

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 31/08/2020



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 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. 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 fosfolípidos 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 fosfolípidos 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

<i>Capítulo 1: Introdução</i>	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
<i>Capítulo 2: Objetivo</i>	53
2.1 – Objetivo Geral:	53
2.2 – Objetivos Específicos:	53
<i>Capítulo 3: Métodos Computacionais</i>	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
<i>Capítulo 4: Estudo Comparativo entre Charmm_gui e Script</i>	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>	<i>97</i>
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 – <i>Adaptive Biasing Force</i> (ABF).....	106

5.3.6 - Interações não Ligadas	107
5.4 – Detalhes Computacionais	108
5.5 – Resultados e Discussões	113
5.5.1 – Adaptive Biasing Force (ABF)	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 (misturas) 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).

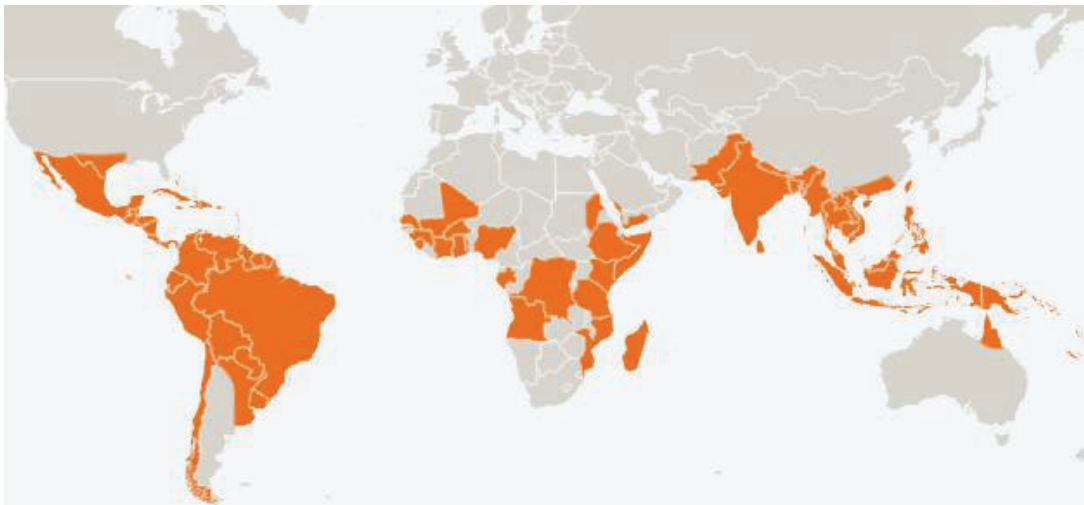


Figura 1 – Áreas de infecção do vírus da Dengue no mundo. Extraído de (32)

