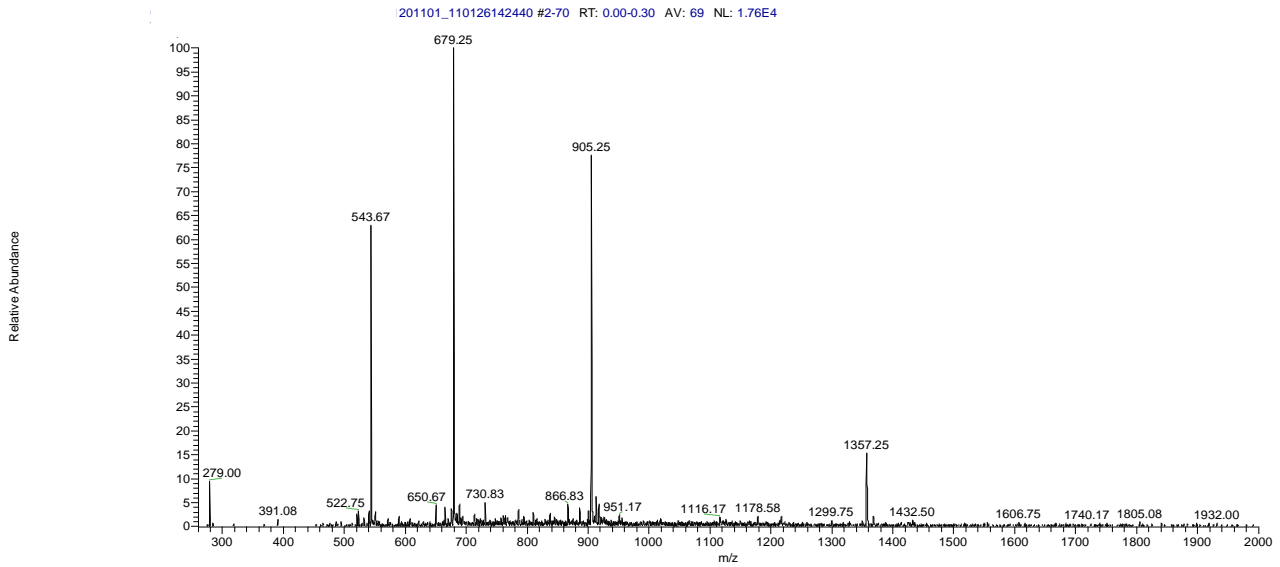


Figura 27 - Espectro de massas do peptídeo Den-2 (98-123) puro.

A massa do peptídeo Den-2 (88-123) clivada foi de 400 mg, resultando após a clivagem e extração do peptídeo bruto uma massa de 187,4 mg e 30 % de grau de pureza. Foram purificados deste material 106,5 mg, resultando na massa de 5,8 mg. Os perfis cromatográficos do peptídeo bruto e puro estão apresentados na figura 28.

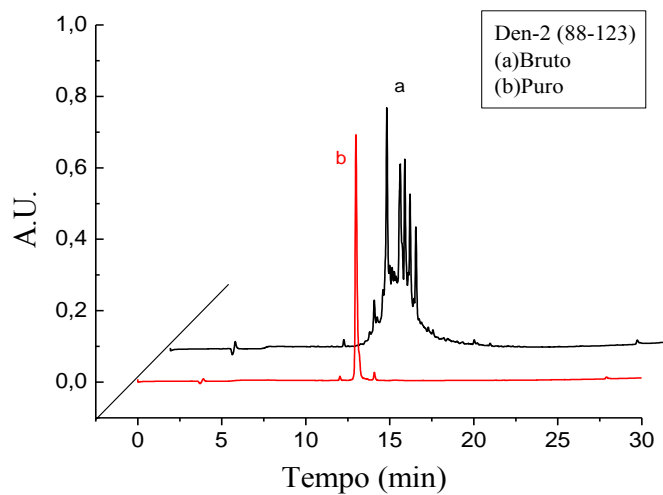


Figura 28 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-2 (88-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

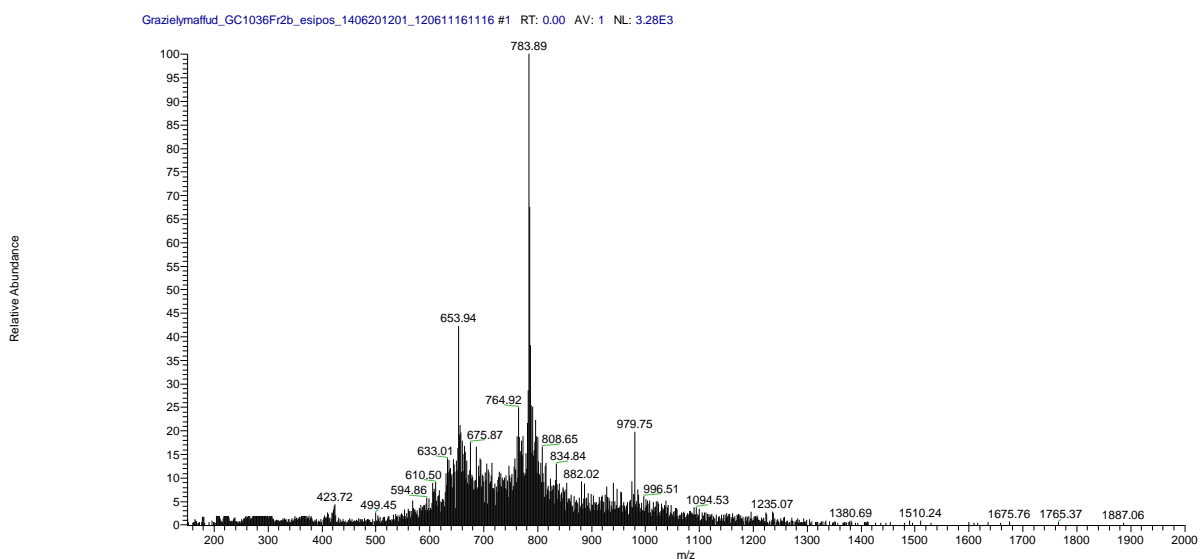


Figura 29 - Espectro de massas do peptídeo Den-2 (88-123). Massa molecular teórica 3914,56 g/mol, (carga +4) 979, (carga +5) 784 g/mol e (carga +6) 653.

Para a resina Den-2 (88-111) foram clivados 400 mg, obtendo após a clivagem e extração, o material bruto liofilizado (figura 30) com 254,5 mg e 58 % de grau de pureza. Do peptídeo bruto, foram purificados 111,3 mg, resultando na massa de 15,7 mg. Os perfis cromatográficos obtidos estão apresentados na figura 30. O espectro de massas obtido confirmou a obtenção do material desejado (figura 31).

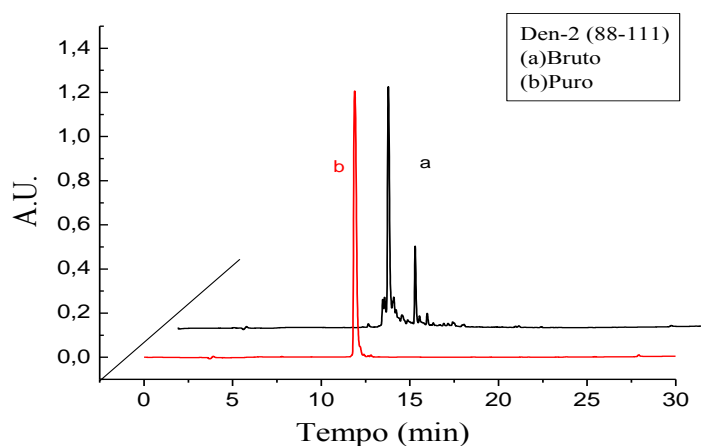


Figura 30 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-2 (88-111): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm

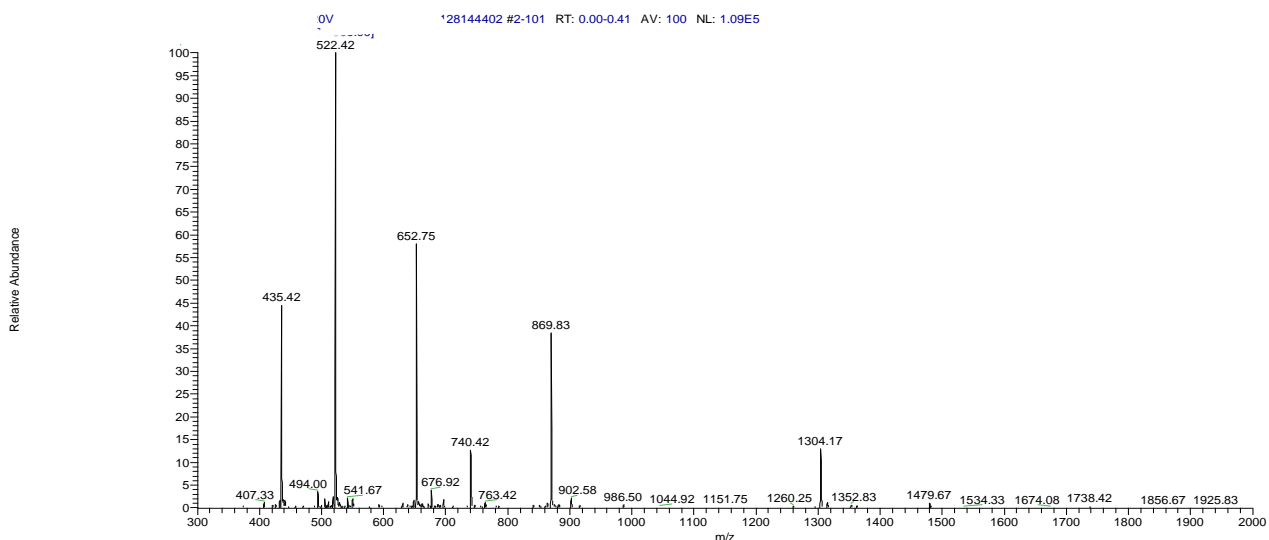


Figura 31 - Espectro de massas do peptídeo Den-2 (88-111). Massa molecular teórica de 2607,98, (carga+2) 1304, (carga +3) 870, (carga +4) 652 g/mol, (carga +5) 522 g/mol e (carga +6) 435 g/mol.

Em sequência, foram sintetizados 3 peptídeos do sorotipo 3 da dengue, tabela 6. O grau de substituição da *Rink* amida utilizada foi de 0,5 mmol, com escala inicial de 0,3 mmol, massa da resina de 666 mg. Dois dos três peptídeos sintetizados começaram na posição 123 até a posição 98, neste ponto, a síntese foi interrompida e dividida em duas partes, ambas com 0,15 mmol de escala. A clivagem desta resina originou a sequência Den-3 (98-123) (posição 98 até 123), e a outra parte foi estendida até a posição 88 da sequência, dando o peptídeo Den-3 (88-123) (posição 88 até 123). A terceira sequência sintetizada, escala de 0,2 mmol e massa de resina de 350 mg (grau de substituição da resina = 0,5 mmol), apresentou a sequência da posição 111 até a 88, dando origem ao peptídeo Den-3 (88-111).

Tabela 6 - Sequência dos peptídeos sintetizados do sorotipo 3 da dengue.

DENGUE SOROTIPO 3	
NOME	SEQUÊNCIA
Den-3 (98-123)	<b>DRGWNGSGLFGK</b> SLVTSAKFQSLE
Den-3 (88-123)	QNYVSKHTYV <b>DRGWNGSGLFGK</b> SLVTSAKFQSLE
Den-3 (88-111)	QNYVSKHTYV <b>DRGWNGSGLFGK</b>

A massa de resina Den-3 (98-123) clivada foi de 400 mg, resultando ao final das etapas de clivagem/extração o peptídeo bruto com 210,7 mg e 48 % de grau de pureza. Foram purificados 123 mg. O perfil cromatográfico está exposto na figura 32, totalizando 27,7 mg.

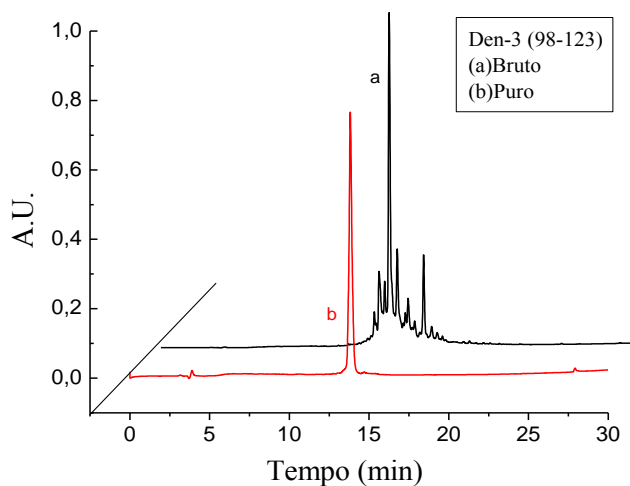


Figura 32 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-3 (98-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

O espectro de massas do peptídeo Den-3 (98-123) com massa 2698,97 g/mol apresentou pico de (carga+2) 1350 g/mol, (carga +3) 900 g/mol e (carga +4) 675g/mol (figura 33). Os valores obtidos confirmaram o sucesso da síntese e a comprovação do material obtido.



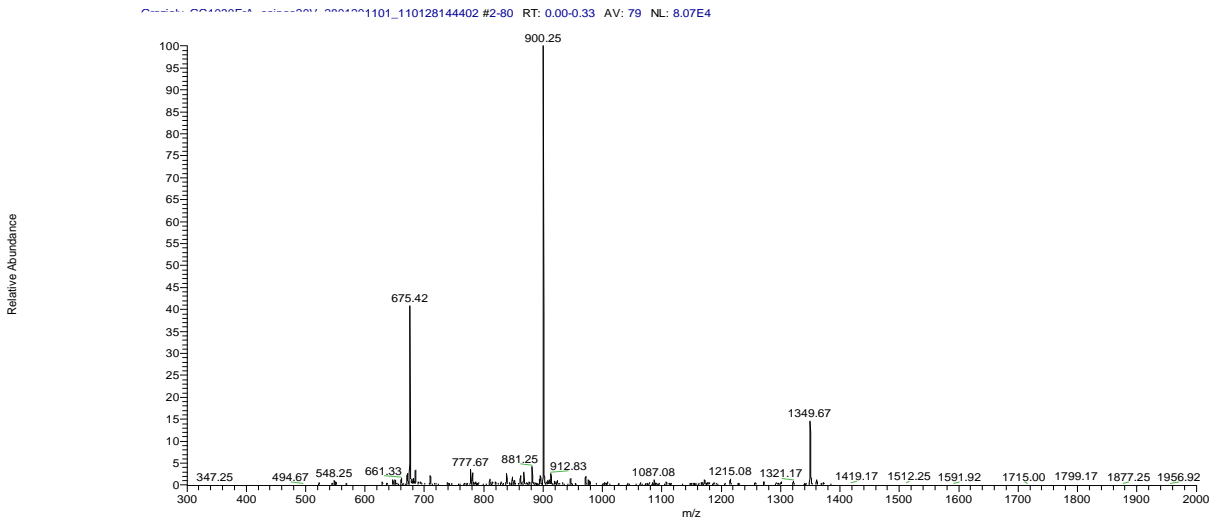


Figura 33 - Espectro de massas do peptídeo Den-3 (98-123) puro.

Para a obtenção do peptídeo Den-3 (88-123) foram clivados 400 mg, resultando ao final das etapas de clivagem e extração, a massa de 203 mg de material com 38 % do grau de pureza. Destas, foram purificados 111 mg, resultando em 9 mg . O perfil cromatográfico está exposto na figura 34.

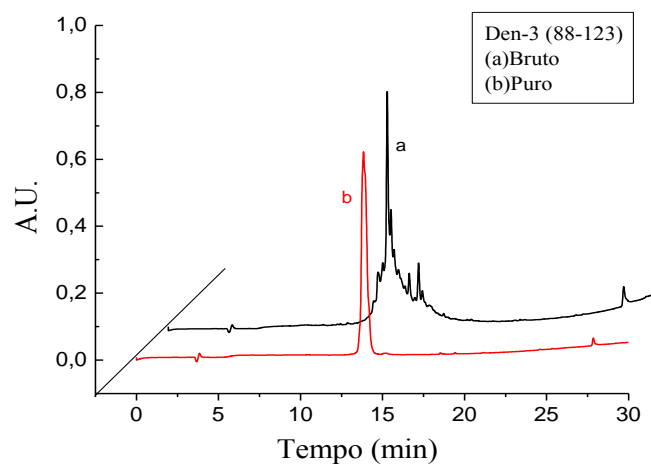


Figura 34 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-3 (88-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

O espectro do peptídeo Den-3 (88-123) com massa 3919,33 g/mol apresentou picos de (carga +3) 1307, (carga +4) 980, (carga +5) 784 e (carga +6) 654 g/mol. (figura 35). Este valor confirmou o sucesso da síntese e do material obtido.

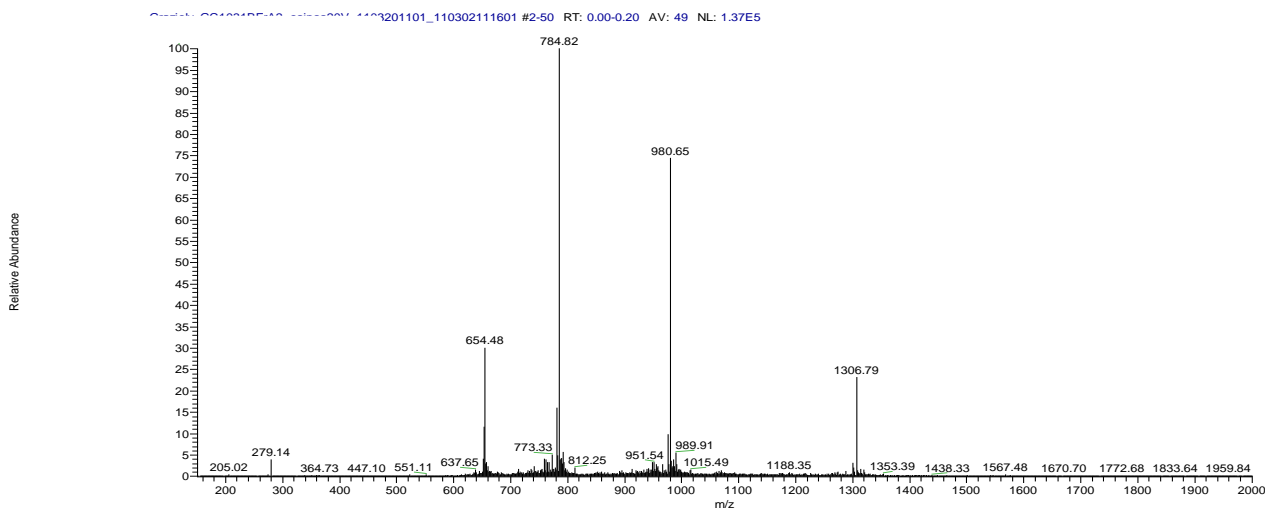


Figura 35 - Espectro de massas do peptídeo Den-3 (88-123) puro.

O peptídeo Den-3 (88-111) foi obtido por meio da clivagem de 400 mg de resina, resultando ao final das etapas de clivagem/extração 277 mg do peptídeo bruto liofilizado com 60 % do grau de pureza. Foram purificados 130 mg deste material, resultando uma massa contendo 30,9 mg de peptídeo puro (figura 35).

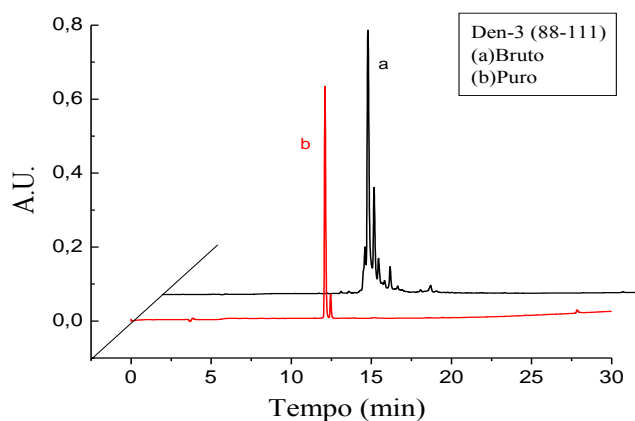


Figura 36 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-3 (88-111): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm

O espectro de massas do peptídeo Den-3 (88-111) com massa 2627,86 g/mol apresentou picos de (carga+2) 1314, (carga +3) 876, (carga +4) 657 g/mol e (carga +5) 526 g/mol (figura 37). Este dado confirmou o sucesso da síntese.

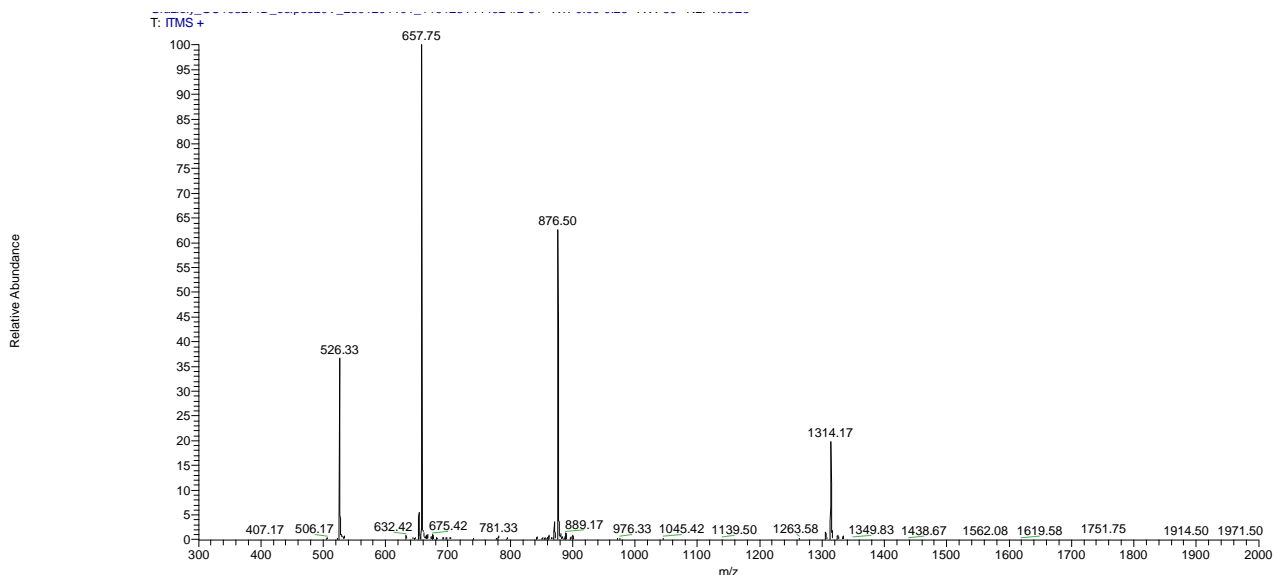


Figura 37 - Espectro de massas do peptídeo Den-3 (88-111) puro.

Procedimentos similares aos descritos acima foram utilizados na síntese dos peptídeos do sorotipo 1 (tabela 7).

A massa do peptídeo Den-1 (98-123) clivada foi de 400 mg, resultando após a clivagem/extração do peptídeo bruto uma massa de 145 mg e 44 % de grau de pureza. Foram purificados deste material 102,8 mg, tendo ao fim uma massa de 5,0 mg. O perfil cromatográfico está na figura 38.

Tabela 7 - Sequência dos peptídeos sintetizados do sorotipo 1 da dengue

DENGUE SOROTIPO 1	
NOME	SEQUÊNCIA
Den-1 (98-123)	<b>DRGWNGSGLFGKGSLLTSAKFKSVT</b>
Den-1 (88-123)	ANFVSRRTFV <b>DRGWNGSGLFGKGSLLTSAKFKSVT</b>
Den-1 (88-111)	ANFVSRRTFV <b>DRGWNGSGLFGKG</b>

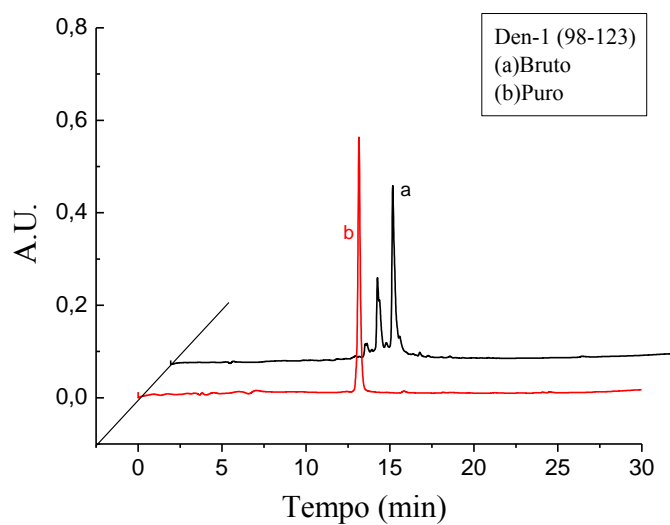


Figura 38 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-1 (98-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

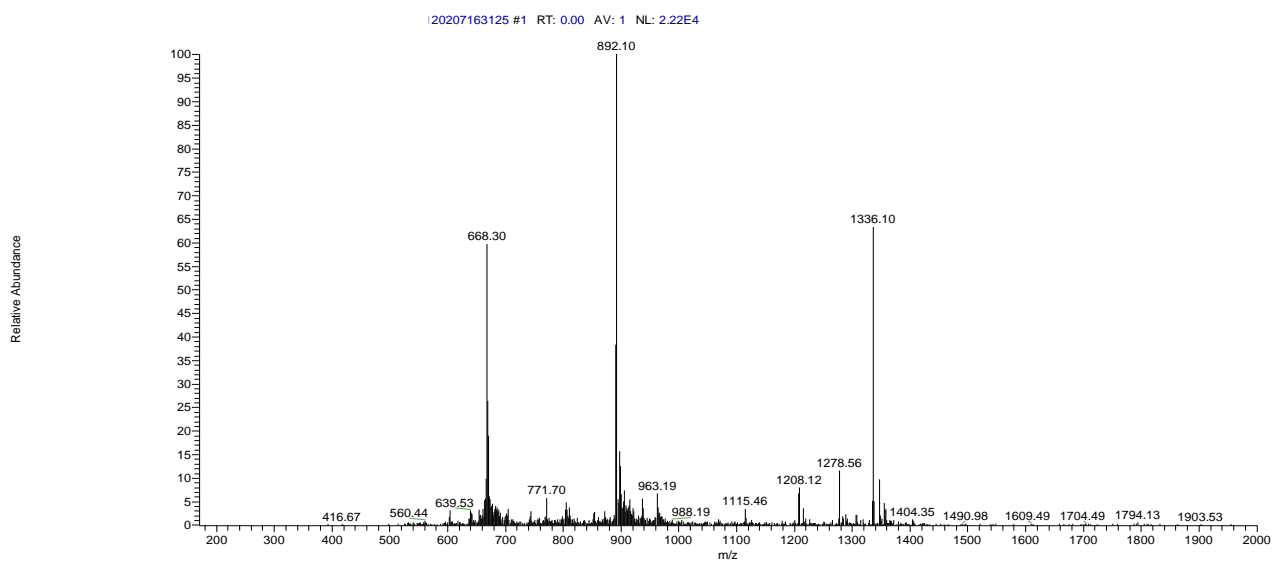


Figura 39 - Espectro de massas do peptídeo Den-1 (98-123). Massa molecular teórica de 2671,01 (carga+2) 1336, (carga +3) 891, (carga +4) 668 g/mol.

Para a resina Den-1 (88-123) foram clivados 400 mg, obtendo após a clivagem/extração o material bruto liofilizado (figura 40), com 145 mg e com 43 % de grau de pureza. Do peptídeo bruto foram purificados 102 mg, resultando em 25,7 mg.

