

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Processos preliminares da infecção viral: estudo estereoquímico da  
proteína E do Dengue

Ricardo Oliveira dos Santos Soares

Ribeirão Preto  
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Processos preliminares da infecção viral: estudo estereoquímico da  
proteína E do Dengue

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física  
Biológica

**Orientado:** Ricardo Oliveira dos Santos  
Soares

**Orientador:** Prof. Dr. Antonio Caliri

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas em 26/07/2013. A versão original encontra-  
se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto  
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Soares, Ricardo Oliveira dos Santos

Processos preliminares da infecção viral: estudo estereoquímico da proteína E do Dengue. Ribeirão Preto, 2013.

145 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: Caliri, Antonio.

1. Dengue. 2. Proteína E. 3. Domínio III. 4. Dinâmica Molecular. 5. Estereoquímica.

Imagem da capa: *Dímero da Proteína E na bicamada lipídica*  
(autoria de Ricardo O. S. Soares)

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Ricardo Oliveira dos Santos Soares

Título do trabalho: Processos preliminares da infecção viral: estudo estereoquímico da proteína E do Dengue

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Caliri

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Aos meus pais, **Wanderley e Isabel**, por tudo,  
e a **Aline**, minha companheira que está  
sempre ao meu lado.

# Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Caliri, pela orientação deste trabalho, a qual foi caracterizada não tão somente por profissionalismo e sagacidade acadêmicos, mas também por humanismo e paixão pela investigação científica. Tal conjunto de virtudes é reflexo direto de combinação de augusta índole e erudição, o que se reflete em sua priorização na orientação à formação de um profissional ético e autossuficiente.

Aos meus colegas de laboratório, companheiros nas discussões e troca de experiências: MSc. Flávio Henrique Sant'Ana Costa, Leandro Oliveira Bortot, MSc. Renata Almeida Garcia Reis, Dr. Rodrigo Antônio Faccioli, e, em especial ao Dr. João Paulo Dal Molin, pela leitura da tese e sugestões pertinentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, pelo suporte dado à pesquisa junto à área de concentração de Química e Física Biológica.

Às Dra. Vanessa D. Menjon Müller, Dra. Ana Maria Sper Simão e a mestranda Raquel Rinaldi Russo pelas preparações virais e auxílio na extração da fração lipídica correspondente ao envelope do vírus do dengue.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (proc. 2009/08700-6), pelo financiamento de nosso projeto, através de bolsa e reserva técnica que possibilitou o atendimento de eventos internacionais e a compra de material tecnológico.

À Universidade de São Paulo, por mais uma demonstração de excelência, pelo estabelecimento de cooperação com a *Rice University* (à qual também estendo os agradecimentos), permitindo o acesso de nossa comunidade acadêmica ao supercomputador IBM® *Blue Gene/P*, de valor crítico para nossa pesquisa.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, pela utilização do *cluster SGI® Altix® XE 1300*, que constitui parte importante dos recursos computacionais disponíveis para a execução deste trabalho; estendo meu agradecimento pelo financiamento FAPESP (2008/11706-3) e o coordenador do projeto temático Prof. Dr. Léo Degève.

“Sempre que uma teoria aparentar como a única possível, tome isso como um sinal de que você não entendeu nem a teoria nem o problema o qual ela era intencionada a resolver”.

**Sir Karl Raimund Popper** (1902-1994), filósofo austro-britânico.

## RESUMO

SOARES, R.O.S. **Processos preliminares da infecção viral: estudo estereoquímico da proteína E do Dengue**. 2013. 145 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A Infecção pelo dengue afeta todas as regiões tropicais e subtropicais do globo, registra aproximadamente 390 milhões de casos por ano, e se destaca como um problema emergente de proporções crescentes, especialmente no Brasil, que atualmente responde por 60% dos casos no continente americano. Assim, ações para criar, adaptar e atender as condições para promover avanços na compreensão do processo de infecção pelo vírus em nível molecular pode ser de grande valor, tanto para enfrentar os desafios impostos pela conjuntura atual do dengue, quanto pela possibilidade de ampliar o conhecimento de mecanismos moleculares para outros vírus relacionados. Aqui, focando na proteína E do envelope do vírus do dengue, abordamos o problema da infecção viral sob os aspectos estruturais da proteína do envelope (E) quando enfrenta as condições ambientais distintas ao longo do caminho desde o trato digestivo do vetor exotérmico até a maquinaria celular do hospedeiro homeotérmico. Para este efeito, empregamos simulações de Dinâmica Molecular, avaliando e quantificando os processos de rearranjo conformacional do domínio III isolado da proteína E dos quatro sorotipos de dengue, os quais são induzidos por alterações nos parâmetros termodinâmicos intensivos (pH 3, 5 e 7, T = 298K e 310K). Além disso, a configuração quaternária pentarradial de cinco domínios III é estudada, correlacionando flexibilidades específicas das regiões de *loops* a ajuste induzido a eventuais ligantes. Nós também verificamos a estabilidade estrutural do complexo DIII com o fragmento da região ligante de antígeno de um anticorpo monoclonal (Fab 1A1D-2), bem como as forças de interação entre a interface de ligação, identificando resíduos-chave. Além disso, os eventos relacionados com a interação da proteína E (tanto na forma monomérica quanto na dimérica) com o envelope lipídico viral são minuciosamente estudados, abrindo o caminho para um possível estudo centrado na formação de trímeros da proteína E, levando à fusão de membranas e subsequente inoculação do RNA viral no citoplasma. Finalmente, alternativas são propostas para a compreensão do mecanismo de ação da fosfolipase do veneno de *Crotalus durissus terrificus* - a cascavel sul-americana, que tem se mostrado eficaz na inibição *in vitro* da infecção pelo vírus do dengue.

**Palavras-chave:** dengue, proteína E, domínio III, dinâmica molecular, ajuste induzido, envelope lipídico, fosfolipase.

## ABSTRACT

SOARES, R.O.S. **Preliminary processes of viral infection: stereochemical study of the E protein of Dengue**. 2013. 145 p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Dengue infection burdens all tropical and subtropical regions of the globe, registers approximately 390 million cases annually, and stands out as an emerging problem of increasing proportions, especially in Brazil, which currently accounts for 60% of cases in the American continent. Thus, actions to create, adapt and meet conditions to promote advances in understanding the process of virus infection at the molecular level can be of great value both to meet the challenges posed by current conjuncture of dengue, and for the possibility to extend the knowledge of the molecular mechanisms to related viruses. Here, focusing on the E protein of the dengue virus envelope, we address the problem of viral infection under stereochemical aspects of the envelope (E) protein when it undergoes the distinct environmental conditions along the pathway from the exothermic vector's digestive tract to the homeothermic host's cell machinery. To this end, we employ molecular dynamics to assess and quantify the processes of conformational rearrangement of isolated domain III of the E protein of the four serotypes of dengue, as induced by changes on intensive thermodynamic parameters (pH 3, 5 and 7; T = 298K and 310K). Further, the 5-fold quaternary configuration of five domains III is studied, correlating specific loop regions flexibilities with induced fit with eventual ligands. We also check the structural stability and interaction forces between the interface of the complex DIII and the antigen binding fragment of a monoclonal antibody (Fab 1A1D-2), identifying key residues. Additionally events related to the interaction of the E protein (both as a monomer and as a dimer) with the viral membrane are thoroughly studied, paving the way for a possible study focused on the formation of trimers of E protein, leading to membrane fusion and subsequent inoculation of viral RNA in the cytoplasm. Finally, alternatives are proposed for understanding the mechanism of action of the phospholipase from the venom of *Crotalus durissus terrificus* - the South American rattlesnake, which has proven effective *in vitro* inhibition of Dengue virus infection.

**Keywords:** dengue, E protein, domain III, molecular dynamics, induced fit, lipid envelope, phospholipase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estágios dos sintomas decorrentes da infecção pelo vírus do dengue .....	2
Figura 1.2. Filogenia dos quatro sorotipos do dengue .....	6
Figura 1.3. Ilustração da morfologia do <i>Aedes aegypti</i> .....	8
Figura 1.4. Inferência do ciclo primitivo de transmissão enzoótica dos vírus do dengue .....	9
Figura 1.5. A evolução da distribuição mundial dos sorotipos do dengue .....	11
Figura 1.6. Evolução do número de casos anuais de dengue .....	12
Figura 1.7. Casos confirmados de dengue reportados pelas mídias locais nos primeiros quatro meses do ano de 2013 .....	14
Figura 1.8. Passos iniciais da patogênese do dengue .....	16
Figura 1.9. Principais mecanismos fisiológicos pelo desenvolvimento de trombocitopenia por infecções de dengue .....	18
Figura 1.10 Esquema simplificado do ciclo viral lítico .....	19
Figura 1.11 Estrutura de fusão de cinco trimeros do vírus SFV .....	21
Figura 1.12 Representação esquemática da atual conjectura da hipótese de sequencia de eventos que levam à fusão de membranas em <i>Flavivirus</i> .....	22
Figura 1.13 Estrutura do vírus do dengue .....	29
Figura 1.14 Tradução da poliproteína do dengue e as respectivas proteínas resultantes .....	30
Figura 1.15 Estrutura da proteína E completa .....	32
Figura 2.1 Estrutura primária do DIII dos quatro sorotipos do DENV .....	58
Figura 2.2 Similaridade estrutural compartilhada entre os DIII dos quatro sorotipos do dengue .....	58
Figura 2.3 Detalhes do fragmento DENV-3/DIII logo após sua remoção da proteína E .....	60

Figura 2.4	Centralização do DIII na unidade de simulação .....	62
Figura 2.5	Valores de RMSD durante a simulação de solvatação dos modelos do DIII .....	63
Figura 2.6	Instantes relativos às simulações dos DIII dos quatro sorotipos .....	64
Figura 2.7	Valores de RMSD em função da variação de força iônica do solvente .....	67
Figura 2.8	Evolução do RMSD do DIII em função de diferentes condições de pH e temperatura .....	68
Figura 2.9	Representação do RMSF DIII em função de diferentes condições de pH e temperatura .....	72
Figura 2.10	Configurações representativas para os DIIIs dos quatro sorotipos, indicando as áreas mais flexíveis da cadeia proteica .....	73
Figura 2.11	Análise do componente principal e correlações de movimento presentes no DIII .....	74
Figura 2.12	Mapas eletrostáticos da região dos <i>loops</i> $\beta_2$ - $\beta_3$ e $\beta_3$ - $\beta_4$ de DIII em função da variação do pH .....	75
Figura 2.13	A configuração dos DIII no poro pentarradial, como encontrado na superfície nativa do DENV .....	76
Figura 2.14	Detalhes das interações eletrostáticas de DENV-2 sob a esfera da superfície interna do poro pentarradial .....	78
Figura 2.15	Superfície eletrostática das as estruturas isoladas do DENV-2/DIII, exibindo a distribuição de cargas de acordo com a condição de temperatura e pH .....	80
Figura 2.16	Complexo DIII/Fab 1A1D-2 em representação de <i>cartoon</i> e em superfície eletrostática .....	81
Figura 2.17	Evolução do RMSD e do raio de giração para o complexo DIII/Fab 1A1D-2 .....	82
Figura 2.18	Representação da superfície eletrostática para o complexo DIII/Fab 1A1D-2 .....	83
Figura 2.17	Detalhe das interações não covalentes na face de contato entre DIII/Fab 1A1D-2 no equilíbrio .....	83

Figura 3.1	Modo de inserção da região da âncora na membrana viral .....	91
Figura 3.2	Passos para a construção do região de haste e transmembrana da proteína E do DENV-2 .....	92
Figura 3.3	O peptídeo âncora e haste do DENV-2 inserido na bicamada de POPC .....	96
Figura 3.4	Os padrões de espessura média dos últimos 10 ns das simulações nos <i>ensembles</i> NPA <sub>z</sub> T à esquerda e NP <sub>γ</sub> T à direita .....	100
Figura 3.5	Evolução da área ocupada por cada lipídio na superfície da bicamada .....	101
Figura 3.6	Parâmetros de ordem dos componentes da membrana mista, (cadeias palmitoil e oleoil) no <i>ensemble</i> NPA <sub>z</sub> T e NP <sub>γ</sub> T .....	102
Figura 3.7	Perfil da densidade eletrônica resultante das simulações da membrana mista nos <i>ensembles</i> NPA <sub>z</sub> T e NP <sub>γ</sub> T .....	103
Figura 3.8	Padrão de multiplicação das coordenadas na membrana RER (10x10) .....	105
Figura 3.9	Parâmetro de ordem de deutério ( $ S_{cd} $ ) das cadeias Palmitoil e Oleoil dos lipídios componentes da membrana mista RER (100x100) .....	106
Figura 3.10	Densidade eletrônica dos últimos 10 ns de simulação da membrana RER .....	106
Figura 3.11	Método utilizado pelo <i>g_membed</i> para a inserção de uma proteína na bicamada .....	108
Figura 3.12	Visão geral do estágio inicial da simulação do monômero da proteína E inserido na membrana RER .....	110
Figura 3.13	Análises (RMSD e raio de giração) sobre o comportamento estrutural da Proteína E e seus componentes individuais .....	111

Figura 3.14 Ligações de hidrogênio estabelecidas intracadeia, indicando a manutenção de estruturas secundárias no monômero da proteína E .....	111
Figura 3.15 Três momentos representativos distintos identificados na simulação do monômero da proteína E na membrana RER .....	114
Figura 3.16 O RMSD correspondente às simulações de pHs diferentes e com uma análise separada para cada cadeia .....	116
Figura 3.17 Resultados relevantes quanto à simulação dimérica .....	117
Figura 3.18 O Raio de Giração correspondente às simulações de pHs diferentes e com uma análise separada para cada cadeia .....	118
Figura 3.19 O número de ligações de hidrogênio estabelecidos intracadeia correspondentes às simulações de pHs diferentes e com uma análise separada para cada cadeia .....	119
Figura 3.20 O perfil eletrostático em pH7 da visão superior (externa) do dímero da proteína E e da região de haste e âncora .....	120
Figura 3.21 Reconstrução de microscopia eletrônica por criogenia das partículas virais imatura e madura do dengue .....	123
Figura 3.22 Os pontos de acesso à bicamada lipídica na superfície da partícula viral madura .....	124
Figura 3.23 Os pontos de acesso à bicamada lipídica na superfície da partícula viral imatura .....	125
Figura 3.24 Sistema montado para a simulação de controle sobre o comportamento do complexo PLA <sub>2</sub> /5DIIIs quando os componentes entram em contato .....	126
Figura 3.25 Análise comparativa estrutural entre as simulações de controle e com aplicação de força .....	128
Figura 3.26 Momentos da passagem forçada da PLA <sub>2</sub> através do poro pentarradial .....	128

Figura A.1. Separação de fases após os passos de ultra centrifugação e adição de tampão e solventes orgânicos.....	137
Figura B.1. Resultado dos experimentos virucida direto, indicando as eficiências de diferentes composições sobre inibição na formação de PFUs .....	138
Figura B.2. Resultado dos experimentos de ensaios virucida indicando as concentrações indicando efetivas para a inibição viral pela PLA2-CB .....	139

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.1. Lista atualizada de candidatos à vacina contra o dengue .....	26
Tabela 1.2. GROMACS vs número de núcleos de processamento.....	40
Tabela 2.1. Composição atômica e estado de ionização dos resíduos nos sistemas das simulações iniciais.....	62
Tabela 2.2. Composição atômica e estado de ionização dos resíduos nos sistemas das simulações com variações termodinâmicas .....	66

**LISTA DE EQUAÇÕES**

Equação 1.1 .....	35
Equação 1.2 .....	35
Equação 1.3 .....	35
Equação 1.4 .....	35
Equação 1.5 .....	35
Equação 1.6 .....	35
Equação 1.7 .....	36
Equação 2.1 .....	63
Equação 2.2 .....	69
Equação 2.3 .....	70
Equação 2.4 .....	71
Equação 3.1 .....	98
Equação 3.2 .....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\beta_2$ - $\beta_3$	<i>Loop</i> localizado entre as folhas $\beta_2$ e $\beta_3$
$\beta_4$ - $\beta_5$	<i>Loop</i> localizado entre as folhas $\beta_4$ e $\beta_5$
ADE	<i>Antibody Dependent Enhancement</i>
CHARMM	<i>Chemistry at HARvard Molecular Mechanics</i>
CHOL	Colesterol
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell - Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DENV	Vírus do dengue
DENV-1 a 4	Vírus do dengue, sorotipos 1 a 4
DI	Domínio I da proteína E
DII	Domínio II da proteína E
DIII	Domínio III da proteína E
Fab 1A1D-2	Anticorpo monoclonal ( <i>Fragment Antigen Binding</i> ) 1A1D-2
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
fs	Femtosegundo
GROMACS	<i>Groningen Machine of Chemical Simulation</i>
IFN $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM $\gamma$	Imunoglobulina M
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
LF	<i>Loop</i> de fusão
nm	Nanômetro
NPA $_z$ T	<i>Ensemble</i> isotérmico-isobárico por ajuste semi-isotrópico, apenas dos eixos $xy$ da caixa de simulação
NPT	<i>Ensemble</i> isotérmico-isobárico
NP $\gamma$ T	<i>Ensemble</i> isotérmico-isobárico com controle da tensão superficial da interface
ns	Nanossegundo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPLS-AA	<i>Optimized Potentials For Liquid Simulations</i>
PDB	<i>Brookhaven Protein Data Bank</i>
PLA $_2$	Fosfolipase A2
POPC	1-Palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina

POPE	1-Palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-etanolamina
POPS	1-Palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serina
ps	picossegundo
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i>
sE	<i>Soluble E protein</i> (DI+DII+DIII da proteína E)
SFV	<i>Semliki Forest Virus</i>
SPC	<i>Simple Point Charge</i>
TBE	Encefalite do carrapato ( <i>Tick borne encephalitis</i> )
THP-1	linhagem celular monocítica
TIP3P	<i>Three-site Transferrable Intermolecular Potential</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
WHO	<i>World Health Organization</i> Organização Mundial de Saúde

**LISTA DE SÍMBOLOS**

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\theta$	Teta
$\tau$	Tau
®	Marca Registrada

## SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	viii
Lista de equações	ix
Lista de abreviaturas e siglas	x
Lista de símbolos	xii

### CAPÍTULO 1 – Introdução: a doença, o vírus e os instrumentos de estudo adotados

1.1 – O dengue: caracterização e sintomas	1
1.1.1 – Origem e filogenia	4
1.1.2 – A emergência do dengue: aspectos históricos ao contexto atual	9
1.1.3 – Patogênese e ciclo viral	14
1.1.4 – Primeira linha de proteção: a vacina	24
1.1.5 – Segunda linha de proteção: medicamentos antivirais	27
1.2 – A constituição do vírus: síntese e estrutura	29
1.2.1 – Aspectos estruturais fundamentais da proteína E	31
1.3 – A ferramenta de análise: Dinâmica Molecular	33
1.3.1 – O conjunto de potenciais: Campo de Força	34
1.3.2 – Campos de força utilizados: OPLS-AA e CHARMM36	36
1.3.3 – GROMACS - Groningen Machine for Chemical Simulations	38
1.3.4 – O custo computacional da DM: <i>hardware</i>	38
1.4 - Referências	41

### CAPÍTULO 2 – O domínio III da proteína E: propriedades estereoquímicas e seu potencial imunogênico

2.1 – Verificação da estabilidade estrutural do fragmento isolado do DIII	57
2.1.1 – Dinâmica molecular: parâmetros das simulações	59
2.2 – Variações ambientais de parâmetros termodinâmicos intensivos	65
2.2.1 – Resposta estrutural do DIII à variação de força iônica, temperatura e pH	66
2.2.2 – Áreas de maior flexibilidade: <i>loops</i> $\beta_2\text{--}\beta_3$ e $\beta_4\text{--}\beta_5$	73
2.2.3 – Configuração quaternária do DIII: as regiões dos <i>loops</i> $\beta_2\text{--}\beta_3$ e $\beta_4\text{--}\beta_5$ como sítio imunogênico	75
2.3 – Interação do DENV-2/DIII com o anticorpo Fab 1A1D-2	80
2.4 – Referências	84

### CAPÍTULO 3 – Interação membrana – proteína E: implicações no processo de infecção

3.1 – Interação proteína-membrana	89
3.1.1 – Desenvolvimento de um modelo completo da Proteína E	90

3.1.1.1 – Estudo de metodologias e parâmetros para simulação de sistemas com interface (bicamadas) .....	92
3.1.1.2 – Estudo preliminar da âncora em bicamada simples .....	94
3.1.2 – Um modelo de membrana mais realista .....	95
3.1.2.1 – Montagem e equilíbrio termodinâmico do modelo mimético de membrana RER .....	97
3.1.2.2 – <i>Ensembles</i> NPA <sub>2</sub> T e NP <sub>γ</sub> T .....	99
3.1.2.3 – Adaptação da bicamada lipídica mista às dimensões da Proteína E .....	104
3.1.3 – Inserção da Proteína E na bicamada lipídica .....	107
3.1.3.1 – Estudo do monômero da Proteína E na bicamada lipídica .....	109
3.1.3.2 – Estudo do dímero da Proteína E na bicamada lipídica .....	115
3.2 – Inibição da infecção viral pela Fosfolipase A <sub>2</sub> de <i>Crotalus durissus terrificus</i> : estudo teórico e experimental .....	121
3.3 – Referências .....	130
<b>EPÍLOGO</b> .....	135
<b>APÊNDICE</b>	
A – Determinação dos componentes da bicamada lipídica do vírus do Dengue por espectrometria de massa .....	138
B – Principais resultados experimentais sobre o efeito da PLA2 sobre o vírus do Dengue .....	141
<b>ÍNDICE REMISSIVO</b> .....	143

# Capítulo 1

## Introdução: a doença, o vírus e os instrumentos de estudo adotados

Prezando a clareza na apresentação de nosso trabalho, dividimos esta tese em três capítulos. Neste primeiro capítulo, desenvolvemos uma ambientação ao tema central, introduzindo por revisão bibliográfica a temática do dengue sob aspectos clínicos, fisio/imunológicos, estruturais, geográficos, filogenéticos e socioeconômicos. No segundo capítulo, descrevemos nossos resultados *in silico* envolvendo os efeitos de variações de parâmetros termodinâmicos intensivos\* sobre regiões particulares da estrutural viral, bem como a interação destas com um anticorpo monoclonal efetivo na inibição de três sorotipos. No terceiro capítulo, apresentamos o desenvolvimento de um modelo original completo da proteína E, o qual tem seu comportamento estrutural estudado quando inserido (em forma monomérica e dimérica) em uma bicamada lipídica desenvolvida com o intuito de mimetizar àquela presente na partícula viral. Ainda no capítulo três, descrevemos um estudo em colaboração, onde investigamos propriedades moleculares estruturais que possam explicar o mecanismo de inibição viral observado.