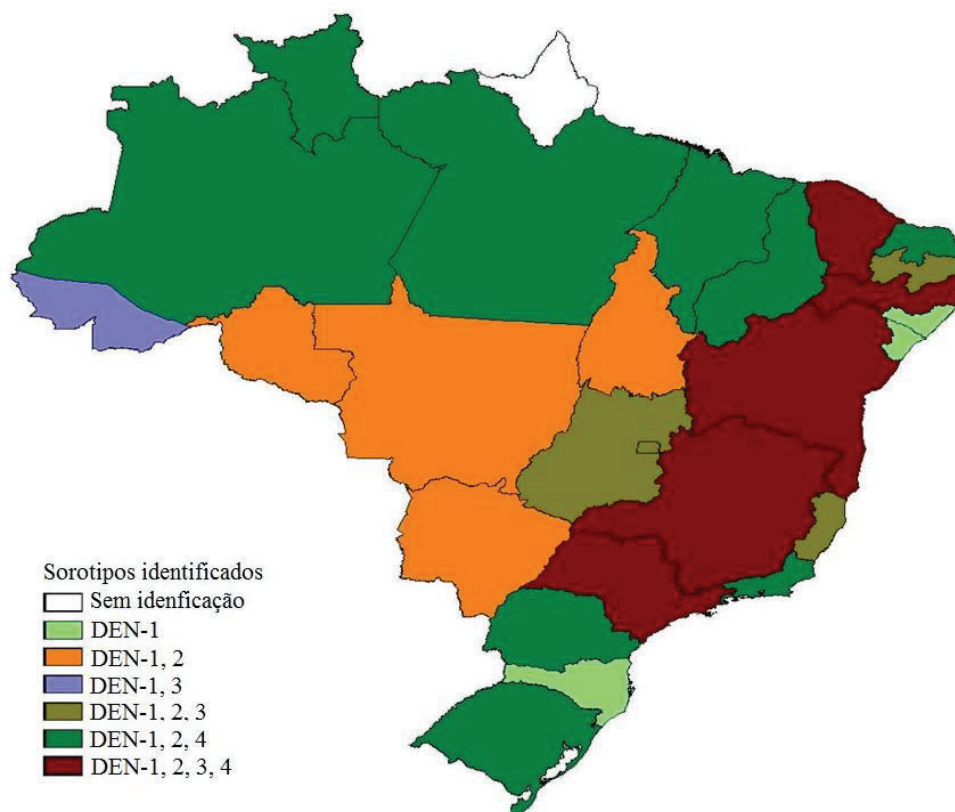


Figura 2 – Sorotipos do vírus da Dengue circulantes no Brasil por Unidade Federativa. Extraído de (33)

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).

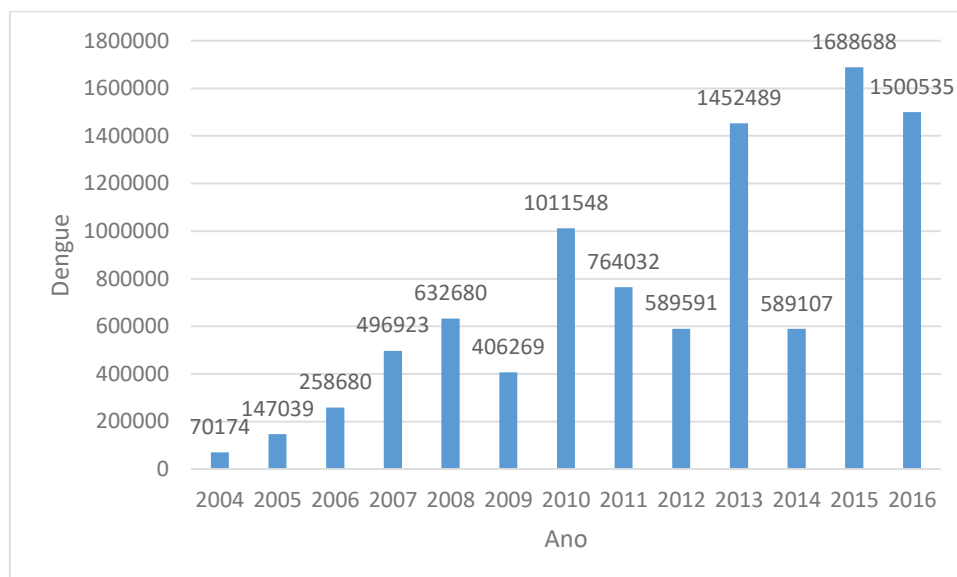


Figura 3 – Situação epidemiológica da Dengue no Brasil no período de 2004 até 2016. Adaptado de (34).

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).