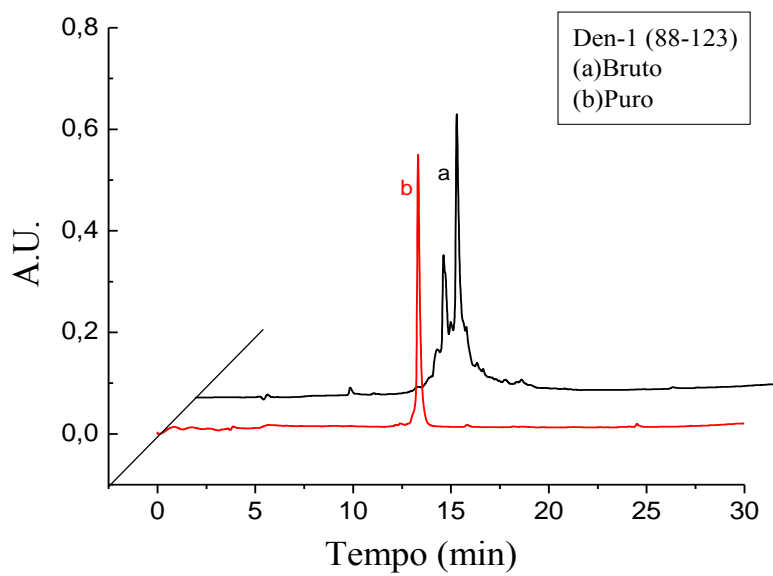


Figura 40 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-1 (88-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

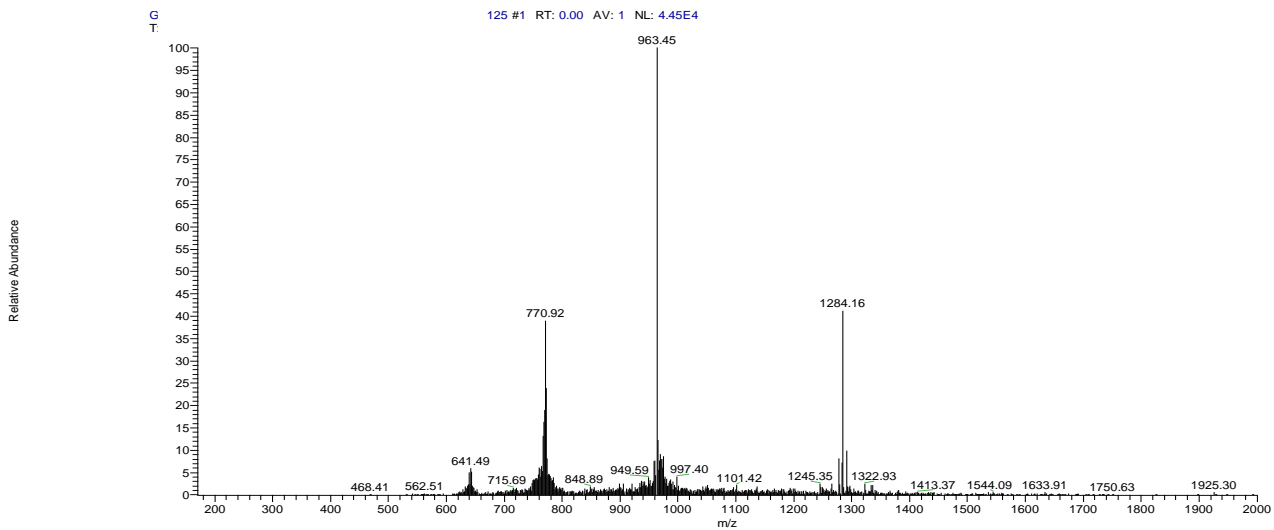


Figura 41 - Espectro de massas do peptídeo Den-1 (88-123). Massa molecular teórica de 3849,37 g/mol, (carga +3) 1284 g/mol, (carga +4) 963 g/mol, (carga +5) 770 g/mol e (carga +6) 642 g/mol.

Da resina Den-1 (88-111) foram clivados 400 mg, obtendo após a clivagem/extração o material bruto liofilizado (figura 42) com 162 mg e 65 % de grau de pureza. Do peptídeo bruto foram purificados 102,7 mg, resultando em 17 mg de material puro.

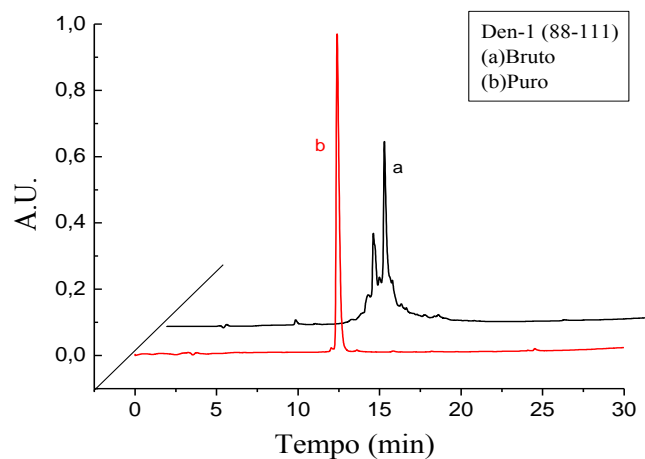


Figura 42 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-1 (88-111): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

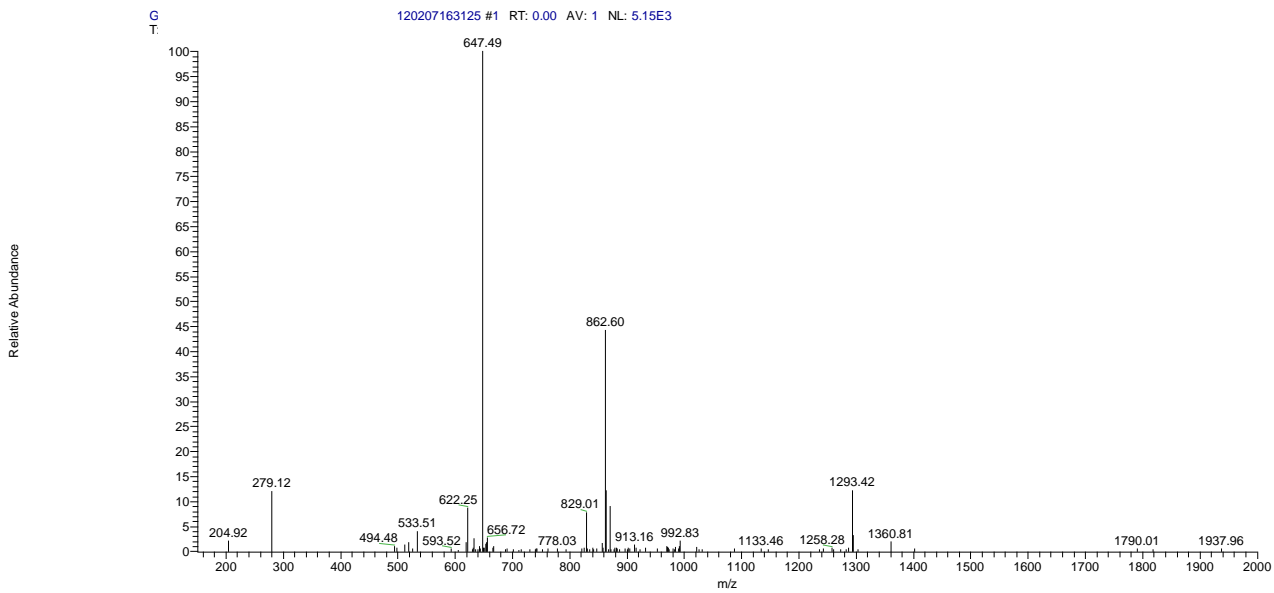


Figura 43 - Espectro de massas do peptídeo Den-1 (88-111). Massa molecular teórica de 2585,87 g/mol, (carga+2) 1293 g/mol, (carga +3) 862 g/mol, (carga +4) 647 g/mol.

O último grupo de peptídeos sintetizados foram provenientes do sorotipo 4 da dengue (tabela 8) . Para a resina Den-4 (98-123) foram clivados 400 mg, obtendo após a clivagem/extração o material bruto liofilizado (figura 44) com 117 mg e 48 % de grau de pureza. Do peptídeo bruto foram purificados 100 mg, resultando na massa de 25,2 mg.

Tabela 8 - Sequência dos peptídeos sintetizados do sorotipo 4 da dengue

DENGUE SOROTIPO 4	
NOME	SEQUÊNCIA
Den-4 (98-123)	<b>DRGWNGSGLFGK</b> GVVTSAKFSSSG
Den-4 (88-123)	QQYISRRDVV <b>DRGWNGSGLFGK</b> GVVTSAKFSSSG
Den-4 (88-111)	QQYISRRDVV <b>DRGWNGSGLFGK</b>

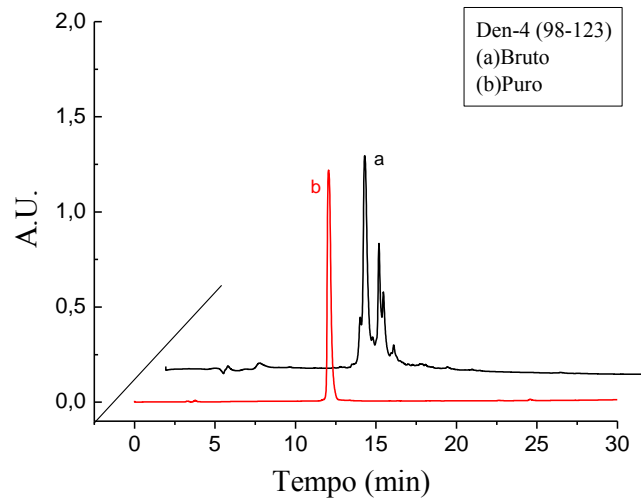


Figura 44 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-4 (98-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

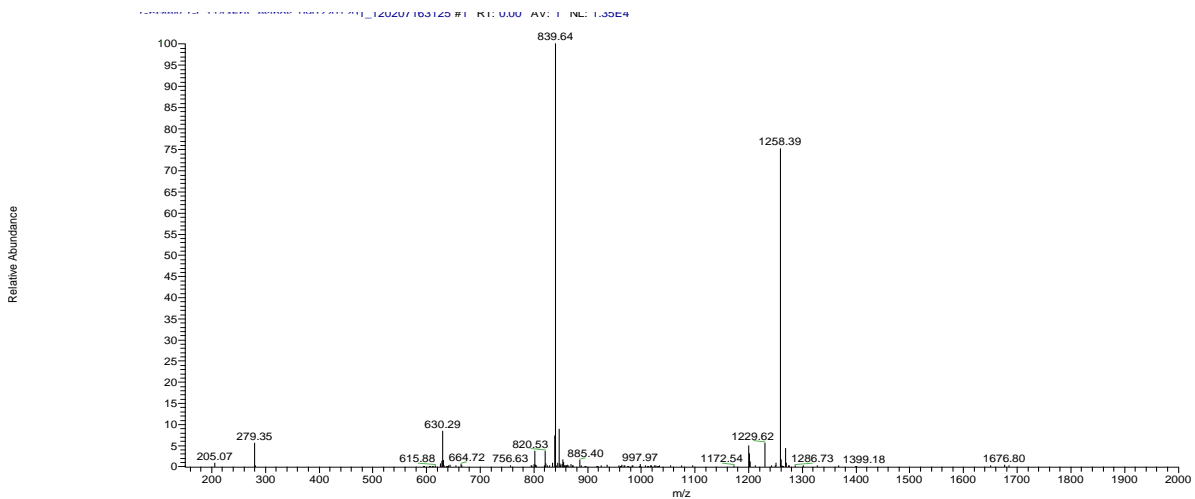


Figura 45 - Espectro de massas do peptídeo Den-4 (98-123). Massa molecular teórica de 2515,72 g/mol, (carga+2) 1258 g/mol, (carga +3) 839 g/mol, (carga +4) 630 g/mol.



Para a resina Den-4 (88-123) foram clivados 400 mg, obtendo após a clivagem/extração o material bruto liofilizado (figura 46) com 190 mg e 48 % de grau de pureza. Do peptídeo bruto foram purificados 100 mg, com 11,4 mg.

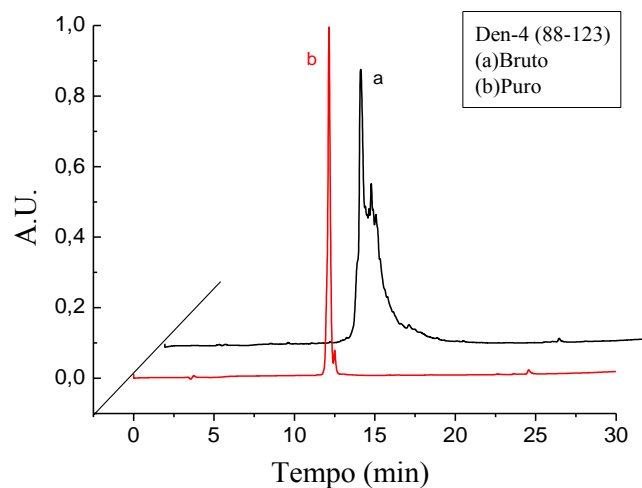


Figura 46 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-4 (88-123): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

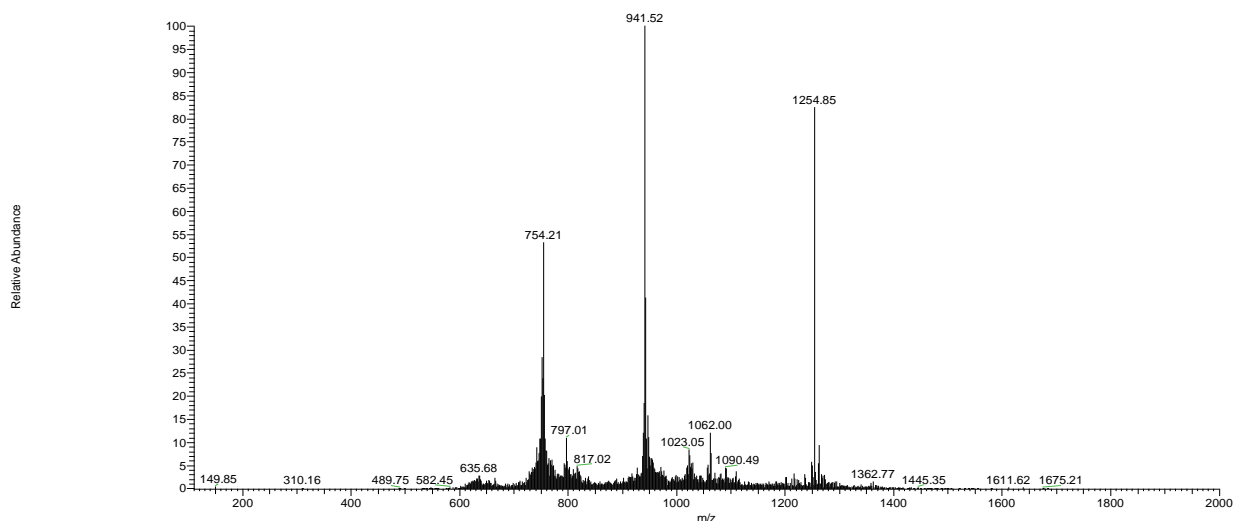


Figura 47 - Espectro de massas do peptídeo Den-4 (88-123). Massa molecular teórica de 3761,13 g/mol, (carga+2) 1881 g/mol, (carga +3) 1254 g/mol, (carga +4) 941 g/mol e (carga +5) 753 g/mol.

A massa de resina Den-4 (88-111) clivada foi de 400 mg, obtendo após a clivagem/extração o material bruto liofilizado (figura 48) com 153 mg e 43 % de grau de pureza. Do peptídeo bruto foram purificados 100 mg, com 6,4 mg.

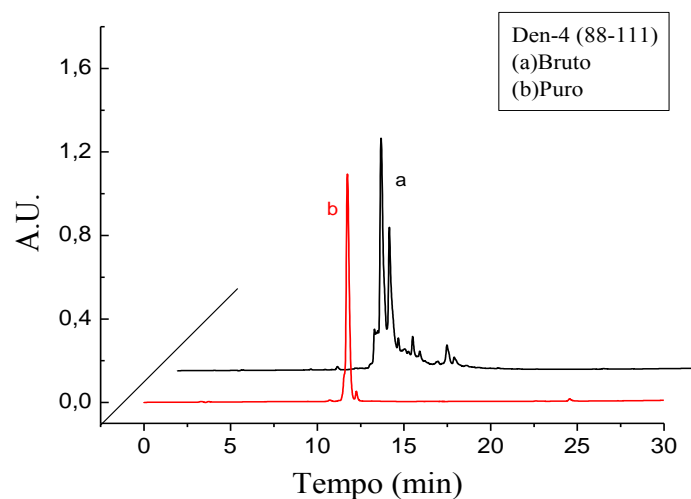


Figura 48 - Perfil cromatográfico do peptídeo Den-4 (88-111): (a) bruto e (b) puro. Programa: 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm.

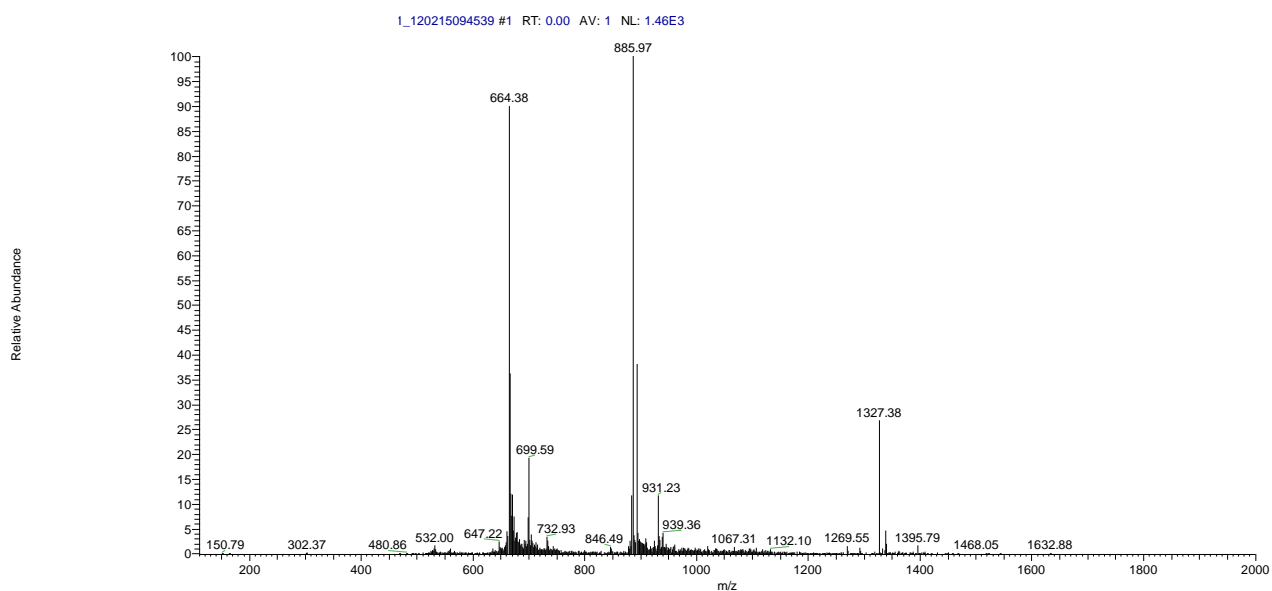


Figura 49 - Espectro de massas do peptídeo Den-4 (88-111). Massa molecular teórica de 2652,91 g/mol, (carga+2) 1327 g/mol, (carga +3) 855 g/mol, (carga +4) 664 g/mol e(carga +5) 531 g/mol.

Todos os peptídeos obtidos a partir das modificações apresentaram ótimos rendimentos, e também apresentaram uma porcentagem de pureza bem melhor do que as obtidas anteriormente.

## 4.2 **F**luorescência

Para verificar a interação dos peptídeos obtidos com membranas, a primeira técnica empregada foi a fluorescência. Como todos os peptídeos sintetizados possuíam um resíduo de triptofano, esse foi utilizado para este fim (absorção em 280 nm e emissão próximo a 340 nm). A fluorescência do cromóforo indol pertencente a este resíduo é sensível ao ambiente, podendo ser utilizada para monitorar alterações conformacionais em proteínas e interações com outras moléculas (CHEN; BARKLEY, 1998). Somado a isto, sondas externas fluorescentes foram utilizadas para a determinação da capacidade fusogênica dos peptídeos.

Em todos os estudos de fluorescência foram utilizados dois tampões, o tampão fosfato com pH 7,1 e o tampão acetato, com pH 5,5. Relembramos que, a fusão do vírus da dengue inicia com a diminuição do pH do endossoma.

## 4.3 **C**apacidade fusogênica

A capacidade de fusão dos peptídeos foi testada em vesículas preparadas com lipídeos zwitteriônico (fosfatidilcolina do ovo-PC) e aniônico (1- palmitoil-2-oleoil-sn-glicerofosfatidilglicerol- POPG). Melo (MELO, 2009), em seus estudos com o peptídeo de fusão (98-112) do vírus da dengue, mostrou que este foi capaz de induzir fusão das vesículas (LUVs) quando estas eram compostas de fosfolipídios aniônicos, como PG, mas não em PE (fosfatidiletanoamina) e PS (fosfatidilserina). A atividade fusogênica do PG e a não do PS, outro lipídeo carregado negativamente, pode estar relacionado com características específicas da cabeça do PG e não ao efeito da carga do lipídeo.

As vesículas foram preparadas, visando mimetizar tanto a composição lipídica da membrana celular como a da membrana do retículo endoplasmático, que participam do processo de fusão.

A porcentagem de fusão dos 14 peptídeos foi representada em forma de histograma para os quatro sorotipos existentes, incluindo os peptídeos de fusão original (contendo o resíduo de cisteína) e o seu análogo, contendo o resíduo de serina.

Os peptídeos de fusão em tampão fosfato apresentaram a mesma habilidade de induzir a mistura lipídica com as vesículas sintéticas, figura 50, desestabilizando a bicamada lipídica e induzindo a fusão da membrana (EPAND, 2003). Na presença do tampão acetato não foi possível verificar atividade fusogênica dos peptídeos de fusão, figura 50.

Os resultados obtidos mostraram que a substituição da cisteína 105 pela serina não alterou a atividade fusogênica do peptídeo.

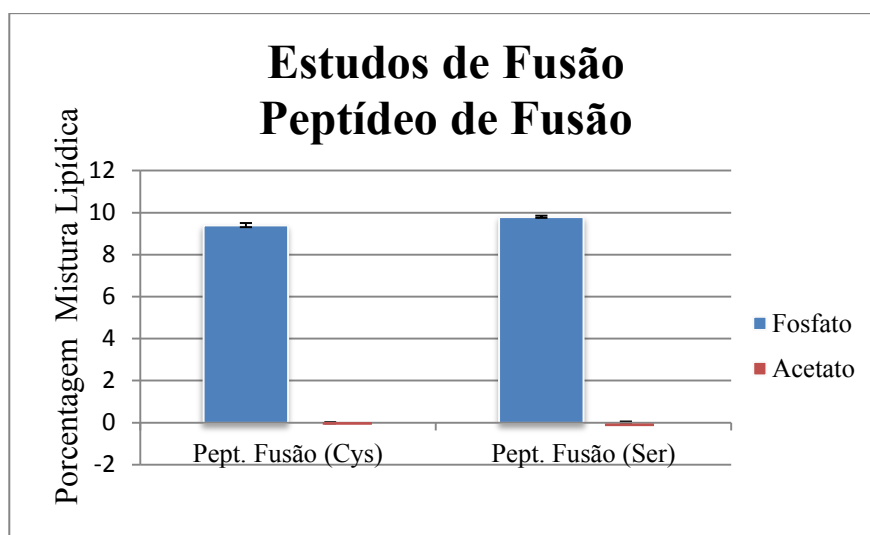


Figura 50 - Porcentagem de mistura lipídica do peptídeo de fusão em tampão fosfato e acetato, com o erro padrão indicados com setas de duas pontas. Tampão fosfato em azul e tampão acetato em vermelho.

Os peptídeos do sorotipo 2, figura 51, e o de fusão, figura 50, induziram significativo nível de fusão nas LUVs, sugerindo que eles foram capazes de interagir com a bicamada nas condições experimentais utilizadas. Estes dados corroboram o trabalho realizado por Stauffer (STAUFFER *et al.*, 2008). Como o encontrado por estes autores, o peptídeo Den-2 (88-123) mostrou maior atividade que o peptídeo de fusão (98-112). Uma análise mais detalhada da atividade de fusão em tampão fosfato dos peptídeos do sorotipo 2 da dengue mostrou que, o Den-2 (88-123) que contém a região anterior e posterior ao peptídeo de fusão, foi a que apresentou maior porcentagem de

mistura lipídica, seguido do peptídeo Den-2 (98-123) que contém somente a região posterior, e o Den-2 (88-111), que contém somente a região anterior.

Em tampão acetato, os peptídeos do sorotipo 2 com a região posterior 113 a 123, figura 51, foram novamente os que promoveram maior mistura lipídica. O peptídeo contendo apenas a região anterior 88-97 não possui a mesma habilidade de fundir as vesículas quanto os peptídeos contendo a região posterior. A ordem fusogênica foi Den-2 (98-123) > Den-2 (88-123) > Den-2 (88-111) > peptídeo de fusão.

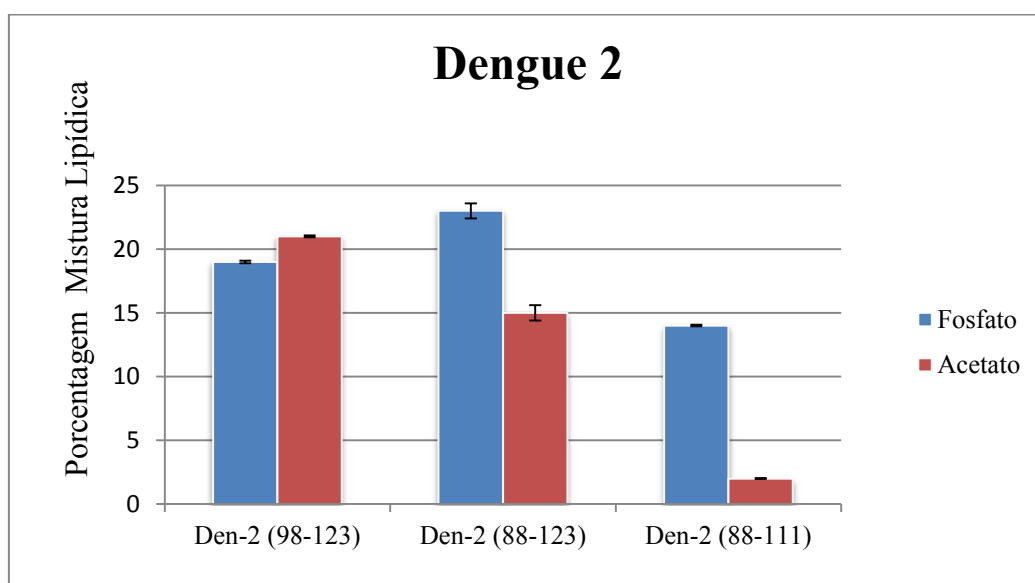


Figura 51 - Porcentagem de mistura lipídica dos peptídeos do sorotipo do dengue 2 em tampão fosfato e acetato, com o erro padrão indicados com setas de duas pontas. Tampão fosfato em azul e tampão acetato em vermelho.

Os sorotipos 1, 3 e 4, apresentaram em tampão fosfato uma menor atividade em comparação aos peptídeos do sorotipo dengue 2 (figuras 52, 53 e 54). Para esses peptídeos em tampão acetato, os resultados mostraram quase ou nenhuma mistura lipídica.

Estes resultados são interessantes, pois não esperávamos uma diferença tão grande entre os sorotipos. A ordem de promover a fusão nas vesículas foi sorotipo 2 > sorotipo 1 > sorotipo 4 > sorotipo 3.

