



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Luiz Fernando da Costa Zonetti

Estudo da interação entre o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue com modelos de membrana biológica por simulações de
Dinâmica Molecular

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2018

Luiz Fernando da Costa Zonetti

Estudo da interação entre o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue com modelos de membrana biológica por simulações de Dinâmica Molecular

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2018

Zonetti, Luiz Fernando da Costa.

Estudo da interação entre o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue com modelos de membrana biológica por simulações de Dinâmica Molecular / Luiz Fernando da Costa Zonetti. – São José do Rio Preto, 2018.

174 f.: il., grafs., tabs.

Orientador: Alexandre Suman de Araujo

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Biofísica molecular. 2. Biofísica. 3. Vírus. 4. Dengue. 5. Energia Livre. 6. Dinâmica molecular. I. Título.

CDU – 577.3

Luiz Fernando da Costa Zonetti

Estudo da interação entre o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue com modelos de membrana biológica por simulações de Dinâmica Molecular.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. José Roberto Ruggiero
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ernesto Raul Caffarena
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Ronaldo Junior de Oliveira
UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

São José do Rio Preto
31 de agosto de 2018

*Dedico este trabalho a toda minha família, principalmente
ao meu pai Luiz, à minha mãe Ismênia,
a minha esposa Mirella
e aos meus filhos Luiz Felipe e Lucas Fernando,
que sempre me apoiaram e me incentivaram nesta jornada*

Agradecimentos

Em primeiro lugar e acima de tudo, a Deus, por me dar forças para vencer esta batalha.

Ao Professor Dr. Alexandre Suman de Araujo, pelo companheirismo durante esta minha caminhada, por sua dedicação, paciência e orientação durante todo este período. Sou imensamente grato!

Ao Professor Dr. Jorge Chahine e ao professor Dr João Ruggiero Neto, pela amizade e pelo acompanhamento desde o início dos meus estudos no IBILCE. Nada mais honroso do que ter tido eles na minha qualificação.

Aos professores Dr. Ícaro Putinhon Caruso, Dr. José Roberto Ruggiero, Dr. Ernesto Raul Caffarena e Dr. Ronaldo Junior de Oliveira por aceitarem a fazer parte da banca na minha defesa de tese.

Aos funcionários do Departamento de Física - Ilva, Paulinho, Barbosa, Marcelino, Bruno e Valéria – que sempre estiveram dispostos a me auxiliar quando necessitei.

Ao Denis Contini do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo que sempre esteve disposto a me ajudar quando precisei.

Aos amigos que trabalham comigo no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Birigui que sempre me incentivaram a finalizar meus estudos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Birigui pelo suporte financeiro.

Agradeço também ao Núcleo de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo (CENAPAD-SP) do projeto UNICAMP / FINEP - MCT pela disponibilização dos recursos computacionais para a realização deste trabalho.

Resumo

Nas últimas décadas a Dengue se tornou a mais importante arbovirose a afetar o homem. A Dengue é causada por um tipo de flavivírus, que são vírus envelopados de geometria esférica. Hoje a Dengue é uma das doenças com maior incidência no Brasil, atingindo a população de todos os estados, independentemente de classe social. O vírus da Dengue possui um envelope viral composto por duas proteínas: a proteína E e a proteína M. A proteína E é considerada uma importante proteína viral, pois forma projeções na superfície do vírus e possui determinantes antigênicos para hemaglutinação e neutralização. A mesma possui uma sequência de resíduos de aminoácidos rica em resíduos hidrofóbicos e de glicinas chamada de peptídeo de fusão. O peptídeo de fusão está envolvido no processo de fusão do vírus com a membrana celular endossomal, necessário para a injeção do material genético viral no meio intracelular. A proteína E é glicosilada e forma homodímeros dispostos paralelamente à superfície viral em pH neutro, sendo incapaz de interagir com a membrana alvo. Com a exposição ao pH ácido do meio endossomal a proteína E sofre alteração conformacional que a leva para a conformação fusogênica, na qual o peptídeo de fusão está exposto. Independentemente da mudança estrutural sofrida pela glicoproteína viral durante este processo, seu peptídeo de fusão mantém a mesma conformação em pH neutro e ácido conforme evidenciado em estruturas cristalográficas. Neste trabalho investigamos a interação do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue com bicamadas lipídicas, investigando a diferença de afinidade (energia livre de ligação) de duas sequências de resíduos de aminoácidos que contêm o peptídeo de fusão (resíduos 88-123 e 98-110 retirados do PDBID: 1OAN) com dois modelos de membrana compostos por fosfolipídios POPC (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina*) e pela mistura de POPC e POPG (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol*) na proporção 4:1, utilizando

simulações de dinâmica molecular e o método *Adaptive Biasing Force* (ABF). Nossos resultados indicam uma pequena diferença na energia livre de ligação de cada peptídeo com a bicamada de POPC e POPC com POPG e um pequeno deslocamento do enterramento do resíduo de triptofano, sendo que em ambas as bicamadas o enterramento está em acordo qualitativo com resultados experimentais obtidos por espectroscopia de fluorescência. Análises estruturais e da energética de ligação do peptídeo de fusão com as bicamadas estudadas apontam que ele não sofre alterações conformacionais significativas ao entrar na bicamada e que existe uma região, denominada de “colar” nesse trabalho, responsável pela maior parte das interações do peptídeo com as bicamadas, a qual pode ser alvo de futuros estudos na busca por inibidores do processo de infecção de células humanas pelo vírus da Dengue.

Palavras-chaves: Vírus da Dengue, Peptídeo de Fusão, Dinâmica Molecular, Energia Livre, *Adaptive Biasing Force*

Abstract

Dengue Fever is, nowadays, the most important arbovirosis to affect men. Dengue fever is caused by a flavivirus, enveloped viruses of spherical shape. Nowadays, it is one of the highest incidence diseases in Brazil, striking populations in every state regardless of social class. The Dengue virus presents a viral envelope composed of two proteins: E and M. Protein E is considered an important viral protein, because it forms projections on the surface of the virus and has antigenic determinants for hemagglutination and neutralization. Protein E holds a sequence of amino acids residue rich in hydrophobic residues and glycine called fusion peptide. The fusion peptide is involved in the process of the fusion of the virus with the endosomal cellular membrane important for the injection of viral genetic material into the intracellular medium. Protein E is glycosylated and forms homodimers parallel to the viral surface in neutral pH, being unable to interact with the target membrane. Due to exposure of acid pH of the endosomal medium, protein E undergoes conformational changes, leading to fusogenic conformation, where the fusion peptide is exposed. Regardless of the structural change undergone by the viral glycoprotein during this process, its fusion peptide keeps the same conformation in neutral and acid pH, as evidenced in crystallographic structures. In this study, we investigated the interaction of the fusion peptide of protein E of the Dengue virus with lipid bilayers calculating the difference in the affinity (binding free energy) of two sequences amino acids residue of the Protein E which contain the fusion peptide (residues 88-123 e 98-110 from PDBID: 1OAN) with two models membranes composed by phospholipids POPC (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina) and by the mixture of POPC and POPG (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol) in the ratio of 4:1, using Molecular Dynamics simulations the Adaptive Biasing Force (ABF) method. Our results show a small difference in the binding free energy of each peptide with the membrane POPC and POPC with POPG and a slight

dislocation on the burial of the Tryptophan residue, showing that in both bilayers the burial is in qualitative agreement with experimental results obtained through fluorescence spectroscopy. Structural and energetic analyses of the binding of the fusion peptide with the studied bilayers show that it does not suffer significant conformational alterations when it enters the bilayers and that there is a region that we call “collar”, which is responsible by most of interactions between the fusion peptide with the bilayers, which can be the subject of future studies aiming at finding inhibitors to the infection of human cells by the Dengue virus.

Keywords: Dengue Virus, Fusion Peptide, Molecular Dynamics, Free Energy, Adaptive Biasing Force

Lista de Figuras

- Figura 1 – Áreas de infecção do vírus da Dengue no mundo. Extraído de (32).. 33*
- Figura 2 – Sorotipos do vírus da Dengue circulantes no Brasil por Unidade Federativa. Extraído de (33)..... 33*
- Figura 3 – Situação epidemiológica da Dengue no Brasil no período de 2004 até 2016. Adaptado de (34)..... 34*
- Figura 4 – Representação esquemática da estrutura do vírus da Dengue e do genoma viral. (A) Organização do genoma do vírus da Dengue. (B) Ilustração dos resultados obtidos por crio-microscopia da estrutura da partícula viral. Podem ser observadas duas camadas protéicas mais externas (azuis claro e escuro), compostas pelas proteínas E e M, uma bicamada lipídica (verde), um nucleocapsídeo (laranja), composto pela proteína C, e finalmente, o RNA genômico (rosa) empacotado no centro do vírus. Adaptado de Smith (43) e Whitehead (44).
..... 36*
- Figura 5 – Diagrama linear dos resíduos de aminoácidos correspondentes a cada domínio da proteína E do vírus da Dengue. A cor vermelha representa o domínio I, a amarela o domínio II e a azul o domínio III da proteína E do vírus da Dengue. Extraído de Modis (12). 38*
- Figura 6 – Rearranjo dos domínios da proteína E durante a transição para trímero. (A) Estrutura do monômero na conformação pré-fusogênica, encontrada nos dímeros de proteína E em pH neutro. (B) Estrutura do monômero na conformação pós-fusogênica, encontrada nos trímeros após exposição ao pH ácido. Ocorre um rearranjo dos domínios II e III (demonstrado pelas setas em A), que mudam sua orientação relativa, fazendo com que o C-terminal se aproxime do peptídeo de fusão, ficando 39 Å mais próximo. O peptídeo de fusão permanece essencialmente com a mesma conformação antes e depois da fusão. Extraído de Modis (12)..... 39*
- Figura 7 – Representação esquemática das estruturas das proteínas de fusão de classes I, II e III no estado conformacional pós-fusogênico. (A) Proteína gp41 do*

HIV-1 (classe I); (B) Proteína E dos flavivírus (classe II); (C) Glicoproteína G do VSV (classe III). Extraído de Weissenhorn (52). 41

Figura 8 – Mecanismos propostos para o processo de fusão catalisado pelas glicoproteínas virais. O dímero é representado na superfície viral, com o seu peptídeo de fusão interno em verde, domínio I em vermelho, II em amarelo e III em azul (a). A proteína se liga ao receptor específico e é internalizada por endocitose. Após exposição ao pH ácido do meio endossomal, ocorre um rearranjo na orientação relativa dos domínios II e III, expondo o peptídeo de fusão (b) e permitindo a formação de trímeros e a inserção do peptídeo de fusão na membrana alvo (c). A reestruturação da proteína continua, com o “dobramento” do domínio III, que aproxima as membranas viral e endossomal. É formada a haste de hemifusão (d) e (e) e finalmente o poro de fusão (f) após o total rearranjo trimérico da proteína de fusão, onde o peptídeo de fusão e a porção transmembrana se encontram próximos. Extraído de Mukhopadhyay (45). 42

Figura 9 – Sequência dos resíduos de aminoácidos do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue, os resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho, resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde, os polares, e em branco os hidrofóbicos. (a) mostra o diagrama linear. (b) Sequência de aminoácido do resíduo 88 até o 123 da proteína E do vírus da Dengue (peptídeo longo), a ponte de dissulfeto entre os resíduos CYS92 e CYS116 esta representada pela cor amarela e (c) Sequência de aminoácido do resíduo 98 até o 110 da proteína E do vírus da Dengue (peptídeo curto). 43

Figura 10 – Principais componentes de uma membrana celular. Extraído de (54) 44

Figura 11 – Movimentos dos fosfolipídios na membrana plasmática. Extraído de (56). 44

Figura 12 – Estrutura base de um fosfolipídio. Extraído de (59). 45

Figura 13 – Estrutura do lipídeo POPC (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina). Extraído de (61). 46

Figura 14 – Estrutura do lipídeo POPG (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol). Extraído de (62). 46

Figura 15 – Principais modelos de membranas. Extraído de (63)..... 48

Figura 16 – Mostra as interações das ligações do campo de força sendo que r e θ são os comprimentos e ângulos de ligação e Φ é o ângulo diedro. Adaptado de Phillips (83)..... 60

Figura 17 – Representação das condições periódicas de contorno em uma simulação por DM. Somente a caixa central é simulada, enquanto que as réplicas garantem a continuidade do sistema, isto é, ausência de contato das moléculas com o vácuo. As setas representam o movimento de uma molécula na caixa central e o mesmo movimento é reproduzido nas caixas réplicas. Extraído de Verli (87)..... 62

Figura 18 – Representação do raio de corte para uma célula de simulação de comprimento L . O raio de corte é traçado a partir de um átomo de interesse i , sendo que este não interage com o átomo j e sim com sua imagem j' , muito menos com sua própria imagem i' . O quadrado tracejado representa a aproximação de mínima imagem e o círculo representa o raio de corte. Adaptado de Allen (88)..... 63

Figura 19 – Peptídeo inserido na bicamada de POPC com POPG antes de iniciar o processo de fechamento da bicamada. As moléculas de água estão representadas como uma superfície roxa, o peptídeo representado em licorice e com os resíduos coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde os polares e em branco os hidrofóbicos. Na bicamada, os grupos acílicos das moléculas de POPC estão coloridos em ciano e das de POPG em vermelho, na região polar os átomos de fósforo são as esferas marrons, os nitrogênios esferas azuis e os oxigênios esferas vermelhas. 71

Figura 20 – Ilustra o cálculo do parâmetro de ordem. A seta preta representa a direção da normal da bicamada, em (a) temos a cauda do fosfolipídio, na qual cada asterisco destaca um grupo no que será calculado o parâmetro de ordem, em (b) mostramos os dois vetores que serão utilizados para obter o parâmetro de ordem para um grupo metil, $C \rightarrow H1$ e $C \rightarrow H2$ e em (c) mostramos o esquema dos ângulos a serem calculados. Extraído de (99) 73

Figura 21 – Ilustra como é calculado o ângulo de Inclinação Lipídica: (a) O ângulo formado entre o fósforo do grupo fosfato e o nitrogênio do grupo colina na região do grupo da cabeça com a normal à bicamada de POPC. (b) O ângulo formado

entre o fósforo do grupo fosfato e o carbono do grupo glicerol na região do grupo da cabeça com a normal à bicamada de POPG. 75

Figura 22 – Ilustra o fenômeno de Interdigitação de lipídeos das cadeias acílicas. Extraído de(99) 76

Figura 23 – Sistemas gerados com a bicamada de POPC com o peptídeo localizado na interface água/bicamada em (a) pelo método desenvolvido e em (c) pelo charmm_gui. Com o peptídeo localizado no interior da bicamada em (b) pelo método desenvolvido e em (d) pelo charmm_gui. As moléculas de água estão representadas como uma superfície roxa, o peptídeo representado em licorice e com os resíduos coloridos conforme sua natureza física, em azul, e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde, os polares e em branco os hidrofóbicos. Na bicamada, os grupos acíclicos das moléculas de POPC estão coloridos em ciano, na região polar os átomos de fósforo são as esferas marrons, os nitrogênios esferas azuis e os oxigênios esferas vermelhas. 79

Figura 24 – Sistemas gerados com a bicamada de POPC com o peptídeo localizado na interface água/bicamada em (a) pelo método desenvolvido e em (c) pelo charmm_gui. Com o peptídeo localizado no interior da bicamada em (b) pelo método desenvolvido e em (d) pelo charmm_gui. As moléculas de água estão representadas como uma superfície roxa, o peptídeo representado em licorice e com os resíduos coloridos conforme sua natureza física, em azul, e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde, os polares e em branco os hidrofóbicos. Na bicamada, os grupos acíclicos das moléculas de POPC estão coloridos em ciano e das de POPG em vermelho, na região polar os átomos de fósforo são as esferas marrons, os nitrogênios esferas azuis e os oxigênios esferas vermelhas. 79

Figura 25 – Em (a) e (c) representa o RMSD entre as posições dos átomos de fósforo da bicamada original e a bicamada pura e mista, respectivamente, no processo de fechamento após a inserção do peptídeo. As linhas preta e verde representam os sistemas 1 e 2 da bicamada pura, respectivamente. Em (b) e (d) mostra o RMSD no final do fechamento da bicamada após a inserção do peptídeo. 80

Figura 26 – Resultados da última coordenada de posição do sistema 2 depois 45 ns de simulação da Dinâmica Molecular em (a) e (c) utilizando o método

desenvolvido para a bicamada pura e mista, respectivamente e utilizando o charmm_gui, em (b) e (d), para a bicamada pura e mista, respectivamente. As moléculas de água estão representadas como uma superfície roxa, o peptídeo representado em licorice e com os resíduos coloridos conforme sua natureza física, em azul, e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde, os polares e em branco os hidrofóbicos. Na bicamada, os grupos acílicos das moléculas de POPC estão coloridos em ciano e das de POPG em vermelho, na região polar os átomos de fósforo são as esferas marrons, os nitrogênios esferas azuis e os oxigênios esferas vermelhas. 81

Figura 27 – Perfil de Densidade de Massa (PDM) da bicamada pura de POPC (a) do sistema 1 em relação ao eixo z, para os dois métodos em estudo, (b) do sistema 2 em relação ao eixo z, para os dois métodos em estudo. Para o script temos como resultado que as moléculas de água estão representadas pela cor preta, os fosfolipídeos pela cor marrom, a bicamada de POPC com a cor vermelha e o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue pela cor verde, para os resultados do charmm_gui temos que as moléculas de água estão representadas pela cor amarela, os fosfolipídeos pela cor castanha, a bicamada de POPC com a cor azul e o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue pela cor cinza. 83

Figura 28 – Perfil de Densidade de Massa (PDM) da bicamada mista de POPC com POPG (a) do sistema 1 em relação ao eixo z, para os dois métodos em estudo; (b) do sistema 2 em relação ao eixo z, para os dois métodos em estudo. Nos resultados obtidos pelo script temos que as moléculas de água estão representadas pela cor preta, os fosfolipídeos pela cor marrom, a bicamada de POPC com a cor azul, a bicamada de POPG com a cor vermelha e o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue pela cor verde, para os resultados do charmm_gui temos as moléculas de água estão representadas pela cor amarela, os fosfolipídeos pela cor castanha, a bicamada de POPC com a cor magenta, a bicamada de POPG com a cor laranja e o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue pela cor cinza. 84

Figura 29 – Parâmetro de ordem do Palmitoil e Olioil da bicamada de POPC obtido a partir (a) do sistema 1 e (b) do sistema 2 contendo a bicamada de POPC, utilizando o método desenvolvido (script) e o charmm_gui. Os círculos em preto representam a cadeia oleil dos sistemas 1 e 2 do script, os quadrados em vermelho representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do script, os triângulos em

amarelo representam a cadeia oleil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui, as estrelas em azul representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui. 86

Figura 30 – Parâmetro de ordem obtido (a) do sistema 1 e (b) do sistema 2 contendo bicamada de POPC/POPG considerando somente os fosfolipídeos de POPC, para o método desenvolvido (script) e o charmm_gui. Os círculos em preto representam a cadeia oleil dos sistemas 1 e 2 do script, os quadrados em vermelho representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do script, os triângulos em amarelo representam a cadeia oleil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui, as estrelas em azul representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui. 87

Figura 31 – Parâmetro de ordem obtido (a) do sistema 1 e (b) do sistema 2 contendo bicamada de POPC/POPG considerando somente os fosfolipídeos de POPG, para o método desenvolvido (script) e o charmm_gui. Os círculos em preto representam a cadeia oleil dos sistemas 1 e 2 do script, os quadrados em vermelho representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do script, os triângulos em amarelo representam a cadeia oleil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui, as estrelas em azul representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui. 88

Figura 32 – Parâmetro de ordem adaptado de (106), tendo em verde as cadeias oleil e a azul as cadeias palmitoil. 89

Figura 33– Mostra o cálculo da diferença de energia livre utilizando o método integração termodinâmica. 106

Figura 34 – Posições aonde foi inserido o peptídeo longo em função da coordenada de reação. 109

Figura 35– Desmembramento do peptídeo longo em (a) e do peptídeo curto em (b). O Colar está representado pela cor vermelha, a Região Interna pela cor verde e a Região Externa pela cor azul. 112

Figura 36- - Desmembramento dos fosfolipídeos de POPC e POPG, em (a) o POPC, está dividido pelo grupo Fosfato representado pela cor vermelha, o grupo Colina pela cor azul e Cauda pela cor verde e em (b) o POPG está dividido pelo grupo Fosfato representado pela cor vermelha, o grupo Glicerol pela cor amarela e a Cauda pela cor verde. 113

Figura 37 - O Perfil de energia livre em função do caminho de reação obtido pelo método ABF em bicamada de POPC (a) e POPC/POPG (c) para o peptídeo de

fusão da proteína E do vírus da Dengue. Amostragem da coordenada de reação para 10 ns de simulação em (b) para POPC e em (d) para POPC/POPG. A curva azul representa o peptídeo longo e a vermelha o peptídeo curto. 115

Figura 38 - Perfil da energia livre ao longo de todo o caminho de reação obtido pelo método ABF em bicamada de POPC, para o peptídeo longo. A simulação de 10 ns está representada pela cor vermelha, a de 15 ns pela cor azul, a de 20 ns pela cor verde, a de 25 ns pela cor alaranjada e a de 30 ns pela cor preta. 116

Figura 39 – Perfil de energia livre em função do caminho de reação obtido pelo método ABF em bicamada de POPC (a) com o peptídeo longo e (b) com o peptídeo curto. Para a simulação de 10 ns a simulação está representada pela cor vermelha, 15 ns pela cor azul, 20 ns pela cor verde, 25 ns pela cor alaranjada e 30 ns pela cor preta. 117

Figura 40 – Perfil da energia livre em função do caminho de reação obtido pelo método ABF em bicamada de POPC/POPG com o peptídeo longo (a) e com peptídeo curto (b). Para a simulação de 10 ns a simulação está representada pela cor vermelha, 15 ns pela cor azul, 20 ns pela cor verde, 25 ns pela cor alaranjada, 30 ns pela cor magenta e 35 ns pela cor preta. 118

Figura 41 – Perfil de energia livre em função do caminho de reação obtido pelo método ABF em (a) para a bicamada de POPC em (c) para a bicamada de POPC/POPG com o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue. A amostragem da coordenada de reação para a bicamada de POPC (b) e em (d) para a bicamada de POPC/POPG. O sistema contendo o peptídeo longo está representado pela cor azul e peptídeo curto representado pela cor vermelha... 120

Figura 42 - A posição do centro de massa do indol do Triptofano em relação ao centro de massa dos fósforos da superfície da bicamada de POPC (a) e POPC/POPG (b) mais próxima do peptídeo, para os dois sistemas simulados. A curva azul representa o peptídeo longo e a vermelha o peptídeo curto. 121

Figura 43 – O valor médio do RMSD em cada janela com relação à estrutura inicial, do peptídeo longo e do peptídeo curto ao longo do caminho de reação para sistema (a) com bicamada de POPC e (b) com POPC/POPG. A curva em azul representa o valor médio do RMSD do peptídeo longo e em vermelho o valor médio do RMSD do peptídeo curto. 123

Figura 44 – Conformações finais (em vermelho) e iniciais (em azul), e os respectivos RMSD médios, do peptídeo longo e do peptídeo curto em dois diferentes pontos do caminho de reação para sistema com bicamada de POPC e POPC/POPG. O primeiro ponto (a), (c), (e) e (g) representa o peptídeo fora da bicamada e o segundo ponto (b), (d), (f) e (h) o peptídeo está localizado dentro da bicamada na região na qual está localizado o mínimo de energia livre. 124

Figura 45 – RMSD em função do tempo para o peptídeo longo e para o peptídeo curto (a) para a bicamada de POPC e (b) para a bicamada de POPC/POPG, na região no qual está localizado o mínimo de energia livre. A curva em azul representa o RMSD do peptídeo longo e em vermelho o RMSD do peptídeo curto. 125

Figura 46 – Porcentagem de estrutura secundária média do peptídeo longo (a) e do curto (b) para a bicamada de POPC, para uma região compreendida entre -27 Å a 1 Å do caminho de reação, nos últimos 5 ns de simulação da DM. A linha preta está sendo representada pela estrutura secundária em hélice, em vermelho a estrutura secundária beta e em verde a estrutura secundária turn. 127

Figura 47 – Porcentagem de estrutura secundária média do peptídeo longo (a) e do curto (b) para a bicamada de POPC/POPG, para uma região compreendida entre -28 Å a 0 Å do caminho de reação, nos últimos 5 ns de simulação da DM. A linha preta está sendo representada pela estrutura secundária em hélice, em vermelho a estrutura secundária beta e em verde a estrutura secundária turn. 128

Figura 48 – Porcentagem da estrutura secundária em função do tempo do peptídeo longo (a) e do peptídeo curto (b) para a bicamada de POPC para uma região compreendida de -8 a -6 Å do caminho de reação. A linha preta está sendo representada pela estrutura secundária em hélice, em vermelho a estrutura secundária beta e em verde a estrutura secundária turn. 129

Figura 49 – Porcentagem da estrutura secundária em função do tempo do peptídeo longo (a) e do peptídeo curto (b) para a bicamada de POPC/POPG para uma região compreendida de -11 a -9 Å do caminho de reação. A linha preta está sendo representada pela estrutura secundária em hélice, em vermelho a estrutura secundária beta e em verde a estrutura secundária turn. 130

Figura 50 – Número de ligações de hidrogênio médio para cada janela entre o peptídeo longo e o peptídeo curto com a água em (a) para a bicamada de POPC e em (b) para a bicamada de POPC/POPG ao longo do caminho de reação. A linha em azul representa as ligações de hidrogênio médio entre o peptídeo longo e a água e a linha em vermelho as ligações de hidrogênio médio entre o peptídeo curto e a água..... 132

Figura 51 – Número médio de ligações de hidrogênio, por janela, entre o peptídeo longo e o peptídeo curto em (a) com as moléculas de POPC e em (b) com as moléculas de POPC/POPG, ao longo do caminho de reação. A linha em azul representa as ligações de hidrogênio entre o peptídeo longo e a bicamada e a linha em vermelho as ligações de hidrogênio entre o peptídeo curto e a bicamada..... 133

Figura 52– Número de ligações de hidrogênio em função do tempo entre o peptídeo longo e o peptídeo curto em (a) com moléculas da bicamada de POPC e em (b) com as moléculas da bicamada de POPC/POPG, na região do mínimo de energia livre. A linha em azul representa as ligações de hidrogênio entre o peptídeo longo e a bicamada e a linha em vermelho as ligações de hidrogênio entre o peptídeo curto e a bicamada. 134

Figura 53 – Ligações de hidrogênio mais frequentes entre o peptídeo longo e o curto com as moléculas de POPC da bicamada e o peptídeo com ele mesmo, para a região do caminho de reação de -8 a -6 Å. Em (a) As esferas em azuis representam os átomos de N e NH1 da ARG99, o átomo de NZ da LYS110 e o átomo N da GLY 106, a esfera em vermelho representa o átomo N da GLY109 do peptídeo longo, já as esferas em marrom estão indicando os átomos das moléculas de POPC envolvidas nas ligações. O peptídeo está em licorise e seus resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde os polares e em branco os hidrofóbicos e as moléculas de POPC em marrom. Em (b) as esferas em azuis representam os átomos de N e NH1 da ARG99, o átomo de NZ da LYS110 e o átomo N da GLY 106 e as esferas em marrom estão indicando átomos de moléculas de POPC. O peptídeo está em licorise e seus resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde os polares e em branco os hidrofóbicos e as moléculas de POPC em marrom..... 138

Figura 54 – Ligações de hidrogênio mais frequentes entre o peptídeo longo e o curto com a moléculas de POPC/POPG, para a região do caminho de reação de -11 a -9 Å. Em (a) a esfera em azul representa o átomo de NZ da LYS110, a esfera em branco do átomo N da PHE108 do peptídeo longo, já as esferas em marrom estão indicando os átomos das moléculas de POPC/POPG envolvidas nas ligações. O peptídeo está em licorise e seus resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde os polares e em branco os hidrofóbicos e as moléculas de POPC/POPG em marrom. Em (b) as esferas em azuis representam os átomos de NH1 e NH2 da ARG99 e o NZ da LYS110 do peptídeo curto, já as esferas em marrom representam os átomos de moléculas de POPC/POPG. O peptídeo está em licorise e seus resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde os polares e em branco os hidrofóbicos e as moléculas de POPC/POPG em marrom.
..... 139

Figura 55 – Valores médios para cada janela da energia de interação não ligada entre o peptídeo longo (cor preta) e peptídeo curto (cor vermelha) com a bicamada de POPC em função do caminho de reação de -27 a 1 Å..... 141

Figura 56– Valores médios para cada janela da interação não ligada entre o peptídeo de fusão com a bicamada de POPC/POPG, na região de -28 a 0 Å do caminho de reação, em (a) entre o peptídeo longo com a bicamada e em (b) entre o peptídeo curto com a bicamada. A linha vermelha representa a contribuição dos fosfolipídeos de POPC, a linha verde a contribuição dos fosfolipídeos de POPG e a linha preta a contribuição dos fosfolipídeos de POPC/POPG..... 142

Figura 57 – Valores médios para cada janela das energias de interação não ligadas entre o peptídeo de fusão, Colar, Região Interna e Região Externa com a bicamada de POPC em função do caminho de reação de -27 a 1 Å. Em (a) para o peptídeo longo e em (b) para o peptídeo curto. A cor preta representa as interações do peptídeo completo com a bicamada, as interações do Colar com a bicamada pela cor vermelha, as interações entre a Região Interna com a bicamada pela cor verde, e pela cor azul estão representadas as interações entre a Região Externa com a bicamada. 144

Figura 58 – Valores médios para cada janela das energias de interação não ligadas entre o peptídeo longo, Colar, Região Interna e Região Externa com a bicamada considerando a contribuição em (a) dos fosfolipídeos de POPC, em (b) dos

fosfolipídeos de POPG e em (c) dos fosfolipídeos de POPC/POPG, na região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações do peptídeo longo com a bicamada, as interações do Colar com a bicamada pela cor vermelha, as interações entre a Região Interna com a bicamada pela cor verde, e pela cor azul estão representadas as interações da Região Externa com a bicamada. ... 145

Figura 59 – Valores médios para cada janela das energias de interação não ligadas entre o peptídeo curto, Colar, Região Interna com a bicamada considerando a contribuição em (a) dos fosfolipídeos de POPC, em (b) dos fosfolipídeos de POPG e em (c) dos fosfolipídeos de POPC/POPG, na região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações do peptídeo longo com a bicamada, as interações do Colar com a bicamada pela cor vermelha, as interações entre a Região Interna com a bicamada pela cor verde. 146

Figura 60 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC com o Colar do peptídeo de fusão, em função do caminho de reação de -27 a 1 Å em (a) para o peptídeo longo e em (b) para o peptídeo curto. A cor preta representa as interações energéticas entre o Colar com a bicamada, as interações entre o Colar com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre o Colar com o grupo Colina e as interações entre o Colar com a Cauda pela cor azul. 149

Figura 61 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC/POPG com o Colar do peptídeo longo, considerando a contribuição em (a) dos fosfolipídeos de POPC, em (b) dos fosfolipídeos de POPG e em (c) dos fosfolipídeos de POPC/POPG, para a região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações energéticas entre o Colar com a bicamada, as interações entre o Colar com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre o Colar com o grupo Colina e as interações entre o Colar com a Cauda pela cor azul. 150

Figura 62 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC/POPG com o Colar do peptídeo curto, considerando a contribuição em (a) dos fosfolipídeos de POPC, em (b) dos fosfolipídeos de POPG e em (c) dos fosfolipídeos de POPC/POPG, para a região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações energéticas entre o Colar com a bicamada, as interações entre o Colar com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre o Colar com o grupo Colina e as interações entre o Colar com a Cauda pela cor azul. 151

Figura 63 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC com a Região Interna do peptídeo de fusão, em função do caminho de reação de -27 a 1 Å em (a) para o peptídeo longo e em (b) para o peptídeo curto. A cor preta representa as interações energéticas entre a Região Interna com a bicamada, as interações entre a Região Interna com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre a Região Interna com o grupo Colina e as interações entre a Região Interna com a Cauda pela cor azul. 155

Figura 64 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC/POPG com a Região Interna do peptídeo longo, considerando a contribuição em (a) dos fosfolipídeos de POPC, em (b) dos fosfolipídeos de POPG e em (c) dos fosfolipídeos de POPC/POPG, para a região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações energéticas entre a Região Interna com a bicamada, as interações entre a Região Interna com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre a Região interna com o grupo Colina e as interações entre a Região Interna com a Cauda pela cor azul. 156

Figura 65 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC/POPG com a Região Interna do peptídeo curto, considerando a contribuição em (a) dos fosfolipídeos de POPC, em (b) dos fosfolipídeos de POPG e em (c) dos fosfolipídeos de POPC/POPG, para a região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações energéticas entre a Região Interna com a bicamada, as interações entre a Região Interna com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre a Região Interna com o grupo Colina e as interações entre a Região Interna com a Cauda pela cor azul. 157

Figura 66 – Ilustra o peptídeo longo na qual foi dividido em região do Colar que está representado pela cor preta, Região Interna pela cor verde e Região Externa pela cor amarela e a bicamada de POPC está dividido em grupo Fosfato pela cor vermelha, grupo Colina pela cor azul e a região da Cauda pela cor branca, a fim de compreender quais são as regiões do peptídeo com a bicamada de POPC que ocorrem as interações energéticas mais significativas. 160

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 – Denominações e abreviaturas para os fosfolipídeos (60)</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 2 – Área por lipídeo da membrana de POPC e POPC/POPG para o script e para o charmm_gui</i>	<i>90</i>
<i>Tabela 3 – Ângulo de inclinação lipídica para a bicamada de POPC e POPC/POPG para o script e para o charmm_gui.</i>	<i>92</i>
<i>Tabela 4 – Interdigitação de lipídeos para a bicamada de POPC e POPC/POPG para o script e o charmm_gui.</i>	<i>94</i>
<i>Tabela 5 – Ilustra os aminoácidos na qual foi dividido o peptídeo longo e o peptídeo curto nas regiões do colar, “região interna” e “região externa”.</i>	<i>111</i>
<i>Tabela 6 - RMSE calculado entre perfis de energia livre obtidos para o mesmo sistema em diferentes tempos de simulação. Quanto menor o RMSE mais próximas são, em média, as curvas obtidas.</i>	<i>118</i>
<i>Tabela 7– Ligações de hidrogênio formadas pelos resíduos de aminoácidos do peptídeo longo e do curto com as moléculas de POPC e com o próprio peptídeo, para a região compreendida entre -8 a -6 Å do caminho de reação.</i>	<i>135</i>
<i>Tabela 8 – Ligações de hidrogênio formadas pelos resíduos de aminoácidos do peptídeo longo e o curto com as moléculas de POPC/POPG e com o próprio peptídeo, para a região compreendida entre -11 a -9 Å do caminho de reação.</i>	<i>137</i>
<i>Tabela 9 – Valores médios e desvio padrão das interações energéticas totais (kcal/mol) entre o peptídeo longo, o peptídeo curto e seus desmembramentos com a bicamada de POPC e POPC/POPG, na região do mínimo de energia livre.</i>	<i>147</i>

Tabela 10 – Média da energia de interação eletrostática e de van der Waals, entre a região do Colar dos peptídeos com cada uma das regiões da bicamada de POPC e POPC/POPG e para a bicamada toda, para a janela que contém o mínimo de energia livre. 153

Tabela 11 – Média da energia de interação eletrostática e de van der Waals, entre a região do Triptofano dos peptídeos com cada uma das regiões da bicamada de POPC e POPC/POPG e para a bicamada toda, para a janela que contém o mínimo de energia livre. 159

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABF	<i>Adaptive Biasing Force</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BPTI	Inibidor de Tripsina Pancreática Bovina
CM	Centro de Massa
DEN-1	Dengue tipo 1
DEN-2	Dengue tipo 2
DEN-3	Dengue tipo 3
DEN-4	Dengue tipo 4
DM	Dinâmica Molecular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FEP	<i>Free Energy Perturbation</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
NAMD	<i>Nanoscale Molecular Dynamics program</i>
NMD	<i>New Molecular Dynamics</i>
NpT	<i>Ensemble Isotérmico-Isobárica</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PA	Ácido Fosfático

PC	Fosfatidilcolina
PDM	Perfil de Densidade de Massa
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Fosfatidilinositol
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
PMF	<i>Potential of Mean Force</i>
POPC	<i>Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina</i>
POPG	<i>Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol</i>
PS	Fosfatidilserina
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
S_{CD}	parâmetro de ordem
TI	<i>Thermodynamic Integration</i>
UTR	<i>Untranslated Regions</i>
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
VSV	Vírus da Estomatite Vesicular
+ssRNA	<i>Positive-sense single-stranded RNA</i>

Lista de Aminoácidos

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

Sumário

Capítulo 1: Introdução	29
1.1 - Dengue	31
1.1.1 – Vírus da Dengue	31
1.1.2 – Proteína de Envelope (E)	37
1.1.3 – Peptídeo de Fusão	39
1.2 – Membranas	43
1.2.1 – Membrana Celular	43
1.2.2 – Fosfolipídios	45
1.2.3 – Modelos de Membranas	46
1.3 – Simulações de Dinâmica Molecular	49
1.3.1 – Simulações Computacionais no Estudo de Biomoléculas	49
Capítulo 2: Objetivo	53
2.1 – Objetivo Geral:	53
2.2 – Objetivos Específicos:	53
Capítulo 3: Métodos Computacionais	55
3.1 – Introdução	55
3.2- Dinâmica Molecular	55
3.2.1 – Campo de Força	58
3.2.2 – Condições Periódicas de Contorno	61
3.2.3 – Raio de Corte	62
3.2.4– Particle Mesh Ewald (PME)	63
3.2.5– Controle de Temperatura e Pressão	66
Capítulo 4: Estudo Comparativo entre Charmm_gui e Script	68
4.1 – Introdução	68
4.2 – Objetivo	68

4.3 – Métodos Computacionais	69
4.3.1 – Construção dos Sistemas em Estudo	69
4.3.1.1 – Processo de inserção do peptídeo na bicamada	70
4.3.2 – Perfil de Densidade de Massa	72
4.3.3 – Parâmetro de Ordem	72
4.3.4 – Área por Lipídeo	74
4.3.5 – Ângulo de Inclinação Lipídica	74
4.3.6 – Interdigitação de Lipídeos	75
4.4 – Detalhes Computacionais	76
4.5 – Resultados e Discussões	78
4.5.1 – Sistemas Gerados pelo <i>Script</i> e <i>Charmm_gui</i>	78
4.5.2 – Perfil de Densidade de Massa e Espessura da Membrana	82
4.5.3 – Parâmetro de Ordem	85
4.5.4 – Área por Lipídeo	89
4.5.5 – Ângulo de Inclinação Lipídica	91
4.5.6 – Interdigitação de Lipídeos	93
4.6 – Conclusões	96
<i>Capítulo 5: Estudo do Processo de Adsorção do Peptídeo de Fusão em Modelos de Membranas</i>	97
5.1 – Introdução	97
5.2 – Objetivo	97
5.3 – Métodos Computacionais	98
5.3.1 – RMSD	98
5.3.2 - RMSE	98
5.3.3 - Estrutura Secundária	99
5.3.4 - Ligações de Hidrogênio	99
5.3.5 – Cálculos de Energia Livre por Simulações de DM	100
5.3.5.1 – Cálculos de Energia Livre	100
5.3.5.1.1 – Integração Termodinâmica	103
5.3.5.2 – Adaptive Biasing Force (ABF)	106

5.3.6 - Interações não Ligadas.....	107
5.4 – Detalhes Computacionais.....	108
5.5 – Resultados e Discussões.....	113
5.5.1 – <i>Adaptive Biasing Force (ABF)</i>	113
5.5.2 – RMSD.....	122
5.5.3 – Estrutura Secundária	126
5.5.4 – Ligações de Hidrogênio	131
5.5.5 – Análise Detalhada das Interações Peptídeo-Bicamada	140
5.5.6 – Conclusão.....	161
<i>Capítulo 6: Perspectivas</i>	163
<i>Capítulo 7: Referências</i>	164
<i>Anexos – Artigos Publicados</i>	173

Capítulo 1: Introdução

Os seres vivos são vulneráveis a diversas doenças, tais como tuberculose, candidíase, gripe, catapora, malária, etc. Essas doenças podem ser causadas por bactérias, fungos e vírus, podendo apresentar sintomas diferentes no organismo do ser humano.

A Dengue é uma doença febril aguda causada por um vírus, sendo uma das mais importantes doenças infecciosas emergentes da atualidade (1–4). Ela é uma arbovirose (5) que afeta o homem e representa um sério problema de saúde pública no mundo, especialmente nos países subtropicais e tropicais (2), onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do mosquito *Aedes aegypti*, seu vetor. A Dengue é causada por um tipo de *flavivírus* (1–3,6–8), que são vírus envelopados de geometria esférica, seus sintomas podem ser assintomáticos ou apresentar amplo espectro clínico, podendo até evoluir para o óbito. Hoje é uma das doenças com maior incidência no Brasil, atingindo a população de todos os estados, independentemente da classe social.

O vírus da Dengue tem o nucleocapsídeo constituído pela proteína C e envolvendo este conjunto temos duas proteínas virais: a proteína E e a proteína M (2,3,8). A proteína E é considerada uma importante proteína viral, pois forma projeções na superfície do vírus e possui determinantes antigênicos para hemaglutinação e neutralização (7–9).

A mesma possui uma sequência de aminoácidos rica em resíduos hidrofóbicos e de glicinas chamada de peptídeo de fusão (10). O peptídeo de fusão está envolvido no processo de fusão do vírus com a membrana celular endossomal, ele é responsável pela injeção do material genético viral no meio intracelular.

A proteína E é glicosilada (11) e forma homodímeros dispostos paralelamente à superfície viral em pH neutro, sendo incapaz de interagir com a membrana alvo. Com a exposição ao pH ácido do meio endossomal a proteína E sofre alteração conformacional que a leva para a conformação fusogênica, na qual

o peptídeo de fusão está exposto. Independentemente da mudança estrutural sofrida pela glicoproteína viral durante este processo, seu peptídeo de fusão mantém a mesma conformação em pH neutro e ácido conforme evidenciado por trabalhos experimentais (2,12).

Para tentar entender o mecanismo de como o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue se liga à célula, os métodos de simulação e modelagem computacional são sem dúvida uma ferramenta poderosa. Estes métodos de simulação complementam e estreitam a ligação entre a teoria e o experimento.

A técnica de simulação por Dinâmica Molecular (DM) é um método que simula o comportamento de um sistema de muitos corpos em escala molecular utilizando a Mecânica Clássica. A ideia é bastante simples: podemos calcular o comportamento de um sistema conhecendo o conjunto de condições iniciais, mais as forças de interação entre os constituintes do sistema, para observar como o sistema evolui com o tempo (13–16).

O método de Dinâmica Molecular tornou-se um método popular e poderoso para o estudo de bicamadas lipídicas (17) e proteínas de membrana na última década devido aos avanços nas áreas de *software* e *hardware* (18,19). Entretanto, algumas simulações de Dinâmica Molecular podem envolver um número elevado de átomos, resultando em tempos de simulação muito altos, o que é altamente indesejável, especialmente na fase de equilíbrio do sistema (20).

Neste trabalho apresentamos o estudo da interação do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue em bicamadas lipídicas, investigando a diferença de afinidade (energia livre de ligação) de duas sequências de resíduos de aminoácidos da proteína E do vírus da Dengue que contêm o peptídeo de fusão (resíduos 88-123 e 98-110) com dois modelos de membrana compostos por fosfolipídios POPC (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina*) e pela mistura de POPC e POPG (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol*) na proporção 4:1 utilizando simulações de dinâmica molecular e o método *Adaptive Biasing Force* (ABF).

Faremos uma análise estrutural a fim de verificar se o peptídeo sofreu alguma alteração na sua estrutura quando inserido na bicamada e será realizado um estudo da interação energética entre o peptídeo de fusão com a bicamada, para

verificar qual região do peptídeo de fusão interage melhor com a bicamada, com o objetivo de, futuramente, encontrar mecanismos que inibam o processo de infecção do vírus da Dengue.

Também foi desenvolvido um *script* cuja finalidade é inserir proteínas de membrana em bicamadas lipídicas causando a mínima perturbação possível, de modo a minimizar o tempo de simulação necessário para o reestabelecimento do estado de equilíbrio do sistema. Este método foi aplicado na inserção do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue em bicamadas de POPC (puras) e POPC com POPG na proporção 4:1 (mistas) e o resultado foi comparado com o mesmo processo realizado em um *site* de preparação de arquivos de entrada para simulações, o *charmm_gui* (21–23).

Dessa forma, para termos uma base teórica para o desenvolvimento deste trabalho, apresentaremos, nos tópicos seguintes, alguns conceitos sobre a Dengue, membranas e Dinâmica Molecular.

1.1 - Dengue

1.1.1 – Vírus da Dengue

Os vírus são pequenos agentes que podem infeccionar seres humanos, animais e plantas, causando doenças. Eles são capazes de se replicarem somente no interior de células de outros organismos e são encontrados em quase todos os ecossistemas, sendo descobertos em 1898 por Beijerinck (24).

Os vírus são constituídos de material genético (RNA ou DNA) e um capsídeo de proteínas, que envolve o material genético, não possuindo estruturas celulares (25).

Dentre os vírus de fita simples positivo (+ssRNA), os *flavivírus* têm considerável importância epidemiológica (25,26). Mais de 50% dos vírus classificados neste grupo estão associados a febres hemorrágicas e encefalites que

podem ser letais para o ser humano. Há muitas *flaviviruses* tais como a febre amarela, a encefalite do Nilo ocidental, a encefalite japonesa, a encefalite europeia, mas a Dengue é a principal *flavivirose* tropical (27).

Os *flavivírus* são vírus envelopados e de geometria esférica, possuem um tamanho relativamente pequeno, com cerca de 40 a 60 nanômetros de diâmetro, e aproximadamente 11Kb em tamanho (28).

Os primeiros casos de Dengue no continente americano datam do final do século XVIII. No entanto, a doença ainda era branda e não apresentava risco de se tornar algo de importância mundial (29). Tal cenário mudou radicalmente com a Segunda Guerra Mundial, na qual o vírus da Dengue foi espalhado por várias partes do mundo e sua proliferação se intensificou com o rápido crescimento populacional. Além disso, em 1954, surgiu a Dengue Hemorrágica o que fez com que a doença se tornasse mais conhecida.

A Dengue é uma virose transmitida para o ser humano por mosquitos do tipo *Aedes*. O vetor é um mosquito da família *culicidae*, gênero *Aedes*, subgênero *stegomyia*, espécie *aegypti*. Ele é mais conhecido como *Aedes aegypti* (que significa casa egípcia) ou mosquito da Dengue, é proveniente da África e já pode ser encontrado em vários países, com maior ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais (2), como observado na Figura 1.

O mosquito da Dengue é sensível a repelentes baseados no composto N,N-dietilmetatoluamida. A Dengue é transmitida pela fêmea do *Aedes aegypti*, tendo o mosquito um ciclo de reprodução de 10 dias. Quando o mosquito nasce, ele passa por quatro estágios de crescimento, que são ovo, larva, pupa e adulto (30).

Em todo o mundo existem quatro tipos de Dengue, já que o vírus causador da doença possui quatro sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. No Brasil, conforme ilustrado na Figura 2, já circulam os quatro tipos, sendo que o tipo 4 não era registrado há mais de 28 anos. A Dengue tipo 4 apresenta risco a pessoas já contaminadas com os vírus 1, 2 ou 3, que são vulneráveis à manifestação alternativa da doença. Complicações podem levar pessoas infectadas ao desenvolvimento da Dengue Hemorrágica (31).

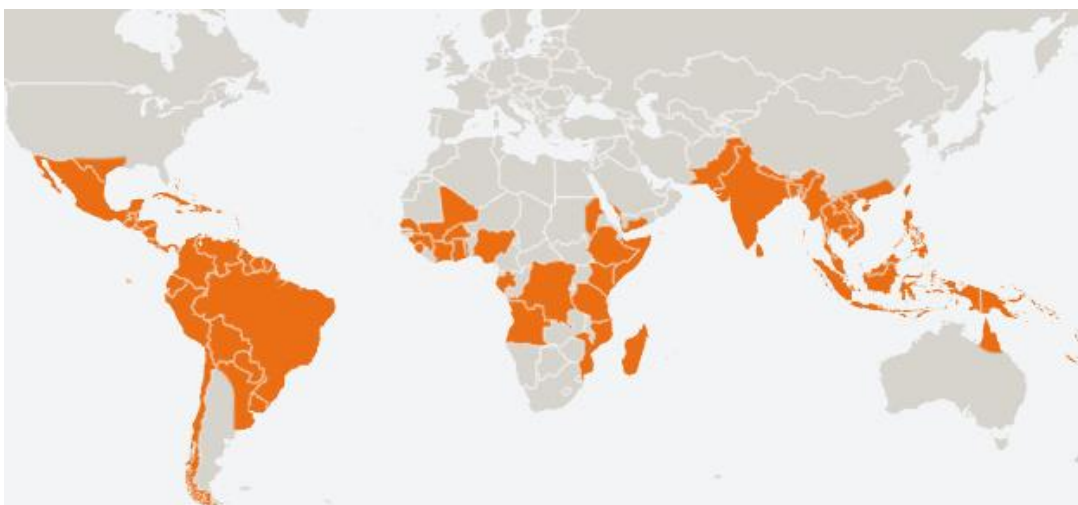


Figura 1 – Áreas de infecção do vírus da Dengue no mundo. Extraído de (32)

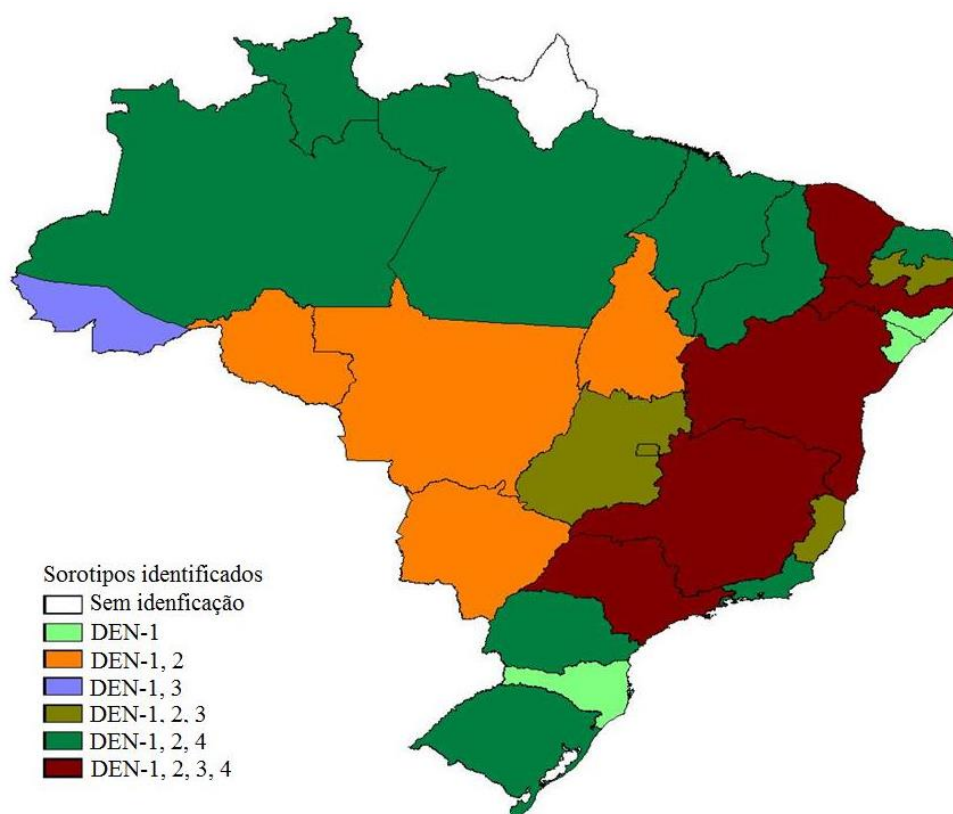


Figura 2 – Sorotipos do vírus da Dengue circulantes no Brasil por Unidade Federativa. Extraído de (33)

A Figura 3 representa a situação epidemiológica da Dengue no Brasil no período de 2004 a 2016 (34). Pode-se observar que 2013 foi um ano no qual o surto

da Dengue foi elevado e depois em 2014 ocorreu uma queda no surto, isso porque o Ministério da Saúde investiu em políticas de prevenção que tiveram como resultado a diminuição acentuada do número de casos da Dengue, aproximadamente 59,5%, o que explica a queda brusca de 2013 para 2014 (35). Em 2015, o cenário volta a ser preocupante quando os casos de Dengue têm um aumento de 180% em relação ao ano de 2014. Tal aumento está relacionado com os períodos estendidos de calor, lixo acumulado e água parada, além disso, 2015 foi o ano mais quente da história (36).