### 1.1 – O dengue: caracterização e sintomas

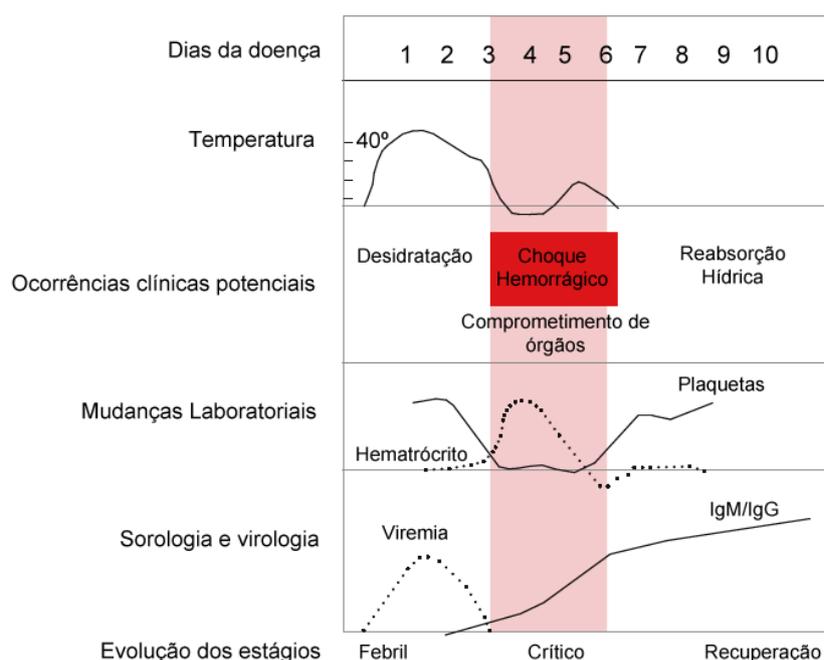
O dengue<sup>† 1,2</sup> é uma enfermidade emergente causada por quatro sorotipos (DENV-1, 2, 3 e 4) do vírus de mesmo nome, membro do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, família esta

---

\* Uma variável é chamada de intensiva quando ela é independente da massa do sistema, como a pressão, temperatura e viscosidade. A razão de duas variáveis extensivas gera uma variável intensiva, como densidade (produto da massa pelo volume).

† A etimologia da palavra “dengue” é proveniente da língua espanhola. O termo “dengue” existe antes mesmo de sua atribuição como denominação da doença, aparecendo no *Diccionario de la Lengua Castellana*, da Real Academia Espanhola (1732), com dois significados: (1) melindre feminino, manha; (2) uma faixa de tecido utilizada como adorno no vestuário feminino.<sup>1</sup> O termo só veio a ser utilizado como denominação da

contendo aproximadamente 70 membros<sup>3</sup> e se constitui por vírus cujas estruturas são de relativas pequenas dimensões (de 40 a 60 nm de diâmetro). Em aspectos gerais, a infecção causada pelo vírus do dengue (detalhes na seção 1.1.3) é devida a uma única entidade com diferentes manifestações clínicas as quais podem variar de acordo com a severidade da infecção, idade e condições gerais do paciente.<sup>4</sup> O quadro pode variar desde casos assintomáticos até manifestações mais graves como níveis de descontrole homeostático com aumento de permeabilidade capilar, causando hemorragia severa e choque hipovolêmico. Em casos não fatais, a evolução típica dos sintomas é iniciada com um período relativamente curto de febre (de 2 a 3 dias), com concomitância ao aumento da viremia e à diminuição de plaquetas<sup>‡</sup>, o que pode causar o choque hemorrágico no paciente. Por volta do sexto dia há um aumento significativo das imunoglobulinas IgM e IgG, com a restauração progressiva do nível plaquetário, do hematócrito (proporção de hemácias por volume sanguíneo), o estabelecimento da reabsorção hídrica e, finalmente, a recuperação (**Fig. 1.1**).



**Figura 1.1.** Evolução generalizada dos estágios dos sintomas decorrentes da infecção pelo vírus do dengue. Modificado de WHO (2009) e Yip et al. (2006).<sup>4,6</sup>

enfermidade por volta do século XIX, e provavelmente foi associado ao fato de eventualmente a infecção por dengue gerar apenas uma leve indisposição no paciente, que se dizia similar a um melindre.<sup>2</sup> Trata-se de um substantivo originalmente masculino, no entanto, pela popularização da forma feminina “a dengue”, atualmente a dualidade de gênero é aceita pela maioria dos dicionários oficiais da língua portuguesa. Neste trabalho, tratamos a enfermidade no gênero masculino, seguindo a tradição médica brasileira.

<sup>‡</sup> A típica diminuição da contagem de plaquetas no dengue se deve principalmente ao ataque viral aos megacariócitos (células produtoras de plaquetas na medula óssea), bem como trombocitopenia imune.<sup>5</sup>

Por causa da notável variação do grau de agressividade da infecção pelo dengue, desde 1997 a Organização Mundial de Saúde (OMS) vem formalizando as classificações para os diferentes níveis de manifestações sintomáticas da doença, com o intuito de auxiliar a avaliação clínica e manter padronizados os relatos na literatura. O primeiro sistema de classificação (oficialmente instituído em 1997 e amplamente utilizado até hoje) consiste na divisão da manifestação clínica da doença em febre indiferenciada, dengue clássica (*dengue fever* - DF) e febre hemorrágica do dengue (*Dengue hemorrhagic fever* – DHF). Dentro deste sistema, a febre hemorrágica (DHF) é subdividida em quatro subgrupos,<sup>7</sup> de acordo com a gravidade crescente, de I a IV<sup>§</sup>:

- Grau I: a prova do laço é positiva (contagem de petéquias na pele);
- Grau II: manifestações hemorrágicas espontâneas na pele;
- Grau III: colapso circulatório manifestado por pulso fraco e rápido, hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação;
- Grau IV: choque profundo com pressão arterial e pulso indetectáveis.

No entanto, grupos associados à OMS vinham indicando a necessidade de uma reformulação com maior detalhamento desse sistema se mostrava necessária, e seria essencial à identificação correta e mais rápida do estágio dos casos clínicos, contribuindo, portanto, ao aumento da eficiência do tratamento sintomático do dengue. Desta forma, em 2009, a OMS publicou as novas guias de classificação do dengue, simplificando a classificação geral em dois grandes grupos: **dengue não severa** e **dengue severa**. Essa divisão principal é importante para aperfeiçoar o processo de triagem e agilizar o tratamento aos casos mais severos. Nos casos de dengue não severa, considera-se dengue sem sinais de alerta (menor probabilidade de evolução ao quadro severo) e dengue com sinais de alerta (maior probabilidade de evolução ao quadro severo). A identificação da infecção em áreas endêmicas é dada pela presença do estado febril em concomitância com pelo menos **dois** dos seguintes sintomas:

- náusea/vômitos;
- erupções cutâneas;
- dores difusas e/ou localizadas;
- teste do laço positivo;
- leucopenia (redução de leucócitos no sangue);
- qualquer sinal de alerta.

---

<sup>§</sup> Os grupos III e IV englobam o estado da síndrome do choque do dengue (*Dengue shock syndrome* - DSS).

Os seguintes sintomas são agrupados em um conjunto específico, e são chamados de sinais de alerta, pois são aqueles que exigem maior nível de observação e intervenção médica, pela maior probabilidade de desenvolvimento para um quadro severo:

- dor ou sensibilidade abdominal;
- vômito persistente;
- derrames cavitários (ascite, derrame pleural e derrame pericárdico)
- sangramento das mucosas;
- letargia, inquietação;
- hepatomegalia;
- aumento no hematócrito com rápida queda na contagem de plaquetas (trombocitopenia).

Finalmente, o dengue severo é caracterizado pela sucessão:

1. extravasamento plasmático severo;
2. hemorragia grave e,
3. Comprometimento severo de órgãos (fígado, coração, baço etc).

A gravidade da doença e sua ampla distribuição impõem um dos maiores fardos sociais e econômicos entre todas as patologias virais transmitidas por mosquitos,<sup>8</sup> e é encontrada nativamente em regiões tropicais e subtropicais do globo. Até a data, não há tratamento específico para o estágio pós-infecção (salvo tratamento sintomático), adicionalmente, embora a prevenção por vacinação se afirme encontrar-se em um estágio avançado, seu efeito prático é elusivo.<sup>9</sup>

### 1.1.1 – Origem e filogenia

O dengue, como todo representante da família *Flaviviridae*, é caracterizado pelo modo de transmissão como um arbovírus\*\*, se relacionando em parentesco, filogeneticamente próximo a outros membros de seu mesmo gênero, *Flavivirus*, os quais também apresentam alta importância socioeconômica: são os membros responsáveis por moléstias como a febre amarela, a febre do Nilo ocidental, a encefalite transmitida por carrapato (TBE), a encefalite japonesa, entre outras. Todas as análises moleculares publicadas sobre o vírus do dengue até o ano de 2003 mostram que os quatro sorotipos provavelmente emergiram por alopatria

---

\*\* Arbovírus: (origem: *arthropod borne virus*) é um vírus que tem como vetor um artrópode.

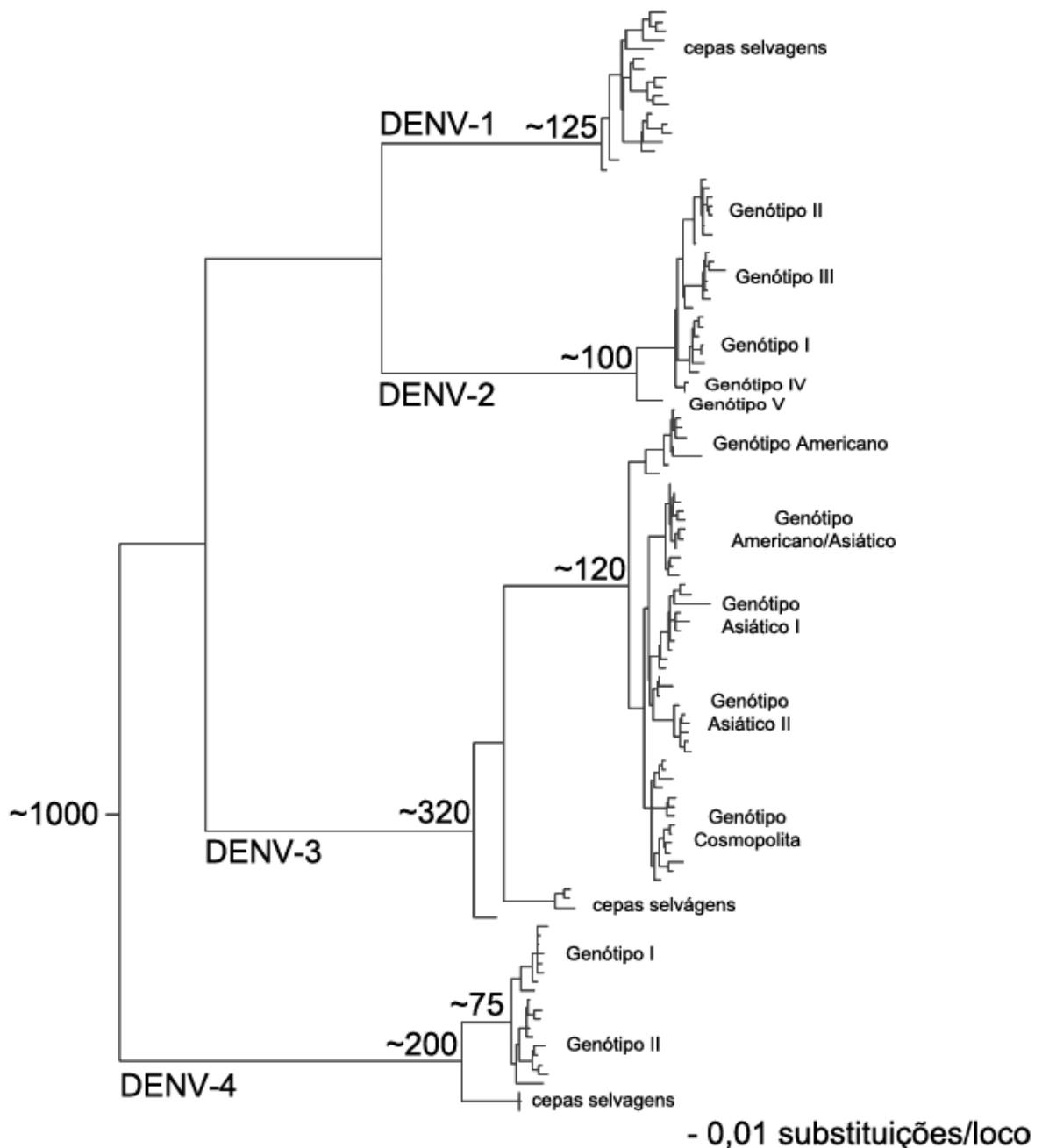
(independentemente em regiões geográficas isoladas) e compartilham tal grau de distinção filogenética, o qual se assemelha àquele estabelecido entre diferentes “espécies” do *genus Flavivirus*.<sup>10,11</sup> Isso significa que, apesar dos quatro sorotipos do dengue ainda se incluírem em um mesmo grupo como vírus do dengue, a semelhança de parentesco entre eles é menor do que se esperaria neste contexto “intraespecífico”. Tal diferença pode ser vista diretamente refletida na dificuldade presente no desenvolvimento de vacinas tetravalentes, o qual é discutido na seção 1.1.4. Através do sequenciamento e alinhamento genético, no entanto, é possível a identificação de relação de parentesco entre os sorotipos e seus diversos genótipos, bem como a determinação aproximada da origem e emergência do ancestral do vírus do dengue pela técnica de análise da taxa de substituição molecular (relógio molecular).

Pela análise filogenética por máxima parcimônia dos 120 genes codificadores da proteína do envelope (**proteína E**) de diversos genótipos, Holmes e Twiddy (2003)<sup>11</sup> propuseram que a primeira ramificação entre o ancestral direto do dengue e outros vírus proximamente relacionados ocorreu há aproximadamente mil anos; muito provavelmente na Ásia (**Fig. 1.2**).

Após essa segregação inicial, o primeiro ramo a se separar dos demais foi aquele que eventualmente originou o grupo de genótipos que hoje chamamos de sorotipo DENV-4. O grupo complementar, por sua vez, sofre mais uma divisão, originando primeiramente o grupo que forma o sorotipo DENV-2, enquanto o restante sofre uma divisão posterior em DENV-1 e DENV-3<sup>††</sup>. Com a elucidação da sequência de divergências filogenéticas entre os sorotipos e a análise da taxa de substituição molecular, Holmes e Twiddy (2003)<sup>11</sup> também determinaram o tempo aproximado da origem das linhagens infectantes humanas *atuais*, ou seja a transposição de linhagens selvagens por transmissão-interespecífica: DENV-1, há 125 anos; DENV-2, há 320 anos; DENV-3, há 100 anos; e DENV-4, há 75 anos (**Fig. 1.2**).

---

<sup>††</sup> Em análise similar, utilizando apenas as sequências proteicas do domínio III da proteína E dos quatro sorotipos do dengue, obtivemos a mesma sucessão de segregações filogenéticas, confirmando o resultado de Holmes e Twiddy,<sup>11</sup> bem como demonstrando a alta especificidade sorológica que esta região da proteína E oferece (Cap. 2).



**Figura 1.2.** Dendrograma representando o parentesco evolutivo dos quatro sorotipos do dengue, bem como seus genótipos e cepas selvagens. Os períodos aproximados de divergências entre ramos basais e àqueles que originaram os grupos atuais são identificados pelos números à base de cada ramificação. As linhas horizontais são desenhadas proporcionalmente (guia à direita, abaixo), de acordo com o grau de substituições por loco gênico, indicando o grau de separação entre os clados. Modificado de Holmes e Twiddy (2003).<sup>11</sup>

Uma série de remanescentes basais de linhagens pertencentes a genótipos silváticos em cada sorotipo aponta diretamente como uma forte evidência de que Dengue era originalmente um vírus que tinha exclusivamente primatas como hospedeiros, e que a transmissão-interespecífica para humanos aconteceu de forma independente em todos os sorotipos.<sup>11</sup> Desta forma, acredita-se que o Dengue teve origem em um ciclo silvático-

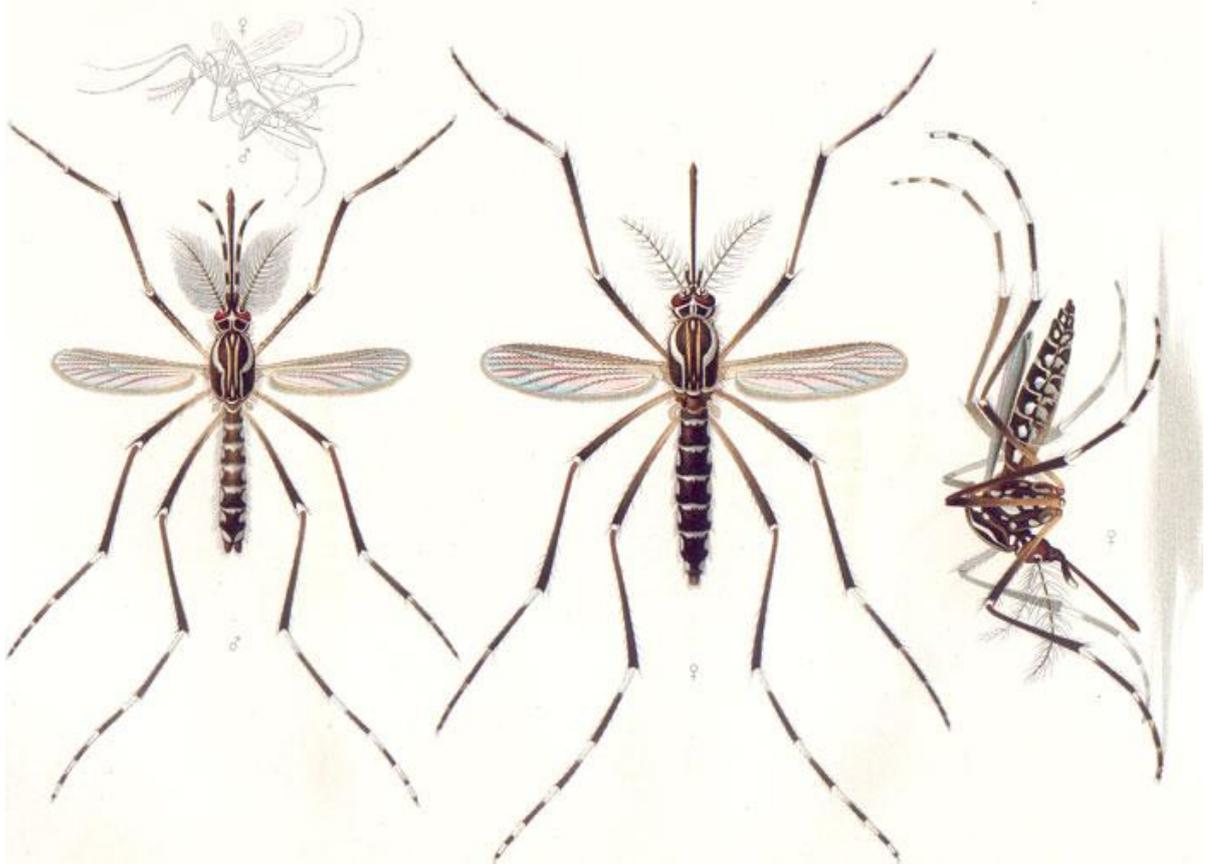
enzoótico,<sup>3</sup> onde os reservatórios naturais dos vírus são primatas selvagens, e que ocorre até os dias atuais. Neste ciclo infere-se que os subgêneros de *Aedes* responsáveis pela transmissão do vírus são, na África, *Stegomyia* e *Diceromyia*; na Ásia o *Stegomyia* e *Finlaya*. Com a expansão humana a áreas cada vez mais isoladas, mosquitos selvagens deste ciclo, antes isolados de populações humanas, vieram a entrar cada vez mais em contato com comunidades rurais, eventualmente inserindo o vírus e criando um novo ciclo: rural-epidêmico. Neste ciclo, as populações humanas não são grandes o suficiente para estabelecerem um perfil endêmico do dengue, havendo, portanto, apenas a ocorrência de surtos pontuais e de relativa rápida duração. Como os surtos são isolados, neste nível, as diferentes variedades do vírus que originaram as cepas atuais do Dengue foram submetidas à seleção natural promovida pela forte pressão imunológica da espécie recém infectada (humanos), o que resultou na extinção de várias cepas de Dengue ao longo da história.<sup>11</sup> Infere-se que as espécies responsáveis pela transmissão no ciclo rural-epidêmico são o *Aedes aegypti* (**Fig. 1.3**), *A. albopictus*, *A. polynesiensis* e possivelmente *A. mediovittatus* (**Fig. 1.4**). A migração de indivíduos infectados no ciclo rural-epidêmico para centros urbanos de alta densidade populacional criou um ambiente ideal ao estabelecimento de um cenário endêmico-epidêmico, onde a quantidade de indivíduos passíveis de se tornarem portadores permite a manutenção da transmissão horizontal sustentada, apoiada pela alta resistência climática do vetor e seus ovos, o que permite a suplementação do ciclo endêmico pela transmissão vertical contínua.<sup>‡‡13</sup>

O ciclo urbano consiste na transmissão viral pela picada de fêmeas<sup>§§</sup> infectadas dos himenópteros *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) para seu hospedeiro humano, este que por sua vez tornar-se-á também um reservatório, podendo assim contaminar outros vetores (**Fig. 1.4**). Todas as espécies citadas oferecem condições apropriadas (em graus diferentes) à encubação do vírus em sua latência, um resultado de um processo coevolutivo, no entanto *A. aegypti* é àquela que apresenta maior distribuição geográfica e, portanto, maior significância socioeconômica.