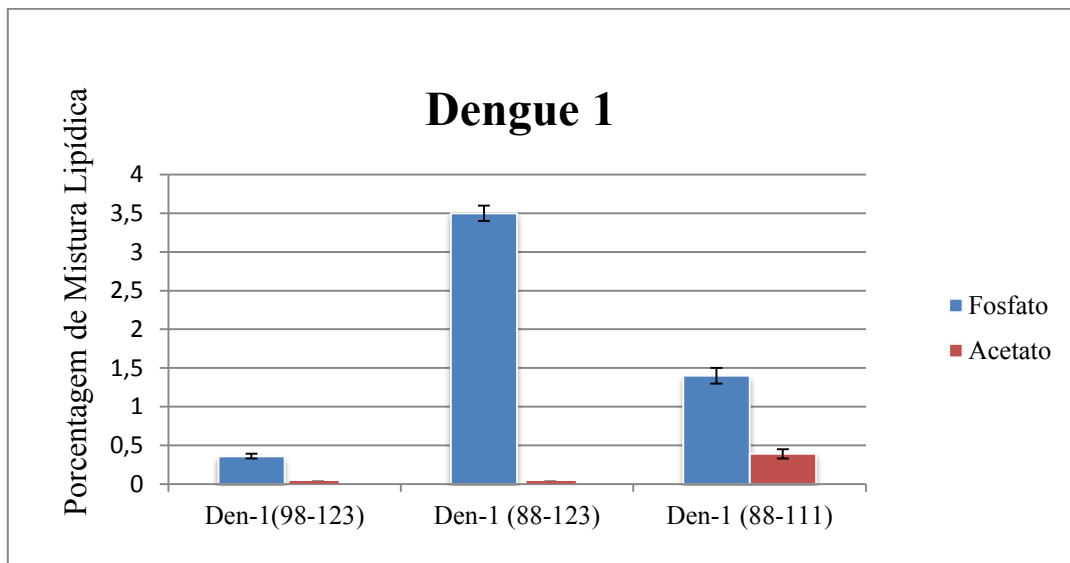


Figura 52 - Porcentagem de mistura lipídica dos peptídeos do sorotipo do dengue 1 em tampão fosfato e acetato, com o erro padrão indicados com setas de duas pontas. Tampão fosfato em azul e tampão acetato em vermelho.

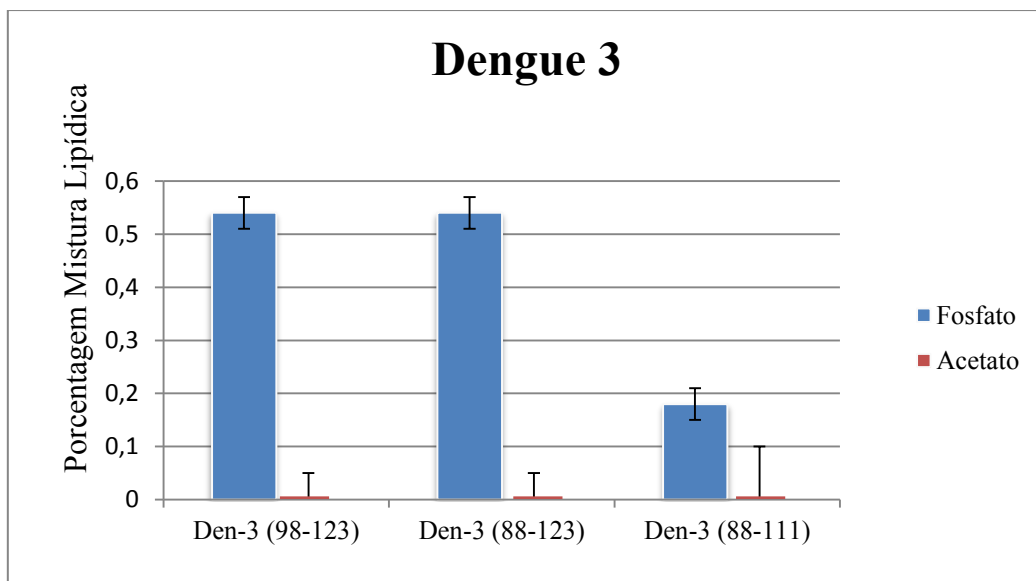


Figura 53 - Porcentagem de mistura lipídica dos peptídeos do sorotipo do dengue 3 em tampão fosfato e acetato, com o erro padrão indicados com setas de duas pontas. Tampão fosfato em azul e tampão acetato em vermelho.

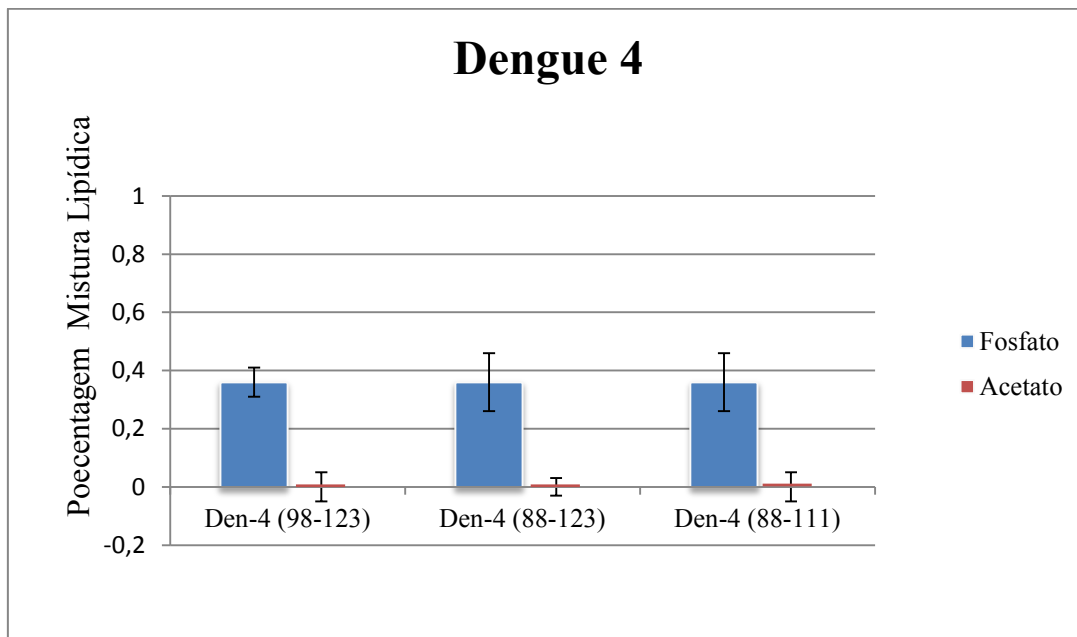


Figura 54 - Porcentagem de mistura lipídica dos peptídeos do sorotipo do dengue 4 em tampão fosfato e acetato, com o erro padrão indicados com setas de duas pontas. Tampão fosfato em azul e tampão acetato em vermelho.

Para tentar explicar as diferenças obtidas, avaliamos algumas propriedades físico-químicas dos peptídeos que estão mostradas na tabela 9.

Tabela 9 - Estrutura primária e polaridade dos peptídeos

Peptídeos	Sequência	Carga pH 5,5	Carga pH 7,1	Hidrof. pH 5,5	Hidrof. pH 7,1
	88                      98                                      112                                      123				
Pept. Fusão Cys	DRGWGNGCGLFGKGG	1,0	0,9	-0,63	-0,57
Pept. Fussão Ser	DRGWGNGSGLFGKGG	1,0	0,9	-0,16	-0,1
Den-1 (98-123)	DRGWGNGSGLFGKGSLLTSAKFKSVT	3,0	2,9	-0,16	-0,1
Den-1 (88-123)	ANFVSRRTFVDRGWGNGSGLFGKGSLLTSAKFKSVT	5,0	4,9	1,0	0,9
Den-1 (88-111)	ANFVSRRTFVDRGWGNGSGLFGKG	3,0	2,9	1,0	0,9
Den-2 (98-123)	DRGWGNGSGLFGKGGIVTSAMFRSCK	4,0	3,9	-0,16	-0,1
Den-2 (88-123)	KRFVSKHSMVDRGWGNGSGLFGKGGIVTSAMFRSCK	7,9	7,1	0,87	0,9
Den-2 (88-111)	KRFVSKHSMVDRGWGNGSGLFGKG	4,9	4,1	0,87	0,9
Den-3 (98-123)	DRGWGNGSGLFGKGSLLTSAKFQSL E	1,2	1,0	-0,16	-0,1
Den-3 (88-123)	QNYVSKHTYVDRGWGNGSGLFGKGSLLTSAKFQSL E	3,1	2,1	1,3	1,3
Den-3 (88-111)	QNYVSKHTYVDRGWGNGSGLFGKG	2,9	2,1	1,3	1,3
Den-4 (98-123)	DRGWGNGSGLFGKGGVVTSAKFSSSG	2,0	1,9	-0,16	-0,1
Den-4 (88-123)	QQYISRRDVVDRGWGNGSGLFGKGGVVTSAKFSSSG	3,1	2,9	1,2	1,1
Den-4 (88-111)	QQYISRRDVVDRGWGNGSGLFGKG	2,1	1,9	1,2	1,1

Apolares: A, V, L, I, P, F, W, M; Polares: G, T, Y, S, C, N, Q; Carregados Negativamente: D e E; Carregados positivamente: K, R e H. Cálculo da hidrofobicidade: <http://www.biosyn.com/PeptidePropertyCalculator/PeptidePropertyCalculator.aspx>

A habilidade de um peptídeo induzir uma mistura lipídica não depende somente do comprimento da sequência, mas sim, da carga total da polaridade da sequência e da



presença de resíduos de glicina (TORRES; BONG, 2011). Estes três requisitos são os responsáveis pela infecção viral, apresentando papel central na fusão da membrana com o envelope do vírus (TORRES; BONG, 2011).

Avaliando os dados apresentados nesta tabela, os peptídeos provenientes do sorotipo 2 da dengue são os que apresentam o maior teor de carga positiva em pH fisiológico, o que poderia explicar sua maior atividade fusogênica. Em seguida, temos os peptídeos provenientes do sorotipo 1, que apresentaram a segunda maior capacidade de fundir vesículas. Os peptídeos dos sorotipos 3 e 4 apresentaram a menor capacidade de misturar lipídeos e as menores cargas. Estes resultados indicam que a carga dos peptídeos, ou seja, a presença de aminoácidos carregados positivamente podem estar relacionadas fortemente com a etapa de fusão.

Acreditamos deste modo que, a maior capacidade de fusão dos peptídeos provenientes do sorotipo 2 esteja ligada aos aminoácidos carregados positivamente presentes nas duas regiões que flanqueiam o peptídeo de fusão.

Ressaltamos que, os peptídeos contendo a região posterior ao peptídeo de fusão Den-2 (98-123) e Den-2 (88-123) tabela 5, foram os que apresentam maior porcentagem de mistura lipídica em relação ao peptídeo contendo apenas a região anterior ao peptídeo de fusão Den-2 (88-111). Desta forma, acreditamos que a região posterior ao peptídeo de fusão esteja mais relacionada à etapa de fusão do que sua região anterior.

#### 4.4 **E**studos em micelas

Após verificar a atividade de fusão dos peptídeos propostos, os mesmos foram submetidos a estudos com micelas, visando obter dados que explicassem as diferenças de atividades encontradas.

As moléculas de surfactantes em ambiente polar tendem a agregar-se, formando esferas denominadas micelas, com as caudas hidrofóbicas voltadas para o seu interior e os grupos hidrofílicos para fora. Estas moléculas se agregam-se a partir de uma concentração micelar crítica. A concentração micelar crítica é a concentração mínima de detergente na qual as micelas se formam. Abaixo da CMC, os surfactantes estão predominantemente na forma de monômeros ou agregados. As micelas formadas podem

ser utilizadas como modelos de membrana, pois mimetizam em parte uma bicamada lipídica.

#### 4.4.1 Micelas de LPC

O LPC é um detergente dipolar, possuindo uma carga negativa próxima da cadeia acila e uma positiva em sua extremidade, diferindo dos demais por conter uma única cauda acila, e não duas. Desta forma, em solução aquosa e a partir da CMC, que é de aproximadamente 1,1 mmol/L (MORAIS *et al.*, 2007), forma micelas. O LPC pode ser considerado quimicamente próximo a fosfatidilcolina (fosfolípido presente na membrana celular de alguns organismos), apresentando uma cabeça polar com um fosfato ligado à cauda acila e um grupo colina.

Para efeito de comparação entre os peptídeos, utilizou-se, primariamente, como parâmetro o comprimento de onda de máxima emissão, pois mudanças conformacionais sofridas pelo peptídeo ou interações com moléculas carregadas do sistema em análise podem causar alterações da intensidade de fluorescência (CHEN; BARKLEY, 1998), devido à proximidade do triptofano com os grupos carregados existentes nas cadeias laterais dos aminoácidos, ou ainda de moléculas na micela.

Os dados obtidos mostraram que o peptídeo de fusão (98 a 112), sequência presente em todos os peptídeos, apresentou uma diminuição no comprimento de onda de emissão máxima  $\lambda$  (“*blue shift*”) nos dois tampões utilizados, bem como um aumento na intensidade de fluorescência. Isto indica uma migração para um ambiente apolar, ou seja, estes dados indicaram uma interação com a micela de LPC.

Os peptídeos provenientes dos sorotipos 1, 2, 3 e 4, apresentaram comportamento semelhante ao peptídeo de fusão, figuras 55 a 64, isto é, interação com o mimético de membrana. Os peptídeos provenientes dos sorotipos 1 e 2, os que apresentaram maior capacidade fusogênica, foram os que apresentaram maior diminuição no comprimento de onda de emissão máxima  $\lambda_{\max}$ , e maior aumento na intensidade de fluorescência, indicando mudança do resíduo de triptofano e do peptídeo para um ambiente apolar. Analisando globalmente os dados obtidos, a interação encontrada foi independente do pH. Somado a isto, os peptídeos com maior interação com as micelas de LPC foram os que possuem o peptídeo de fusão e a região posterior a

este segmento (113-123), ou seja, todos os sorotipos contendo a região 113-123 interagiram mais com as micelas de LPC do que os peptídeos contendo a região 88-97. Estes dados mostraram que a região posterior ao peptídeo de fusão contribui mais para a interação com a membrana que a região que precede o peptídeo de fusão. Exceção foram encontradas para os peptídeos oriundo dos sorotipo 3 e 4.

Os dados obtidos mostraram que a capacidade de fusão do peptídeo está diretamente relacionada a interação com o mimético de membrana, isto é, quanto maior a interação encontrada, maior foi a capacidade de induzir fusão do peptídeo.

#### A) Em tampão fosfato

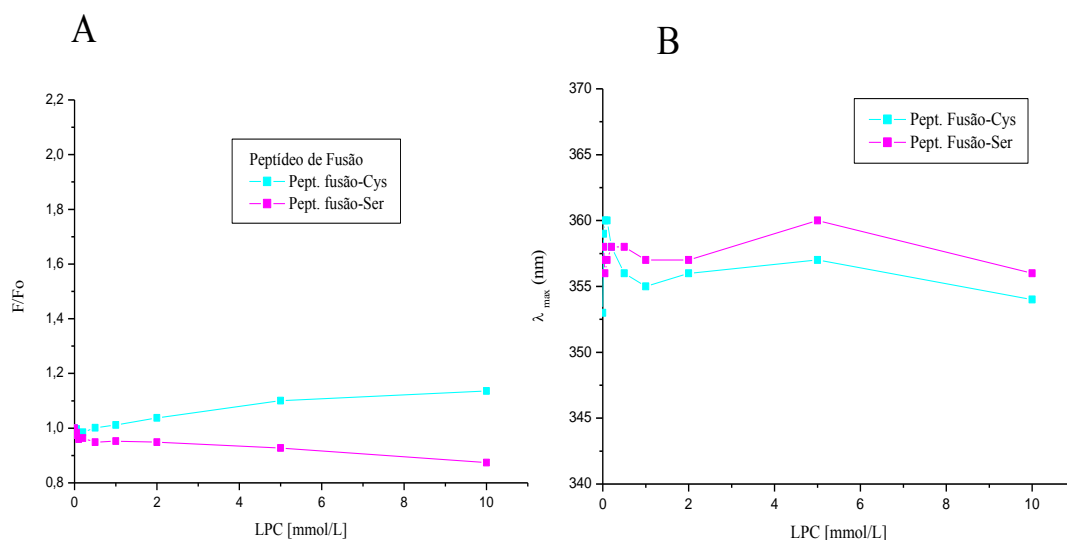


Figura 55 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos de fusão com serina e cisteína.

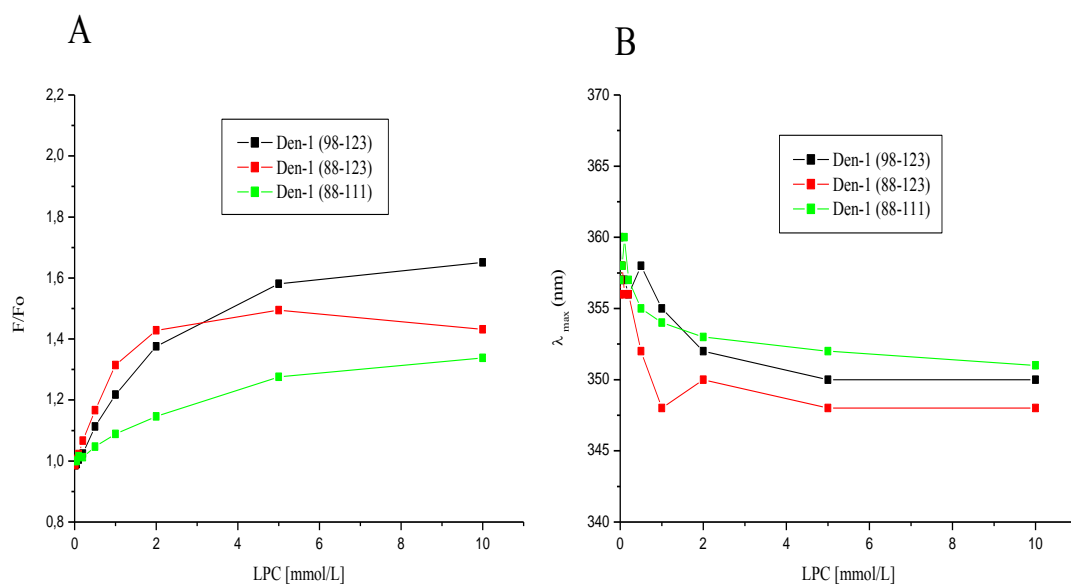


Figura 56 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão(B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 1.

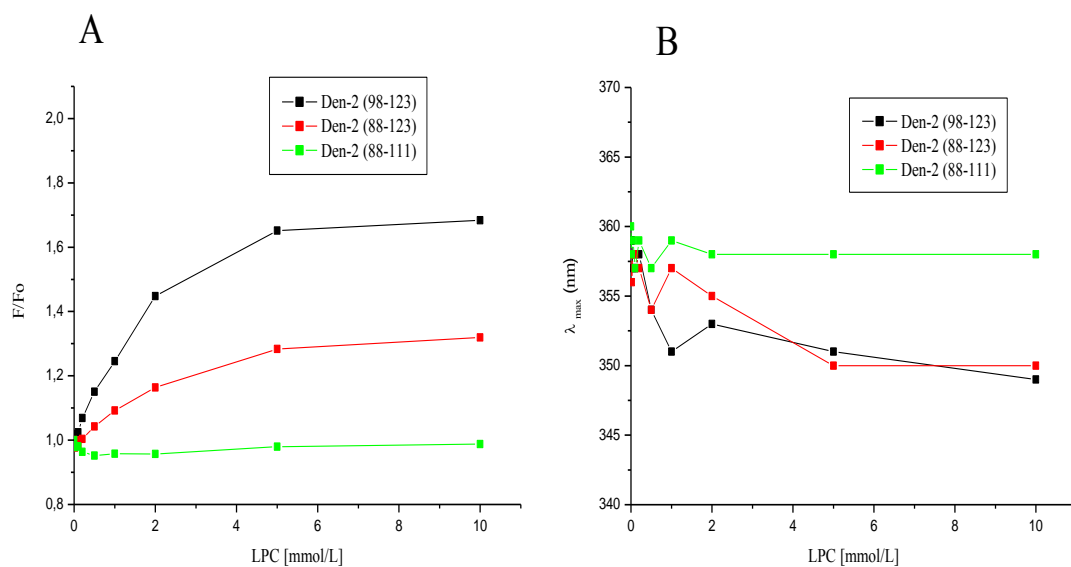


Figura 57 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 2.

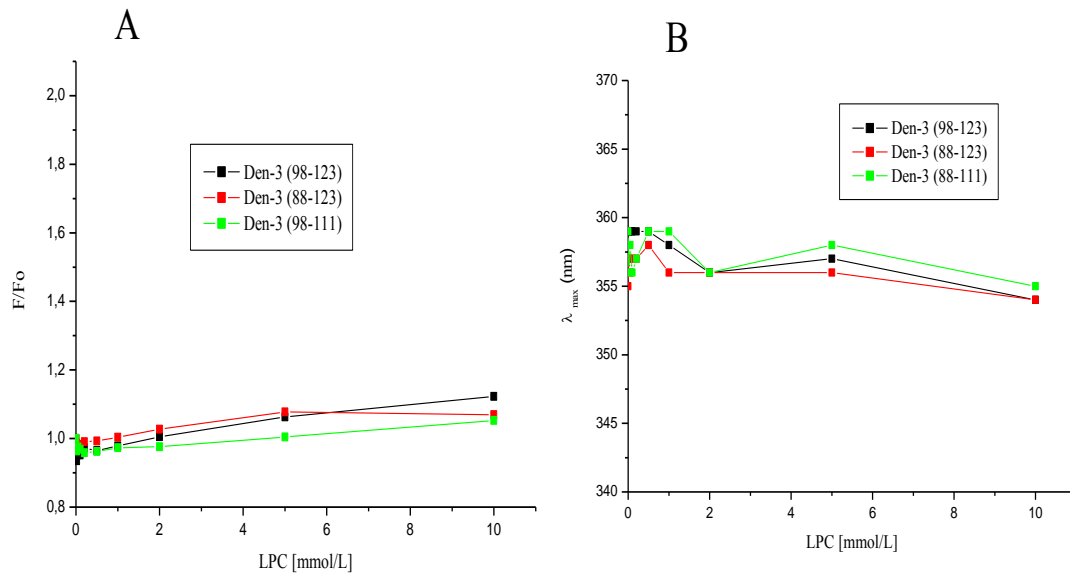


Figura 58 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 3.

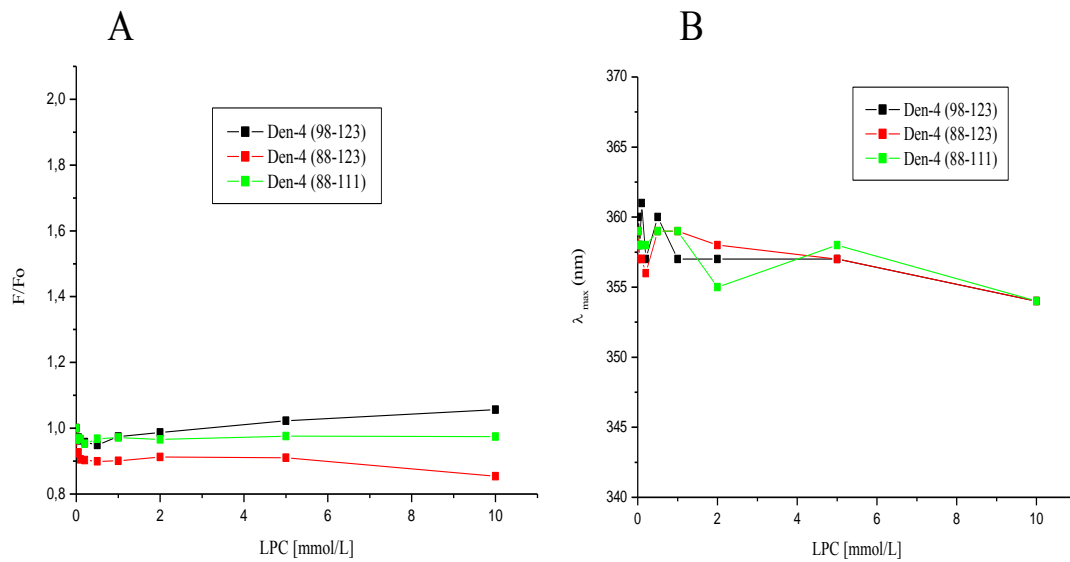


Figura 59 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 4.

B) Em tampão acetato

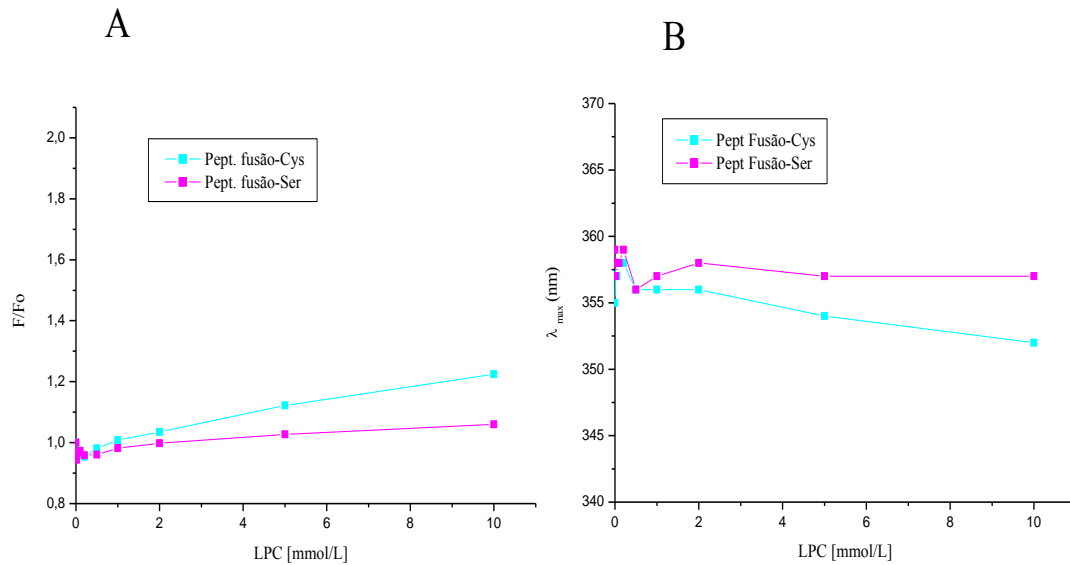


Figura 60 -Variação da intensidade de fluorescência (A) do comprimento de onda de máxima emissão(B) em função da [LPC] para os peptídeos de fusão com serina e cisteína.

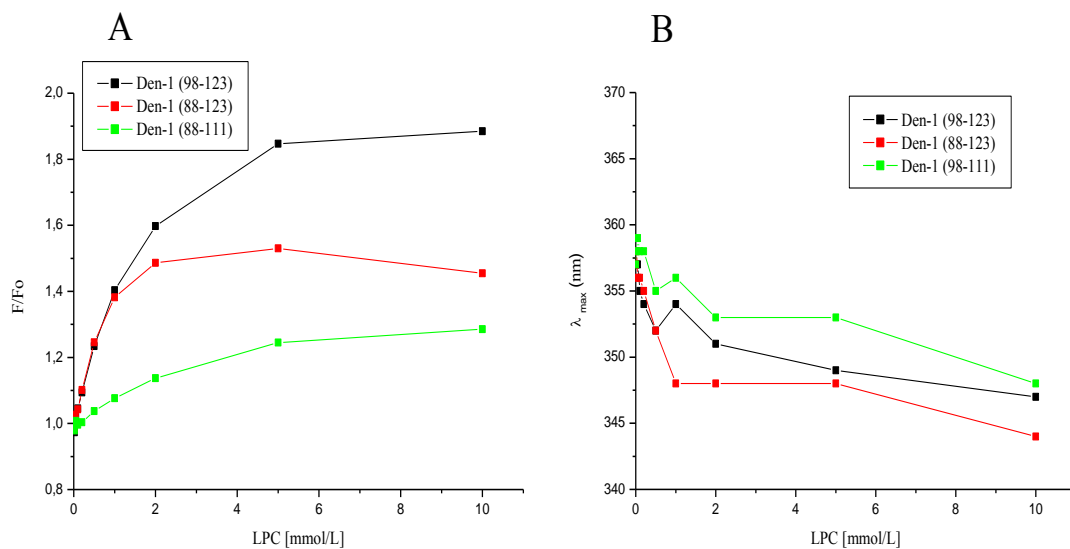


Figura 61 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 1.