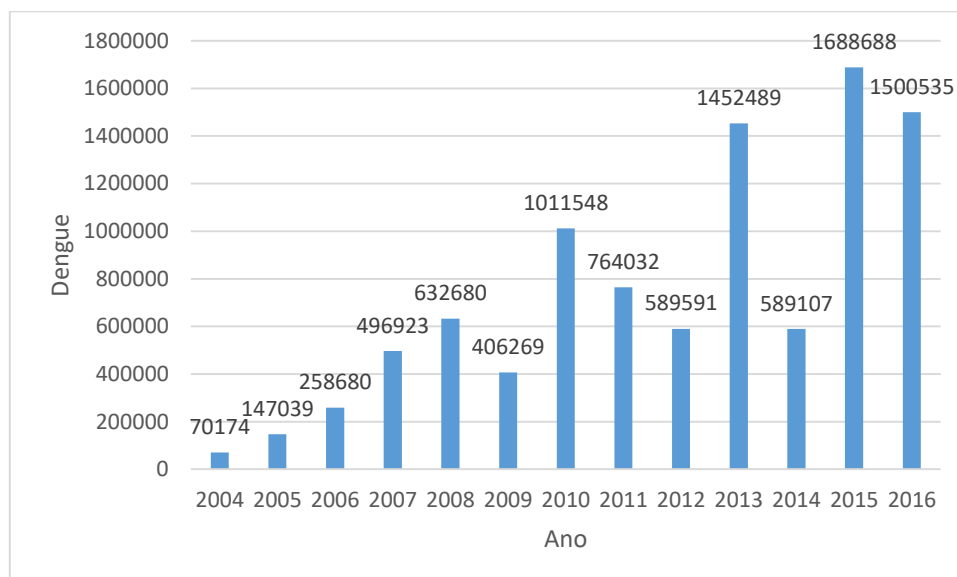


Figura 3 – Situação epidemiológica da Dengue no Brasil no período de 2004 até 2016. Adaptado de (34).

A Dengue pode se apresentar – clinicamente – de quatro formas diferentes: Infecção Inaparente, Dengue Clássica, Febre Hemorrágica da Dengue e Síndrome de Choque da Dengue. Dentre eles, destacam-se a Dengue Clássica e a Febre Hemorrágica da Dengue.

Após a transmissão do vírus da Dengue por meio da picada do mosquito, a primeira replicação ocorre em linfonodos locais, fibroblastos, células musculares estriadas e lisas. Com isso, há a disseminação do microrganismo. Quando o vírus entra no sangue, as membranas do vírus se fundem com a das células dos tecidos que envolvem os vasos sanguíneos e então começa a se multiplicar. Ocorre então

uma inflamação nesses vasos e o sangue começa a circular lentamente na corrente sanguínea, prejudicando a oxigenação dos nossos órgãos, causando cansaço típico de pessoas contaminadas. As dores abdominais provêm da inflamação do fígado quando o vírus invade e ataca nosso sistema circulatório. O vírus também diminui a produção de plaquetas no sangue, que são responsáveis pela coagulação (5).

A forma mais leve da doença é a Dengue Clássica que é semelhante à gripe. Os sintomas duram até uma semana. A pessoa infectada tem febre alta (39°C a 40°C), dores de cabeça, cansaço, dor muscular e nas articulações, indisposição, enjôos, vômitos, manchas vermelhas na pele, dor abdominal, entre outros sintomas.

A Dengue Hemorrágica é uma doença grave e se caracteriza por alterações da coagulação sanguínea da pessoa infectada. A produção de plaquetas diminui tanto que além dos sintomas da Dengue “comum”, aparecem sangramentos (hemorragias) na pele, na forma de manchas vermelhas. A Dengue Hemorrágica pode provocar hemorragias nasais, gengivais, urinárias, gastrointestinais ou uterinas. A Dengue mata quando os vasos ficam tão frágeis, que acontecem vazamentos de líquidos do sangue, que podem se acumular na pleura (membrana que envolve o pulmão) e no abdômen, fazendo com que o doente entre em estado de choque (31,37).

Para formar as proteínas virais necessárias para a montagem viral, o genoma do vírus da Dengue codifica uma poliproteína processada pela combinação de serino-proteases virais e enzimas celulares. Como resultado desta clivagem, são obtidas três proteínas estruturais (C, prM, e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (3,28,38–41) esquematizadas na Figura 4. O RNA genômico do Dengue apresenta uma longa janela aberta de leitura (ORF - *open reading frame*), na montante e na jusante da ORF existem duas regiões não traduzidas denominadas 5'-UTR e 3'-UTR (*untranslated regions*), que apresentam estruturas secundárias que são importantes ao processo de tradução, à montagem do vírus e à interação do RNA no complexo de replicação (42).

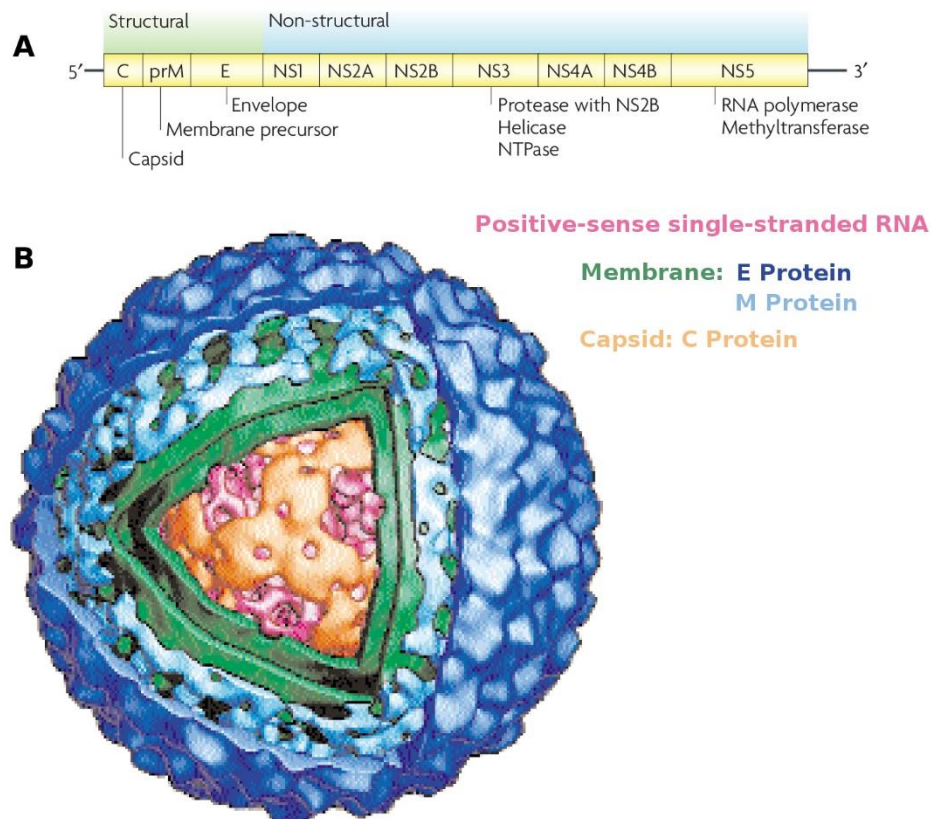


Figura 4 – Representação esquemática da estrutura do vírus da Dengue e do genoma viral. (A) Organização do genoma do vírus da Dengue. (B) Ilustração dos resultados obtidos por criomicroscopia da estrutura da partícula viral. Podem ser observadas duas camadas protéicas mais externas (azuis claro e escuro), compostas pelas proteínas E e M, uma bicamada lipídica (verde), um nucleocapsídeo (laranja), composto pela proteína C, e finalmente, o RNA genômico (rosa) empacotado no centro do vírus. Adaptado de Smith (43) e Whitehead (44).

A proteína C está envolvida no empacotamento do genoma viral e é composta por 120 resíduos de aminoácidos. Já a proteína glicosilada prM de aproximadamente 18,5 kDa, é clivada tardiamente por uma protease tipo furina presente na célula hospedeira, gerando a proteína estrutural M de 8 kDa. A proteína M, juntamente com a proteína E, formam a estrutura externa da partícula viral. prM possivelmente funciona auxiliando a correta montagem e enovelamento da proteína E (45). A proteína E, exposta na superfície do vírus, apresenta peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Essa glicoproteína é responsável pelas principais propriedades biológicas do vírus, incluindo a interação com receptores de superfície da célula, fusão com a membrana endossomal da célula hospedeira em pH ácido, age como hemaglutinina viral (liga o vírus à célula hospedeira) e constitui o

principal componente antigênico do vírus, sendo responsável pela neutralização de anticorpos (46).

A proteína NS1 possui peso molecular de aproximadamente 46 kDa, existe sob três formas: associada à célula, na superfície da célula e no meio extracelular. Inicialmente ela foi caracterizada como um antígeno solúvel presente no soro e em tecidos de animais experimentalmente infectados. Hoje está fortemente relacionada com a indução de uma resposta imune humoral. Contudo, são várias evidências sobre a participação de NS1 na replicação do RNA viral.

As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas que estão associadas à membrana, com um peso molecular de 22, 14, 16 e 27 kDa, respectivamente. Em particular, a NS2B está associada à NS3 formando um complexo ativo serino-protease.

A proteína NS3 possui aproximadamente 70 kDa, é uma proteína multifuncional que, além de promover o processamento da poliproteína, tem a atividade helicásica (dissociação da fita dupla de RNA), NTPásica (hidrólise do ATP como fonte de energia) e RTPásica (capeamento do RNA viral) (47,48). Ela é considerada uma proteína essencial para o processo de replicação viral.

Já a NS5 é a maior e a mais conservada dentre todas as proteínas não estruturais dos *flavivírus* apresentando um peso molecular na ordem de 104 kDa. Ela é caracterizada pelo motivo metiltransferase no domínio N-terminal e pela atividade RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) localizada no domínio C-terminal (41).

1.1.2 – Proteína de Envelope (E)

O envelope viral é composto por duas proteínas: a proteína E e a proteína M. A proteína E forma projeções na superfície do vírus, e possui determinantes antigênicos para hemaglutinação e neutralização, sendo considerada a principal proteína viral (49). Tal proteína desempenha atividades importantes como por

exemplo: participa do processo de fusão de membrana; montagem do vírus; receptor de ligação e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes (9).

A proteína E é glicosilada e forma homodímeros dispostos paralelamente à superfície viral em pH neutro, com seu peptídeo de fusão inacessível ao meio externo, sendo que cada monômero é constituído de três domínios distintos denominados: domínio I, que constitui a região central N terminal; domínio II, o qual compreende uma região de dimerização e peptídeo de fusão; e domínio III, que abriga a região do receptor de ligação (1,12,11).

O domínio III tem sido sugerido como o receptor de reconhecimento e ligação do vírus à membrana celular, devido ao seu dobramento semelhante à imunoglobulina, sendo então associado com estruturas que tem a função de adesão. Além disso, essa região está projetada perpendicularmente à superfície do vírus mais do que qualquer outra parte da proteína E (50).

A proteína E é classificada como uma proteína de fusão de classe II, devido a sua estrutura ser formada principalmente por folhas- β e de seu peptídeo de fusão estar localizado no meio da sequência da proteína (12).

O diagrama linear dos resíduos de aminoácidos da proteína E do vírus da Dengue está esquematizado na Figura 5.,

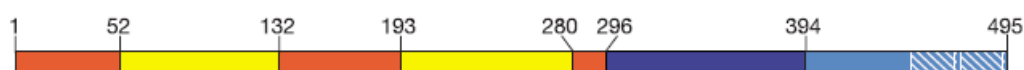


Figura 5 – Diagrama linear dos resíduos de aminoácidos correspondentes a cada domínio da proteína E do vírus da Dengue. A cor vermelha representa o domínio I, a amarela o domínio II e a azul o domínio III da proteína E do vírus da Dengue. Extraído de Modis (12).

A reorganização estrutural necessária para aquisição da conformação fusogênica é desencadeada pela exposição da proteína E do vírus da Dengue ao pH ácido e se inicia pelo rearranjo das orientações relativas dos domínios da proteína E esquematizada na Figura 6 (12). O domínio II gira aproximadamente 30° em relação ao domínio I. Já o domínio III sofre um maior deslocamento na transição de dímero para trímero, pois gira cerca de 70° e desloca seu centro de massa em

36Å à frente do domínio II, fazendo com que ele não se encontre mais estendido linearmente junto com os domínios I e II.

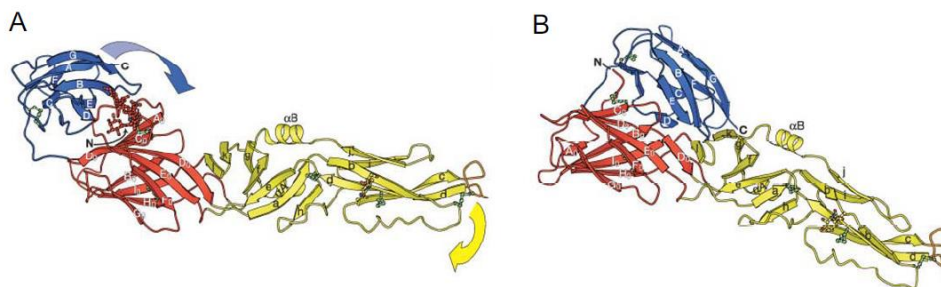


Figura 6 – Rearranjo dos domínios da proteína E durante a transição para trímero. (A) Estrutura do monômero na conformação pré-fusogênica, encontrada nos dímeros de proteína E em pH neutro. (B) Estrutura do monômero na conformação pós-fusogênica, encontrada nos trímeros após exposição ao pH ácido. Ocorre um rearranjo dos domínios II e III (demonstrado pelas setas em A), que mudam sua orientação relativa, fazendo com que o C-terminal se aproxime do peptídeo de fusão, ficando 39 Å mais próximo. O peptídeo de fusão permanece essencialmente com a mesma conformação antes e depois da fusão. Extraído de Modis (12)

No caso da proteína E do vírus da Dengue, ocorre a formação de trímeros e exposição dos peptídeos de fusão no topo da molécula desencadeada pela exposição ao pH ácido do meio endossomal. Apesar da glicoproteína viral sofrer uma mudança estrutural durante este processo, seu peptídeo de fusão mantém a mesma conformação em pH neutro e ácido (12).

1.1.3 – Peptídeo de Fusão

Para que ocorra a infecção dos vírus envelopados é necessária a fusão entre as membranas viral e celular, que é mediada pelas glicoproteínas (51), e que, por essa razão, são denominadas proteínas de fusão. Estas glicoproteínas contêm uma parte de sua sequência de aminoácidos com grande número de resíduos hidrofóbicos e de glicinas, capaz de interagir com a membrana alvo, conhecida como “peptídeo de fusão” (10).

As proteínas de fusão têm as seguintes características (10):

- a maior parte de sua massa é composta da porção externa à membrana viral;

- o N-terminal está sempre localizado no domínio externo;
- os domínios transmembrana e C-terminal são relativamente pequenos;
- contêm carboidratos N-ligados;
- formam oligômeros;
- estão presentes em alta densidade na membrana viral.

A Figura 7 mostra as 3 classes de proteínas de fusão conhecidas como classe I, classe II e classe III (40).

Pode-se exemplificar as proteínas de classe I pelas proteínas de fusão dos ortomixovírus, retrovírus e paramixovírus (40). Elas têm estrutura predominante em α -hélices e formam espículas triméricas no envelope viral. A conformação pós-fusão apresenta uma estrutura bastante típica, conhecida como *hairpin*, ou grampo de cabelo como mostrado na Figura 7.

Para exemplificar as proteínas de fusão de classe II temos os *alfavírus* e os *flavivírus*(40). Elas possuem três domínios, que estão principalmente organizados em folhas- β , e também formam *hairpins*. Estas proteínas formam homo ou heterodímeros, que se encontram paralelos ao envelope viral. O peptídeo de fusão está localizado em um *loop* entre duas fitas β , que se localiza na interface interna do dímero. As proteínas de classe II não sofrem clivagem proteolítica durante sua maturação, o que ocorre nas proteínas de classe I. No entanto, é necessária a clivagem de proteínas de membrana que se encontram associadas a estas proteínas de fusão. Após a exposição ao pH ácido, a proteína se reorganiza em trímeros perpendiculares à membrana viral, expondo o peptídeo de fusão, catalisando a fusão de membranas.

As proteínas de classe III são representadas pelos vírus VSV, rabdovírus (40). Tais proteínas também apresentam trímeros de *hairpins*, mas combinam elementos estruturais de ambas as classes de proteínas de fusão. Apresentam uma região central em α -hélice semelhante às proteínas de classe I. No entanto, cada domínio de fusão está localizado na ponta de folhas- β alongadas, característica marcante das proteínas de classe II.

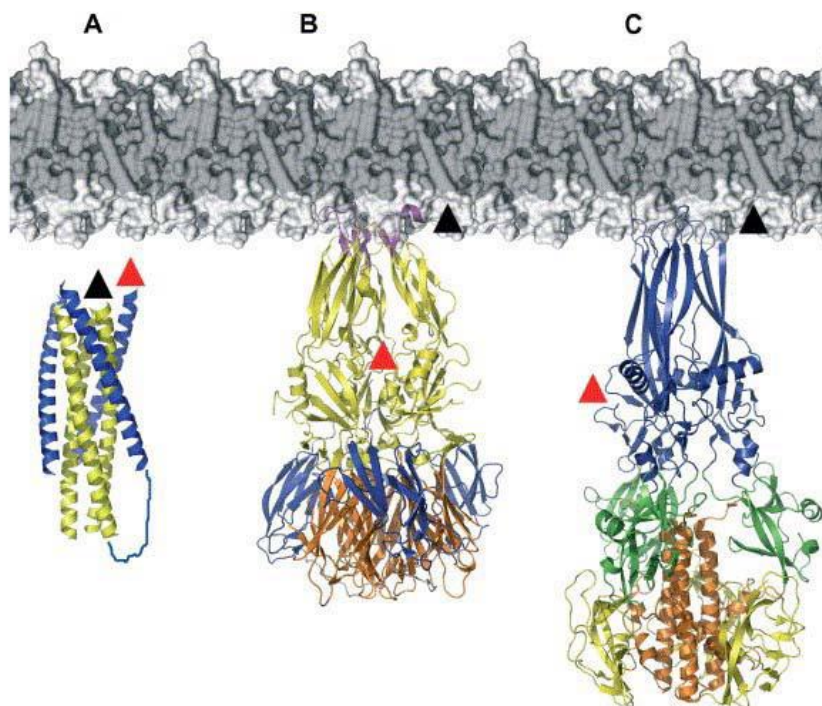


Figura 7 – Representação esquemática das estruturas das proteínas de fusão de classes I, II e III no estado conformacional pós-fusogênico. (A) Proteína gp41 do HIV-1 (classe I); (B) Proteína E dos flavivírus (classe II); (C) Glicoproteína G do VSV (classe III). Extraído de Weissenhorn (52).

A Figura 8 mostra o mecanismo de fusão induzido pelas proteínas de fusão de classe II. Inicia-se com a reorganização da proteína em trímeros desencadeada pela exposição ao pH ácido do meio endossomal. Durante esse processo, ocorre um rearranjo da orientação relativa dos domínios II e III da glicoproteína, que acarreta na exposição do peptídeo de fusão, que se insere na membrana alvo, com o ancoramento da proteína nas membranas celular e viral. Posteriormente, ocorre uma reestruturação do domínio III, que traz o peptídeo de fusão e o domínio transmembrana C-terminal para posições justapostas, ocasionando a aproximação das membranas viral e celular ocorrendo a formação do poro de fusão que permite a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma (40,53).

Em seus estudos, Stauffer et al. (2) sintetizaram duas sequências de resíduos de aminoácido da proteína E do vírus da Dengue do resíduo 88 até o 123 e do 98 até o 110, sendo a segunda sequência considerada o peptídeo de fusão clássico.

Por meio de técnicas de espectrofluorimetria, Stauffer fez o estudo de interação com vesículas lipídicas. Como resultado Stauffer (2), observou experimentalmente que os mecanismos de interação molecular entre o peptídeo de

fusão do vírus da Dengue com a membrana celular ocorrem com maior eficiência quando a razão entre o número de peptídeos de fusão e lipídeo é maior.

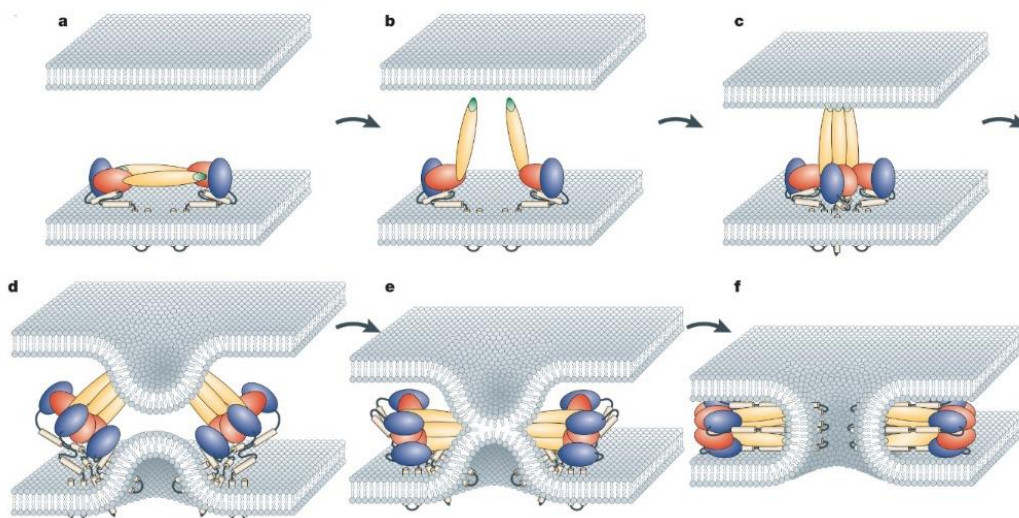


Figura 8 – Mecanismos propostos para o processo de fusão catalisado pelas glicoproteínas virais. O dímero é representado na superfície viral, com o seu peptídeo de fusão interno em verde, domínio I em vermelho, II em amarelo e III em azul (a). A proteína se liga ao receptor específico e é internalizada por endocitose. Após exposição ao pH ácido do meio endossomal, ocorre um rearranjo na orientação relativa dos domínios II e III, expondo o peptídeo de fusão (b) e permitindo a formação de trímeros e a inserção do peptídeo de fusão na membrana alvo (c). A reestruturação da proteína continua, com o “dobramento” do domínio III, que aproxima as membranas viral e endossomal. É formada a haste de hemifusão (d) e (e) e finalmente o poro de fusão (f) após o total rearranjo trimérico da proteína de fusão, onde o peptídeo de fusão e a porção transmembrana se encontram próximos. Extraído de Mukhopadhyay (45).

Através do experimento de fluorescência e pelo método de parallax, Stauffer (2) observou que o resíduo de Triptofano está localizado aproximadamente 12,5 Å abaixo da superfície da membrana.

Neste trabalho será realizado um estudo da sequência de resíduos de aminoácidos do resíduo 88 até o 123 da proteína E do vírus da Dengue que será denominado de peptídeo longo (pep_longo) e do resíduo 98 até o 110 denominado de peptídeo curto (pep_curto). Na Figura 9 estão esquematizadas as duas sequências.

O peptídeo longo apresenta ligações de dissulfeto (figura 9 b), entre os resíduos CYS92 e CYS116 em sua estrutura, o que possivelmente contribui para uma maior estabilidade conformacional em comparação com o peptídeo curto.

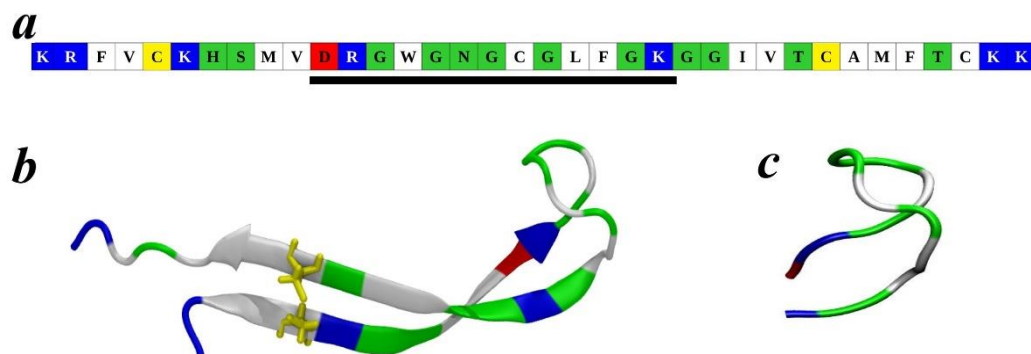


Figura 9 – Sequência dos resíduos de aminoácidos do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue, os resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho, resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde, os polares, e em branco os hidrofóbicos. (a) mostra o diagrama linear. (b) Sequência de aminoácido do resíduo 88 até o 123 da proteína E do vírus da Dengue (peptídeo longo), a ponte de dissulfeto entre os resíduos CYS92 e CYS116 esta representada pela cor amarela e (c) Sequência de aminoácido do resíduo 98 até o 110 da proteína E do vírus da Dengue (peptídeo curto).

1.2 – Membranas

1.2.1 – Membrana Celular

A membrana celular tem uma estrutura que delimita todas as células vivas, tanto as procarióticas como as eucarióticas. Ela estabelece a fronteira entre o meio intracelular do meio extracelular, formando uma barreira que impede que o conteúdo celular de escapar e se misturar com o meio que a rodeia. A membrana celular é responsável pelo controle de entrada e saída de nutrientes da célula e serve como ancoragem na fixação de vírus ou toxinas.

Em sua composição e complexidade, a membrana celular é constituída basicamente de lipídeos, proteínas e glicídios, como pode ser observado na Figura 10.

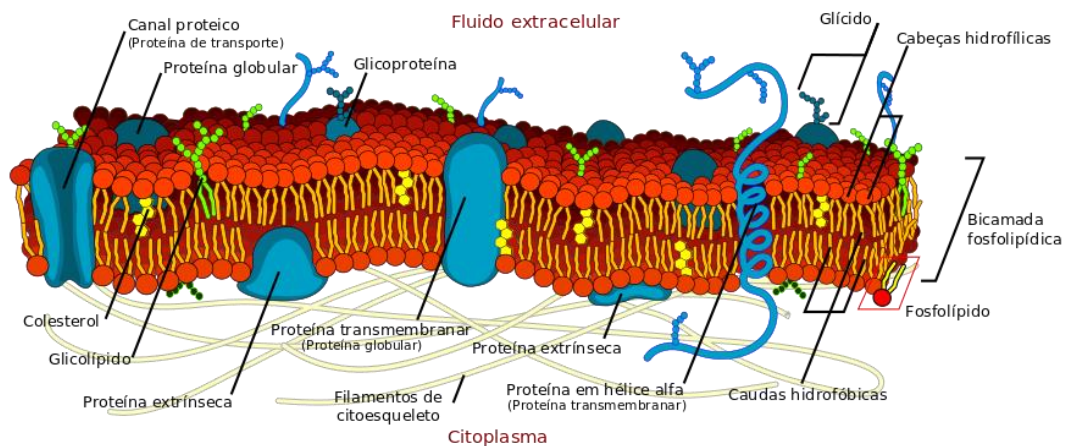


Figura 10 – Principais componentes de uma membrana celular. Extraído de (54)

A espécie predominante em uma membrana são os lipídeos, que podem ser os fosfolipídios, esfingolipídios, glicolipídeos e os esteróis (55). A membrana plasmática não é uma estrutura estática, os lipídeos movem-se proporcionando fluidez à membrana. A Figura 11 mostra os movimentos dos lipídeos que ocorrem com maior frequência, são eles: flexão, difusão lateral e rotação, podendo ainda ter o movimento que os lipídeos podem trocar de camadas, sendo este mais raro de acontecer, também conhecido por *flip-flop* (56,57).

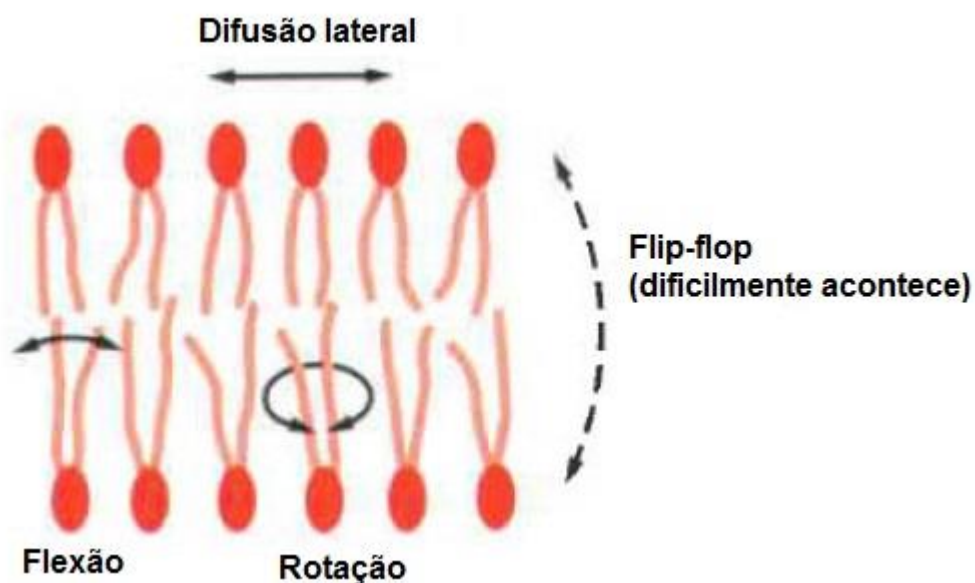


Figura 11 – Movimentos dos fosfolipídios na membrana plasmática. Extraído de (56).

1.2.2 – Fosfolipídios

As membranas biológicas são constituídas basicamente de fosfolipídios (58). As moléculas de fosfolipídios, possuem tanto regiões hidrofílicas quanto hidrofóbicas. A região hidrofílica é a região da “cabeça” de um fosfolipídio, essa região se associa a moléculas polares de água e a região hidrofóbica refere-se em longas “caudas” de ácidos graxos não-polares, não sendo solúveis em água ou capazes de se associarem a substâncias hidrofílicas.

Os fosfolipídios são derivados do grupo glicerol, e suas cadeias alifáticas (R^1 e R^2) podem ser saturadas ou insaturadas (Figura 12). A nomenclatura de um fosfolipídio é dada pelo tamanho das cadeias alifáticas e pelo grupo ligado na posição X no fosfato.

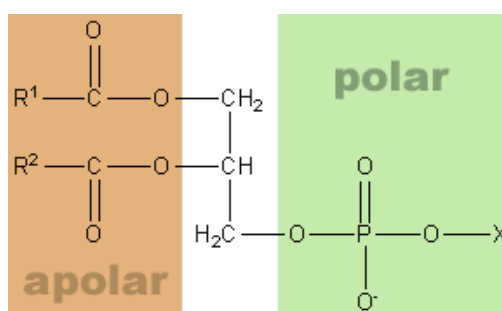


Figura 12 – Estrutura base de um fosfolipídio. Extraído de (59)

Os fosfolipídios têm sua denominação feita de acordo com o álcool polar presente na cabeça. A tabela 1 mostra as denominações dos fosfolipídios mais comuns, bem como as abreviaturas.

Tabela 1 – Denominações e abreviaturas para os fosfolipídeos (60)

Grupo polar ligado ao fosfato	Nome Genérico	Nome Sistemático	Abreviatura
Hidrogênio	Ácido Fosfatídico	ácido 1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfórico	PA
Colina	Fosfatidilcolina	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina	PC
Etanolamina	Fosfatidiletanolamina	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina	PE
Serina	Fosfatidilserina	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoserina	PS
Glicerol	Fosfatidilglicerol	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol	PG
Inositol	Fosfatidilinositol	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoinositol	PI

Tais fosfolipídios a pH fisiológico (pH 7) podem ter cargas líquidas nulas (zwitteriônicas) ou cargas líquidas negativas (aniônicos). Os que apresentam cargas totais nulas são os PC e PE, já os que têm cargas negativas são os PA, PS, PG e PI. Neste trabalho estudaremos os fosfolipídios POPC e uma mistura de POPC com POPG na proporção 4:1.

A molécula de POPC (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina*) (Figura 13) que consiste de um grupo colina ligado a um fosfato e possui duas caudas, uma insaturada e outra saturada, sua fórmula molecular é $C_{42}H_{82}NO_8P$.

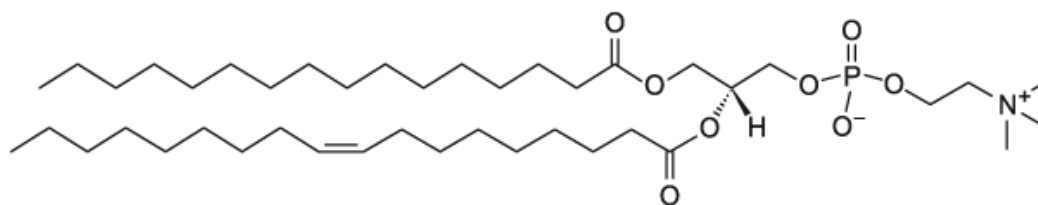


Figura 13 – Estrutura do lipídeo POPC (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina*). Extraído de (61).

A Figura 14 mostra uma molécula de POPG (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol*) que consiste de um grupo glicerol ligado a um fosfato e possui duas caudas, uma insaturada e outra saturada, esta molécula é aniônica e possui carga resultante igual a -1, sua fórmula molecular é $C_{40}H_{76}O_{10}P$.

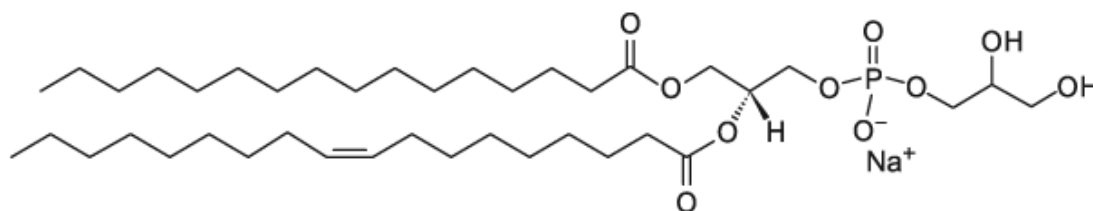


Figura 14 – Estrutura do lipídeo POPG (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol*). Extraído de (62).

1.2.3 – Modelos de Membranas

A fim de estudar e reproduzir as propriedades das membranas celulares, podemos construir diferentes modelos de membranas, sendo cada tipo de modelo

usado para diferentes aplicações. Dependendo da complexidade do que está sendo estudado, os sistemas de modelos de membranas podem ser construídos por um único lipídeo ou por uma mistura de vários lipídeos de diferentes classes.

A Figura 15 mostra os principais modelos de membranas que surgiram ao longo da história da Ciência. Na Figura 15A Irving Langmuir propôs um modelo do qual os lipídeos da membrana se encontram em uma única camada com a extremidade hidrofílica virada para a água e a hidrofóbica, dos lipídeos, encontrava-se afastada da água, voltada para o ar.

Gorter e Grendel (Figura 15B) fizeram o primeiro modelo estrutural composto por bicamada fosfolipídica. Sugerindo que a membrana plasmática seria constituída por duas camadas de fosfolipídios cujas caudas apolares hidrofóbicas estariam direcionadas para o interior da membrana e as caudas polares, hidrofílicas estariam apontadas para o exterior.

Davison e Danielli (Figura 15C) propuseram uma estrutura um pouco mais complexa. Segundo eles, a bicamada fosfolipídica seria coberta, externa e internamente, por uma camada proteica unida às extremidades polares hidrófilas dos fosfolipídios. Depois de algum tempo eles reformularam seu modelo (Figura 15D) e propuseram a existência de poros proteicos que formariam passagens hidrofílicas através das quais as substâncias polares poderiam permear a membrana.

Singer e Nicholson (Figura 15E) preconizaram um modelo de membrana chamado de mosaico fluido, formado de uma bicamada fosfolipídica, onde se encontram inseridas proteínas. Existem dois tipos de proteínas inseridas, uma delas atravessa toda a membrana, denominada proteína intrínseca, e a outra se localiza sobre a membrana, estas são chamadas de proteínas periféricas. É considerado neste modelo que a membrana é uma estrutura dinâmica e fluida, prevê uma distribuição aleatória da proteína na bicamada lipídica além de contatos moleculares quase permanentes, difusão limitada, reorganização dinâmica e importantes elementos estruturais que conferem o dinamismo da mesma (63).

O lipídeo de POPC é tipicamente considerado um modelo para experimentos biofísicos. Sua composição da cadeia saturada e a cadeia insaturada

imita a composição de fosfolipídio de mamíferos. Por exemplo, o POPC é um excelente substituto sintético da *fosfatidilcolina* da gema de ovo.

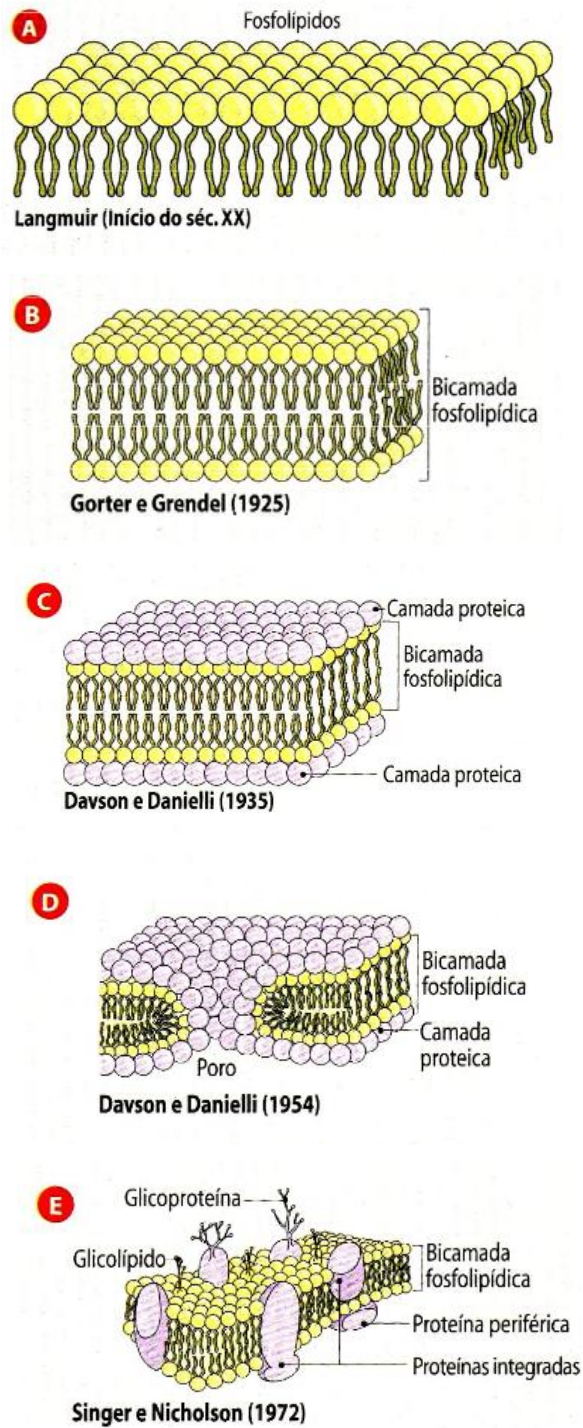


Figura 15 – Principais modelos de membranas. Extraído de (63)

O POPG é um lipídeo aniônico encontrado nas membranas de mamíferos em pequenas quantidades, cerca de 1 a 2% do total dos fosfolipídios. Mesmo sendo um lipídeo com pequena presença na bicamada lipídica é um dos principais lipídeos no surfactante pulmonar (64). Embora sua presença em membranas animais seja pouca; é abundante em algumas bactérias e plantas.

Alguns fosfolipídios são parametrizados para serem usados em simulações de Dinâmica Molecular. Estas parametrizações são descritas por campos de forças tais como CHARMM, OPLS, AMBER e GROMOS. Nas simulações realizadas neste trabalho foi utilizado o campo de força CHARMM em sua versão 36.

1.3 – Simulações de Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica de simulação computacional cujo foco principal é descrever a evolução temporal das posições e velocidades dos átomos constituintes de um sistema. Assim, por meio da integração das equações de movimento, determinam-se as propriedades de equilíbrio ou de transporte que o caracterizam (13,14). A DM tem sido aplicada com sucesso ao longo dos anos nos mais variados campos de estudo, tais como Física, Química, Biologia, Medicina, Astrofísica, Ciência dos Materiais, Polímeros, etc.

1.3.1 – Simulações Computacionais no Estudo de Biomoléculas

Para a compreensão dos fenômenos físicos e químicos dos materiais, os métodos de simulação e modelagem computacional são, sem dúvida, uma ferramenta poderosa. Tais métodos de simulação complementam e estreitam a ligação entre a teoria e o experimento.

A técnica de simulação por DM é um método que procura simular o comportamento de um sistema de muitos corpos em escala molecular. A ideia é

bastante simples, podemos calcular o comportamento de um sistema se soubermos o conjunto de condições iniciais, mais as forças de interação entre os constituintes do sistema. Deste modo, o modelo mostrará como o sistema evolui com o tempo.

Por meio da Dinâmica Molecular é possível obter propriedades que dependam da configuração do sistema, como estrutura cristalina, energia de coesão, módulo de elasticidade, transição de fase, densidade de carga, condutividade térmica e etc.

O método da Dinâmica Molecular foi proposto pela primeira vez por Alder e Wainwright (65) em 1957 para investigar o diagrama de fase de um sistema de esferas duras, e em particular as regiões sólidas e líquidas. No sistema de esferas duras, as partículas se comportam como partículas livres entre as colisões e interagem por colisões instantâneas.

Uns dos primeiros exemplos de um cálculo de DM com um potencial contínuo baseado no método da diferença finita do tempo de integração foi feito em 1960 por Gibson et al. (66). Este cálculo foi realizado para um sistema de 500 átomos e foi executado em um IBM 704, sendo gasto, aproximadamente, um minuto para cada intervalo de tempo.

Em 1964 Rahman (67), um dos pioneiros em DM, estudou várias propriedades do argônio líquido e utilizou o potencial de Lennard-Jones em um sistema com 864 átomos, realizado em um computador CDC 3600. A base de seus algoritmos ainda é utilizada em muitos programas de DM em operação ao redor do mundo.

Loup Verlet (68) calculou em 1967 o diagrama de fase do argônio utilizando o potencial Lennard-Jones, e fez o cálculo das funções correlação para testar as teorias do estado líquido. Hansen e Verlet (69) em 1969 investigaram a transições de fase no mesmo sistema utilizando o método de Monte Carlo.

O método de DM foi limitado por muitos anos ao *ensemble* microcanônico em que são conservados o volume, o número de partículas e a energia total.

Andersen(70) foi o pioneiro do método de pressão constante *New Molecular Dynamics* (NMD) no qual o volume tem possibilidade para flutuar. O método de Andersen, que representa um *ensemble* com entalpia e pressão constantes,

introduziu um parâmetro C , que determina a proporção que o volume flutua. No equilíbrio, quantidades estáticas calculadas neste *ensemble* aproximado são independentes do valor deste parâmetro.

Parrinello e Rahman (71) estenderam o método de Andersen para permitir que a caixa de simulação possa mudar sua forma e, conseqüentemente, explorar a relação entre os potenciais de interação e as estruturas cristalinas. O método NMD foi então usado para investigar a transformação da temperatura induzida entre fases não-condutoras e superiônicas do cristal de Ni.

A primeira simulação de DM em proteínas foi feita por McCammon et al. (72), em 1977 com a proteína Inibidor de Tripsina Pancreática Bovina (BPTI). Foi resolvida a equação de movimento para os átomos com uma função empírica de potencial de energia.

Nosé e Klein (73) em 1983 realizaram a simulação de DM para sistemas moleculares em cristais de nitrogênio sob pressão, investigaram as transformações estruturais no Tetrafluoreto de carbono. Nos estudos foi observado que ocorreram mudanças no volume e forma da célula na DM e também transições de fase.

Em 2006 Cavallari et al. (74) realizaram simulações de DM para estudar a estabilidade da enzima protease do HIV-1 (HIV-1 PR) em solução aquosa em diferentes estados de enovelamento, contendo diferentes conteúdos de hélices α e folhas β (13 e 25%, respectivamente). O campo de força CHARMM foi utilizado juntamente com o modelo de água TIP3P em sistema com número de partículas, volume e temperatura constantes.

Simulações de DM foram utilizadas por Carlsson et al. (75) e Nervall et al. (76), ambos em 2008, como ferramenta para cálculos de energia livre de ligação de complexos obtidos pelo método de *docking* empregando estruturas cristalográficas da enzima transcriptase reversa do HIV-1.

O estudo das interações da articaína foi realizado por Prates e Skaf (2009) (77), com membranas do modelo de POPC empregando simulações computacionais de dinâmica molecular. Das simulações de equilíbrio da articaína em POPC, obtiveram-se informações como o seu comportamento conformacional, também foram realizadas simulações de não equilíbrio, utilizando a técnica de Dinâmica

Molecular de Caminho Induzido, em que uma molécula de articaína foi removida do interior da membrana para o meio aquoso, por meio de uma força aplicada em seu centro de massa, com isso estimaram a energia livre da articaína neutra entre os estados em que se encontra no meio aquoso e no interior da membrana de POPC.

Em 2009 Vieira et al. (78) averiguaram por meio de simulação de DM os efeitos da temperatura entre 298 para 338K do *xylanases hydrolyze xylan*, que é um dos polissacarídeos de vegetais mais abundantes encontrados na natureza e têm muitas aplicações em biotecnologia.

Simulações de DM podem ser úteis na área de estruturas de proteínas através da escala de afinidade. Mazzé (79) mostrou que essa escala é fácil de ser usada e com vantagem de revelar o domínio transmembramar em α -hélice da proteína sem a necessidade de saber nada além da estrutura primária da mesma.

Por meio de uma simulação de DM, Fuzo et al. (80) estudaram três porções do ectodomínio da proteína E presente na superfície do vírus da Dengue em solvente. Neste estudo também foi modelado as condições fisiológicas de pH neutro e pH ácido de endossomos que desencadeiam o processo de fusão.

Prakash et al. (81) empregaram simulações metadinâmicas para estudar a estabilidade da estrutura de proteínas do vírus da Dengue sob condições de pH baixo e alto. A energia livre obtida ao longo da coordenada de reação demonstra que o pH afeta a interface do domínio, em ambas as conformações, do monômero E do vírus da Dengue.

Capítulo 2: Objetivo

2.1 – Objetivo Geral:

- Caracterizar e investigar as interações entre o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue e modelos de membranas biológicas (POPC e POPC com POPG na proporção 4:1) utilizando simulações de Dinâmica Molecular, a fim de compreender melhor o mecanismo de infecção da célula pelo vírus, com a perspectiva de contribuir para o desenvolvimento de fármacos que combatam a infecção viral.

2.2 – Objetivos Específicos:

- Desenvolver um *script* cuja finalidade é inserir proteínas de membrana em bicamadas lipídicas causando a mínima perturbação possível, de modo a minimizar o tempo de simulação necessário para o reestabelecimento do estado de equilíbrio do sistema. O método foi aplicado na criação das janelas utilizadas para os cálculos de energia livre;

- Comparar as bicamadas geradas pelo *script* com bicamadas geradas com a proteína já inserida no sistema pelo *charmm_gui*. A comparação será feita por meio do cálculo de propriedades físico-químicas das bicamadas tais como: perfil de densidade de massa, espessura da membrana, parâmetro de ordem, área por lipídeos, ângulo de inclinação lipídica e interdigitação de lipídeos;

- Estudar a afinidade e a posição relativa do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue com modelos de membranas biológicas, utilizando Dinâmica Molecular. Para isso será calculado o perfil de energia livre em função do caminho de reação, com o método *Adaptive Biasing Force* (ABF);

- Verificar se o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue sofreu alguma alteração na sua estrutura quando inserido na membrana, utilizar-se-á a estrutura secundária, RMSD e ligação de hidrogênio, para o estudo desta análise;

- Investigar detalhadamente as interações não ligadas, interações de van der Waals e interações eletrostáticas, entre o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue e as bicamadas, a fim de determinar a região do peptídeo e quais os tipos de interações que são mais relevantes.