---

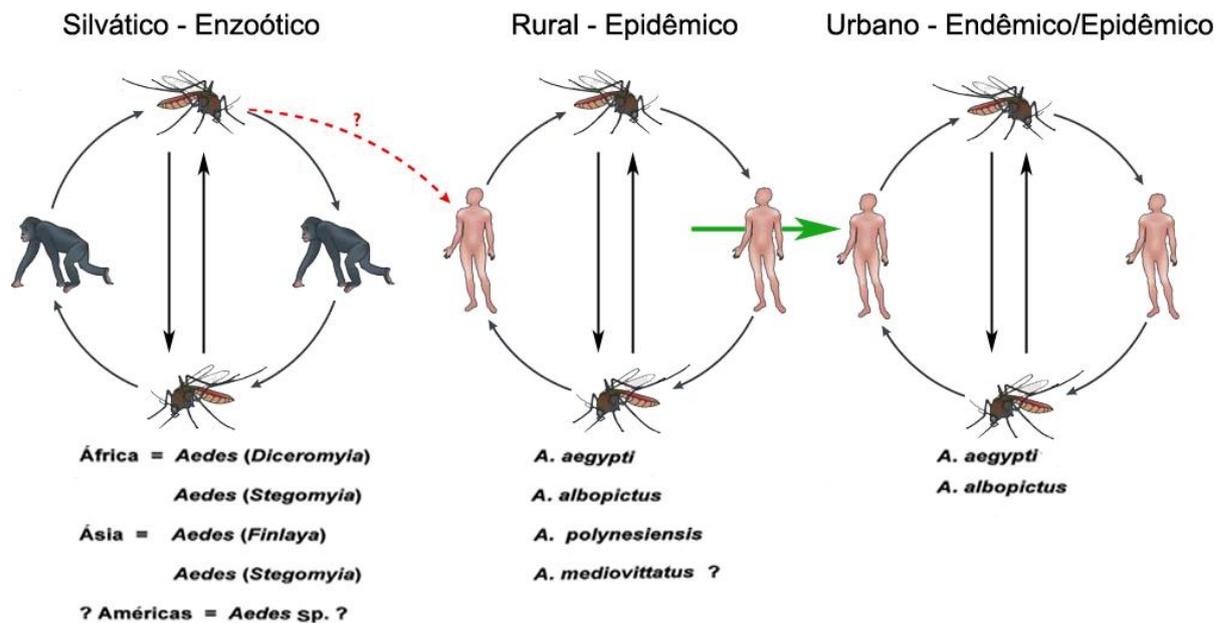
<sup>‡‡</sup> A transmissão vertical é a passagem do vírus diretamente entre os mosquitos, por descendência ou venereamente, e é essencial para a manutenção do reservatório viral na em áreas urbanas endêmicas.<sup>12</sup>

<sup>§§</sup> Apenas as fêmeas transmitem o vírus, pois apenas elas têm o hábito alimentar predominantemente hematófago, enquanto os machos alimentam-se exclusivamente de seiva. Em estudo recente, determinou-se que uma população local de *Aedes aegypti* e *A. albopictus* se alimentam quase que exclusivamente de sangue humano (>97%, e 100% respectivamente), tendo pouca preferência também a cães, suínos, felinos e galináceos.<sup>14</sup>



**Figura 1.3.** Ilustração histórica descritiva da morfologia do macho (à esquerda) e da fêmea (ao meio em posição dorsal e à direita em vista lateral esquerda) do *Aedes aegypti*, pelo naturalista e zoólogo Suiço-Brasileiro Dr. Emil August Göldi. Modificado de Göldi (1905).<sup>15</sup>

Há apenas algumas centenas de anos, o dengue era primariamente uma doença selvagem, a qual causava apenas surtos esporádicos em seres humanos, e lembrando o padrão mostrado ainda hoje pelo vírus da febre amarela.<sup>11</sup> A migração do ciclo exclusivamente silvático-enzootico (selvagem, com infecção apenas de primatas não humanos) e rural-epidêmico para o ciclo urbano-epidêmico e depois endêmico, só foi possível com o aumento populacional urbano, e crescentes níveis de densidade populacional, bem como a facilidade moderna de deslocamento de grande quantidade de pessoas pelos continentes.



**Figura 1.4.** Inferência do ciclo primitivo de transmissão enzoótica dos vírus do dengue, e sua migração às áreas urbanas. As setas circulares representam o ciclo de infecção mosquito/primata ou mosquito/humano; setas verticais antiparalelas indicam transmissão vertical diretamente entre os mosquitos; a seta pontilhada vermelha indica o sentido de propagação viral do ciclo silvático ao rural; finalmente, a seta verde indica a migração de indivíduos infectados em áreas endêmicas para grandes centros urbanos, possibilitando o estabelecimento de um quadro endêmico/epidêmico. A lista dos mosquitos *Aedes* em cada ciclo representa sua respectiva participação no mesmo. Primatas basais na Ásia e África, bem como representativos humanos de áreas rurais e urbanas são ilustrados. Modificado de Gubler e Kuno (1997) e Whitehead et al. (2007).<sup>3,16</sup>

Este padrão de transmissão viral de origem selvagem para grandes áreas urbanas é recorrente, e de forma alguma exclusiva do dengue. A mais recente ameaça do subgrupo do vírus influenza, H7N9, é um exemplo, de vírus que originalmente circulava apenas entre populações não humanas (aves), e vem preocupando a sociedade pela confirmação de infecções humanas na região de Shanghai – China – com consequências severas (64 casos, 14 mortes – de 1 de fevereiro a 16 de abril de 2013). No entanto, em meio a muitas incertezas, acredita-se que a propagação deste subgrupo permaneça restrita à região, já que no momento ainda não se tem evidências suficientes de transmissão sustentada entre humanos.<sup>17</sup>

### 1.1.2 – A emergência do Dengue: aspectos históricos ao contexto atual

Os primeiros relatos de uma grande epidemia de uma doença possivelmente tida como o Dengue ocorreu simultaneamente na Ásia, África e América do Norte, em 1779 e 1780, com

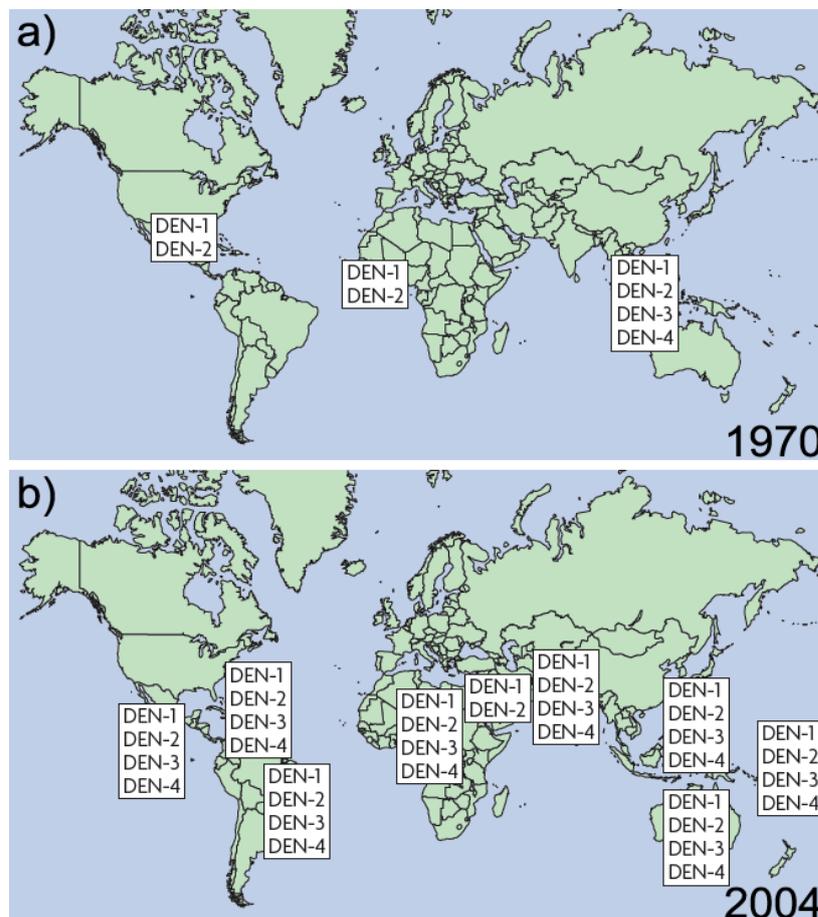
casos isolados registrados ainda mais anteriormente.<sup>3,18</sup> No entanto, o primeiro caso documentado de uma doença com sintomas similares ao dengue (vírus ancestral proximamente relacionado) era chamada pelos chineses de “veneno da água”, e se inferia que esta seria de alguma forma conectada com insetos voadores com o ciclo de vida associado à água. Esta primeira descrição histórica consta da enciclopédia chinesa de sintomas e remédios, datada durante a dinastia Chin entre os anos de 265 a 420 D.C., e com mais duas edições formais nos anos de 610 (dinastia Tang) e 992 (dinastia Sung do norte).<sup>19\*\*\*</sup> Em referência a períodos posteriores, em 1635, nas Índias Ocidentais Francesas, e em 1699, no Panamá, há indícios de que surtos de uma doença também poderia ter sido dengue.<sup>18</sup> De acordo com este padrão, é bem provável que o dengue, ou alguma doença similar (provavelmente flaviviróide) já era bem distribuída geograficamente antes do século XVIII, que foi quando a primeira pandemia conhecida de dengue começou, com relatos de surtos em Jacarta (Indonésia) e Cairo (Egito), em 1779, e no estado americano da Filadélfia, em 1780.<sup>22</sup> A partir desse ponto, até por volta da década de 1940, o dengue tem surgido em epidemias relativamente infrequentes, já que turistas suscetíveis contraíam a doença algum tempo após sua chegada em grandes centros urbanos tropicais, mesmo em períodos inter endêmicos (sem transmissão aparente da doença), o que sugere o estabelecimento de endemicidade do vírus.

A Segunda Guerra Mundial (1939-1945) foi responsável por um grande fluxo humano no globo, e foi nesse cenário que a ruptura ecológica de ambientes naturais do sudeste asiático e pacífico se desenrolou, criando condições ideais para a amplificação da transmissão de doenças transmitidas por mosquitos. Foi nesse cenário que uma pandemia se estabeleceu com transmissão epidêmica aumentada e emergência de hiperendemicidade [co-circulação de mais de um sorotipo de vírus – **Fig. 1.5(a)**], principalmente no sudeste asiático. Data de 1953/1954 o primeiro relato do surto de uma então nova modalidade de dengue mais agressivo, o dengue hemorrágico, ocorridos primeiramente em Manila (Filipinas) e logo e seguida em Bangcoc (Tailândia).<sup>3,16,23,24</sup> No fim da década de 1990, já se registrava uma distribuição global dos mosquitos *A. aegypti* na região dos trópicos.<sup>3</sup> Sendo endêmico na região tropical e subtropical do globo, em uma faixa onde vive aproximadamente metade da população mundial, o dengue é a arbovirose mais difundida no mundo desde meados da década de 1990.<sup>25</sup>

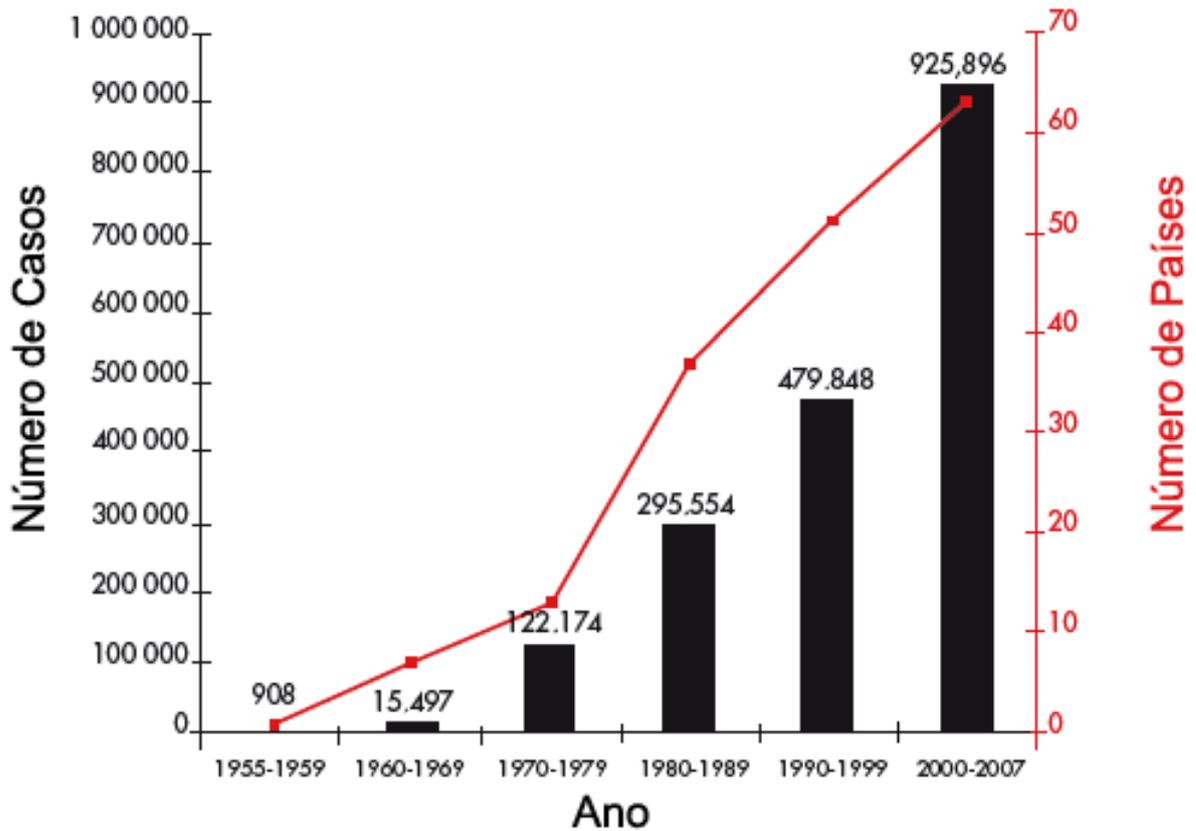
---

\*\*\* apud Gubler (1997, 1998)<sup>20,21</sup>

Atualmente o dengue vem sendo considerado como um problema de crescentes proporções<sup>4</sup> (Figs. 1.5 (b), 1.6). Destacando-se como uma preocupação crescente na mídia nas últimas décadas, o dengue se enquadra como uma preocupação sazonal, com estatísticas que se intensificam a cada ciclo anual. Atualmente se estima que aproximadamente 390 milhões de pessoas sejam infectadas anualmente no mundo todo, sendo que, entre estas, 96 milhões de pessoas manifestam os sintomas.<sup>26</sup> A incidência destes casos se restringe na atualidade apenas às faixas tropicais e subtropicais do globo, região que cobre uma área de risco que comporta uma população de quase 3 bilhões de pessoas. Recentes estatísticas, dados de infecções em 2010,<sup>26</sup> indicam a seguinte distribuição de infecções pelo globo: a alta densidade populacional da Ásia, fator chave para a rápida disseminação, coloca o continente na liderança absoluta com 70% das infecções mundiais (somente a Índia isolada contribui com 34%); a África apresenta 16% dos casos estimados; as Américas contribuem com 14% (somente o Brasil e México com aproximadamente 7%); os demais continentes, Oceania, Europa e Antártida não apresentam índices significativos.



**Figura 1.5.** A evolução da distribuição mundial dos sorotipos do dengue em 1997 (a) e em 2004 (b) mostra a recente emergência da doença. Modificado de Guzman et al. (2010).<sup>27</sup>



**Figura 1.6.** Evolução do número de casos anuais de dengue e respectivo número de países registrando a doença. As barras pretas indicam a média anual do número de casos de dengue clássico e dengue hemorrágico registrados pela Organização Mundial de Saúde; a linha vermelha segue o número de países que registram casos de infecção pelo vírus do dengue, ao longo dos anos de 1955-2007. Modificado de WHO (2009).<sup>4</sup>

Atualmente, o Brasil vem se destacando nos casos confirmados de dengue: no país que detém mais de 60% de todos os casos nas Américas,<sup>4</sup> e em apenas três meses neste ano (1º de janeiro a 23 de março) já foram registrados 635.161 casos e confirmadas 108 mortes<sup>†††</sup> (42% dos quais são idosos), contra 167.279 casos e 117 mortes no mesmo período do ano passado (dados do Ministério da Saúde). Obviamente tal aumento vertiginoso do número de pessoas infectadas<sup>†††</sup> é decorrente de uma combinação de vários fatores difíceis de serem isolados, no entanto estão entre eles o aumento da temperatura média global, e a recente introdução de um novo sorotipo. O aquecimento global gera condições ótimas tanto para a reprodução do vetor *Aedes aegypti* em suas áreas nativas, quanto sua disseminação para áreas antes frias demais para sua fisiologia,<sup>29</sup> causando um aumento no alcance a populações antes isoladas de contato

<sup>†††</sup> Em Ribeirão Preto (SP), foram registrados em 343 casos em janeiro, 1465 em fevereiro e 3409 em março.<sup>28</sup>

<sup>†††</sup> Observa-se que mesmo com o aumento das infecções, o número de mortes vem diminuindo, graças à percepção da importância da identificação e tratamento sintomático precoce e do melhor preparo dos serviços públicos de saúde em relação ao dengue.

com o vírus. Ademais, a introdução de um sorotipo invasor (e provavelmente genótipos invasores) não encontra indivíduos pré-imunizados, sendo eles possivelmente suscetíveis, causando, portanto, a rápida propagação da epidemia em um número maior de pessoas. Na história recente, o Brasil vinha sendo afligido apenas pelos sorotipos 1,2 e 3, fato que mudou com a chegada do DENV-4 em 2011. A chegada deste sorotipo já era alvo de preocupações, o que vem sendo confirmado agora no grande surto de 2013, visto que esse é o sorotipo dominante, detectado em mais de 50% dos casos (dados do Ministério da Saúde e *BBC News*).<sup>30</sup>

Um levantamento recente pelo site *healthmap.org*<sup>§§§</sup> mostra que a América Latina, em especial o Brasil e o México, é campeã no registro de pacientes infectados com qualquer um dos quatro sorotipos de Dengue em 2013 (janeiro a abril de 2013 – **Fig. 1.7**). No entanto, além da gravidade da situação, temos que nos atentar para o fato de que o mapa mostra apenas casos reportados na mídia e nos órgãos públicos, ou seja, não leva em consideração pessoas infectadas e não registradas. Isso é notável principalmente na relativa ausência de marcadores na região da Índia, sendo que o país respondeu por aproximadamente 34% do total mundial de infecções por dengue ocorridas em 2010.<sup>26</sup> Dentro deste contexto, o *Healthmap.org* se mostra como uma ferramenta bastante eficiente para a vigilância em tempo real do aparecimento de casos recentes, os quais de outra maneira só seriam contabilizados meses depois do início de um possível novo surto. É válido ressaltar que a eficiência deste tipo de registro é diretamente dependente da qualidade/quantidade de informações que as mídias locais disponibilizam *online*.

---

§§§ O site *healthmap.com* é uma iniciativa de um grupo de pesquisadores, epidemiologistas e desenvolvedores de software do Hospital Infantil de Boston (<http://www.childrenshospital.org>), e se trata de um serviço gratuito de vigilância *online* para a contabilização em tempo real de registros de surtos de doenças infecto-contagiosas divulgadas nos meios de mídia e órgãos públicos.



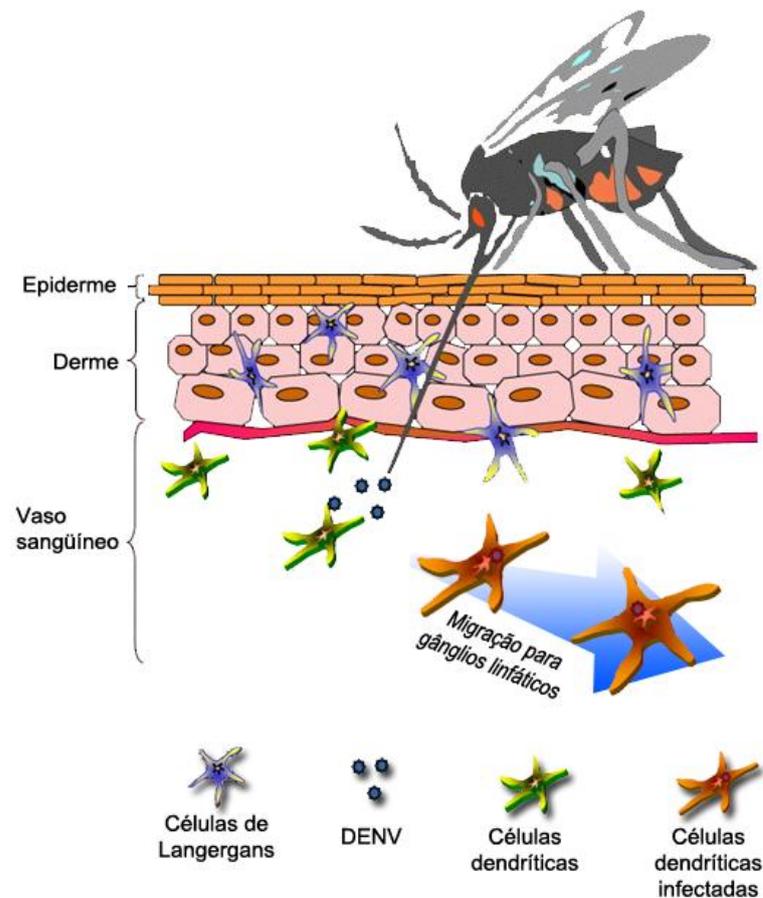
**Figura 1.7.** A situação de registros de casos confirmados de dengue reportados pelas mídias locais nos primeiros quatro meses do ano de 2013, segundo compilação feita pelo site <http://www.healthmap.org/dengue>. Cada alfinete vermelho significa um registro local de infecção por dengue; as esferas vermelhas (um pouco maiores que os alfinetes) significam registros em nível nacional.