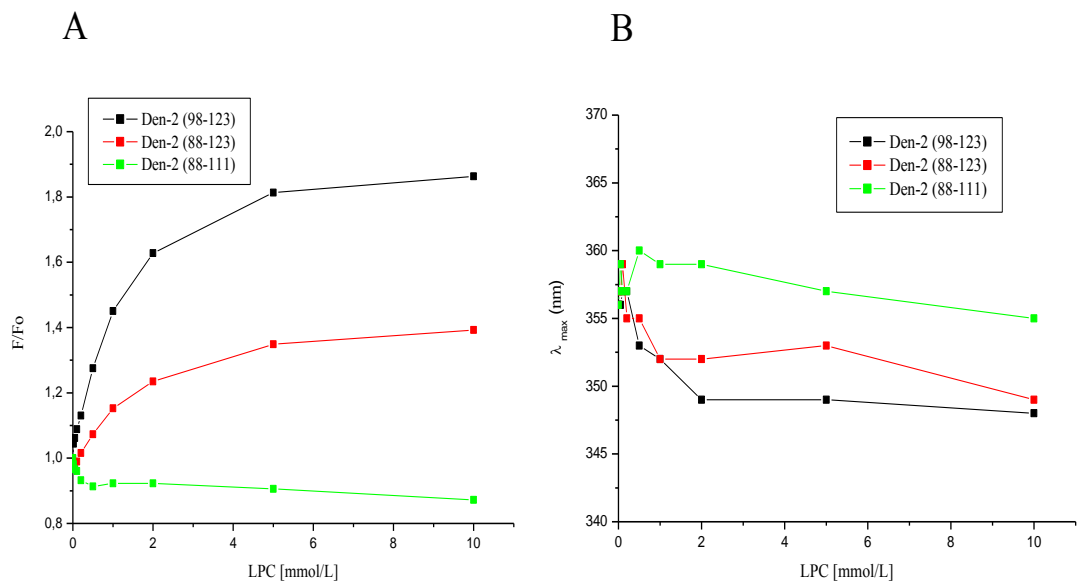


Figura 62 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 2.

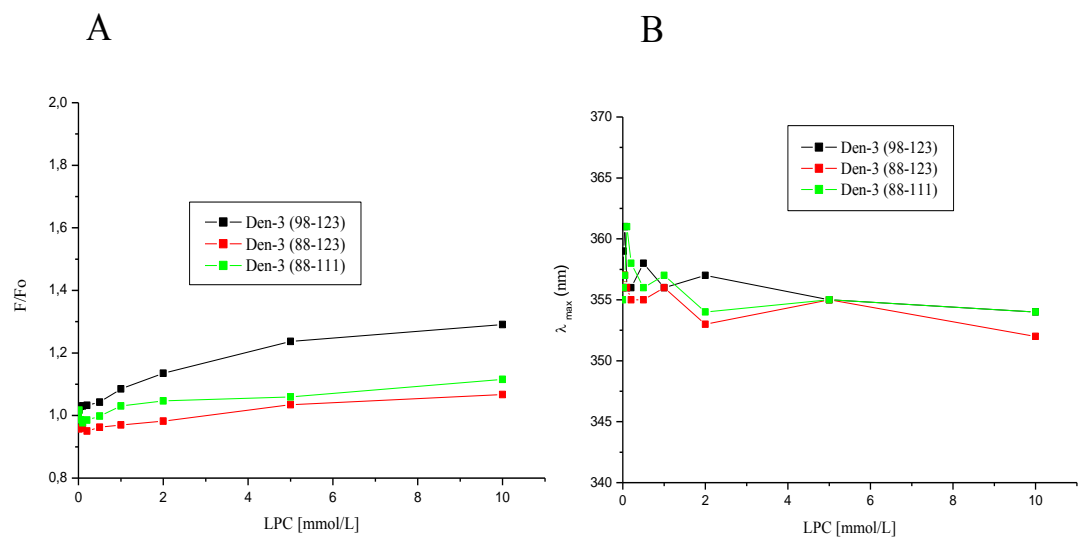


Figura 63 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 3.

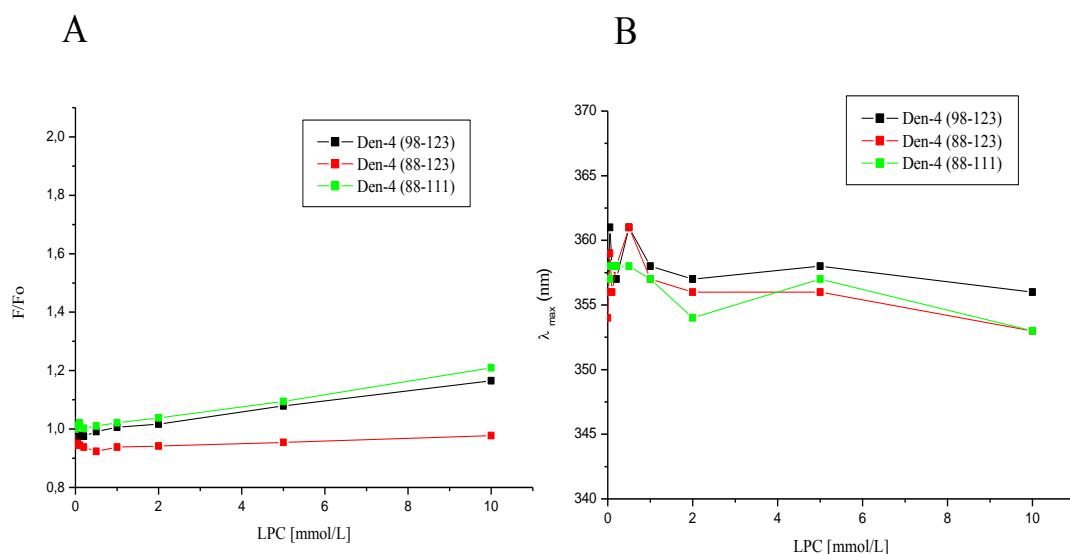


Figura 64 - Variação da intensidade de fluorescência (A) e do comprimento de onda de máxima emissão (B) em função da [LPC] para os peptídeos do sorotipo 4.

#### 4.4.2 Estudos de Supressão de Fluorescência

Para complementar os estudos acima, foram realizados experimentos de supressão de fluorescência com os peptídeos em solução e na presença das micelas. O supressor utilizado foi a acrilamida, que é um eficiente supressor da fluorescência do triptofano. Este agente diminui a intensidade de fluorescência via contato físico (colisão) com o anel indol excitado. Assim, uma maior supressão da fluorescência indica uma maior exposição do triptofano ao meio polar e uma menor inserção na micela.

Esta supressão foi medida numericamente por meio da constante de *Stern Volmer* para cada peptídeo nas diferentes condições estudadas (EFTINK; GHIRON, 1976). A constante de *Stern-Volmer* ( $K_{sv}$ ) é um parâmetro obtido a partir da tangente da curva de supressão, que relaciona à intensidade de fluorescência ( $F_0/F$ ) em função da concentração de supressor ( $F_0/F$ ).

Como havíamos realizado a troca dos resíduos de cisteína pelo de serina, estes experimentos também foram realizados na comparação entre estes dois peptídeos. Os



dados mostrados na tabela 4 para os peptídeos de fusão contendo serina e cisteína não apresentaram grandes diferenças entre estes peptídeos, validando, desta forma, a utilização dos peptídeos com esta substituição.

Os estudos de supressão pela acrilamida dos peptídeos dos sorotipos 1, 2, 3, 4 e do peptídeo de fusão estão mostrados nas figuras 65 a 69, onde se verificou a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração do supressor, tabelas 10 e 11. O comprimento de onda de emissão não se alterou (não mostrados), indicando que a supressão foi do tipo dinâmica.

Na comparação dos valores obtidos de Ksv (tabela 10 e 11), pode-se observar que os valores foram maiores em água do que em micela, confirmando a interação dos peptídeos com estes modelos de membrana (LPC). Menores valores de Ksv indicam que o triptofano está menos exposto ao meio aquoso e, conseqüentemente, mais inserido na micela.

#### A) Em tampão Fosfato

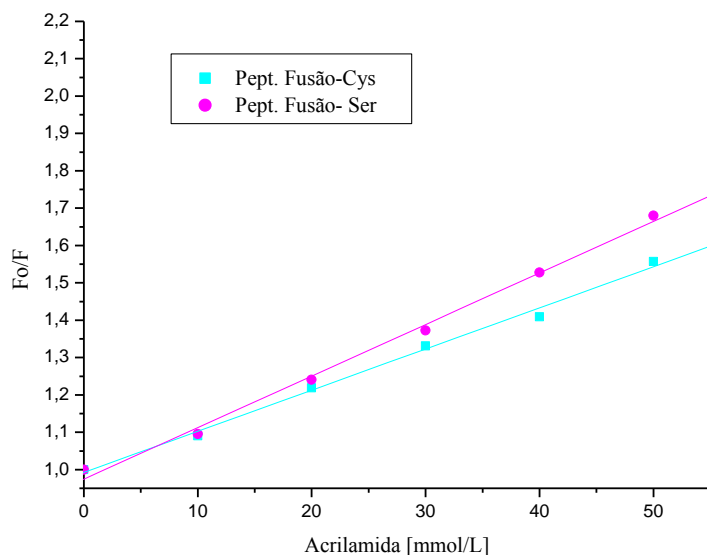


Figura 65 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos de fusão em solução aquosa pH 7,1. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

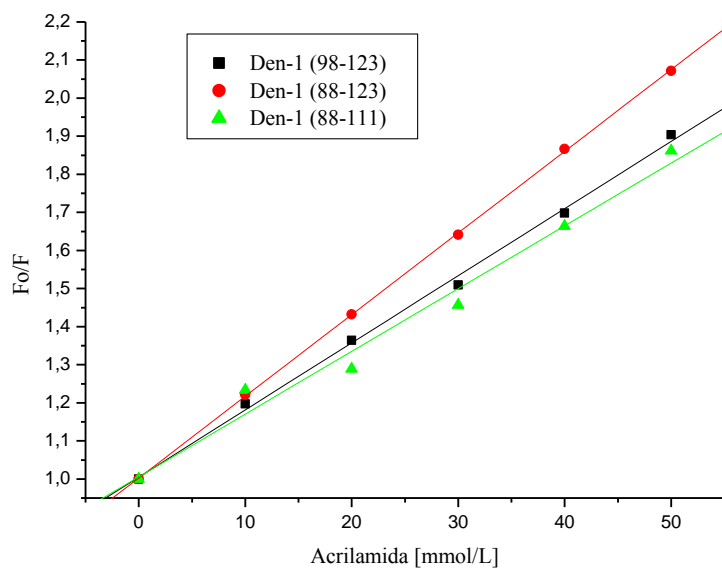


Figura 66 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 1 em solução aquosa pH 7,1. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

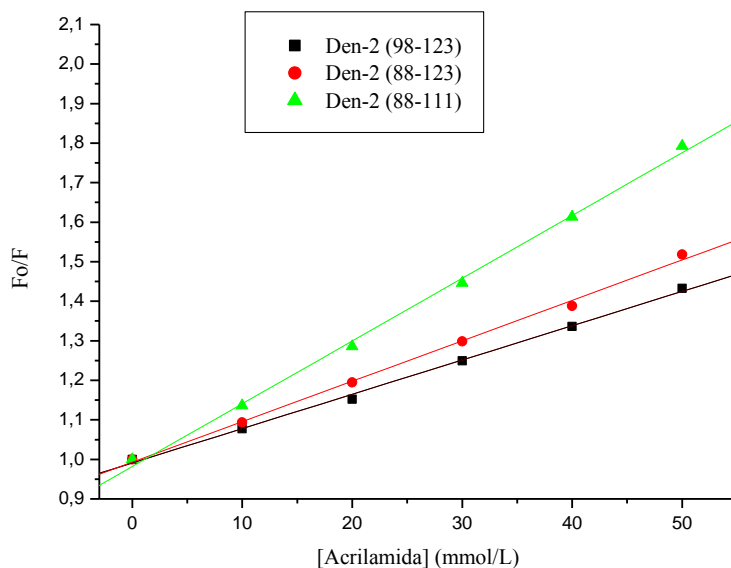


Figura 67 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 2 em solução aquosa pH 7,1. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

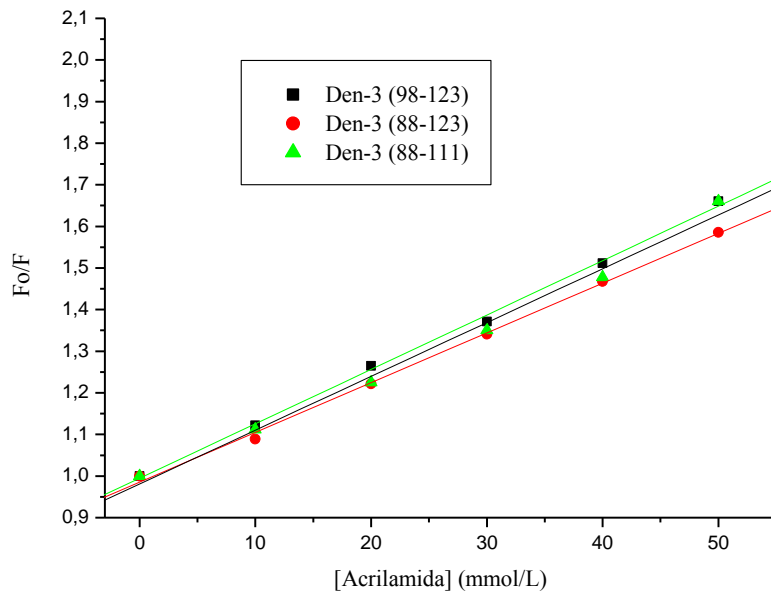


Figura 68 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 3 em solução aquosa pH 7,1. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

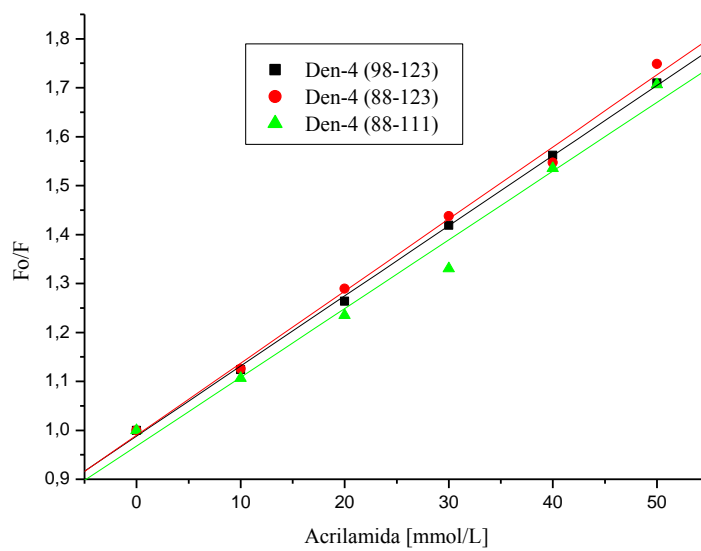


Figura 69 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 4 em solução aquosa pH 7,1. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

Tabela 10 - Valores de emissão de fluorescência do triptofano e das constantes de *Stern-Volmer* (Ksv) em solução e em LPC.

Peptídeos	Tampão Fosfato				
	$\lambda_{\max}$ solução (nm)	$\lambda_{\max}$ LPC (nm)	F/Fo	Ksv solução (mol/L) <sup>-1</sup>	Ksv LPC (mol/L) <sup>-1</sup>
Pept. Fusão-Ser	357	356	1,0	17,4	11,0
Pept. Fusão-Cys	355	354	1,1	17,0	12,0
Den-1 (98-123)	360	350	1,6	17,6	10,5
Den-1 (88-123)	356	348	1,4	21,4	8,2
Den-1 (88-111)	357	351	1,3	16,4	12,0
Den-2 (98-123)	359	349	1,8	15,8	8,6
Den-2 (88-123)	358	350	1,3	18,4	10,2
Den-2 (88-111)	360	358	0,8	18,9	15,8
Den-3 (98-123)	356	354	1,1	19,5	11,3
Den-3 (88-123)	356	352	1,0	20,7	11,2
Den-3 (88-111)	355	354	1,0	17,4	13,9
Den-4 (98-123)	358	354	1,0	21,0	14,3
Den-4 (88-123)	357	359	0,9	21,0	13,6
Den-4 (88-111)	358	355	1,0	20,0	14,0

Analisando os dados de  $\lambda_{\max}$  e de Ksv obtidos para os peptídeos oriundos do sorotipo 1 e 2 com os peptídeos do sorotipo 3 e 4, é possível verificar uma maior interação destes com as micelas de LPC.

Se compararmos os resultados obtidos aqui com os estudos realizados (CESPEDES *et al.*, 2009) na interação de peptídeos antimicrobianos com micelas de LPC, podemos observar maiores valores de Ksv para os peptídeos desse trabalho, indicando menor inserção dos peptídeos de fusão nas micelas. Estes resultados podem

indicar que os peptídeos correspondentes aos vírus da dengue estão localizados perto da superfície da micela.

Somado a isto, a menor atividade de induzir fusão dos peptídeos 3 e 4 podem estar relacionados com uma menor interação inicial com a membrana. Além disto, podemos observar que os peptídeos contendo a região anterior ao peptídeo de fusão apresentaram menor interação com as micelas (maiores valores de  $K_{sv}$ ). Estes dados estão condizentes com os obtidos na determinação da capacidade fusogênia (mistura lipídica).

Em tampão acetato

Os mesmos estudos de supressão da fluorescência pela acrilamida foram realizados em pH 5,5 para mimetizar um menor pH que o fisiológico e a condição que ocorre a fusão.

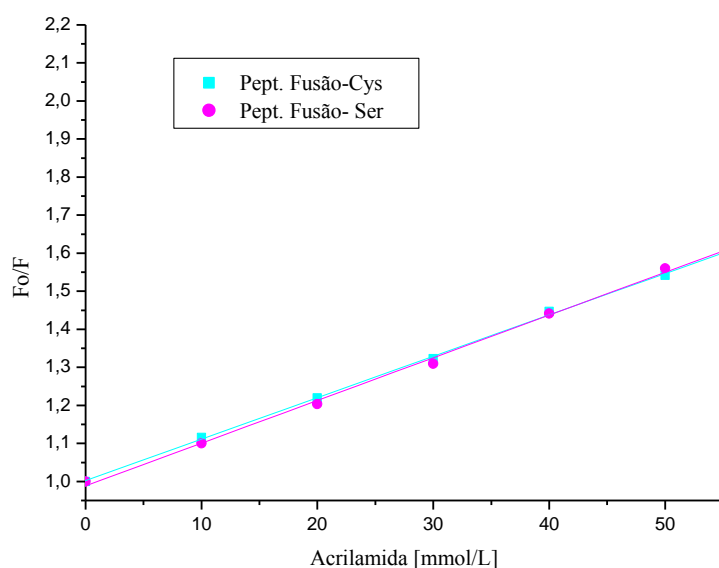


Figura 70 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos de fusão em tampão acetato. ( $F_0$ ) é a fluorescência inicial e ( $F$ ) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

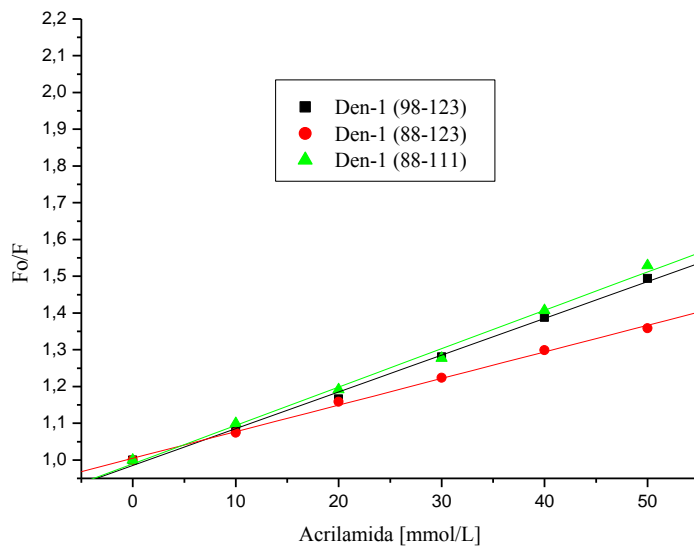


Figura 71 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 1 em tampão acetato. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

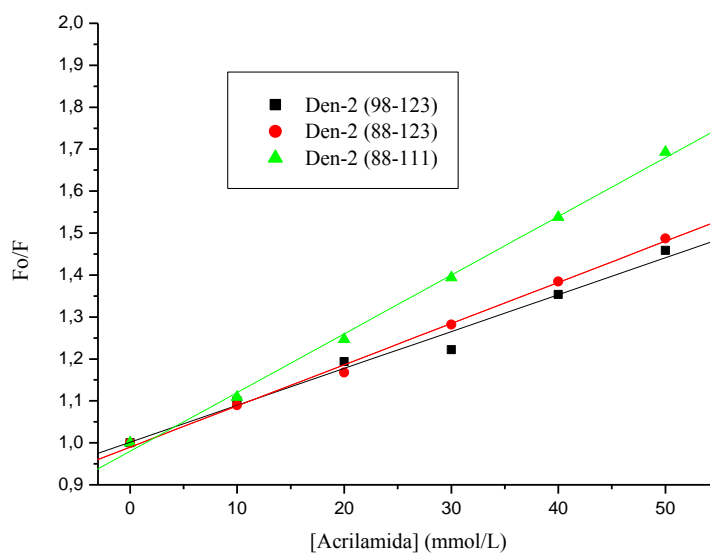


Figura 72 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 2 em tampão acetato. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

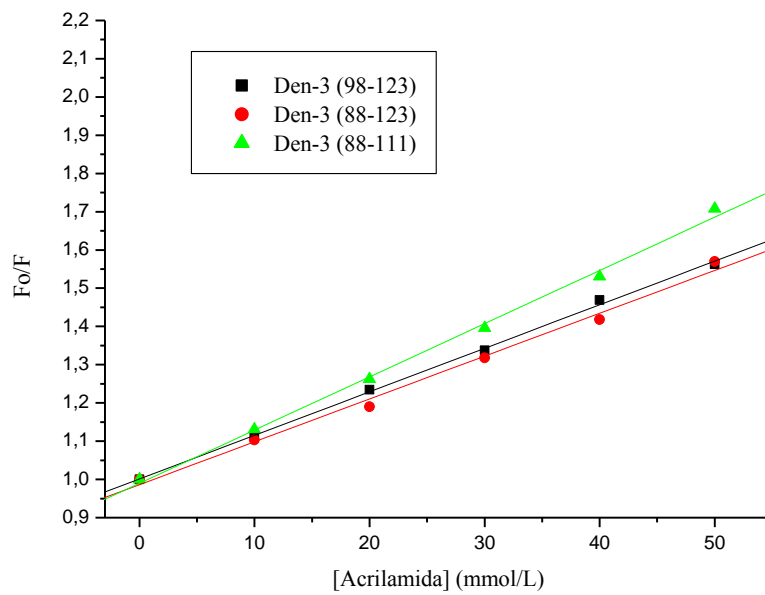


Figura 73 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 3 em tampão acetato. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

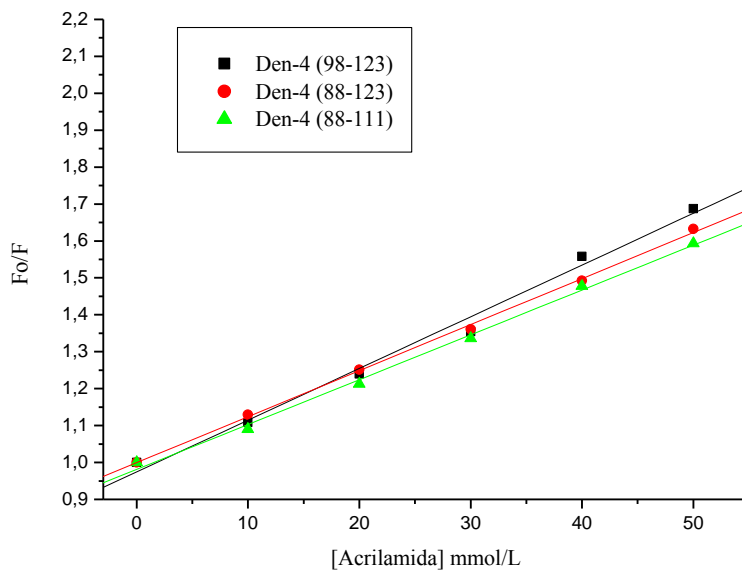


Figura 74 - Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos do sorotipo 4 em tampão acetato. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

Tabela 11 - Valores de emissão de fluorescência do triptofano e das constantes de *Stern-Volmer* (Ksv) no detergente LPC e em solução.

Peptídeos	Tampão acetato				
	$\lambda_{\max}$ solução (nm)	$\lambda_{\max}$ LPC (nm)	F/F <sub>0</sub>	Ksv solução (mol/L) <sup>-1</sup>	Ksv LPC (mol/L) <sup>-1</sup>
Pept. Fusão-Ser	359	357	1,1	14,0	11,0
Pept. Fusão-Cys	355	352	1,2	15,0	11,0
Den-1 (98-123)	357	347	1,8	19,6	9,9
Den-1 (88-123)	357	344	1,4	19,2	7,2
Den-1 (88-111)	357	348	1,2	16,5	10,4
Den-2 (98-123)	356	348	1,8	17,8	8,8
Den-2 (88-123)	357	349	1,3	19,8	9,8
Den-2 (88-111)	356	355	0,8	18,7	13,9
Den-3 (98-123)	359	354	1,3	20	13
Den-3 (88-123)	355	354	1,2	18	11
Den-3 (88-111)	359	355	1,1	19	13
Den-4 (98-123)	356	357	1,0	18	12,2
Den-4 (88-123)	357	357	1,0	18,2	12,4
Den-4 (88-111)	356	357	1,0	17	14,3

Os dados obtidos em pH 5,5 foram similares aos encontrados em pH fisiológico, isto é, os peptídeos do sorotipo 2 apresentaram maior interação que os do sorotipo 1, que por sua vez apresentou maior interação que os dos sorotipos 3 e 4.

Com exceção dos peptídeos provenientes dos sorotipos 3 e 4, as sequências contendo a região posterior ao peptídeo de fusão (113-123) mostraram maior imersão na membrana que o contendo somente a região anterior (88-97). Estes resultados são interessantes, pois mostraram contribuições diferentes para cada região que flanqueia o peptídeo de fusão. A região posterior induz maior interação com a membrana que a região anterior ao peptídeo de fusão.



## 4.5 Análise estrutural dos peptídeos

### 4.5.1 Dicroísmo Circular

Para avaliar a relação estrutura/função e as modificações que estes peptídeos sofrem ao interagir com modelos de membrana nos dois tampões utilizados, mudanças estruturais do peptídeo de fusão e dos peptídeos dos sorotipos da dengue 2 e 3 foram estudadas em solução e após a adição do mimético de membrana (LPC). Os dados mostrados nas figuras abaixo, 75 a 81, indicaram que os peptídeos não sofreram alterações na sua estrutura com a adição de micelas de LPC ou alterando-se o pH. Somado a isto, não apresentaram estrutura secundária definida.

Segundo Modis, na glicoproteína E, encontram-se três domínios, com dobras baseadas em grande parte em  $\beta$ -folha. O domínio II, que apresenta o peptídeo de fusão suporta um loop no seu topo com uma sequência conservada em todas as flaviviruses e estes resíduos hidrofóbicos são essenciais para sua atividade de fusão (MODIS *et al.*, 2004). Os três resíduos hidrofóbicos (Trp, Leu, Phe) no loop de fusão são conservados em todos os flaviviruses, sendo que os resíduos de glicina são completamente expostos na superfície molecular, durante o mecanismo de fusão (MODIS *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2010). As estruturas não foram encontradas nos espectros obtidos.