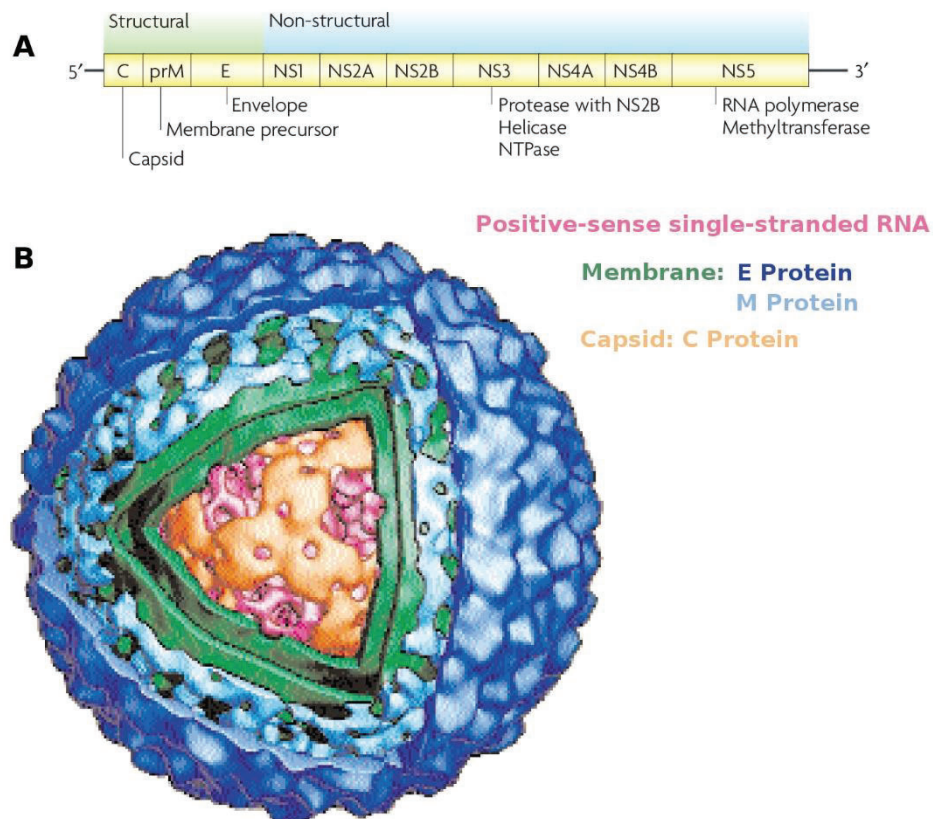


Figura 4 – Representação esquemática da estrutura do vírus da Dengue e do genoma viral. (A) Organização do genoma do vírus da Dengue. (B) Ilustração dos resultados obtidos por criomicroscopia da estrutura da partícula viral. Podem ser observadas duas camadas protéicas mais externas (azuis claro e escuro), 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.

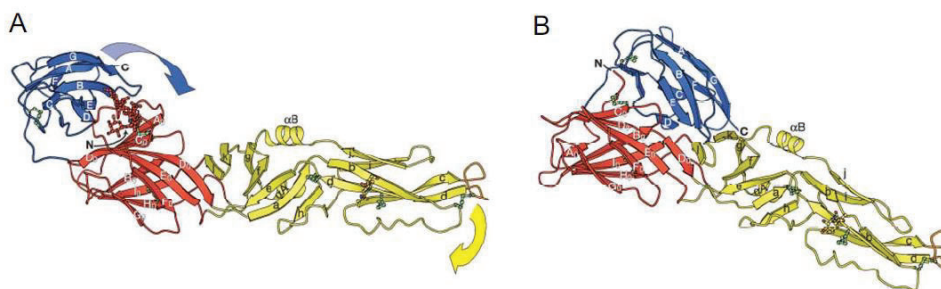


Figura 6 – Rearranjo dos domínios da proteína E durante a transição para trímero. (A) Estrutura do monômero na conformação pré-fusogênica, encontrada nos dímeros de proteína E em pH neutro. (B) Estrutura do monômero na conformação pós-fusogênica, encontrada nos trímeros após exposição ao pH ácido. Ocorre 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.

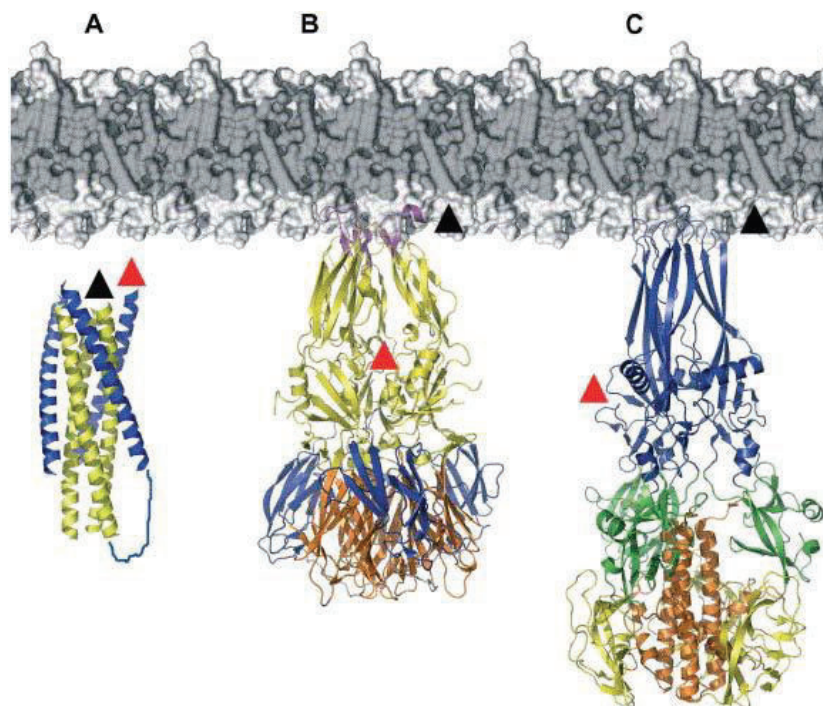


Figura 7 – Representação esquemática das estruturas das proteínas de fusão de classes I, II e III no estado conformacional pós-fusogênico. (A) Proteína gp41 do HIV-1 (classe I); (B) Proteína E dos flavivirus (classe II); (C) Glicoproteína G do VSV (classe III). Extraído de Weissenhorn (52).