### 1.1.3 – Patogênese e ciclo viral

Nesta seção tratamos sobre os participantes celulares dos principais mecanismos que levam à doença, ou seja, descrevemos aspectos gerais da patogênese do dengue clássico. O humano infectado só se torna transmissor do dengue durante o período de viremia (com duração média de três dias), o qual se estabelece após o contato inicial e um período de incubação de cinco a sete dias, enquanto que o mosquito necessita de um período extrínseco de incubação de oito a doze dias antes de poder transmitir o vírus.<sup>31</sup> Sendo atendidas estas condições, a transmissão horizontal do dengue começa com o mosquito entrando em contato com o vírus através de sangue contaminado do hospedeiro humano e sendo infectado pelas partículas virais em seu trato epitelial do intestino médio. Em seguida, o vírus migra para a hemocele, infectando as glândulas salivares. Após período de incubação (replicação viral), os vírus estão disponíveis para serem secretados na saliva em concentração suficiente para a propagação sustentada ao hospedeiro, pela infecção do mesmo no ato da inserção da probóscide do mosquito através da pele até o vaso sanguíneo do hospedeiro.<sup>32</sup> O mosquito, que pode portar outros arbovírus sem a interferência entre suas virulências,<sup>33</sup> então identifica sua presa primeiro visualmente (por movimento) e em seguida por detecção de calor corporal e, através de células olfativas nas antenas, a detecção de aromas expelidos, como o do gás carbônico e principalmente o gás de L-ácido láctico.<sup>34,35</sup> Uma vez identificado um vaso sanguíneo periférico na pele do humano, o inseto insere sua probóscide até o alcance do fluxo sanguíneo, sugando uma pequena

quantidade de sangue (porém relativamente grande para o inseto), ao mesmo tempo em que ocorre a liberação de saliva portadora de partículas virais maduras (**Fig. 1.8**). Até recentemente acreditava-se que o a replicação viral acontecia primariamente em macrófagos, fagócitos ou monócitos,<sup>36-38</sup> no entanto, Navarro-Sánchez (2005) e colaboradores<sup>39</sup> afirmam que células-alvo em potencial para a infecção do dengue deveria se tratar das células dendríticas dermais/intersticiais localizadas no epitélio, mais especificamente as células de Langerhans (**Fig. 1.8**). A função normal das células dendríticas é associada à resposta inicial a antígenos, capturando-os, processando-os em peptídeos imunogênicos, emigração para o paracortex dos gânglios linfáticos e apresentando os peptídeos aos linfócitos T.<sup>40</sup> Para a efetiva adsorção às células dendríticas, o vírus depende de interações com a lectina tipo C, **DC-SIGN** (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*). A manose, um carboidrato presente na superfície da proteína do envelope do Dengue, tem sido identificada como fator importante na interação com **DC-SIGN** nos passos iniciais do processo que precede a fusão das membranas.<sup>41</sup> Evidências que favorecem esta proposição vêm do fato de que anticorpos anti-**DC-SIGN** inibem a infecção do vírus do Dengue em células dendríticas humanas *in vitro*.<sup>39,42,43</sup>

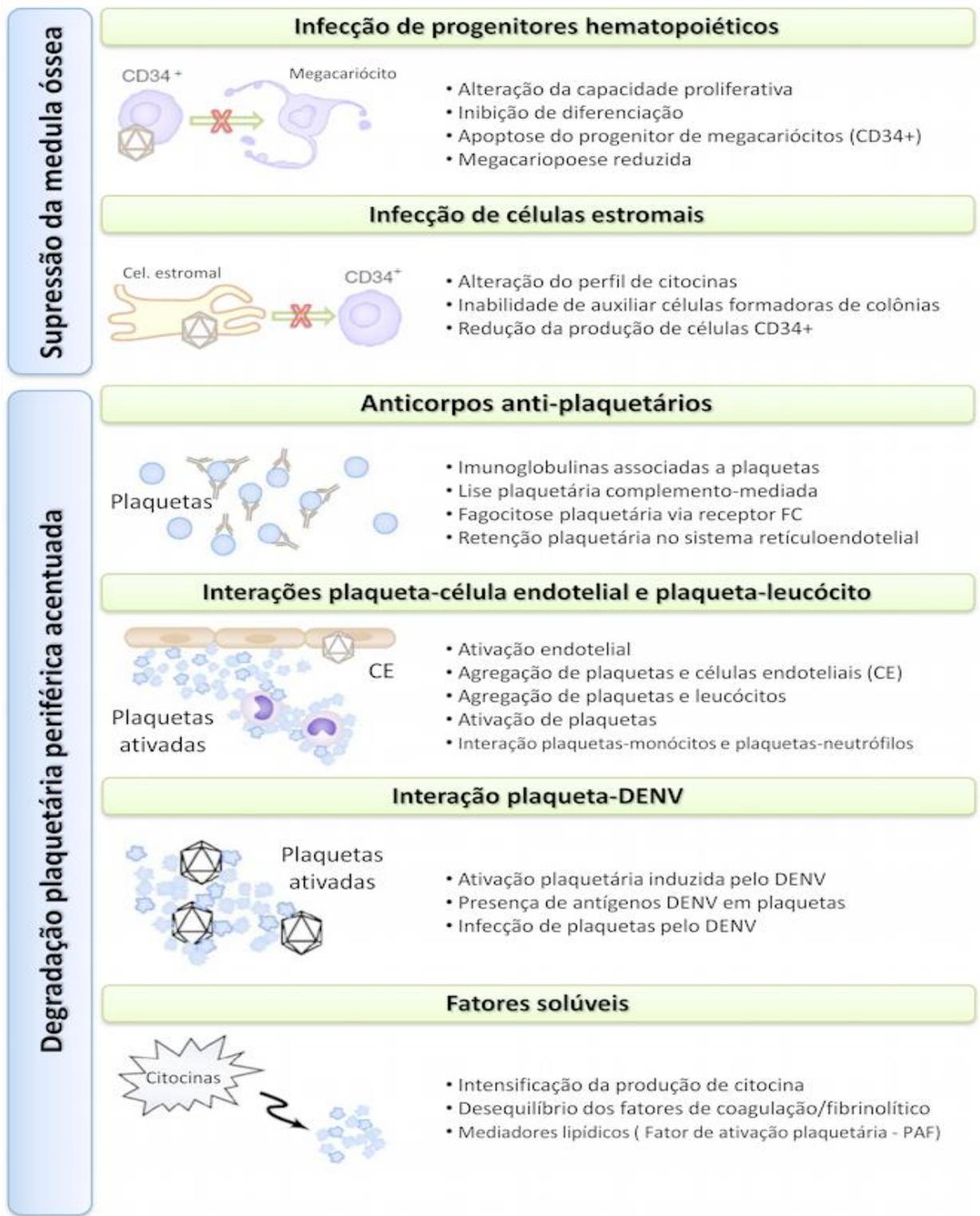
Após a infecção das células dendríticas, estas procedem para seu caminho usual, até gânglios linfáticos regionais (**Fig. 1.8**), onde passará pelo processo de maturação. Após este período de maturação, os vírus são propagados pelo corpo do paciente, atingindo os mais variados órgãos, concentrando a infecção principalmente nos órgãos linfoides, pulmões e fígado. Especificamente, o Dengue também ataca os megacariócitos, células presentes na medula óssea, responsáveis pela produção de plaquetas, causando o sintoma característico da trombocitopenia e levando ao extravasamento de plasma capilar (hemorragia).<sup>44</sup>



**Figura 1.8.** Esquema dos passos iniciais simplificados da patogênese do dengue, desde a inoculação viral ao hospedeiro do vírus pelo vetor *Aedes* sp., até a migração das células dendríticas infectadas para os gânglios linfáticos. Modificado de Service (1992).<sup>31</sup>

O vírus do Dengue já foi isolado em leucócitos, monócitos, células dendríticas, progenitores de megacariócitos (CD34+), plaquetas circulantes entre outros.<sup>45-48</sup> Essa distribuição específica sugere que a trombocitopenia ocorre por uma série de fatores, sendo os quais divididos em duas frentes, uma constituindo a supressão da medula óssea pela interação com megacariócitos, e a outra na acentuada degradação plaquetária direta.<sup>49</sup> A supressão da produção de megacariócitos (megacariopose) pode ocorrer tanto diretamente, pela infecção viral com supressão dos precursores hematopoiéticos (provavelmente por indução apoptótica),<sup>50</sup> ou indiretamente, pela infecção das células estromais (células reticulares adventícias e células dendríticas da medula óssea), as quais sofrerão alteração no perfil de produção de citocinas,<sup>49</sup> essenciais para a maturação das células progenitoras de megacariócitos. Todavia, como descrito, o ataque às plaquetas não ocorre apenas indiretamente pela inibição de sua produção, mas também diretamente, pela destruição das unidades circundantes, principalmente por (Fig. 1.9):

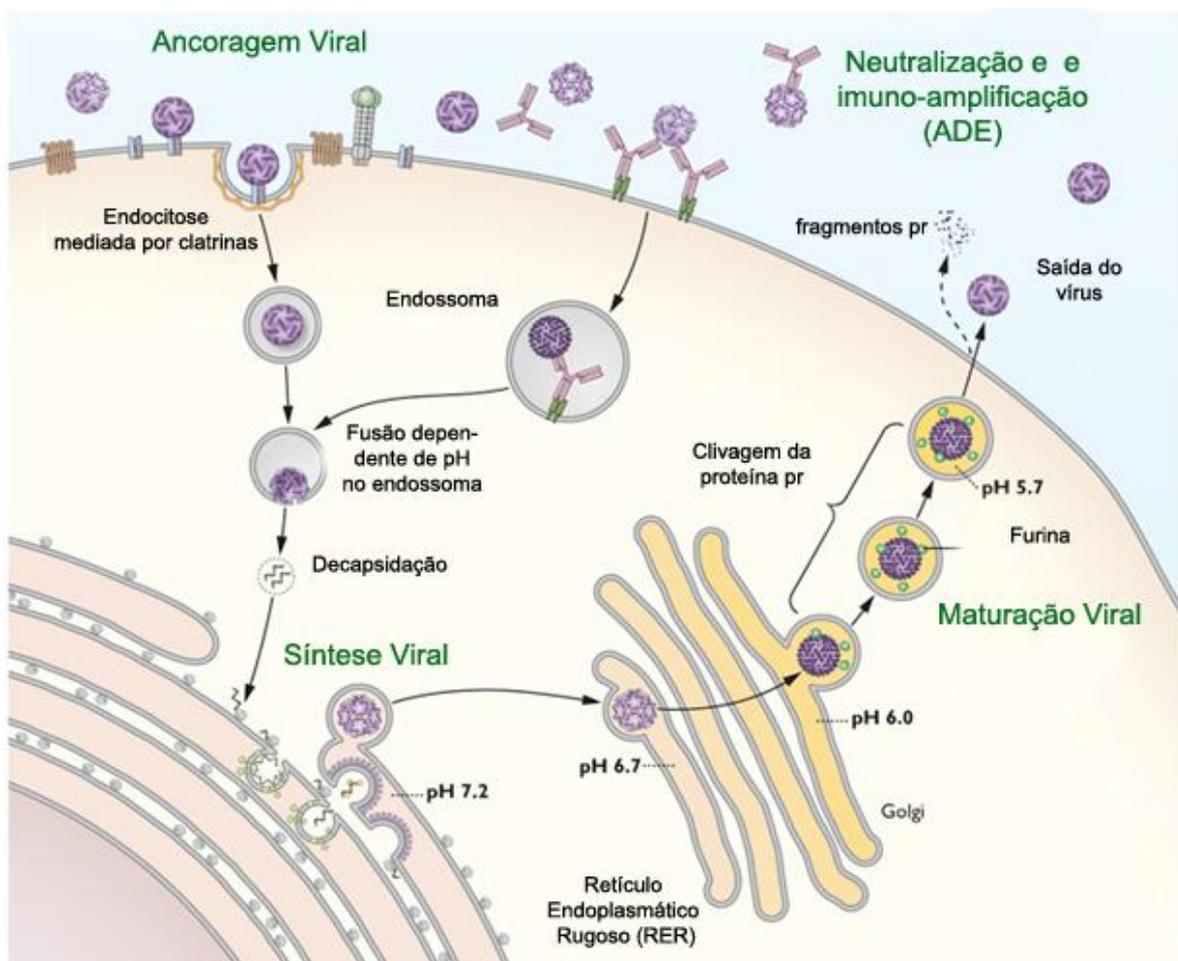
- reação cruzada de anticorpos anti-NS1, com fator de coagulação fibrinogênio e plaquetas<sup>51</sup> bem como reação cruzada de anticorpos anti-C, anti-pR/M e anti-E com trombinas, plasminogênio e ativador tecidual de plasminogênio;<sup>52</sup> isso é demonstrado em amostras de soro retiradas de pacientes de casos severos de dengue, que mostraram maior quantidade de IgM (classe de anticorpos presentes no desencadeamento de *clearance* de plaquetas)<sup>53</sup> circundante do que pacientes que foram aflitos com a versão clássica mais branda da doença;<sup>54</sup>
- reação cruzada envolvendo células endoteliais ativadas (CEAs),<sup>55</sup> além do que as quais também passaram a mostrar elevada expressão de E-seletina que, por sua vez, promove aderência anormal de plaquetas às CEAs<sup>56</sup> com consequente agregação de plaquetas-monócitos em humanos<sup>57</sup> e plaquetas-neutrófilos em outros primatas;<sup>45</sup>
- o soro de pacientes DENV positivo causa a atenuação na agregação de plaquetas (e portanto seu fator de coagulação) pela inibição da proteína dissulfeto isomerase (PDI) por anticorpos anti-NS1;<sup>58</sup>
- infecção direta das plaquetas, o que causa um desequilíbrio em seu metabolismo, impedindo a célula de desempenhar suas funções características;
- estímulo de produção de conjuntos de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), as quais são frequentemente ligadas ao início e regulação de trombose<sup>59</sup> e desenvolvimento de trombocitopenia.<sup>60</sup>



**Figura 1.9.** Conjectura atual das principais mecanismos fisiológicos propostos como responsáveis pelo desenvolvimento do quadro de trombocitopenia em pacientes aflitos com infecções severas de dengue e manifestações hemorrágicas. Modificado de Hottz et al. (2011).<sup>49</sup>

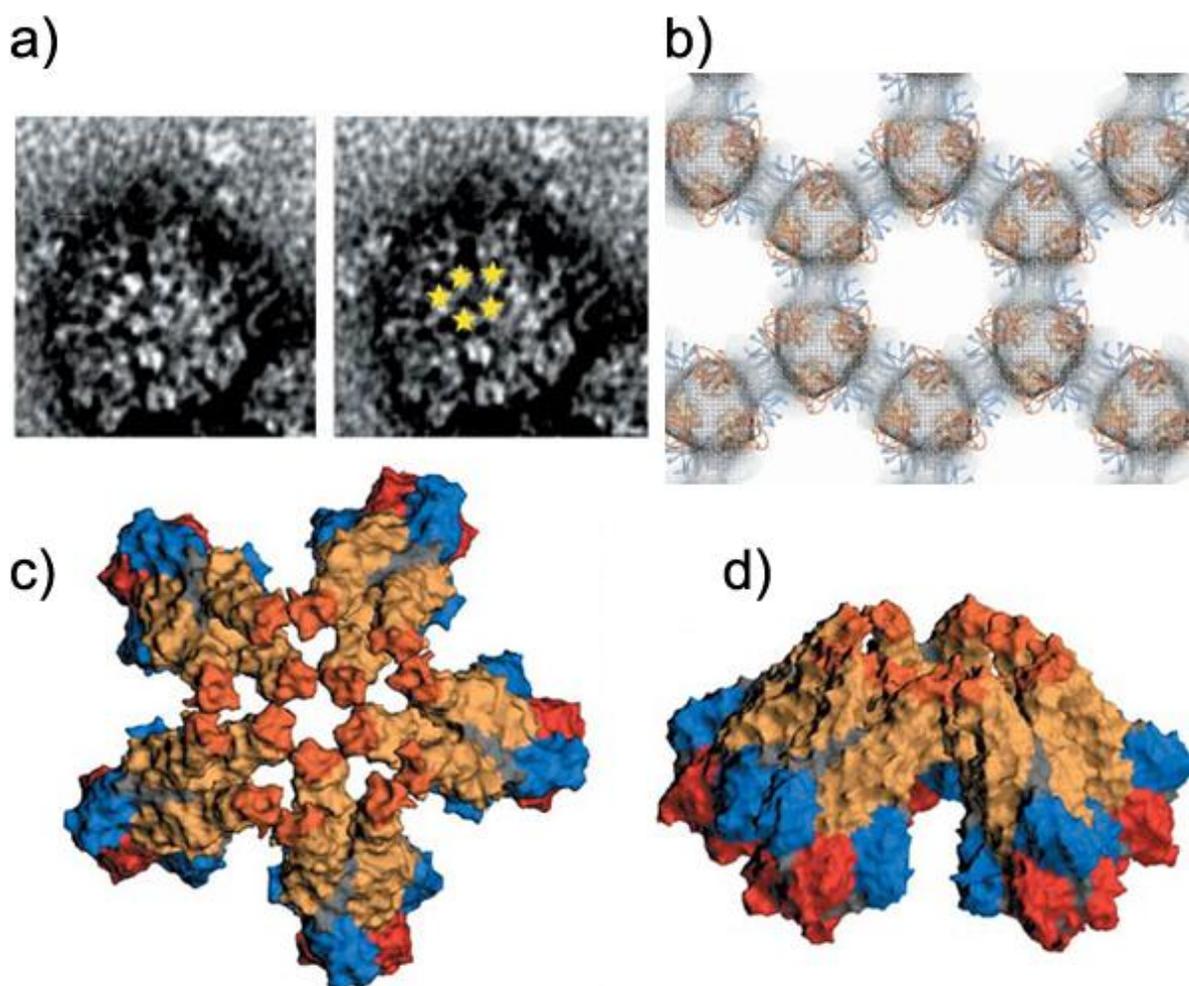
Uma vez difundido pelo organismo, a **adsorção viral às células hospedeiras** é o primeiro passo efetuado pelo vírus do Dengue (**Fig. 1.10**), e é intermediado pela ligação do

envelope viral a uma gama de receptores presentes na superfície celular.<sup>61</sup> Apesar de existirem questões em aberto sobre as localizações exatas dos epítomos virais, bem como sua quantidade, parece ser bem estabelecido que todos eles pertencem à proteína E.<sup>62-65</sup> A proteína E sofre ações de algumas moléculas, como a heparana e certos sulfatos de heparana, evitando efetivamente o processo de infecção pelo vírus do Dengue.<sup>66</sup> Esta informação é importante do ponto de vista terapêutico por causa da conveniência de se interromper o ciclo viral antes da fusão do vírus com a célula. Sulfatos de heparanas são oligossacarídeos que se encontram naturalmente nas membranas celulares ou fora das mesmas, e o vírus do Dengue, por meio de suas proteínas E, interage com sulfatos de heparana, fixando-se sobre a membrana celular.<sup>67</sup> Assim, tem sido sugerido que o sulfato de heparana desempenha papel importante no processo de infecção: ele seria necessário para agregar partículas virais sobre a superfície da célula facilitando a ligação da proteína E sobre um receptor específico.<sup>68</sup>



**Figura 1.10.** Esquema simplificado do ciclo viral lítico, os principais passos são escritos em fonte verde. Para maiores detalhes, favor referir-se ao texto. Modificado de Pierson (2012).<sup>69</sup>