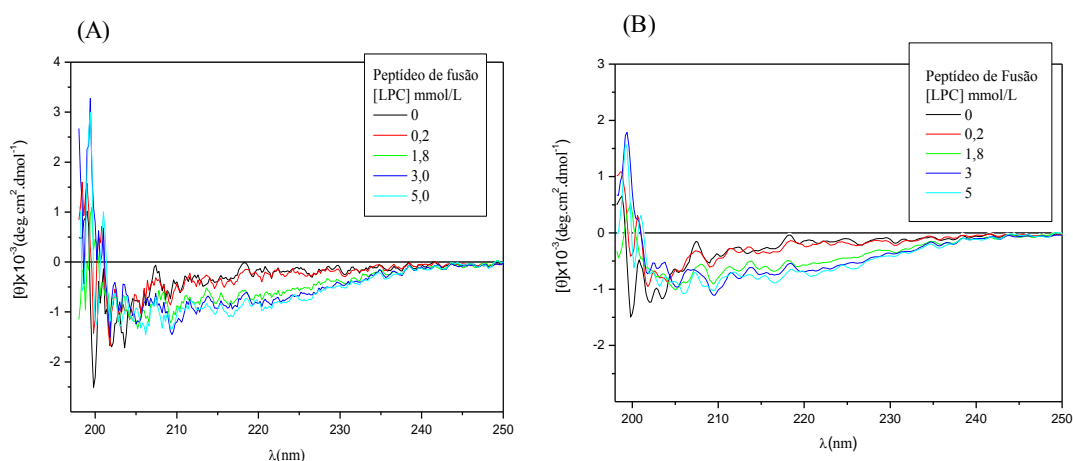


Figura 75 - Espectros de CD do peptídeo de fusão em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato.

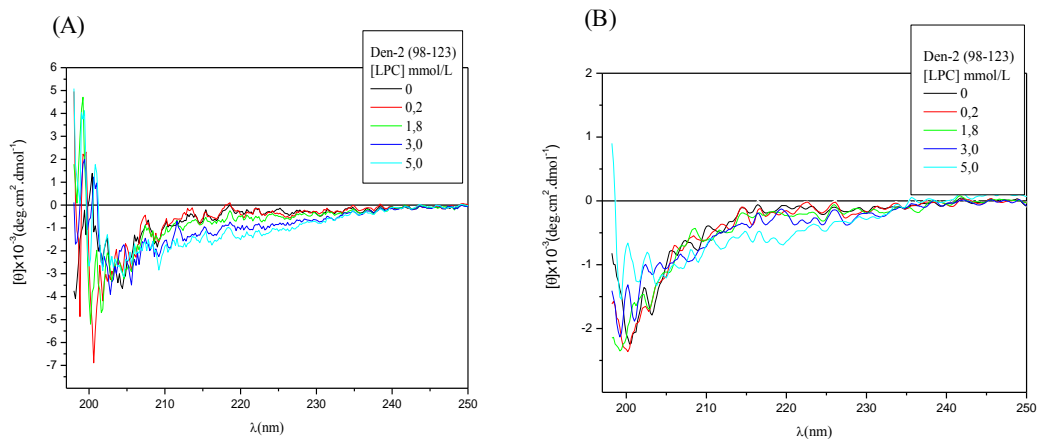


Figura 76 - Espectros de CD do peptídeo Den-2 (98-123) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato.

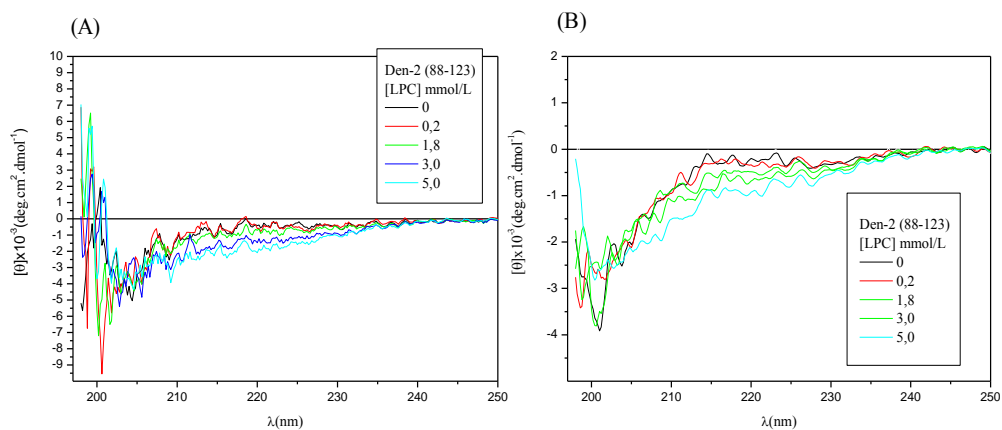


Figura 77 - Espectros de CD do peptídeo Den-2 (88-123) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato.

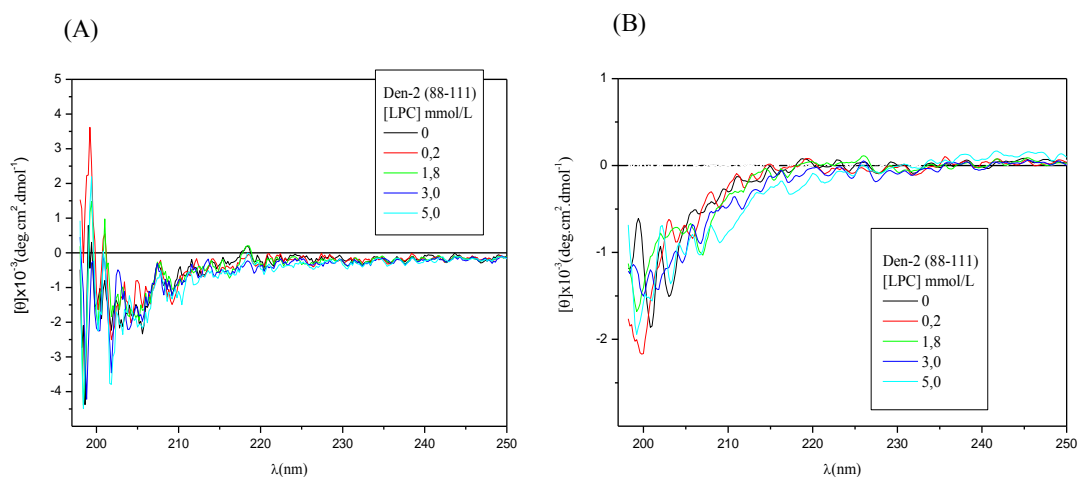


Figura 78 - Espectros de CD do peptídeo Den-2 (88-111) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato.

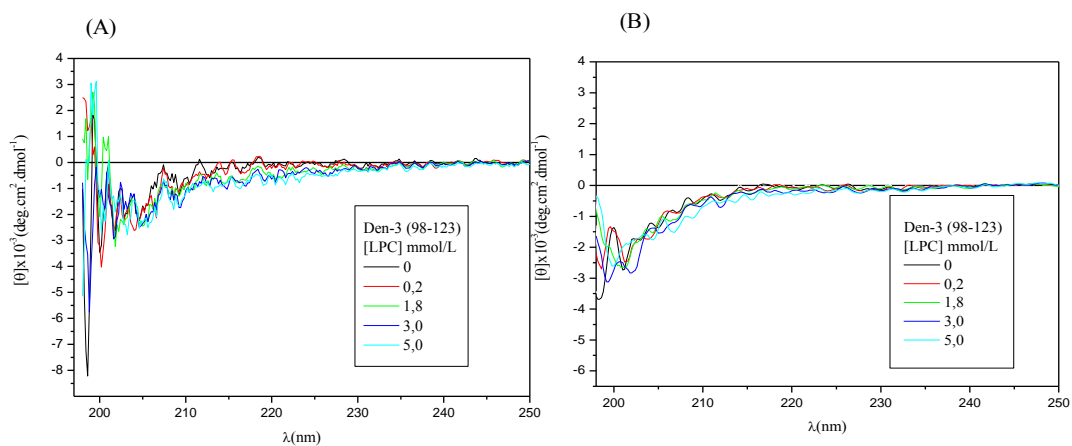


Figura 79 - Espectros de CD do peptídeo Den-3 (98-123) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato.

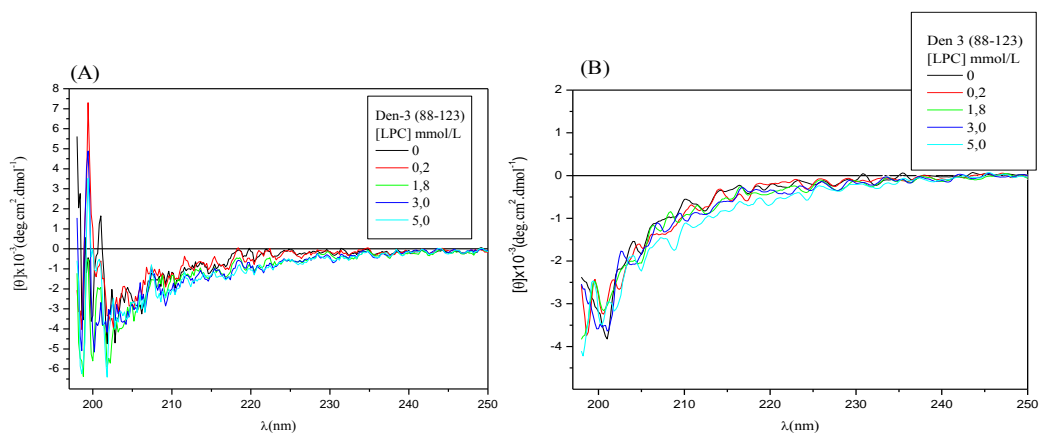


Figura 80 - Espectros de CD do peptídeo Den-3 (88-123) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato.

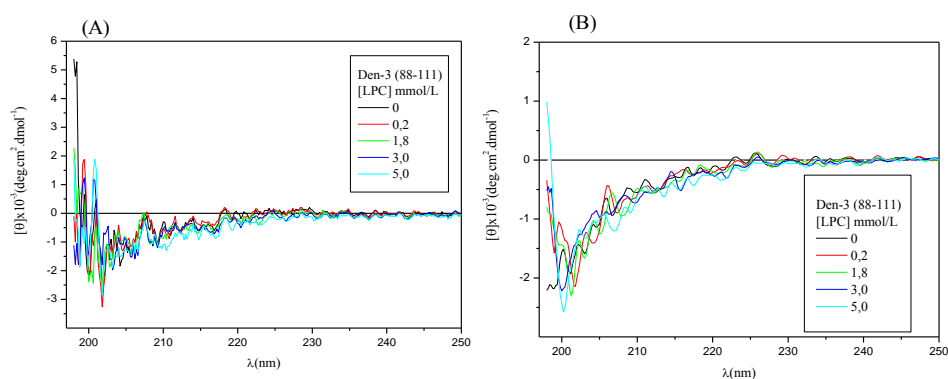


Figura 81 - Espectros de CD do peptídeo Den-3 (88-111) em: (A) tampão acetato e (B) tampão fosfato.

## 4.6 Monocamada de Langmuir

Atualmente, uma gama de estudos tem sido feito utilizando monocamadas de Langmuir no estudo de interações entre peptídeos e lipídeos (CASELI, *et al.*, 2005). Segundo Mcconnel, (McCONNEL, 1991), as monocamadas de fosfolipídeos são modelos de membrana bem definidos, o que desperta o interesse desta técnica.

Para investigar e obter mais dados sobre a interação peptídeo-membrana celular, monocamadas de Langmuir foram utilizadas, uma vez que, compreendem um modelo simples, mas bastante funcional (PHILLIPS; CHAPMAN, 1968), mimetizando “metade” da membrana celular. A grande vantagem da utilização destes sistemas se deve ao elevado controle da densidade, arquitetura e composição do filme que a técnica proporciona (MARSH, 1996; NOBRE *et al.*, 2010).

Os estudos de monocamada de Langmuir foram realizados para os peptídeos oriundos do sorotipo 2, devido à sua predominância biológica e às diferenças fusogênicas encontradas. As concentrações utilizadas dos peptídeos variaram de 0,75 a 3,0  $\mu\text{mol/L}$ . Verificou-se também o efeito do pH da subfase, e, para tal, os peptídeos foram estudados em tampão acetato (pH 5,5) e tampão fosfato (pH 7,1).

Inicialmente, foi investigada a atividade superficial dos peptídeos na interface água-ar, ou seja, na ausência de lipídeos. Posteriormente, avaliou-se a cinética de adsorção dos peptídeos em monocamadas de Langmuir de DPPC. Esse é um lipídeo zwitteriônico (dipolar) e um dos principais lipídeos presentes na constituição das membranas celulares. Após o equilíbrio de adsorção ter sido atingido, as monocamadas contendo o peptídeo foram comprimidas, de modo a obter as isotermas de pressão superficial *versus* área por molécula.

### 4.6.1 Interface Ar/Tampão Fosfato

A figura 82 traz os resultados da cinética de adsorção para todos os peptídeos estudados na interface líquido-ar em subfase de tampão fosfato. Utilizando como referência o peptídeo de fusão contendo cisteína (98-112), observou-se que a inserção dos aminoácidos correspondentes à região 88-97, ver peptídeo Den-2 (88-111), pouco

afetou a atividade superficial, visto que pouca diferença no valor de pressão superficial final foi observada. Entretanto, uma variação bastante significativa no valor de pressão superficial foi observada quando a região 113-123 foi inserida ao peptídeo de fusão, peptídeos Den-2 (98-123) e Den-2 (88-123). Pôde-se verificar que  $\Delta\pi$  foi cerca de três vezes maior que a obtida para o peptídeo de fusão. De forma bastante interessante, o resultado obtido para o peptídeo Den-2 (88-123), que possui as duas regiões que flanqueiam o peptídeo de fusão, foi similar ao Den-2 (98-123), sugerindo que a região 113-123 foi a responsável pela elevada atividade superficial do peptídeo. Estes resultados estão coerentes com os obtidos no estudo de interação em micelas, onde os peptídeos contendo a região posterior ao peptídeo de fusão mostraram maior interação com as micelas.

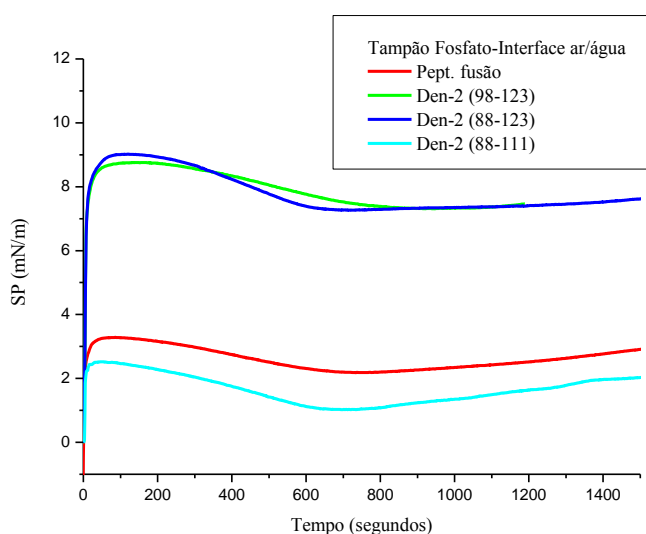


Figura 82 - Cinéticas de adsorção dos peptídeos estudados em tampão fosfato com concentração de aproximadamente 1,5  $\mu\text{mol/L}$ , na interface líquido-ar.

A adsorção de proteínas na interface ar/água é um fenômeno bem estudado (TRIPP, 1995). Sabe-se que muitos parâmetros podem afetar o processo de adsorção, dentre eles, a massa molar da proteína ou peptídeos, sua conformação e sua hidrofobicidade. No caso dos peptídeos estudados neste trabalho, a força motriz para o processo de adsorção na interface deve estar relacionada apenas com a diferença na hidrofobicidade ou carga destas moléculas. Entretanto, em função da distribuição dos

resíduos hidrofóbicos, alguns processos de dobramento podem tornar a relação hidrofobicidade/adsorção mais complexa. Os dados de cinética de adsorção foram correlacionados com a sequência primária dos peptídeos (tabela 9), onde pôde-se verificar que a região anterior (88 a 97) possui maior número de resíduos positivos (5) e menor número de resíduos hidrofóbicos (4) que a posterior (113 a 123) (4 e 5, respectivamente). Estas diferenças fazem com que a hidrofobicidade, quantificada pelo parâmetro denominado de média hidrofóbica - soma da hidrofobicidade de cada aminoácido dividido pelo número de aminoácidos -, seja maior para a região posterior que a anterior ao peptídeo de fusão. O valor obtido utilizando a escala de consenso geral (CCS - sítio <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>) (TOSSI *et al.*, 2002) para a região posterior ao peptídeo de fusão foi de -1,44 e para a região anterior de -1,94. Quanto mais negativo, mais polar é o peptídeo.

Posterior à cinética de adsorção, o sistema foi comprimido e o resultado das isotermas é apresentado na figura 83. As isotermas de pressão superficial mostraram que os sistemas atingiram elevados valores de pressão superficial, sugerindo que as moléculas de peptídeo permanecem na interface com a compressão do sistema. Além disso, o comportamento das isotermas de pressão superficial corroborou o resultado observado das cinéticas de adsorção, pois os peptídeos Den-2 (88-123) e Den-2 (98-123) apresentaram valores de pressão superficial maiores que os demais peptídeos para a mesma área da cuba. Este resultado indicou que uma maior quantidade desses peptídeos permanece na interface após a compressão, fato provavelmente relacionado à sua hidrofobicidade. Isto mostra a maior afinidade dos peptídeos contendo a região 113-123 (posterior ao peptídeo de fusão) pela interface. Estes resultados estão coerentes com os dados de interação com micelas e de capacidade de fusão apresentados anteriormente.

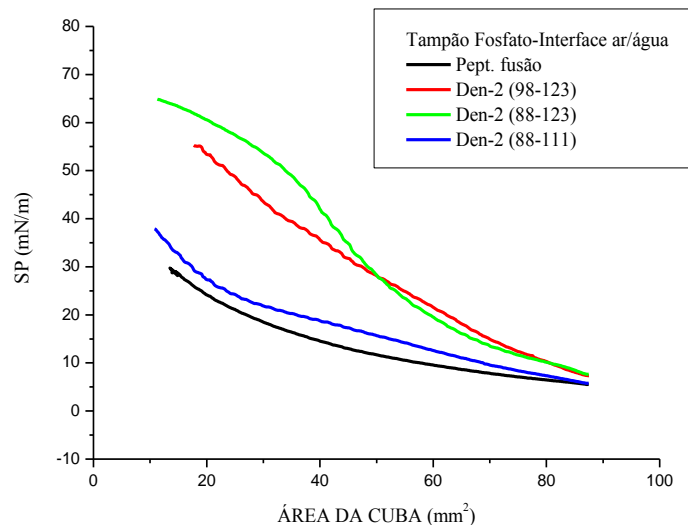


Figura 83 - Isothermas de pressão superficial versus área da cuba para os peptídeos em subfase de tampão fosfato com concentração de aproximadamente 1,5  $\mu\text{mol/L}$ .

#### 4.6.2 Interação dos Peptídeos em Monocamadas de DPPC em Tampão Fosfato

Após o estudo da atividade superficial dos peptídeos, a interação destes com a membrana foi estudada por meio da formação de filmes de Langmuir do lipídeo DPPC e a injeção dos peptídeos na subfase. Para tal, utilizou-se um procedimento semelhante ao descrito anteriormente, sendo que o peptídeo foi injetado depois da adição do lipídeo a interface. As cinéticas de adsorção foram realizadas com a monocamada em baixo empacotamento lipídico (aproximadamente  $130 \text{ \AA}^2$ ) e pressão superficial próximo de zero.

A figura 84 traz o resultado de cinética de adsorção para o peptídeo de fusão (resíduos de 98-112), em diferentes concentrações.

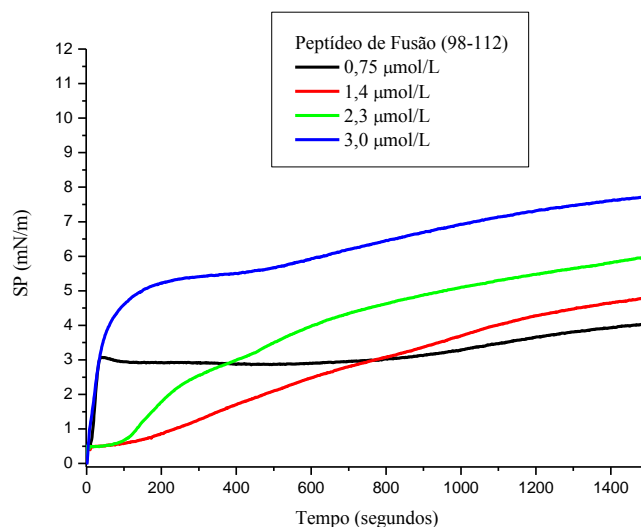


Figura 84 - Cinéticas de adsorção do peptídeo de fusão (98-112) em monocamadas de Langmuir de DPPC.

Os resultados mostraram que ocorre uma interação entre o peptídeo de fusão e a monocamada lipídica e que esta é dependente da concentração. Além disto, os resultados indicaram que o peptídeo precisa de um tempo para se acomodar na monocamada, principalmente em altas concentrações. Estes dados podem indicar uma agregação inicial entre as cadeias peptídicas, dificultando a sua interação com a monocamada.

A figura 85 traz as isotermas de pressão superficial para as monocamadas, depois do equilíbrio de adsorção ter sido atingido. Para o DPPC puro, uma transição de fase da primeira ordem de líquido-expandido (LE) para líquido-condensado (LC) verificada pelo platô a aproximadamente 5 mN/m e o colapso em  $\sim 70$  mN/m são coerentes com os dados obtidos por Pérez- López (PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2009). Nota-se, ainda, um ligeiro deslocamento para maiores valores de área por molécula, indicando a incorporação do peptídeo. Vale ressaltar que, o patamar correspondente à região de coexistência de fases líquido-expandido/líquido-condensado, característica para a isoterma de DPPC em água está pouco evidenciada na figura em função do tampão fosfato na subfase. Este patamar não é observado na monocamada contendo peptídeo na subfase, sugerindo que a presença desta biomolécula afeta o empacotamento, favorecendo estados mais fluidos.



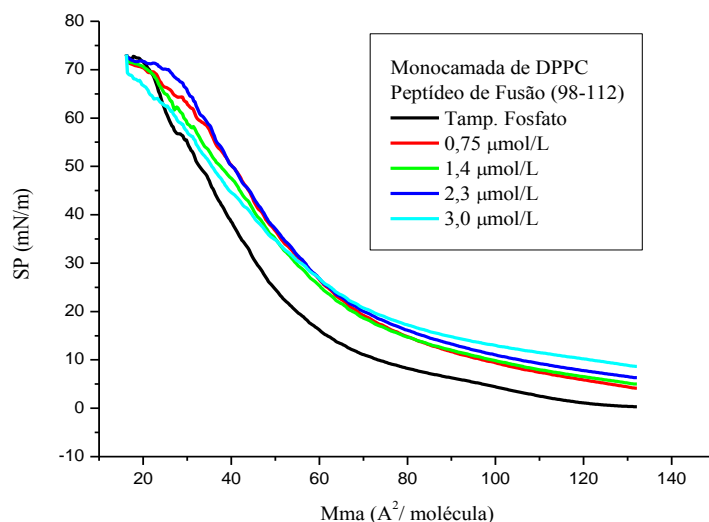


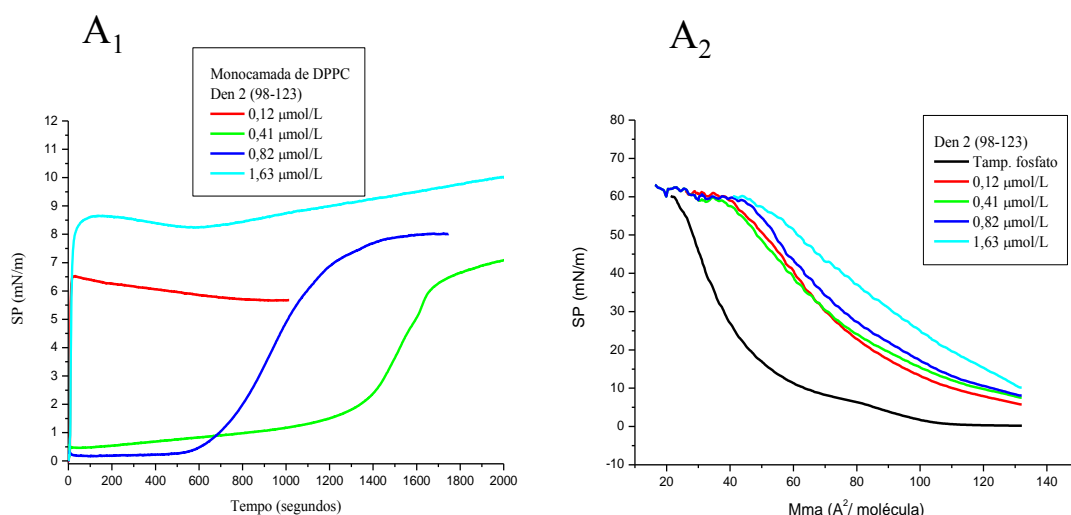
Figura 85 - Isoterma de pressão superficial versus área por molécula para monocamadas de DPPC em diferentes concentrações do peptídeo de fusão (98-112).

Os resultados obtidos para os outros peptídeos estão apresentados na figura 86. A cinética de adsorção do peptídeo Den-2 (98-123) mostra que, assim como o resultado obtido na interface líquido-ar, este peptídeo também provoca maiores variações no valor de pressão superficial (comparado ao peptídeo de fusão) na presença da monocamada lipídica. Quanto maior a concentração do peptídeo, maior a variação da pressão superficial, indicando que, na faixa de concentração estudada, não há agregação do peptídeo na subfase. Quando o perfil obtido na figura 86A<sub>1</sub> é comparado com a cinética de adsorção do peptídeo Den-2 (98-123) (figura 82) na ausência de lipídeos, pode-se concluir que, também, neste caso a adsorção do peptídeo é um processo cooperativo, que envolve a exposição das regiões hidrofóbicas do peptídeo e sua interação com o lipídeo na interface.

A cinética de adsorção do peptídeo Den-2 (88-123) (figura 86B<sub>1</sub>) na monocamada lipídica, que na interface líquido-ar apresentava perfil muito similar ao do peptídeo Den-2 (98-123), apresentou diferenças. Este comportamento sugere que a região (88-97), que pareceu não contribuir significativamente para a atividade superficial do peptídeo, tem papel importante na interação com o lipídeo, provavelmente com a cabeça polar do mesmo. Entretanto, para a maior concentração

estudada, o valor de pressão superficial final é menor do que de concentrações inferiores, provavelmente devido a não estabilização do sistema no tempo avaliado.

Finalmente, para o peptídeo Den-2 (88-111), nota-se claramente uma menor adsorção à monocamada lipídica (figura 86C<sub>1</sub>), visto os valores de  $\Delta\pi$  em torno de 4mN/m. Nota-se, entretanto, um aumento da quantidade de peptídeo na interface com o aumento da concentração, o que leva à conclusão de que o peptídeo tem interação com a monocamada lipídica. Considerando todos os resultados obtidos até então, pôde-se verificar que existe uma cooperatividade na interação dos peptídeos com a membrana, e que o papel de cada região nesta interação possa estar se elucidado. No caso da região 113-123, temos a interação predominante do tipo hidrofóbica, que facilitaria a penetração do peptídeo na membrana. Já no caso da região anterior (88-97), a interação com a membrana é menor, e parece ter mais caráter eletrostático.