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.

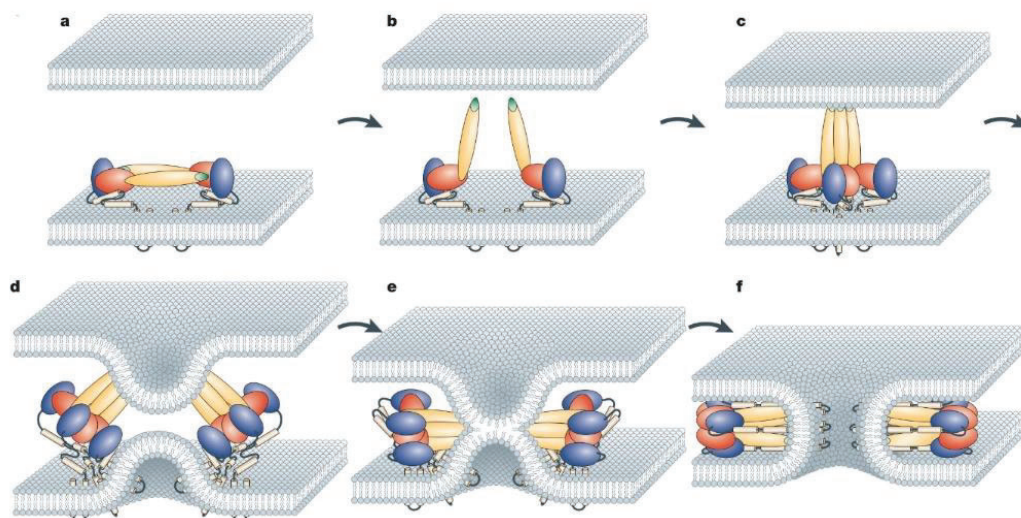


Figura 8 – Mecanismos propostos para o processo de fusão catalisado pelas glicoproteínas virais. O dímero é representado na superfície viral, com o seu peptídeo de fusão interno em verde, domínio I em vermelho, II em amarelo e III em azul (a). A proteína se liga ao receptor específico e é internalizada 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 trimeros 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.

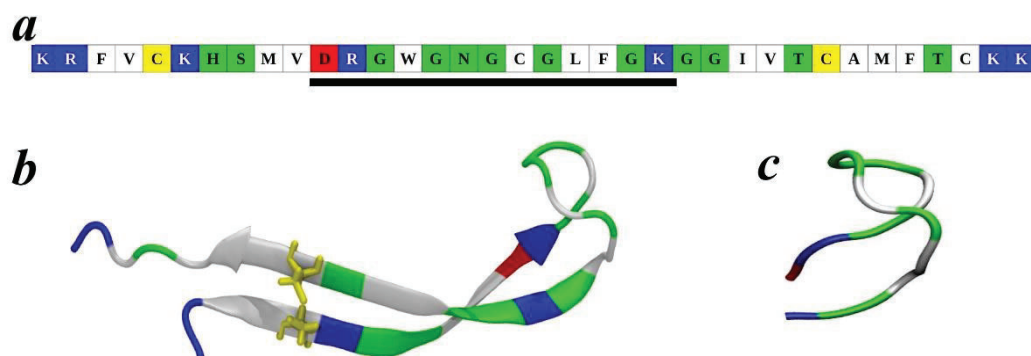


Figura 9 – Sequência dos resíduos de aminoácidos do peptídeo de fusão da proteína E do vírus da Dengue, os resíduos estão coloridos conforme sua natureza física, em azul e vermelho, resíduos com carga positiva ou negativa, respectivamente, em verde, os polares, e em branco os hidrofóbicos. (a) mostra 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.