Capítulo 3: Métodos Computacionais

3.1 – Introdução

Serão descritos neste capítulo os mecanismos necessários para se fazer uma simulação de Dinâmica Molecular. Iremos definir como ocorre as interações entre as moléculas devido ao campo de Força, que é um conjunto de funções capazes de descreverem o comportamento de um dado sistema molecular em uma simulação de Dinâmica Molecular.

3.2- Dinâmica Molecular

Conforme mencionado anteriormente, o conceito da Dinâmica Molecular foi proposto por Alder (65) para simular o comportamento mecânico de sistemas moleculares. A base teórica da Dinâmica Molecular engloba vários dos importantes resultados produzidos por grandes nomes da Mecânica, tais como Euler, Hamilton, Lagrange e Newton.

As técnicas de Dinâmica Molecular clássicas consistem em resolver as equações de Newton do movimento (equação 1) ou outras relacionadas a um sistema molecular (15,82,83).

$$\vec{F}_i(t) = m_i \cdot \vec{a}_i \quad (1)$$

Sendo que \vec{F}_i é a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo t , e \vec{a}_i é a aceleração do átomo i de massa m_i .

As forças que atuam sobre cada partícula são obtidas calculando-se a primeira derivada do potencial em relação às posições desses átomos como exemplificado na equação 2.

$$\vec{F}_i(t) = - \frac{\partial V(r_i)}{\partial \vec{r}_i} \hat{r} \quad (2)$$

A DM usa da mecânica clássica para modelar átomos e/ou moléculas como partículas, cada uma com um potencial de interação que age em todas as outras partículas dentro de sua esfera de alcance. O campo de força que cada par de partículas experimenta é determinado por meio de um potencial. A partir da energia potencial (equação 2) pode-se calcular a força total em uma dada partícula e usando a segunda Lei de Newton de movimento (equação 1), a aceleração da partícula pode ser determinada. Sabendo sua velocidade e posição iniciais combinadas com o vetor aceleração, pode-se determinar o movimento das partículas e qualquer posição e/ou velocidade, isto é feito para cada partícula do sistema, completando assim um intervalo de tempo. O processo continua nos vários intervalos de tempo.

Por ser a energia potencial uma função das posições de todas as partículas do sistema, sua solução analítica fica inviável. Para resolver isso, usam-se algoritmos que aproximam as posições, velocidades e acelerações das partículas, a partir de uma expansão de Taylor.

Iniciando o sistema com a posição, velocidade e aceleração em um determinado tempo t , podemos calcular a nova configuração do sistema no tempo $t + \Delta t$, utilizando a expansão de Taylor.

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \frac{\partial \vec{r}}{\partial t}(t)\Delta t + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial t^2}(t)\Delta t^2 + \dots \quad (3)$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial t}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t)\Delta t + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \vec{v}}{\partial t^2}(t)\Delta t^2 + \dots \quad (4)$$

$$\vec{a}(t + \Delta t) = \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t + \Delta t) = \vec{a}(t) + \frac{\partial^2 \vec{v}}{\partial t^2}(t)\Delta t + \dots \quad (5)$$

Verlet em 1967 (68) desenvolveu um algoritmo de integração para ser utilizado em cálculos de Dinâmica Molecular para determinar as equações de

movimento. Depois deste algoritmo surgiram outros como: Beeman (84), Leap-Frog (85) e Velocity-Verlet (86).

No algoritmo de Velocity-Verlet os resultados são mais precisos que os produzidos pelo algoritmo de Verlet, ele utiliza as posições, velocidades e acelerações no mesmo passo de simulação e os erros de arredondamento são minimizados. O programa NAMD (*NANoscale Molecular Dynamics programs*) (83) utiliza o algoritmo de Velocity-Verlet,

Multiplicando a equação da aceleração (equação 5) por $\Delta t/2$ obtemos:

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t + \Delta t) \frac{\Delta t}{2} = \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t) \frac{\Delta t}{2} + \frac{\partial^2 \vec{v}}{\partial t^2}(t) \frac{\Delta t^2}{2} + \dots \quad (6)$$

Isolando o último termo:

$$\frac{\partial^2 \vec{v}}{\partial t^2}(t) \frac{\Delta t^2}{2} = \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t + \Delta t) \frac{\Delta t}{2} - \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t) \frac{\Delta t}{2} + \dots \quad (7)$$

Substituindo este termo na segunda derivada da velocidade (equação 4) temos que:

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t) \Delta t + \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t + \Delta t) \frac{\Delta t}{2} - \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t) \frac{\Delta t}{2} + \dots \quad (8)$$

Reorganizando a equação obtivemos:

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\Delta t}{2} \left(\frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t) + \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(t + \Delta t) \right) + \dots \quad (9)$$

Logo, a expressão para a velocidade no algoritmo de Velocity-Verlet é dada por:

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\Delta t}{2} (\vec{a}(t) + \vec{a}(t + \Delta t)) + \dots \quad (10)$$

Assim temos que as equações de movimento que regem o algoritmo de Velocity-Verlet são dadas por:

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \Delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad (11)$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \Delta t [\vec{a}(t) + \vec{a}(t + \Delta t)] \quad (12)$$

O algoritmo começa com o cálculo da posição, equação 11, no tempo $t + \Delta t$ utilizando a posição, velocidade e a aceleração no tempo t , determina a força e a aceleração no tempo $t + \Delta t$ e depois calcula a nova velocidade, equação 12.

Obtidas as novas coordenadas, velocidades e acelerações, é possível reiniciar o ciclo e a repetição deste procedimento nos fornece a obtenção da trajetória de todas as partículas do sistema ao longo do tempo, que posteriormente são utilizadas para análises do sistema.

Em uma simulação de DM a maior parte do gasto é no cálculo das energias de interação de cada sítio, estas energias dependem fortemente do campo de força escolhido, assunto que será discutido posteriormente.

3.2.1 – Campo de Força

O conjunto de funções capaz de descrever o comportamento de um dado sistema molecular é denominado Campo de Força (15,82,83). O Campo de Força é conhecido como uma função de energia potencial, que permite que a energia potencial total do sistema, $V(r)$, seja calculada a partir da estrutura tridimensional (3D) do mesmo. $V(r)$ é descrito como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não ligados (interações de van der Waals e de Coulomb). Um Campo de Força típico é descrito pela equação 13:

$$V(r) = \sum V_r + \sum V_\theta + \sum V_\varphi + \sum V_{vdW} + \sum V_{ele} \quad (13)$$

V_r é a energia de estiramento da ligação em relação a seu valor de equilíbrio, V_θ é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação a seu valor de equilíbrio, V_φ é a energia devido à torção em torno de uma ligação, V_{vdW} representa a energia das interações de van der Waals e V_{ele} representa as energias de atração ou repulsão eletrostática entre duas cargas.

As equações para representar os potenciais harmônicos devido às oscilações dos comprimentos e ângulos de ligação com relação aos valores de equilíbrio é a descrita pela Lei de Hooke, mostrada nas equações 14 e 15:

$$V_r = k_r(r - r_0)^2 \quad (14)$$

$$V_\theta = k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad (15)$$

Sendo que r e θ são os comprimentos e ângulos de ligação, respectivamente, r_0 e θ_0 são os correspondentes valores de equilíbrio e k_r e k_θ as constantes de força para a restituição aos respectivos valores de equilíbrio.

A equação 16 representa o potencial de energia para uma torção:

$$V_\varphi = \frac{V_n}{2}(1 + \cos(n\Phi - \gamma)) \quad (16)$$

V_n é a barreira de energia para a torção, n é o número de máximos (ou mínimos) de energia em uma torção completa, Φ é o ângulo diedro e γ é o ângulo de fase (defasagem no ângulo diedro que pode gerar um ponto de mínimo ou de máximo na posição $\Phi = 0$).

As interações das ligações do campo de força estão esquematizadas na Figura 16.

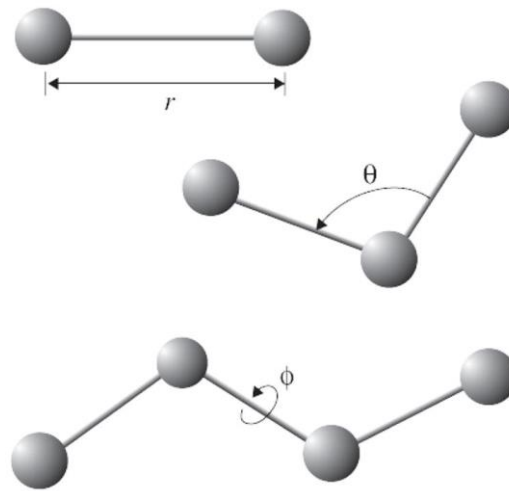


Figura 16 – Mostra as interações das ligações do campo de força sendo que r e θ são os comprimentos e ângulos de ligação e Φ é o ângulo diedro. Adaptado de Phillips (83).

As equações que representam as interações entre pares de átomos não ligados covalentemente (i, j) são descritas por potenciais compostos pelos termos de van der Waals e eletrostático representados pelos potenciais de Lennard-Jones (equação 17) e de Coulomb (equação 18), respectivamente.

$$V_{vdW} = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (17)$$

$$V_{ele} = \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_r r_{ij}} \quad (18)$$

Assim sendo, ε_{ij} é a profundidade do potencial entre a barreira atrativa e a repulsiva, e σ_{ij} é a distância finita na qual o potencial interpartícula é zero. Ambos são parâmetros ajustados experimentalmente ou por cálculos teóricos, r_{ij} a distância entre as cargas, q_i e q_j correspondem à magnitude das cargas pontuais de cada átomo, ε_0 a permissividade do espaço livre e ε_r a constante dielétrica relativa do meio.

Ainda podemos citar, como exemplo, outras funções potenciais que incluem outros termos para descrever especificamente as ligações de hidrogênio ou para

acoplar oscilações entre ângulos e comprimentos de ligação com o objetivo de obter uma melhor concordância com espectros vibracionais. Em grande parte, a escolha do Campo de Força depende do sistema a ser estudado e das propriedades que serão analisadas. No caso de sistemas biomoleculares, os Campos de Força mais utilizados são: CHARMM, GROMOS, AMBER, OPLS, CVFF, entre outros (82).

Em uma simulação de Dinâmica Molecular temos que definir como ocorre as interações entre as moléculas devido ao campo de Força e isso depende das Condições Periódicas de Contorno, do Raio de Corte, do *Particle Mesh Ewald* (PME) e do Controle de Temperatura e Pressão, assuntos que serão discutidos nos próximos tópicos.

3.2.2 – Condições Periódicas de Contorno

Em uma simulação de Dinâmica Molecular quanto maior o número de moléculas incluídas no sistema, maior será o tempo necessário para realizar os cálculos, por isso é conveniente incluir o menor número de moléculas possível capaz de descrever as condições experimentais (87). Estas simulações possuem, normalmente, de 10^2 a 10^6 partículas, representando uma quantidade insignificante quando comparada aos átomos presentes no sistema macroscópico (82). Para suprir este problema utiliza-se as condições periódicas de contorno (82,87–89).

A condição periódica de contorno permite que os átomos do sistema sejam colocados em uma caixa, rodeada por outras caixas, réplicas da inicial. Ao longo da simulação, o movimento molecular de uma molécula será idêntico ao movimento da mesma molécula nas caixas replicadas. Se uma molécula sai da caixa original, sua imagem entra pela face oposta da caixa, com a mesma velocidade, a fim de conservar o mesmo número total de moléculas na caixa central, como pode ser visto na Figura 17.

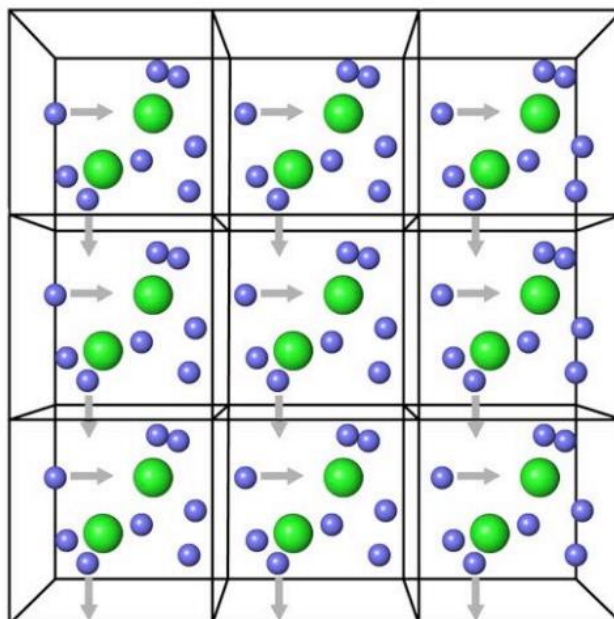


Figura 17 – Representação das condições periódicas de contorno em uma simulação por DM. Somente a caixa central é simulada, enquanto que as réplicas garantem a continuidade do sistema, isto é, ausência de contato das moléculas com o vácuo. As setas representam o movimento de uma molécula na caixa central e o mesmo movimento é reproduzido nas caixas réplicas. Extraído de Verli (87).

Para a implementação das condições periódicas de contorno temos que analisar as interações não ligadas, interações de van der Waals (calculadas pelo potencial Lennard-Jones) e interações eletrostáticas (calculadas pelo potencial de Coulomb), exercidas sobre cada partícula por todas as partículas do sistema. O cálculo dessas interações não ligadas em simulações de Dinâmica Molecular gera um custo computacional muito alto, pois a soma delas irá conter infinitos termos, assim, para otimizar a simulação de Dinâmica Molecular temos que realizar aproximações. Nos próximos dois tópicos abordar-se-á tais aproximações (82,87,88).

3.2.3 – Raio de Corte

O potencial de Lennard-Jones é um potencial que decai com um fator de aproximadamente 10^{-6} , assim sendo as interações entre os átomos que compõe o

sistema são consideradas interações de curto alcance. No estudo das interações de curto alcance entre os átomos utiliza o procedimento de mínima imagem que é uma consequência do uso das condições periódicas de contorno. O método da mínima imagem é utilizado para impedir que uma partícula i interaja com sua própria imagem i' ou com outra partícula j e a imagem desta j' , como pode ser observado na Figura 18, onde o quadrado tracejado representa a aproximação de mínima imagem (82,87,88).

É utilizado o truncamento do potencial em um raio de corte esférico, geralmente da ordem de $L/2$, sendo que L é o comprimento da célula de simulação, para interagir a partícula i com apenas as partículas que possuem seu centro de massa a uma distância menor ou igual que o raio de corte. As interações além do raio de corte são ignoradas. Na Figura 18 o círculo representa tal raio (82,88).

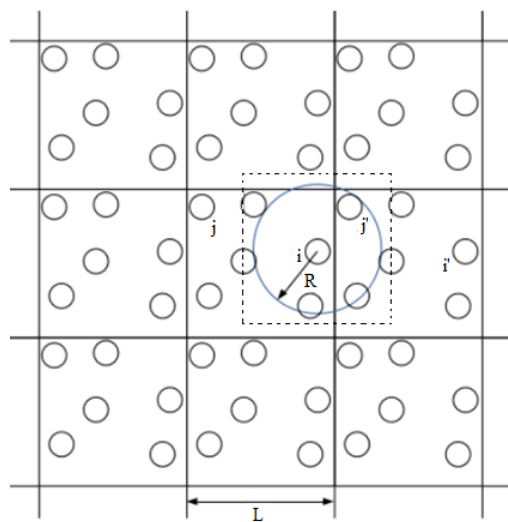


Figura 18 – Representação do raio de corte para uma célula de simulação de comprimento L . O raio de corte é traçado a partir de um átomo de interesse i , sendo que este não interage com o átomo j e sim com sua imagem j' , muito menos com sua própria imagem i' . O quadrado tracejado representa a aproximação de mínima imagem e o círculo representa o raio de corte. Adaptado de Allen (88).

3.2.4– Particle Mesh Ewald (PME)

Na Física existe uma grande variedade de problemas quando se diz respeito a sistemas com interações de longo alcance (90). Os potenciais eletrostáticos são

potenciais de longo alcance. A forma do potencial de Coulomb para a interação entre duas cargas i e j é dada pela equação 18:

$$V_{ele} = \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}}$$

Uma maneira de tratar o problema de longo alcance é introduzir um raio de corte na função de energia potencial, isto é, a energia potencial cai a zero a uma distância r . O problema com tal método é que não é natural que o potencial muda drasticamente para zero. A maneira de resolver esse problema é usar então uma função que suavemente define o potencial para zero sobre uma certa distância.

Um modo de tratar as interações de longo alcance é implementar o método de soma de Ewald (91).

Considere N íons no vácuo, nas posições $r_1, r_2, r_3, \dots, r_N$, e com cargas pontuais $q_1, q_2, q_3, \dots, q_N$, respectivamente. A energia total da interação de Coulomb é dada por:

$$E = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{(i,j)} \frac{q_i q_j}{|r_{ij}|} \quad (19)$$

Sendo que $r_{ij} = r_i - r_j$, $\epsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{C}^2 \text{N}^{-1} \text{m}^{-2}$ é constante de permissividade do vácuo, e a soma é sobre todos os pares iônicos (i, j) .

No método de soma de Eward a energia total é dada por:

$$E = E^S + E^L - E^{self} \quad (20)$$

Sendo que E^S é a contribuição da energia no espaço real, E^L é a contribuição da energia no espaço recíproco, E^{self} é o termo da energia de auto-interação.

A contribuição da energia no espaço real é dada por:

$$E^S = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{2} \sum_n \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N ' \frac{q_i q_j}{|r_i - r_j + nL|} \text{erfc} \left(\frac{|r_i - r_j + nL|}{\sqrt{2}\sigma} \right) \quad (21)$$

Sendo que n é um número arbitrário e L é o comprimento da célula

A contribuição da energia no espaço recíproco é escrita como

$$E^L = \frac{1}{2V\epsilon_0} \sum_{\mathbf{k} \neq \mathbf{0}} \frac{e^{-\sigma^2 k^2/2}}{k^2} |S(\mathbf{k})|^2 \quad (22)$$

Sendo que $S(\mathbf{k})$ é o fator de estrutura da distribuição de carga dada por

$$S(\mathbf{k}) = \sum_{j=1}^N q_j e^{i\mathbf{k}r_j} \quad (23)$$

A energia de auto-interação é escrita da seguinte forma

$$E^{self} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \sum_{i=1}^N q_i^2 \quad (24)$$

Assim temos que a energia total utilizando o método de soma de Eward é dada por:

$$E = E^S + E^L - E^{self}$$

$$E = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{2} \sum_n \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left[\frac{q_i q_j}{|r_i - r_j + nL|} \operatorname{erfc} \left(\frac{|r_i - r_j + nL|}{\sqrt{2}\sigma} \right) + \frac{1}{2V\epsilon_0} \sum_{\mathbf{k} \neq \mathbf{0}} \frac{e^{-\sigma^2 k^2/2}}{k^2} |S(\mathbf{k})|^2 - \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \sum_{i=1}^N q_i^2 \right] \quad (25)$$

Esta equação reescreve a energia eletrostática de um sistema de N cargas pontuais, eletricamente neutro, sob condições de contorno periódicas, em uma outra forma equivalente, mas que convirja rapidamente. Assim, temos uma expressão que é interessante do ponto de vista numérico.

3.2.5– Controle de Temperatura e Pressão

Como a maioria das observações experimentais são realizadas a temperatura e pressão constantes, o *ensemble* isotérmico-isobárico (NPT) tem sido amplamente utilizado em simulações moleculares. O movimento de uma partícula está associado a uma energia, essa energia quando aplicada ao mundo macromolecular ou do laboratório é analisada em termos da pressão (P), temperatura (T) e volume (V). A Dinâmica Molecular tem como objetivo reproduzir um sistema experimental, para tanto são aplicados sistemas de controles a fim de que essas variáveis de laboratório sejam mantidas nos valores desejados. O *ensemble* NPT descreve um sistema com um número de partículas fixas, em contato com um pistão e um banho térmico, com uma pressão P e temperatura T, respectivamente, o volume do sistema flutua a fim de manter constante temperatura e pressão durante as simulações (92).

Durante as simulações de Dinâmica Molecular o controle de temperatura pode ser obtido por meio de um processo conhecido como termostato de Berendsen (93) ou também pelo termostato de Langevin. O termostato de Berendsen foi um dos primeiros algoritmos criados que contém um banho térmico acoplado ao sistema que mantém a temperatura fixa. Durante as simulações, as velocidades são re-escaladas a cada passo de integração, com a finalidade de ajustar a energia cinética do sistema até a temperatura selecionada (93).

O programa NAMD utiliza o termostato de Langevin para o controle de temperatura, são acrescentados dois termos na equação de movimento, o termo de atrito e o de ruído (força estocástica), como pode ser observado na equação 26 (83):

$$M\dot{v} = F(x) - \gamma v - \sqrt{\frac{2\gamma k_B T}{M}} R(t) \quad (26)$$

Sendo que M é a massa, \dot{v} é a aceleração, v é a velocidade, F é a força, γ é o coeficiente de atrito, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e R(t) é um número aleatório.

O NAMD fornece o controle da pressão ajustando o tamanho da célula e rescalonando todas as coordenadas das partículas, um dos métodos de controle de pressão é o método de Nosé-Hoover modificado (94,95), em que a dinâmica de Langevin é usada para controlar as flutuações no barostato (83). Tal método deve ser combinado com um método de controle de temperatura para simular o ensemble NPT.

Capítulo 4: Estudo Comparativo entre Charmm_gui e Script

4.1 – Introdução

Neste capítulo serão expostos os resultados e as discussões sobre a comparação do *script* criado por nosso grupo para a inserção de proteínas em bicamadas lipídicas causando a mínima perturbação possível com um programa que gera automaticamente sistemas de bicamadas com proteínas já inseridas, para isso foi utilizado o *charmm_gui* com a ferramenta *Membrane Builder*, a comparação será feita por algumas propriedades físico-químicas das bicamadas tais como: perfil de densidade de massa, espessura da membrana, parâmetro de ordem, área por lipídeos, ângulo de inclinação lipídica e interdigitação de lipídeos

4.2 – Objetivo

Descrever o desenvolvimento de um *script* cuja finalidade é inserir proteínas de membrana em bicamadas lipídicas causando a mínima perturbação possível, de modo a minimizar o tempo de simulação necessário para o reestabelecimento do estado de equilíbrio do sistema. O método foi aplicado na criação das janelas utilizadas para os cálculos de energia livre;

Comparar as bicamadas geradas pelo *script* com aquelas geradas com a proteína já inserida no sistema pelo *charmm_gui*. A acareação será realizada por intermédio da computação de propriedades físico-químicas das bicamadas nomeadamente: perfil de densidade de massa, espessura da membrana, parâmetro de ordem, área por lipídeos, ângulo de inclinação lipídica e interdigitação de lipídeos.

4.3 – Métodos Computacionais

4.3.1 – Construção dos Sistemas em Estudo

O método desenvolvido foi baseado nas ideias contidas no trabalho de Christian Kandt (96), com a diferença de que no contexto do presente trabalho não são retiradas moléculas de fosfolipídios da bicamada no processo. Isso é particularmente conveniente em simulações em que é calculado o perfil de energia livre por um caminho de reação usando a técnica de múltiplas janelas, já que as diversas janelas criadas pela metodologia abordada neste trabalho apresentam o mesmo número de fosfolipídios.

Nos resultados apresentados utilizou-se bicamadas lipídicas em solução aquosa compostas por lipídeos de POPC (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina*) (bicamada pura) e por lipídeos de POPC e POPG (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol*) na proporção 4:1 (bicamada mista). Inseriu-se nessas bicamadas uma sequência de resíduos de aminoácidos da proteína E do vírus da Dengue do resíduo 98 até o resíduo 110, conhecido como peptídeo de fusão, contendo a seguinte sequência de resíduos de aminoácidos D R G W G N G C G L F G K.

Os arquivos de entrada para o *script* (bicamadas lipídicas solvatadas) foram gerados no *site* do *charmm_gui*, com a ferramenta *Membrane Builder*. Gerou-se dois sistemas para nossas simulações: a bicamada pura contém 288 moléculas de POPC e a mista contém 240 moléculas de POPC e 60 moléculas de POPG. As bicamadas foram posicionadas de modo que o eixo normal ao seu plano coincidissem com o eixo z.

As bicamadas foram solvatadas com moléculas de água suficientes para gerar camadas de aproximadamente 80 Å cada lado. A seguir, foi adicionado ao sistema o peptídeo posicionado na fase aquosa. Esses sistemas, contendo a bicamada (pura ou mista), as camadas de água e o peptídeo posicionado na solução foram utilizados como arquivos de entrada para o *script*. Aplicou-se o *script* para gerar janelas que diferiram na distância do peptídeo ao centro da bicamada, para

cada uma estudada. No próximo tópico será descrito o processo de inserção do peptídeo na bicamada, por meio do *script*.

4.3.1.1 – Processo de inserção do peptídeo na bicamada

Como a finalidade do *script* é criar diferentes janelas para simulações de perfil de energia livre por um caminho de reação, a dinâmica de seu funcionamento consiste na geração, a partir de uma configuração inicial, de configurações em que as distâncias entre dois grupos de átomos assumem diferentes valores consecutivos. No caso do sistema estudado neste trabalho, o caminho de reação é a distância em z entre o centro de massa (CM) do peptídeo e o centro de massa da bicamada. Adiante evidencia-se o relato minucioso de cada etapa do método:

1. Movimentou-se o peptídeo até a posição definida para a janela em questão.
2. Verificou-se se a distância z entre o CM do peptídeo e da bicamada é maior que um determinado valor definido pelo usuário. Se for, significa que o peptídeo ainda não entrou na bicamada, salvou-se a configuração e passou-se para a próxima janela, caso contrário, continuar-se-ia para as próximas etapas na mesma janela.
3. Determinou-se a coordenada x do centro geométrico do peptídeo e define duas bandas na bicamada selecionando moléculas de fosfolipídeos cujos átomos de fósforo possuem coordenada x maior ou menor que esse valor.
4. Calculou-se as dimensões do peptídeo na direção x e deslocou-se as bandas definidas no passo 3 nessa direção de modo a criar uma abertura com o tamanho do peptídeo. A Figura 19 mostra a bicamada de POPC com POPG, quando o peptídeo está inserido no centro da bicamada antes de começar o fechamento da bicamada:
5. Iniciou-se a sequência de “fechamento” da bicamada em que em cada passo a abertura criada foi diminuída a uma distância determinada pelo usuário seguida por uma simulação de minimização de energia para correção de possíveis superposições de átomos.

6. O fechamento para quando o RMSD entre a posição original e atual dos átomos de fósforo é mínima, o que significa que a bicamada retornou à conformação mais próxima do original possível.
7. Armazenou-se a configuração obtida e prosseguiu para a próxima janela.

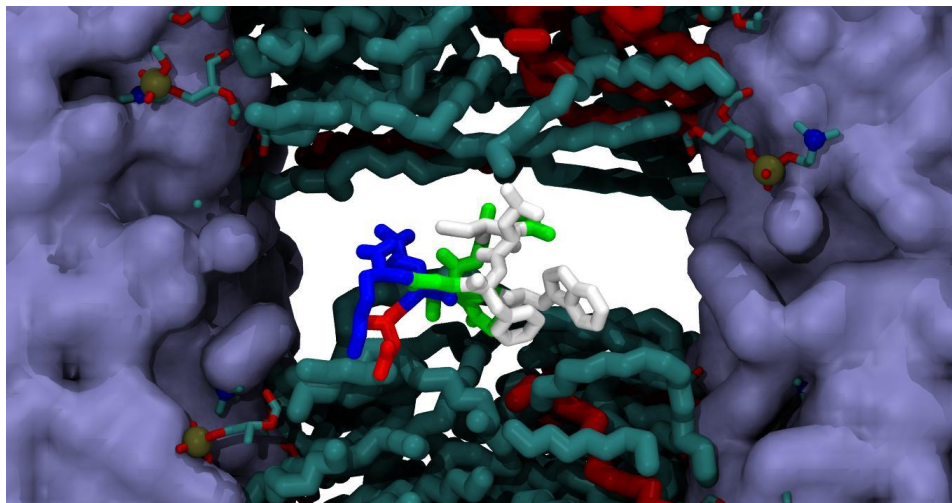


Figura 19 – Peptídeo inserido na bicamada de POPC com POPG antes de iniciar o processo de fechamento da bicamada. As moléculas de água estão representadas como uma superfície roxa, o peptídeo representado em licorice e com os resíduos coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde os polares e em branco os hidrofóbicos. Na bicamada, os grupos acílicos das moléculas de POPC estão coloridos em ciano e das de POPG em vermelho, na região polar os átomos de fósforo são as esferas marrons, os nitrogênios esferas azuis e os oxigênios esferas vermelhas.

A linguagem utilizada no *script* foi o *tcl* e sua execução é feita pelo *software Visual Molecular Dynamics (VMD)* (97). Como as simulações dos sistemas gerados seriam realizadas com o programa *Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD)* (83), o *script* trabalhou com arquivos dos tipos *pdb* e *psf*.

Com a finalidade de verificar se este *script* insere adequadamente o peptídeo na bicamada lipídica, foram selecionadas duas dessas configurações para cada composição da bicamada, usando os resíduos de aminoácidos da proteína E do vírus da Dengue do resíduo 98 ao 110, para realizar algumas análises e comparar com sistemas gerados com o peptídeo já inserido na bicamada diretamente pelo próprio *site* do *charmm_gui*, sendo que em cada uma delas o peptídeo ocupa ambientes físico-químicos distintos: no sistema 1, o peptídeo se localiza na interface água/bicamada estando seu centro de massa a aproximadamente 20 Å do centro da

bicamada e no sistema 2 o peptídeo está completamente inserido na bicamada com o centro de massa coincidindo com o centro da bicamada.

Para gerar os sistemas pelo *charmm_gui* se fez uso da ferramenta *Membrane Builder* (22,23) na qual foi gerado para a bicamada de POPC e POPC com POPG na proporção 4:1 os seguintes sistemas: a) um sistema com o peptídeo localizado na interface água/bicamada, estando seu centro de massa a aproximadamente 20 Å do centro da bicamada; b) outro sistema quando o peptídeo está completamente inserido na bicamada, com o seu centro de massa coincidindo com o centro da bicamada.

4.3.2 – Perfil de Densidade de Massa

O Perfil de Densidade de Massa fornece, por meio de uma varredura ao longo do eixo z (normal à bicamada), a quantidade de massa referente às moléculas em cada ponto do sistema, possibilitando determinar a região ocupada pela bicamada, a região ocupada pelo solvente (água), a posição dos íons, a posição da proteína na bicamada e os grupos que compõem os lipídeos.

Pode-se observar ainda a interface entre a bicamada e o solvente, assim como a posição de cada molécula do sistema em relação à bicamada ou ainda permitindo-se também localizar qualquer molécula no interior da bicamada.

A espessura da membrana é uma propriedade que depende do comprimento da cadeia dos seus componentes lipídicos, do ângulo de inclinação e do grau de insaturação dos lipídeos dentro da bicamada.

4.3.3 – Parâmetro de Ordem

Uma maneira de avaliar a disposição das caudas hidrofóbicas é a avaliação da ordem das mesmas em termos do parâmetro de ordem S_{CD} (Figura 20). O Parâmetro de ordem é um parâmetro normalizado que indica o grau de ordenamento

de um sistema. Quanto maior o alinhamento dos carbonos na cadeia, maior o parâmetro de ordem.

O parâmetro de ordem quantifica a ordenação das caudas de hidrocarbonetos dos fosfolipídios pela média sobre duas ligações em cada grupo CH, para todos os lipídeos em função do tempo e do ângulo. A expressão usada para cada grupo CH nas cadeias é escrita como (98):

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta_{CD} - 1 \rangle \quad (27)$$

θ_{CD} é o ângulo entre uma ligação CD (em experiências) ou uma ligação CH (em simulações) e o vetor normal à superfície da bicamada. Os parênteses indicam uma média sobre as duas ligações em cada grupo CH_2 , para todos os lípídeos e em função do tempo.

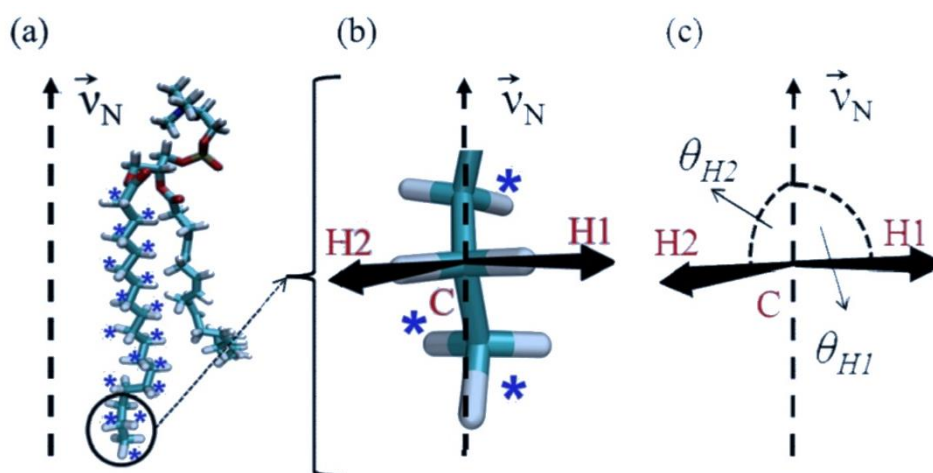


Figura 20 – Ilustra o cálculo do parâmetro de ordem. A seta preta representa a direção da normal da bicamada, em (a) temos a cauda do fosfolipídio, na qual cada asterisco destaca um grupo no qual será calculado o parâmetro de ordem, em (b) mostramos os dois vetores que serão utilizados para obter o parâmetro de ordem para um grupo metil, $C \rightarrow H1$ e $C \rightarrow H2$ e em (c) mostramos o esquema dos ângulos a serem calculados. Extraído de (99)

Partindo deste princípio, caso haja um aumento da área da bicamada, ocorrerá uma maior mobilidade das cadeias, diminuindo assim o parâmetro de ordem. O contrário também vale, uma diminuição da área da bicamada, faz com

que haja maior proximidade dos lipídeos, restringindo seus movimentos, podendo aumentar a ordem do sistema.

Para analisar o ordenamento das cadeias alifáticas do POPC e POPC com POPG, foi realizado o cálculo do Parâmetro de Ordem das cadeias palmitoil e oleil, que conta com uma insaturação entre o carbono 9 com o carbono 10.

4.3.4 – Área por Lipídeo

Os lipídeos têm uma área superficial que é determinada principalmente pela cabeça polar dos fosfolipídios. Um parâmetro essencial no estudo de simulações em bicamadas lipídicas é o cálculo da área por lipídeos, que mostra o quanto o sistema está em equilíbrio, esse cálculo é determinado pela área de cada fosfolipídeo, multiplicada pela quantidade em que estão presentes em cada monocamada.

No cálculo da área por lipídeo quando a proteína já esta inserida na bicamada utiliza-se a equação 28 (100).

$$A_{lip} = 2 * (A_{xy} - A_{prot}) / n_{lip} \quad (28)$$

Sendo que n_{lip} é o número de lipídeos na bicamada, A_{xy} é a área do plano da bicamada xy, A_{prot} é a área da proteína estimada pela projeção de todos os átomos da proteína que se sobrepõem à placa de bicamada.

4.3.5 – Ângulo de Inclinação Lipídica

Da bicamada permite-se calcular várias propriedades físicas que podem ser obtidas por técnicas experimentais (101), por exemplo o Ângulo de Inclinação Lipídica, é o ângulo entre um vetor arbitrário, usando dois átomos dentro de um lipídeo, e o vetor normal à bicamada (eixo-z). Na bicamada de POPC foi aplicado

o ângulo entre o fósforo do grupo fosfato e o nitrogênio do grupo colina na região do grupo da cabeça com a normal à bicamada, e para a bicamada de POPG fez-se uso do ângulo entre o fósforo do grupo fosfato com o carbono do grupo glicerol com a normal à bicamada, como podemos observar na Figura 21:

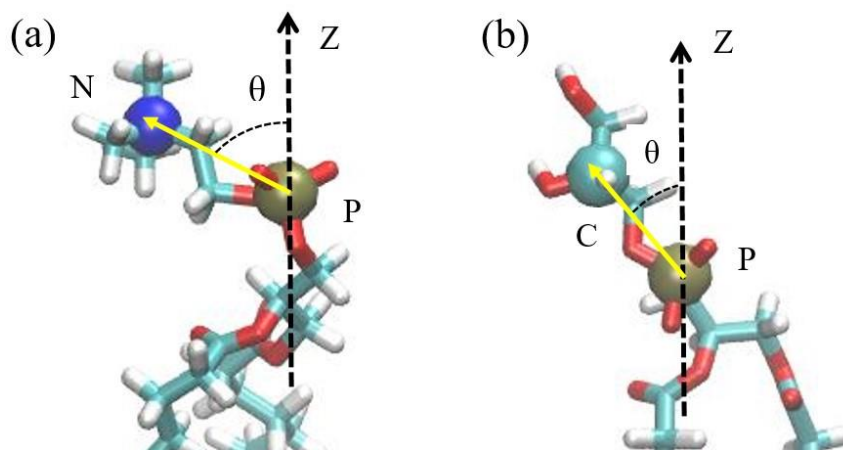


Figura 21 – Ilustra como é calculado o ângulo de Inclinação Lipídica: (a) O ângulo formado entre o fósforo do grupo fosfato e o nitrogênio do grupo colina na região do grupo da cabeça com a normal à bicamada de POPC. (b) O ângulo formado entre o fósforo do grupo fosfato e o carbono do grupo glicerol na região do grupo da cabeça com a normal à bicamada de POPG.

4.3.6 – Interdigitação de Lipídeos

O fenômeno de interdigitação de lipídeos ocorre quando as cadeias acíclicas pertencentes a uma folha específica estão envolvidas por cadeias acíclicas da outra folha a quais existe a sobreposição de densidades de massa. Com isso é otimizada a interação hidrofóbica enquanto se evita a exposição de cadeias hidrofóbicas a um ambiente aquoso. A interdigitação ajuda na formação de micro-domínios de membrana (102).

A Figura 22 exemplifica o fenômeno de interdigitação das cadeias acíclicas dos lipídeos. Observa-se que a interdigitação ocorre entre os átomos das folhas superior (amarelo) e inferior (azul) onde existe a sobreposição de densidade de massa, fora desta região não existe a interdigitação.

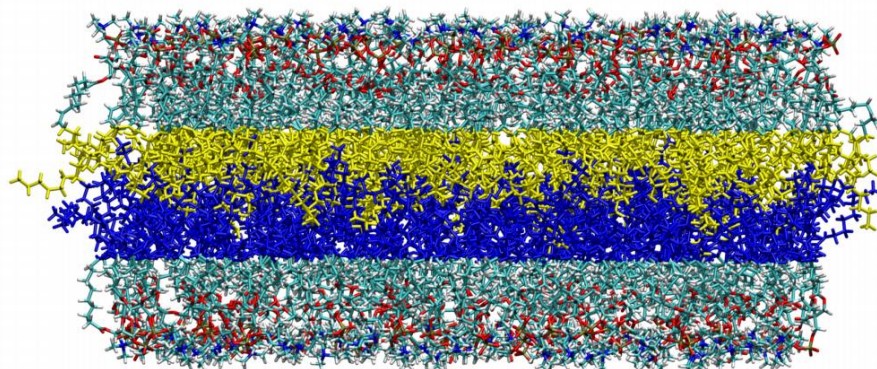


Figura 22 – Ilustra o fenômeno de Interdigitação de lipídeos das cadeias acíclicas. Extraído de(99)

Com a ferramenta de Interdigitação de Lipídeos(103) pode-se calcular três diferentes medidas de Interdigitação da cadeia acíclica que são eles I_p , w_p e I_c .

I_p avalia a sobreposição das distribuições de massa das duas folhas ao longo da normal à bicamada, é calculado pela expressão 29.

$$I_p^2 = \frac{4 \int \rho_a(z)\rho_b(z)dz}{\int [\rho_a(z)+\rho_b(z)]^2 dz} \quad (29)$$

Sendo que ρ_a e ρ_b representam os perfis de densidade de massa para cada uma das folhas.

Pela equação podemos observar que $0 \leq I_p \leq 1$

w_p é definido por $\rho_a\rho_b$ e indica a largura da região de sobreposição de distribuições de massa.

I_c é um valor que informa o número de átomos que estão em contato com a folha oposta em relação a um determinado átomo, estes contatos são definidos geometricamente por um raio de corte. Este valor pode variar de $0 < I_c < 1$.

4.4 – Detalhes Computacionais

Nos métodos computacionais, foram utilizadas bicamadas lipídicas em solução aquosa compostas por lipídeos de POPC (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-

Colina) (bicamada pura) e por lipídeos de POPC e POPG (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol) na proporção 4:1 (bicamada mista). Nessas bicamadas foi inserida uma sequência de resíduos de aminoácidos da proteína E do vírus da Dengue do resíduo 98 até o resíduo 110, identificado como peptídeo de fusão, que possui o seguinte encadeamento de resíduos de aminoácidos D R G W G N G C G L F G K.

Os sistemas gerados pelo nosso *script* foram: com o peptídeo localizado na interface água/bicamada estando seu centro de massa a aproximadamente 20 Å do centro da bicamada e o peptídeo completamente inserido na bicamada com o centro de massa coincidindo com o centro da bicamada tiveram a mesma quantidade de fosfolipídios, a bicamada pura contém 288 moléculas de POPC e a mista contendo 240 moléculas de POPC e 60 moléculas de POPG.

Os sistemas gerados automaticamente pelo *site* do *charmm_gui* foram os seguintes: com o peptídeo localizado na interface água/bicamada estando seu centro de massa a aproximadamente 20 Å do centro da bicamada, a bicamada pura contém 291 moléculas de POPC e a mista contendo 240 moléculas de POPC e 60 moléculas de POPG e quando o peptídeo completamente inserido na bicamada com o centro de massa coincidindo com o centro da bicamada, essa em sua versão pura contém 293 moléculas de POPC e a mista contendo 240 moléculas de POPC e 60 moléculas de POPG.

Em todas as simulações de Dinâmica Molecular, a fim de comparar o desempenho do nosso *script* com o *charmm_gui*, foram utilizadas as seguintes condições fixas: temperatura de 310 K, pressão de 1 atm e pH 7,0. Os sistemas foram simulados usando o NAMD, os parâmetros de energia potencial foram calculados pelo campo de força CHARMM36 (104) e o modelo de água foi o TIP3P, foi realizada uma minimização de energia com 10 mil passos, uma Dinâmica Molecular de equilíbrio com 5 ns e uma dinâmica de produção com 45 ns. Para a coleta de dados foram utilizados os últimos 10 ns da dinâmica de produção.

No NAMD foram usados os seguintes parâmetros para simulação: o passo de integração foi de 2 fs; raio de corte 10 Å; coeficiente de amortecimento da dinâmica de Langevin 1 ps⁻¹; período de oscilação do pistão de Langevin 200 fs;

tempo de amortecimento de Langevin 100 fs e para o PME foi utilizado um tamanho do *grid* na direção x e y de 100 Å e na direção z um grid de 196 Å.

Na minimização e na equilibração o peptídeo ficou fixo e foram aplicadas restrições a alguns átomos que também ficaram fixos, e a dinâmica de aquisição de todo o sistema ficou sem nenhum tipo de restrição.

Na análise de comparação entre o *script* e o *charmm_gui* para determinar o perfil de densidade de massa foi utilizado o *plugin Density Profile* do VMD (97,105), e com o *plugin Membplugin* do VMD (99,103) foram realizados as seguintes análises: espessura de membrana; área por lipídeos; ângulo de inclinação lipídica e interdigitação de lipídeos.

4.5 – Resultados e Discussões

4.5.1 – Sistemas Gerados pelo *Script* e *Charmm_gui*

Nas Figuras 23 e 24 apresentamos os sistemas gerados com a bicamada pura e a mista em (a) sistema gerado pelo *script*, em (c) pelo *charmm_gui*, para o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue localizado na interface água/bicamada e em (b) sistema gerado pelo *script* e (d) pelo *charmm_gui* com o peptídeo localizado no interior da bicamada. Verificou-se que em todos os casos o peptídeo está inserido adequadamente na bicamada sem alterações conformacionais significativas, tanto no peptídeo como na bicamada. Não observou-se superposições que podem levar a valores de energia que possam desestabilizá-los para quando for realizada a simulação.

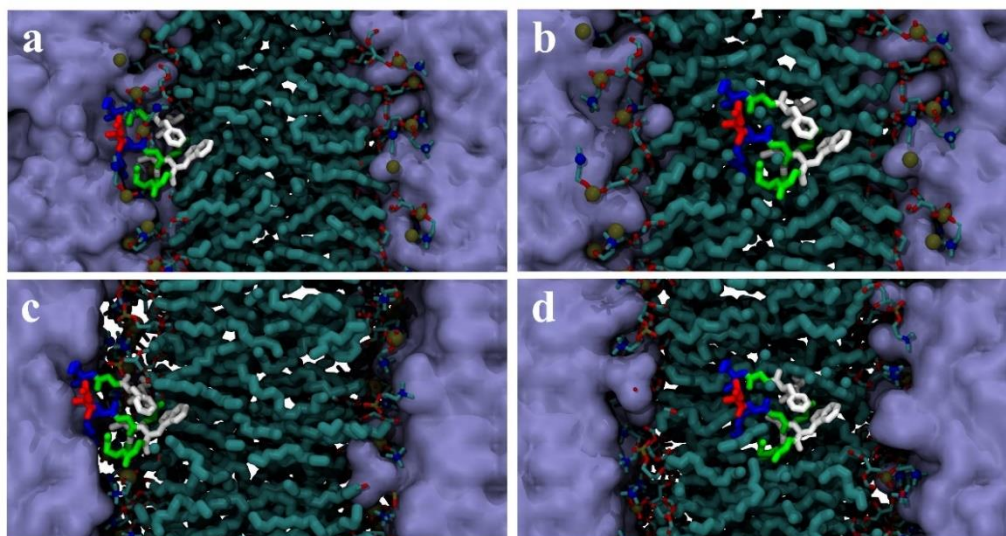


Figura 23 – Sistemas gerados com a bicamada de POPC com o peptídeo localizado na interface água/bicamada em (a) pelo método desenvolvido e em (c) pelo charmm_gui. Com o peptídeo localizado no interior da bicamada em (b) pelo método desenvolvido e em (d) pelo charmm_gui. As moléculas de água estão representadas como uma superfície roxa, o peptídeo representado em licorice e com os resíduos coloridos conforme sua natureza física, em azul, e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde, os polares e em branco os hidrofóbicos. Na bicamada, os grupos acíclicos das moléculas de POPC estão coloridos em ciano, na região polar os átomos de fósforo são as esferas marrons, os nitrogênios esferas azuis e os oxigênios esferas vermelhas.

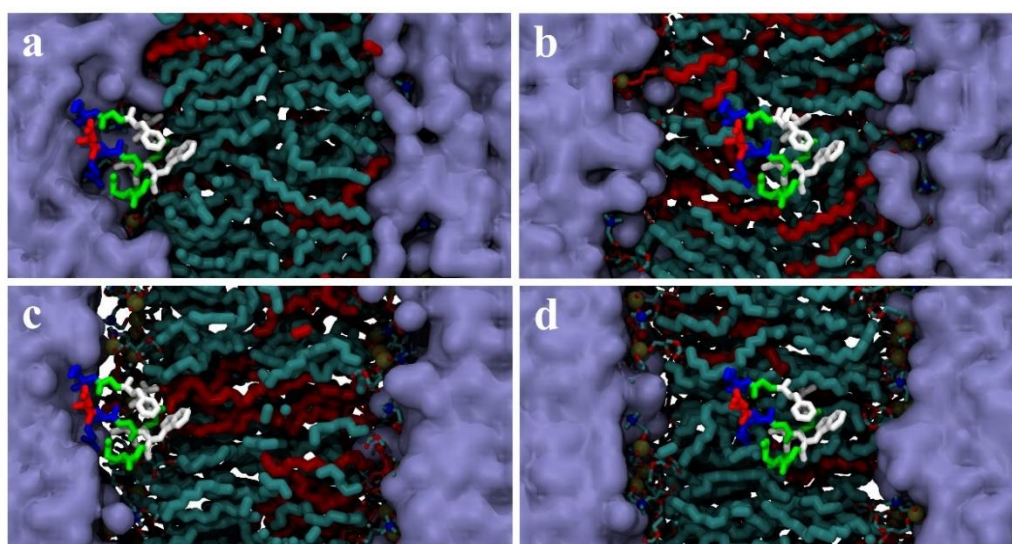


Figura 24 – Sistemas gerados com a bicamada de POPC com o peptídeo localizado na interface água/bicamada em (a) pelo método desenvolvido e em (c) pelo charmm_gui. Com o peptídeo localizado no interior da bicamada em (b) pelo método desenvolvido e em (d) pelo charmm_gui. As moléculas de água estão representadas como uma superfície roxa, o peptídeo representado em licorice e com os resíduos coloridos conforme sua natureza física, em azul, e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde, os polares e em branco os hidrofóbicos. Na bicamada, os grupos acíclicos das moléculas de POPC estão coloridos em ciano e das de POPG em vermelho, na região polar os átomos de fósforo são as esferas marrons, os nitrogênios esferas azuis e os oxigênios esferas vermelhas.

As Figuras 25 (a) e 25 (c) mostram o RMSD entre as posições dos átomos de fósforo da bicamada na conformação inicial e cada etapa do processo de fechamento da bicamada descrito nos itens 5 e 6 da seção de detalhes computacionais, para a bicamada pura e a mista. Notou-se ainda que os sistemas 1 (linha preta) e 2 (linha verde) da bicamada pura apresentam resultados semelhantes com o valor mínimo para o RMSD por volta de $0,5 \text{ \AA}$, que pode ser verificado na Figura 25 (b). Para a bicamada mista podemos verificar na Figura 25 (d), os sistemas 1 (linha preta) e 2 (linha verde) apresentam valor mínimo de RMSD de $0,15 \text{ \AA}$ e $0,10 \text{ \AA}$, respectivamente, e os valores foram alcançados com menos passos que os sistemas gerados com a bicamada de POPC. Valores de RMSD menores que 1 \AA apontaram que a configuração estrutural da bicamada obtida após o processo de inserção do peptídeo é muito próxima da observada na bicamada original que estava equilibrada.