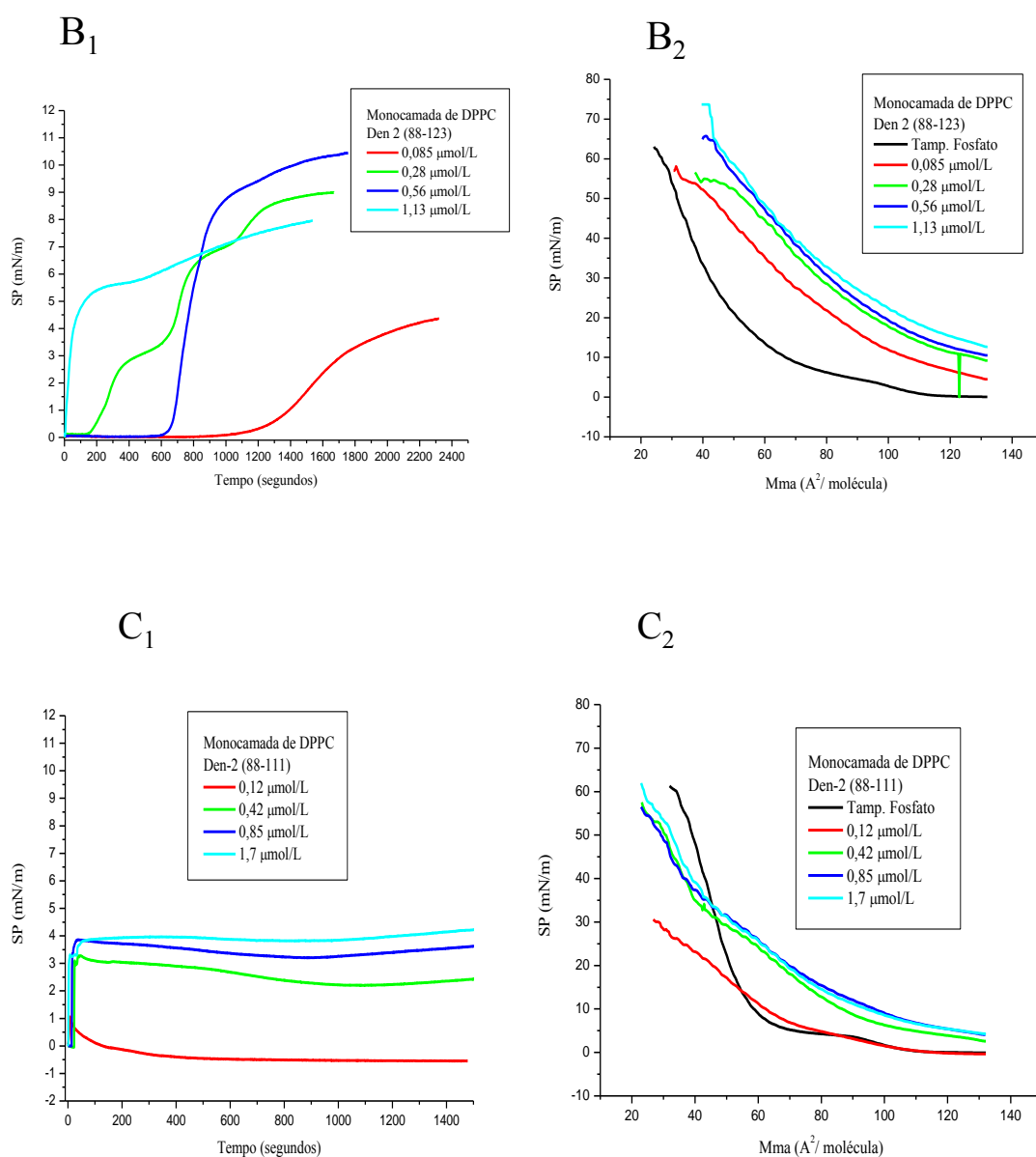


Figura 86 - Cinéticas de adsorção e isothermas de pressão superficial versus área por molécula para monocamadas de DPPC em diferentes concentrações dos peptídeos: (A) Den-2 (98-123); (B) Den-2 (88-123) e (C) Den-2 (88-111).

Avaliando o perfil das isothermas de pressão superficial (figura 86) e tendo como referência o comportamento do peptídeo de fusão, temos que ambos Den-2 (98-123) quanto, Den-2 (88-123) deslocam o colapso da monocamada para elevados valores de área por molécula, de  $\sim 20 \text{ \AA}^2$  para  $\sim 40 \text{ \AA}^2$ . Este deslocamento para maiores valores de área por molécula indica que o peptídeo afetou o empacotamento lipídico, sugerindo sua

incorporação na monocamada. Importante destacar que este deslocamento mostra que o peptídeo permanece na interface, mesmo após a compressão, indicando sua forte interação com o filme. Este mesmo comportamento foi encontrado para o peptídeo (E2C279-298) em DMPC (LÁRIOS, *et al.*, 2006). Já o peptídeo Den-2 (88-111) apresentou comportamento muito distinto, visto que em  $\sim 30 \text{ mN/m}^{-1}$ , estado que mimetiza o valor da pressão da membrana biológica (MARSH, 1996), a isoterma de pressão superficial atinge valores de área por molécula similares ao peptídeo de fusão, indicando que o peptídeo é expulso da interface para o interior da solução. Entretanto, o fato da isoterma mostrar valores de área por moléculas menores que aquelas obtidas para o lipídeo puro pode ser um indicativo de que moléculas de DPPC podem também estar se solubilizando. Isto indicaria uma interação deste peptídeo com a monocamada. Tal interação também explicaria as diferenças encontradas nas curvas dos peptídeos Den-2 (88-123) e Den-2 (98-123). O primeiro teria a interação hidrofóbica formada pela região posterior ao peptídeo de fusão (113-123) e uma eletrostática entre as cabeças dos lipídeos e a região anterior (88-97).

#### 4.6.3 Interface Ar/Tampão Acetato

Como a fusão do vírus da dengue é promovida em pH mais baixo que o fisiológico, realizamos os mesmos estudos acima em pH acetato pH 5,5, que mimetiza o pH do endossoma. Como a adsorção de proteínas em moléculas lipídicas ocorre, também, devido as interações eletrostáticas, (DOL *et al.*, 2001), e estas se alteram com o pH, a variação do pH poderia afetar a carga do peptídeo e a interação com as monocamadas.

A partir da figura 86, nota-se que a cinética de adsorção dos peptídeos foi alterada significativamente em função do pH da subfase. Em tampão acetato, todos os peptídeos apresentaram diminuição significativa de sua atividade superficial quando comparados os valores obtidos em tampão fosfato, sendo que o peptídeo Den-2 (88-111) sequer apresentou adsorção na interface líquido-ar. A diminuição do pH pode estar causando a protonação dos resíduos de Histidina ( $pK_r = 6,0$ ) e de Aspartato ( $pK_r = 3,65$ ), diminuindo a hidrofobicidade dos peptídeos e a sua adsorção na interface líquido-ar. Ressaltamos que, a presença de cargas negativas próximas a estes resíduos pode

causar um aumento do pK<sub>r</sub> da Histidina e do pK<sub>r</sub> Aspartato. O peptídeo Den-2 (88-111), por possuir os dois resíduos, foi o que mais sofreu a influência da carga e apresentou a menor adsorção. O peptídeo Den-2 (88-123) também apresenta os dois resíduos, mas pelo fato de apresentar maior tamanho, teve este efeito minimizado.

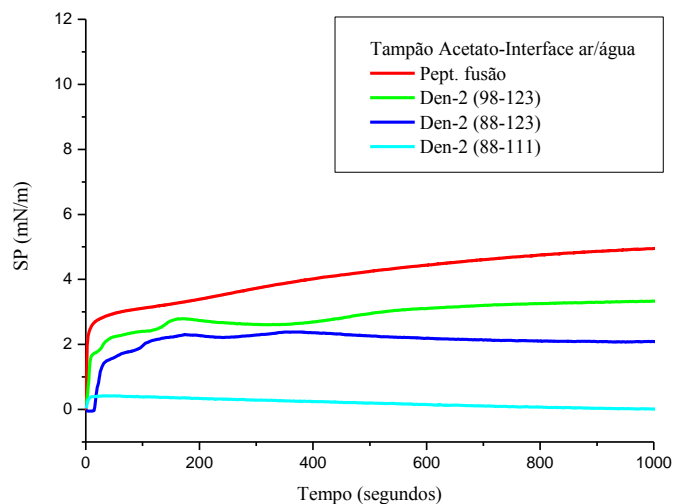


Figura 87 - Cinéticas de adsorção dos peptídeos estudados em tampão acetato, na interface líquido-ar.

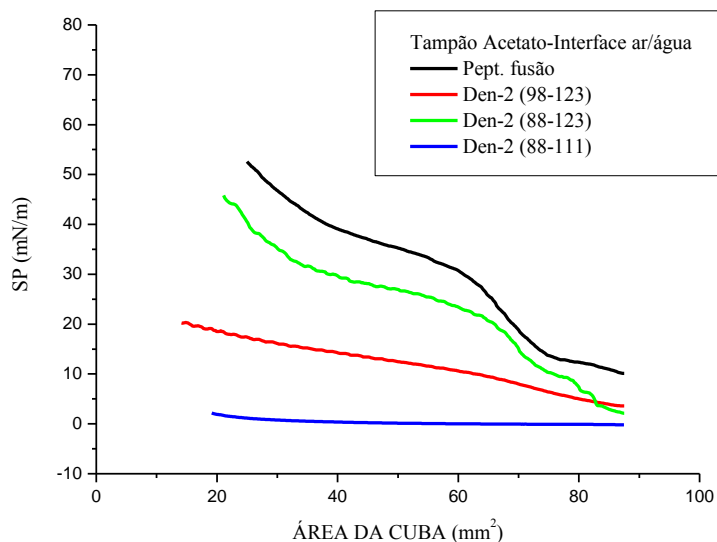


Figura 88 - Isoterma de pressão superficial *versus* área da cuba para os peptídeos em subfase de tampão acetato.

O comportamento das isotermas de pressão superficial mostra que, com exceção do peptídeo de fusão, todos os outros sistemas foram menos compressíveis que em pH 7,1, visto os menores valores de pressão superficial de colapso. Estes resultados indicaram menor interação com a interface em relação ao tampão fosfato.

#### 4.6.4 Interação dos Peptídeos em Monocamada de DPPC em Tampão Acetato

Também na presença da monocamada lipídica em baixo empacotamento lipídico, é possível notar que, o peptídeo de fusão apresentou menor adsorção ao filme comparado ao observado em tampão fosfato, visto os menores valores de  $\Delta\pi$ .

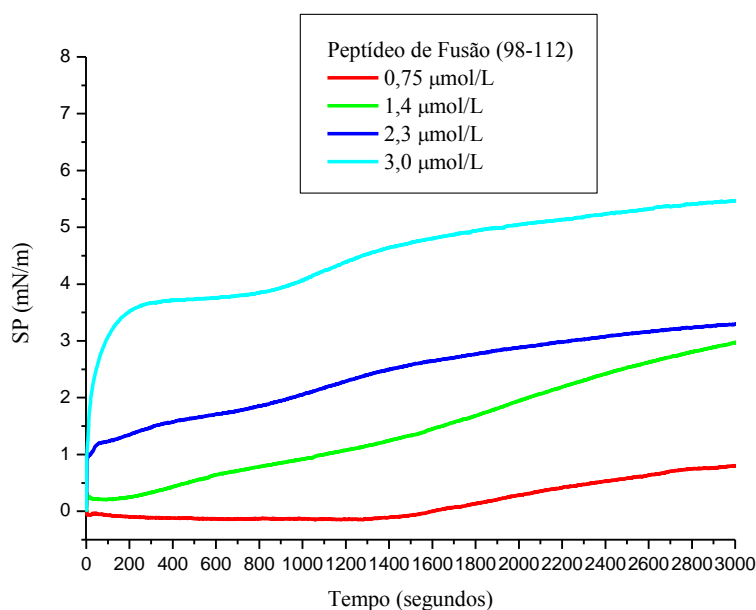


Figura 89 - Cinéticas de adsorção do peptídeo de fusão em monocamadas de DPPC em baixo empacotamento lipídico.

Comparando os resultados observados na figura 90 e na figura 85, nota-se uma semelhança no perfil das isotermas obtidas nos dois valores de pH. No entanto, em pH 5,5, conforme maior a concentração do peptídeo de fusão na subfase, a curva passa a ocupar menores valores de área por molécula em função da compressão, comparado com as curvas de menor concentração. Este comportamento pode sugerir que com o aumento da compressão, uma parte das moléculas de peptídeo esteja se solubilizando na subfase, por estar em excesso na interface.

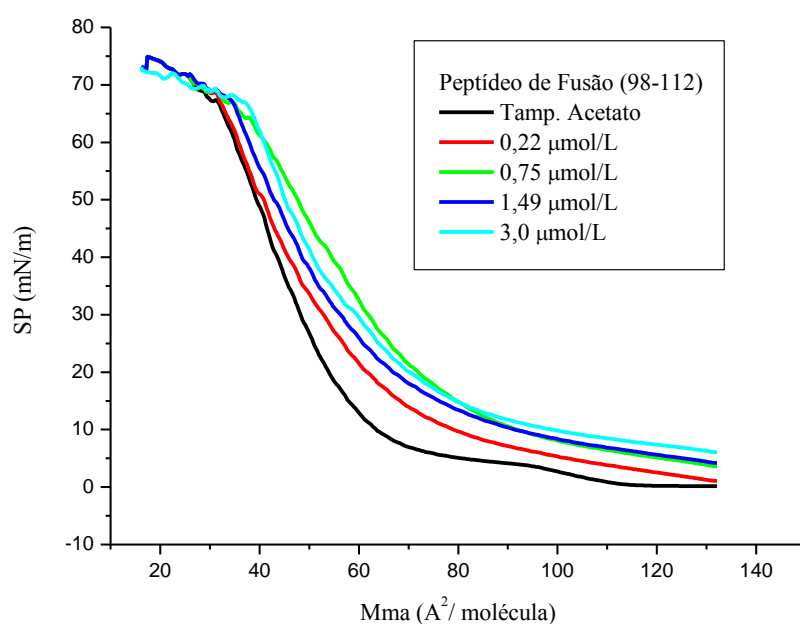
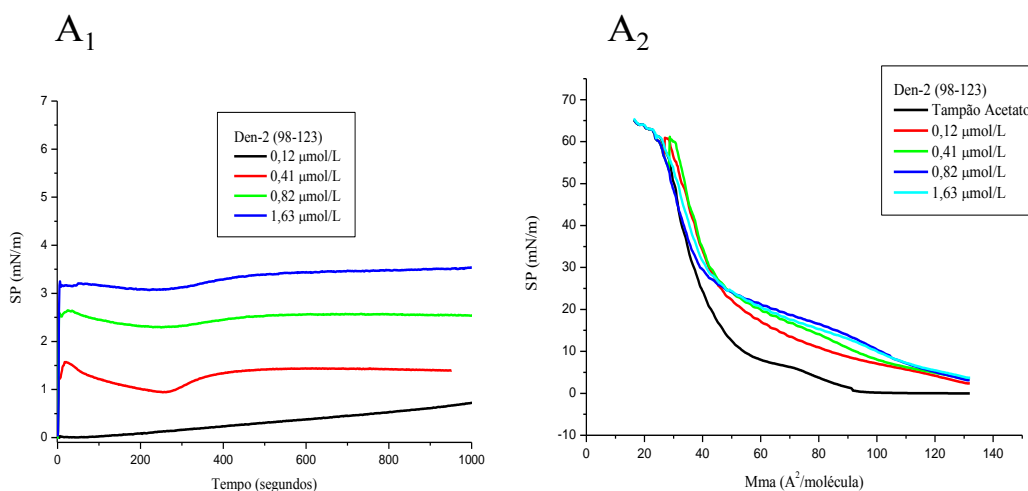


Figura 90 - Isotermas de pressão superficial versus área por molécula para monocamadas de DPPC em diferentes concentrações do peptídeo de fusão (98-112) em tampão acetato.

Avaliando as curvas obtidas para os outros peptídeos e comparando-os com o comportamento do peptídeo de fusão, algumas importantes observações devem ser pontuadas. As curvas de cinética de adsorção indicaram que todos os peptídeos apresentaram menor adsorção (menor pressão superficial) no filme lipídico, quando comparada à monocamada de DPPC em tampão fosfato. Para os peptídeos Den-2 (98-123) e Den-2 (88-123), pôde-se observar que a isoterma de pressão superficial apresenta

a formação de um platô a altas pressões superficiais. Este platô é mais evidente para monocamadas formadas com o peptídeo Den-2 (98-123). Já o peptídeo Den-2 (88-111) parece não apresentar interação significativa com a monocamada lipídica. O aparecimento do patamar nas curvas dos peptídeos Den-2 (98-123) e Den-2 (88-123) sugere que, conforme a compressão da monocamada, o peptídeo incorporado ao filme lipídico sofre um rearranjo em sua configuração na interface, de modo a ocupar menor área por molécula, mas permanece junto à monocamada lipídica na interface. Esses dois peptídeos apresentam em comum a região (113-123) que é mais hidrofóbica (tabela 9) que a (88-97). Estes dados mostraram que a região posterior ao peptídeo de fusão é fundamental para a interação com a membrana. No entanto, a região anterior (88-97) também contribui, apesar de menor intensidade, para a inserção do peptídeo na monocamada lipídica. Casas (CASAS *et al.*, 2006), em seu artigo que relata os estudos sobre um peptídeo de fusão do vírus da hepatite G, afirma que a hidrofobicidade é importante para a interação com a estrutura lipídica, o que produziria um efeito de desorganização.





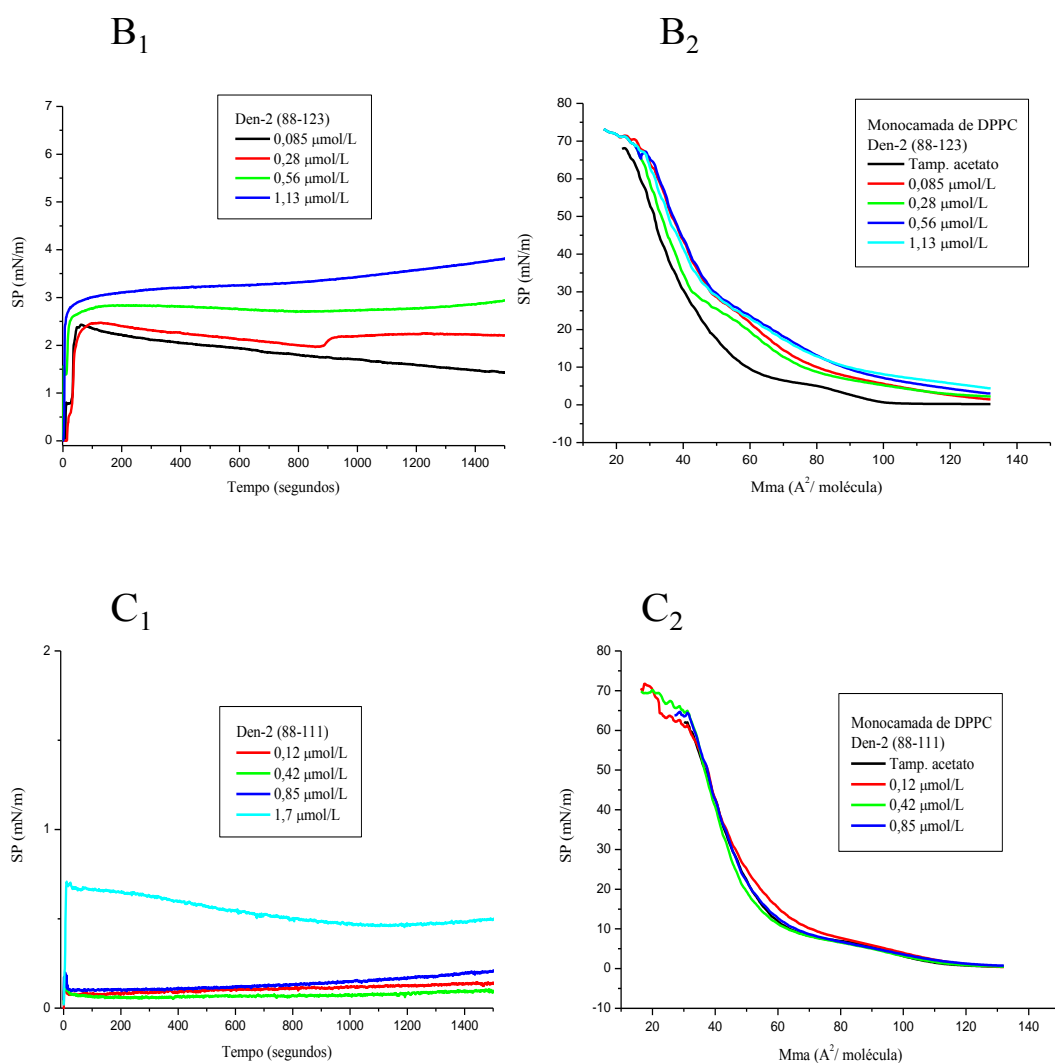


Figura 91 - Cinéticas de adsorção e isothermas de pressão superficial versus área por molécula para monocamadas de DPPC e diferentes concentrações em tampão acetato. (A) Den-2 (98-123); (B) Den-2 (88-123); (C) Den-2 (88-111).

Avaliando as isothermas em tampão acetato (figura 91) para os peptídeos Den-2 (98-123) e Den-2 (88-123), podemos verificar que com o aumento da compressão os peptídeos são expelidos da monocamada, apresentando área de colapso semelhante à monocamada, contendo somente o lipídeo DPPC. Este resultado é diferente do obtido para o tampão fosfato (figura 86). Em pH 7,1, os peptídeos ainda ficaram retidos na monocamada na pressão de colapso. Estes resultados indicaram uma diferença de afinidade pela monocamada, dependendo do pH utilizado. Em pH próximo ao

fisiológico, o peptídeo contendo a região posterior possui maior afinidade pela membrana, sendo que em pH mais ácido ocorre a diminuição da afinidade, o que poderia permitir a mudança conformacional da proteína. Estes dados mostram novamente, uma mudança de afinidade que pode estar relacionada à mudança conformacional da proteína.

Para melhor avaliar o efeito dos peptídeos sobre a organização da monocamada lipídica, a morfologia dos filmes de DPPC foi avaliada pela técnica de microscopia no ângulo de Brewster (McCONLOGUE; VANDERLICK, 1997; LAWRIE *et al.*, 2000).

## 4.7 **M**icroscopia no Ângulo de Brewster (BAM)

### 4.7.1 **M**onocamada de DPPC

O uso da técnica de BAM tem sido utilizada no estudos de peptídeos de fusão, por exemplo, do HIV-1 (TAYLOR, *et al.*, 2000).

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada no estudo dos peptídeos provenientes do sorotipo 2 da dengue.

A compressão da monocamada lipídica forma domínios que podem variar em função da velocidade de compressão, da densidade superficial e do lipídeo utilizado, podendo trazer importantes informações a respeito da organização lateral e textura do filme.

A literatura descreve que a monocamada de DPPC, quando comprimida, forma inicialmente domínios nucleados, sendo que com o aumento da compressão ocorre a formação de domínios semelhantes a grãos de feijão (*bean-like shapes*), passando para a um formato de “S”, até atingir o formato multi-lobos (três ou quatro braços curvados) (KOUZAYHA; BESSON, 2005; KOUZAYHA *et al.*, 2009; MATAR; BESSON, 2010), formando, por fim, uma superfície totalmente condensada.

## A) Tampão Fosfato

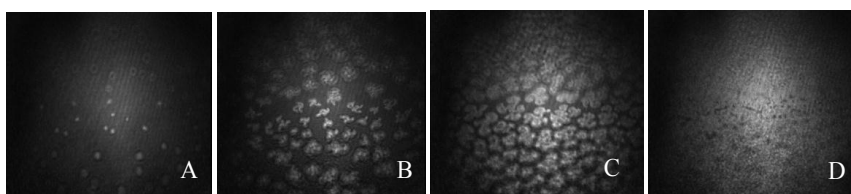
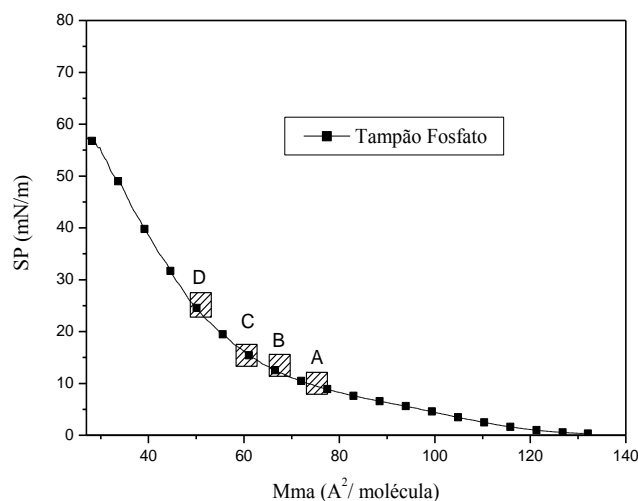


Figura 92 - Isoterma em monocamadas de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondentes a diferentes pressões de superfície: (A) 9,5 mN/m, (B) 11,4 mN/m, (C) 12 mN/m e (D) 18 mN/m.

As imagens de BAM obtidas para a monocamada de DPPC, mostraram resultados similares aos obtidos por Matar (MATAR; BESSON, 2010). A figura 92 mostra a morfologia da monocamada durante a compressão. A imagem 92A mostrou a formação de pequenos domínios (nucleados), que apresentaram formato esférico. Já na imagem 92B, foi possível verificar maior quantidade de domínios, que apresentam um formato semelhante a uma flor. Esses domínios passam a ser maiores, no formato multi-lobos ou “cata-vento”, e em maior quantidade na imagem 92C (12mN/m), sendo que na imagem 92D, vemos os domínios coalescendo, mostrando que a monocamada encontra-se totalmente no estado condensado. Micrografias no ângulo de Brewster para DPPC, reportadas na literatura (PIRES, 2008; NOBRE *et al.*, 2010) geralmente mostram domínios de DPPC com formato semelhante ao de feijão. A diferença de morfologia existente ao encontrado em nosso trabalho e em alguns da literatura pode ser atribuída às diferentes condições e/ou composição do meio, tais como, pH e força iônica.

Para avaliar o efeito do peptídeo de fusão na morfologia da monocamada lipídica, inicialmente, micrografias foram obtidas durante a cinética de adsorção do peptídeo de fusão à monocamada lipídica com baixo empacotamento.

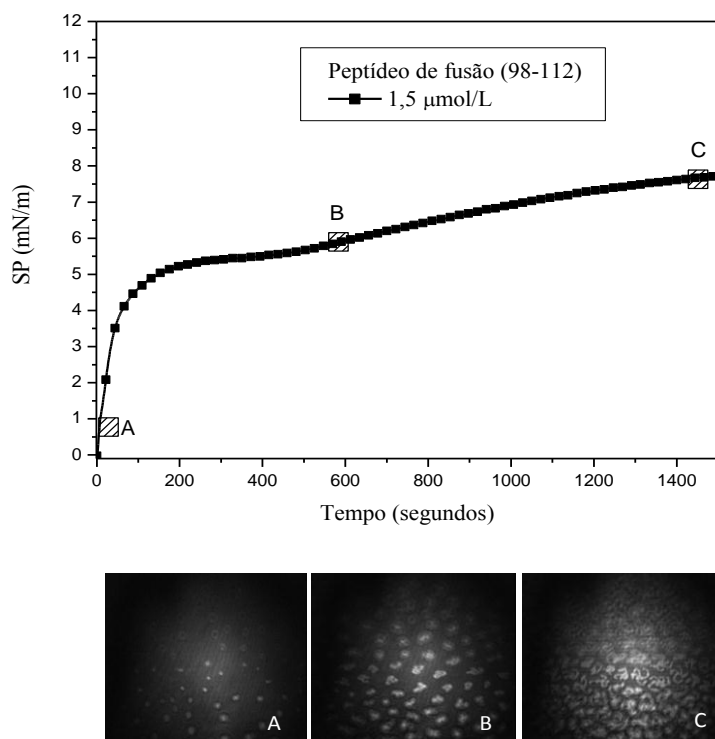


Figura 93 - Cinéticas de adsorção para peptídeo de fusão (98-112) em monocamadas de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 1 mN/m, (B) 5,5 mN/m e (C) 7,5 mN/m.

A partir da figura 93, pôde-se verificar que pequenos domínios esféricos começam a formar-se logo após a injeção do peptídeo na subfase (nucleados). Após 600 segundos, foi possível verificar a formação de domínios do tipo feijão, sendo que, próximo do equilíbrio de adsorção, os domínios apresentaram um formato que se assemelhou ao de uma flor, mas com algumas distorções, os quais foram denominados “cata-ventos”.

Após o equilíbrio de adsorção, a monocamada foi comprimida e a figura 94 traz os resultados da morfologia do sistema. A imagem 94A mostrou que os domínios ainda apresentaram o formato “cata-vento”, porém, encontraram-se mais próximos, provavelmente, devido à pequena compressão. Nas imagens 94B e 94C, nota-se a coalescência dos domínios, e na imagem 94D, a monocamada encontra-se totalmente condensada.