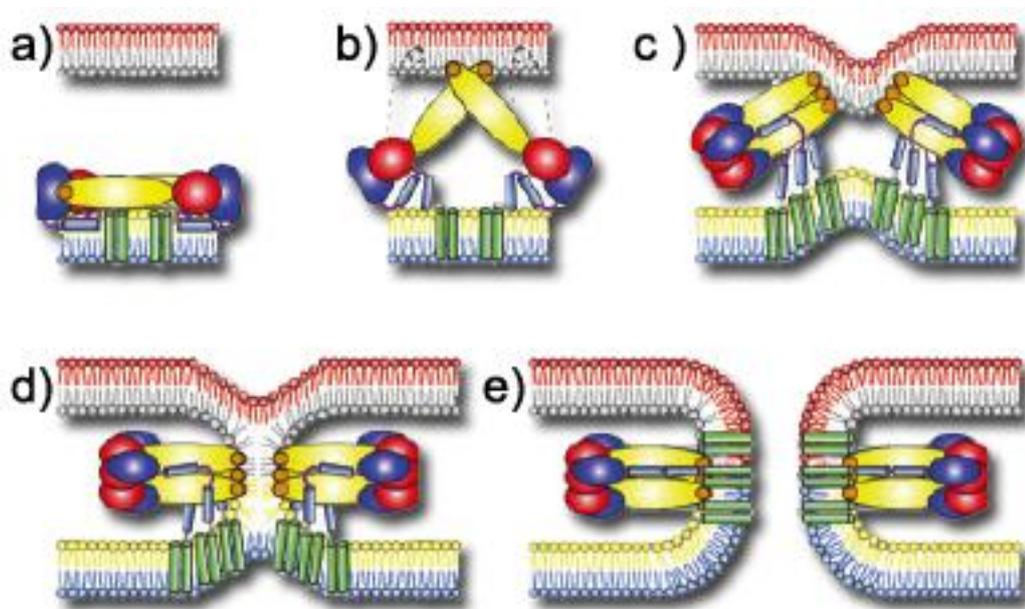
Após a adsorção viral, é dado início ao processo de **penetração celular** pelo processo de endocitose mediada pela proteína citoplasmática clatrina. Este processo não é muito eficiente, e se estima que apenas uma pequena porcentagem de vírus adsorvidos é efetivamente interiorizada e fundida com a membrana endossomal.<sup>70</sup> Com a ligação do vírus à membrana plasmática, a célula hospedeira é sinalizada a envolver o vírus até englobá-lo em uma vesícula, a qual recebe a denominação de endossomo. O endossomo tem a função primária de ataque químico ao material englobado por acidificação de seu interior, o que é alcançado pelo transporte ativo de íons  $H^+$  para o interior do endossomo. Ao mesmo tempo em que essa pré-digestão ocorre, o endossomo transporta seu conteúdo para ser depositado no lisossomo, organela responsável pela grande parte da hidrólise celular. No entanto, antes do endossomo fundir-se com o lisossomo, o vírus do Dengue passa por processos de mudança conformacional mediado pela redução do pH (de 6,2 a 5,2)<sup>71</sup> no interior do endossomo tardio. Nesta etapa os dímeros da proteína E se dissociam e se rearranjam em um movimento lateral progressivo, o que a leva à exposição dos *loops* de fusão, que, por sua vez, em contato com a membrana interna do endossomo, são (provavelmente localmente) guiados à formação de trímeros.<sup>72</sup> Estes, ligados à bicamada lipídica viral através das âncoras e das hastes da base da proteína E, se aproximam e possivelmente formam um complexo de um conjunto de cinco trímeros, contendo 15 *loops* de fusão (**Fig. 1.11**), interagindo com a camada fosfolipídica da camada interna da membrana do endossomo da célula hospedeira (proveniente da camada externa da membrana celular). Esta interação tem início em média em 12 minutos após a entrada do vírus na célula,<sup>70</sup> dando continuidade ao processo que levará ulteriormente à fusão de membranas (**Fig. 1.12**),<sup>61</sup> o que ocorre com sucesso em apenas 17% das ocasiões.<sup>70</sup> O arranjo de cinco trímeros da proteína E interagindo via *loops* de fusão (identificado na proteína E1 do Alfavírus SFV – *Semliki Forest Virus*) forma um anel que corresponde a um estágio intermediário da reação de fusão de membranas. Postula-se que tal anel é responsável pela interação com as cabeças lipídicas e a formação de uma cratera, o que induz à formação de uma deformação conectora da membrana alvo, levando à fusão com a bicamada lipídica viral. Este estado precede a abertura de um poro de fusão, o que provavelmente requer a transposição de uma barreira energética adicional.<sup>73</sup>



**Figura 1.11.** **a)** Micrografia eletrônica da superfície do vírus SFV (*Semliki Forest Virus*), o qual possui estrutura similar ao Dengue, ilustrando o padrão de cinco trimeros formando a estrutura de fusão (estrelas amarelas indicam a posição dos *loops* de fusão). **b)** rede de densidade eletrônica cristalina da disposição trimérica em conjuntos de cinco unidades; modelos proteicos em *cartoon* foram ajustados para melhor representação. **c)** Visão superior e **(d)** lateral da representação em superfície do conjunto de cinco trimeros da proteína E1, formando a estrutura de fusão do SFV. A coloração segue: DI em vermelho, DII em amarelo, DIII em azul, *loop* de fusão em alaranjado e porção da haste em cinza. Modificado de Gibbons et al. (2004).<sup>72</sup>

No momento da fusão, o vírus sofre o processo de descapsidação, liberando seu material genético no citoplasma, onde ocorre a tradução, e dando início à fase sintética. Enquanto isso, a replicação do RNA viral ocorre em complexos membranosos induzidos pelas proteínas virais não estruturais.<sup>69</sup> A montagem da partícula viral ocorre nas membranas derivadas do retículo endoplasmático rugoso (RER), de onde os vírus brotam na forma imatura (não-infecciosa), exibindo 60 protuberâncias triméricas da proteína pré-membrana (prM) depositadas sobre as proteínas do envelope. Em seguida, o vírus entra na via de exocitose e, enquanto percorre a rede trans-Golgi (TGN),<sup>74</sup> sofre mudanças conformacionais devidas à diminuição do pH do microambiente das vesículas, e pouco antes de sua liberação

ao meio extracelular, as proteínas prM são clivadas pela endoprotease furina (presente no TGN), dando origem à proteína transmembrana M, bem como peptídeos solúveis pr.<sup>75,76</sup> Este processo modifica superfície da estrutura viral, exportando o vírus maduro (infeccioso). Até recentemente, a superfície do vírus maduro era considerada lisa, porém recentemente uma nova configuração levemente acidentada (*bumpy*) foi proposta por Zhang e colaboradores (mais detalhes na seção 1.2).<sup>77</sup> Após certo patamar de infecção viral, o estresse sofrido pela produção excessiva de proteínas virais pela célula hospedeira a leva ao desencadeamento do ciclo apoptótico,<sup>78</sup> causando eventualmente a sua morte programada, caracterizando o ciclo do vírus do Dengue como um ciclo lítico.



**Figura 1.12.** Representação esquemática da atual conjectura da hipótese de sequencia de eventos que levam à fusão de membranas em *Flavivirus*. **a)** Dímero metaestável da proteína E encontra-se na superfície viral. **b)** Em meio acidificado do endossomo, ocorre a dissociação dos monômeros da proteína E, com interação *loop* de fusão-membrana endossômica. **c)** Início da formação da trimerização pelo deslocamento do DIII e relocação da haste ao longo do eixo longo da proteína. **d)** estágio intermediário de fusão, onde ambas bicamadas externas são fundidas. **e)** após transposição energética ainda elusiva, o processo final de fusão de membranas é completo, o que leva a formação do poro de fusão. A coloração para a proteína E é a mesma utilizada na figura 1.15; a coloração das bicamadas lipídicas segue: camada viral interna em azul, camada viral externa em amarelo, camada endossômica interna em vermelho e camada endossômica externa em cinza. Modificado de Stiasny e Heiz (2006).<sup>79</sup>

O desequilíbrio no processo de penetração viral é um dos principais fatores que orquestra o nível de gravidade com que o dengue se manifesta, bem como aspectos da dinâmica de suas epidemias. Este desequilíbrio tem tido causa atribuída ao fenômeno da imunoamplificação dependente de anticorpos (*Antibody Dependent Enhancement – ADE*).<sup>39</sup> Este mecanismo imunopatogênico tem risco associado a uma infecção secundária heterotípica (por um sorotipo

diferente), e ocorre quando complexos vírus-anticorpos não neutralizantes são internalizados nas células via receptores da via de fagocitose  $Fc\gamma$  ( $Fc\gamma R$ ), localizados na superfície da célula, resultando em infecção de um maior número de células-alvo, levando ulteriormente a maior replicação viral.<sup>80</sup> Após uma primeira infecção, o organismo desenvolve imunidade vitalícia ao sorotipo infectante, porém imunidade cruzada apenas transiente aos demais sorotipos.<sup>80</sup> A resposta imunológica desta primeira infecção gera basicamente dois tipos de anticorpos: aqueles que possuem a capacidade de bloquear uma parte da replicação viral com sucesso (neutralizantes), e aqueles que não produzem uma resposta imune adequada pela falta de bloqueio no ciclo de replicação viral (não neutralizantes). Em uma segunda infecção, os anticorpos não neutralizantes presentes no organismo, por utilizarem a via  $Fc\gamma R$ , facilitam a adsorção viral, levando à intensificação da penetração celular e consequente replicação em monócitos, resultando em maior estado de viremia.

Apesar de ser evidente que o aumento da viremia é diretamente responsável pelo estabelecimento de sintomas mais intensos e aparecimento de quadro severo de dengue, um mecanismo complementar tem sido proposto como consequência da ADE: a supressão da resposta imune ao vírus. Quando o Dengue penetra na célula por sua via padrão, a endocitose, a célula começa uma série de reações que vão modulando o sistema imune, estimulando uma linha de defesa contra o antígeno. Porém, se sabe que quando o vírus do Dengue penetra em células THP-1 (linhagem celular monocítica) via  $Fc\gamma R$ , há a supressão da transcrição e de produção de interleucina 12 (IL-12), interferon gama ( $IFN\gamma$ ), fator de necrose tumoral ( $TNF\alpha$ ) e óxido nítrico (NO),<sup>81</sup> fatores fundamentais para resposta imunológica apropriada ao combate à replicação viral. Concomitantemente a essa supressão imunológica, há o aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-6, IL-10).<sup>81</sup>

Em 2010, Rodenhuis-Zybert *et al.* demonstraram que partículas virais totalmente imaturas tornam-se altamente infecciosas quando interagem com anticorpos anti prM via  $Fc\gamma R$ .<sup>82</sup> Adicionalmente, Dejnirattisai *et al.* identificaram que anticorpos para o precursor estrutural da proteína M, a proteína prM, respondem pela grande maioria do componente da resposta imunológica.<sup>83</sup> Estes anticorpos promovem intensa reação cruzada dos anticorpos entre os quatro sorotipos e, mesmo em altas concentrações, não neutralizam a infecção, mas sim promovem a ADE.<sup>83</sup> Estes dados apontam que o ADE é um mecanismo pelo qual partículas imaturas contendo prM (as quais respondem por volta de 40% da produção em

células C6/36)<sup>70</sup> passam a comportar-se como partículas maduras infecciosas e, como visto, capazes de penetrar na célula, replicar-se e contribuir com a intensificação da viremia.

#### **1.1.4 – Primeira linha de proteção: a vacina**

Apesar de o dengue ter seus primeiros relatos confirmados desde ao redor de 1780,<sup>21</sup> foi apenas em 1944 que começaram a surgir os primeiros candidatos a uma vacina efetiva. Naquele ano, Kimura & Hotta<sup>84</sup> testaram um soro imunizante em ratos, porém sem resultado satisfatório. No ano seguinte, Sabin e Schlesinger,<sup>85</sup> através de estudos com inoculação intracerebral em ratos de um vírus do Dengue modificado, obtiveram imunidade em hamsters, porcos da Índia e coelhos. No entanto, esta variante produziu os sintomas de dengue em todos os voluntários humanos. O artigo original clama que após séries de experimentos, essa variação poderia ser utilizada como um protótipo de vacina, o que não procedeu, mesmo após vários trabalhos na área ao longo dos anos.<sup>86-88</sup> Mais recentemente, com o apoio da Organização Mundial de Saúde, novas possibilidades em direção a uma vacina foram surgindo,<sup>3,89</sup> com candidatos promissores por meio de vírus atenuados avaliados em testes na Tailândia, como formulações de mono a tetravalentes, as quais abrangem todos os sorotipos conhecidos de Dengue. Muito dos novos progressos se devem a técnicas novas e variadas, tais como o uso de vírus inteiros inativados,<sup>90</sup> peptídeos sintéticos,<sup>91,92</sup> vacinas a partir de subunidades virais,<sup>93</sup> expressão de vetores,<sup>94</sup> vacinas clone-derivadas de cDNA infeccioso,<sup>95,96</sup> entre outras.

A vacina efetiva para a proteção contra um vírus da mesma família do Dengue, e bastante similar em estrutura, o vírus da febre amarela (o qual consiste em apenas um sorotipo), foi desenvolvida há muitos anos, em 1937, por Max Theiler.<sup>97</sup> O relativo longo histórico de tentativas frustradas para o desenvolvimento de vacinas para o Dengue é um reflexo direto da patologia complexa da doença aliado à necessidade do desenvolvimento de um controle dos quatro sorotipos simultaneamente (vacina tetravalente), tudo isso à luz da insuficiência de investimentos.<sup>98</sup> É absolutamente necessário que a vacina seja tetravalente, visto que a imunização parcial protege indivíduo também parcialmente, porém cria ao mesmo tempo uma situação de suscetibilidade ao desenvolvimento de um quadro de dengue severa, caso haja uma infecção por um sorotipo não protegido pela vacina (exposição a risco de ADE, seção 1.1.3). Dada a situação crítica de coexistência dos quatro sorotipos praticamente em

todas as regiões onde o dengue é endêmico (**Fig. 1.5 b**), a aplicação em massa de uma vacina não tetravalente pode ter consequências sérias, com aumento nas estatísticas de casos hemorrágicos e, possivelmente fatais. Ademais, a falta de modelos animais validados aumenta as dificuldades do processo de ensaio clínico, causando grande letargia na seleção de candidatos a vacinas promissoras, sendo geralmente necessárias várias etapas de fase I de avaliação em humanos.<sup>99</sup>

Atualmente existem várias vacinas candidatas tetravalentes em ensaios clínicos e pré-clínicos, sendo que apenas uma se encontra na fase III, aquela desenvolvida pela empresa Sanofi Pasteur.<sup>99</sup> Cada candidata foi desenvolvida isoladamente pelas instituições públicas ou privadas, sozinhas ou em parceria, a partir de métodos que variam de acordo com o modo de ação, sendo que algumas são isolados de vírus atenuados, antígenos recombinantes, compostos quiméricos com o vírus da febre amarela, ou uma combinação destes métodos (**Tabela 1.1**). Os EUA se apresentam em condição de destaque como um grande colaborador no panorama de candidatos a vacinas contra o dengue, tanto por parcerias que envolvem financiamento de estudos em outros países, quanto por desenvolvimento direto ou através de filiais de empresas com sede originária do país. Enquanto a maioria de países sede dos estudos é pertencente à classe de países desenvolvidos, grande parte do desenvolvimento e a totalidade dos ensaios clínicos têm origem nas localidades parceiras ou filiais, os quais se localizam em países como Tailândia, Indonésia, Cingapura, Brasil, México, Índia, entre outros. Destacamos a participação maciça de países emergentes como a Índia, Brasil, Cuba e Tailândia em lugares de destaque no desenvolvimento de candidatos às opções americanas.

**Tabela 1.1.** Lista atualizada de candidatos à vacina contra o dengue. Modificado de Guzman et al. (2010) Halstead e Thomas (2013).<sup>27,99</sup> A identificação de siglas dos desenvolvedores seguem em ordem alfabética: **CDC**, *Centers for Disease Control and Prevention* ; **CIGB**, *Center for Genetic Engineering and Biotechnology* ; **GSK**, *GlaxoSmithKline*; **Fiocruz**, Instituto Oswaldo Cruz; **IPK**, Instituto Pedro Kouri de Medicina Tropical; **NIAID**, *National Institute for Allergy and Infectious Diseases* ; **US NIH LID**, *United States National Institutes of Health Laboratory of Infectious Diseases*; **US NMRC**, *United States Naval Medical Research Center*; **USP**, Universidade de São Paulo: **WRAIR**. *Walter Reed Army Institute of Research*.

<b>Tipo de vacina</b>	<b>Desenvolvedores</b>	<b>Países Envolvidos</b>	<b>Ensaio clínico</b>
Vacina viva atenuada tetravalente e quimérica de Febre Amarela – DENV	Sanofi Pasteur	França – EUA	Fase III
Vacina viva atenuada tetravalente de isolado viral	WRAIR – GSK	EUA – Grã Bretanha	Fase II
Vacina viva atenuada e quimérica de DENV2–DENV	CDC – Inviragen	EUA	Fase I
Vacina de subunidade recombinante da proteína E (DENV1)	Merck (Hawaii Biotech)	EUA	Fase I
Vacina viva atenuada tetravalente com deleções na porção 3' do RNA e quimeras DENV–DENV	US NIH LID – NIAID	EUA	Fase I
Vacina de antígeno recombinante (domínio III da proteína E)	IPK/CIGB	Cuba – Índia	Pré-clínico
Vacina tetravalente de DNA	US NMRC – Maxygen – GenPhar	EUA	Pré-clínico
Vacina tetravalente purificada e inativada	WRAIR – GSK	EUA – Grã Bretanha	Pré-clínico
Quimera viva atenuada de Febre Amarela/DENV	Fiocruz – GSK	Brasil – EUA	Pré-clínico
Vacina tetravalente atenuada	Butantan – USP – US NIH	Brasil – EUA	Pré-clínico

Ao longo dos estágios clínicos iniciais, a vacina candidata da Sanofi Pasteur vem obtendo ótimos resultados desde a imunização de macacos rhesus (*Macaca mullata* – Zimmermann, 1780), até estágios que envolvem a inoculação em pequenos grupos de voluntários humanos. No entanto, o relato mais recente sobre a eficácia desta vacina<sup>100</sup> deixou a comunidade um tanto apreensiva, visto que a vacina falhou em proteger consistentemente crianças em idade escolar à infecção pelo Dengue, especificamente o sorotipo 2, com eficácia total de imunização de apenas 30%. Este foi o primeiro teste realizado em larga escala de uma vacina contra o Dengue (estágio clínico 2b), onde 4002 crianças tailandesas de idade entre 4 e 11 anos foram divididas em dois grupos, sendo que um deles recebeu três doses semestrais ( $n = 2669$ ) e o outro serviu de controle ( $n = 1333$ ). As crianças foram acompanhadas por 25 meses, e não apresentaram sinais de intolerância em momento algum, o que indica grande sucesso em relação à segurança da vacina no organismo paciente. Apesar da relativa baixa eficácia na proteção contra o sorotipo 2, este teste sugere

que a existência de uma vacina segura contra o Dengue é uma possibilidade, além do que não devemos desconsiderar o sucesso contra os demais sorotipos.

No Brasil, duas vacinas são desenvolvidas independentemente e se encontram em estágio pré-clínico. Uma delas, a qual teve o início de seu desenvolvimento no ano de 2002, é resultado de esforço conjunto do Instituto Oswaldo Cruz com a transnacional *GlaxoSmithKline*. A vacina é resultado de uma quimera entre o envelope do vírus da febre amarela contendo sequências de genes do Dengue, os quais dão origem a peptídeos inofensivos ao paciente, porém são estimuladores imunogênicos contra os quatro sorotipos do Dengue. A outra vacina é desenvolvida desde 2005 pelo Instituto Butantan, em colaboração com o Centro de Pesquisas Clínicas do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e com o *National Institute of Health* dos Estados Unidos. Diferentemente da quimera do Fiocruz, a vacina do Instituto Butantan conta com a atenuação da virulência das partículas virais inteiras do Dengue, o que se espera gerar uma resposta imunológica protetora, e ao mesmo tempo não causar infecções aos voluntários. O Instituto Butantan aguarda a liberação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) para ensaios clínicos em 50 voluntários saudáveis, que nunca contraíram o dengue bem como nunca foram vacinados contra a febre amarela.<sup>101</sup> Em luz do presente contexto mundial, o progresso recente alcançado indica que uma estimativa plausível para o licenciamento de uma vacina em países endêmicos se dê até 2018.<sup>99</sup>

### **1.1.5 – Segunda linha de proteção: medicamentos antivirais**

Enquanto o desenvolvimento de vacinas contra o Dengue é essencial para o controle de epidemias pela imunização da população suscetível em áreas endêmicas, elas não têm utilidade no tratamento de pessoas já infectadas. Mesmo em um cenário hipotético, com a disponibilidade de uma vacina tetravalente efetiva, eventualidades como ineficiência na distribuição à população ou o deslocamento de pessoas não imunizadas a áreas endêmicas são alguns exemplos que podem acontecer, possibilitando a infecção. Atualmente, nos casos confirmados de dengue, a abordagem atual se baseia apenas no tratamento sintomático, com medidas paliativas como o controle da temperatura corporal com antitérmicos, monitoração

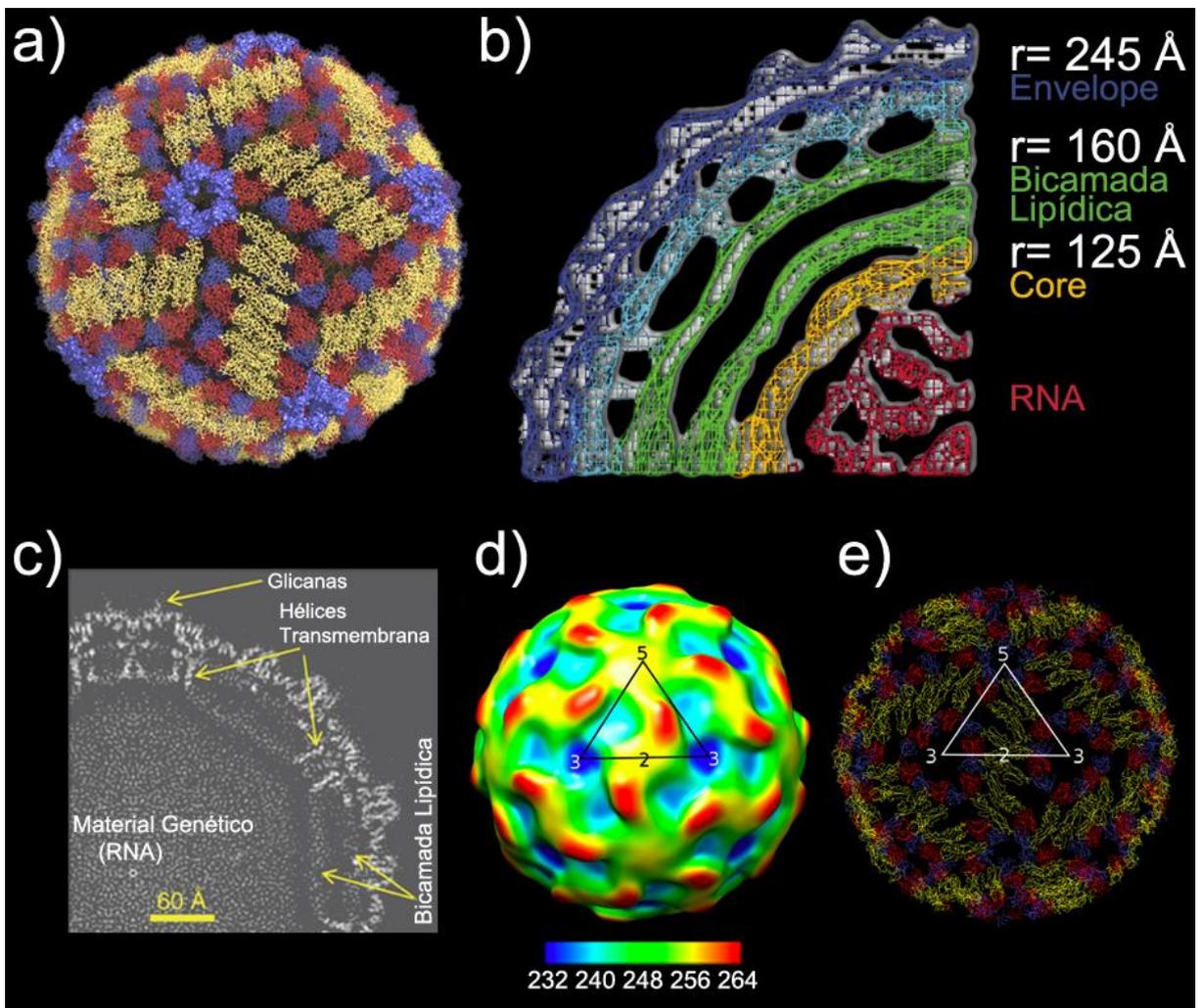
dos níveis plaquetários, tratamento das dores corporais por medicamentos analgésicos (excetuando-se aqueles com propriedades antitrombóticas, como o ácido acetilsalicílico), e assim por diante. É nesse contexto que se torna altamente desejável o desenvolvimento de fármacos que atacam diretamente o vírus, ou mesmo algumas de suas vias metabólicas, minimizando ou bloqueando sua reprodução no organismo hospedeiro, enquanto o próprio sistema imunológico se encarrega de eliminar a infecção. Isso propiciaria uma recuperação muito mais rápida, com minimização de danos aos tecidos corporais mais suscetíveis, além de minimizar as probabilidades de desenvolvimento de quadro severo com manifestações hemorrágicas.