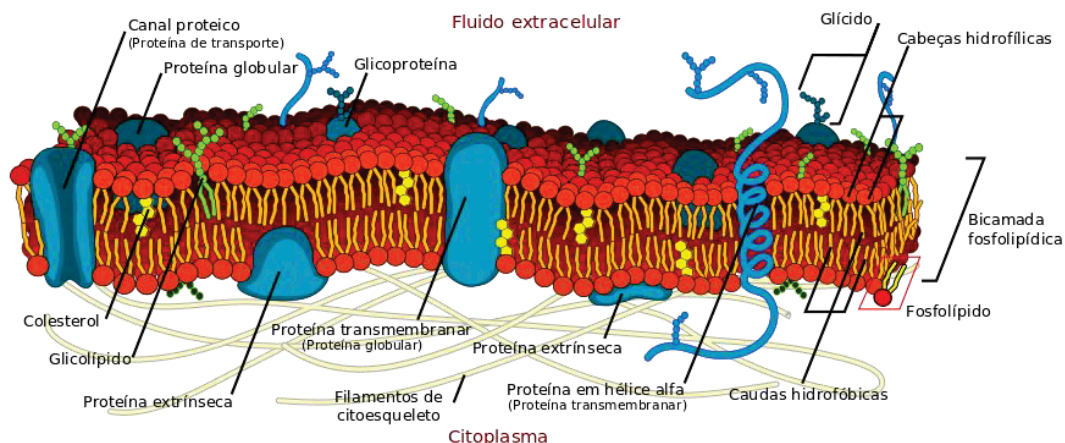


Figura 10 – Principais componentes de uma membrana celular. Extraído de (54)

A espécie predominante em uma membrana são os lipídeos, que podem ser os fosfolipídios, esfingolipídios, glicolípídeos 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).

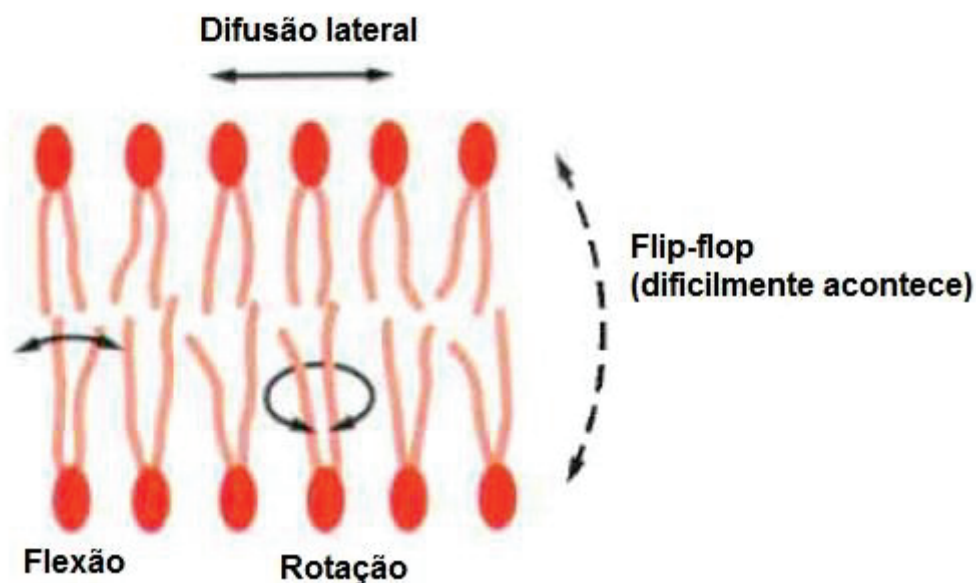


Figura 11 – Movimentos dos fosfolipídios na membrana plasmática. Extraído de (56).

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.

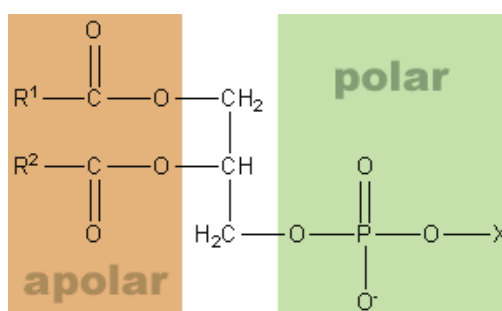


Figura 12 – Estrutura base de um fosfolipídio. Extraído de (59)

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
Hidrogénio	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 $C_{42}H_{82}NO_8P$.