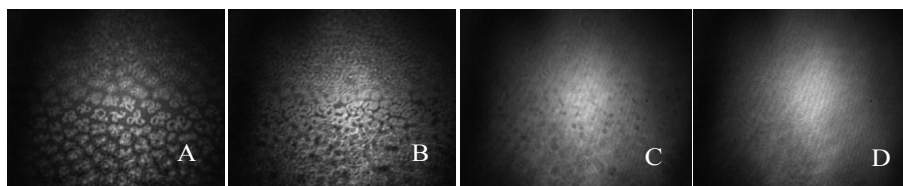
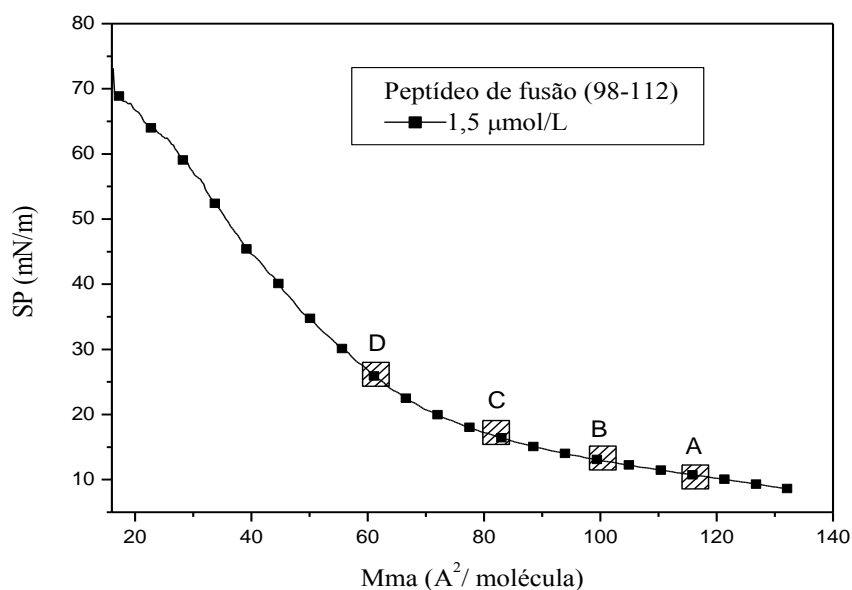


Figura 94 - Isoterma para Peptídeo de fusão (98-112) em monocamada de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressão de superfície: (A) 10 mN/m, (B) 13 mN/m, (C) 16 mN/m e (D) 26 mN/m.

De forma geral, as imagens mostraram que a morfologia da monocamada foi alterada pela presença do peptídeo (SANCHEZ-MARTÍN *et al.*, 2010), sendo que a fase condensada ocorreu em menores valores de pressão superficial na presença do peptídeo, em comparação com o DPPC sozinho. Este comportamento indicou que a incorporação do peptídeo de fusão favoreceu a interação entre as moléculas lipídicas, possibilitando a fusão da membrana, fato que corrobora com a sua ação esperada *in vivo*.

As micrografias obtidas para o peptídeo Den-2 (98-123) incorporado à monocamada de Langmuir (figuras 95 e 96), mostraram que este peptídeo promoveu a formação de um filme uniforme, onde as moléculas do lipídeo encontraram-se em um único estado. Essa compactação da monocamada pode ser vista antes da compressão da mesma, nas imagens obtidas durante a cinética de adsorção (figura 96B). Comportamento idêntico foi observado para a interação do peptídeo Den-2 (88-123) com a monocamada lipídica (figuras 97 e 98), visto que não houve a formação de domínios, sugerindo que a monocamada encontra-se uniforme. Estes resultados, somados aos obtidos por meio das curvas de cinética de adsorção e isoterma de pressão superficial, sugerem que os resíduos adicionais posteriores ao peptídeo de fusão (113-123) exercem um papel importante na interação do peptídeo de fusão com a monocamada. Entretanto, até o presente momento, não é possível afirmar se esta região é capaz de promover a fusão da membrana, ou se apenas apresenta papel de facilitadora da ancoragem do peptídeo de fusão.

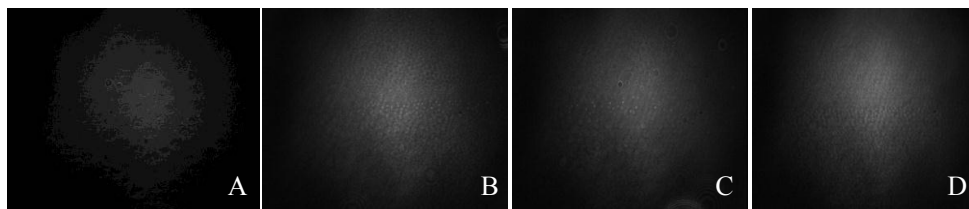
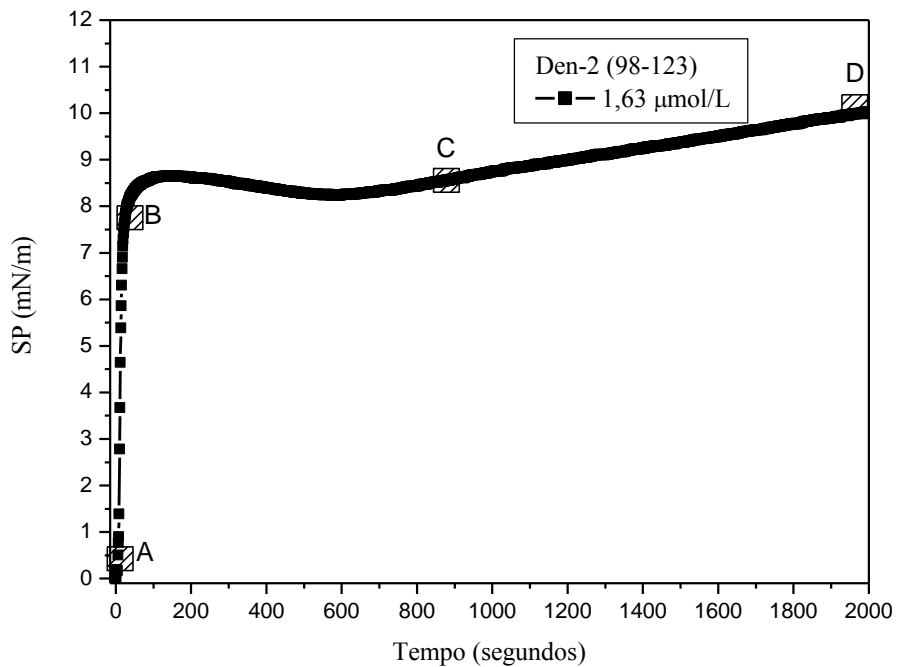


Figura 95 - Cinéticas de adsorção para Den-2 (98-123) em monocamadas de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 0,5 mN/m, (B) 7,8 mN/m, (C) 8,6 mN/m e (D) 10,1 mN/m.

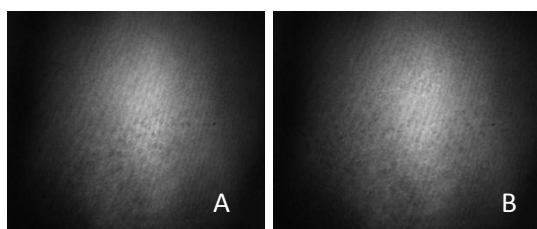
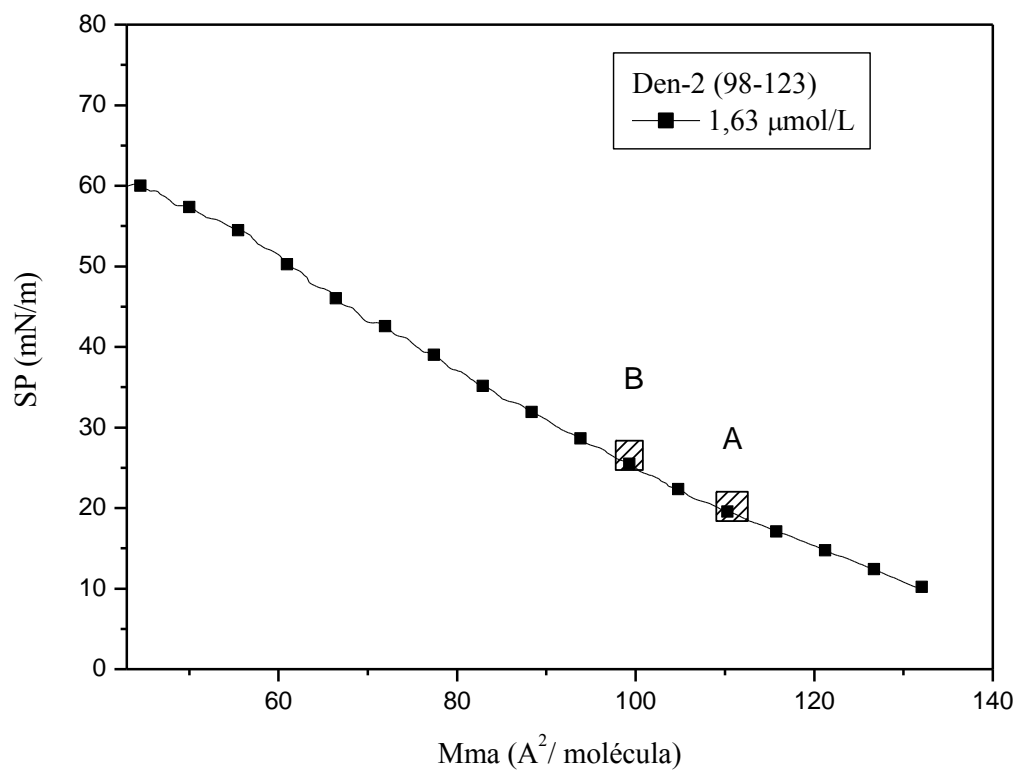


Figura 96 - Isotherma para Den-2 (98-123) em monocamada de DPPC espalhadas em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressão de superfície: (A) 19 mN/m e (B) 25 mN/m.



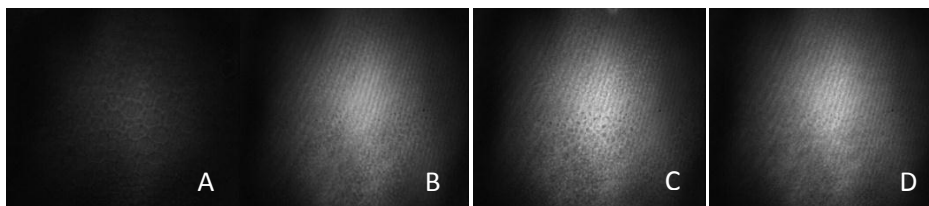
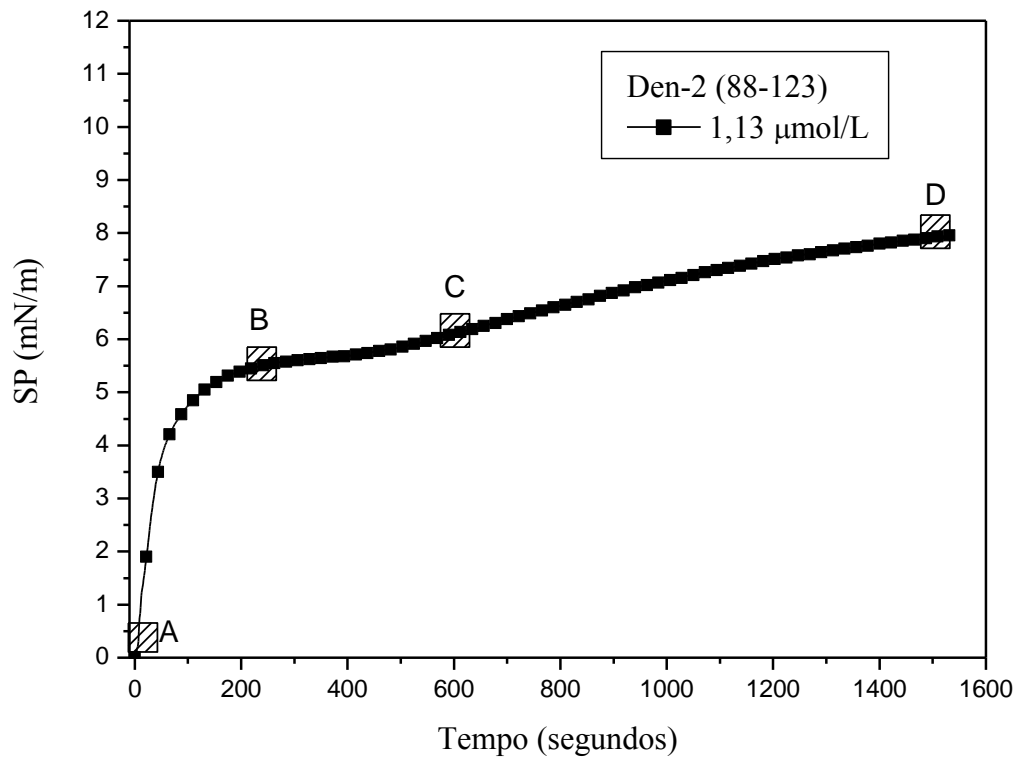


Figura 97 - Cinéticas de adsorção para Den-2 (88-123) em monocamadas de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 0,5 mN/m; (B) 5,5 mN/m; (C) 6,0 mN/m e (D) 8,0 mN/m.

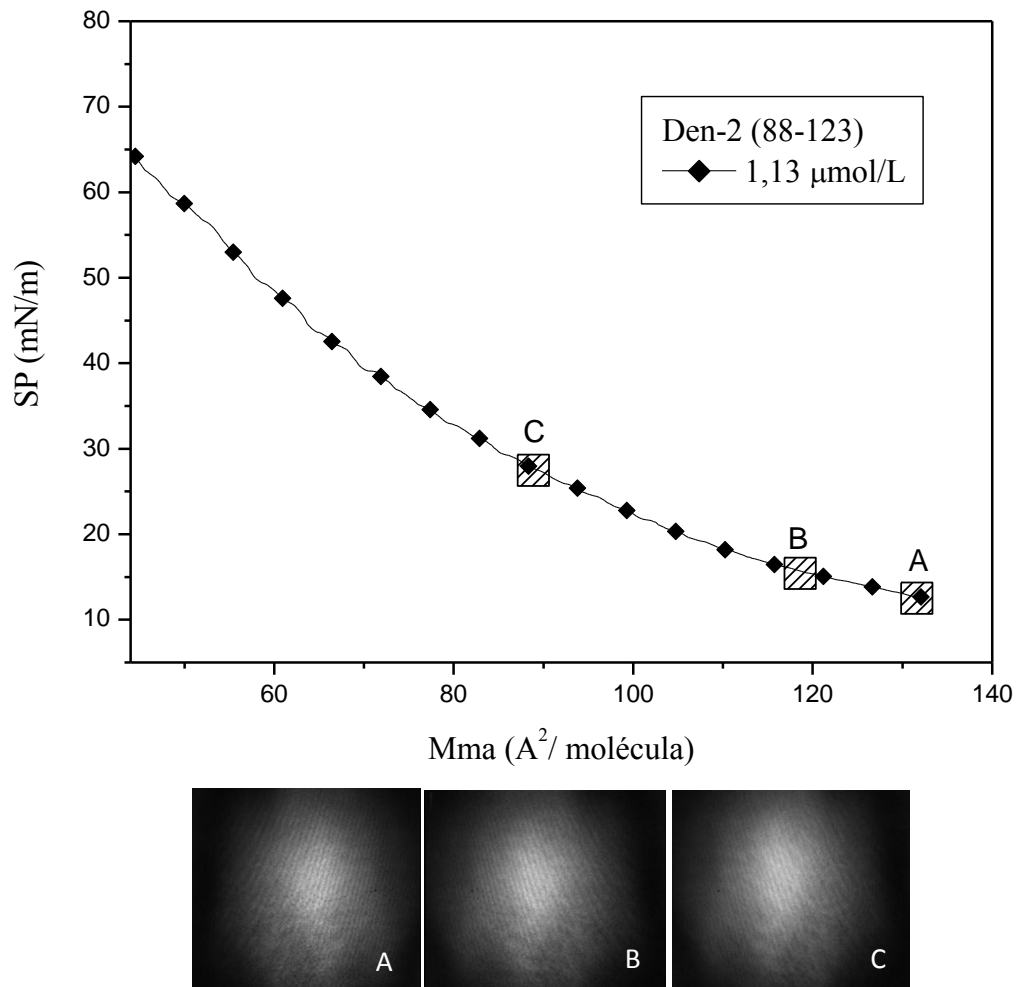


Figura 98 - Isotermas para Den-2 (88-123) em monocamada de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 12 mN/m e (B) 16 mN/m (C) 28 mN/m.

Os resultados para o peptídeo Den-2 (88-111) diferem bastante dos obtidos para todos os outros peptídeos provenientes do sorotipo 2 da dengue, estudados neste trabalho. Por outro lado, a morfologia da monocamada na presença deste peptídeo se assemelha à obtida para o lipídeo puro. Este resultado sugere que o peptídeo Den-2 (88-111), mesmo interagindo com a monocamada lipídica, não favorece a fusão dos lipídeos, como observado para os peptídeos anteriores, ou promove em uma extensão muito menor.

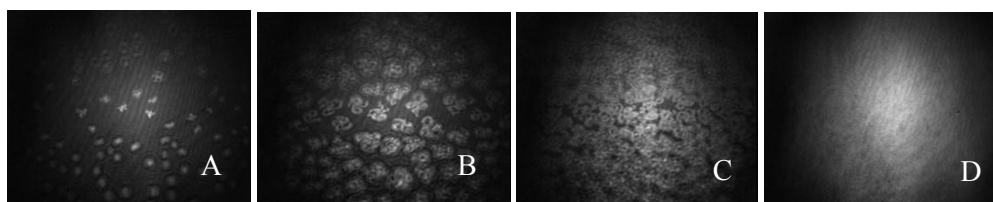
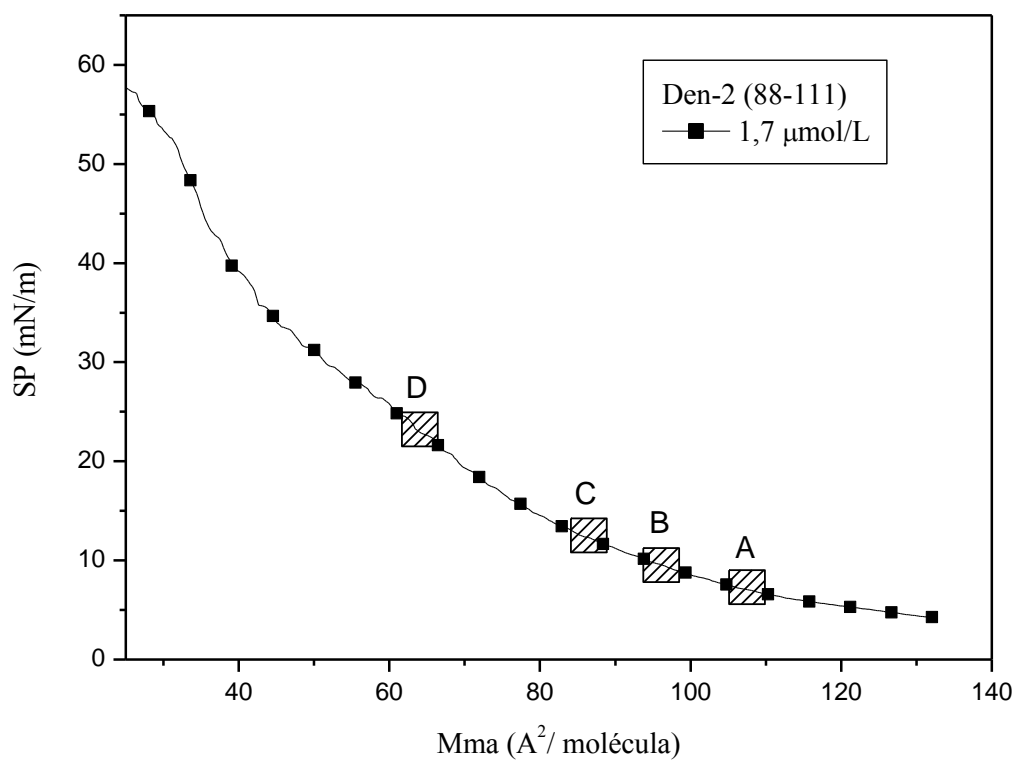


Figura 99 - Isothermas para Den-2 (88-111) em monocamada de DPPC em tampão fosfato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 7,8 mN/m, (B) 9,4 mN/m, (C) 12,2 mN/m e (D) 23,7 mN/m.

## B) Tampão Acetato

O DPPC puro em pH 5,5 com área mínima de  $65\text{\AA}^2$ , na fase gasosa, apresentou pequenos domínios circulares distantes um do outro, figura 100A. Com a maior compressão das barreiras, começa a ocorrer a fase líquido-expandido, visto na figura 100B, na qual os domínios aumentam de tamanho e ficam mais próximos uns dos outros. Quando a pressão chega em  $20\text{ mN/m}$ , podemos ver duas fases, a de líquido-expandido e a condensada, figura 100C, os domínios se organizam melhor, apresentando-se maiores e com formas irregulares. Na figura 100D, podemos ver o completo empacotamento da monocamada, os domínios se unem, formando um filme único compacto.

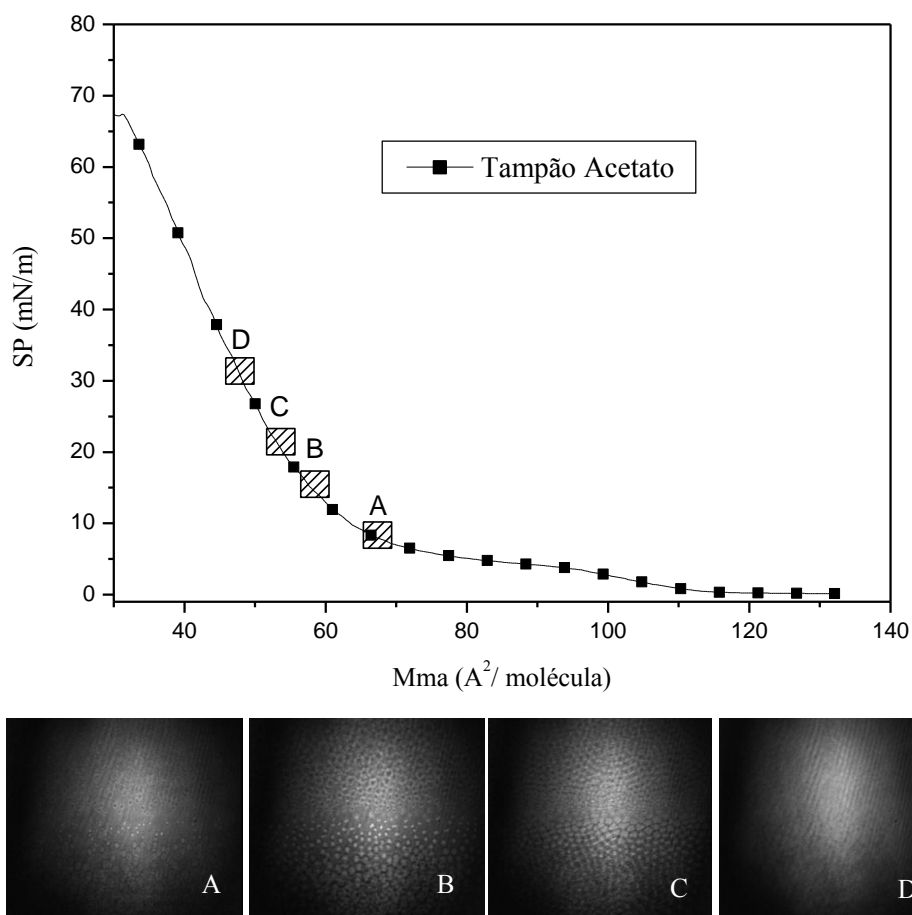


Figura 100 - Isoterma em monocamadas de DPPC espalhadas em tampão acetato. Imagens de BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A)  $8,6\text{ mN/m}$ ; (B)  $15,4\text{ mN/m}$ ; (C)  $21\text{ mN/m}$  e (D)  $31,8\text{ mN/m}$ .

A adição do peptídeo de fusão à monocamada mostrou que, no início da compressão, figura 101A e B, ocorre a formação de domínios organizados e mais compactados, o peptídeo provavelmente age de forma cooperativa, incentivando a formação de domínios precocemente. Na figura 101C, podemos visualizar duas fases, a expandida e a condensada, na qual os domínios estão muito próximos e de forma mais organizada. Na figura 101D e E é possível verificar a completa formação de um filme uniforme. Os resultados indicaram que, uma pequena quantidade de peptídeo conseguiu solubilizar na monocamada de lipídeos e induzir a formação de domínios mais estruturados.

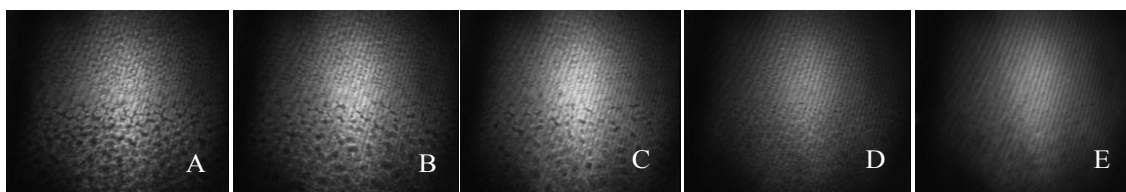
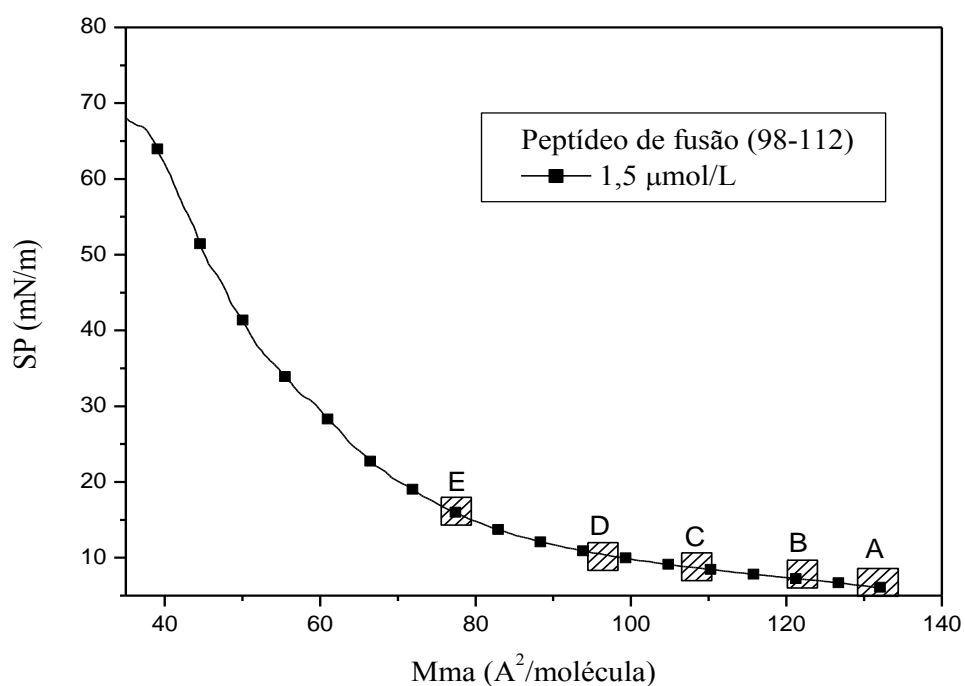


Figura 101 - Isotermas para Peptídeo de fusão (98-112) em monocamada de DPPC espalhadas em tampão acetato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 6,5 mN/m, (B) 7,3 mN/m, (C) 8,9 mN/m, (D) 11 mN/m e (E) 16 mN/m.

Para o peptídeo Den-2 (98-123), formou-se inicialmente pequenos domínios, figura 102A e B, que foram aumentando em número com a compressão (figura 102C), até formar um filme compacto e rígido, figura 102D.