Um exemplo bem estabelecido de medicamentos antiviral é o aciclovir (eficiente contra vírus do Herpes tipo 1 e tipo 2), o qual é um nucleosídeo sintético análogo à adenina e guanina, que é convertido em seu derivado monofosfatado pela timidina quinase (TK) apenas de origem viral, tendo, portanto, alta seletividade para células infectadas. O monofosfato de aciclovir, por sua vez, sofre mais duas fosfatações, tornando-se o trifosfato de aciclovir. Finalmente, esta molécula é incorporada a cadeias nascentes de DNA viral pela DNA polimerase celular, o que causa o término abrupto da duplicação e impossibilidade do contínuo da replicação viral. Sem novos vírus sendo sintetizados, o sistema imune do paciente agora tem possibilidades de combater a infecção de forma autônoma.<sup>102</sup>

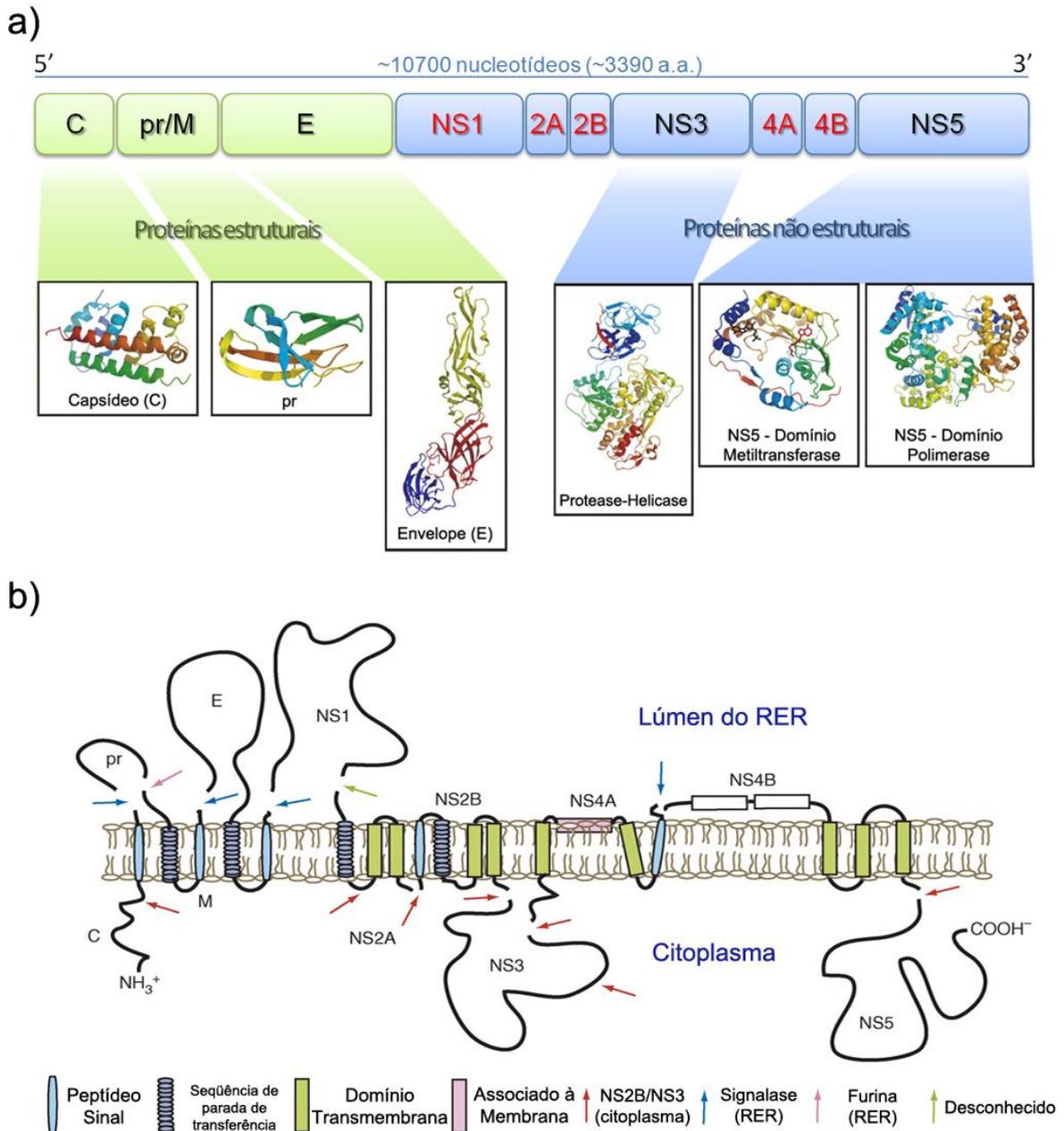
De forma análoga, o estudo estrutural da partícula viral do Dengue, pode trazer informações importantes em relação a processos de infecção, possibilitando a proposição de maneiras a se impedir a evolução de estágios, desde a adsorção viral, até a exportação. Neste estudo focamos neste tópico, estudando em detalhes a estrutura molecular da proteína E, e, sempre que apropriado, levantando informações que possam auxiliar o entendimento de processos infecciosos por sua interação estereoquímica com o meio, com ela mesma, e com a bicamada lipídica viral.

## 1.2 – A constituição do vírus: síntese e estrutura

O vírus do Dengue é composto por uma fita positiva de RNA envolto por um capsídeo proteico, ambos contidos por uma camada de membrana lipídica e finalmente protegidos por um envelope (glico)proteico esférico (Fig. 1.13). A fita de RNA de aproximadamente 11.000 nucleotídeos traduzem dez proteínas distintas, sendo três estruturais e sete não-estruturais (Fig. 1.14).



**Figura 1.13.** a) Estrutura do vírus do dengue a temperatura ambiente, as cores são proteínas E seguem o mesmo padrão da figura 1.15. b) Representação da densidade eletrônica por micrografia do vírus. Os valores à direita indicam o raio em que cada estrutura, nomeada por sua respectiva coloração, se encontra em relação ao centro geométrico. c) Micrografia eletrônica de corte do vírus, identificando as principais estruturas visíveis. d) Mapa de relevo do vírus do dengue à temperatura fisiológica (37°C); a escala abaixo encontra-se em Angstroms, e indica a mesma distância representada no item b. e) representação da estrutura viral à temperatura fisiológica, identificando os vértices pentarradiais e trirradiais, bem como a aresta da geometria icosaédrica do vírus. Modificado de Zhang et al. (2013a,b), Khun et al. (2002)<sup>77,103,104,103</sup>



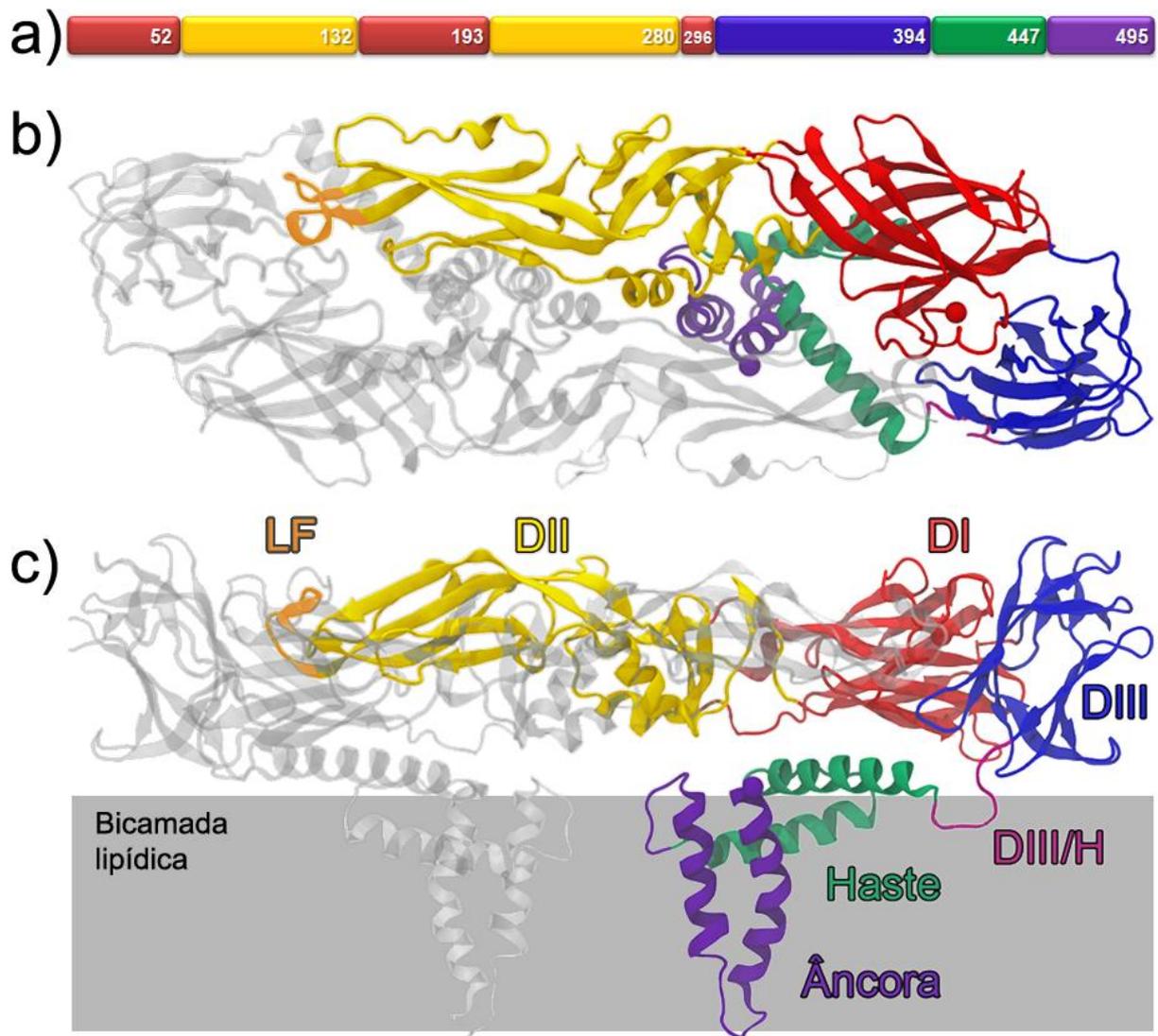
**Figura 1.14. a)** Representação da fita de RNA positivo do dengue, e a distribuição proporcional das regiões que originam as proteínas estruturais (em verde) e as não estruturais (em azul); as proteínas com o nome representado em vermelho ainda não tem sua atividade plenamente conhecida. **b)** Esquema do processamento da poliproteína do dengue, com setas indicando os sítios de clivagem pelas respectivas enzimas indicadas na legenda. Modificado de Perera e Khun (2008).<sup>105</sup>

Duas destas proteínas estruturais, prM e E, compõem essencialmente o envelope do vírus, que tem a função primordial de proteção de seu material genético de ataques químicos, da mesma maneira que provê todo o aparato para o reconhecimento da célula alvo, ancoração, fusão de membranas e infecção com o RNA invasor.

### 1.2.1 – Aspectos estruturais fundamentais da proteína E

A (glico)proteína E do envelope do vírus da Dengue (DEN) desempenha papel central no processo preliminar da infecção viral, caracterizado pelos elementos moleculares envolvidos no primeiro contato entre vírus e receptores celulares, e pelo processo de fusão do vírus com a membrana celular.

As 180 proteínas E que recobrem o vírus se arranjam dimericamente em sua superfície icosaédrica. Por sua vez, cada monômero com 394 resíduos (no DENV-2) se organiza tridimensionalmente por *folds* baseados principalmente em fitas- $\beta$  cuja estrutura resultante é descrita em termos de três domínios (**Fig. 1.15**).<sup>106,107</sup> O domínio I (DI) é a porção central da proteína E; é formado pelo *motif* estrutural *beta-barrel* contendo oito *beta-strands*, e possui dois sítios de nitrogênio-glicosilação, a saber, nos resíduos Asn-67 e Asn-153; ambos são conservados em todos os tipos de vírus do Dengue e têm sido implicados na ligação do vírus com a célula hospedeira. O domínio II (DII) é a porção responsável pela dimerização da proteína E, e se conforma numa estrutura alongada, na forma de “dedo” (resíduos 88 – 123 da proteína E). O *loop* em seu extremo (resíduos 98-109) é constituído por uma sequencia de resíduos hidrofóbicos que se conserva em todos os flavivírus;<sup>61</sup> fato este que o torna alvo de grande interesse farmacológico. Especificamente, experimentos com outro vírus do mesmo *genus*, a saber, o agente da encefalite do carrapato (TBE), tem mostrado que este *loop* é a parte responsável pela ligação do ectodomínio da proteína E à membrana da célula hospedeira.<sup>106</sup> Após a fusão, esta fração peptídica da proteína se encontra numa conformação trimérica (determinada por difração de raios-X), mas os detalhes do processo de sua formação, os quais somente podem ser fornecidos pela dinâmica do processo da transição da forma dimérica para a forma trimérica, concomitante à (ou seguida pela) inserção do *loop* na membrana, ainda não se conhece.<sup>61</sup> Por sua vez, o domínio III (DIII) com 112 resíduos (DENV-4) é um módulo do tipo IgG (topologia da imunoglobulina),<sup>108</sup> constituído por dez *beta-strands*; é considerado como um domínio ligante-receptor auxiliar do envelope do vírus, e constitui a parte da proteína E mais saliente da superfície viral.<sup>103</sup> Na superfície do vírus maduro, dímeros de proteínas E se distribuem orquestralmente de tal forma que em certas regiões cinco subunidades se contatam formando poros, sobre os quais anticorpos ou receptores podem se ligar.



**Figura 1.15.** Distribuição da localização dos domínios da proteína E representadas de acordo com a coloração correspondente: **a)** sequência primária dos resíduos. **b)** Representação do dímero da proteína E (glicanas ausentes) em vista a partir da superfície viral; e em **c)** em vista lateral. Para beneficiar a clareza, um dos dímeros é representado em transparência. As regiões da estrutura são coloridas: DI em vermelho, DII em amarelo, DIII em azul, LF (*loop* de fusão) em alaranjado, região de ligação DIII/H em magenta, Haste em verde e Âncora em violeta.

Surpreendentemente, os DIIIs têm sido significativamente preservados, pois somente nove aminoácidos mutantes (~8%) diferenciam o mesmo domínio III nas cepas selvagens e DENV-4.<sup>109</sup> Daí o interesse no estudo estrutural e dinâmico do DIII, o qual para o sorotipo 4 (DENV-4 - DIII) teve também, recentemente, a estrutura solucionada por ressonância magnética nuclear (PDB ID: 2H0P).<sup>109</sup>

Um agrupamento (“*cluster*”) de aminoácidos polares na interface entre os domínios I e III da proteína E do DENV-1 é encontrado, e acredita-se ser o responsável pela modificação

estrutural nessa região sob pH ácido do endossomo.<sup>110</sup> O conjunto His-27, His-282, His-317 e Glu-368, que é conservado entre todos os tipos de Dengue, forma esse agrupamento, e cada um está à distancia de uma ligação de hidrogênio aos demais três, sendo que dois deles são pertencentes ao domínio I (His-27 e His-282) e os outros dois, ao domínio III (His-317 e Glu-368).<sup>111</sup> A presença desse grupo polar nessa região da proteína, e a obtenção experimental da forma trimérica de pós-fusão do DENV-1 sem a utilização de um meio acidificado, resultado não obtido com o DENV-2, sugere que os tipos diferentes de Dengue apresentam requerimentos diferentes de acidificação do meio, e que esse grupo polar na interface DI e DIII provavelmente é influenciado por resíduos adjacentes não conservados entre as flavivíruses.<sup>111</sup>

Existe uma região no domínio I da proteína E do dengue, a qual é responsável pela fusão do trímero à membrana do hospedeiro. Essa região é chamada de *loop* de fusão (LF) (**Fig. 1.15**), e se constitui de um *loop* formado por aminoácidos apolares (grande proporção de aromáticos) e possui grande afinidade com a constituição da membrana fosfolipídica do hospedeiro. Essa região só se torna ativa após o processo de acidificação e consequente trimerização da proteína E.

O trímero de pós-fusão do Dengue tipo 2 e do vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBE) são pouco solúveis na ausência de detergentes, devido ao caráter apolar do *loop* de fusão. No entanto, Nayak et al. (2009)<sup>111</sup> conseguiram essa trimerização com o DENV-1 mesmo na ausência de detergentes, o que indica –do mesmo modo que o agrupamento polar– que os fatores que levam à trimerização, são dependentes de fatores intrínsecos, como as sequências não conservadas de aminoácidos adjacentes. Detalhes estruturais abordados pelo presente trabalho são apresentados nos capítulos seguintes.

### **1.3 – A ferramenta de análise: Dinâmica Molecular**

A dinâmica molecular pode ser descrita como uma rotina que trata a movimentação dos átomos de um sistema, seguindo as leis Newtonianas clássicas de movimento.<sup>112</sup> Toda a interação atômica é regida por um grupo de potenciais pré-determinados, o qual se encontra detalhado em arquivos ASCII acessíveis ao programa de dinâmica molecular. Estas informações estão inseridas nos chamados “campos de força”, que, apesar de não conterem

forças propriamente ditas, apresentam os potenciais para a geração delas. Apresentamos na próxima seção (1.4.1) um apanhado geral dos tipos de potenciais comumente inseridos nos campos de força, para em seguida discutirmos um pouco sobre as principais instâncias utilizadas atualmente neste trabalho.

### 1.3.1 – O conjunto de potenciais: Campo de Força

Há atualmente dois modelos principais de cinética de folding de proteínas: o modelo dos caminhos e o funil energético (ou rotas paralelas).<sup>113</sup> O conjunto de potenciais que governam o comportamento da cadeia peptídica em meio fisiológico, é tradicionalmente denominado campo de força. A descrição detalhada dos elementos do campo de força é de importância fundamental para estes modelos de *folding*, já que são eles que regem toda a trajetória da simulação. Uma comparação entre os principais campos de força disponíveis atualmente é feita mais adiante, com o objetivo de ilustrar o quanto suas diferenças influenciam o resultado final da simulação.

Um campo de força é formado por dois componentes distintos. Primeiro, um conjunto de funções de potencial, usadas para gerar energias potenciais e suas derivadas (forças) e, segundo, os parâmetros usados neste conjunto de equações. Neste trabalho iremos apresentar o primeiro caso apenas.

Funções de potencial podem ser basicamente divididas em **(1)** não ligadas, **(2)** ligadas e **(3)** restritivas. Interações energéticas entre átomos não ligados são computadas baseando-se em uma lista de átomos vizinhos não ligados covalentemente; tais interações são somente consideradas efetivas dentro de certas distâncias chamadas de raio de corte. Por sua vez, as interações ligadas envolvem dois ou mais átomos e são representadas por ligações covalentes (potencial de estiramento), dobramento angular, diedros próprios e impróprios. Ligações restritivas remetem a potenciais restritivos (compulsórios) adicionais, os quais são usados para impor restrições no movimento dos componentes do sistema, tanto para evitar desvios irreais ou para incluir dados experimentais específicos. Estas incluem restrições nas posições relativas, nos ângulos, nas distâncias e nas orientações.

As energias devidas às interações não ligadas  $V_{NB}$  são compostas pelos termos Coloumbiano e de *Lennard-Jones*, e envolvem todas as moléculas do sistema (intercadeia e solvente), as quais são, essencial e respectivamente descritas por

$$V_{NB} = \sum_{(pares\ ij)} f \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + 4\epsilon_{ij} \left( \frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) \quad (1.1)$$

onde na interação Coloumbiana  $f = 1/4\pi\epsilon_0$  ( $\epsilon_0$  é a permissividade elétrica do vácuo),  $r_{ij}$  é a distância entre o centro de massa dos átomos  $i$  e  $j$ , e  $q_i$  e  $q_j$  são suas cargas elétricas. Em relação ao potenciais de *Lennard-Jones*,  $\sigma_{ij}$  corresponde à distância entre os átomos  $i$  e  $j$  em que o potencial inter partículas é zero, e  $\epsilon_{ij}$  corresponde à profundidade do poço de potencial.