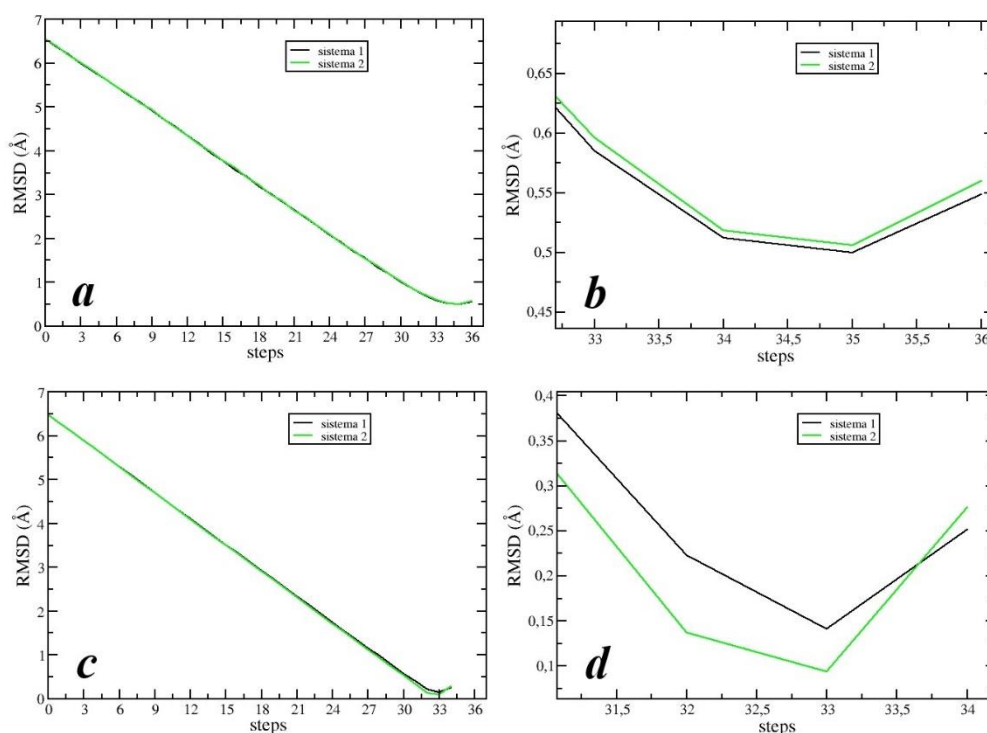


Figura 25 – Em (a) e (c) representa o RMSD entre as posições dos átomos de fósforo da bicamada original e a bicamada pura e mista, respectivamente, no processo de fechamento após a inserção do peptídeo. As linhas preta e verde representam os sistemas 1 e 2 da bicamada pura, respectivamente. Em (b) e (d) mostra o RMSD no final do fechamento da bicamada após a inserção do peptídeo.

Depois de 45 ns de simulação de Dinâmica Molecular pode-se observar, na Figura 26, a última coordenada de posição da dinâmica para o sistema no qual o peptídeo de fusão estava localizado no interior da bicamada (sistema 2), para a bicamada pura (figura 26 (a) para o script e a figura 26 (b) para o *charmm_gui*) e para a bicamada mista (figura 26 (c) para o script e a figura 26 (d) para o *charmm_gui*). Pode-se observar que, tanto para o método desenvolvido por nós, como para o *charmm_gui*, as posições finais são parecidas para as bicamadas pura e mista. Resultados de energia livre por meio do método ABF, que serão discutidos posteriormente, mostram que esta posição onde se encontra o peptídeo de fusão depois da simulação é a posição de menor energia livre. Para o sistema 1, não houve uma mudança significativa na posição do peptídeo, pelo fato que ele já se encontra na posição de menor energia livre.

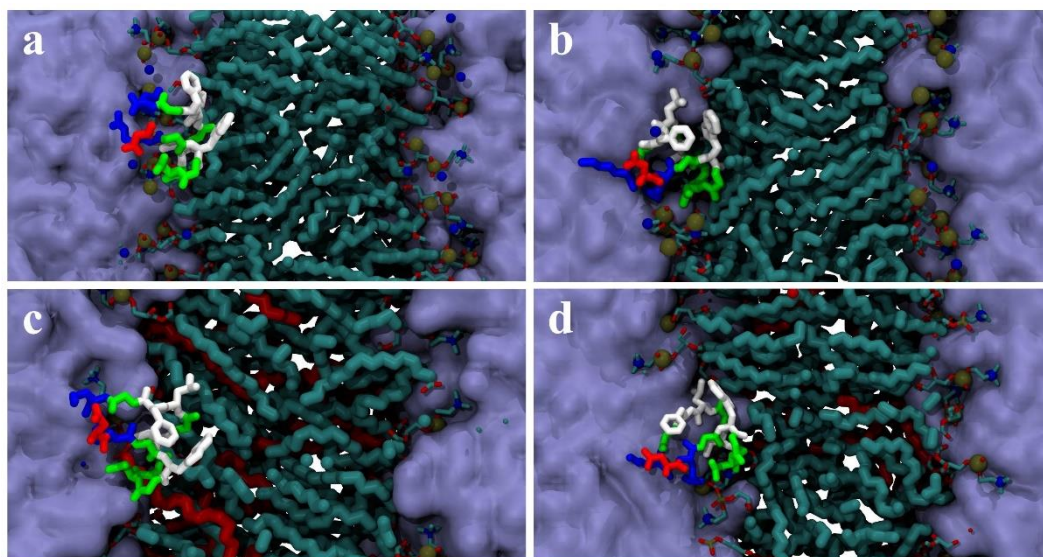


Figura 26 – Resultados da última coordenada de posição do sistema 2 depois 45 ns de simulação da Dinâmica Molecular em (a) e (c) utilizando o método desenvolvido para a bicamada pura e mista, respectivamente e utilizando o *charmm_gui*, em (b) e (d), para a bicamada pura e mista, respectivamente. As moléculas de água estão representadas como uma superfície roxa, o peptídeo representado em licorice e com os resíduos coloridos conforme sua natureza física, em azul, e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde, os polares e em branco os hidrofóbicos. Na bicamada, os grupos acílicos das moléculas de POPC estão coloridos em ciano e das de POPG em vermelho, na região polar os átomos de fósforo são as esferas marrons, os nitrogênios esferas azuis e os oxigênios esferas vermelhas.

4.5.2 – Perfil de Densidade de Massa e Espessura da Membrana

Através do Perfil de Densidade de Massa, possibilitou-se fazer uma varredura ao longo do eixo z (normal à bicamada) e determinar a quantidade de massa das moléculas do sistema em cada ponto.

A figura 27 mostra os gráficos do Perfil de Densidade de Massa (PDM), do sistema 1 (Figura 27 (a)) e do sistema 2 (Figura 27 (b)), contendo bicamada POPC, utilizando o método desenvolvido (*script*) e o *charmm_gui*. Para a bicamada de POPC/POPG temos que os gráficos do sistema 1 e do sistema 2 que estão nas Figuras 28 (a) e 28 (b), respectivamente, utilizando o método desenvolvido (*script*) e o *charmm_gui*. Analisando as Figuras 27 e 28 constatou-se uma semelhança entre os resultados obtidos pelo *script*, em comparação com os resultados obtidos pelo *charmm_gui*. O PDM da água indica coexistência com a região polar da bicamada na interface e é nulo na região no centro da bicamada como esperado, pois dentro da bicamada não existe água, tanto para o *script* como para o *charmm_gui*. Pode-se observar também que o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue está ocupando a mesma posição para os dois métodos estudados.

Verifica-se ainda que nas Figuras 27 (b) e 28 (b) o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue não se encontra na posição inicial localizado no interior da bicamada, pelo fato que ele tende a ir mais próximo da superfície, pois é a posição de menor energia.

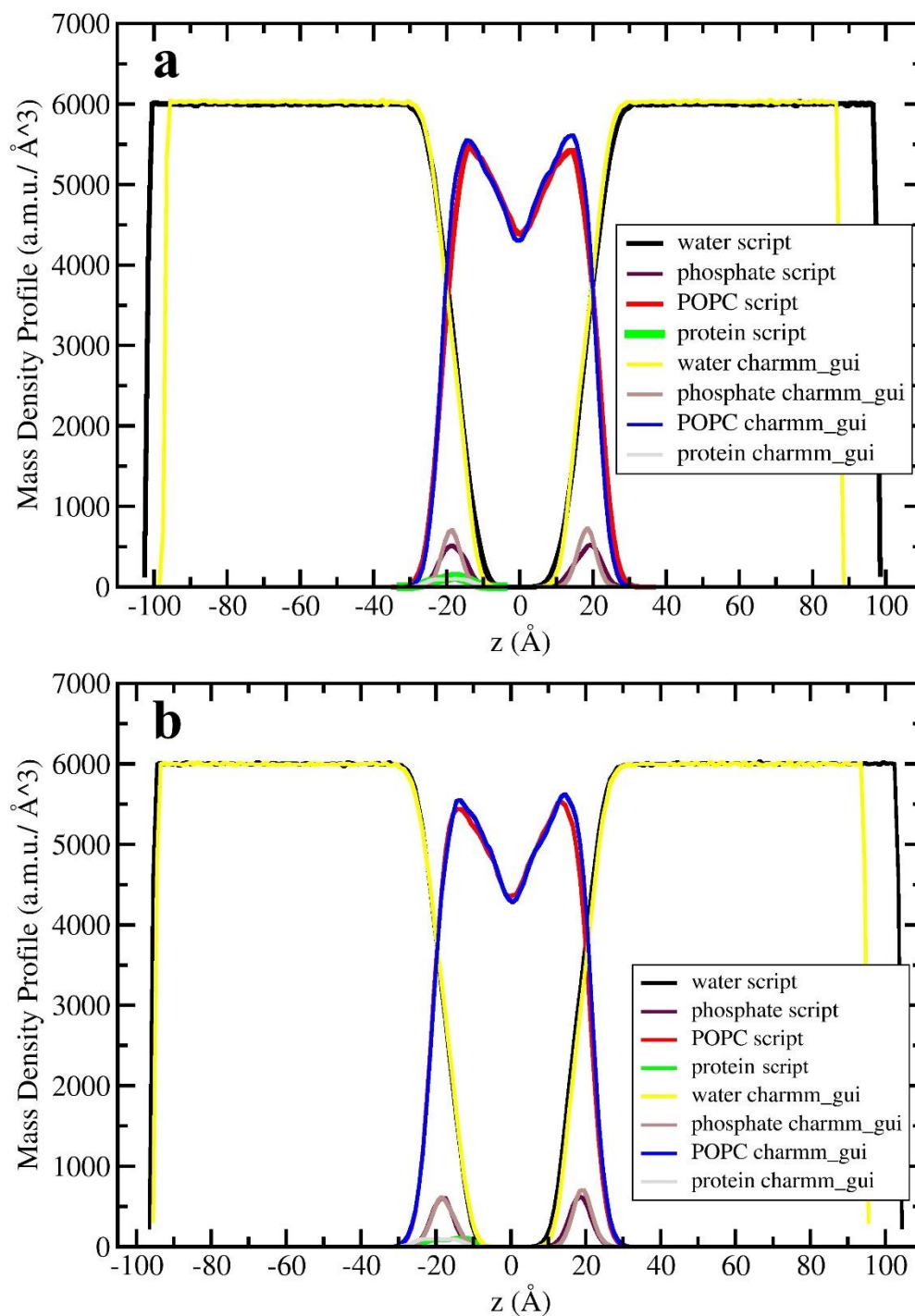


Figura 27 – Perfil de Densidade de Massa (PDM) da bicamada pura de POPC (a) do sistema 1 em relação ao eixo z , para os dois métodos em estudo, (b) do sistema 2 em relação ao eixo z , para os dois métodos em estudo. Para o script temos como resultado que as moléculas de água estão representadas pela cor preta, os fosfolípidos pela cor marrom, a bicamada de POPC com a cor vermelha e o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue pela cor verde, para os resultados do charmm_gui temos que as moléculas de água estão representadas pela cor amarela, os fosfolípidos pela cor castanha, a bicamada de POPC com a cor azul e o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue pela cor cinza.

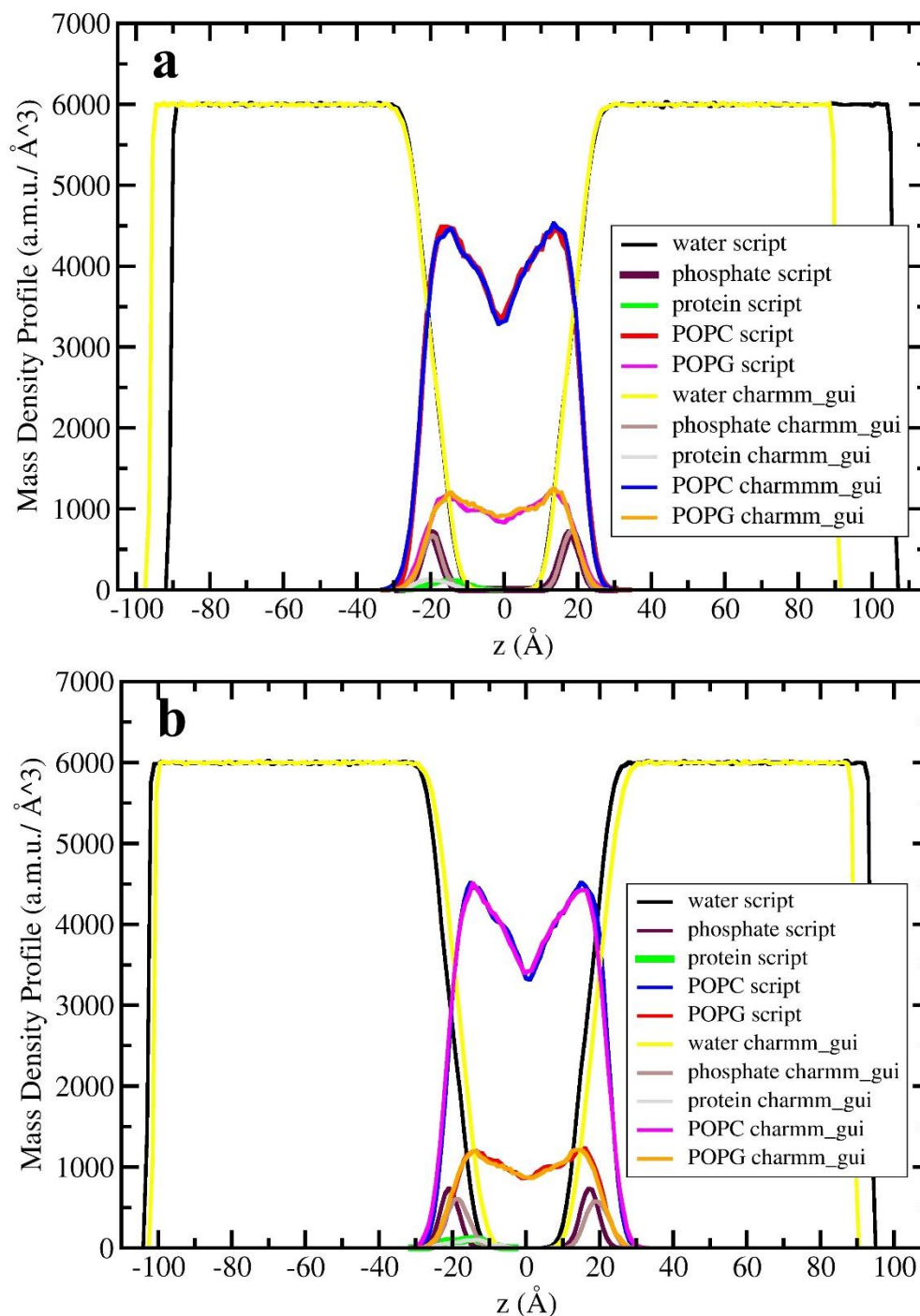


Figura 28 – Perfil de Densidade de Massa (PDM) da bicamada mista de POPC com POPG (a) do sistema 1 em relação ao eixo z , para os dois métodos em estudo; (b) do sistema 2 em relação ao eixo z , para os dois métodos em estudo. Nos resultados obtidos pelo script temos que as moléculas de água estão representadas pela cor preta, os fosfolipídeos pela cor marrom, a bicamada de POPC com a cor azul, a bicamada de POPG com a cor vermelha e o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue pela cor verde, para os resultados do charmm_gui temos as moléculas de água estão representadas pela cor amarela, os fosfolipídeos pela cor castanha, a bicamada de POPC com a cor magenta, a bicamada de POPG com a cor laranja e o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue pela cor cinza.

Por meio do *plugin Membplugin* do VMD foi obtido a espessura da membrana da bicamada lipídica, para a bicamada de POPC, temos para o sistema 1 os seguintes resultados $37,3 \pm 0,2 \text{ \AA}$ e $37,4 \pm 0,2 \text{ \AA}$, para *script* e *charmm_gui*, respectivamente, e para o sistema 2 a espessura da membrana foi de $37,3 \pm 0,2 \text{ \AA}$ e $37,7 \pm 0,2 \text{ \AA}$, para *script* e *charmm_gui*, respectivamente. Para a bicamada de POPC/POPG, o sistema 1 e o sistema 2, tiveram o mesmo resultado de $38,3 \pm 0,2 \text{ \AA}$, tanto para *script* e *charmm_gui*. Isso demonstra que o método utilizado perturba pouco as bicamadas com relação a sua espessura, pois são aproximadamente iguais na bicamada de POPC e idêntica na bicamada de POPC/POPG em comparação com o *charmm_gui*.

4.5.3 – Parâmetro de Ordem

Será analisado agora o parâmetro de ordem que quantifica a ordem e a disposição das caudas de hidrocarbonetos dos fosfolipídios. As Figuras 29 (a) e 29 (b) mostram os gráficos do parâmetro de ordem obtido dos sistemas 1 e 2, respectivamente, contendo bicamada de POPC (bicamada pura), utilizando o método desenvolvido (*script*) e o *charmm_gui*. Para a bicamada de POPC/POPG as figuras 30 (a) e 30 (b) mostram os sistemas 1 e 2, na ordem devida, considerando somente os fosfolipídeos de POPC, para o *script* e para o *charmm_gui*. Considerando os fosfolipídeos de POPG temos que para o sistema 1 (figura 31 (a)) e sistema 2 (figura 31 (b)) o parâmetro de ordem levando em conta o *script* e o *charmm_gui*.

Constata-se, nas figuras 29, 30 e 31, um maior alinhamento na cadeia saturada (palmitoil) em comparação com a cadeia insaturada (oleil). Isso se deve ao fato de que a insaturação dificulta a ordenação dessa cadeia. Também é possível perceber que os átomos localizados no início da cadeia apresentam maior parâmetro de ordem se comparado aos localizados na outra extremidade, por causa da grande mobilidade nessa região.

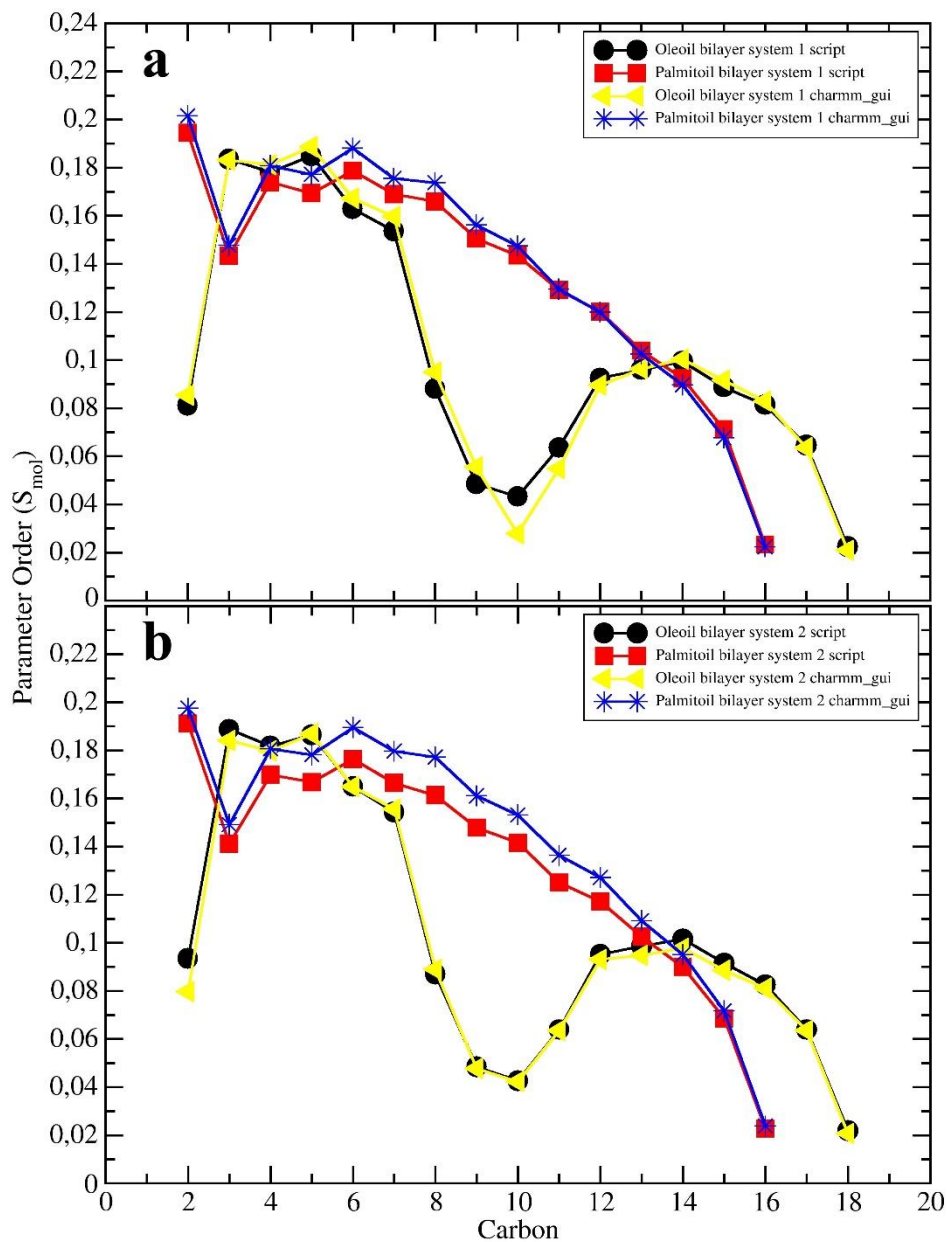


Figura 29 – Parâmetro de ordem do Palmitoil e Oleoil da bicamada de POPC obtido a partir (a) do sistema 1 e (b) do sistema 2 contendo a bicamada de POPC, utilizando o método desenvolvido (script) e o charmm_gui. Os círculos em preto representam a cadeia oleoil dos sistemas 1 e 2 do script, os quadrados em vermelho representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do script, os triângulos em amarelo representam a cadeia oleoil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui, as estrelas em azul representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui.

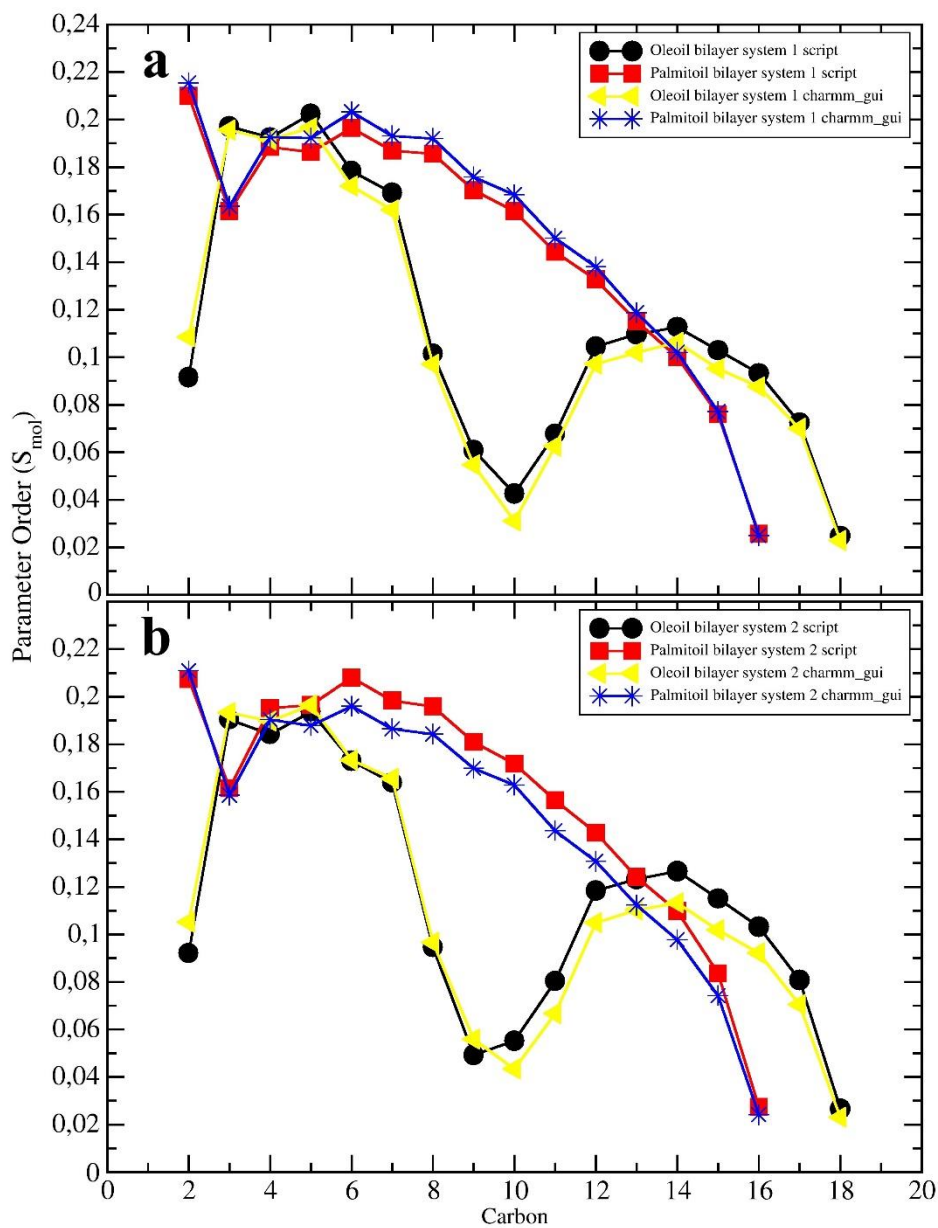


Figura 30 – Parâmetro de ordem obtido (a) do sistema 1 e (b) do sistema 2 contendo bicamada de POPC/POPG considerando somente os fosfolípidos de POPC, para o método desenvolvido (script) e o charmm_gui. Os círculos em preto representam a cadeia oleil dos sistemas 1 e 2 do script, os quadrados em vermelho representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do script, os triângulos em amarelo representam a cadeia oleil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui, as estrelas em azul representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui.

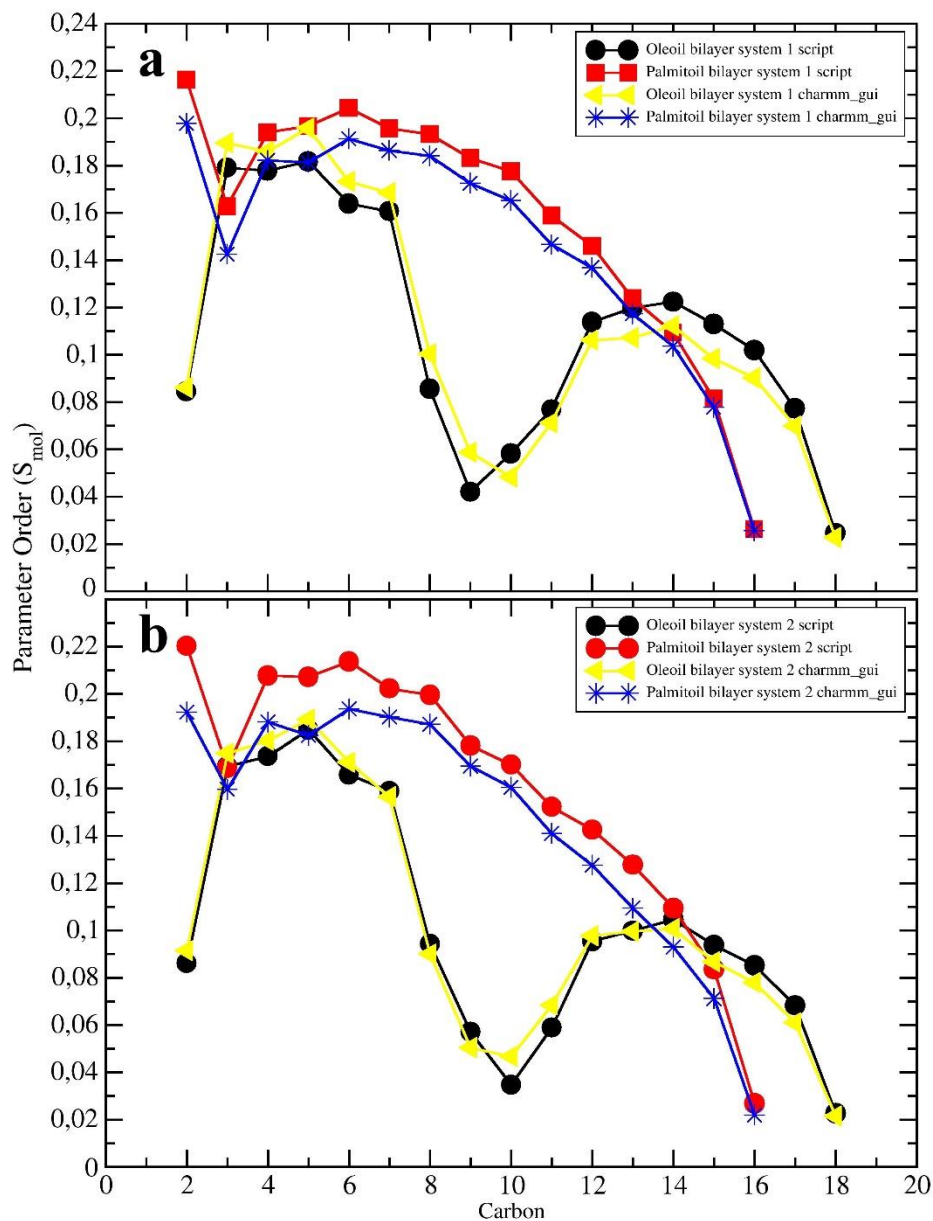


Figura 31 – Parâmetro de ordem obtido (a) do sistema 1 e (b) do sistema 2 contendo bicamada de POPC/POPG considerando somente os fosfolípidos de POPG, para o método desenvolvido (script) e o charmm_gui. Os círculos em preto representam a cadeia oleil dos sistemas 1 e 2 do script, os quadrados em vermelho representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do script, os triângulos em amarelo representam a cadeia oleil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui, as estrelas em azul representam a cadeia palmitoil dos sistemas 1 e 2 do charmm_gui.

Comparando com os resultados desse artigo (106), Figura 32, obtidos a partir da mesma composição da bicamada e o mesmo campo de força, avista-se semelhança entre as figuras 29, 30 e 31. Isso acontece, pois, os dois tipos de lipídeos

constituintes da bicamada possuem cadeias alifáticas idênticas: palmitoil com 18 carbonos e saturada, e oleil com 16 carbonos e insaturada entre o carbono 9 e 10.

Observa-se ainda que nas Figuras 29, 30 e 31 há uma pequena variação nos resultados para o cálculo do parâmetro de ordem, para o sistema 2, mas ainda assim verifica-se certa similaridade no grau de ordenamento comparado com as outras Figuras referentes ao parâmetro de ordem.

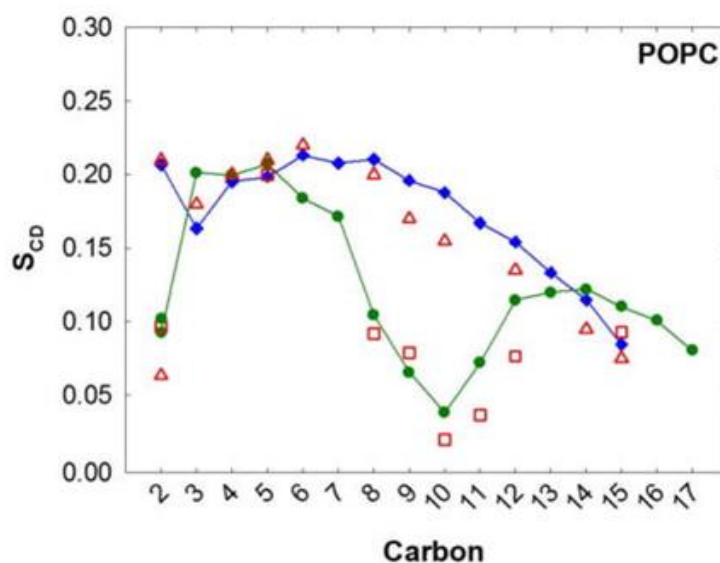


Figura 32 – Parâmetro de ordem adaptado de (106), tendo em verde as cadeias oleil e a azul as cadeias palmitoil.

4.5.4 – Área por Lipídeo

No estudo de simulações em bicamadas lipídicas é necessário verificar o quanto o sistema está em equilíbrio para isso calculou-se a área por lípidos. A tabela 2 mostra os valores calculados da área por lipídeo para a bicamada lipídica de POPC e POPC/POPG utilizando o método desenvolvido (*script*) e o *charmm_gui*. Na bicamada de POPC constatou-se que para o sistema 1 a diferença entre as áreas por lipídeos do *script* e do *charmm_gui* é de $0,3 \text{ \AA}^2$, indicando um resultado semelhantes entre o *script* e o *charmm_gui*, pelo fato que a área por lipídeo nessa situação teve uma variação de $\pm 1,1 \text{ \AA}^2$ para o *script* e $\pm 1,3 \text{ \AA}^2$ para o *charmm_gui*.

Para o sistema 2 testemunhou-se uma certa similaridade entre o *script* e o *charmm_gui* pois a diferença entre as áreas de lipídeos foi de $1,1 \text{ \AA}^2$ e a variação dos dois sistemas é de $\pm 1,1 \text{ \AA}^2$.

No caso da bicamada de POPC/POPG temos que para o sistema 1 há diferença entre as áreas por lipídeos do *script* e do *charmm-gui* para a bicamada de POPC é de $0,3 \text{ \AA}^2$ e de POPG $0,9 \text{ \AA}^2$, indicando um resultado próximo, pelo fato que a área por lipídeo teve uma variação da bicamada de POPC de $\pm 1,1 \text{ \AA}^2$ para o *script* e $\pm 1,2 \text{ \AA}^2$ para o *charmm_gui*, e a variação da bicamada de POPG é de $\pm 2,5 \text{ \AA}^2$ para o *script* e $\pm 2,4 \text{ \AA}^2$ para o *charmm_gui*. Para o sistema 2 temos que essa diferença entre as áreas por lipídeos para a bicamada de POPC é de $0,7 \text{ \AA}^2$ e de POPG $2,4 \text{ \AA}^2$, os resultados são satisfatórios, pois a bicamada de POPC teve uma variação $\pm 1,2 \text{ \AA}^2$ tanto para o *script* quanto para o *charmm_gui*; e a variação da bicamada de POPG é de $\pm 2,7 \text{ \AA}^2$ para o *script* e $\pm 2,3 \text{ \AA}^2$ para o *charmm_gui*.

Tabela 2 – Área por lipídeo da membrana de POPC e POPC/POPG para o *script* e para o *charmm_gui*

		Área por lipídeo da membrana de POPC (\AA^2)	Área por lipídeo da membrana de POPG (\AA^2)
Bicamada de POPC			
<i>script</i>	Sistema 1	$69,4 \pm 1,1$	-
	Sistema 2	$69,4 \pm 1,1$	-
<i>charmm_gui</i>	Sistema 1	$69,1 \pm 1,3$	-
	Sistema 2	$68,3 \pm 1,1$	-
Bicamada de POPC/POPG			
<i>script</i>	Sistema 1	$67,0 \pm 1,1$	$65,5 \pm 2,5$
	Sistema 2	$66,2 \pm 1,2$	$68,3 \pm 2,7$
<i>Charmm_gui</i>	Sistema 1	$66,7 \pm 1,2$	$66,4 \pm 2,4$
	Sistema 2	$66,9 \pm 1,2$	$65,9 \pm 2,3$

Tais resultados obtidos podem ser comparados com o valor obtido pelo próprio *site* do *CHARMM-GUI* para a bicamada de POPC pura, sem proteínas

inseridas nela, esse valor é que é de $68,3 \text{ \AA}^2$ e a bicamada de POPG pura tem o valor de 62 \AA^2 , depreendeu-se que, para os sistemas que contem somente a bicamada de POPC foram identificados valores bem próximos da área por lipídeos. A diferença encontrada nos valores é que no *site* do *charmm_gui* a área por lipídeo é de um sistema contendo somente a bicamada de POPC e nos sistemas simulados foi inserido nas bicamadas o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue.

Quando se tem uma bicamada mista de POPC/POPG, há uma diminuição no valor da área por lipídeo para a bicamada de POPC e um aumento para a bicamada de POPG, isso se deve a mistura das bicamadas fazendo com que uma diminua e a outra aumente.

4.5.5 – Ângulo de Inclinação Lipídica

O ângulo de inclinação lipídica, permite calcular o ângulo entre um vetor arbitrário, definido usando dois átomos dentro de um lipídeo, e a normal à bicamada (eixo-z). Para os lipídeos de POPC se fez uso do ângulo entre o fósforo do grupo fosfato e o nitrogênio do grupo colina na região do grupo da cabeça com a normal à bicamada, e para os lipídeos de POPG empregou-se o ângulo entre o fósforo do grupo fosfato com o carbono do grupo glicerol com a normal à bicamada. A tabela 3 mostra estes resultados, na bicamada de POPC pode-se notar que para o sistema 1 a diferença entre os ângulos de inclinação é de $0,8^\circ$, indicando resultados bem parecidos, pois os ângulos de inclinação tiveram um desvio médio quadrático de $\pm 1,6^\circ$ para ambos. Para o sistema 2 observou-se que entre o *script* e o *charmm_gui* a diferença entre os ângulos de inclinação é de $0,7^\circ$ e o desvio médio quadrático dos dois sistemas é de $\pm 1,6^\circ$.

Para a bicamada de POPC/POPG, viu-se que para o sistema 1 a diferença entre os ângulos de inclinação dos lipídeos de POPC é de $0,6^\circ$ e de POPG $0,7^\circ$, indicando que as bicamadas são bem parecidas, pelo fato de que a diferença é menor que 1° e o desvio quadrático médio para os lipídeos de POPC de $\pm 1,7^\circ$ para o *script* e para o *charmm_gui*, e o desvio quadrático médio dos lipídeos de POPG é de $\pm 4^\circ$

para o *script* e para o *charmm_gui*. Para o sistema 2 temos que esta diferença entre os ângulos de inclinação lipídica para os lipídeos de POPC é de $1,1^\circ$ e de POPG $0,7^\circ$, com o desvio quadrático médio de $\pm 4,1^\circ$ para os lipídeos de POPC e $\pm 4,3^\circ$ para os lipídeos de POPG, esse resultado indica que as bicamadas do *script* e o *charmm_gui* são semelhantes para a bicamada de POPC e POPC/POPG.

Tabela 3 – Ângulo de inclinação lipídica para a bicamada de POPC e POPC/POPG para o *script* e para o *charmm_gui*.

		Ângulo de inclinação lipídica para a bicamada de POPC ($^\circ$)	Ângulo de inclinação lipídica para a bicamada de POPG ($^\circ$)
Bicamada de POPC			
<i>script</i>	Sistema 1	$67,0 \pm 1,6$	-
	Sistema 2	$66,7 \pm 1,6$	-
<i>charmm_gui</i>	Sistema 1	$66,2 \pm 1,6$	-
	Sistema 2	$66,0 \pm 1,6$	-
Bicamada de POPC/POPG			
<i>script</i>	Sistema 1	$66,7 \pm 1,7$	$82,5 \pm 4,0$
	Sistema 2	$67,5 \pm 1,7$	$85,1 \pm 4,1$
<i>Charmm_gui</i>	Sistema 1	$67,3 \pm 1,7$	$83,2 \pm 4,0$
	Sistema 2	$66,4 \pm 1,7$	$85,8 \pm 4,3$

Comparando o ângulo de inclinação lipídica dos lipídeos de POPC da bicamada pura com os valores dos lipídeos de POPC da bicamada de POPC/POPG pode-se divisar que os valores são próximos, indicando que na bicamada POPC/POPG não houve mudança significativa entre os ângulos do grupo fosfato com o grupo colina na presença da bicamada de POPG.

Os resultados da inclinação lipídica dos lipídeos de POPG é condizente com a área por lipídeos, pois o grupo glicerol esta mais paralelo à superfície da membrana fazendo com que os lipídeos de POPG tenha uma área por lipídeo maior.

4.5.6 – Interdigitação de Lipídeos

Por intermédio da ferramenta de Interdigitação de lipídeos foi possível calcular três medidas diferentes de Interdigitação das cadeias acíclicas que são eles I_p , w_p e I_c .

A tabela 4 mostra o quanto as cadeias acíclicas pertencentes a uma folha específica estão envolvidas por cadeias acíclicas da outra folha nos quais existe a sobreposição de densidades de massa. Para a bicamada de POPC notou-se que a sobreposição das distribuições de massa das duas folhas dos lipídeos de POPC ao longo da normal à bicamada, I_p , é de 34% e 32% para o *script* e o *charmm_gui*, respectivamente, e a diferença entre eles é 2%, com o desvio quadrático médio de $\pm 2\%$ para *script* e *charmm_gui*. Analisando o sistema 2 a sobreposição de densidade de massa é de 33% para o *script* e 32% para o *charmm_gui*, com uma diferença de 1%, com o desvio quadrático médio de $\pm 1\%$ para ambos.

Para a bicamada de POPC/POPG, para o cálculo dos lipídeos de POPC temos um valor de 31% e 30% para o *script* e o *charmm_gui*, respectivamente, tendo uma diferença entre eles de 1%, com o desvio quadrático médio de $\pm 1\%$ para *script* e $\pm 2\%$ para *charmm_gui*, para os lipídeos de POPG é de 30% para o *script* e 33% para o *charmm_gui*, e a diferença entre eles é 3%, com o desvio quadrático médio de $\pm 3\%$ para *script* e *charmm_gui*. Para o sistema 2 a sobreposição de densidade de massa é de 31% para ambos, com o desvio quadrático médio de 1% para *script* e 2% para *charmm_gui*, para a bicamada de POPG é de 32% para o *script* e 31% para o *charmm_gui*, e a diferença entre eles é 1%, com o desvio quadrático médio de $\pm 3\%$ para *script* e *charmm_gui*.

A largura da região de sobreposição de distribuições de massa, w_p , para a bicamada de POPC temos que para os lipídeos de POPC o valor encontrado para o *script* foi de 5,9 Å e para o *charmm_gui* é de 5,4 Å e a diferença entre o *script* e o *charmm_gui* é 0,5 Å com o desvio quadrático médio de $\pm 0,5$ e $\pm 0,4$ Å, para o *script* e para o *charmm_gui*, respectivamente. No sistema 2 temos que a largura de

sobreposição das distribuições de massa é de 5,6 e 5,5 Å, para o *script* e *charmm_gui*, com o desvio quadrático médio de $\pm 0,3$ Å para os sistemas estudados.

Tabela 4 – Interdigitação de lipídeos para a bicamada de POPC e POPC/POPG para o *script* e o *charmm_gui*.

		Ip	Wp (Å)	Ic
Bicamada de POPC				
<i>script</i>	Sistema 1	0,34 ± 0,02	5,9 ± 0,5	0,063 ± 0,004
	Sistema 2	0,33 ± 0,01	5,6 ± 0,3	0,062 ± 0,003
<i>charmm_gui</i>	Sistema 1	0,32 ± 0,02	5,4 ± 0,4	0,061 ± 0,004
	Sistema 2	0,32 ± 0,01	5,5 ± 0,3	0,059 ± 0,003
Bicamada de POPC/POPG				
		POPC		
<i>script</i>	Sistema 1	0,31 ± 0,01	5,4 ± 0,4	0,047 ± 0,003
	Sistema 2	0,31 ± 0,01	5,8 ± 0,4	0,047 ± 0,003
<i>Charmm_gui</i>	Sistema 1	0,30 ± 0,02	5,5 ± 0,5	0,045 ± 0,003
	Sistema 2	0,31 ± 0,02	5,5 ± 0,4	0,047 ± 0,004
		POPG		
<i>script</i>	Sistema 1	0,30 ± 0,03	5,3 ± 0,7	0,013 ± 0,004
	Sistema 2	0,32 ± 0,03	5,8 ± 0,6	0,014 ± 0,004
<i>Charmm_gui</i>	Sistema 1	0,33 ± 0,03	5,5 ± 0,7	0,013 ± 0,004
	Sistema 2	0,31 ± 0,03	5,4 ± 0,8	0,014 ± 0,004

Para a bicamada de POPC/POPG considerando o sistema 1 temos que a largura da região de sobreposição de distribuições de massa, para os lipídeos de POPC é de 5,4 Å para o *script* e para o *charmm_gui* é de 5,5 Å e a diferença dos valores do *script* e do *charmm_gui* é 0,1 Å com o desvio quadrático médio de $\pm 0,4$ e $\pm 0,5$ Å para o *script* e para o *charmm_gui*, nos lipídeos de POPG é de 5,3 Å para o *script* e 5,5 Å para o *charmm_gui*, a diferença entre o *script* e o *charmm_gui* é 0,2 Å com o desvio quadrático médio de $\pm 0,7$ Å para o *script* e para o *charmm_gui*.

No sistema 2 temos que a largura de sobreposição das distribuições de massa para os lipídeos de POPC é de 5,8 e 5,5 Å para o *script* e o *charmm_gui*, e a diferença entre eles é de 0,3 Å, com o desvio quadrático médio de $\pm 0,4$ Å para os dois sistemas estudados. Nos lipídeos de POPG é de 5,8 e 5,4 Å, com uma diferença entre o *script* e *charmm_gui* de 0,4 Å com o desvio quadrático médio de $\pm 0,6$ e $\pm 0,8$ Å para o *script* e para o *charmm_gui*, respectivamente.

Considerando a fração baseada na coordenação construída contando o número de átomos que estão em contato com a folha oposta (I_c) e utilizando um raio de corte de 4 Å, para a bicamada de POPC, constatou que os lipídeos de POPC no sistema 1 tem uma diferença entre o *script* e o *charmm_gui* de 0,2% com o desvio quadrático médio de 0,4% para ambos, *script* e *charmm_gui*. Considerando o sistema 2 temos uma diferença de 0,3% entre o *script* e o *charmm_gui*, com o desvio quadrático médio de 0,3% para *script* e *charmm_gui*.

Para a bicamada de POPC/POPG podemos observar para o sistema 1 com os lipídeos de POPC para o *script* o valor é de 4,7% e para o *charmm_gui* 4,5%, tem-se uma diferença entre o *script* e o *charmm_gui* de 0,2% com o desvio quadrático médio de $\pm 0,3\%$ para ambos, para os lipídeos POPG o valor é de 1,3% para o *script* e o *charmm_gui* com o desvio quadrático médio de $\pm 0,4\%$ para ambos. Considerando o sistema 2 temos para os lipídeos de POPC para o *script* e *charmm_gui* o valor é de 4,7% com o desvio quadrático médio de $\pm 0,3\%$ para *script* e $\pm 0,4\%$ para *charmm_gui*, nos lipídeos de POPG o valor é de 1,4% para o *script* e o *charmm_gui* com o desvio quadrático médio de $\pm 0,4\%$ para ambos.

Os valores mencionados acima indicam que a sobreposição e a largura de distribuição de densidade de massa são próximos tanto para o *script* como para o *charmm_gui*, para os sistemas estudados. Em relação a fração baseada na coordenação construída, contando o número de átomos que estão em contato com a folha oposta, os dois métodos e os dois sistemas ficaram com resultados próximos, tanto é que em alguns casos os valores foram os mesmos. Esta diferença de valores e I_c para os lipídeos de POPC com o de POPG está relacionada com a proporção existente na bicamada.

4.6 – Conclusões

Para gerar os sistemas que foram simulados no estudo da interação entre o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue com modelos de membranas desenvolveu-se um *script* cuja finalidade era inserir proteínas de membrana em bicamadas lipídicas causando a mínima perturbação possível. Este método foi aplicado na inserção do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue em bicamadas lipídicas. Os resultados obtidos foram comparados com o mesmo processo realizado em um *site* de preparação de arquivos de entrada para simulações, o *charmm_gui*.

Com relação ao *script*, podemos concluir que ele é eficiente para a inserção de proteínas em bicamadas lipídicas causando a mínima perturbação possível, pelos seguintes argumentos:

- Uma das vantagens do nosso método, em comparação com o *charmm_gui*, é que as diversas janelas criadas apresentam o mesmo número de fosfolipídios na bicamada. Isso é particularmente conveniente em simulações nas quais são calculados os perfis de energia livre por um caminho de reação usando a técnica de múltiplas janelas. Isso já não ocorre no *charmm_gui*, pois houve uma diferença nos números de lipídeos.

- O RMSD calculado mostra que a diferença entre as posições dos átomos de referência (fósforos) da bicamada inicial e da bicamada gerada ficou abaixo de 1 Å, com convergência mais rápida para a bicamada mista (POPC/POPG);

- Na análise de comparação do cálculo de propriedades físico-químicas das bicamadas entre o *script* e o *charmm_gui* tais como: Perfil de Densidade, Parâmetro de Ordem, Área por Lipídeo, Ângulo de Inclinação Lipídica e Interdigitação de Lipídeos nossos resultados são comparáveis aos obtidos com o *charmm_gui*;

Capítulo 5: Estudo do Processo de Adsorção do Peptídeo de Fusão em Modelos de Membranas

5.1 – Introdução

Neste capítulo, faremos a caracterização do processo de adsorção do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue em modelos de membranas de POPC e POPC:POPG na razão 4:1. Para isso serão realizadas análises estruturais a fim de verificar se o peptídeo sofreu alguma alteração na sua estrutura quando inserido na bicamada e será também realizado um estudo da energética desse processo, para verificar qual região do peptídeo de fusão interage melhor com a bicamada, com o objetivo de, futuramente, encontrar mecanismos que inibam essa interação e, conseqüentemente, a infecção da célula pelo do vírus da Dengue.

5.2 – Objetivo

Estudar a posição relativa e a afinidade do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue com modelos de membranas biológicas, utilizando Dinâmica Molecular. Para isso será calculado o perfil de energia livre em função de um caminho de reação com o método *Adaptive Biasing Force* (ABF).