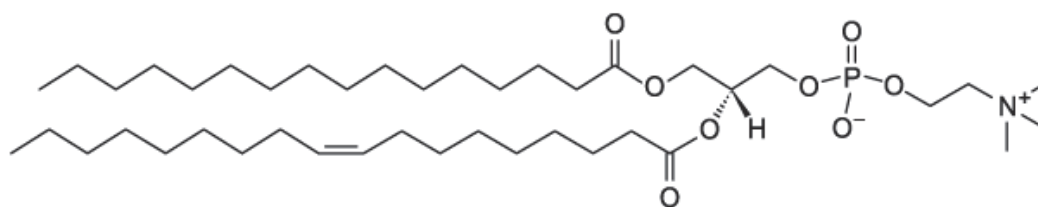


Figura 13 – Estrutura do lipídeo POPC (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina*). Extraído de (61).

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 $C_{40}H_{76}O_{10}P$.

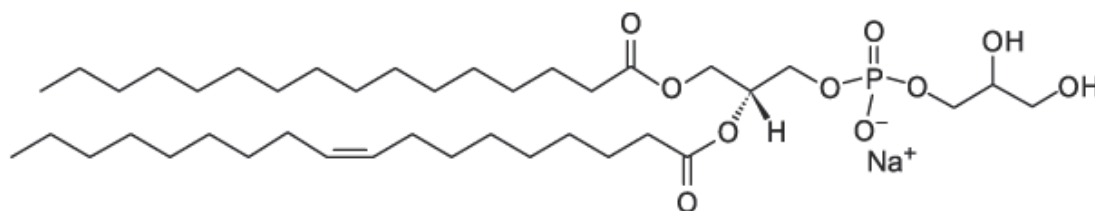


Figura 14 – Estrutura do lipídeo POPG (*Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol*). Extraído de (62).

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.

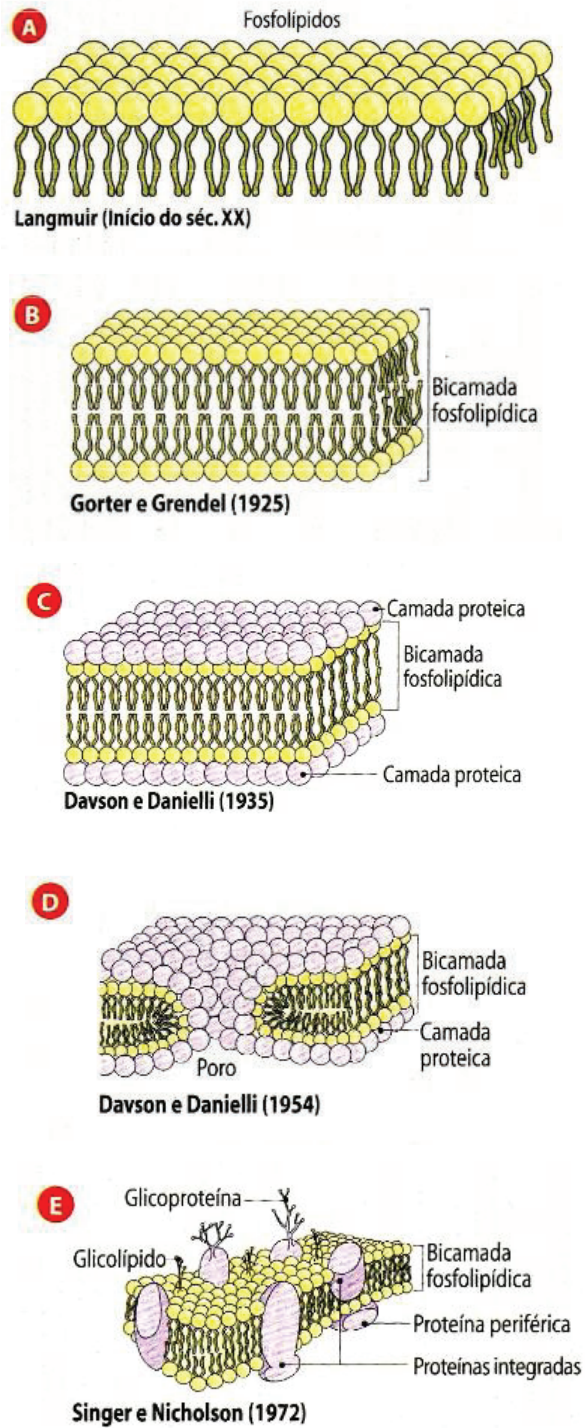


Figura 15 – Principais modelos de membranas. Extraído de (63)

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.

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 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. 2º 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.** 6º 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**. 1º 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 Science; 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 Dil 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.