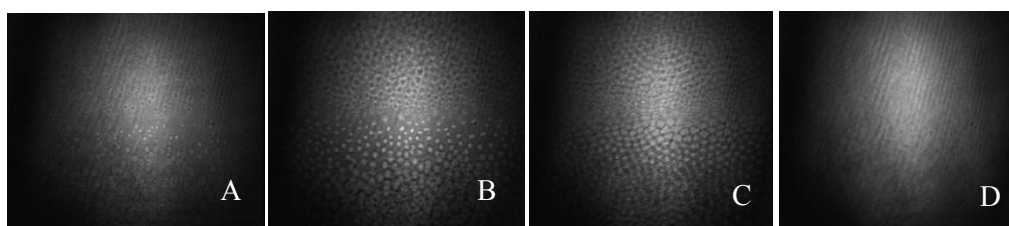
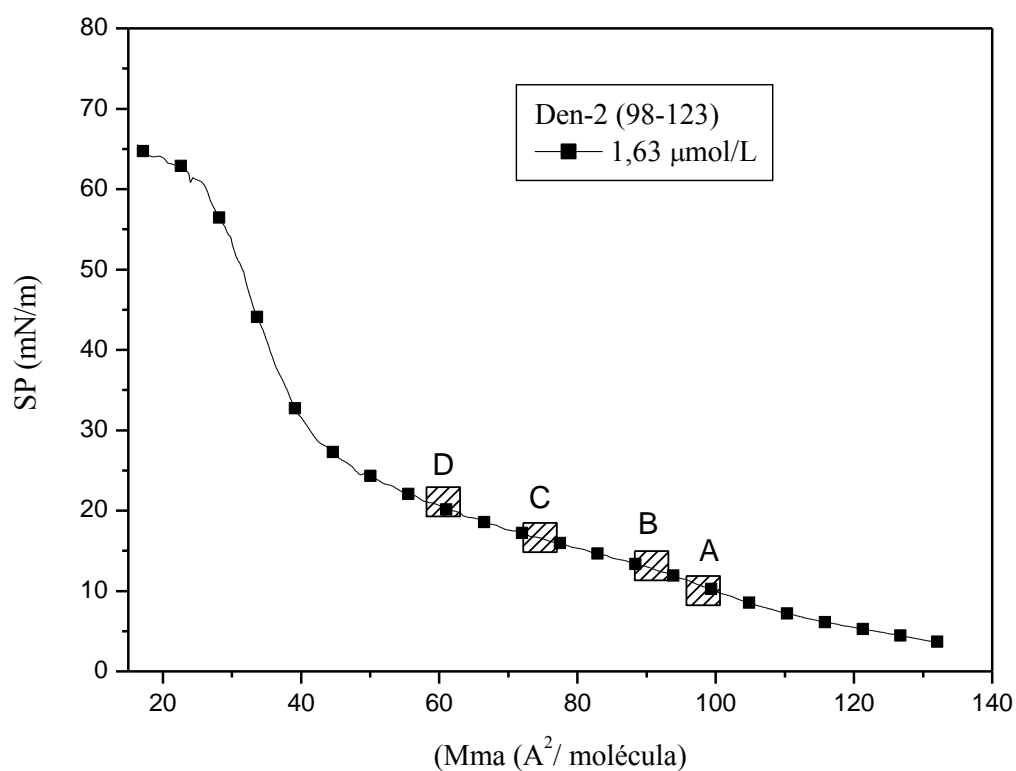


Figura 102 - Isotermas para Den-2 (98-123) em monocamada de DPPC espalhadas em tampão acetato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 10,3 mN/m, (B) 13,3 mN/m, (C) 16,7 mN/m e (D) 21,2 mN/m.

A compressão da monocamada contendo o peptídeo Den-2 (88-123) mostrou a formação inicial de pequenos domínios (figura 103A). Estes domínios permanecem pequenos, mas começam a se organizar (figura 103B), de modo a formar uma monocamada mais compactada. As formas obtidas foram circulares irregulares muito próximas umas das outras, formando um filme compacto e rígido, figura 103D. Os resultados, desta forma, foram muito iguais aos obtidos para o peptídeo Den-2 (98-123).

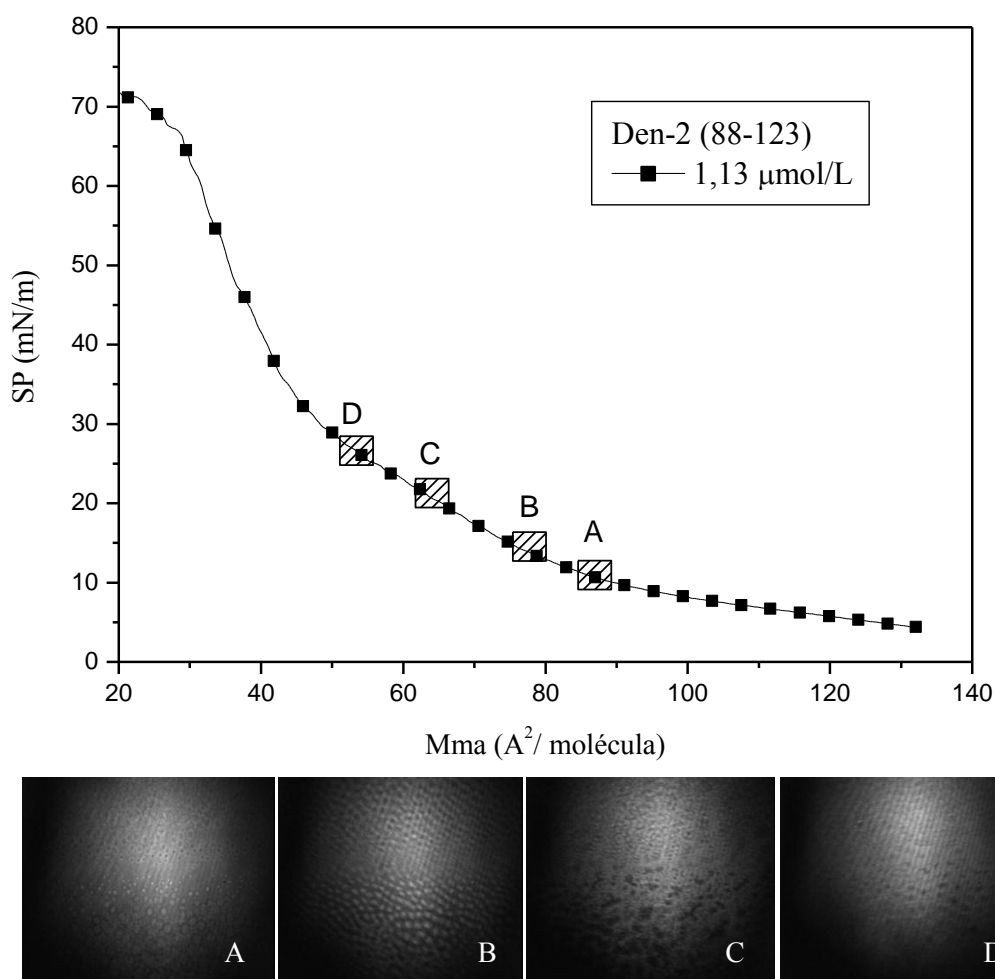


Figura 103 - Isotermas para Den-2 (88-123) em monocamada de DPPC espalhadas em tampão acetato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 11,7 mN/m; (B) 15 mN/m; (C) 21,2 mN/m and (D) 26,8 mN/m.

Para o peptídeo Den-2 (88-111), o fechamento das barreiras fez com que a monocamada se estruture inicialmente em pequenos domínios bem separados, figura 104A. Nas figuras 104B e C, os domínios começam a se organizar, ficando mais compactos e próximos uns dos outros, mostrando duas fases visíveis, a expandida e a condensada (LE/LC). Em 16,4 mN/m é formado um filme compacto e uniforme.

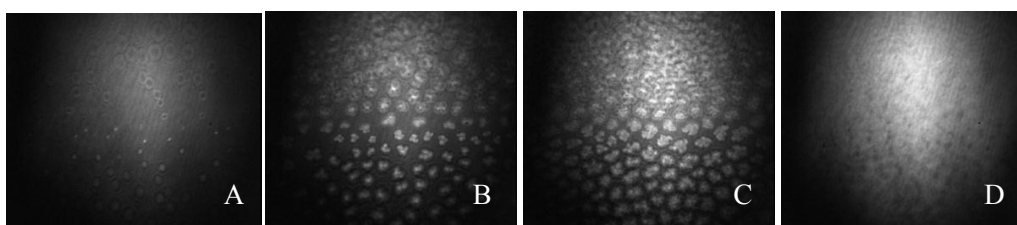
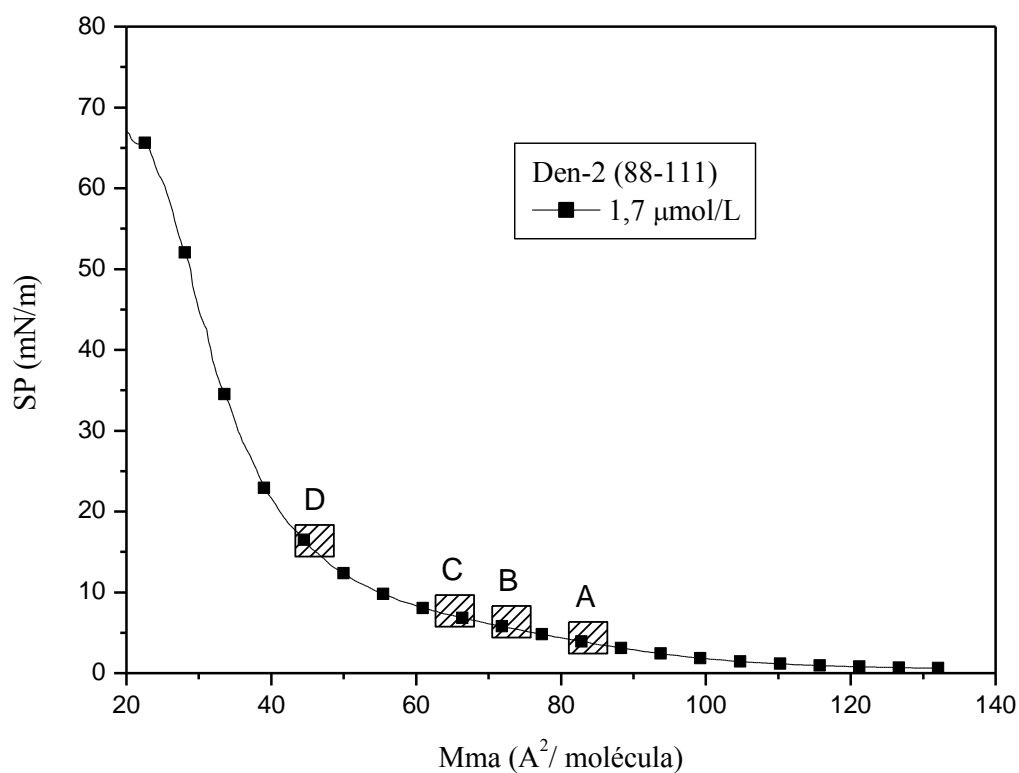


Figura 104 - Isotermas para Den-2 (88-111) em monocamada de DPPC espalhadas em tampão acetato. Imagens BAM correspondente a diferentes pressões de superfície: (A) 4 mN/m, (B) 6 mN/m, (C) 7,2 mN/m e (D) 16,4 mN/m.



Os domínios encontrados por meio do BAM para o lipídeo puro, em tampão acetato, comparativamente à monocamada contendo este peptídeo, são diferentes em formato e pressão de formação, indicando a interação deste peptídeo com a monocamada.

Podemos concluir que nos estudos com monocamada de Langmuir, os peptídeos contendo a posição posterior (113-123) ao peptídeo de fusão Den-2 (98-123) e o Den-2 (88-123) em tampão fosfato, foram os que apresentaram maior interação com a monocamada do que os demais peptídeos, mostrando a importância da sequência de aminoácidos que antecede o peptídeo de fusão. Já em tampão acetato, o deslocamento da área mínima foi pequeno em comparação ao deslocamento ocorrido em tampão fosfato. Mas neste caso, o peptídeo de fusão foi o que apresentou maior atividade com a monocamada lipídica.

## 5. CONCLUSÕES

A substituição dos resíduos de cisteína, presentes na estrutura primária dos peptídeos selvagens por serina, permitiu a obtenção com bons rendimentos dos peptídeos desejados.

Os dados obtidos para os experimentos de fusão mostraram que a substituição do resíduo de cisteína na posição 105 do peptídeo de fusão por serina, não afetou a sua capacidade fusogênica. Somado a isto, os peptídeos provenientes dos diversos sorotipos da dengue contendo esta alteração, mantiveram a capacidade de misturar lipídeos.

Os peptídeos com maior capacidade de fundir vesículas foram os provenientes do sorotipo 2 da dengue para os dois tampões estudados. Os demais peptídeos seguiram a seguinte ordem de habilidade de fusão  $1 > 3 > 4$  em tampão fosfato. Estes resultados mostraram a grande contribuição das sequências que flanqueiam o peptídeo de fusão na sua atividade. Em tampão fosfato, com exceção dos peptídeos provenientes do sorotipo 2 da dengue, não houve observação de capacidade fusogênica das sequências estudadas.

De maneira global, houve menor interação do peptídeo de fusão com miméticos de membrana, quando da comparação com os peptídeos contendo a região posterior da

sequência (113-123) para os peptídeos provenientes aos sorotipos 1, 2 e 3 da dengue. Os resultados mostraram que as regiões anterior (88-97) e posterior (113-123) contribuíram de maneira diferente para interação peptídeo/membrana e para o processo de fusão. A região mais importante para a interação inicial com membranas foi a região contendo o segmento posterior ao peptídeo de fusão.

Os resultados com monocamadas mostraram que os peptídeos promoveram uma compactação dos lipídeos da monocamada, indicando, provavelmente, o modo como estes peptídeos promovem a fusão. Somado a isto, a região posterior ao peptídeo de fusão promoveu uma maior alteração nas propriedades da membrana, indicando novamente que esta região contribuiu de maneira mais significativa para a fusão da membrana.

Os resultados obtidos, pelo BAM também indicaram que a adsorção dos peptídeos em pH 7,1 e 5,5 foram diferentes, mostrando que ocorreu uma alteração da afinidade com a mudança de pH. Este resultado pôde apresentar o “gatilho” que promoveu a mudança de estrutura da proteína E, causando a fusão do vírus. A interação inicial entre a membrana e a região posterior ao peptídeo de fusão ocorreria em pH 7,1, sendo que o abaixamento do pH, diminuiu a afinidade desta região pela membrana, o que poderia promover a mudança estrutural na proteína E e a fusão entre a membrana celular e a viral.

## Referências

- ALBERICIO, F. Editorial: current perspectives in peptide chemistry. I. Synthesis. **Biopolymers**, v. 55, n. 2, p. 99-100, 2000.
- ALLISON, S. L.; SCHALICH, J.; STIASNY, K.; MANDL, C. W.; HEINZ, F. X. Mutational evidence for an internal fusion peptide in Flavivirus envelope protein E. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4268-4275, 2001.
- BANGHAM, A. D. A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. **Nature**, v. 192, n. 480, p. 1197-1198, 1961.
- BROCKMAN, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 438-443, 1999.
- CASAS, J.; ESPINA, M.; HARO, M.; ROIO, F.; ALSINA, M. A.; HARO, I.; MESTRES, C. Interfacial properties of a synthetic derived from hepatitis G virus E2 protein: interaction with lipid monolayer. **Langmuir**, v. 22, p. 246-254, 2006.
- CASELI, L.; OLIVEIRA, R. G.; MASUI, D. C.; FURRIEL, R. P.; LEONE, F. A.; MAGGIO, B.; ZANIQUELLI, M. E. Effect of molecular surface packing on the enzymatic activity modulation of an anchored protein on phospholipid Langmuir monolayers. **Langmuir**, v. 21, n. 9, p. 4090-4095, 2005.
- CESPEDES, G. F. **Sínteses e estudos estrutura/função de um peptídeo extraído da rã *Hypsiboas albopunctatus* e análogos**. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- CHEN, Y.; BARKLEY, M. D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. **Biochemistry**, v. 37, n. 28, p. 9976-9982, 1998.
- D'ALAMA, L. **Mais de 50 testes no mundo buscam vacina contra a dengue, diz Butantan**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2012/11/mais-de-50-testes-no-mundo-buscam-vacina-contradengue-diz-butantan.html>>. Acesso em: 14 jan. 2013.
- DOL, G.; TSUDA, K.; WEENER, J.; BARTELS, M.; ASAVEL, T.; GENSCH, T.; HOFKENS, J.; LATTERINI, L. Merging of hard spheres by phototriggered micromanipulation. **Angewandte Chemie International**, v. 113, n. 9, p. 1710-1714, 2001.
- EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. **Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 672-680, 1976.

- EPAND, R. M. Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1614, p. 116-121, 2003.
- FERREIRA, M.; CAETANO, W.; ITRI, R.; TABAK, M.; OLIVEIRA JÚNIOR, O. N. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-blodgett (LB). **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 502-510, 2005.
- FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International Journal of Peptide & Protein Research**, v. 35, n. 3, p. 161-214, 1990.
- FIGUEIREDO, L. T. M. History, present and future of dengue fever in Brazil. In: ROSA, A. P. A. T. da.; VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, J. F. S. T. da. **An overview of arbovirology on Brazil and neighboring countries**. Belem: Institute Evandro Chagas, 1998. p. 154-163.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Vacinas contra o dengue. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 32, p. 21-25, 1999.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brasil: past, present and future perspective. **Dengue Bulletin**, v. 27, p. 25-33, 2003.
- FÖSTER, T. 10th spiess memorial lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation. **Discussions of the Faraday Society**, v. 27, p. 7-17, 1959.
- FREZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.
- GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Disease**, v. 2, p. 33-42, 2002.
- GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.
- HALSTEAD, S. B. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. **Vaccine**, v. 23, p. 849-856, 2005.
- HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v. 370, p. 1644-1652, 2007.
- HARRISON, S. C. The pH sensor for flavivirus membrane fusion. **The Journal of Cell Biology**, v. 183, n. 2, p. 177-179, 2008.
- HÉNON, S.; MEUNIER, J. Microscope at the Brewster angle: direct observation of first order phase transitions in monolayers. **Review of Scientific Instruments**, v. 62, p. 936-939, 1991.

- HÖNING, D.; MÖBIUS, D. J. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. **Journal Physical Chemistry**, v. 95, p. 4590-4592, 1991.
- HROBOWSKI, Y. M.; GARRY, R. F.; MICHAEL, S. F. Peptides inhibitors of dengue virus and west Nile virus infectivity. **Journal of Virology**, v. 2, p. 49, June 2005.
- HUANG, C. Y-H.; BUTRAPET, S.; MOSS, K. J.; CHILDERS, T.; ERB, S. M.; CALVERT, A. E.; SILENGO, S. J.; KINNEY, R. M.; BLAIR, C. D.; ROEHRING, J. T. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. **Virology**, v. 396, p. 305-315, 2010.
- KAISER, E.; COLESCOT, R. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.
- KEELAPANG, P.; SRIBURI, R.; SUPASA, S.; PANYADEE, N.; SONGJAENG, A.; JAIRUNGSRI, A.; PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; MALASIT, P.; SITTISOMBUT, N. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. **Journal of Virology**, v. 78, n. 5, p. 2367-2381, 2004.
- KIELIAN, M.; REY, F. A. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 67-76, 2006.
- KOURI, G. El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 19, n. 3, p. 143-145, 2006.
- KOUZAYHA, A.; BESSON, F. GPI- alkaline phosphatase insertion into phosphatidylcholine monolayers: phase behavior and morphology changes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, p. 1315-1351, 2005.
- KOUZAYHA, A.; NASIS, M. N.; BUCHET, R.; WATTRAINT, O.; SARAZIN, C.; BESSON, F. Conformation and interface analyses of  $K_3A_{18}K_3$  and alamecithin in model membranes. **Journal Physical Chemistry B**, v. 113, p. 7012-7019, 2009.
- KROSCHEWSKI, H.; LIM, S. P.; BUTCHER, R. E.; YAP, T. L.; LESCAR, J.; WRIGHT, P. J.; VASUDEVAN, S. G.; DAVIDSON, A. D. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain. **Journal Biological Chemistry**, v. 283, p. 19410-19421, 2008.
- LARIOS, C.; MIÑONES, J. Jr.; HARO, I.; ALSINA, M. A.; BUSQUETS, M. A.; TRILLO, M. Study of adsorption and penetration of E2 (279-298) peptide into Langmuir phospholipid monolayers. **Journal Physical Chemistry B**, v. 110, p. 23292-23299, 2006.

LAWRIE, G. A.; GENTLE, I. R.; BARNES, G. T. The structure of mixing monolayer films of DPPC and hexadecanol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 171, p. 217-224, 2000.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum Press, 1983.

MACH, H.; MIDDAUGH, C. R.; LEWIS, R. V. Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 200, n. 1, p. 74-80, 1992.

MACHADO, T. G. C. **Expressão da proteína do envelope do vírus da febre amarela em células de inseto**. 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10447/1/2012\\_LorenaCarvalhodeSouzaChaves.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10447/1/2012_LorenaCarvalhodeSouzaChaves.pdf)>. Acesso em: 20 ago. 2009.

MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1286, n. 3, p. 183-223, 1996.

MATAR, G.; BESSON, F. Influence of the lipid composition of biomimetic monolayers on the structure and orientation of the gp41 tryptophan-rich peptide from HIV-1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 2534-2543, 2010.

McCONNELL, H. M. Structures and transitions in lipid monolayer at the air-water interface. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 42, p. 171-195, 1991.

McCONLOGUE, C. W.; VANDERLICK, T. K. A close look at domain formation in DPPC monolayers. **Langmuir**, v. 13, n. 26, p. 7158-7164, 1997.

MELO, M. N.; SOUZA, F. J. R.; CARNEIRO, F. A.; CASTANHO, M. A. R. B.; VALENTE, A. P.; ALMEIDA, F. C. L.; POIAN, A. T.; MOHANA-BORGES, R. Interaction of the dengue virus fusion peptide with membranes assessed by NMR: the essential role of the envelope protein Trp 101 for membrane fusion. **Journal of Molecular Biology**, v. 392, n. 3, p. 736-746, 2009.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis .1. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-319, 2004.

MORAIS, L. G. M.; FAZIO, A. M.; VIEIRA, R. F. F.; NAKAIE, R. C.; MIRANDA, M. T. M.; SCHREIER, S.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Conformational and functional studies of gomesin analogues by CD, EPR and fluorescence spectroscopies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 1, p. 52-58, 2007.

MULKERRIN, N. G. **Spectroscopic methods for determining protein structure in solution**. New York: VCH, 1996. p. 5-27.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. São Paulo: Savier, 2006.

NEMÉSIO, H.; PALOMARES-JEREZ, F.; VILLALÁIN, J. The membrane-active regions of the dengue virus proteins C and E. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 2390-2402, 2011.

NOBRE, T. M.; PAVINATTO, F. J.; COMINETTI, M. R.; ARAÚJO, H. S. S.; ZANIQUELLI, M. E. D.; BELTRAMINI, L. M. The specificity of *frutalin lexti* using biomembrane models. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 1547-1555, 2010.

OLSON, F.; HUNT, C. A.; SZOKA, F. C.; VAIL, W. J.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Preparations of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 557, n. 1, p. 9-23, 1979.

PAVINATTO, A. **Efeito de características estruturais da quitosana sobre sua interação com filmes de Langmuir como modelo de biomembrana**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais)-Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2009. Disponível em: <[http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/.../Dissertacao\\_Vananelia.pdf%E2%80%8E](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/.../Dissertacao_Vananelia.pdf%E2%80%8E)>. Acesso em: 08 jan. 2013.

PÉREZ-LÓPEZ, S.; NIETO-SUAREZ, M.; MASTERS, C.; ALSINA, M. A.; HARO, I.; VILA-ROMEU, N. Behavior of a peptide sequence from the GB virus C / hepatitis G virus E2 protein in Langmuir monolayers: its interaction with phospholipid membrane models. **Biophysical Chemistry**, v. 141, p.153-161, 2009.

PIRES, M. A. **Caracterização das monocamadas mistas (DPPC+BCD) de Langmuir**: efeito da estrutura e concentração do BCD e da força iônica na subfase. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59135/tde-22072010-113112/pt-br.php>>. Acesso em: 09 fev. 2013.

PHILLIPS, M. C.; CHAPMAN, D. Monolayer characteristics of saturated 1,2,-diacyl phosphatidylcholines (lecithins) and phosphatidylethanolamines at the air-water interface. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 163, n. 3, p. 301-313, 1968.

REYES, L. F. **Estudos funcionais e estruturais da proteína recombinante humana UBE2G2 (Ubiquitin)- conjugation enzyme E2G2**. 2005. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

SANCHEZ-MARTÍN, M. J.; HARO, J.; ASUNCIÓN, A. M.; BUSQUETS, M. A.; PYLOL, M. A. Langmuir monolayer study of the interaction of E1 (145-162) hepatitis G virus peptide with phospholipid membranes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 448-456, 2010.

SANCHEZ-MARTÍN, M. J.; BUSQUETS, M. A.; GIRONA, V.; HARO, J.; ALSINA, A. M.; PUJOL, M. Effect of E1 (64-81) hepatitis G peptide on the *in vitro* interaction of HIV-1 fusion peptide with membrane models. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 2178-2188, 2011.

SANTOS, C. N.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.

SANTOS JÚNIOR, D. S. dos; PAVINATTO, F. J.; BALOGH, D. T.; MISOGUTI, L.; OLIVEIRA JÚNIOR, O. N.; MENDONÇA, C. R. *In situ* UV-VIS. Absorbance measurements for Langmuir films of the poly[4-[2-(methacryloyloxy)-ethyl]ethylamino]-2-chloro-4-nitroazobenzene] (HPDR13) azopolymer. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, p. 138-142, 2004.

SELIGMAN, S. J. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide. **Journal of Virology**, v. 5, p. 27, Feb. 2008.

SILER, J. F. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Phillipine Journal of Science**, v. 29, p. 120-250, 1926.

SIMMONS, C. P.; DONG, T.; CHAU, N. V.; DUNG, N. T.; CHAU, T. N.; THAO, L. T. T.; HIEN, T. T.; ROWLAND-JONES, S.; FARRA, R. J. Early T- cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5665- 5675, 2005.

STAUFFER, F.; MELO, M. N.; CARNEIRO, F. A.; SOUZA, F. J. R.; JULIANO, A. M.; JULIANO, L.; MOHANA-BORGES, R.; POIAN, A. T.; CASTANHO, M. A. R. B. Interaction between dengue virus fusion peptide and lipid bilayers depends on peptide clustering. **Molecular Membrane Biology**, v. 25, n. 2, p. 128-138, 2008.

STIASNY, K.; FRITZ, R.; PANGERL, K.; HEINZ, F. X. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1159-1163, 2009.

TAYLOR, S. E.; DESBAT, B.; BLAUDEZ, D.; JACOB, S.; CHI, L. F.; FUCHS, H.; SCHWTARZ, G. Structure of a fusion peptide analogue at the air-water interface, determined from surface activity, infrared spectroscopy and scanning force microscopy. **Biophysical Chemistry**, v. 87, p. 63-72, 2000.

TORRES, O.; BONG, D. Determinants of membrane activity from mutational analysis of the HIV fusion peptide. **Biochemistry**, v. 50, p. 5195-5206, 2011.



TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. New consensus hydrophobicity scale extended to non-proteinogenic amino acids. In: BENEDETTI, E.; PEDONE, C. **Peptides 2002**: proceedings of the twenty-seventh European peptide symposium. Napoli: Edizioni, 2002. p. 416-417.

TRIPP, B. C.; MAGDA, J. J.; ANDRADE, J. D. Adsorption of globular-proteins at the air/waterinterface as measured via dynamic surface-tension-concentration dependence, mass-transfer considerations, and adsorption-kinetics. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 173, p. 16-27, 1995.

URCUQUI-INCHIMA, S.; PATIÑO, C.; TORRES, S.; HAENNI, A.; DÍAZ, F. J. Recent developments in understanding dengue virus replication. **Advances in Virus Research**, v. 77, p. 1-39, 2010.