Verificar se o peptídeo de fusão sofreu alguma alteração em sua estrutura conformacional quando inserido na bicamada. Para isso faremos análises da estrutura secundária e RMSD

Calcular as ligações de hidrogênio entre o peptídeo e seu entorno e as interações não-ligadas, que são representadas pelas interações de van der Waals e eletrostáticas, entre o peptídeo de fusão e as bicamadas de POPC e POPC com POPG na proporção 4:1, com a intenção de determinar quais interações entre

peptídeo e bicamada são mais eficientes e verificar que região do peptídeo contribui mais para essas interações.

5.3 – Métodos Computacionais

5.3.1 – RMSD

O RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*, indica o quanto cada átomo, em média, se distanciou de sua posição original. Essa medida é utilizada para calcular o quanto a estrutura no tempo t_2 em questão se afastou da estrutura no tempo t_1 (equação 30). Normalmente a estrutura no tempo t_1 é a conformação encontrada na primeira configuração do sistema.

$$RMSD(t_1, t_2) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \|\vec{r}_i(t_1) - \vec{r}_i(t_2)\|^2} \quad (30)$$

Sendo que N é o número de sítios que se está querendo calcular o RMSD, e $\vec{r}_i(t)$ é o vetor posição do sítio i no tempo t . Um detalhe importante é que as conformações que estão sendo analisadas com o cálculo do RMSD devem estar sobrepostas (alinhadas) utilizando o método dos mínimos quadrados. Em geral as ferramentas que calculam o RMSD já fazem essa sobreposição (alinhamento).

5.3.2 - RMSE

O RMSE (desvio médio quadrático da energia) é semelhante ao RMSD, a diferença é que em vez de considerar o quanto cada sítio se distanciou de sua posição original, consideramos no RMSE o quanto a energia livre de cada ponto do caminho de reação foi alterada, para o mesmo sistema, entre um tempo de simulação e outro. O RMSE é calculado pela equação 31.

$$RMSE(A_1, A_2) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (E_i(A_1) - E_i(A_2))^2} \quad (31)$$

Sendo que A_i se refere ao perfil de energia livre por um caminho de reação ξ obtido em um tempo de simulação arbitrário, M é o número de pontos do caminho de reação e $E_i(A_j)$ é a energia livre do ponto i do caminho de reação ξ do perfil j .

5.3.3 - Estrutura Secundária

Uma das principais características de uma proteína é a sua estrutura secundária. Isso porque a função da proteína está intimamente ligada à sua estrutura. A estrutura secundária de um polímero é definida como a conformação local da sua cadeia principal.

No caso particular das proteínas, a estrutura secundária é geralmente usada para descrever os padrões regulares da geometria local da cadeia polipeptídica, tais como α -hélices, folhas- β e voltas (*turns*).

Em nossos estudos utilizamos uma parte da estrutura cristalográfica (PDBID: 1OAN) da proteína E do vírus da dengue. A Figura 9 (b) representa a estrutura secundária do peptídeo longo (do resíduo 88-123) e a Figura 9 (c) a estrutura secundária do peptídeo curto (do resíduo 98-110), antes da simulação de DM. O peptídeo longo e o peptídeo curto aparentemente apresentam as estruturas folhas betas e voltas (*turns*) e não tem a estrutura em alfa hélice.

5.3.4 - Ligações de Hidrogênio

A ligação de hidrogênio é uma interação atrativa seletiva e direcional com efeitos na definição de estruturas, que ocorre entre duas moléculas ou entre duas partes da mesma molécula e entre elas há a presença do átomo de hidrogênio.

Uma ligação de hidrogênio é formada quando um átomo de hidrogênio está

ligado por uma ligação covalente com um átomo A, este átomo A é mais eletronegativo que o hidrogênio, forma uma segunda ligação com outro átomo B e é representada como $A - H \cdots B$.

5.3.5 – Cálculos de Energia Livre por Simulações de DM

5.3.5.1 – Cálculos de Energia Livre

Interações entre proteínas e membranas têm um papel importante em muitos processos biológicos (10,11,19,38,98,107), e como tal, é interessante que existam métodos capazes de calcular as variações de energia livre (108–110) nesses processos. O cálculo da energia livre de ligação entre dois estados, ΔG , tem sido muito utilizado na caracterização de sistemas biológicos, em especial, no cálculo da afinidade entre proteínas e membranas. Pela formulação da Segunda Lei da Termodinâmica, a definição de energia livre relaciona variações de entalpia (energia liberada pela reação) e entropia (energia gasta na organização), representado pela equação 32, de modo que em um processo espontâneo a variação de energia livre é sempre negativa.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (32)$$

Sendo que ΔG é a variação da energia livre de Gibbs, ΔH é a variação de entalpia, T temperatura absoluta e ΔS é a variação de entropia.

Vários métodos foram desenvolvidos para o cálculo da energia livre, com diferenças no poder computacional necessário e na qualidade dos resultados obtidos. Os métodos perturbação termodinâmica (FEP, para *Free Energy Perturbation*) (14,108,111,112) e integração termodinâmica (TI, para *Thermodynamic Integration*) (109,14,112–114) são os métodos, disponíveis atualmente e considerados os mais rigorosos para o cálculo da energia livre. Apesar

de serem os métodos com mais rigidez, são também os métodos mais exigentes computacionalmente.

A determinação das energias envolvidas em processos de associação ligante-receptor são de extrema importância quando o objetivo é entender melhor os mecanismos pelos quais essa ligação acontece. A teoria de Integração Termodinâmica (14) nos diz que em qualquer sistema podemos assumir que o perfil do Potencial de Força Média (PMF, do inglês *Potential of Mean Force*) ao longo de uma determinada coordenada de reação ξ corresponde ao perfil de energia livre ao longo da mesma.

Dentre os diversos métodos existentes para se calcular o Potencial de Força Média ao longo de uma coordenada de reação, o método *Adaptive Biasing Force* (ABF) (109,112,114) é considerado, atualmente, um dos mais precisos e bem fundamentado teoricamente.

Em geral, algumas propriedades físicas, tais como pressão, calor específico, podem ter uma dependência com a posição e o momento de um sistema constituído de N partículas. O valor instantâneo de uma propriedade A pode ser escrito como sendo $A(\mathbf{p}^N(t), \mathbf{r}^N(t))$, sendo que $\mathbf{p}^N(t)$ e $\mathbf{r}^N(t)$ representa, respectivamente, o momento e a posição das N partículas em função do tempo, isto é, $A(\mathbf{p}^N(t), \mathbf{r}^N(t)) \equiv A(p_{1x}, p_{1y}, p_{1z}, p_{2x}, \dots, x_1, y_1, z_1, x_2, \dots, t)$ sendo que p_{1x} é o momento da partícula 1 na direção de x e x_1 é a coordenada em x . Devido ao resultado da interação entre as partículas o valor instantâneo da propriedade A flutua ao longo do tempo. Este valor é medido experimentalmente como uma média do valor de A ao longo do tempo, conhecido por *time average*, podendo ser calculado pela equação 33.

$$A_{\text{médio}} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} A(\mathbf{p}^N(t), \mathbf{r}^N(t)) dt \quad (33)$$

Através das interações intermoleculares podemos calcular o valor médio de propriedades do sistema, isto pode ser feito por meio da força que atua em cada partícula durante a interação com os outros átomos. Esta força pode ser calculada

diferenciando a função energia, sabendo a força que atua em cada átomo é possível determinar a aceleração por meio da segunda Lei de Newton. Conhecendo a velocidade e posição iniciais de cada átomo, combinadas com o vetor aceleração, pode-se determinar o movimento das partículas. Isto é feito para cada partícula do sistema variando o tempo, de modo que podemos determinar os valores médios das propriedades usando o equivalente numérico da equação 33. A dificuldade de calcular propriedades macroscópicas é o número de moléculas, que são da ordem de 10^{23} , tornando inviável este cálculo. Boltzmann e Gibbs, conhecendo este problema, desenvolveram a mecânica estatística, que substitui um único sistema que evolui no tempo por um grande número de repetições do sistema que ocorrem simultaneamente, então o *time average* é substituído por *ensemble average* descrito na equação 34.

$$\langle A \rangle = \iint A(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) \cdot \rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N \quad (34)$$

Sendo que $\langle A \rangle$ indica o valor médio da propriedade A sobre todas as repetições do *ensemble* gerado pela simulação e $\rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)$ é a densidade de probabilidade do *ensemble*.

O *ensemble average* da propriedade A é determinado pela integral sobre todas as possíveis configurações do sistema. Sob condições constantes de números de partículas, volume e temperatura, a densidade de probabilidade é expressa pela distribuição de Boltzmann (equação 35).

$$\rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) = \frac{e^{[-E(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T]}}{Q} \quad (35)$$

Sendo que $E(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)$ é a energia, Q é a função de partição canônica, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura.

A função de partição canônica é escrita em termos do Hamiltoniano, para um sistema com N partículas idênticas esta função é dada por:

$$Q_{NVT} = \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \iint e^{-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T} d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N \quad (36)$$

Sendo que k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, $N!$ surge da indistinguibilidade da partícula, h é a constante de Planck e $1/h^{3N}$ é necessário para garantir que a função de partição seja igual ao resultado da mecânica quântica para uma partícula em uma caixa.

A seguir iremos utilizar os conceitos discutidos acima para desenvolver o método de Integração Termodinâmica (113) para determinar o valor da energia livre.

5.3.5.1.1 – Integração Termodinâmica

A energia livre é considerada uma das mais importantes grandezas na termodinâmica, ela é usualmente expressa por uma função de Helmholtz (A) ou função de Gibbs (G). A energia livre de Helmholtz é utilizada em um sistema que mantém constantes o número de partículas, o volume e a temperatura, e a energia livre de Gibbs é utilizada quando tem-se constantes o número de partículas, a pressão e a temperatura.

A energia livre de Helmholtz é dada por:

$$A = -k_B T \ln Q \quad (37)$$

Sendo que k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e Q é a função de partição que foi definida na equação 36.

O método de integração termodinâmica determina a variação de energia livre entre dois estados de um sistema a partir de um caminho de reação qualquer. Considerando que a variação de energia livre (ΔA) pode ser escrita como sendo uma função contínua de ξ e que pode ser escrita como sendo:

$$\Delta A = \int_0^1 \frac{\partial A_\xi}{\partial \xi} d\xi \quad (38)$$

Da equação 37 temos que:

$$A(\xi) = -k_B T \ln Q(\xi) \quad (39)$$

então

$$\frac{\partial A(\xi)}{\partial \xi} = \frac{\partial(-k_B T \ln Q(\xi))}{\partial \xi} \quad (40)$$

$$\frac{\partial A(\xi)}{\partial \xi} = -\frac{k_B T}{Q(\xi)} \frac{\partial Q(\xi)}{\partial \xi} \quad (41)$$

Da definição da função de partição (equação 36) podemos escrever $\partial Q(\xi)/\partial \xi$ como sendo:

$$\frac{\partial Q(\xi)}{\partial \xi} = \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \iint \frac{\partial}{\partial \xi} \{e^{[-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T]}\} d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N \quad (42)$$

Diferenciando em relação a ξ temos que:

$$\frac{\partial Q(\xi)}{\partial \xi} = -\frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \frac{1}{k_B T} \iint \frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} e^{[-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T]} d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N \quad (43)$$

Substituindo a equação 43 na equação 41 obtemos;

$$\frac{\partial A(\xi)}{\partial \xi} = -\frac{k_B T}{Q(\xi)} \left[-\frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \frac{1}{k_B T} \iint \frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} e^{[-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T]} d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N \right] \quad (44)$$

$$\frac{\partial A(\xi)}{\partial \xi} = \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \frac{1}{Q(\xi)} \iint \frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} e^{[-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T]} d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N \quad (45)$$

Substituindo o valor de $Q(\xi)$ na equação 45

$$\frac{\partial A(\xi)}{\partial \xi} = \frac{\frac{1}{N!h^{3N}} \iint \frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} e^{-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T} d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N}{\frac{1}{N!h^{3N}} \iint e^{-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T} d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N} \quad (46)$$

$$\frac{\partial A(\xi)}{\partial \xi} = \frac{\iint \frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} e^{-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T} d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N}{\iint e^{-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T} d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N} \quad (47)$$

Levando em consideração que a densidade de probabilidade, $\rho_\xi(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)$, é dada por:

$$\rho_\xi(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) = \frac{e^{-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T}}{\iint e^{-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T} d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N} \quad (48)$$

podemos escrever $\partial A(\xi)/\partial \xi$ como sendo

$$\frac{\partial A(\xi)}{\partial \xi} = \iint \frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} \rho_\xi(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N \quad (49)$$

A integral da equação 49 representa a média do *ensemble*, assim esta equação fica:

$$\frac{\partial A(\xi)}{\partial \xi} = \left\langle \frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} \right\rangle_\xi \quad (50)$$

Substituindo a equação 50 na equação 38

$$\Delta A = \int_{\xi=0}^{\xi=1} \left\langle \frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} \right\rangle_\xi d\xi \quad (51)$$

Para determinar a diferença de energia livre usando a Integração Termodinâmica temos que calcular a integral da equação 51.

Pode-se calcular estas derivadas parciais (equação 51) utilizando conceito de diferenças finitas, fazendo uma aproximação podemos escrever que:

$$\frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} \approx \frac{\Delta H}{\Delta \xi} \quad (52)$$

A diferença de energia livre total é igual a área do gráfico de $\langle \frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} \rangle_{\xi}$ por ξ , como ilustrado na Figura 33.

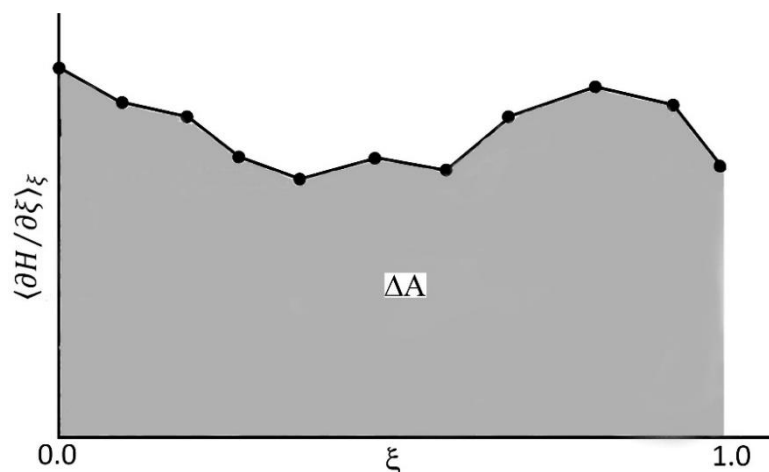


Figura 33– Mostra o cálculo da diferença de energia livre utilizando o método integração termodinâmica.

O termo à direita na equação 50 é a força média que atua sobre o sistema em estudo na direção de ξ . Assim, como a variação da energia livre é a integral em ξ dessa força média, a energia livre também é chamada de Potencial da Força Média (PMF).

5.3.5.2 – Adaptive Biasing Force (ABF)

No método ABF a energia livre é obtida a partir de sua derivada, que é tomado como a média da força resultante exercida na direção de ξ (F_{ξ}) tomada sobre uma superfície na qual ξ é o caminho de reação (equação 53).

$$\frac{\partial A(\xi)}{\partial \xi} = \left\langle \frac{\partial H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{\partial \xi} \right\rangle_{\xi} = - \langle F_{\xi} \rangle_{\xi} \quad (53)$$

Dessa forma, o valor de $A(\xi)$ é obtido a partir de diferentes simulações nas quais onde F_{ξ} é calculado em pequenos intervalos de largura $\delta\xi$, permitindo então uma estimativa de $\partial A(\xi)/\partial \xi$. O diferencial do método ABF é que a força aplicada na direção de ξ , cuja finalidade é fazer o sistema percorrer toda a coordenada de reação, é refinada durante a própria simulação resultando em uma amostragem muito mais homogênea do espaço de fase. Essa força, chamada de força F^{ABF} , tem a forma da equação 54.

$$F^{\text{ABF}} = \nabla_x A' = - \langle F_{\xi} \rangle_{\xi} \nabla_x \xi \quad (54)$$

sendo A' é a energia livre e $\langle F_{\xi} \rangle_{\xi}$ a média de F_{ξ} , calculados até o tempo atual para cada valor de ξ . Conforme a simulação segue o valor de F^{ABF} vai sendo progressivamente refinado e aplicado ao sistema por toda coordenada de reação. Tal procedimento garante que no intervalo de largura $\delta\xi$ centrado em ξ , a força atuando ao longo da coordenada de reação tenda a zero com o tempo, de forma que a evolução do sistema ao longo de ξ é governado de forma majoritária por suas propriedades de difusão. A aplicação dessa força, que se adapta às barreiras de energia livre que o sistema deve superar para percorrer toda a coordenada de reação, resulta na estimativa do perfil de energia livre com uma amostragem mais homogênea e com um custo computacional baixo em relação aos outros métodos.

5.3.6 - Interações não Ligadas

Como já mencionado anteriormente, as interações não ligadas entre pares podem ser descritos pelos potenciais de van der Waals e pelo eletrostático que são

representados, respectivamente, pelos potenciais de Lennard-Jones (equação 17) e de Coulomb (equação 18).

A interação total entre os átomos não ligados será a soma dos potenciais de Leonard-Jones com o de Coulomb.

5.4 – Detalhes Computacionais

Em nossas simulações utilizamos bicamadas lipídicas em solução aquosa compostas por lipídeos de POPC (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina) (bicamada pura) e por lipídeos de POPC e POPG (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol) na proporção 4:1 (bicamada mista). Nos sistemas gerados temos que a bicamada pura contém 288 moléculas de POPC e a mista contendo 240 moléculas de POPC e 60 moléculas de POPG. Inserimos nesses sistemas duas sequências de resíduos de aminoácidos da proteína E do vírus da Dengue (estrutura cristalográfica obtida do PDBID: 1OAN) do resíduo 88 até o resíduo 123, denominado peptídeo longo ou pep_longo, que contém a seguinte sequência de resíduo de aminoácidos K R F V C K H S M V D R G W G N G C G L F G K G G I V T C A M F T C K K (*vide* figura 9 (b)), e do resíduo 98 até o resíduo 110, denominado peptídeo curto ou pep_curto, esta região é conhecida como peptídeo de fusão, e contém a seguinte sequência de resíduos de aminoácidos D R G W G N G C G L F G K (*vide* figura 9 (c)). A carga líquida total do peptídeo longo é de +6e e do peptídeo curto de +1e. As bicamadas foram solvatadas com moléculas de água suficientes para gerar camadas de aproximadamente 80 Å cada lado

Para os cálculos do perfil energia livre em função de um caminho de reação é conveniente que se divida esse caminho em porções que podem ser simuladas independentemente de forma paralela, de modo a otimizar o tempo de simulação e obter uma amostragem o mais uniforme possível. Essas porções são chamadas de “janelas”. O caminho de reação utilizado em nossas simulações foi a distância z , perpendicular ao plano da bicamada, entre o átomo de carbono CH₂ do resíduo do triptofano do peptídeo de fusão e o centro de massa dos átomos de fósforo de todos

os fosfolipídios da bicamada. Foram gerados dois sistemas, com 60 janelas cada, para a bicamada pura onde em um sistema foi inserido o pep_longo e no outro sistema o pep_curto. Na bicamada mista foram gerados também dois sistemas com 60 janelas cada, sendo em um sistema inserido o pep_longo e no outro o pep_curto. Cada janela dos sistemas gerados compreende 2 Å do caminho de reação.

A Figura 34 mostra três posições onde foi inserido o peptídeo longo na bicamada de POPC ao longo da coordenada de reação em diferentes janelas. Observa-se que o primeiro peptídeo está na coordenada de reação de -38 Å, esta coordenada de reação corresponde a janela 1, e o último peptídeo na coordenada de reação de 84 Å que corresponde a janela 60.

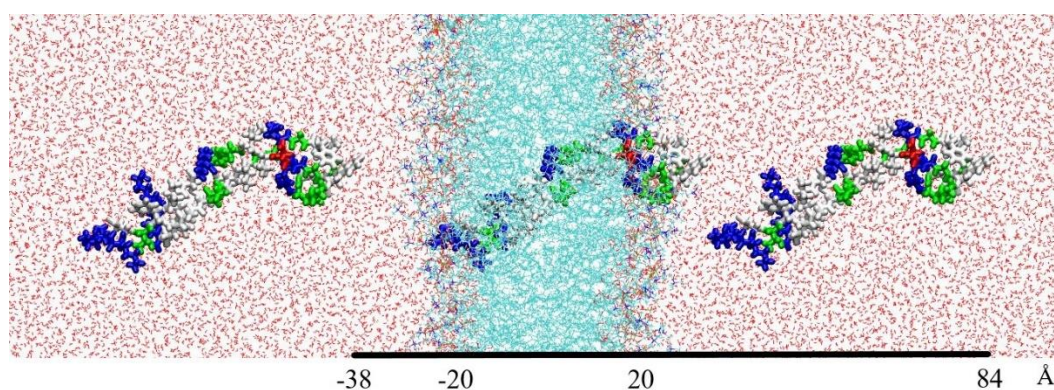


Figura 34 – Posições aonde foi inserido o peptídeo longo em função da coordenada de reação.

Em todas as simulações de Dinâmica Molecular, foram utilizadas as seguintes condições: temperatura de 310 K, pressão de 1 atm e pH 7,0. As simulações foram rodadas pelo NAMD, foi utilizado o campo de força CHARMM36 (104) e o modelo de água foi o TIP3P. Em todos os sistemas gerados foi realizada uma minimização de energia com 10 mil passos e uma equilibração de 5 ns. Para o cálculo da energia livre pelo caminho de reação, primeiramente foi feito uma simulação de 10 ns. Depois disso, foi selecionada a região onde se observou o mínimo de energia livre e refinamos os cálculos nessa região, simulando de 5 em 5 ns, até obter 30 ns para a bicamada pura e 35 ns para a bicamada mista. Nesses tempos foi observada convergência do mínimo de energia livre.

Em todas as simulações foram usados os seguintes parâmetros: o passo de integração foi de 2 fs; raio de corte 10 Å; coeficiente de amortecimento da dinâmica de Langevin 1 ps⁻¹; período de oscilação do pistão de Langevin 200 fs; tempo de amortecimento de Langevin 100 fs e as interações de longo alcance foram tratadas utilizando PME com um tamanho de *grid* na direção x e y de 100 Å e na direção z de 196 Å.

Nas simulações de minimização e equilibração, foram aplicadas restrições aos átomos do peptídeo e a alguns átomos de fósforo da bicamada com a finalidade de manter inalteradas a estrutura secundária inicial do peptídeo e a distância z entre o peptídeo e a bicamada.

Nos cálculos utilizando o método ABF nenhuma restrição foi aplicada além das exigidas pelo método. Foi estipulado um passo de largura de *bin* de 0,1 Å para o cálculo da força média, os limites do caminho de reação foram garantidos pela aplicação de um potencial quadrático com constante de força de 10 kcal/mol.Å² que atua a partir dos limites e a força ABF foi aplicada, em cada bin, depois de uma amostragem mínima de 1000.

Nos cálculos de RMSD foi utilizado o *plugin RMSD Trajectory Tool* do VMD, selecionando o *backbone* do peptídeo e o primeiro *frame* como referência. A análise de estrutura secundária foi realizada a partir de um *script* TCL desenvolvido em nosso grupo que obtém, a partir de uma trajetória, a conformação de estrutura secundária de cada aminoácido e a porcentagem de cada tipo de conformação na proteína toda em função do tempo. Utilizamos o *plugin Hydrogen Bonds* do VMD para determinar as ligações de hidrogênio, usando como parâmetros a distância máxima entre doador e aceitador de 3 Å e ângulo de corte de 20°. Todos os valores médios foram calculados utilizando os últimos 5 ns de simulação da DM.

Para o cálculo das interações não-ligadas usamos o *plugin NAMD Energy* do VMD. No *plugin* inserimos os seguintes parâmetros: na seleção 1 o peptídeo longo, na seleção 2 a bicamada de POPC, o tipo de energia selecionado foi o VDW e Elec, um *switch* de 10, *cutoff* 12, *Dielectric* 1, *timemult* 2, *step length* de 1 e *stride* 1. Em seguida foi dividido o peptídeo longo em “Colar”, “Região Interna” e

“Região Externa” do peptídeo (definição a seguir) e colocado na seleção 1 e na seleção 2 a bicamada de POPC, após fazer uma análise verificou-se que no peptídeo da região do Colar e da Região Interna do peptídeo são as regiões de melhores interações com a bicamada, assim com essa informação dividiu-se a bicamada de POPC em grupo Fosfato, grupo Colina e Cauda e calculou-se as interações não ligadas com Colar e com a Região Interna do peptídeo. O mesmo procedimento foi adotado para as simulações com o peptídeo curto. Todos os valores médios foram calculados utilizando os últimos 5 ns de simulação da DM.

No caso da bicamada mista de POPC/POPG, foi calculado as interações da mesma forma que foi calculado só com POPC, sendo a única diferença no desmembramento do POPG o grupo Glicerol no lugar do grupo Colina. A fim de verificar qual é a influência do POPG na bicamada em termos energéticos, a bicamada de POPC/POPG também foi separada em POPC, POPG e POPC/POPG.

Como já mencionado, para os cálculos das interações não ligadas, o peptídeo longo e o peptídeo curto foi desmembrado em Colar, Região Interna e Região Externa. A tabela 5 e na figura 35 mostram os resíduos de aminoácidos em suas respectivas regiões para o peptídeo longo e curto.

Tabela 5 – Ilustra os aminoácidos na qual foi dividido o peptídeo longo e o peptídeo curto nas regiões do colar, “região interna” e “região externa”.

	Pep_longo		Pep_curto	
Colar	Ácido Aspártico 98 Arginina 99 Asparagina 103 Lisina 110		Ácido Aspártico 98 Arginina 99 Asparagina 103 Lisina 110	
Região Interna	Glicina 100 Triptofano 101 Glicina 102 Glicina 104 Cisteína 105	Glicina 106 Leucina 107 Fenilalanina 108 Glicina 109	Glicina 100 Triptofano 101 Glicina 102 Glicina 104 Cisteína 105	Glicina 106 Leucina 107 Fenilalanina 108 Glicina 109
Região Externa	Lisina 88 Arginina 89 Fenilalanina 90 Valina 91 Cisteína 92 Lisina 93	Isoleucina 113 Valina 114 Treonina 115 Cisteína 116 Alanina 117 Metionina 118		

	Histidina 94 Serina 95 Metionina 96 Valina 97 Glicina 111 Glicina 112	Fenilalanina 119 Treonina 120 Cisteína 121 Lisina 122 Lisina 123	
--	--	--	--

Para o desmembramento dos fosfolipídios temos que: para o POPC (Figura 36 (a)), ficou representada pela cor vermelha o grupo Fosfato, o grupo Colina pela cor azul e em verde os grupos acíclicos (que será chamada de Cauda), e para o fosfolipídio de POPG (Figura 36 (b)) a única diferença é que, no lugar do grupo Colina temos o grupo Glicerol representado pela cor amarela.

Destacando que, o peptídeo longo tem carga líquida de +6e e o peptídeo curto com carga líquida de +1e, após o desmembramento o Colar ficou com carga líquida +1e, a Região Interna com carga líquida nula e a Região Externa do peptídeo longo com carga +5e. Levando em consideração a bicamada de POPC, ela apresenta carga líquida nula, com o desmembramento o Fosfato ficou com carga líquida de -1e, a Colina com carga líquida de +1e e a Cauda com carga líquida nula, a bicamada de POPG tem carga líquida de -1e, com o desmembramento o Fosfato ficou com carga líquida de -1e, o Glicerol e a Cauda com carga líquida nula.

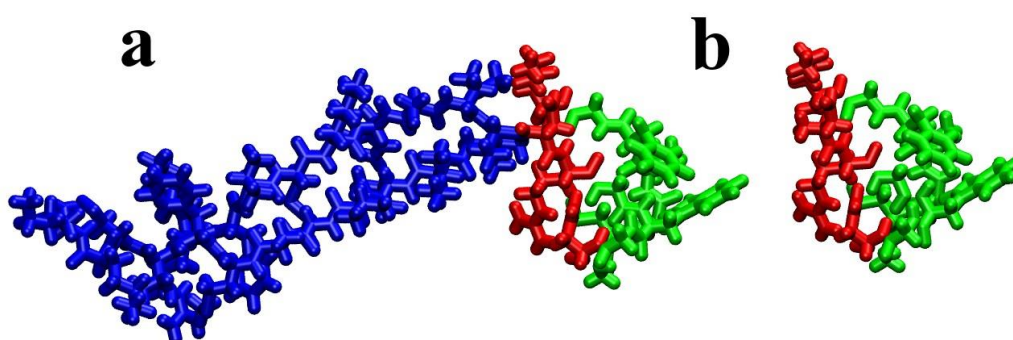


Figura 35– Desmembramento do peptídeo longo em (a) e do peptídeo curto em (b). O Colar está representado pela cor vermelha, a Região Interna pela cor verde e a Região Externa pela cor azul.

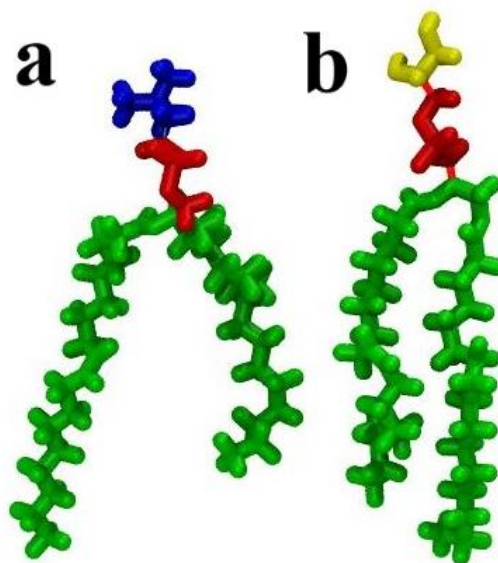


Figura 36- - Desmembramento dos fosfolipídeos de POPC e POPG, em (a) o POPC, está dividido pelo grupo Fosfato representado pela cor vermelha, o grupo Colina pela cor azul e Cauda pela cor verde e em (b) o POPG está dividido pelo grupo Fosfato representado pela cor vermelha, o grupo Glicerol pela cor amarela e a Cauda pela cor verde.

5.5 – Resultados e Discussões

5.5.1 – Adaptive Biasing Force (ABF)

Com a finalidade de obtermos a posição de equilíbrio do peptídeo com relação à bicamada e a energia livre envolvida no processo, realizamos simulações utilizando o método ABF. As Figuras 37 (a) e 37 (c) mostram o perfil da energia livre em função do caminho de reação obtido em 10 ns de simulação pelo método ABF, para a bicamada de POPC e POPC/POPG, respectivamente. O caminho de reação foi definido como a distância z entre o átomo do carbono (CH₂) do resíduo do Triptofano do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue e o centro de massa dos átomos de fósforo da bicamada de POPC e POPC/POPG.

A distribuição do número de vezes que cada valor da coordenada de reação foi amostrado e está representada nas Figuras 37 (b) e 37 (d) para o tempo de simulação de 10 ns, respectivamente para a bicamada de POPC e POPC/POPG. Pode-se observar que todos os pontos da coordenada de reação foram visitados em

uma mesma ordem de grandeza, tanto para o peptídeo longo quanto para o peptídeo curto.

Nota-se na Figura 37, para ambas as bicamadas, que na região de aproximadamente entre -15 a 0 Å está localizado o mínimo de energia livre para os dois peptídeos simulados. Para a bicamada de POPC temos que, o mínimo de energia livre da curva referente ao peptídeo curto é mais profundo que para o peptídeo longo, mostrando que, para esse tempo de simulação, o peptídeo curto tem maior afinidade pela bicamada e para a bicamada de POPC/POPG o peptídeo longo tem um valor mais profundo no mínimo de energia livre comparado com o peptídeo curto. Entretanto, não sabemos se o perfil obtido para 10 ns está devidamente convergido. Assim, estendemos o tempo de simulação para 15, 20, 25 e 30 ns para a bicamada de POPC.

A Figura 38 ilustra as curvas obtidas a partir das simulações realizadas nos tempos de 10, 15, 20, 25 e 30 ns, para o peptídeo longo, em bicamadas de POPC, ao longo de todo o caminho de reação. Como o perfil de energia livre apresenta, para todos os tempos de simulação, um comportamento similar com um único mínimo, iremos restringir nossas análises e cálculos somente a valores da distância z entre -28 Å e 2 Å para os sistemas a serem estudados com bicamadas de POPC e da distância z entre -29 Å e 1 Å para os sistemas com bicamadas de POPC/POPG.

As Figuras 39 (a) e 39 (b) ilustram esta região na qual está localizado o mínimo de energia para o peptídeo longo e para o peptídeo curto em bicamada de POPC, respectivamente. Para a bicamada de POPC/POPG as curvas obtidas das simulações realizadas nos tempos de 10, 15, 20, 25, 30 e 35 ns está ilustrada nas Figuras 40 (a) para o peptídeo longo e 40 (b) para o peptídeo curto.

Pode ser averiguado que para o peptídeo longo (figura 39 (a)), houve um aprofundamento do mínimo de energia livre, convergindo para um valor de aproximadamente -2,6 kcal/mol depois de 25 ns de simulação. Diferentemente ocorreu com o peptídeo curto (figura 39 (b)), que apresentou um aumento do mínimo, convergindo para um valor de aproximadamente -1,8 kcal/mol.

Notamos que tanto para o peptídeo longo (figura 40 (a)) como para o peptídeo curto (figura 40 (b)), houve um aprofundamento do mínimo de energia

livre, convergindo para um valor de aproximadamente -2 kcal/mol depois de 20 ns de simulação para o peptídeo longo e para a o peptídeo curto convergiu para um valor de aproximadamente -1.9 kcal/mol.

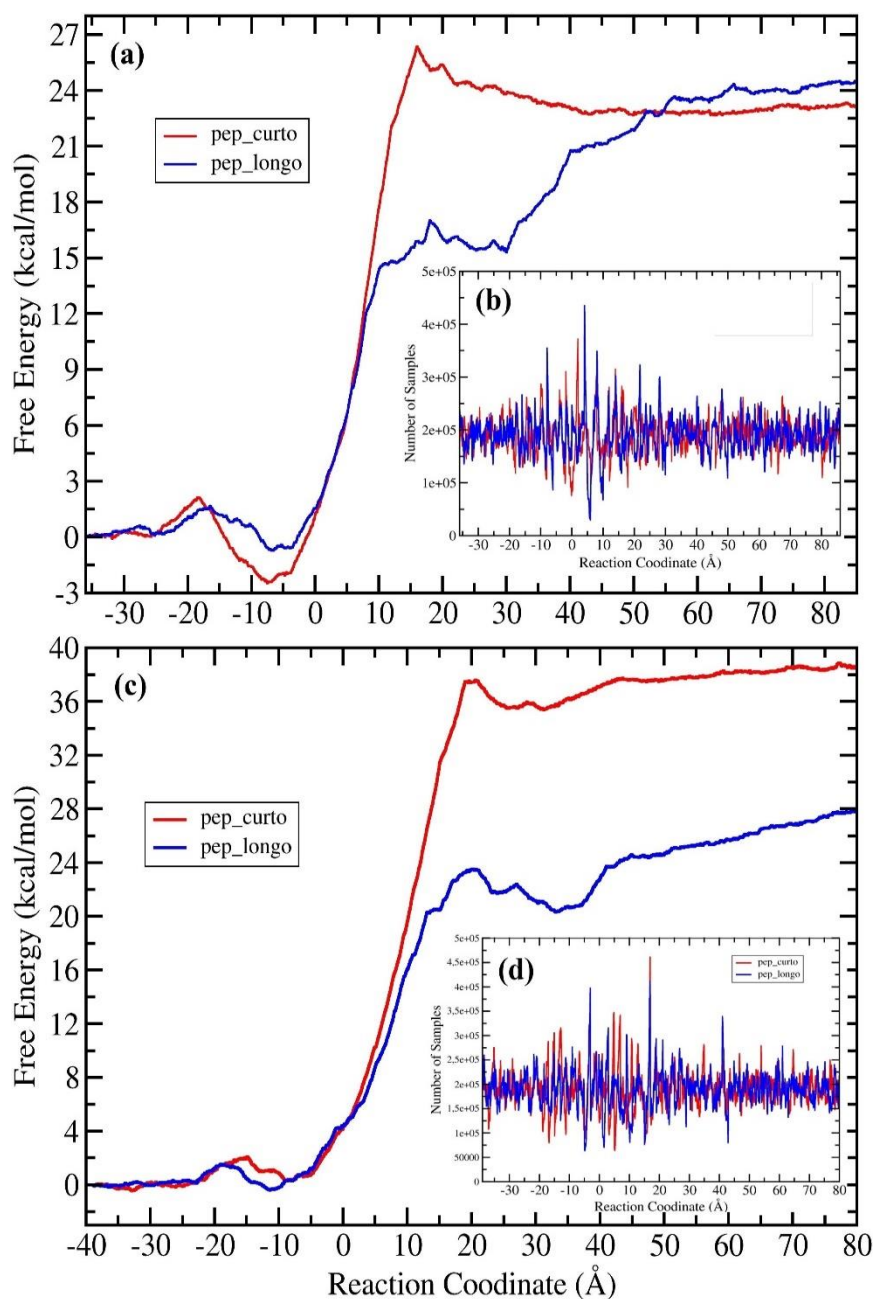


Figura 37 - O Perfil de energia livre em função do caminho de reação obtido pelo método ABF em bicamada de POPC (a) e POPC/POPG (c) para o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue. Amostragem da coordenada de reação para 10 ns de simulação em (b) para POPC e em (d) para POPC/POPG. A curva azul representa o peptídeo longo e a vermelha o peptídeo curto.

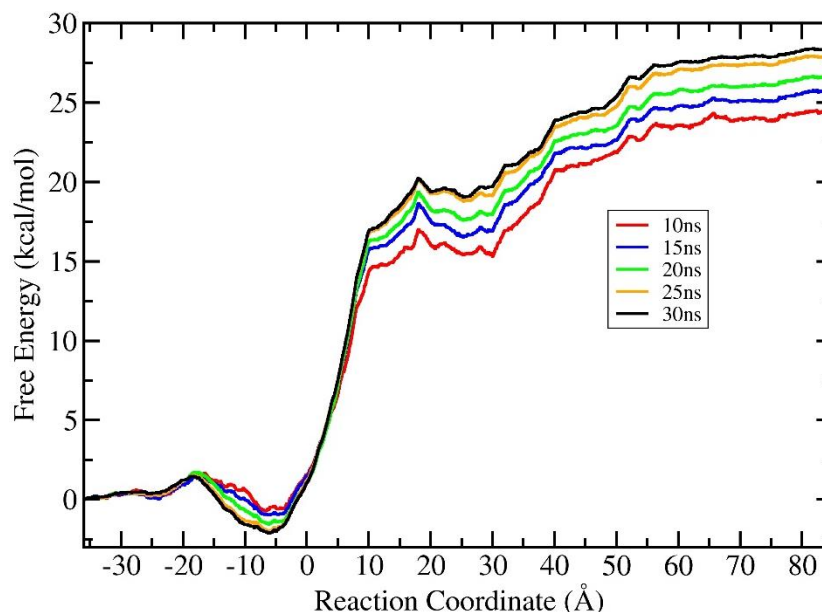


Figura 38 - Perfil da energia livre ao longo de todo o caminho de reação obtido pelo método ABF em bicamada de POPC, para o peptídeo longo. A simulação de 10 ns está representada pela cor vermelha, a de 15 ns pela cor azul, a de 20 ns pela cor verde, a de 25 ns pela cor alaranjada e a de 30 ns pela cor preta.

Para quantificarmos a convergência dos perfis de energia livre, foi calculado o RMSE (desvio médio quadrático da energia) entre as curvas obtidas nos diferentes tempos de simulação. A tabela 6 mostra os valores de RMSE para os dois sistemas simulados em bicamadas de POPC e POPC/POPG. Podemos verificar na tabela que para ambas as bicamadas os valores de RMSE a partir de 20 e 25 ns atingiram valores menores do que a metade de $k_B T$ (aproximadamente 0,6 kcal/mol para 310 K), considerando que esta diferença de energia livre é muito pequena entre as simulações podemos dizer que estes sistemas convergiram.

As Figuras 41 (a) e 41 (c) mostram, separadamente, os perfis, convergidos após 30 ns de simulação para a bicamada de POPC e 35ns para a bicamada de POPC/POPG, de energia livre em função do caminho de reação para os dois sistemas simulados. As amostragens de cada ponto do caminho de reação estão esquematizadas nas Figuras 41 (b) e 41 (d), respectivamente para a bicamada de POPC e POPC/POPPG. Pode-se constatar que todos os pontos da coordenada de reação em ambas as bicamadas foram visitados em uma mesma ordem de grandeza, tanto para o peptídeo longo quanto para o curto.

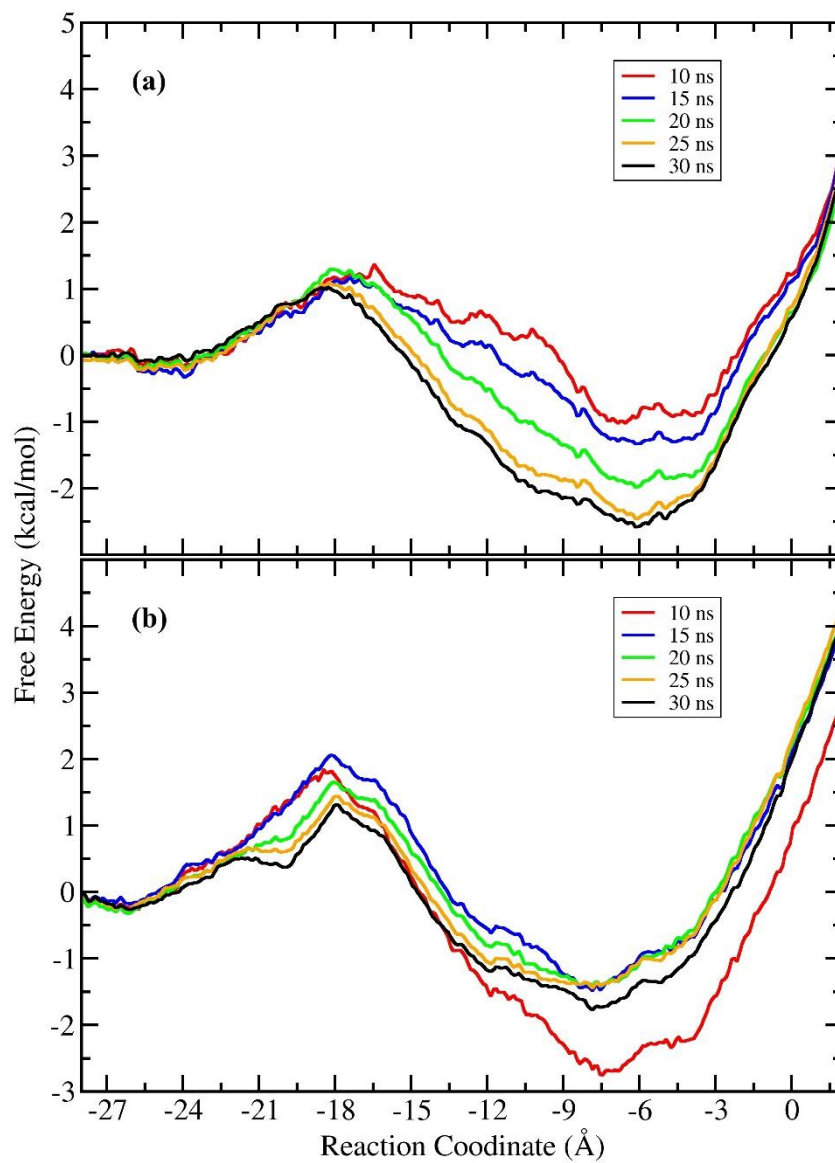


Figura 39 – Perfil de energia livre em função do caminho de reação obtido pelo método ABF em bicamada de POPC (a) com o peptídeo longo e (b) com o peptídeo curto. Para a simulação de 10 ns a simulação está representada pela cor vermelha, 15 ns pela cor azul, 20 ns pela cor verde, 25 ns pela cor alaranjada e 30 ns pela cor preta.

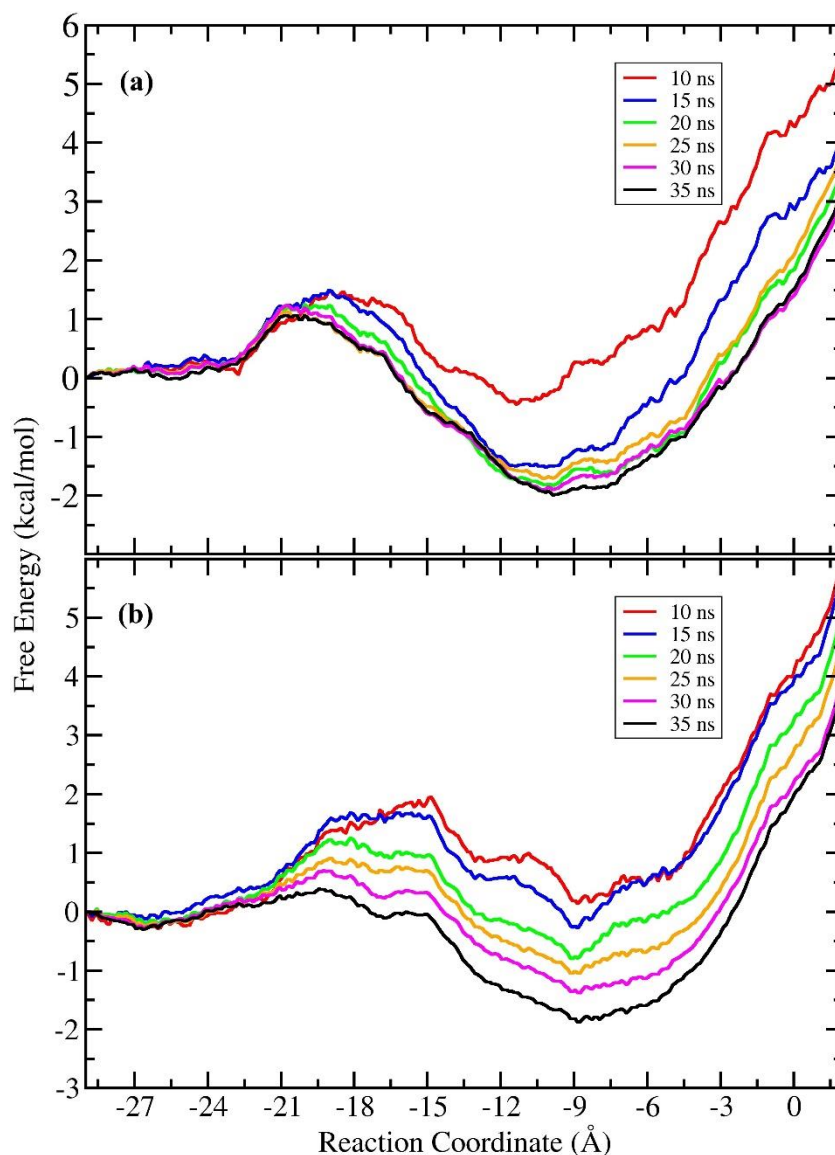


Figura 40 – Perfil da energia livre em função do caminho de reação obtido pelo método ABF em bicamada de POPC/POPG com o peptídeo longo (a) e com peptídeo curto (b). Para a simulação de 10 ns a simulação está representada pela cor vermelha, 15 ns pela cor azul, 20 ns pela cor verde, 25 ns pela cor alaranjada, 30 ns pela cor magenta e 35 ns pela cor preta.

Tabela 6 - RMSE calculado entre perfis de energia livre obtidos para o mesmo sistema em diferentes tempos de simulação. Quanto menor o RMSE mais próximas são, em média, as curvas obtidas.

Tempo (ns)	Pep_longo (kcal/mol)	Pep_curto (kcal/mol)
Bicamada de POPC		
10 e 15	0,4661	0,5171
15 e 20	0,3071	0,3210
20 e 25	0,2514	0,2600
25 e 30	0,2012	0,2030

Bicamada de POPC/POPG		
10 e 15	0,4567	0,4690
15 e 20	0,3429	0,3552
20 e 25	0,2599	0,2466
25 e 30	0,2107	0,1984
30 e 35	0,1840	0,1740

Fazendo uma comparação do perfil da energia livre para o peptídeo longo e o curto para a bicamada de POPC e POPC/POPG, observa-se uma pequena diferença entre os mínimos de energia livre de aproximadamente 0,8 kcal/mol e 0,1kcal/mol, respectivamente.

A Figura 42 (a) ilustra a distância em z do centro de massa do indol do Triptofano em relação ao centro de massa dos fósforos da superfície da bicamada de POPC mais próxima do peptídeo, para o peptídeo longo e o curto, em uma região compreendida entre -8 Å a -6 Å do caminho de reação, a qual contém os mínimos de energia livre, nos últimos 5 ns da simulação. Para a bicamada de POPC/POPG (figura 42 (b)) a região do mínimo de energia livre está compreendida entre -11 Å a -9 Å do caminho de reação.

Comparando as Figuras 41 e 42, podemos observar que, na bicamada de POPC o sistema com o peptídeo longo tem-se um valor do mínimo de energia localizado na coordenada de reação em aproximadamente -6 Å e para a bicamada de POPC/POPG o valor do mínimo de energia está localizado na coordenada de reação em aproximadamente -10 Å. Considerando a posição do indol do TRP em relação a superfície da bicamada esse valor corresponde a um valor médio de 9 ± 1 Å para a bicamada de POPC e 7 ± 1 Å para a bicamada de POPC/POPG. Para o peptídeo curto o valor da coordenada de reação em que se encontra o mínimo de energia livre é de aproximadamente -8 Å para a bicamada de POPC e para a bicamada de POPC/POPG o valor da coordenada de reação é de aproximadamente -9 Å e em relação a posição do indol do TRP o peptídeo curto apresenta o mesmo valor do peptídeo longo em ambas as bicamadas. Esse resultado apresenta acordo qualitativo com os resultados experimentais, obtidos por espectro de fluorescência,

para a profundidade de aterramento do resíduo de triptofano em bicamadas, publicados por Stauffer(2) e Modis(12).