Nas ligações covalentes (ligadas), as energias potenciais intracadeia devido ao estiramento e variações angulares da cadeia peptídica são representadas por potenciais harmônicos denominados de estiramento, angular e impróprio, respectivamente,  $V_B$ ,  $V_\alpha$  e  $V_{imp}$ :

$$V_B = \sum_{ligações} \frac{1}{2} K_r (b - b_0)^2 \quad e \quad V_\alpha = \sum_{angulos} \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (1.2, 1.3)$$

$$V_{imp} = \sum_{extraplana} \frac{1}{2} K_\zeta (\zeta - \zeta_0)^2 \quad (1.4)$$

E finalmente, os termos energéticos intracadeia referentes às torções envolvendo cada ângulo diedral próprio  $\varphi$ :

$$V_D = \sum_{diedral} K_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \delta)] \quad (1.5)$$

Na cadeia polipeptídica, descrita com resolução atômica, à cada átomo  $i$  é associado uma massa pontual  $m_i$ . O potencial descrito pelo campo de forças finalmente é obtido relacionando-se as funções apresentadas até este ponto, da seguinte maneira:

$$V(\{r_i\}_N) = [V_B + V_\alpha + V_{imp} + V_D + V_{NB}] \quad (1.6)$$

A força  $F_i$  sobre cada átomo  $i$  dentre os  $N$  átomos da macromolécula, por sua vez é dada pelo gradiente do potencial no local do átomo  $i$ , devido ao conjunto  $\{j\}$  dos  $N-1$  outros átomos (distintos de  $i$ ), o que é dado por

$$\mathbf{F}_i = - \sum_j \frac{dV_{ij}(r_{ij})}{dr_{ij}} \frac{\mathbf{r}_{ij}}{r_{ij}} \quad (1.7)$$

Cada termo da Equação 1.7 é função das coordenadas ( $r_{ij}$ ), isto é, função da distância entre os pares de átomos  $i$  e  $j$  da macromolécula. Como visto acima, os potenciais são separados em dois grupos principais: aquelas envolvendo grupos de dois ou mais átomos próximos ao longo da cadeia e conectados, por ligações covalentes (variações nos comprimentos das ligações, nos ângulos entre cada três átomos consecutivos, e torções entre uma ligação e outras ligações vizinhas), e as interações entre pares de átomos não ligados covalentemente, a saber, interações do tipo *Coloumbiana* e de *van der Waals*.

As interações entre as moléculas do solvente (moléculas de água e íons) e entre estas e a molécula proteica, seguem as mesmas abordagens descritas acima.

### 1.3.2 – Campos de força utilizados: OPLS-AA e CHARMM36

No o final da década de 70, as simulações moleculares surgiram<sup>114</sup> e vinham caminhando como uma técnica utópica que dificilmente conseguiria simular grandes moléculas, muito menos em períodos de tempo longos. Foi então que o *boom* da informática (início dos anos 90) permitiu o avanço de técnicas computacionais cada vez mais complexas, as quais vêm sendo estudadas e desenvolvidas no campo da ciência. É neste contexto que tanto a dinâmica molecular quanto a técnico Monte Carlo vem recebendo novas tecnologias para serem utilizadas em vários campos acadêmicos. O campo de força computacional chegou com a necessidade (e permissibilidade) da simulação de moléculas *in silico*, e desde então é objeto sistemático de estudo.

Campos de força vêm sendo modificados para estudo de carboidratos,<sup>115,116</sup> proteínas,<sup>117</sup> produtos naturais,<sup>118</sup> lipídios<sup>119</sup> *etc.*, devidamente comparados com dados experimentais e validados,<sup>119-124</sup> o que demonstra sua versatilidade e confiabilidade. Contudo, um problema surge da seguinte máxima: se na natureza existe apenas um único e geral campo de força, (pelo menos na Terra; excluem-se singularidades, buracos negros etc) e presentemente dispomos de várias versões representativas para o mesmo, então apenas um deles deve estar certo ou nenhum está perfeitamente certo. De fato, muito ainda deve ser desenvolvido para se aproximar de um único e completo campo de forças, e por isso a existência de versões com aplicações dirigidas a situações mais ou menos específicas. E

assim, embora indique prospecto pouco agradável, o estudo comparativo de diferentes campos de força se mostra indispensável ao avanço da área.

Nesta tese, utilizamos basicamente dois campos de força: OPLS-AA para as simulações com os DIIs (Cap. 2) e CHARMM36c para as simulações que envolvem interfaces bicamada lipídica – solvente aquoso com adição de proteína transmembrana (Cap.3).

Desenvolvido por Jorgensen em 1988,<sup>125</sup> o OPLS-AA (*Optimized Potentials for Liquid Simulations – All Atom*) é um dos mais populares campos de força para simulações de biomoléculas, incluindo proteínas<sup>126</sup> e carboidratos.<sup>115</sup> Apresenta potencial de *Lennard Jones* (12-6) mais cargas pontuais para átomos livres ou distantes; e para átomos diferentes é utilizado ainda mistura de regras geométricas. Interações intra-moleculares apresentam dinâmicas do potencial tipo harmônico tanto para estiramento de ligações quanto para torções angulares e ângulos diedrais do tipo próprio. Átomos conectados por três ligações também apresentam tratamento misto, porém em escala distinta: são regidos por *Lennard Jones* e potencial de Coulomb. Torções angulares do tipo impróprias são utilizadas em certos átomos do tipo *sp2* para restringir a planaridade de resíduos aromáticos.

O campo de força CHARMM36 utiliza regras de potenciais para átomos não ligados de *Lennard-Jones* mais cargas pontuais para átomos livres ou distantes. As interações intra-moleculares apresentam dinâmicas do potencial tipo harmônico tanto para estiramento de ligações quanto para torções angulares e ângulos diedrais do tipo impróprio, além de termos não escalados do tipo Coulomb. Torções angulares do tipo impróprias são utilizadas em casos especiais com fins de restrição de planaridade de resíduos aromáticos. Atualmente, CHARMM36 é amplamente utilizado em dinâmica molecular, sendo, juntamente com AMBER, o campo de força mais popular para simulações de bicamadas. CHARMM36 é o que melhor consegue reproduzir tensões superficiais condizentes com o estado de organização dos lipídios de uma bicamada em um *ensemble* NPT (isotérmico-isobárico).<sup>119</sup> Adicionalmente, tanto a recente introdução da parametrização da molécula de colesterol<sup>\*\*\*\*127</sup> a este campo de força quanto na associação à sua interface online para construção de

---

\*\*\*\* A conversão dos parâmetros nos valores e unidades nativas do CHARMM foram convertidos para o formato GROMACS por nós.

membranas mistas (CHARMM-GUI)<sup>128</sup> o transforma em opção bastante versátil para a execução deste trabalho.

### 1.3.3 – GROMACS - *Groningen Machine for Chemical Simulations*

O pacote computacional GROMACS reúne vários programas de relacionados à simulação e análise dinâmica molecular e de análise de seus dados gerados. Originalmente desenvolvido na Universidade de Groningen, o GROMACS agora é mantido e codesenvolvido em diferentes institutos de pesquisa, destacando-se a Universidade de Uppsala, Universidade de Estocolmo e o Instituto Max Plank para pesquisa de polímeros.<sup>129-131</sup>

O projeto GROMACS nasceu a partir de um aprimoramento do projeto GROMOS, escrito então em Fortran77, substituído assim por uma nova arquitetura, agora na linguagem de programação C. Essa nova ferramenta conta com vários novos elementos específicos, sendo a reestruturação de seu código e o suporte a novos recursos computacionais e processadores suas maiores virtudes: a grande otimização dessa nova compilação faz do GROMACS o mais rápido programa de simulação por dinâmica molecular atualmente. Adicionalmente, o suporte e a flexibilidade por vários e diferentes campos de força e seu código fonte aberto (*open source*) fazem deste pacote uma ótima opção para o estudo envolvendo dinâmica molecular.

O projeto *foldings@home*<sup>†††</sup> da Universidade de Stanford é um dos maiores sucessos na questão da divulgação do software, já que se trata de um projeto de cooperação *on-line* para o estudo do *foldings* de proteínas, o qual se utiliza do poder computacional de colaboradores do mundo todo para dar continuidade às simulações de dinâmica molecular suportadas pela plataforma GROMACS.

### 1.3.4 – O custo computacional da DM: *hardware*

Como visto anteriormente, a DM consiste basicamente em cálculos das posições e movimentação dos átomos ao longo do tempo (trajetória), então não é surpreendente que

---

<sup>†††</sup> <http://folding.stanford.edu/>

quanto maior o tamanho da molécula, maior o número de átomos a serem analisados pelo algoritmo e, por consequência, maior o tempo de simulação. Outro problema emergente com o aumento do tamanho da proteína, é que esta necessitará de um ambiente maior para habitar, o qual abrigará também mais moléculas de água, que por sua vez entrarão no processamento.

Dois agravantes adicionais são de ordem técnica e outro de ordem teórica. O primeiro significa que apesar de as máquinas estarem cada vez mais rápidas, ainda hoje um sistema de dinâmica molecular é um sistema computacionalmente custoso, o que significa que a simulação de tempos muito curtos ainda requer tempo muito longo de processamento. A segunda questão é que proteínas apresentam tempos característicos de acomodação conformacional muito variados, sendo que grande parte os tempos característicos de *folding* conhecidos atualmente são grandes demais para serem plenamente simulados por DM. Podemos visualizar a situação de dados mais práticos: uma curta simulação de DM com duração de 1 nanossegundo ( $10^{-9}$  segundo), de uma proteína muito pequena (35 resíduos), em um computador *desktop* moderno leva por volta de 1 hora. Uma simulação razoável, portanto, de um fenômeno de 100 ns, para essa mesma proteína pequena, levaria uma semana.

Um dos grandes trunfos do GROMACS é proveniente ainda do fato de vir preparado para paralelização, um recurso que distribui igualmente o cálculo da trajetória entre os núcleos processadores disponíveis na máquina (ou no *cluster* de CPUs), a fim de aumentar a velocidade da simulação. No entanto, o aumento linear do número de processadores não é corresponde diretamente ao aumento da velocidade de simulação, já que na divisão do processamento entre diferentes nós, existem perdas de velocidade que são cumulativas e sobrepõem à eficácia da adição de processadores extras. Isso evidentemente varia de acordo com a versão do programa. Abaixo na **Tabela 1.2** encontram-se valores referentes a essa questão.

**Tabela 1.2** Resultados de desempenho do GROMACS conforme se aumenta o número de núcleos de processamento (*cores*). Os valores mostrados na tabela correspondem à quantidade de nanossegundos simulados por dia com um *time-step* de 5 fs (femtosssegundos) em um cluster *Core2Infiniband® Intel™* de 3 GHz. cpn é o número de núcleos de processamento por nós. Modificada de van der Spoel et al. (2005).<sup>130</sup>

cores	cpn	4	8	16	32	64	128
GROMACS 4	2	3.1	6.1	11.8	22.3	39.3	65.5
GROMACS 4	4	3.1	6.0	11.6	21.6	38.0	60.1
GROMACS 3.3	2	2.8	4.8	7.7	9.5		
GROMACS 3.3	4	2.7	4.8	7.0	8.4		

Outro fator importante a ser considerado pela forte influência no desempenho da simulação é o número de *bits* do processador. Uma máquina 64 bits, possui a capacidade de armazenamento de dados numéricos com precisão duas vezes maior que uma de 32 *bits*, o que torna o tempo de cálculo menor. O usuário pode ainda indagar sobre as vantagens sobre um (*micro*)*cluster* com duas CPU's de duplo processamento (*dual-core*) ou apenas um único computador com quádruplo ou óctuplo processamento (*quad/octo-core*). Obviamente o resultado pela superioridade nessa comparação varia muito de acordo com a qualidade, fabricante, tipo e quantidade de componentes utilizados (memória RAM, processadores, placa mãe *etc*), mas, novamente, quanto menos portas de troca de dados bem como caminhos para o fluxo de dados houver, melhor será a resposta do sistema. Portanto, a otimização de elementos de rede, quando possível, é desejável.

Neste trabalho, utilizamos 30% do tempo (72 cores) do cluster *Silicon Graphics International® Altix® XE 1300*, adquirido através do projeto temático FAPESP número 2008/11706-3 e hospedado no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Utilizamos também o supercomputador *BlueGene/P* localizado na *Rice University* (Texas - EUA), o qual foi possível através de recente convênio da Universidade de São Paulo com a *Rice University*. O supercomputador conta com 24.576 cores do tipo Power PC 450, cada um sendo de 32 bits e rodando a 850MHz. O sistema possui 4GB de RAM por nó (cada nó tem 4 cores) e 260TB de armazenamento compartilhado. Neste espaço, gostaria de agradecer e parabenizar o esforço da USP pelo estabelecimento deste convênio, permitindo que pesquisadores brasileiros tenham a oportunidade de desfrutar desta tecnologia de ponta, melhorando nossa competitividade no panorama internacional.

## 1.4 – Referências<sup>\*\*\*\*</sup>

- <sup>1</sup> REZENDE, J. M. D. **Linguagem médica**. 4a. Goiânia: Editora Kelps, 2011. 468 p. ISBN 9788540000995.
- <sup>2</sup> COLOMINES, J. ; PASCUAL, J. A. **Diccionario crítico etimológico castellano e hispánico**. Madrid: Gredos, 1980. v. <1-6 > ISBN 8424913620 (set).
- <sup>3</sup> GUBLER, D. J. ; KUNO, G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Wallingford, Oxon, UK ; New York: CAB International, 1997. xi, 478 p. ISBN 0851991343 (alk. paper).
- <sup>4</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2009. 147 p. ISBN 978 92 4 154787 1.
- <sup>5</sup> STROBEL, M.; MULLER, P.; LAMAURY, I. ; ROUET, F. Dengue fever: A harmful disease in patients with thrombocytopenia? **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p. 580-581, 2001.
- <sup>6</sup> YIP, W. C. L. Dengue haemorrhagic fever: current approaches to management. **Medical Progress**, 1980.
- <sup>7</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue haemorrhagic fever : diagnosis, treatment, prevention, and control**. 2nd. Geneva: World Health Organization, 1997. viii, 84 p. ISBN 9241545003.
- <sup>8</sup> GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 100-3, 2002.

---

<sup>\*\*\*\*</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- <sup>9</sup> National Institute of Health (EUA). NIH-developed candidate dengue vaccine shows promise in early-stage trial. 23 de Janeiro de 2013. Disponível em: < <http://www.nih.gov/news/health/jan2013/niaid-23.htm> >. Acesso em: 12/03/2013.
- <sup>10</sup> KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 73-83, 1998.
- <sup>11</sup> HOLMES, E. C. ; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infect Genet Evol**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2003.
- <sup>12</sup> ARUNACHALAM, N. et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 127, n. 4, p. 395-397, 2008.
- <sup>13</sup> WEAVER, S. C. ; BARRETT, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 789-801, 2004.
- <sup>14</sup> PONLAWAT, A. ; HARRINGTON, L. C. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 844-849, 2005.
- <sup>15</sup> GOLDI, E. A. **Os mosquitos no Pará**. Pará, Brazil, : C. Wiegandt, 1905. 154 p.
- <sup>16</sup> WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P. ; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.
- <sup>17</sup> World Health Organization. Avian influenza A(H7N9) virus 2013. Disponível em: < [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/influenza\\_h7n9/en/index.html](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/en/index.html) >. Acesso em: 20/04/2013.
- <sup>18</sup> HOWE, G. M. **A World geography of human diseases**. London ; New York: Academic Press, 1977. xxviii, 621 p. ISBN 0123571502.

- 19 NOBUCHI, H. Os sintomas da uma doença similar ao dengue registrados em uma enciclopédia médica Chinesa (original em Japonês). **Kanpo Rinsho**, v. 26, p. 422-425, 1979.
- 20 GUBLER, D. J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 442-450, 1998.
- 21 \_\_\_\_\_. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480+, 1998.
- 22 CAREY, D. E. et al. 1964 Chikungunya Epidemic at Vellore, South India, Including Observations on Concurrent Dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 4, p. 434-&, 1969.
- 23 HALSTEAD, S. B. Dengue Fever, Viral Hemorrhagic Fevers, and Rabies. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 332-337, 1992.
- 24 \_\_\_\_\_. Dengue Hemorrhagic-Fever - a Public-Health Problem and a Field for Research. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 1, p. 1-21, 1980.
- 25 KAUTNER, I.; ROBINSON, M. J. ; KUHNLE, U. Dengue virus infection: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. **Journal of Pediatrics**, v. 131, n. 4, p. 516-524, 1997.
- 26 BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 25, n. 496(7446), p. 504-7, 2013.
- 27 GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, p. S7-S16, 2010.
- 28 LUCERA, M. Ribeirão supera 3 mil casos de dengue. **Jornal "A Cidade"**, 2013.

- 29 LAFFERTY, K. D. The ecology of climate change and infectious diseases. **Ecology**,  
v. 90, n. 4, p. 888-900, 2009.
- 30 BBC News. Brazil dengue cases almost triple as new strain spreads. 2013.  
Disponível em: < <http://www.bbc.co.uk/news/world-latin-america-21585328> >.  
Acesso em: 11/04/2013.
- 31 SERVICE, M. W. Importance of ecology in *Aedes aegypti* control. **Southeast Asian J  
Trop Med Public Health**, v. 23, n. 4, p. 681-90, 1992.
- 32 MCBRIDE, W. J. H. ; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections;  
pathogenesis and epidemiology. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1041-1050,  
2000.
- 33 LAM, K. S. K. ; MARSHALL, I. D. Dual Infections of *Aedes Aegypti* with  
Arboviruses .I. Arboviruses That Have No Apparent Cytopathic Effect in Mosquito.  
**American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 17, n. 4, p. 625-&, 1968.
- 34 SIJU, K. P.; HILL, S. R.; HANSSON, B. S. ; IGNELL, R. Influence of blood meal on  
the responsiveness of olfactory receptor neurons in antennal sensilla trichodea of the  
yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 6, p.  
659-665, 2010.
- 35 HAO, H. L.; SUN, J. C. ; DAI, J. Q. Preliminary analysis of several attractants and  
spatial repellents for the mosquito, *Aedes albopictus* using an olfactometer. **Journal  
of Insect Science**, v. 12, 2012.
- 36 GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Research in  
Immunology**, v. 149, n. 7-8, p. 685-688, 1998.
- 37 HALSTEAD, S. B. ; OROURKE, E. J. Dengue Viruses and Mononuclear Phagocytes  
.1. Infection Enhancement by Non-Neutralizing Antibody. **Journal of Experimental  
Medicine**, v. 146, n. 1, p. 201-217, 1977.
- 38 HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue - Challenges to Molecular-Biology.  
**Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-481, 1988.

- 39 NAVARRO-SANCHEZ, E.; DESPRES, P. ; CEDILLO-BARRON, L. Innate immune responses to dengue virus. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 5, p. 425-435, 2005.
- 40 LIU, Y. J.; KANZLER, H.; SOUMELIS, V. ; GILLIET, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. **Nature Immunology**, v. 2, n. 7, p. 585-589, 2001.
- 41 REY, F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 6899-6901, 2003.
- 42 ALEN, M. et al. Antiviral Activity of Carbohydrate Binding Agents (CBAS) and the Role of DC-SIGN in Dengue Virus and HIV Infection. **Antiviral Research**, v. 82, n. 2, p. A22-A22, 2009.
- 43 ALEN, M. M. F. et al. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. **Virology**, v. 387, n. 1, p. 67-75, 2009.
- 44 KHARYA, G.; YADAV, S. P.; KATEWA, S. ; SACHDEVA, A. Management of Severe Refractory Thrombocytopenia in Dengue Hemorrhagic Fever With Intravenous Anti-D Immune Globulin. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 28, n. 8, p. 727-732, 2011.
- 45 ONLAMOON, N. et al. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. **Blood**, v. 115, n. 9, p. 1823-1834, 2010.
- 46 NAKAO, S.; LAI, C. J. ; YOUNG, N. S. Dengue Virus, a-Flavivirus, Propagates in Human-Bone Marrow Progenitors and Hematopoietic-Cell Lines. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1235-1240, 1989.
- 47 NOISAKRAN, S. et al. Detection of Dengue Virus in Platelets Isolated from Dengue Patients. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 40, n. 2, p. 253-262, 2009.

- 48 SAITO, M. et al. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 2, p. 299-303, 2004.
- 49 HOTTZ, E. et al. Platelets in dengue infection. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 8, n. 1-2, p. e33-e38, 2011.
- 50 MURGUE, B.; CASSAR, O.; GUIGON, M. ; CHUNGUE, E. Dengue virus inhibits human hematopoietic progenitor growth in vitro. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 6, p. 1497-1501, 1997.
- 51 LIN, C. F. et al. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. **Viral Immunology**, v. 19, n. 2, p. 127-132, 2006.
- 52 ALTMAN, R. et al. Collaborative Overview of Randomized Trials of Antiplatelet Therapy .1. Prevention of Death, Myocardial-Infarction, and Stroke by Prolonged Antiplatelet Therapy in Various Categories of Patients. **British Medical Journal**, v. 308, n. 6921, p. 81-100, 1994.
- 53 CINES, D. B.; WILSON, S. B.; TOMASKI, A. ; SCHREIBER, A. D. Platelet Antibodies of the Igm Class in Immune Thrombocytopenic Purpura. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 4, p. 1183-1190, 1985.
- 54 LIN, C. F. et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. **Journal of Medical Virology**, v. 63, n. 2, p. 143-149, 2001.
- 55 LIN, Y. S. et al. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 5, p. 515-523, 2011.
- 56 KRISHNAMURTI, C.; PEAT, R. A.; CUTTING, M. A. ; ROTHWELL, S. W. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 435-441, 2002.