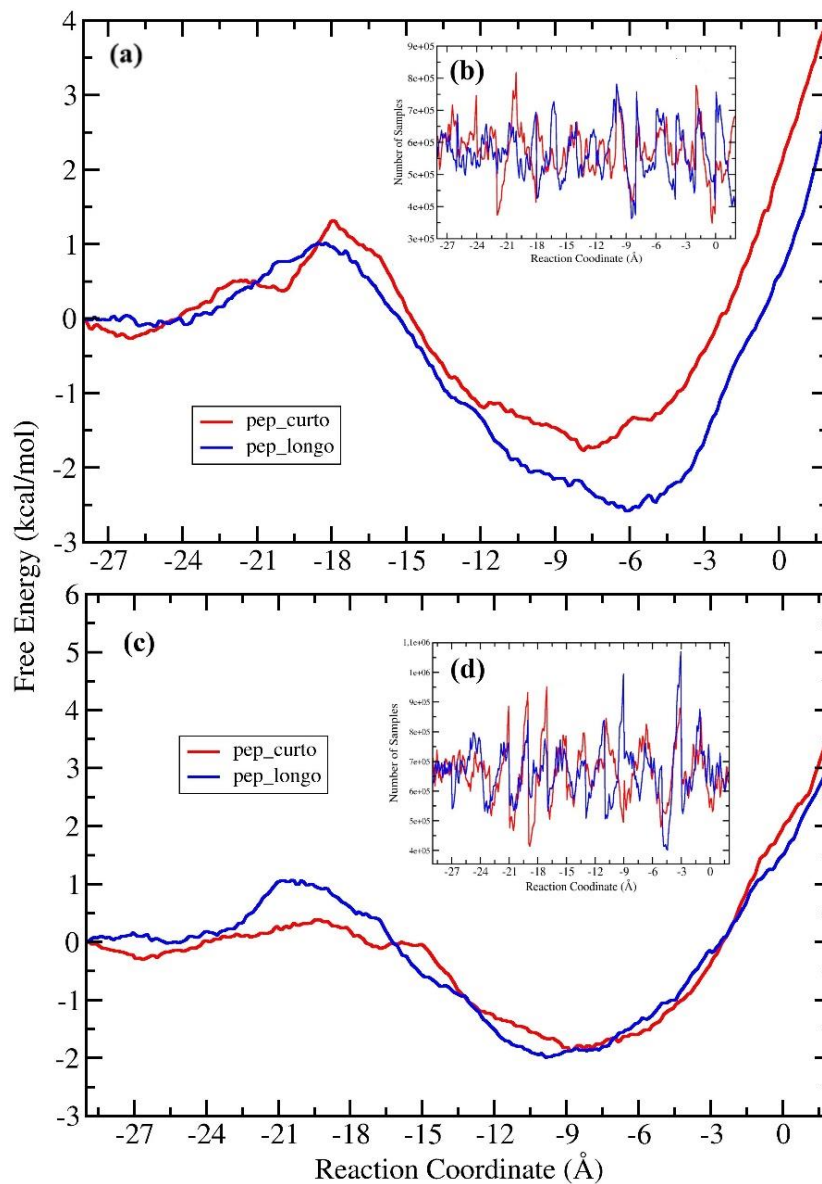


Figura 41 – Perfil de energia livre em função do caminho de reação obtido pelo método ABF em (a) para a bicamada de POPC em (c) para a bicamada de POPC/POPG com o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue. A amostragem da coordenada de reação para a bicamada de POPC (b) e em (d) para a bicamada de POPC/POPG. O sistema contendo o peptídeo longo está representado pela cor azul e peptídeo curto representado pela cor vermelha.

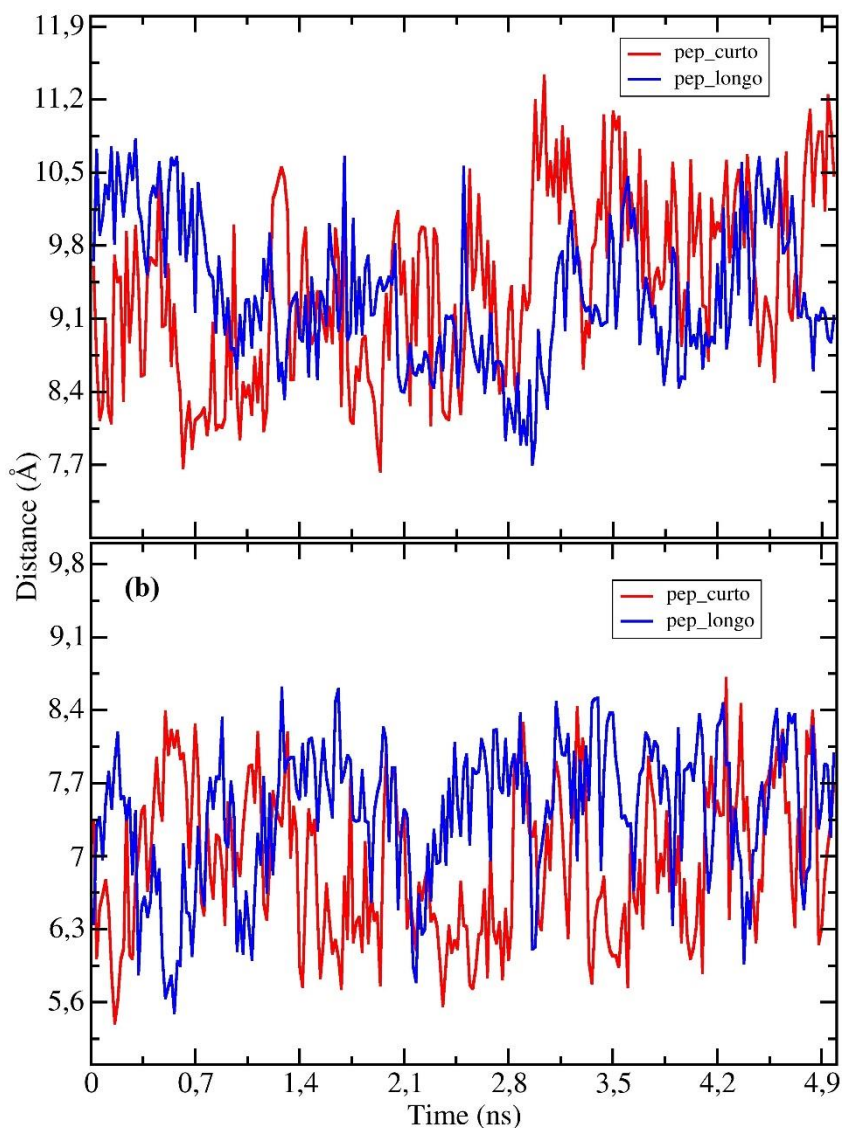


Figura 42 - A posição do centro de massa do indol do Triptofano em relação ao centro de massa dos fósforos da superfície da bicamada de POPC (a) e POPC/POPG (b) mais próxima do peptídeo, para os dois sistemas simulados. A curva azul representa o peptídeo longo e a vermelha o peptídeo curto.

Em virtude dos fatos mencionados pode-se concluir que, em relação ao método ABF o peptídeo longo na bicamada de POPC apresenta um mínimo de energia livre mais profundo que para o peptídeo longo na bicamada de POPC/POPG, mostrando que o peptídeo longo tem maior afinidade pela bicamada de POPC. Em relação a posição do indol do Triptofano verificamos que na bicamada de POPC o peptídeo está mais enterrado na bicamada em relação a bicamada de POPC/POPG

5.5.2 – RMSD

Com a finalidade de medirmos quanto as estruturas dos peptídeos simulados mudam em função do caminho de reação e, portanto, do ambiente físico-químico que experimentam, calculamos o RMSD médio com relação a estrutura cristalográfica para o peptídeo longo e peptídeo curto em cada janela de simulação, entre -27 a 1Å do caminho de reação, para o sistema com bicamada de POPC e para a bicamada de POC/POPG o caminho de reação foi de -28 a 0Å. O resultado obtido é mostrado na Figura 43 (a) para a bicamada de POPC e na Figura 43 (b) para a bicamada de POPC/POPG, na qual podemos constatar que na região aonde o peptídeo está localizado dentro da bicamada observamos um valor menor de RMSD, quando comparados com o valor inicial da estrutura cristalográfica do peptídeo, tanto para peptídeo longo como para peptídeo curto e em ambas as bicamadas. Para o peptídeo curto na bicamada de POPC/POPG só foi notado depois que o peptídeo já estava inserido um pouco na bicamada. Esta diminuição do valor médio do RMSD ocorre, pois, a bicamada restringe a mobilidade do peptídeo longo e do peptídeo curto. Fora da bicamada o peptídeo curto tem uma variância muito alta no valor médio do RMSD em relação a estrutura cristalográfica inicial do peptídeo, indicando uma alta flexibilidade em solução.

A Figura 44 mostra a sobreposição entre as conformações finais (em vermelho) e iniciais (em azul), e seus respectivos RMSD médios, do peptídeo longo e do peptídeo curto em dois pontos específicos do caminho de reação para sistema com bicamada de POPC e POPC/POPG. Para a bicamada de POPC o primeiro ponto específico do peptídeo está localizado fora da bicamada em uma região compreendida de -26 à -24 Å do caminho de reação, como mostra as Figuras 44 (a) (peptídeo longo) e 44 (c) (peptídeo curto). No outro ponto específico, Figuras 44 (b) (peptídeo longo) e 44 (d) (peptídeo curto) o peptídeo está inserido dentro da bicamada na região compreendida de -8 a -6 Å que é a região aonde está localizado o mínimo de energia livre.

Para sistema com bicamada de POPC/POPG o primeiro ponto específico, Figuras 44 (e) (peptídeo longo) e 44 (g) (peptídeo curto), o peptídeo está localizado fora da bicamada em uma região compreendida de -27 à -25 Å do caminho de reação e no outro ponto específico o peptídeo está inserido dentro da bicamada na região compreendida de -11 à -9 Å, Figuras 44 (f) (peptídeo longo) e 44 (h) (peptídeo curto) que é a região na qual está localizado o mínimo de energia livre.

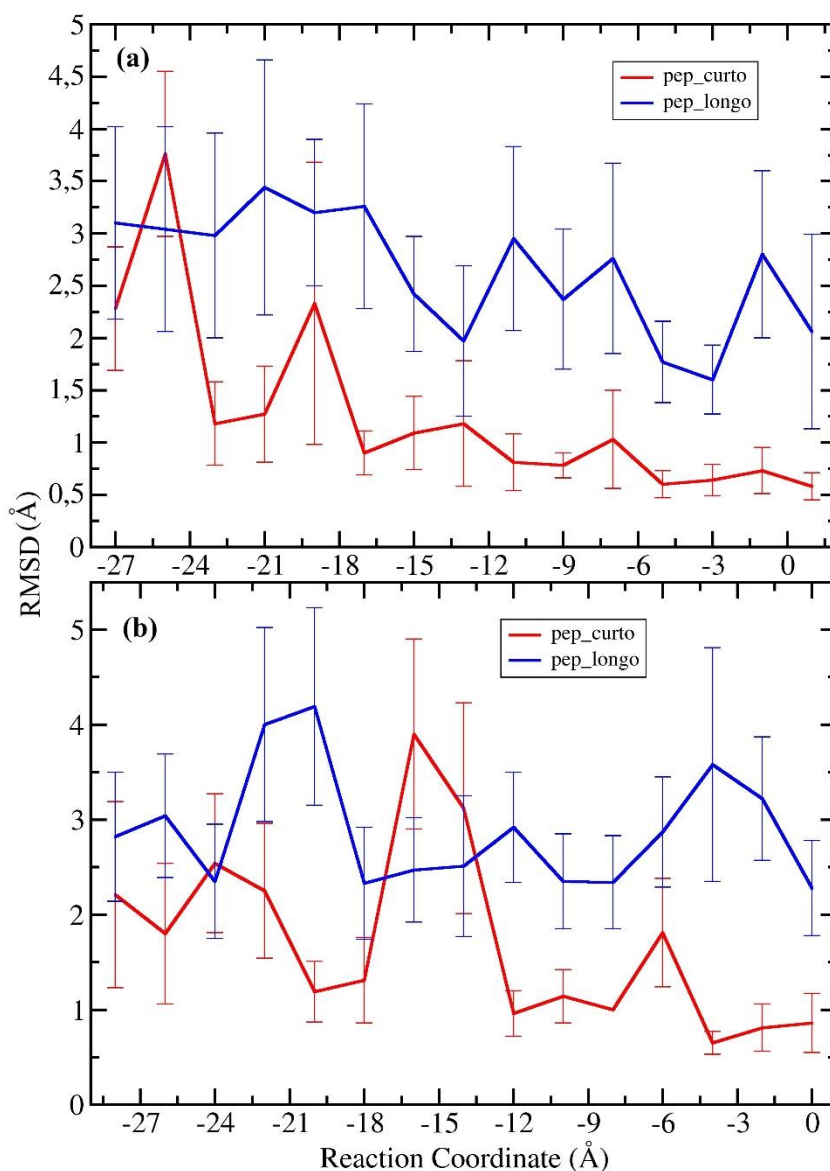


Figura 43 – O valor médio do RMSD em cada janela com relação à estrutura inicial, do peptídeo longo e do peptídeo curto ao longo do caminho de reação para sistema (a) com bicamada de POPC e (b) com POPC/POPG. A curva em azul representa o valor médio do RMSD do peptídeo longo e em vermelho o valor médio do RMSD do peptídeo curto.

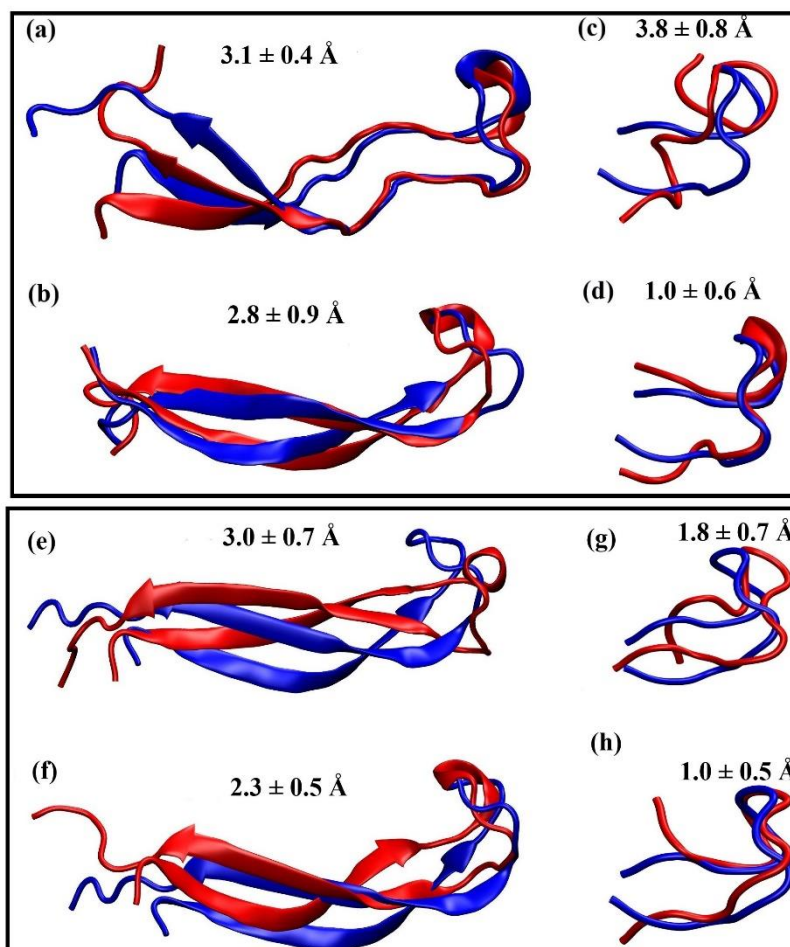


Figura 44 – Conformações finais (em vermelho) e iniciais (em azul), e os respectivos RMSD médios, do peptídeo longo e do peptídeo curto em dois diferentes pontos do caminho de reação para sistema com bicamada de POPC e POPC/POPG. O primeiro ponto (a), (c), (e) e (g) representa o peptídeo fora da bicamada e o segundo ponto (b), (d), (f) e (h) o peptídeo está localizado dentro da bicamada na região na qual está localizado o mínimo de energia livre.

Pode ser observado nas Figuras 43 e 44, que o peptídeo longo apresentou valores de RMSD médio bem próximos ao longo do caminho de reação, para ambas as bicamadas, tanto dentro como fora da bicamada. No entanto, para o peptídeo curto isso não ocorre, pois, o RMSD fora da bicamada é bastante diferente dos valores observados quando o peptídeo está inserido na bicamada. Isto é uma indicação que o peptídeo curto não está mantendo sua estrutura inicial em água, enquanto o peptídeo longo se mantém estruturado em todas as janelas.

As Figuras 45 (a) e 45 (b) mostram o RMSD em função do tempo para o peptídeo longo e peptídeo curto com a bicamada de POPC e POPC/POPG,

respectivamente, para a região na qual está localizado o mínimo de energia livre. Podemos averiguar, para ambas as bicamadas, que o peptídeo longo apresenta um RMSD maior que o peptídeo curto, isso ocorre, pois, o peptídeo longo apresenta uma quantidade maior de resíduos, fazendo com que ele apresente uma mobilidade maior entre os resíduos em comparação com o peptídeo curto. Apesar dessa diferença, os valores médios de RMSD para ambos os peptídeos são baixos em comparação a estrutura cristalográfica inicial do peptídeo.

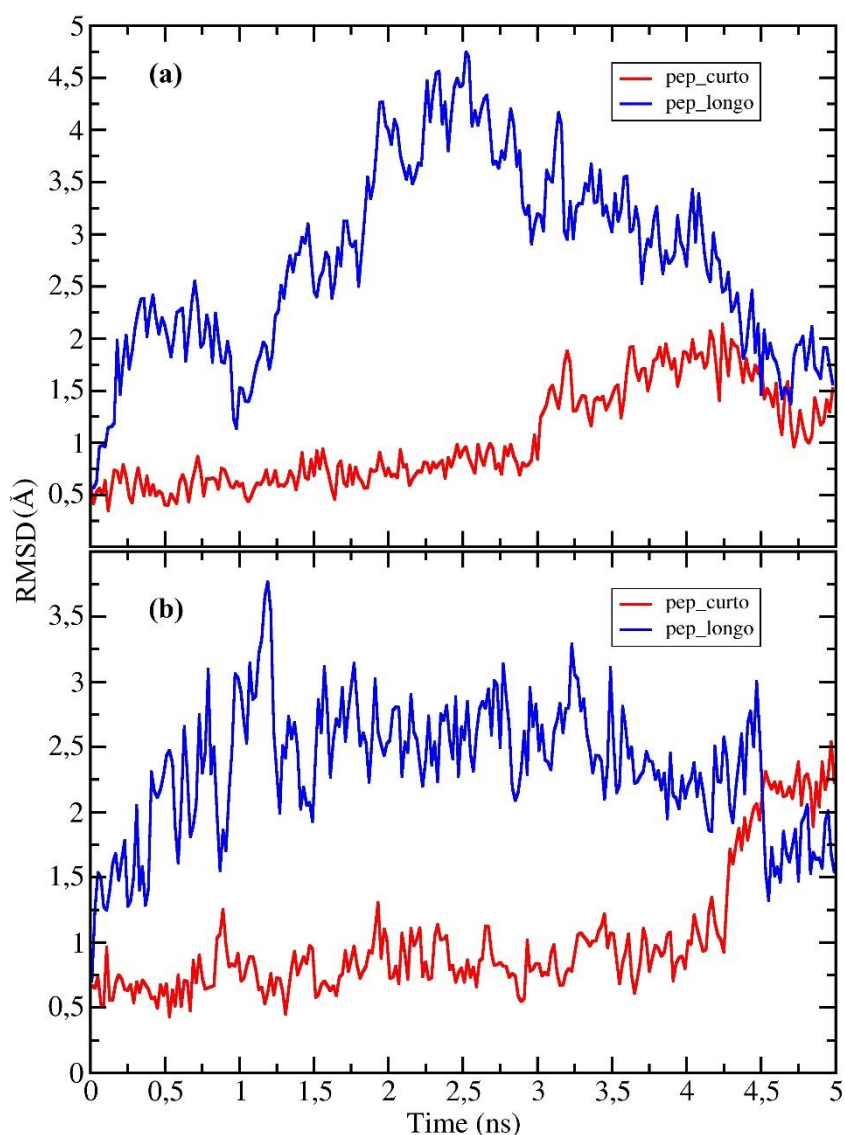


Figura 45 – RMSD em função do tempo para o peptídeo longo e para o peptídeo curto (a) para a bicamada de POPC e (b) para a bicamada de POPC/POPG, na região no qual está localizado o mínimo de energia livre. A curva em azul representa o RMSD do peptídeo longo e em vermelho o RMSD do peptídeo curto.

5.5.3 – Estrutura Secundária

Para complementar as informações oferecidas pelas análises da seção anterior, fizemos uma análise da estrutura secundária de cada um dos peptídeos de fusão em função do caminho de reação, ou seja, para cada janela de simulação, e em função do tempo para a janela na qual encontramos o mínimo de energia livre. Essas informações podem indicar se a transição de ambiente aquoso para o interior da bicamada induz alterações conformacionais no peptídeo de fusão.

A porcentagem de estrutura secundária média do peptídeo longo e do curto utilizando a bicamada de POPC, para uma região compreendida entre -27 a 1 Å do caminho de reação são mostradas nas Figuras 46 (a) e (b). Pode-se verificar que durante a simulação a estrutura secundária média do peptídeo longo e do curto não foi alterada drasticamente ao longo do caminho de reação.

As Figuras 47 (a) e (b) mostram as porcentagens de estrutura secundária média do peptídeo longo e do curto, respectivamente, utilizando a bicamada de POPC/POPG, para uma região compreendida entre -28 a 0 Å do caminho de reação. Verifica-se que não houve alterações drásticas durante a simulação na estrutura secundária média do peptídeo longo e do curto ao longo do caminho de reação do mesmo modo que ocorreu da bicamada de POPC.

Para a bicamada de POPC podemos examinar que as Figuras 48 (a) e (b) mostram a porcentagem de estrutura secundária em função do tempo do peptídeo longo e do curto, para uma região compreendida de -8 a -6 Å do caminho de reação, que é a região na qual está localizado o mínimo de energia livre. O peptídeo longo nesta região apresenta uma baixa porcentagem de hélice com um valor médio de $5 \pm 10\%$, já a estrutura secundária em turn e beta são mais evidenciadas com $40 \pm 5\%$ e $54 \pm 3\%$, respectivamente. Para o peptídeo curto temos que, ele apresenta uma baixa porcentagem de estrutura secundária em beta, com um valor médio de $4 \pm 7\%$, e de estrutura secundária em hélice de $16 \pm 11\%$, sendo a estrutura secundária predominante a coil-turn com $80 \pm 12\%$. Tem se ainda que no último 1 ns de

simulação a estrutura secundária em beta deixa de existir e averígua-se um aumento percentual de estrutura secundária em turn.

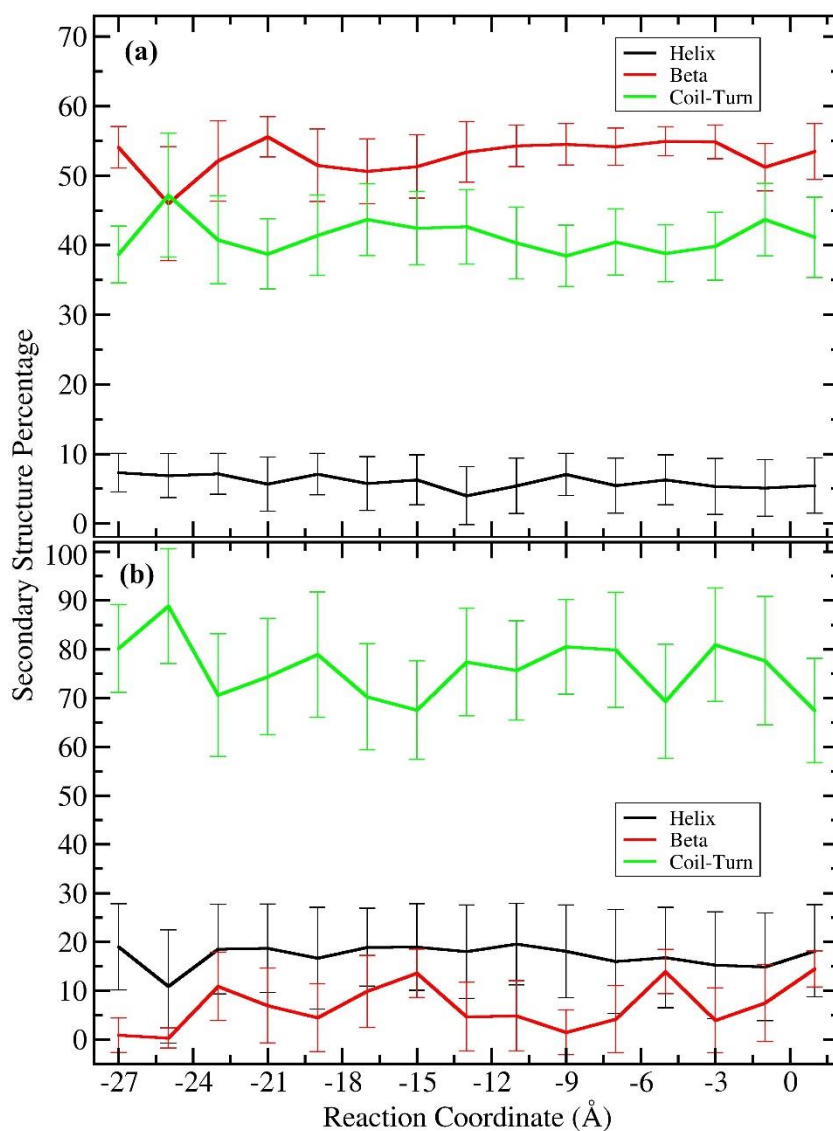


Figura 46 – Porcentagem de estrutura secundária média do peptídeo longo (a) e do curto (b) para a bicamada de POPC, para uma região compreendida entre -27 Å a 1 Å do caminho de reação, nos últimos 5 ns de simulação da DM. A linha preta está sendo representada pela estrutura secundária em hélice, em vermelho a estrutura secundária beta e em verde a estrutura secundária turn.

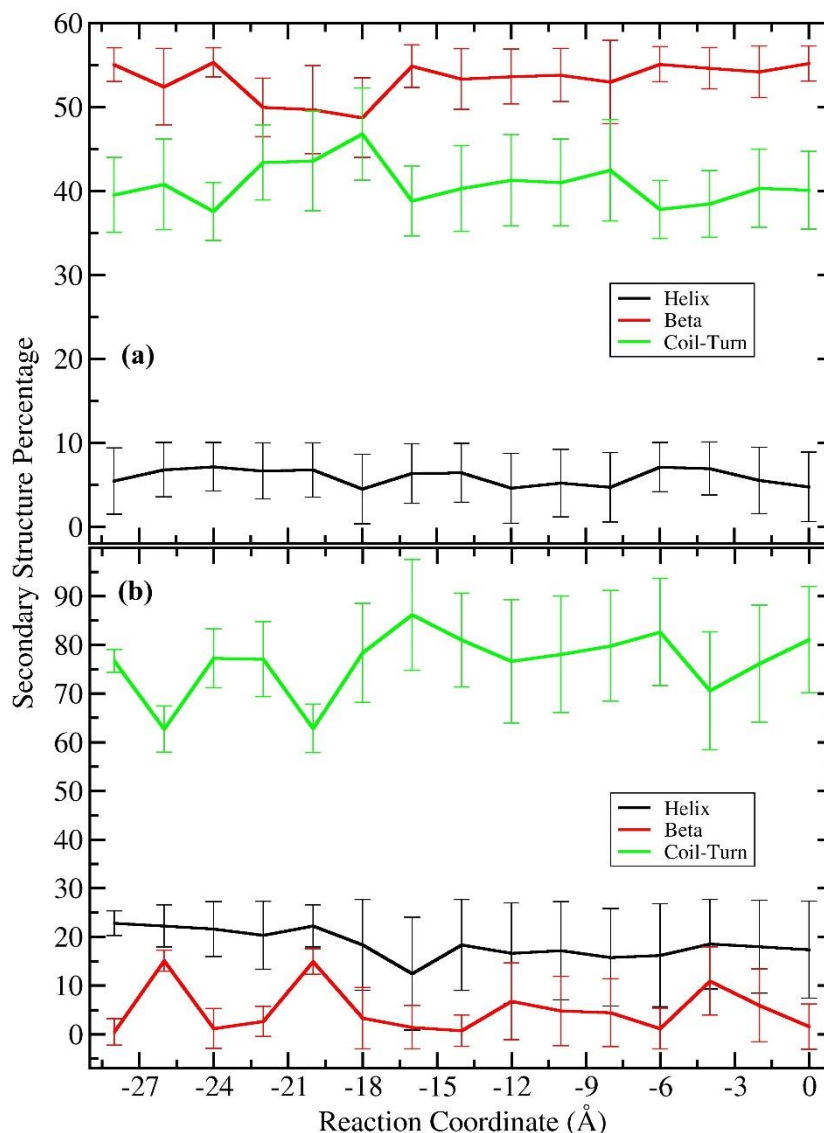


Figura 47 – Porcentagem de estrutura secundária média do peptídeo longo (a) e do curto (b) para a bicamada de POPC/POPG, para uma região compreendida entre -28 Å a 0 Å do caminho de reação, nos últimos 5 ns de simulação da DM. A linha preta está sendo representada pela estrutura secundária em hélice, em vermelho a estrutura secundária beta e em verde a estrutura secundária turn.

Levando em consideração a bicamada de POPC/POPG temos que para o peptídeo longo (Figura 49 (a)) e para o peptídeo curto (Figura 49 (b)) a porcentagem da estrutura secundária em função do tempo, para uma região compreendida de -11 a -9 Å do caminho de reação, que é a região na qual está o mínimo de energia livre. Examina-se que nesta região o peptídeo longo apresenta uma baixa porcentagem de estrutura secundária em hélice, com um valor médio de $5 \pm 4\%$, já a estrutura secundária em turn tem valor médio de $42 \pm 6\%$ e a estrutura em beta apresenta um

valor médio de $53 \pm 5\%$. O peptídeo curto apresenta uma baixa porcentagem de estrutura secundária em beta, com um valor médio de $4 \pm 7\%$ e de estrutura secundária em hélice de $16 \pm 11\%$, sendo a estrutura secundária predominante a coil-turn com $80 \pm 11\%$. Podemos notar ainda que nos últimos 3 ns de simulação a estrutura secundária em beta deixa de existir e a estrutura secundária em turn teve um aumento percentual em relação ao início da simulação.

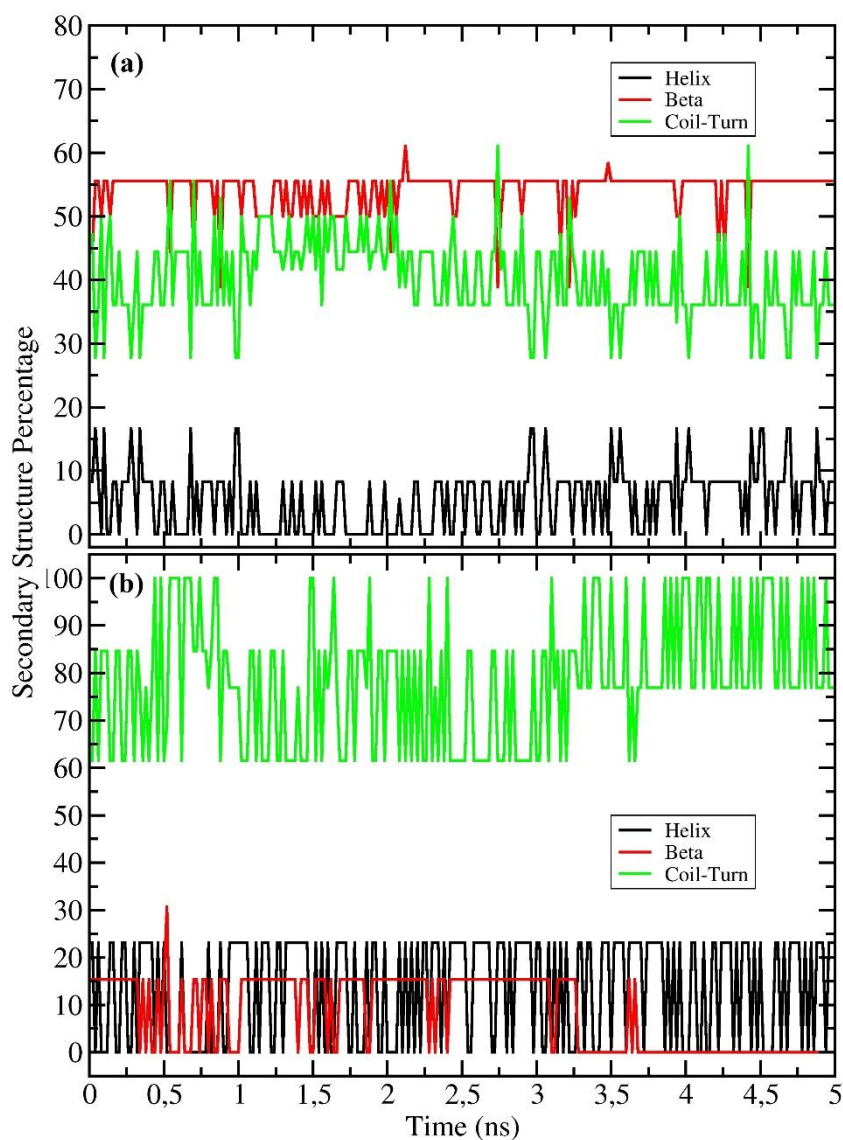


Figura 48 – Porcentagem da estrutura secundária em função do tempo do peptídeo longo (a) e do peptídeo curto (b) para a bicamada de POPC para uma região compreendida de -8 a -6 Å do caminho de reação. A linha preta está sendo representada pela estrutura secundária em hélice, em vermelho a estrutura secundária beta e em verde a estrutura secundária turn.

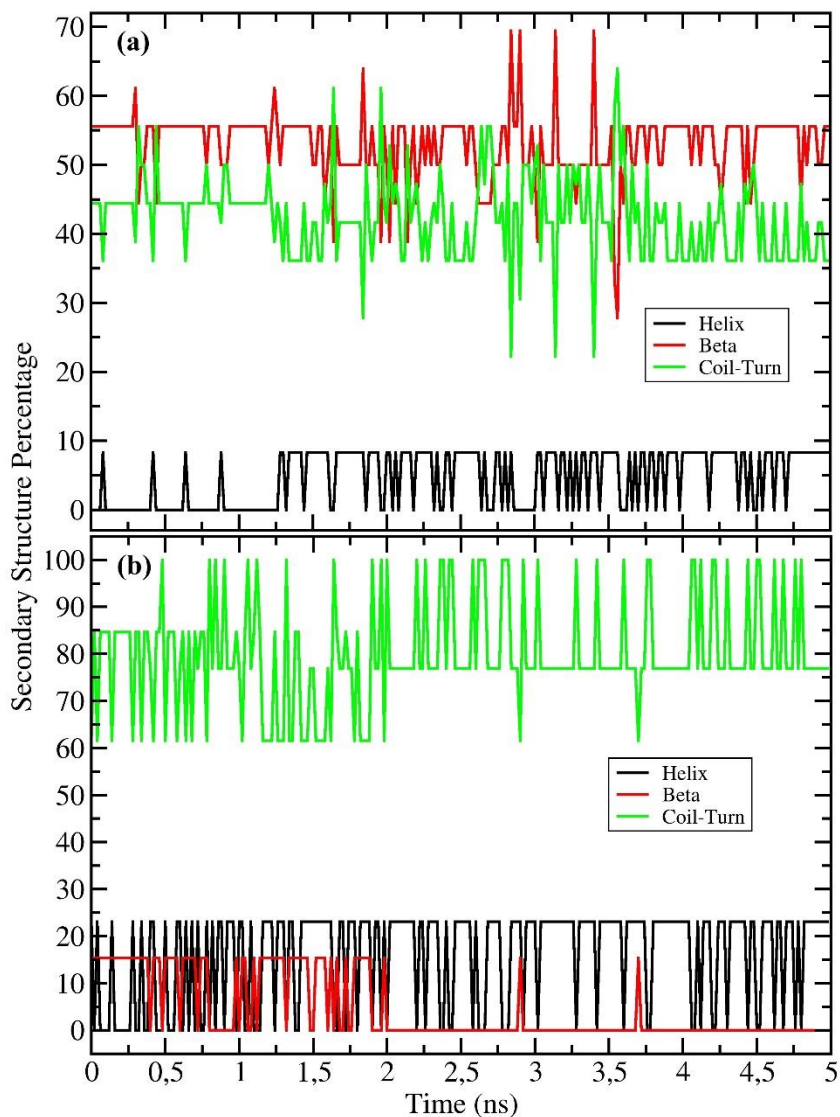


Figura 49 – Porcentagem da estrutura secundária em função do tempo do peptídeo longo (a) e do peptídeo curto (b) para a bicamada de POPC/POPG para uma região compreendida de -11 a -9 Å do caminho de reação. A linha preta está sendo representada pela estrutura secundária em hélice, em vermelho a estrutura secundária beta e em verde a estrutura secundária turn.

Compreende-se do estudo da estrutura secundária evidenciados pelos resultados, que tanto para o peptídeo longo como o peptídeo curto e em ambas as bicamadas, não variam significativamente em função do caminho de reação, em especial no caso do peptídeo longo que apresenta ligações de dissulfeto, entre os resíduos da CYS92 com a CYS116, na sua estrutura, fazendo com que o peptídeo fique mais estável, isso mostra que, quando o peptídeo de fusão mudou de ambiente aquoso para o interior da bicamada não induziu alterações conformacionais

significativas. O peptídeo curto não apresentou mudanças na sua estrutura secundária mesmo ter apresentado valores altos de RMSD fora da bicamada como foi observado na seção anterior.

5.5.4 – Ligações de Hidrogênio

Realizou-se uma análise das ligações de hidrogênio entre o peptídeo de fusão com a bicamada e com a água, a fim de entender como se dá o processo de interação entre o peptídeo de fusão e a bicamada de POPC e POPC/POPG e determinar quais são as regiões e os átomos responsáveis pelas interações.

O número de ligações de hidrogênio médio para cada janela entre o peptídeo longo e o curto com as moléculas de água, na região compreendida entre -27 a 1 Å do caminho de reação para sistema com bicamada de POPC é exemplificada na Figura 50 (a) e para a bicamada de POPC/POPG é evidenciada na Figura 50 (b) na região compreendida de -28 a 0 Å. Podemos observar, para ambas as bicamadas, que, quando o peptídeo começa a entrar na bicamada as ligações de hidrogênio entre o peptídeo e a água começam a diminuir, tanto para peptídeo longo como para peptídeo curto. Este resultado é coerente, pois, no interior da bicamada não encontramos moléculas de água e a diferença de valores das ligações de hidrogênio entre os peptídeos se refere ao fato que o peptídeo longo é constituído por mais resíduos de aminoácidos que o peptídeo curto.

O número médio de ligações de hidrogênio, para cada janela, entre o peptídeo longo e o curto com as moléculas de POPC e POPC/POPG ao longo do caminho de reação são mostradas nas Figura 51 (a) e 51 (b). O gráfico mostra que fora de ambas as bicamadas o número de ligações de hidrogênio são próximos de zero e quando os peptídeos vão entrando esse número vai aumentando, sendo que os valores para ambos os peptídeos são bem próximos. Isso indica que nesta região do caminho de reação só a região do peptídeo de fusão contribui para as ligações de hidrogênio entre os peptídeos e as bicamadas.

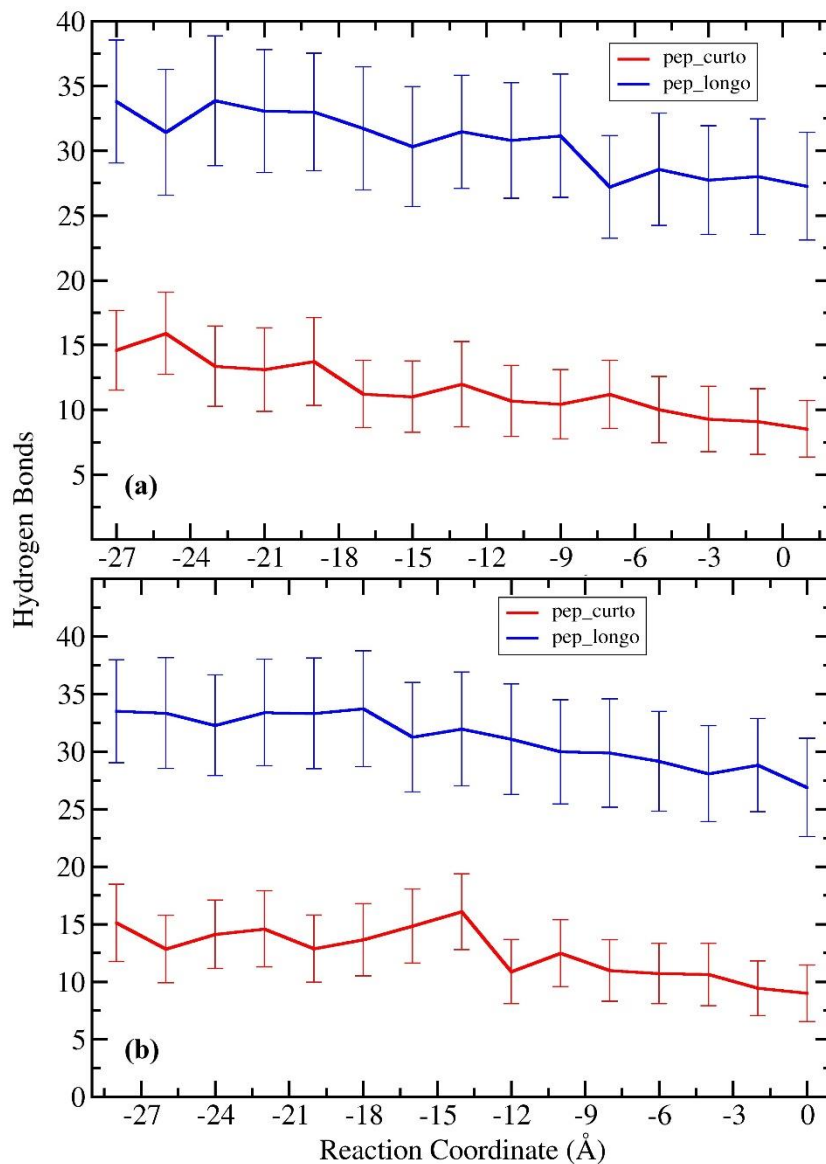


Figura 50 – Número de ligações de hidrogênio médio para cada janela entre o peptídeo longo e o peptídeo curto com a água em (a) para a bicamada de POPC e em (b) para a bicamada de POPC/POPG ao longo do caminho de reação. A linha em azul representa as ligações de hidrogênio médio entre o peptídeo longo e a água e a linha em vermelho as ligações de hidrogênio médio entre o peptídeo curto e a água.

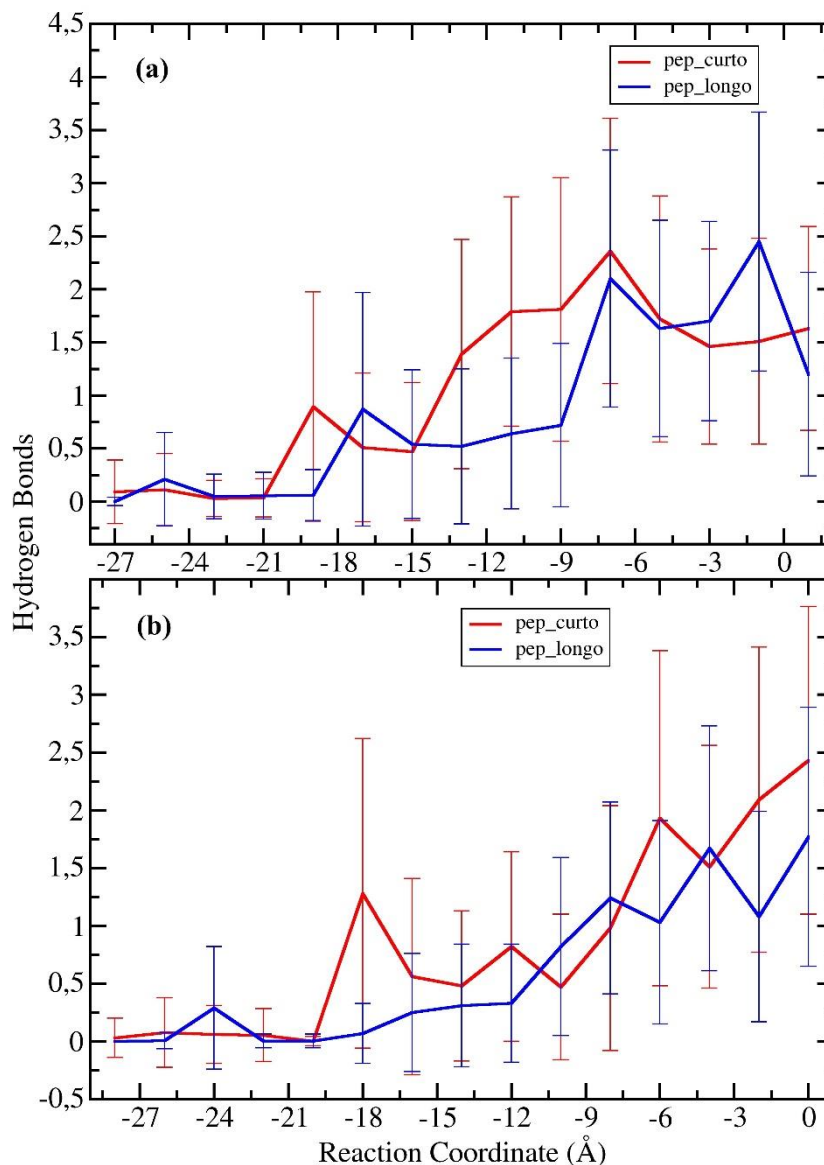


Figura 51 – Número médio de ligações de hidrogênio, por janela, entre o peptídeo longo e o peptídeo curto em (a) com as moléculas de POPC e em (b) com as moléculas de POPC/POPG, ao longo do caminho de reação. A linha em azul representa as ligações de hidrogênio entre o peptídeo longo e a bicamada e a linha em vermelho as ligações de hidrogênio entre o peptídeo curto e a bicamada.

As Figuras 52 (a) e 52 (b) mostram o número de ligações de hidrogênio em função do tempo entre o peptídeo longo e o curto com as moléculas de POPC e POPC/POPG, na região do caminho de reação na qual está localizado o mínimo de energia livre. Verifica-se em ambas as bicamadas, que nesta região o peptídeo longo e o peptídeo curto apresentam valores bem próximos de ligações de hidrogênio com moléculas das bicamadas. Para a bicamada de POPC o peptídeo longo está fazendo,

em média, $2,1 \pm 1$ ligações de hidrogênio e o peptídeo curto $2,4 \pm 1$, já para a bicamada de POPC/POPG podemos observar que nesta região ocorreu uma diminuição nas ligações de hidrogênio, o peptídeo longo faz, em média, $1,2 \pm 1$ ligações de hidrogênio e o peptídeo curto $1,0 \pm 1$.

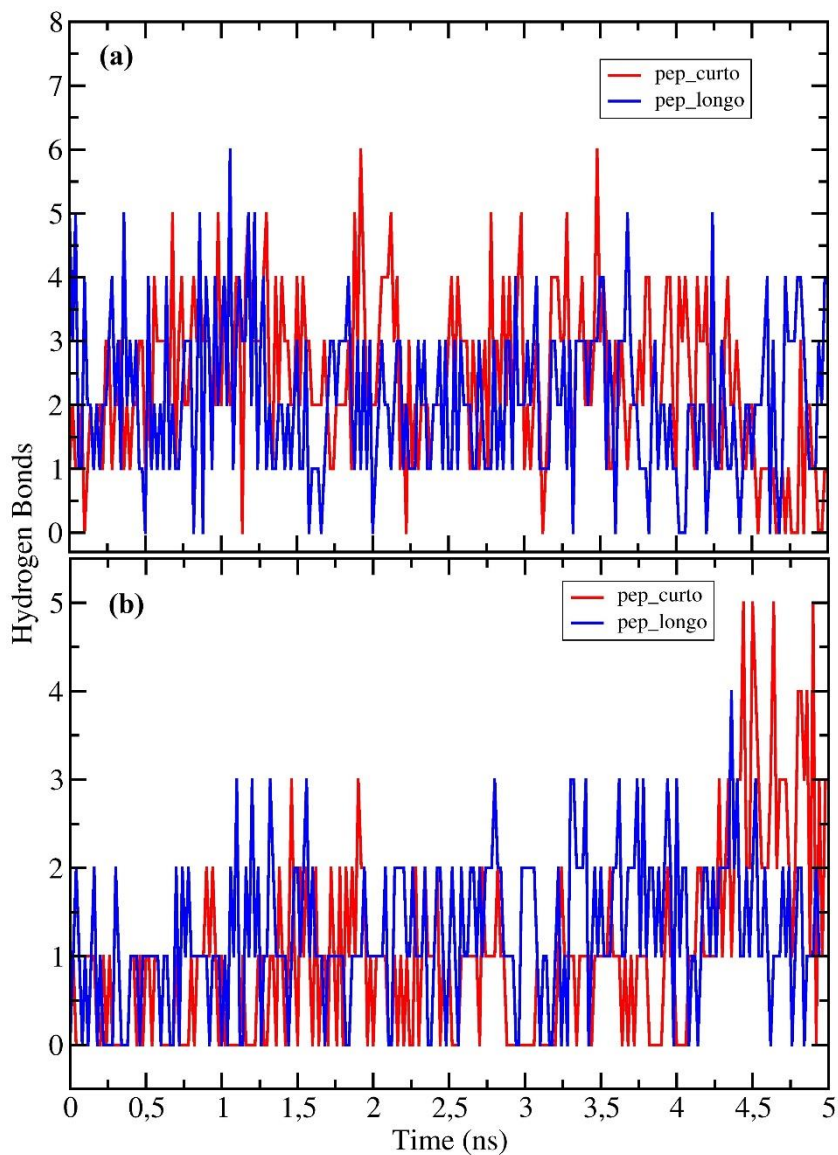


Figura 52– Número de ligações de hidrogênio em função do tempo entre o peptídeo longo e o peptídeo curto em (a) com moléculas da bicamada de POPC e em (b) com as moléculas da bicamada de POPC/POPG, na região do mínimo de energia livre. A linha em azul representa as ligações de hidrogênio entre o peptídeo longo e a bicamada e a linha em vermelho as ligações de hidrogênio entre o peptídeo curto e a bicamada.

A tabela 7 mostra as principais ligações de hidrogênio e os átomos que fazem estas ligações entre o peptídeo longo e o curto com as moléculas de POPC e as ligações entre os próprios peptídeos, na região compreendida entre -8 a -6 Å do caminho de reação. Constatamos na tabela que a maior parte das ligações de hidrogênio que ocorrem entre o peptídeo longo e o curto com as moléculas de POPC envolvem os resíduos ARG99, LYS110 e da GLY106 e as ligações de hidrogênio entre o peptídeo longo com ele mesmo é devido a ARG99 com a GLY109 e a VAL97 com a GLY111. Para o peptídeo curto temos que as ligações de hidrogênio com ele mesmo são devido às interações da ARG99 com a ASN103.

Tabela 7– Ligações de hidrogênio formadas pelos resíduos de aminoácidos do peptídeo longo e do curto com as moléculas de POPC e com o próprio peptídeo, para a região compreendida entre -8 a -6 Å do caminho de reação.

Doador	Aceitador	Ocupância
Peptídeo longo		
ARG99-Side-NH2	POPC131-Side-O13	12.40%
ARG99-Side-NH1	POPC131-Side-O13	41.60%
GLY106-Main-N	POPC131-Side-O32	52.00%
GLY112-Main-N	POPC132-Side-O12	12.00%
GLY112-Main-N	POPC132-Side-O14	18.40%
LYS110-Side-NZ	POPC94-Side-O14	22.00%
PHE108-Main-N	POPC102-Side-O32	25.60%
ARG99-Side-NE	ASN103-Side-OD1	48.00%
ARG99-Main-N	GLY109-Main-O	95.20%
ARG99-Side-NH2	ASN103-Main-O	39.20%
LYS110-Side-NZ	ASP98-Side-OD1	28.80%
ALA117-Main-N	VAL91-Main-O	44.80%
LYS93-Main-N	THR115-Main-O	18.40%
THR115-Main-N	LYS93-Main-O	35.20%
VAL97-Main-N	GLY111-Main-O	92.80%
PHE119-Main-N	ARG89-Main-O	32.00%

Peptídeo curto		
ARG99-Side-NH1	POPC131-Side-O13	58.80%
ARG99-Side-NH2	POPC131-Side-O12	53.60%
ARG99-Side-NE	ASN103-Side-OD1	36.80%
ARG99-Side-NH2	ASN103-Main-O	18.40%
ARG99-Main-N	LYS110-Side-OT1	12.00%
GLY106-Main-N	POPC131-Side-O32	31.60%
LYS110-Main-N	POPC132-Side-O13	6.00%
LYS110-Side-NZ	POPC132-Side-O13	11.20%
LYS110-Side-NZ	POPC105-Side-O14	18.40%
ASP98-Main-N	LYS110-Side-OT2	10.40%
ASP98-Main-N	LYS110-Side-OT1	35.20%
GLY100-Main-N	ASN103-Side-OD1	35.20%

As principais ligações de hidrogênio e os átomos que fazem estas ligações entre o peptídeo longo e o curto com as moléculas de POPC e POPG e as ligações entre os próprios peptídeos, na região compreendida entre -11 a -9 Å do caminho de reação, é mostrada na tabela 8. Podemos examinar, que as moléculas de POPG não fazem ligação de hidrogênio com os peptídeos e prejudicam as ligações de hidrogênio entre o peptídeo e a membrana de POPC, como pode ser visto comparando as tabelas 7 e 8. As poucas ligações de hidrogênio que ocorrem entre o peptídeo longo com as moléculas de POPC envolvem os resíduos LYS110 e PHE108 e as ligações de hidrogênio entre o peptídeo longo com ele mesmo é devido a ARG99 com a GLY109 e a VAL97 com a GLY111. Para o peptídeo curto as ligações de hidrogênio que ocorrem com as moléculas de POPC e POPG provêm da ARG99, LYS110 e as ligações de hidrogênio entre o peptídeo curto com ele mesmo é devido às interações da ARG99 com a GLY109.

Tabela 8 – Ligações de hidrogênio formadas pelos resíduos de aminoácidos do peptídeo longo e o curto com as moléculas de POPC/POPG e com o próprio peptídeo, para a região compreendida entre -11 a -9 Å do caminho de reação.

Doador	Aceitador	Ocupância
Peptídeo longo		
PHE108-Main-N	POPC161-Side-O32	49.20%
LYS110-Side-NZ	POPC162-Side-O14	14.60%
ARG99-Main-N	GLY109-Main-O	37.60%
ARG99-Side-NE	ASN103-Side-OD1	14.00%
LYS110-Side-NZ	ASP98-Side-OD1	29.20%
LYS110-Side-NZ	ASP98-Side-OD2	34.40%
ARG99-Side-NH2	ASN103-Main-O	20.00%
SER95-Main-N	ILE113-Main-O	45.20%
VAL97-Main-N	GLY111-Main-O	82.80%
THR115-Main-N	LYS93-Main-O	31.60%
LYS93-Main-N	THR115-Main-O	40.80%
Peptídeo curto		
ARG99-Side-NH2	POPC155-Side-O13	4.20%
ARG99-Side-NH2	POPC157-Side-O13	5.40%
ARG99-Side-NH1	POPC157-Side-O13	12.00%
ARG99-Side-NH1	POPC155-Side-O14	3.20%
ARG99-Side-NH2	POPC161-Side-O11	8.20%
ARG99-Side-NE	POPC161-Side-O13	6.00%
ARG99-Side-NH2	ASN103-Main-O	2.80%
ARG99-Main-N	GLY109-Main-O	17.20%
ARG99-Main-N	LYS110-Side-OT1	6.40%
GLY109-Main-N	ARG99-Main-O	8.80%
LYS110-Side-NZ	POPC162-Side-O14	3.80%
LYS110-Side-NZ	POPC162-Side-O13	4.40%
LYS110-Side-NZ	POPC172-Side-O13	3.00%
LYS110-Side-NZ	POPC161-Side-O14	7.40%
LYS110-Side-NZ	POPC195-Side-O32	6.80%
LYS110-Side-NZ	ASP98-Side-OD2	7.60%
ASP98-Main-N	LYS110-Side-OT1	5.20%

A figura 53 ilustra as ligações de hidrogênio mais frequentes entre o peptídeo longo (figura 53 (a)) e curto (figura 53 (b)) com as moléculas de POPC e o peptídeo com ele mesmo, na região compreendida entre -8 a -6 Å do caminho de reação. Analisamos que, para o peptídeo longo, o átomo NH1 da ARG99 faz ligação de hidrogênio com o átomo O13 do POPC131 com uma ocupância de 41,60%, o átomo N da ARG99 faz ligação de hidrogênio com o átomo O da GLY109 com

uma ocupância de 95,2%, o átomo N da LYS110 faz ligação de hidrogênio com o átomo O14 do POPC94 com uma ocupância de 22,00% e o átomo N da GLY106 faz ligação de hidrogênio com o átomo O32 do POPC131 com uma ocupância de 52,00%.

Para o peptídeo curto temos que o átomo NH1 da ARG99 faz ligação de hidrogênio com o átomo O13 do POPC131 com uma ocupância de 58,8%, o átomo NH2 da ARG99 faz ligação de hidrogênio com o átomo O12 do POPC131 com uma ocupância de 53,6%, o átomo N da LYS110 faz ligação de hidrogênio com o átomo O14 do POPC105 com uma ocupância de 18,40% e o átomo N da GLY106 faz ligação de hidrogênio com o átomo O32 do POPC131 com uma ocupância de 31,60%.

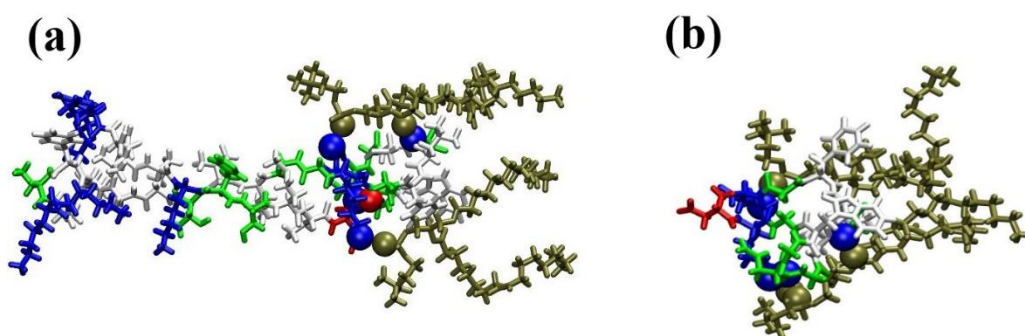


Figura 53 – Ligações de hidrogênio mais frequentes entre o peptídeo longo e o curto com as moléculas de POPC da bicamada e o peptídeo com ele mesmo, para a região do caminho de reação de -8 a -6 Å. Em (a) As esferas em azuis representam os átomos de N e NH1 da ARG99, o átomo de NZ da LYS110 e o átomo N da GLY 106, a esfera em vermelho representa o átomo N da GLY109 do peptídeo longo, já as esferas em marrom estão indicando os átomos das moléculas de POPC envolvidas nas ligações. O peptídeo está em licorise e seus resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde os polares e em branco os hidrofóbicos e as moléculas de POPC em marrom. Em (b) as esferas em azuis representam os átomos de N e NH1 da ARG99, o átomo de NZ da LYS110 e o átomo N da GLY 106 e as esferas em marrom estão indicando átomos de moléculas de POPC. O peptídeo está em licorise e seus resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde os polares e em branco os hidrofóbicos e as moléculas de POPC em marrom.

As ligações de hidrogênio mais frequentes entre o peptídeo longo e o curto com as moléculas de POPC e POPG da bicamada e o peptídeo com ele mesmo, na região compreendida entre -11 a -9 Å do caminho de reação, é mostrada na Figura 54 (a) para o peptídeo longo e na Figura 54 (b) para o peptídeo curto. Considerando

o peptídeo longo o átomo O32 do POPC161 faz ligação de hidrogênio com o N do PHE108 com ocupância de 49,20%, e o átomo O14 do POPC162 com NZ da LYS110 com ocupância de 14,60%.

Levando em conta o peptídeo curto temos que o átomo O13 do POPC157 faz ligação de hidrogênio com o NH1 da ARG99 com ocupância de 12,00%, o átomo O11 do POPC161 com NH2 da ARG99 com ocupância de 8,20%, o átomo O14 do POPC161 com NZ da LYS110 com ocupância de 7,40%.

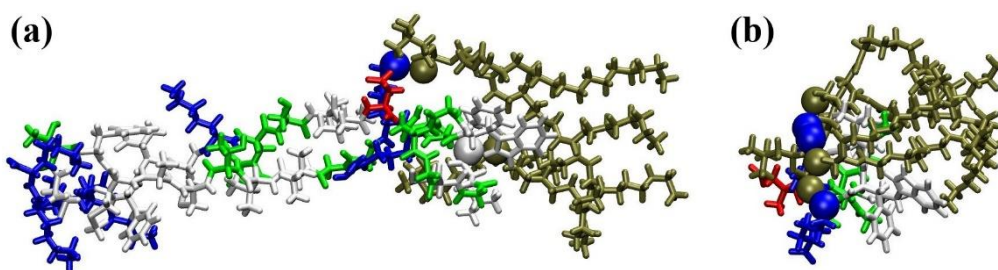


Figura 54 – Ligações de hidrogênio mais frequentes entre o peptídeo longo e o curto com a moléculas de POPC/POPG, para a região do caminho de reação de -11 a -9 Å. Em (a) a esfera em azul representa o átomo de NZ da LYS110, a esfera em branco do átomo N da PHE108 do peptídeo longo, já as esferas em marrom estão indicando os átomos das moléculas de POPC/POPG envolvidas nas ligações. O peptídeo está em licorise e seus resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde os polares e em branco os hidrofóbicos e as moléculas de POPC/POPG em marrom. Em (b) as esferas em azuis representam os átomos de NH1 e NH2 da ARG99 e o NZ da LYS110 do peptídeo curto, já as esferas em marrom representam os átomos de moléculas de POPC/POPG. O peptídeo está em licorise e seus resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde os polares e em branco os hidrofóbicos e as moléculas de POPC/POPG em marrom.

Verificamos que os resíduos de aminoácidos ARG99 e LYS110 constituem uma parte da região do peptídeo denominada colar e a GLY 106 e o PHE108 faz parte da “região externa” do peptídeo (Figura 35). Todos os átomos das moléculas de POPC envolvidos nas ligações de hidrogênio com o peptídeo longo fazem parte da região hidrofílica da molécula. No mínimo de energia livre averiguamos que na conformação de equilíbrio do sistema simulado as interações de hidrogênio entre os peptídeos estudados e em ambas as bicamadas ocorrem exclusivamente via peptídeo de fusão, não envolvendo outras porções presentes no peptídeo longo e no curto e que a bicamada de POPG dificulta as ligações de hidrogênio entre o peptídeo e a bicamada.

5.5.5 – Análise Detalhada das Interações Peptídeo-Bicamada

Para a realização da análise detalhada das interações entre os peptídeos simulados e a bicamada de POPC e POPC/POPG definimos algumas regiões, tanto nos peptídeos como nas moléculas da bicamada, sobre as quais focaremos nossas análises calculando as interações não ligadas entre eles. Para os peptídeos foram definidas três regiões (*vide* Figura 35), a primeira delas chamada de “Colar” que compreende os resíduos Ácido Aspártico (98), Arginina (99), Asparagina (103) e Lisina (110), a segunda é chamada “Região Interna” e compreende todos os resíduos de aminoácidos que fazem parte do peptídeo de fusão com exceção da região do “Colar” (*vide* tabela 5) e, por fim, a terceira região foi nomeada como “Região Externa” que consiste na construção de resíduos de aminoácidos que não estão no peptídeo de fusão (*vide* tabela 5).

As moléculas de POPC que compõem a bicamada também foram divididas em três regiões (*vide* Figura 36 (a)) o que, conseqüentemente, divide a própria bicamada em três regiões. Definimos duas regiões denominadas de, “Fosfato” e “Colina” compreendendo os grupos químicos homônimos presentes na molécula de POPC. A terceira região, chamada de “Cauda”, compreende a região hidrofóbica do POPC, composta pelas duas cadeias acíclicas presentes na bicamada. Foram estudadas as interações não ligadas de todas as regiões dos peptídeos com todas as da bicamada, a fim de conhecer qual região dos peptídeos é responsável pela maior parte da interação com a bicamada. Para as moléculas de fosfolipídeos de POPG teve uma sutil diferença onde foi tirado o grupo Colina e acrescentado o grupo Glicerol (*vide* Figura 36 (b)).

Além das divisões citadas acima para as bicamadas, no estudo da interação energética entre o peptídeo de fusão com a bicamada de POPC/POPG como um todo, realizou-se uma análise na qual levou-se em consideração a contribuição específica de cada tipo de fosfolipídeo. A contribuição das moléculas de POPC (denominaremos POPC), a contribuição das moléculas de POPG (denominaremos POPG).

A Figura 55 exemplifica os valores médios para cada janela das energias de interação não ligadas entre o peptídeo longo e peptídeo curto com a bicamada de POPC em função do caminho de reação de -27 a 1 Å. Evidenciando que a bicamada começa em aproximadamente -20 Å, com isso pode-se observar que na região fora da bicamada a interação entre peptídeo longo e o peptídeo curto com a bicamada é uma interação de baixa intensidade e atrativa, depois, dentro da bicamada, a interação continua atrativa tanto para o peptídeo longo como para o peptídeo curto e seus valores energéticos são bem próximos.

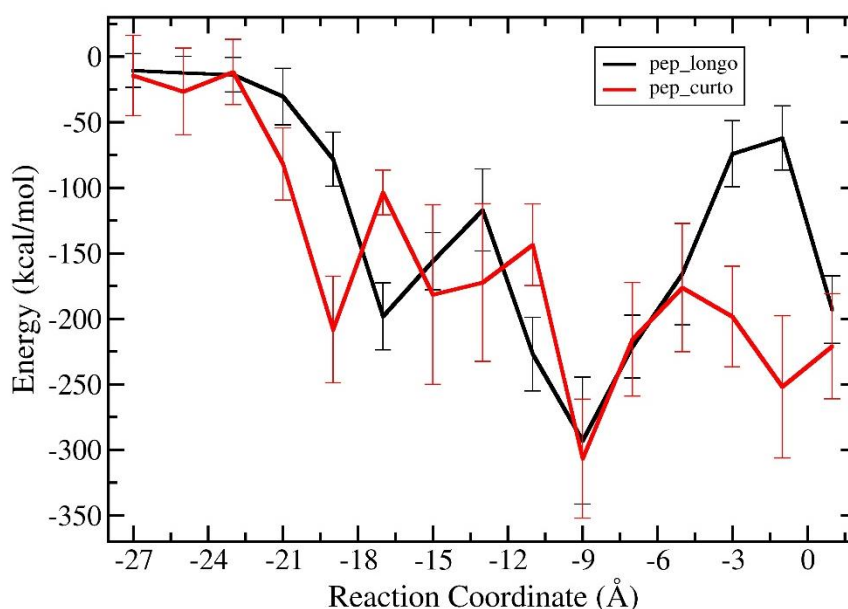


Figura 55 – Valores médios para cada janela da energia de interação não ligada entre o peptídeo longo (cor preta) e peptídeo curto (cor vermelha) com a bicamada de POPC em função do caminho de reação de -27 a 1 Å.

Na bicamada de POPC/POPG as figuras 56 (a) e 56 (b) mostram, respectivamente, os valores médios para cada janela das energias de interação entre o peptídeo longo e o peptídeo curto com a bicamada, na região de -28 à 0 Å do caminho de reação. Nota-se na Figura 56, tanto para o peptídeo longo como para o curto que na região fora da bicamada os valores energéticos são próximos de zero, tornando-se atrativos na região dentro da bicamada. A contribuição mais relevante entre a bicamada de POPC e POPG é a interação energética com a bicamada de POPC para ambos os peptídeos, apresentando valores bem próximos ao da

bicamada POC/POPG.

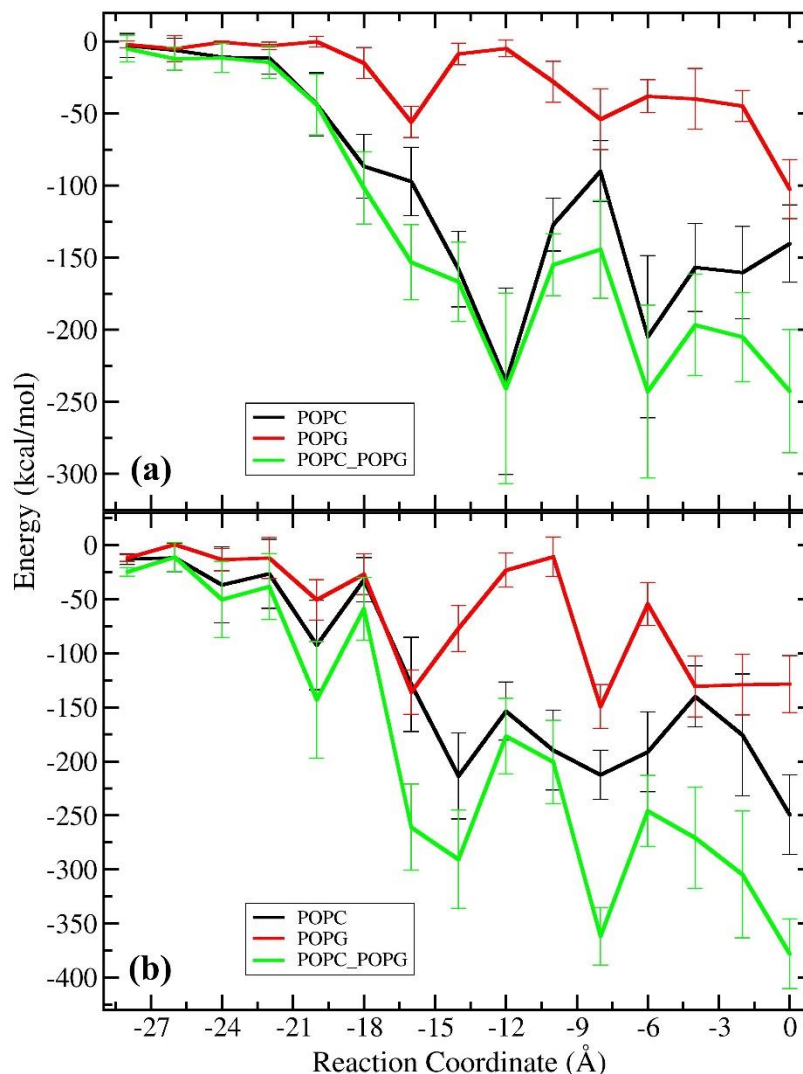


Figura 56– Valores médios para cada janela da interação não ligada entre o peptídeo de fusão com a bicamada de POPC/POPG, na região de -28 a 0 Å do caminho de reação, em (a) entre o peptídeo longo com a bicamada e em (b) entre o peptídeo curto com a bicamada. A linha vermelha representa a contribuição dos fosfolipídeos de POPC, a linha verde a contribuição dos fosfolipídeos de POPG e a linha preta a contribuição dos fosfolipídeos de POPC/POPG.

Para entender quais regiões do peptídeo longo e do peptídeo curto são responsáveis pela interação atrativa com as bicamadas de POPC e POPC/POPG, os peptídeos foram divididos nas regiões descritas acima e calculadas as interações energéticas com as bicamadas.

Os valores médios para cada janela das energias de interação não ligadas entre os peptídeos completos, o Colar, a Região Interna e a Região Externa, com a bicamada de POPC, em função do caminho de reação, estão representados na Figura 57 (a) e 57 (b), para o peptídeo longo e para o peptídeo curto, respectivamente. Para a bicamada de POPC/POPG temos que para o peptídeo longo estas interações estão representadas na Figura 58 (a) interação com os fosfolípídeos de POPC, Figura 58 (b) interação com os fosfolípídeos de POPG e Figura 58 (c) interação com os fosfolípídeos de POPC/POPG e para o peptídeo curto pelas Figuras 59 (a) interação com os fosfolípídeos de POPC, Figura 59 (b) interação com os fosfolípídeos de POPG e Figura 59 (c) interação com os fosfolípídeos de POPC/POPG.

Nas Figura 57, 58 e 59 permitiu-se observar que, quando o peptídeo longo e o peptídeo curto se encontram fora da bicamada (coordenada de reação menor que -20 \AA), todas as interações energéticas são interações atrativas e com valores de baixa interação. A medida que o peptídeo entra na bicamada, a energia de interação não ligada continua sendo atrativa e aumentando seus valores significativamente para a interação do peptídeo completo com a bicamada assim como a interação energética entre o Colar com a bicamada e a Região Externa com a bicamada, estas duas interações apresentam valores energéticos próximos.

Com relação as interações entre a Região Externa do peptídeo longo com a bicamada, figuras 57 (a) e 58, observou-se que as interações não ligadas apresentam valores baixos ao longo de todo caminho de reação, mesmo a Região Externa tendo uma carga líquida de $+5e$, esta região do peptídeo longo está contribuindo somente para fazer com que o peptídeo de fusão não sofra nenhuma alteração estrutural, através das ligações de dissulfeto entre os resíduos CYS92 e CYS116 e também através das ligações de hidrogênio, conforme observado que a Região Externa do peptídeo não contribui com as ligações de hidrogênio. Sendo assim os cálculos das energias de interação entre a Região Externa com as ramificações das bicamadas não serão realizados.

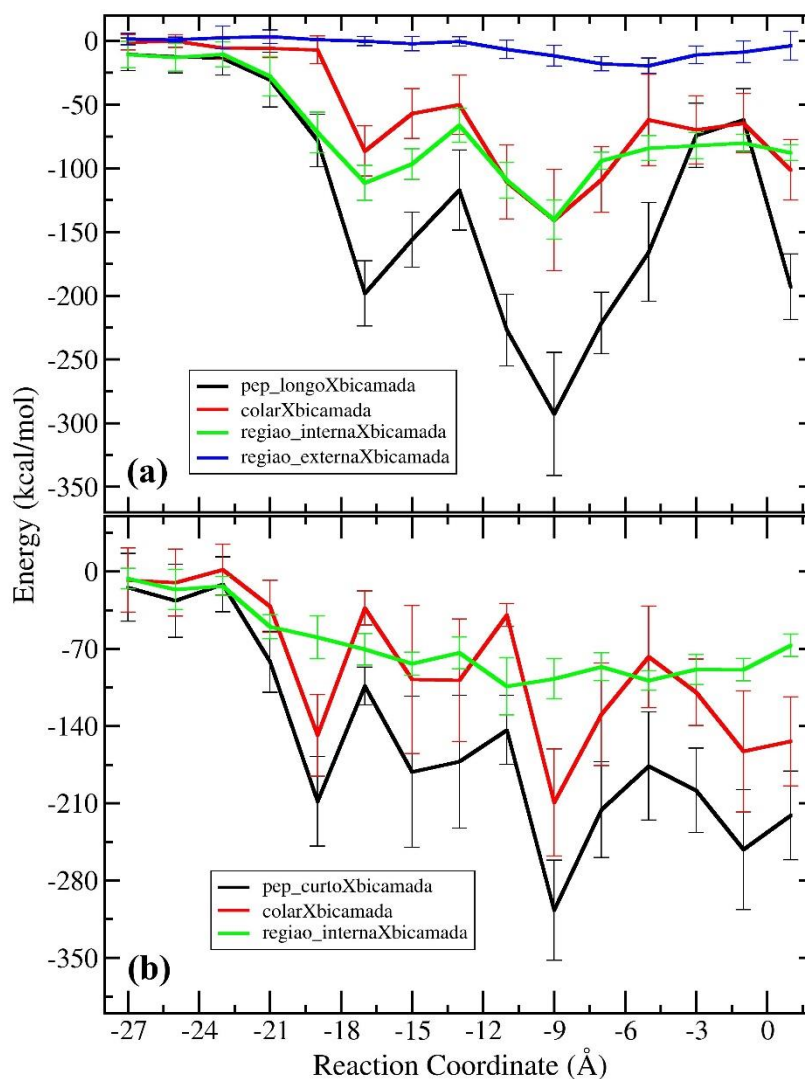


Figura 57 – Valores médios para cada janela das energias de interação não ligadas entre o peptídeo de fusão, Colar, Região Interna e Região Externa com a bicamada de POPC em função do caminho de reação de -27 a 1 Å. Em (a) para o peptídeo longo e em (b) para o peptídeo curto. A cor preta representa as interações do peptídeo completo com a bicamada, as interações do Colar com a bicamada pela cor vermelha, as interações entre a Região Interna com a bicamada pela cor verde, e pela cor azul estão representadas as interações entre a Região Externa com a bicamada.

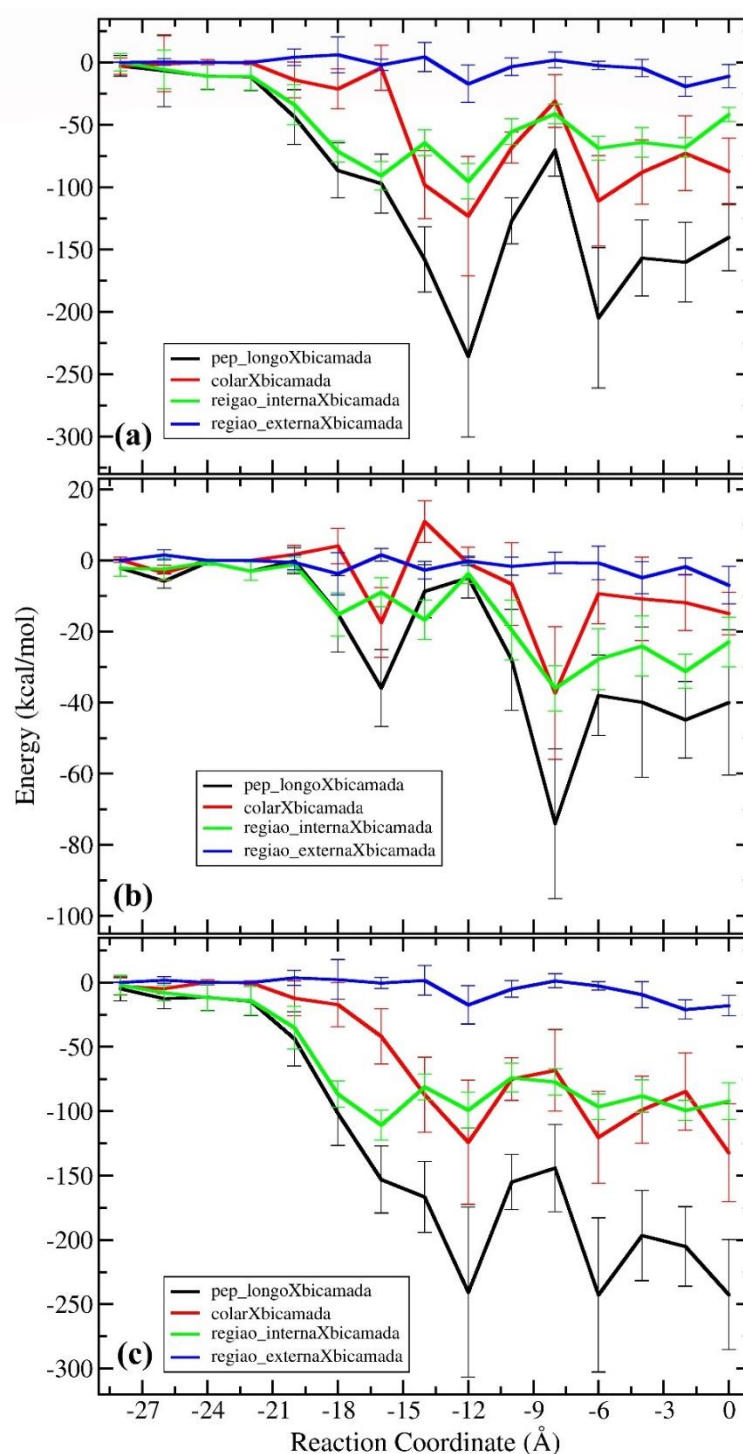


Figura 58 – Valores médios para cada janela das energias de interação não ligadas entre o peptídeo longo, Colar, Região Interna e Região Externa com a bicamada considerando a contribuição em (a) dos fosfolipídeos de POPC, em (b) dos fosfolipídeos de POPG e em (c) dos fosfolipídeos de POPC/POPG, na região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações do peptídeo longo com a bicamada, as interações do Colar com a bicamada pela cor vermelha, as interações entre a Região Interna com a bicamada pela cor verde, e pela cor azul estão representadas as interações da Região Externa com a bicamada.

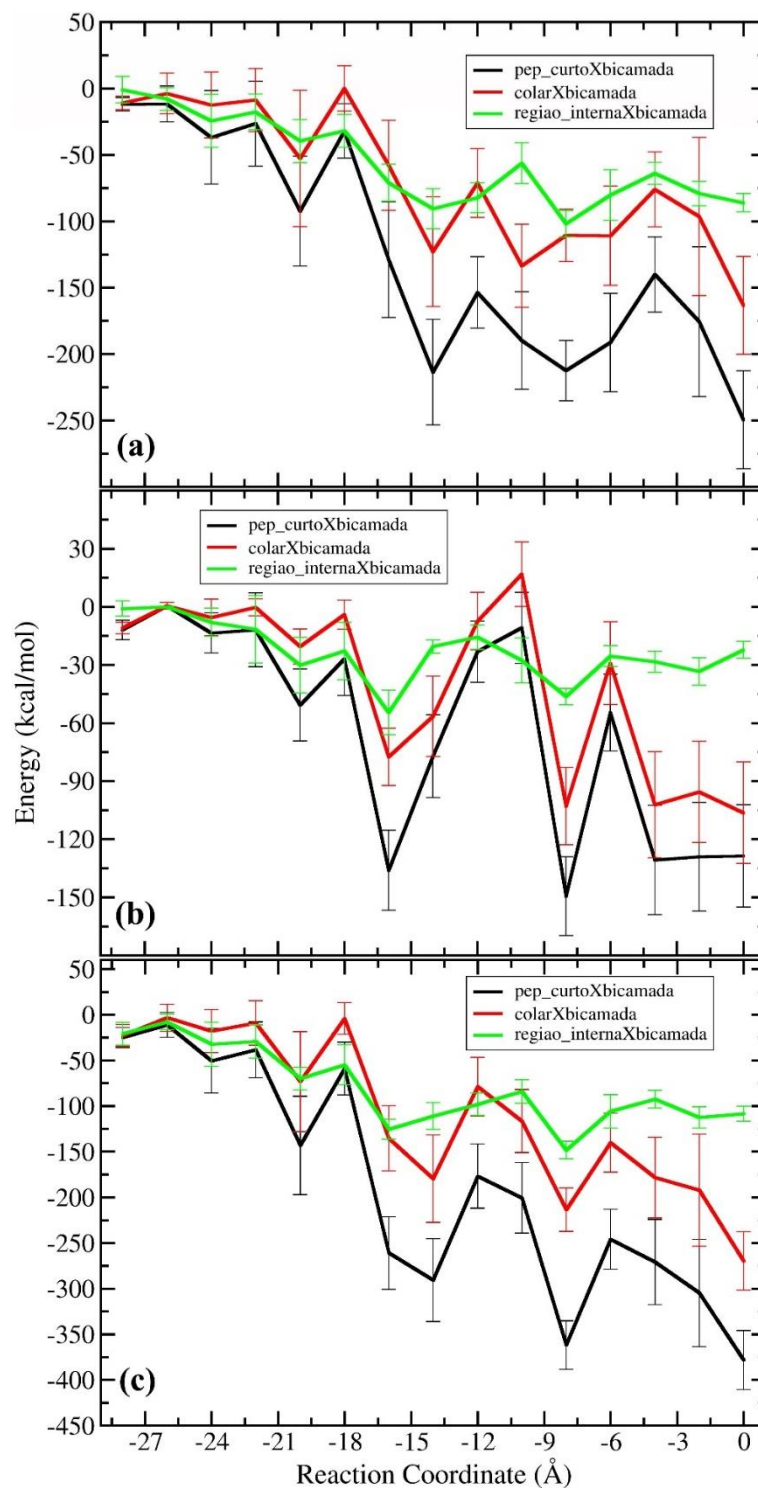


Figura 59 – Valores médios para cada janela das energias de interação não ligadas entre o peptídeo curto, Colar, Região Interna com a bicamada considerando a contribuição em (a) dos fosfolipídeos de POPC, em (b) dos fosfolipídeos de POPG e em (c) dos fosfolipídeos de POPC/POPG, na região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações do peptídeo longo com a bicamada, as interações do Colar com a bicamada pela cor vermelha, as interações entre a Região Interna com a bicamada pela cor verde.

A tabela 9 mostra, na região do mínimo de energia livre, os valores médios com seus desvios padrões das interações energéticas não ligadas entre o peptídeo (longo e o curto) e suas divisões entre Colar, Região Interna e Região Externa com a bicamada de POPC e POPC/POPG.

Tabela 9 – Valores médios e desvio padrão das interações energéticas totais (kcal/mol) entre o peptídeo longo, o peptídeo curto e seus desmembramentos com a bicamada de POPC e POPC/POPG, na região do mínimo de energia livre.

Interação energética (kcal/mol)	Peptídeo X Bicamada	Colar X Bicamada	Região Interna X Bicamada	Região Externa X Bicamada	
POPC					
Pep_longo	-221 ±24	-109 ±26	-94 ±7	-18 ±6	
Pep_curto	-215 ±43	-129 ±46	-86 ±13	-	
POPC/POPG					
Pep_longo	POPC	-127 ±18	-68 ±12	-55 ±10	-3 ±7
	POPG	-28 ±14	-7 ±12	-19 ±8	-2 ±3
	POPC/POPG	-155 ±21	-75 ±17	-74 ±11	-5 ±6
Pep_curto	POPC	-190 ±37	-134 ±31	-56 ±15	-
	POPG	-11 ±18	17 ±17	-28 ±12	-
	POPC/POPG	-201 ±39	-117 ±35	-84 ±13	-

Analisando a bicamada de POPC observamos que a contribuição da interação de cada região para a energia de interação total peptídeo/bicamada mais significativas são as do Colar com a bicamada, para ambos os peptídeos, sendo que para o peptídeo longo esta interação representa 49,3% do valor total e para o peptídeo curto 60%. A interação da Região Interna com a bicamada para o peptídeo longo e para o peptídeo curto foi de 42,5% e 40%, respectivamente e a interação da Região Externa com a bicamada foi de aproximadamente 8,2% para o peptídeo longo.

Para a bicamada de POPC/POPG contamos um comportamento similar com a bicamada de POPC, as interações mais significativas são as do Colar com os fosfolídeos da bicamada, para ambos os peptídeos, com exceção para as interações com os fosfolídeos de POPG que teve como interação mais

significativa a interação da Região Interna com os fosfolipídeos da bicamada. Para o peptídeo longo a interação entre o colar com os fosfolipídeos de POPC representa aproximadamente 54%, 25% com os fosfolipídeos de POPG e 49% com os fosfolipídeos de POPC/POPG do valor total das interações. Para o peptídeo curto temos que 70% das interações é devido a interação entre o Colar com os fosfolipídeos de POPC, 38% e 58% são decorrentes aos fosfolipídeos de POPG e os fosfolipídeos de POPC/POPG.

A interação entre a Região Interna do peptídeo longo com os fosfolipídeos de POPC corresponde a aproximadamente 44% do valor total das interações, 68% com os fosfolipídeos de POPG e 48% com os fosfolipídeos de POPC/POPG do valor total. Para o peptídeo curto esta interação representa aproximadamente 30% com os fosfolipídeos de POPC, 62% com os fosfolipídeos de POPG e 40% com os fosfolipídeos de POPC/POPG do valor integral.

Considerando a Região Externa do peptídeo longo a interação foi de aproximadamente 2% com os fosfolipídeos de POPC, 7% com os fosfolipídeos de POPG e 3% com os fosfolipídeos de POPC/POPG do valor.

Pelo que foi exposto na tabela acima, os fosfolipídeos de POPG influenciam diretamente na interação energética entre o Colar com a bicamada, em ambos os peptídeos, diminuindo a interação entre os mesmos. Para detalhar ainda mais as interações energéticas entre o peptídeo longo e o peptídeo curto com as bicamadas, dividimos cada molécula de POPC e POPG, e conseqüentemente as bicamadas, em três regiões sendo elas Fosfato, Colina e Cauda para as moléculas de POPC (*vide* figura 36 (a)) e Fosfato, Glicerol e Cauda para as moléculas de POPG (*vide* figura 36 (b)), calculamos as interações energéticas entre todas as regiões dos peptídeos com todas as regiões da bicamada, para averiguar qual parte da bicamada tem maior interação com cada parte do peptídeo.

As Figuras 60 (a) e 60 (b) mostram o valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC com o Colar dos peptídeos longo e curto, em função do caminho de reação. Para as interações energéticas entre a bicamada de POPC/POPG com o Colar do peptídeo longo são mostrados na Figura 61 (a) considerando somente os fosfolipídeos de POPC, Figura

61 (b) com os fosfolipídeos de POPG e Figura 61 (c) com os fosfolipídeos de POPC/POPG e para o peptídeo curto são mostrados nas Figura 62 (a) com os fosfolipídeos de POPC, Figura 62 (b) com os fosfolipídeos de POPG e Figura 62 (c) com os fosfolipídeos de POPC/POPG.

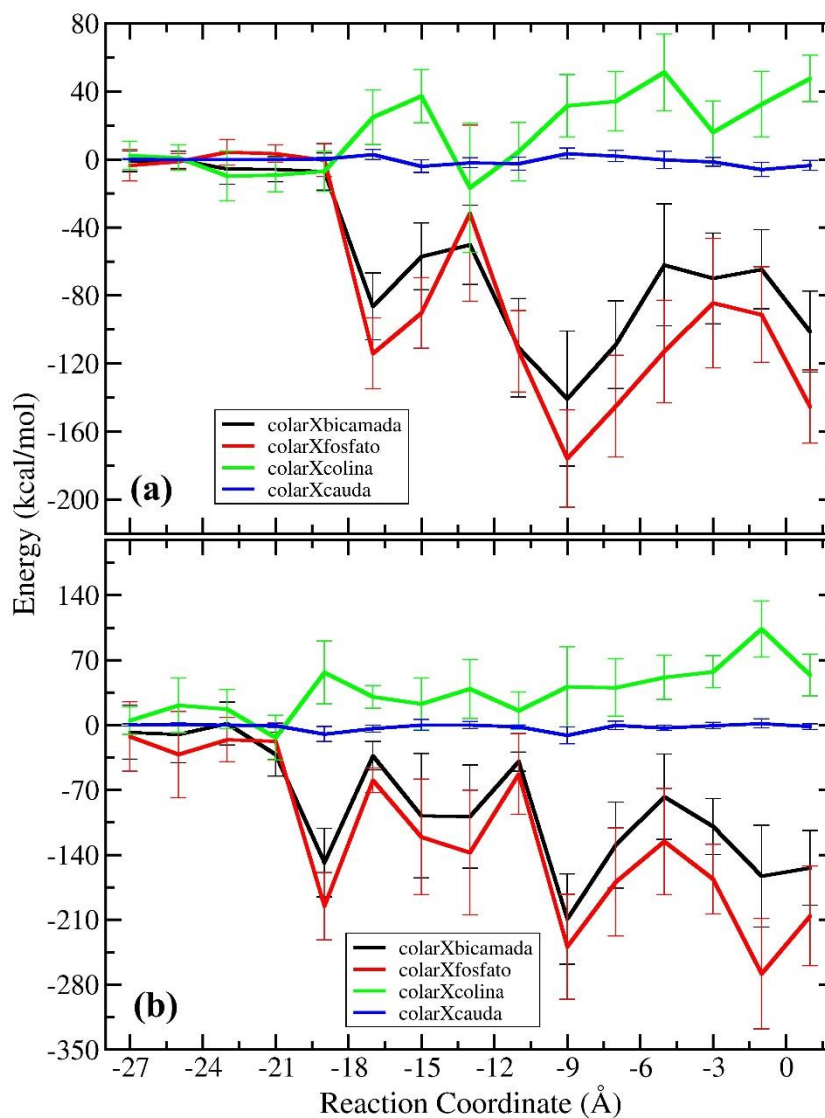


Figura 60 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC com o Colar do peptídeo de fusão, em função do caminho de reação de -27 a 1 Å em (a) para o peptídeo longo e em (b) para o peptídeo curto. A cor preta representa as interações energéticas entre o Colar com a bicamada, as interações entre o Colar com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre o Colar com o grupo Colina e as interações entre o Colar com a Cauda pela cor azul.

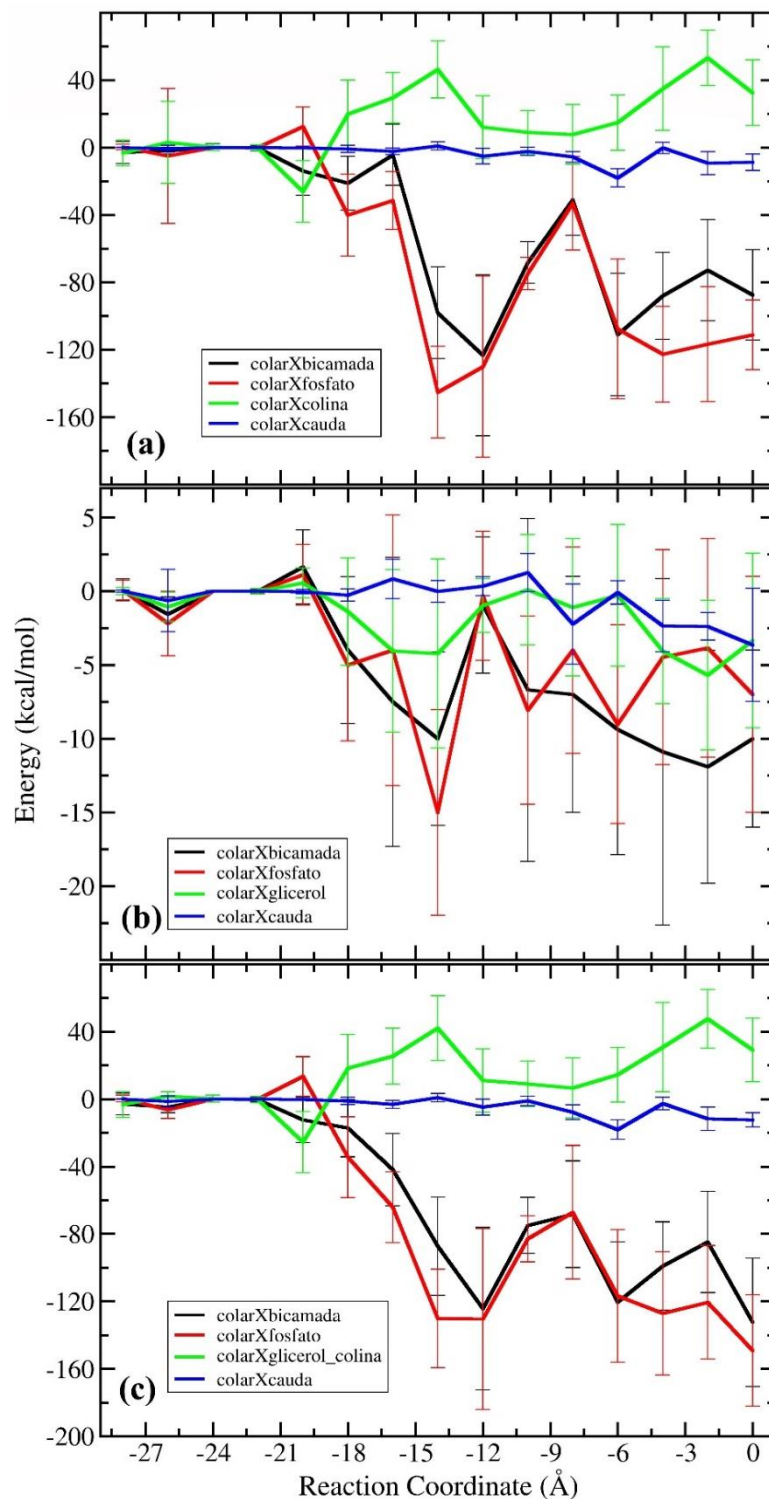


Figura 61 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC/POPG com o Colar do peptídeo longo, considerando a contribuição em (a) dos fosfolipídeos de POPC, em (b) dos fosfolipídeos de POPG e em (c) dos fosfolipídeos de POPC/POPG, para a região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações energéticas entre o Colar com a bicamada, as interações entre o Colar com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre o Colar com o grupo Colina e as interações entre o Colar com a Cauda pela cor azul.

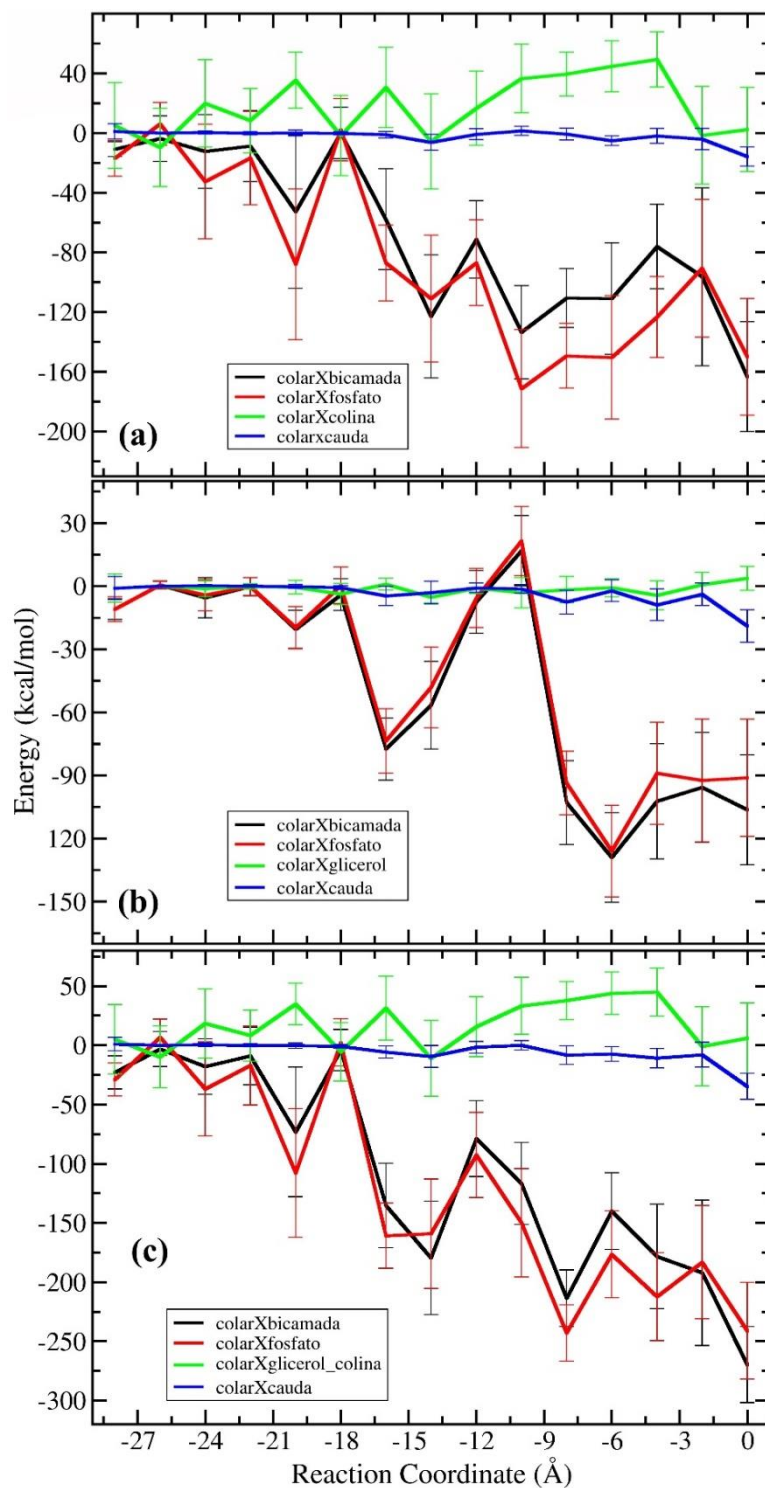


Figura 62 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC/POPG com o Colar do peptídeo curto, considerando a contribuição em (a) dos fosfolípídeos de POPC, em (b) dos fosfolípídeos de POPG e em (c) dos fosfolípídeos de POPC/POPG, para a região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações energéticas entre o Colar com a bicamada, as interações entre o Colar com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre o Colar com o grupo Colina e as interações entre o Colar com a Cauda pela cor azul.

Nas Figuras 60, 61 (a), 61 (c), 62 (a) e 62 (c), evidenciou-se que as interações energéticas se comportam de forma parecida nos dois peptídeos. Isso se deve ao fato que a região do Colar é idêntica em ambos os peptídeos. As interações energéticas fora das bicamadas são interações que apresentam valores energéticos bem pequenos, próximos de zero, neste caso isso ocorre, pois, o Colar está bem distante da membrana, fazendo com que a interação energética seja baixa para todos os tipos de interações energéticas. Quando o peptídeo começa a entrar na bicamada a interação predominante é uma interação atrativa (negativa) e ocorre entre o Colar com o grupo Fosfato. Esta interação atrativa que ocorre entre os grupos mencionados é devido ao fato que o Colar apresenta carga líquida +1e e o grupo Fosfato carga líquida -1e. Considerando as interações entre o Colar com o grupo Colina viu-se que as interações são repulsivas e de menor valor energético do que a interação entre o Colar com o grupo Fosfato, a interação repulsiva entre o Colar com o grupo Colina acontece pois, o Colar e grupo Colina apresentam cargas líquidas iguais a +1e. A interação energética entre o Colar com a Cauda é praticamente insignificante comparada com as outras interações energéticas tanto dentro como fora da bicamada, pois a Cauda apresenta carga líquida nula.

Considerando agora as Figuras 61 (b) e 62 (b) a interação energética mais significativa é uma interação atrativa e que ocorre entre o Colar (carga líquida +1e) com o grupo Fosfato (carga líquida -1e). A interação entre Colar com o Glicerol (carga líquida nula) apresenta uma interação atrativa, figura 61(b) e 62 (b), esta interação é muito pequena quando comparada com as demais.

Se observarmos os valores obtidos na região do mínimo de energia livre nas figuras 60, 61 e 62, para ambos os peptídeos, vemos que as interações energéticas ocorrem majoritariamente entre o Colar com o grupo Fosfato das bicamadas de POPC estes valores são de aproximadamente 80% para ambos os peptídeos e para a bicamada de POPC/POPG temos que para o peptídeo longo a interação entre o Colar com o grupo Fosfato vale aproximadamente 87% para os fosfolipídeos de POPC, 89% para os fosfolipídeos de POPG e 89% para os fosfolipídeos de

POPC/POPG e o peptídeo curto tem uma interação energética de aproximadamente 82% para os fosfolipídeos de POPC, 84% para os fosfolipídeos de POPG e 82% para os fosfolipídeos de POPC/POPG, apesar das porcentagens dos valores da interações energéticas serem maiores nas bicamadas de POPC/POPG elas apresentam um valor energético menor quando comparada com a bicamada de POPC.

Para determinar quais tipos de interação não ligada peptídeo/bicamada são mais importantes na conformação de equilíbrio do sistema, ou seja, na região que contém o mínimo de energia livre, calculou-se separadamente os valores médios das interações eletrostáticas (Ele.) e de van de Waals (V. d. W.) entre a região do Colar de cada um dos peptídeos e a bicamada toda de POPC e POPC/POPG e cada uma de suas regiões. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 10. Verificou-se que a maior contribuição energética é devido a interação eletrostática tanto na interação entre o Colar e a bicamada como um todo como na interação do Colar com o grupo Fosfato. Isso ocorre pelo fato que essas interações ocorrem entre grupos carregados o que, portanto, resulta em valores elevados de interações eletrostáticas.

Tabela 10 – Média da energia de interação eletrostática e de van der Waals, entre a região do Colar dos peptídeos com cada uma das regiões da bicamada de POPC e POPC/POPG e para a bicamada toda, para a janela que contém o mínimo de energia livre.

	Energia (kcal/mol)	Colar X Bicamada	Colar X Fosfato	Colar X Colina/ Glicerol	Colar X Cauda
POPC					
Pep_longo	Ele.	-89 ±28	-138 ±31	40 ±18	9 ±3
	V. d. W.	-20 ±4	-7 ±3	-6 ±1	-6 ±1
	Total	-109 ±26	-145 ±30	34 ±17	2 ±3
Pep_curto	Ele.	-120 ±47	-167 ±59	44 ±30	3 ±4
	V. d. W.	-9 ±4	-2 ±4	-4 ±1	-3 ±1
	Total	-129 ±46	-169 ±58	40 ±31	-0.5 ±5

POPC/POPG						
Pep_longo	Só POPC	Ele.	-64 ±13	-75 ±10	11 ±13	0.5 ±2
		V. d. W.	-4 ±2	0.4 ±2	-2 ±1	-3 ±1
		Total	-68 ±12	-75 ±10	9 ±13	-2 ±2
	Só POPG	Ele.	-2 ±12	-6 ±12	1 ±4	2 ±1
		V. d. W.	-4 ±2	-2 ±1	-1 ±1	-1 ±1
		Total	-7 ±12	-8 ±11	0.1 ±4	1 ±1
	POPC/POPG	Ele.	-66 ±17	-81 ±14	12 ±14	3 ±3
		V. d. W.	-9 ±3	-2 ±2	-3 ±1	-4 ±1
		Total	-75 ±17	-83 ±14	9 ±13	-1 ±3
Pep_curto	Só POPC	Ele.	-128 ±33	-171 ±40	39 ±23	4 ±3
		V. d. W.	-5 ±4	-0.5 ±3	-3 ±1	-2 ±1
		Total	-133 ±31	-171 ±40	36 ±23	1 ±3
	Só POPG	Ele.	18 ±17	22 ±17	-3 ±8	-1 ±2
		V. d. W.	-1 ±1	-0.7 ±1	-0.2 ±1	-0.2 ±0.5
		Total	17 ±17	21 ±16	-3 ±7	-1 ±2
	POPC/POPG	Ele.	-110 ±36	-149 ±47	36 ±25	2 ±4
		V. d. W.	-6 ±4	-1 ±3	-3 ±1	-2 ±1
		Total	-117 ±35	-150 ±46	33 ±24	-0.01 ±4

Estes resultados explicam porquê a energia de interação peptídeo/bicamada se torna atrativa quando o peptídeo entra na bicamada (Figuras 55 e 56) pois, para ambos os peptídeos, a energia de interação atrativa entre o Colar com o grupo Fosfato é maior que as interações entre o Colar e o grupo Colina/Glicerol e o Colar com a Cauda. Como a interação Colar/bicamada domina a interação peptídeo/bicamada, temos indícios de que a interação peptídeo/bicamada é governada pelas interações entre os resíduos de aminoácidos da região do Colar com as moléculas da região do Fosfato das bicamadas de POPC e POPG.

Está esquematizado nas Figura 63 (a) e 63 (b), respectivamente a interação energética da Região Interna do peptídeo longo e curto com cada região da bicamada de POPC, em função do caminho de reação. Para as interações energéticas entre a bicamada de POPC/POPG com a Região Interna do peptídeo longo são mostrados na Figura 64 (a) interação com os fosfolipídeos de POPC, Figura 64 (b) interação com os fosfolipídeos de POPG e Figura 64 (c) interação

com os fosfolipídeos de POPC/POPG e para o peptídeo curto são mostrados na Figura 65 (a) interação com os fosfolipídeos de POPC, Figura 65 (b) interação com os fosfolipídeos de POPG e a interação com os fosfolipídeos de POPC/POPG na Figura 65 (c).

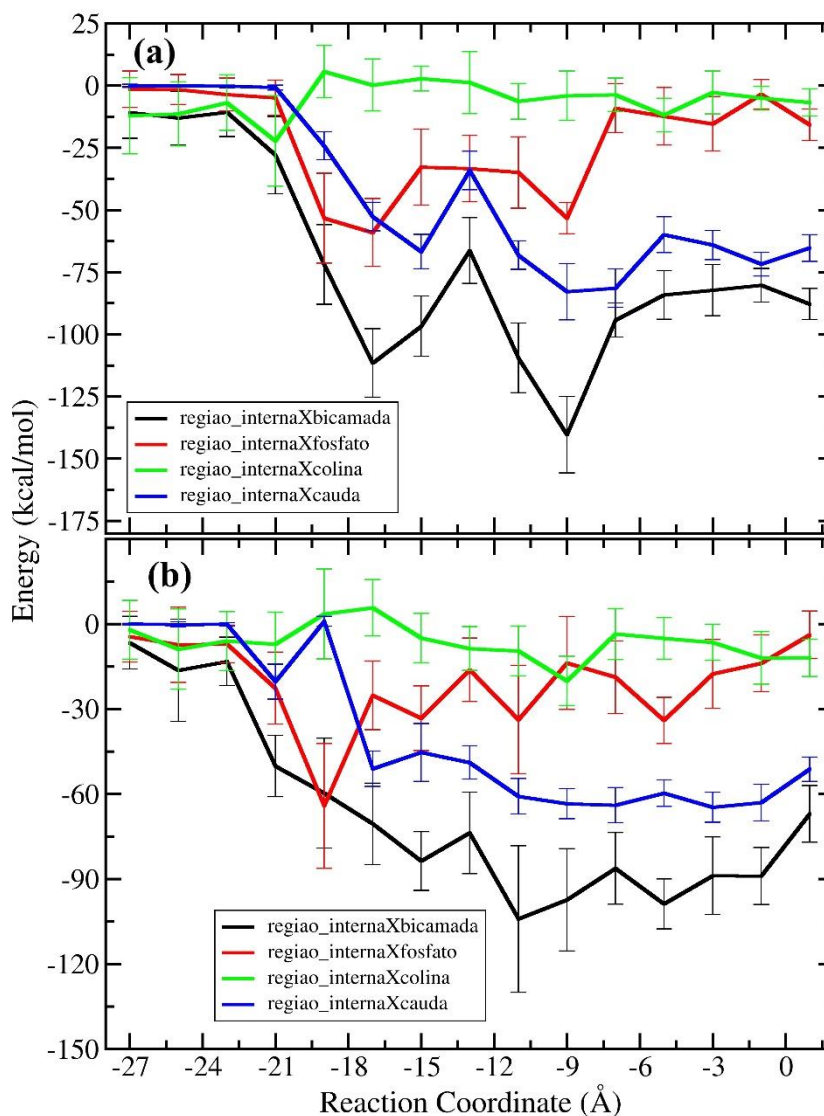


Figura 63 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC com a Região Interna do peptídeo de fusão, em função do caminho de reação de -27 a 1 Å em (a) para o peptídeo longo e em (b) para o peptídeo curto. A cor preta representa as interações energéticas entre a Região Interna com a bicamada, as interações entre a Região Interna com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre a Região Interna com o grupo Colina e as interações entre a Região Interna com a Cauda pela cor azul.

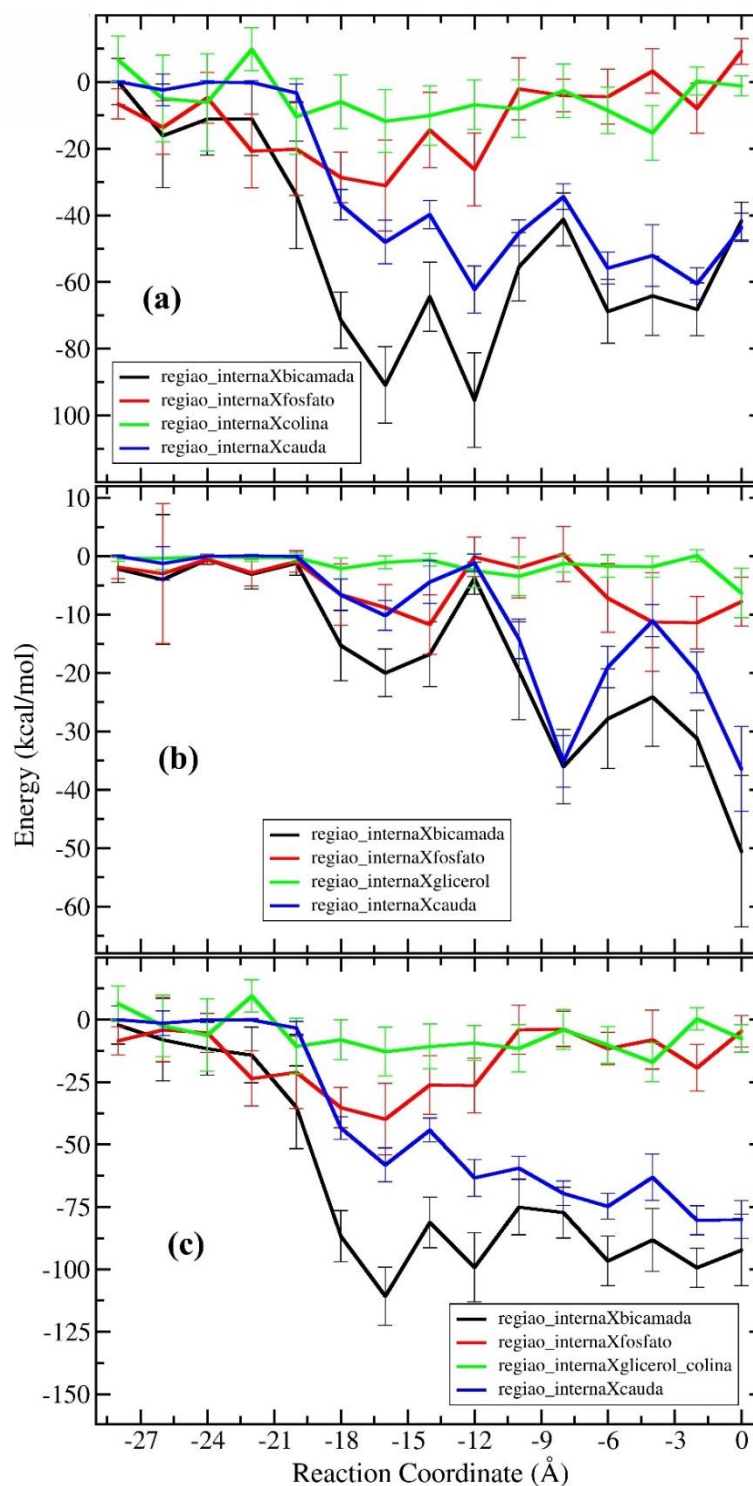


Figura 64 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC/POPG com a Região Interna do peptídeo longo, considerando a contribuição em (a) dos fosfolípidos de POPC, em (b) dos fosfolípidos de POPG e em (c) dos fosfolípidos de POPC/POPG, para a região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações energéticas entre a Região Interna com a bicamada, as interações entre a Região Interna com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre a Região interna com o grupo Colina e as interações entre a Região Interna com a Cauda pela cor azul.

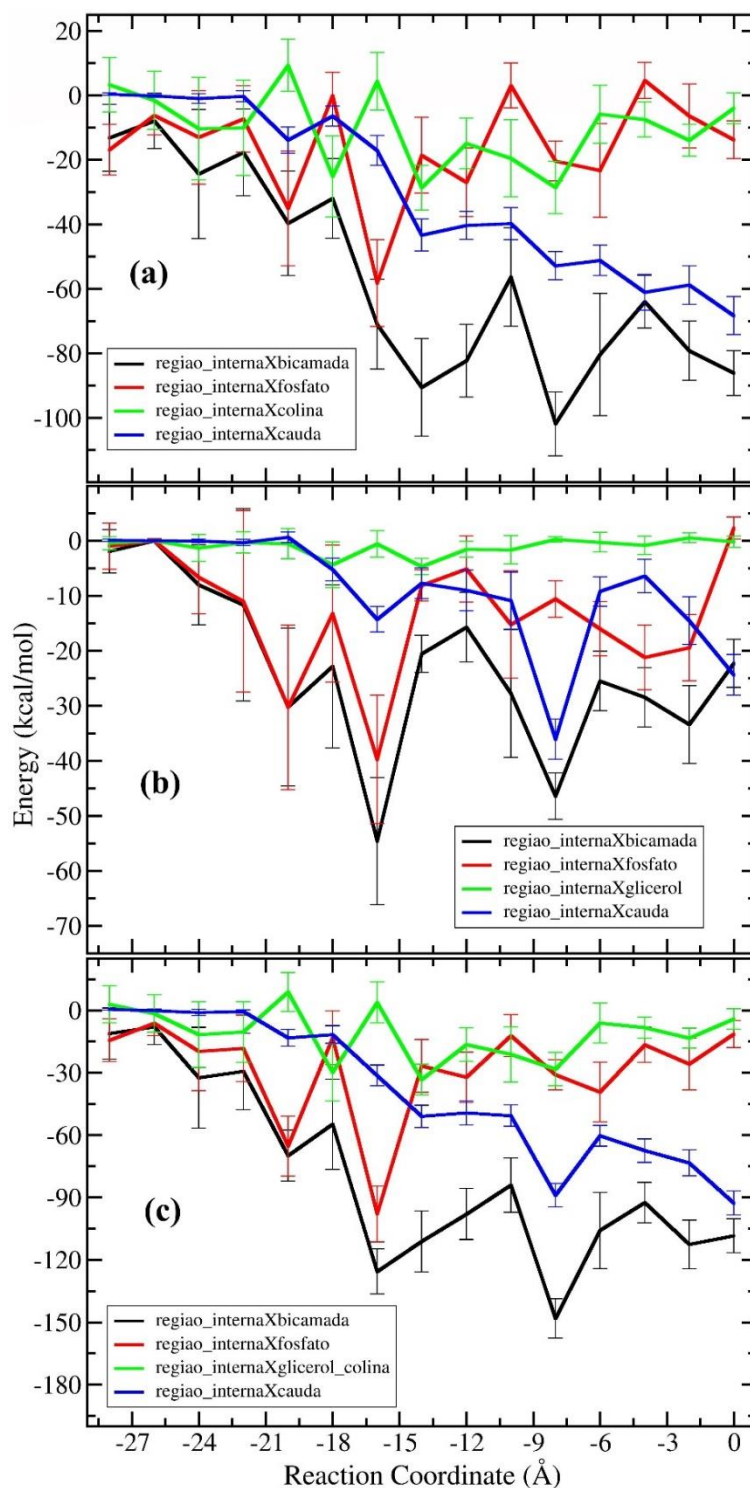


Figura 65 – Valor médio para cada janela das interações energéticas entre cada região da bicamada de POPC/POPG com a Região Interna do peptídeo curto, considerando a contribuição em (a) dos fosfolipídeos de POPC, em (b) dos fosfolipídeos de POPG e em (c) dos fosfolipídeos de POPC/POPG, para a região de -28 a 0 Å do caminho de reação. A cor preta representa as interações energéticas entre a Região Interna com a bicamada, as interações entre a Região Interna com o grupo Fosfato pela cor vermelha, pela cor verde as interações entre a Região Interna com o grupo Colina e as interações entre a Região Interna com a Cauda pela cor azul.

Podemos observar que, nas Figuras 63, 64 e 65, as interações energéticas se comportam de forma parecida nos dois casos estudados e nas bicamadas de POPC e POPC/POPG. Isso se deve ao fato que a Região Interna do peptídeo é a mesma em ambos os peptídeos. Analisando a região fora da bicamada temos que as interações energéticas entre a Região Interna com a bicamada e seus desmembramentos são interações de intensidades fracas e atrativas. Quando o peptídeo, longo e o curto, entra na bicamada de POPC e POPC/POPG a interação energética mais pronunciada é a interação entre a Região Interna com a Cauda e apresenta uma interação atrativa, enquanto que, os valores das interações entre a Região Interna com o Fosfato, com a Colina e com o Glicerol tem seus valores energéticos atrativos e de intensidades baixas durante todo o caminho de reação.

Se analisarmos os valores obtidos na região na qual está localizado o mínimo de energia livre nas figuras 63, 64 e 65, para ambos os peptídeos, vemos que as interações energéticas ocorrem predominantemente entre a Região Interna com a cauda das bicamadas de POPC e POPC/POPG, com exceção da interação do peptídeo curto com o grupo Fosfato dos fosfolípídeos de POPG que tem a interação mais atrativa. A interação entre a Região Interna do peptídeo longo com Cauda da bicamada de POPC corresponde a um valor de aproximadamente de 86%, para o peptídeo curto este valor é de aproximadamente 74%. Considerando a bicamada de POPC/POPG temos que para o peptídeo longo a interação entre a Região Interna com a Cauda vale aproximadamente 82% para os fosfolípídeos de POPC, 74% para os fosfolípídeos de POPG e 80% para os fosfolípídeos de POPC/POPG e o peptídeo curto tem uma interação energética de aproximadamente de 65% para os fosfolípídeos de POPC, 61% para os fosfolípídeos de POPC/POPG, para os fosfolípídeos de POPG a interação mais significativa foi a interação da Região Interna com o grupo Fosfato com aproximadamente 54%, a bicamada de POPC apresenta uma interação energética maior que a bicamada de POPC/POPG.

A tabela 11 mostra quais são os tipos de interação não ligada peptídeo/bicamada são mais importantes na conformação de equilíbrio do sistema, calculamos separadamente os valores médios das interações eletrostáticas (Ele.) e de van de Waals (V. d. W.) entre a Região Interna de cada um dos peptídeos e a

bicamada toda e cada uma de suas subdivisões. Podemos verificar que a maior contribuição energética é devido a interação de van de Waals tanto na interação entre a Região Interna e a bicamada como um todo como na interação da Região Interna com a Cauda. As interações entre Região Interna com o grupo Fosfato, Colina e Glicerol têm intensidade pequena frente às interações com as outras interações da bicamada.

Tabela 11 – Média da energia de interação eletrostática e de van der Waals, entre a região do Triptofano dos peptídeos com cada uma das regiões da bicamada de POPC e POPC/POPG e para a bicamada toda, para a janela que contém o mínimo de energia livre.

	Energia (kcal/mol)	Região Interna X Bicamada	Região Interna X Fosfato	Região Interna X Colina/ Glicerol	Região Interna X Cauda	
POPC						
Pep_longo	Ele.	-24 ±6	-2 ±10	-0.5 ±7	-22 ±5	
	V. d. W.	-70 ±4	-7 ±1	-3 ±1	-59 ±4	
	Total	-94 ±7	-9 ±10	-4 ±7	-81 ±8	
Pep_curto	Ele.	-27 ±11	-12 ±12	-1 ±9	-14 ±4	
	V. d. W.	-59 ±5	-7 ±2	-2 ±1	-49 ±4	
	Total	-86 ±13	-19 ±13	-3 ±9	-64 ±6	
POPC/POPG						
Pep_longo	Só POPC	Ele.	-14 ±10	1 ±9	-6 ±8	-9 ±3
		V. d. W.	-41 ±4	-3 ±1	-2 ±1	-36 ±4
		Total	-55 ±10	-2 ±9	-8 ±8	-45 ±4
	Só POPG	Ele.	-3 ±6	-1 ±5	-1 ±3	-1 ±1
		V. d. W.	-16 ±4	-1 ±1	-2 ±1	-13 ±3
		Total	-20 ±8	-2 ±5	-3 ±3	-14 ±3
	POPC/POPG	Ele.	-17 ±10	1 ±10	-8 ±8	-10 ±3
		V. d. W.	-57 ±4	-5 ±1	-3 ±2	-49 ±4
		Total	-74 ±12	-4 ±10	-11 ±9	-59 ±5
Pep_curto	Só POPC	Ele.	-14 ±12	9 ±7	-17 ±11	-6 ±3
		V. d. W.	-43 ±5	-6 ±2	-2 ±1	-34 ±4
		Total	-56 ±15	3 ±7	-19 ±12	-40 ±5
	Só POPG	Ele.	-15 ±8	-13 ±9	-0.5 ±2	-1 ±2
		V. d. W.	-13 ±4	-2 ±1	-1 ±1	-10 ±4
		Total	-28 ±12	-15 ±10	-2 ±3	-11 ±5
	POPC/POPG	Ele.	-28 ±12	-4 ±10	-18 ±13	-6 ±3
		V. d. W.	-56 ±4	-8 ±2	-3 ±2	-44 ±4
		Total	-84 ±13	-12 ±10	-21 ±13	-51 ±5

Realizando uma análise na região do mínimo de energia livre entre as interações da Região Interna do peptídeo com cauda das bicamadas e entre o Colar com o grupo Fosfato das bicamadas, verificamos que as interações não ligadas predominantes são as interações de van der Waals e eletrostática, respectivamente. Outro aspecto importante é que as interações entre o Colar com o grupo Fosfato apresentam valores energéticos mais altos que as interações entre a Região Interna do peptídeo com a Cauda. Como a interação Colar/bicamada domina a interação peptídeo/bicamada, os resíduos de aminoácidos da região do Colar são fundamentais no processo de interação da proteína E do vírus da Dengue com o grupo Fosfato das bicamadas.

A Figura 66 ilustra a posição do peptídeo longo com a bicamada de POPC na situação do mínimo de energia, com o propósito de compreender melhor o exposto acima sobre quais são as regiões do peptídeo que interagem melhor com as regiões da bicamada. Averiguou-se que a Região Interna tem uma interação maior com a Cauda, enquanto que o Colar interage fortemente com o grupo Fosfato da bicamada.

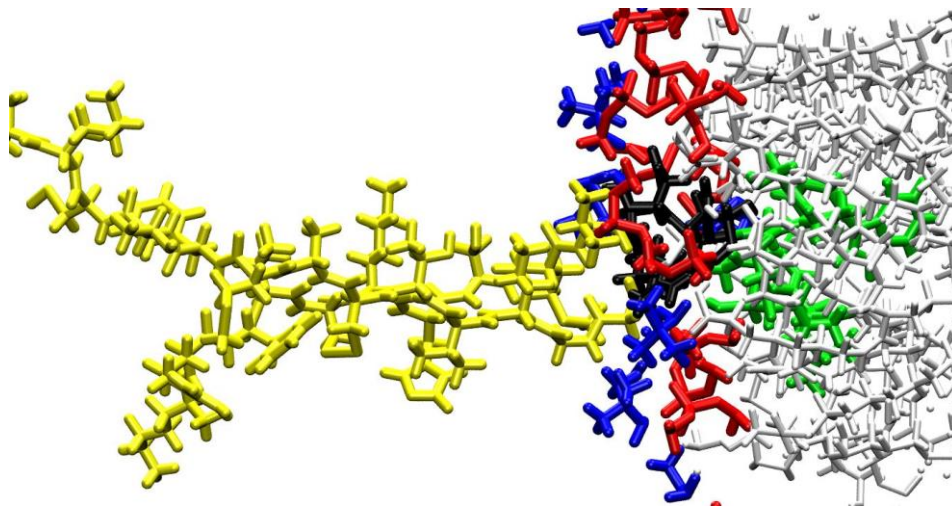


Figura 66 – Ilustra o peptídeo longo na qual foi dividido em região do Colar que está representado pela cor preta, Região Interna pela cor verde e Região Externa pela cor amarela e a bicamada de POPC está dividido em grupo Fosfato pela cor vermelha, grupo Colina pela cor azul e a região da Cauda pela cor branca, a fim de compreender quais são as regiões do peptídeo com a bicamada de POPC que ocorrem as interações energéticas mais significativas.

5.5.6 – Conclusão

Neste capítulo, foi utilizado a Dinâmica Molecular e o método *Adaptive Biasing Force* (ABF), para fazer a caracterização do processo de adsorção de duas sequências de resíduos de aminoácidos da proteína E do vírus da Dengue que contêm o peptídeo de fusão (resíduos 88-123 e 98-110) em modelos de membranas de POPC e POPC:POPG na razão 4:1. Para isso foi realizada uma análise estrutural do peptídeo de fusão para verificar se ele sofre alguma alteração em sua estrutura quando inserido na bicamada. Realizou-se também um estudo da energética desse processo, para verificar qual região do peptídeo de fusão interage melhor com a bicamada, com o intuito de que futuramente possamos encontrar mecanismos que inibam essa interação e, conseqüentemente, a infecção da célula pelo do vírus da dengue.

A análise estrutural, realizada por meio do cálculo do RMSD com relação à estrutura cristalográfica e a porcentagem de estrutura secundária em cada peptídeo, mostra que os peptídeos não sofreram alterações conformacionais significativas no interior das bicamadas de POPC e POPC com POPG. No entanto, fora da bicamada, o peptídeo curto, em ambas os sistemas, apresentou altas variações no valor do RMSD. Isso indica que o peptídeo curto não está mantendo sua estrutura inicial em água e que, provavelmente, ele não é adequado para ser utilizado em estudos como os propostos neste trabalho, sendo necessário utilizar porções maiores da proteína E, como o peptídeo longo aqui utilizado.

Com relação ao estudo da posição relativa e a afinidade (energia livre de ligação) do peptídeo longo e do peptídeo curto em bicamadas de POPC e POPC com POPG, verificamos uma pequena diferença na profundidade do mínimo de energia livre de cada peptídeo com as bicamadas estudadas, sendo que os valores mais negativos são observados no sistema que contém a bicamada de POPC puro. Um pequeno deslocamento do enterramento do resíduo do Triptofano também é observado quando comparamos as simulações com as diferentes bicamadas. Entretanto, de forma qualitativa, o enterramento do Triptofano está de acordo com resultados experimentais obtidos por espectroscopia de fluorescência e

cristalografia.

No estudo energético das interações não ligadas (representadas pelas interações de van der Waals e eletrostáticas) entre o peptídeo de fusão e as bicamadas de POPC e POPC/POPG, notamos que as maiores interações ocorrem entre a região do peptídeo de fusão denominada Colar, composta pelos resíduos de aminoácidos Ácido Aspártico (98), Arginina (99), Asparagina (103) e Lisina (110), com o grupo Fosfato para ambas as bicamadas, sendo mais pronunciadas nas bicamadas de POPC. Constatamos também que as interações de hidrogênio entre ambos os peptídeos e as bicamadas envolvem exclusivamente a região do Colar e grupos químicos localizados na região hidrofílica dos fosfolípidos.

Por conseguinte, podemos então propor que existe uma região do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da dengue, designado aqui como “Colar”, que é responsável pela maior parte das interações entre o peptídeo de fusão e a membrana celular e que poderá ser alvo de estudos posteriores focados no desenvolvimento de ligantes que inibam essas interações, e portanto, a infecção da célula pelo vírus da Dengue.

Capítulo 6: Perspectivas

- Estudar a afinidade do trímero do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue com modelos de membranas biológicas, bem como determinar sua posição relativa com relação a superfície dessas bicamadas, utilizando simulações de Dinâmica Molecular;
- Calcular detalhadamente as interações não ligadas entre trímero do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue e as bicamadas, a fim de determinar quais dos resíduos de aminoácidos do trímero mais contribuem para a interação trímero/bicamada.
- Investigar possíveis ligantes que possam inibir a interação da proteína E do vírus da dengue com a membrana celular utilizando simulações computacionais.

Artigos propostos

- Epidemiologia matemática: a modelagem matemática e a Dengue;
- Desenvolvimento e testes de uma ferramenta para inserção com baixa perturbação de proteínas de membrana em bicamadas lipídicas para simulações de Dinâmica Molecular;
- Estudo da interação entre o peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue com modelos de membrana biológica por simulações de Dinâmica Molecular.

Capítulo 7: Referências

1. Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao C, et al. **Cryo-EM Reconstruction of Dengue Virus in Complex with the Carbohydrate Recognition Domain of DC-SIGN.** *Cell.* 124(3):485–93, 2006.
2. Stauffer F, Melo MN, Carneiro FA, Sousa FJR, Juliano MA, Juliano L, et al. **Interaction between dengue virus fusion peptide and lipid bilayers depends on peptide clustering.** *Mol Membr Biol.* 25(2):128–38,2008.
3. Melo MN, Sousa FJR, Carneiro FA, Castanho MARB, Valente AP, Almeida FCL, et al. **Interaction of the Dengue Virus Fusion Peptide with Membranes Assessed by NMR: The Essential Role of the Envelope Protein Trp101 for Membrane Fusion.** *J Mol Biol.* 392(3):736–46,2009.
4. DHF_guidelines_COVER.indd - dengue-diagnosis.pdf. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>> Acesso em: 06 de março de 2018.
5. Dengue. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>>. Acesso em: 06 de março de 2018.
6. Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB de, Pereira MAS, Schatzmayr HG. **Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96(7):925–6, 2001.
7. Henchal EA, McCown JM, Burke DS, Seguin MC, Brandt WE. **Epitopic Analysis of Antigenic Determinants on the Surface of Dengue-2 Virions Using Monoclonal Antibodies*.** *Am J Trop Med Hyg.* 34(1):162–9,1985.
8. Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae the Viruses and Their Replication.* Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/46776233/Flaviviridae-the-Viruses-and-Their-Replication>
9. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. **Flavivirus genome organization, expression, and replication.** *Annu Rev Microbiol.* 44:649–88, 1990.
10. Eckert DM, Kim PS. **Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition.** *Annu Rev Biochem.* 70:777–810, 2001.

11. Chin JFL, Chu JJH, Ng ML. **The envelope glycoprotein domain III of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry.** *Microbes Infect.* 9(1):1–6, 2007.
12. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. **Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion.** *Nature.*427(6972):313–9, 2004.
13. Field MJ. **A Practical Introduction to the Simulation of Molecular Systems.** Cambridge University Press. p. 294 , 2007.
14. Leach AR. **Molecular Modelling: Principles and Applications.** Prentice Hall. p.784, 2001.
15. GROMACS Reference Manual - manual-2016.2.pdf. Disponível em: <<http://manual.gromacs.org/documentation/2016.2/manual-2016.2.pdf>>. Acesso em: 06 de março de 2018.
16. Frenkel D, Smit B. **Understanding Molecular Simulation**, Second Edition: From Algorithms to Applications. 2^o ed. Academic Press, p. 664, 2001.
17. Róg T, Murzyn K, Pasenkiewicz-Gierula M. **Molecular dynamics simulations of charged and neutral lipid bilayers: treatment of electrostatic interactions.** *Acta Biochim Pol.* 50(3):789–98, 2003.
18. Hansson T, Oostenbrink C, van Gunsteren W. **Molecular dynamics simulations.** *Curr Opin Struct Biol.*;12(2):190–6, 2002.
19. Karplus M, McCammon JA. **Molecular dynamics simulations of biomolecules.** *Nat Struct Mol Biol.* 9(9):646–52, 2002.
20. Jo S, Kim T, Im W. **Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations.** *PLoS ONE.* 2(9):e880, 2007.
21. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. **CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM.** *J Comput Chem.* 29(11):1859–65, 2008.
22. Jo S, Lim JB, Klauda JB, Im W. **CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes.** *Biophys J.* 97(1):50–8, 2009.
23. Wu EL, Cheng X, Jo S, Rui H, Song KC, Dávila-Contreras EM, et al. **CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations.** *J Comput Chem.* 35(27):1997–2004, 2014.
24. Dimmock N, Easton A, Leppard K. **Introduction to Modern Virology.** 6^o ed. Wiley-Blackwell. p. 536, 2007.

25. Flint JS, Racaniello VR, Krug R, Flint SJ, Enquist LW, Skalka AM, et al. Principles of Virology: **Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses**. 1^o ed. American Society Microbiology. p. 700, 1999.
26. Lok S-M, Kostyuchenko V, Nybakken GE, Holdaway HA, Battisti AJ, Sukupolvi-Petty S, et al. **Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins**. Nat Struct Mol Biol. 15(3):312–7, 2008.
27. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, et al. **Fields Virology**. 3 Sub. Lippincott Williams and Wilkins. p. 2950, 1996.
28. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. **Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil**. Rev Pan-Amaz Saúde. 5(3):55–64, 2014.
29. Gubler DJ. **Cities spawn epidemic dengue viruses**. Nat Med. 10(2):129–30, 2004.
30. Mosquito da Dengue. Disponível em: <<http://www.combateadengue.com.br/mosquito-da-dengue/>>. Acesso em: 13 de março de 2018.
31. Tipos da DENGUE. Disponível em: <<http://www.combateadengue.com.br/tipos-da-dengue>>. Acesso em: 13 de março de 2018.
32. The mosquito: the world's smallest biggest killer. Disponível em: <<http://www.dw.com/en/the-mosquito-the-worlds-smallest-biggest-killer/a-19017493>>. Acesso em: 13 de março de 2018.
33. DEFESA CIVIL DIVULGA INFORMAÇÕES SOBRE A DENGUE. Disponível em: <<http://www.defesacivil-ap.com.br/portal/noticias/16-defesadivulgainformacaodengue.html>>. Acesso em: 13 de março de 2018.
34. Situação Epidemiológica. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>>. Acesso em: 13 de março de 2018.
35. Casos de dengue caem 59% e óbitos 40% em 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/16191-casos-de-dengue-caem-59-e-obitos-40-em-2014>>. Acesso em: 14 de março de 2018.
36. Calvo JM. Agora é oficial: 2015 foi o ano mais quente. Disponível em: <<http://www.oeco.org.br/reportagens/agora-e-oficial-2015-foi-o-ano-mais-quente/>>. Acesso em: 15 de março de 2018.

37. O que acontece quando o vírus da DENGUE ataca nosso organismo?. Disponível em: <<http://diariodebiologia.com/2008/03/o-que-acontece-quando-o-virus-da-dengue-ataca-nosso-organismo>>. Acesso em: 15 de março de 2018.
38. Fernandez-Garcia M-D, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of **Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell**. *Cell Host Microbe*. 5(4):318–28, 2009.
39. Villordo SM, Gamarnik AV. **Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication**. *Virus Res*. 139(2):230–9, 2009.
40. Stauffer F. **Fusão de membranas como alvo para inativação viral e desenvolvimento de vacinas**. Dissertação (Doutorado em Química Biológica). Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2007.
41. Egloff M-P, Benarroch D, Selisko B, Romette J-L, Canard B. **An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization**. *EMBO J*. 21(11):2757–68, 2002.
42. Chiu W-W, Kinney RM, Dreher TW. **Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome**. *J Virol*. 79(13):8303–15, 2005.
43. Smith T. **Does Dengue virus fuse using β -barrels?** *Nat Struct Mol Biol*. 9(4):244–244, 2002.
44. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. **Prospects for a dengue virus vaccine**. *Nat Rev Microbiol*. 5(7):518–28, 2007.
45. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. **A structural perspective of the flavivirus life cycle**. *Nat Rev Microbiol*. 3(1):13–22, 2005.
46. Knipe DM, Howley PM, organizadores. **Fields Virology**. Fifth. Lippincott Williams & Wilkins. p. 3177, 2006.
47. Wengler G, Wengler G. **The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity**. *Virology*. 197(1):265–73, 1993.
48. Cui T., Sugrue R.J., Xu Q., Lee A.K.W., Chan Y.C., Fu J. **Recombinant Dengue Virus Type 1 NS3 Protein Exhibits Specific Viral RNA Binding and NTPase Activity Regulated by the NS5 Protein**. *Virology*. 246(2):409–17, 1998.
49. Henchal EA, McCown JM, Burke DS, Seguin MC, Brandt WE. **Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies**. *Am J Trop Med Hyg*. 34(1):162–9, 1985.

50. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. **The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution.** Nature. 375(6529):291–8, 1995.
51. Kielian M, Rey FA. **Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin.** Nat Rev Microbiol. 4(1):67–76, 2006.
52. Weissenhorn W, Hinz A, Gaudin Y. **Virus membrane fusion.** FEBS Lett. 581(11):2150–5, 2007.
53. Harrison SC. **Mechanism of Membrane Fusion by Viral Envelope Proteins.** In: Polly Roy, organizador. Advances in Virus Research. Academic Press. p. 231–61, 2005.
54. Cell membrane. Disponível em: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cell_membrane&oldid=756869027> . Acesso em: 13 de abril de 2018.
55. Cascio M. **Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels.** Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.1711(2):142–53, 2005.
56. Membrana Plasmática: Características e Funções. Disponível em: <<http://biologiadezblog.blogspot.com.br/p/membranaplasmatica-plasmalemaou.html>>. Acesso em: 13 de abril de 2018.
57. Gurtovenko AA, Vattulainen I. **Molecular mechanism for lipid flip-flops.** J Phys Chem B. 2007;111(48):13554–9.
58. Marsh D. **Handbook of Lipid Bilayers**, Second Edition. CRC Press. p. 1145, 2013.
59. Fosfolípidio. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Fosfol%C3%ADpido&oldid=45092039>>. Acesso em: 18 de abril de 2018.
60. Caracterização Biofísica da Membrana Plasmática da Levedura. Disponível em: <http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/5476/1/ulfc096484_tm_Francisco_Branco.pdf>. Acesso em: 18 de abril de 2018.
61. Lipid Products (POPC). Disponível em: <<https://avantilipids.com/product/850457/>>. Acesso em: 19 de abril de 2018.
62. Lipid Products POPG. Disponível em: <<https://avantilipids.com/product/840457/>>. Acesso em: 19 de abril de 2018.
63. Membrana Plasmática. Disponível em: <<https://biogeo1.files.wordpress.com/2008/04/67-resumobio1-membrana-plasmatica.pdf>>. Acesso em: 19 de abril de 2018.

64. Stillwell W. **An Introduction to Biological Membranes: From Bilayers to Rafts**. 1 edition. London ; Waltham, MA: Elsevier Scienc;. p. 378, 2013.
65. Alder BJ, Wainwright TE. **Studies in Molecular Dynamics**. I. General Method. *J Chem Phys*. 31(2):459–66, 1959.
66. Gibson JB, Goland AN, Milgram M, Vineyard GH. **Dynamics of Radiation Damage**. *Phys Rev*. 120(4):1229–53, 1960.
67. Rahman A. **Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon**. *Phys Rev*. 136(2A):A405–11, 1964.
68. Verlet L. **Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules**. *Phys Rev*. 159(1):98–103, 1967.
69. Hansen J-P, Verlet L. **Phase Transitions of the Lennard-Jones System**. *Phys Rev*. 184(1):151–61, 1969.
70. Andersen HC. **Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature**. *J Chem Phys*. 72(4):2384–93, 1980.
71. Parrinello M, Rahman A. **Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method**. *J Appl Phys*. 52(12):7182–90, 1981.
72. McCammon JA, Gelin BR, Karplus M. **Dynamics of folded proteins**. *Nature*. 267(5612):585–90, 1977.
73. Nosé S, Klein ML. **Constant pressure molecular dynamics for molecular systems**. *Mol Phys*. 50(5):1055–76, 1983.
74. Cavallari M, Ghio C, Monti S, Ferrario M, Maritan A, Carloni P. **Partially folded states of HIV-1 protease: Molecular dynamics simulations and ligand binding**. *J Mol Struct THEOCHEM*. 769(1–3):111–21, 2006.
75. Carlsson J, Boukharta L, Aqvist J. **Combining docking, molecular dynamics and the linear interaction energy method to predict binding modes and affinities for non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase**. *J Med Chem*. 51(9):2648–56, 2008.
76. Nervall M, Hanspers P, Carlsson J, Boukharta L, Aqvist J. **Predicting binding modes from free energy calculations**. *J Med Chem*. 51(9):2657–67, 2008.
77. Prates ET, Skaf MS. **Dinamica Molecular de Articaína em Membranas POPC**. Dissertação de Mestrado. 2009. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000470421>>. Acesso em: 25 de abril de 2018.

78. Vieira DS, Degrève L, Ward RJ. **Characterization of temperature dependent and substrate-binding cleft movements in *Bacillus circulans* family 11 xylanase**: A molecular dynamics investigation. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 1790(10):1301–6, 2009.
79. Mazzé FM, Fuzo CA, Degrève L, Ciancaglini P. **Use of molecular dynamics data in biochemistry courses: An amphipathy scale to determine protein α -helix transmembrane segments**. *Biochem Mol Biol Educ Bimon Publ Int Union Biochem Mol Biol.* 36(2):129–34, 2008.
80. Fuzo CA, Degreve L. **New pockets in dengue virus 2 surface identified by molecular dynamics simulation**. *J Mol Model.* 19(3):1369–77, 2013.
81. Prakash MK, Barducci A, Parrinello M. **Probing the Mechanism of pH-Induced Large-Scale Conformational Changes in Dengue Virus Envelope Protein Using Atomistic Simulations**. *Biophys J.* 99(2):588–94, 2010.
82. Namba AM, Silva VB da, Silva CHTP da. **Molecular dynamics: theory and applications in drug design**. *Eclética Quím.*;33(4):13–24, 2008.
83. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. **Scalable molecular dynamics with NAMD**. *J Comput Chem.* 26(16):1781–802, 2005.
84. Beeman D. **Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations**. *J Comput Phys.* 20(2):130–9, 1976.
85. Hockney RW, Goel SP, Eastwood JW. **Quiet high-resolution computer models of a plasma**. *J Comput Phys.* 14(2):148–58, 1974.
86. Swope WC, Andersen HC, Berens PH, Wilson KR. **A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules**: Application to small water clusters. *J Chem Phys.* 76(1):637–649, 1982.
87. Verli H. *Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Moleculares*. Bioinfo. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/bioinfo/ebook/>>. Acesso em: 26 de abril de 2018.
88. Allen MP, Tildesley DJ. **Computer Simulation of Liquids**. Oxford University Press, USA. p. 408, 1989.
89. van Gunsteren WF, Berendsen HJC. **Computer Simulation of Molecular Dynamics**: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl.* 29(9):992–1023, 1990.

90. Campa A, Dauxois T, Ruffo S. **Statistical mechanics and dynamics of solvable models with long-range interactions**. Phys Rep. 480(3–6):57–159, 2009.
91. Ewald PP. **The calculation of optical and electrostatic grid potential**. Ann Phys. (64):253, 1921.
92. Uline MJ, Corti DS. **Molecular Dynamics at Constant Pressure: Allowing the System to Control Volume Fluctuations via a “Shell” Particle**. Entropy. 15(9):3941–3969, 2013.
93. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR. **Molecular dynamics with coupling to an external bath**. J Chem Phys. 81:3684–90, 1984.
94. Nosé S. **A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods**. J Chem Phys. 81(1):511–9, 1984.
95. Hoover null. **Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions**. Phys Rev Gen Phys. 31(3):1695–7, 1985.
96. Kandt C, Ash WL, Peter Tieleman D. **Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins**. Methods. 41(4):475–88, 2007.
97. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. **VMD: visual molecular dynamics**. J Mol Graph. 14(1):33–8, 27–8, 1996.
98. Hofsäß C, Lindahl E, Edholm O. **Molecular Dynamics Simulations of Phospholipid Bilayers with Cholesterol**. Biophys J. 84(4):2192–206, 2003.
99. MEMBPLUGIN Disponível em: <<https://sourceforge.net/projects/membplugin/files/Tutorial/>>. Acesso em: 03 de maio de 2018.
100. Wolf MG, Hoefling M, Aponte-Santamaría C, Grubmüller H, Groenhof G. **g_membed: Efficient insertion of a membrane protein into an equilibrated lipid bilayer with minimal perturbation**. J Comput Chem. 31(11):2169–74, 2010.
101. Strandberg E, Özdirekcan S, Rijkers DTS, Wel PCA van der, Koeppe RE, Liskamp RMJ, et al. **Tilt Angles of Transmembrane Model Peptides in Oriented and Non-Oriented Lipid Bilayers as Determined by 2H Solid-State NMR**. Biophys J. 86(6):3709–21, 2004.
102. Muddana HS, Gullapalli RR, Manias E, Butler PJ. **Atomistic simulation of lipid and DiI dynamics in membrane bilayers under tension**. Phys Chem Chem Phys. 13(4):1368–78, 2011.

103. Guixà-González R, Rodríguez-Espigares I, Ramírez-Anguita JM, Carrió-Gaspar P, Martínez-Seara H, Giorgino T, et al. **MEMBPLUGIN**: studying membrane complexity in VMD. *Bioinformatics*. 30(10):1478–80, 2014.
104. Mackerell AD. **Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues**. *J Comput Chem*. 25(13):1584–604, 2004.
105. Giorgino T. **Computing 1-D atomic densities in macromolecular simulations**: The density profile tool for VMD. *Comput Phys Commun*. 185(1):317–22, 2014.
106. Klauda JB, Venable RM, Freites JA, O'Connor JW, Tobias DJ, Mondragon-Ramirez C, et al. **Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids**: Validation on six lipid types. *J Phys Chem B*. 114(23):7830–43, 2010.
107. Gibbons DL, Vaney M-C, Roussel A, Vigouroux A, Reilly B, Lepault J, et al. **Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus**. *Nature*. 427(6972):320–5, 2004.
108. Chipot C, Pearlman D. **Free Energy Calculations**. The Long and Winding Gilded Road. *Mol Simul*. 28(1):1–12, 2002.
109. Darve E, Rodríguez-Gómez D, Pohorille A. **Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations**. *J Chem Phys*. 128(14):144120-144120–13, 2008.
110. Comer J, Gumbart JC, Hénin J, Lelièvre T, Pohorille A, Chipot C. **The adaptive biasing force method: everything you always wanted to know but were afraid to ask**. *J Phys Chem B*. 119(3):1129–51, 2015.
111. Torrie GM, Valleau JP. **Monte Carlo free energy estimates using non-Boltzmann sampling**: Application to the sub-critical Lennard-Jones fluid. *Chem Phys Lett*. 28(4):578–81, 1974.
112. Chipot C, Pohorille A. *Free Energy Calculations - Theory and Applications in Chemistry and Biology*. Springer; 2007. Disponível em: <www.springer.com/us/book/9783540384472>. Acesso em: 07 de maio de 2018.
113. Kirkwood JG. **Statistical Mechanics of Fluid Mixtures**. *J Chem Phys*. 3(5):300–13, 1935.
114. Hénin J, Chipot C. **Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulations**. *J Chem Phys*. 121(7):2904–14, 2004.

Anexos – Artigos Publicados



Desenvolvimento de Ferramenta para a Inserção com Baixa Perturbação de Proteínas de Membrana em Bicamadas Lipídicas para Simulações de Dinâmica Molecular

ESSENTIAL JOURNAL ON PROTEIN & PEPTIDE SCIENCES




Editor-in-Chief:
Ben M. Dunn, USA

Protein & Peptide Letters publishes letters, research articles and mini reviews in all important aspects of protein and peptide research, including structural studies, advances in recombinant expression, recombinant expression, function, synthesis, enzymology, immunology, molecular modeling, drug design etc.

- Publishing High Quality Peer Reviewed Articles
- Abstracted in JCR/Science Edition, SCI, MEDLINE, EMBASE, EMBiology, Scopus and more...
- FREE Online Trials for Institutions
- FREE Sample Issues Available on Website

For Subscriptions
Contact: subscriptions@benthamscience.org

For Advertising & Free Online Trials
Contact: marketing@benthamscience.org

www.benthamscience.com


**BENTHAM
SCIENCE**

Publishers of Quality Research

Molecular Aspects of the Dengue Virus Infection Process: A Review

Protein & Letters, 2018, 25, 1-8

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 03 / 12 / 2018

Luiz Fernando da Costa Zonetti

Luiz Fernando da Costa Zonetti