- 57 TSAI, J. J. et al. Frequency Alterations in Key Innate Immune Cell Components in the Peripheral Blood of Dengue Patients Detected by FACS Analysis. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 5, p. 530-540, 2011.
- 58 CHEN, M. C. et al. Deletion of the C-Terminal Region of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Abolishes Anti-NS1-Mediated Platelet Dysfunction and Bleeding Tendency. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 3, p. 1797-1803, 2009.
- 59 SUHARTI, C. et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in Dengue Shock Syndrome. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 87, n. 1, p. 42-46, 2002.
- 60 BOZZA, F. A. et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **Bmc Infectious Diseases**, v. 8, 2008.
- 61 MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D. ; HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-319, 2004.
- 62 SOARES, R. O. S. ; CALIRI, A. Stereochemical features of the envelope protein Domain III of dengue virus reveals putative antigenic site in the five-fold symmetry axis. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 221-230, 2013.
- 63 CHEN, Y. C. et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against dengue virus type 1 for epitope mapping and serological detection by epitope-based peptide antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 4, p. 404-411, 2007.
- 64 ROEHRIG, J. T. et al. Contribution of disulfide bridging to epitope expression of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 78, n. 5, p. 2648-2652, 2004.
- 65 WU, H. C. ; HUANG, L. Identification of serotype-specific epitope of dengue virus by phage displayed random peptide library. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 268a-268a, 1999.

- <sup>66</sup> CHEN, Y. P. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, v. 3, n. 8, p. 866-871, 1997.
- <sup>67</sup> FLINT, S. J. **Principles of virology : molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses**. 2nd. Washington, D.C.: ASM Press, 2004. xxvi, 918 p. ISBN 1555812597 (hardcover).
- <sup>68</sup> GERMI, R. et al. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology**, v. 292, n. 1, p. 162-168, 2002.
- <sup>69</sup> Pierson, T. C. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Laboratory of viral diseases: program description., 2012. Disponível em: < <http://www.niaid.nih.gov/labsandresources/labs/aboutlabs/lvd/viralpathogenesissection/Pages/default.aspx> >. Acesso em: 18/04/2013.
- <sup>70</sup> VAN DER SCHAAR, H. M. et al. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. **Journal of Virology**, v. 81, n. 21, p. 12019-12028, 2007.
- <sup>71</sup> Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Phagosome - Homo sapiens (human). 2013. Disponível em: < [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa04145](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04145) >. Acesso em: 02/05/2013.
- <sup>72</sup> GIBBONS, D. L. et al. Conformational change and protein protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 320-325, 2004.
- <sup>73</sup> BRESSANELLI, S. et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. **Embo Journal**, v. 23, n. 4, p. 728-738, 2004.
- <sup>74</sup> ZYBERT, I. A.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; WILSCHUT, J. ; SMIT, J. M. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 3047-3051, 2008.

- 75 WENGLER, G. ; WENGLER, G. Cell-Associated West Nile Flavivirus Is Covered with E+Pre-M Protein Heterodimers Which Are Destroyed and Reorganized by Proteolytic Cleavage during Virus Release. **Journal of Virology**, v. 63, n. 6, p. 2521-2526, 1989.
- 76 MACKENZIE, J. M. ; WESTAWAY, E. G. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. **Journal of Virology**, v. 75, n. 22, p. 10787-10799, 2001.
- 77 ZHANG, X. et al. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2013.
- 78 COURAGEOT, M. P.; CATTEAU, A. ; DESPRES, P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. **Flaviviruses: Pathogenesis and Immunity**, v. 60, p. 157-186, 2003.
- 79 STIASNY, K. ; HEINZ, F. X. Flavivirus membrane fusion. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2755-2766, 2006.
- 80 GUZMAN, M. G. ; VAZQUEZ, S. The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. **Viruses-Basel**, v. 2, n. 12, p. 2649-2662, 2010.
- 81 CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KALAYANAROOJ, S. ; UBOL, S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 365-375, 2007.
- 82 RODENHUIS-ZYBERT, I. A. et al. Immature Dengue Virus: A Veiled Pathogen? **Plos Pathogens**, v. 6, n. 1, 2010.
- 83 DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 745-748, 2010.

- 84 KIMURA, R. ; HOTTA, S. Studies on dengue: anti-dengue active immunization experiments in mice. **Jpn. J. Bacteriol**, v. 1, p. 96-96, 1944.
- 85 SABIN, A. B. ; SCHLESINGER, R. W. Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. **Science**, v. 101, n. 2634, p. 640-642, 1945.
- 86 HALSTEAD, S. B. Studies on the attenuation of Dengue 4 **Asian J. Infectious Dis.**, v. 2, p. 112-117, 1978.
- 87 RUSSELL, P. K. Progress toward dengue vaccines. **Asian J. Infect. Dis.**, v. 2, p. 118-120, 1978.
- 88 BANCROFT, W. H. et al. Dengue Virus Type-2 Vaccine - Reactogenicity and Immunogenicity in Soldiers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 149, n. 6, p. 1005-1010, 1984.
- 89 VAUGHN, D. W. et al. Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. **Vaccine**, v. 14, n. 4, p. 329-336, 1996.
- 90 CHAMBERS, T. J.; TSAI, T. F.; PERVIKOV, Y. ; MONATH, T. P. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organization meeting. **Vaccine**, v. 15, n. 14, p. 1494-1502, 1997.
- 91 BECKER, Y. Dengue Fever Virus and Japanese Encephalitis-Virus Synthetic Peptides, with Motifs to Fit Hla Class-I Haplotypes Prevalent in Human-Populations in Endemic Regions, Can Be Used for Application to Skin Langerhans Cells to Prime Antiviral Cd8(+) Cytotoxic T-Cells (CtIs) - a Novel-Approach to the Protection of Humans. **Virus Genes**, v. 9, n. 1, p. 33-45, 1994.
- 92 ROEHRIG, J. T. et al. Enhancement of the Antibody-Response to Flavivirus B-Cell Epitopes by Using Homologous or Heterologous T-Cell Epitopes. **Journal of Virology**, v. 66, n. 6, p. 3385-3390, 1992.

- <sup>93</sup> TAN, B. H. et al. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. **Virology**, v. 216, n. 2, p. 317-325, 1996.
- <sup>94</sup> MASON, P. W. et al. Japanese Encephalitis-Virus Vaccinia Recombinants Produce Particulate Forms of the Structural Membrane-Proteins and Induce High-Levels of Protection against Lethal Jev Infection. **Virology**, v. 180, n. 1, p. 294-305, 1991.
- <sup>95</sup> LAI, C. J.; ZHAO, B.; HORI, H. ; BRAY, M. Infectious Rna Transcribed from Stably Cloned Full-Length Cdna of Dengue Type-4 Virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 12, p. 5139-5143, 1991.
- <sup>96</sup> POLO, S.; KETNER, G.; LEVIS, R. ; FALGOUT, B. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. **Journal of Virology**, v. 71, n. 7, p. 5366-5374, 1997.
- <sup>97</sup> BARRETT, A. D. T. ; TEUWEN, D. E. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 308-313, 2009.
- <sup>98</sup> MULLA, M. S. et al. Mosquito burden and impact on the poor: Measures and costs for personal protection in some communities in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 17, n. 3, p. 153-159, 2001.
- <sup>99</sup> HALSTEAD, S. B. ; THOMAS, S. J. Dengue vaccines. In: PLOTKIN, S. A., ORENSTEIN, W. A.;OFFIT, P. A. (Ed.). **Vaccines**. 6th. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders, 2013. cap. 44, p.1550 p. ISBN 9781455700905 (hbk.).
- <sup>100</sup> SABCHAREON, A. et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1559-1567, 2012.
- <sup>101</sup> Instituto Butantan. Butantan produz vacina contra a dengue. 2012. Disponível em: < [http://www.butantan.gov.br/home/releases/Butantan\\_produz\\_vacina\\_contra\\_dengue.pdf](http://www.butantan.gov.br/home/releases/Butantan_produz_vacina_contra_dengue.pdf) >.

- 102 ELION, G. B. et al. Selectivity of Action of an Anti-Herpetic Agent, 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)Guanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5716-5720, 1977.
- 103 KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.
- 104 ZHANG, X. K. et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-angstrom resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 105-U133, 2013.
- 105 PERERA, R. ; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.
- 106 ALLISON, S. L. et al. Oligomeric Rearrangement of Tick-Borne Encephalitis-Virus Envelope Proteins Induced by an Acidic Ph. **Journal of Virology**, v. 69, n. 2, p. 695-700, 1995.
- 107 ALLISON, S. L. et al. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. **Journal of Virology**, v. 73, n. 7, p. 5605-5612, 1999.
- 108 NYBAKKEN, G. E. et al. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 764-768, 2005.
- 109 VOLK, D. E. et al. Solution structure of the envelope protein domain III of dengue-4 virus. **Virology**, v. 364, n. 1, p. 147-154, 2007.
- 110 FRITZ, R.; STIASNY, K. ; HEINZ, F. X. Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion. **Journal of Cell Biology**, v. 183, n. 2, p. 353-361, 2008.
- 111 NAYAK, V. et al. Crystal Structure of Dengue Virus Type 1 Envelope Protein in the Postfusion Conformation and Its Implications for Membrane Fusion. **Journal of Virology**, v. 83, n. 9, p. 4338-4344, 2009.

- 112 LEACH, A. R. **Molecular modelling : principles and applications**. 2nd. Harlow, England ; New York: Prentice Hall, 2001. xxiv, 744 p., 16 p. of plates ISBN 0582382106 (pbk.).
- 113 OZKAN, S. B.; DILL, K. A. ; BAHAR, I. Fast-folding protein kinetics, hidden intermediates, and the sequential stabilization model. **Protein Science**, v. 11, n. 8, p. 1958-1970, 2002.
- 114 SCOTT, W. R. P. et al. The GROMOS biomolecular simulation program package. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 103, n. 19, p. 3596-3607, 1999.
- 115 KONY, D.; DAMM, W.; STOLL, S. ; VAN GUNSTEREN, W. F. An improved OPLS-AA force field for carbohydrates. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, n. 15, p. 1416-1429, 2002.
- 116 KIRSCHNER, K. N. et al. GLYCAM06: A generalizable Biomolecular force field. Carbohydrates. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 622-655, 2008.
- 117 XU, Z. T.; LUO, H. H. ; TIELEMAN, D. P. Modifying the OPLS-AA force field to improve hydration free energies for several amino acid side chains using new atomic charges and an off-plane charge model for aromatic residues. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2007.
- 118 KAHN, K. ; BRUICE, T. C. Parameterization of OPLS-AA force field for the conformational analysis of macrocyclic polyketides. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 977-996, 2002.
- 119 KLAUDA, J. B. et al. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 23, p. 7830-7843, 2010.
- 120 PRAKASH, P. ; SANKARARAMAKRISHNAN, R. Force Field Dependence of Phospholipid Headgroup and Acyl Chain Properties: Comparative Molecular Dynamics Simulations of DMPC Bilayers. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 266-277, 2010.

- 121 PANDIT, K. R. ; KLAUDA, J. B. Membrane models of E-coli containing cyclic moieties in the aliphatic lipid chain. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1818, n. 5, p. 1205-1210, 2012.
- 122 DICKSON, C. J. et al. GAFFlipid: a General Amber Force Field for the accurate molecular dynamics simulation of phospholipid. **Soft Matter**, v. 8, n. 37, p. 9617-9627, 2012.
- 123 WENSINK, E. J. W.; HOFFMANN, A. C.; VAN MAAREN, P. J. ; VAN DER SPOEL, D. Dynamic properties of water/alcohol mixtures studied by computer simulation. **Journal of Chemical Physics**, v. 119, n. 14, p. 7308-7317, 2003.
- 124 SUARDIAZ, R.; MAESTRE, M.; SUAREZ, E. ; PEREZ, C. Parameterization and validation of Gromos force field to use in conformational analysis of epoxidic systems. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, v. 778, n. 1-3, p. 21-25, 2006.
- 125 JORGENSEN, W. L. ; TIRADORIVES, J. The Opls Potential Functions for Proteins - Energy Minimizations for Crystals of Cyclic-Peptides and Crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 1657-1666, 1988.
- 126 TIRADORIVES, J. ; JORGENSEN, W. L. Molecular-Dynamics of Proteins with the Opls Potential Functions - Simulation of the 3rd Domain of Silver Pheasant Ovomuroid in Water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 7, p. 2773-2781, 1990.
- 127 LIM, J. B.; ROGASKI, B. ; KLAUDA, J. B. Update of the Cholesterol Force Field Parameters in CHARMM. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 1, p. 203-210, 2012.
- 128 JO, S.; LIM, J. B.; KLAUDA, J. B. ; IM, W. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 1, p. 50-58, 2009.
- 129 LINDAHL, E.; HESS, B. ; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001.

- <sup>130</sup> VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005.
- <sup>131</sup> PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845-854, 2013.

## Capítulo 2

# O domínio III da proteína E: propriedades estereoquímicas e seu potencial imunogênico

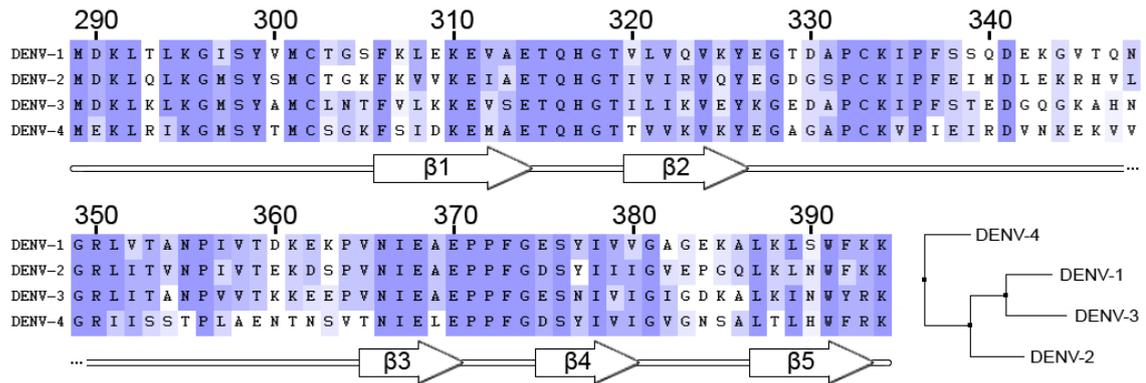
Neste segundo capítulo, é dado início à descrição de nosso trabalho com a proteína E do vírus da Dengue, especificamente seu domínio III (DIII), sob a perspectiva da simulação computacional, utilizando a técnica de Dinâmica Molecular. Como apresentado no Capítulo 1, o DIII é conhecido pelo seu potencial imunogênico, fato que, aliado as suas dimensões apropriadas à demanda computacional, bem como sua contiguidade estrutural primária, o torna um ótimo objeto de estudo para sua investigação estrutural. Aqui são apresentados resultados referentes à estabilidade estrutural do domínio III da proteína E (DIII) dos quatro sorotipos do Dengue, monitorando o aspecto de seu comportamento estrutural face à variação de condições de parâmetros termodinâmicos intensivos (pH e temperatura) as quais os vírus são submetidos durante o caminho viral desde a encubação no mosquito vetor, até a fusão de membranas dentro da célula do hospedeiro humano. Discutimos nossos principais resultados obtidos relativos à rigidez do DIII e a relativa insensibilidade de seu núcleo às variações termodinâmicas descritas e a importância da flexibilidade dos *loops* em relação a futuros estudos experimentais. Adicionalmente, apresentamos um estudo complementar que consiste na caracterização da interação do DIII com o fragmento ligante de antígeno (Fab) do anticorpo monoclonal mAb 1A1D-2, o qual se mostrou bastante eficiente na inibição da adsorção viral à célula hospedeira, promovendo neutralização da infecção viral em células de camundongo para os sorotipos 1,2 e 3.<sup>1</sup> Neste capítulo apresentamos mais de 7  $\mu$ s de tempo de simulação, distribuídos tanto em simulações com o domínio III (DIII) da proteína E de

cada sorotipo do vírus do Dengue, bem como sua interação com o fragmento de anticorpo monoclonal Fab 1A1D-2. Identificamos resíduos-chave na interface DIII-anticorpo, os quais participam da estabilização do complexo através de ligações não covalentes.

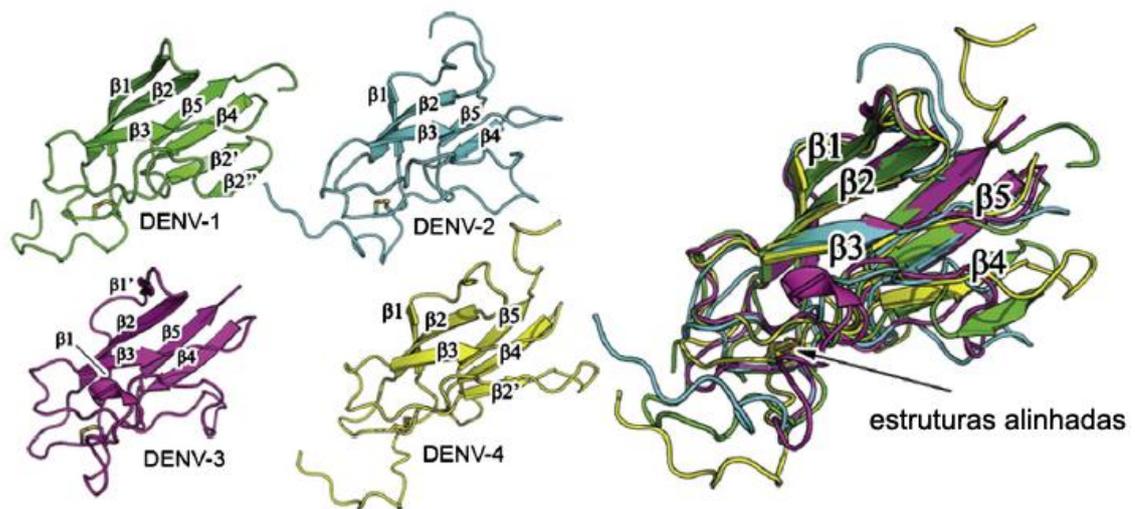
## 2.1 – Verificação da estabilidade estrutural do fragmento isolado do DIII

A topologia geral do DIII é do mesmo tipo da imunoglobulina C. O domínio é composto por cinco fitas  $\beta$  conservadas, e nenhuma hélice estável (**Fig. 1.15**, destacado em azul), com uma ponte dissulfeto (Cis302-Cis333) conectando a porção n-terminal do *hairpin* formado pelas fitas  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . Esta ligação é importante porque estabiliza a região de conexão dos domínios I/III através da “dobradiça” (*hinge*) entre eles. Por ser uma região bastante móvel, ela sofre considerável estresse mecânico, o qual poderia levar a uma desestabilização do DIII, no caso da ausência desta conexão S-S. Este fato de caráter estrutural, somado à completa conservação dos pares de cisteínas ao longo dos quatro sorotipos é um forte indicativo da grande relevância desta ligação.

De acordo com análise por alinhamento das sequências primárias dos domínios III dos quatro sorotipos com utilização do programa ClustalW2,<sup>2</sup> estes apresentam grau de identidade que varia da seguinte forma: 68% entre DENV 1-3, 63% entre DENV 1-2, 59% entre DENV 2-3, 58% entre DENV 2-4, 52% entre DENV 1-4 e 49% entre DENV 3-4 (**Fig. 2.1**). Estes valores indicam um maior grau de parentesco entre DENV-1 e DENV-3, estes tendo como grupo irmão o DENV-2. As similaridades apresentadas se refletem nas propriedades estruturais entre os sorotipos, que tendem a se comportar de maneira similar, mas não idêntica, como veremos adiante. Esta similaridade não se restringe apenas às estruturas primárias. Quando alinhados, os DIII dos diferentes sorotipos revelam grande conservação estrutural entre as fitas  $\beta$  (**Fig. 2.2**), fato importante a ser considerado, uma vez que isto pode ser um indício de que a função primária do DIII é manter a conformação de seu núcleo suficientemente invariável, e não participar de qualquer mudança conformacional que a proteína E sofre durante o processo de trimerização na superfície viral.



**Figura 2.1.** Estrutura primária do DIII dos quatro sorotipos do DENV utilizados neste trabalho. A numeração dos resíduos leva em consideração os domínios precedentes (I e II). A coloração dos resíduos segue a tabela Blosum62, com cores de intensas ao branco indicando respectivamente maior e menor conservação. Abaixo dos resíduos, um esquema da localização das fitas  $\beta$  representativas, bem como os *loops* (linhas retas). À direita, uma árvore de identidade, feita pelo método de junção por vizinhos no software ClustalW2.<sup>2</sup> Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>



**Figura 2.2** Similaridade estrutural compartilhada entre os DIII dos quatro sorotipos do dengue. Estas conformações são estruturalmente estáveis e resultam de 200ns de simulação em pH 7 e temperatura 298K. À esquerda as estruturas são orientadas no mesmo ângulo de visualização. À direita, o alinhamento estrutural dos sorotipos. Fitas  $\beta$  são indicadas de acordo com sua posição; a numeração obedece a ordem do N para o C terminal. Os símbolos de linha (-) indicam a presença de uma fita  $\beta$  não conservada. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>

Antes de promovermos um estudo sobre os efeitos de variações de qualquer natureza sobre uma estrutura, é necessário que conheçamos o comportamento padrão da mesma, além de verificarmos se a estrutura oferece estabilidade estrutural suficiente para a exequibilidade de um estudo deste tipo. Como o DIII trata-se de um fragmento da proteína E, em princípio, ele manteria sua topologia pelas condições nativas da estrutura viral, isto é, na presença e contato direto com os outros domínios adjacentes, bem como a bicamada lipídica viral. Dessa

forma, o isolamento do DIII em solução poderia causar variações estruturais severas, de forma a descaracterizar excessivamente sua configuração, impedindo efetivamente um estudo com esta abordagem. Por isso, uma primeira etapa consistiu na análise do comportamento estéreoquímico do DIII isolado dos quatro tipos de dengue em experimentos de dinâmica molecular com solvente explícito, a qual é apresentada a seguir.

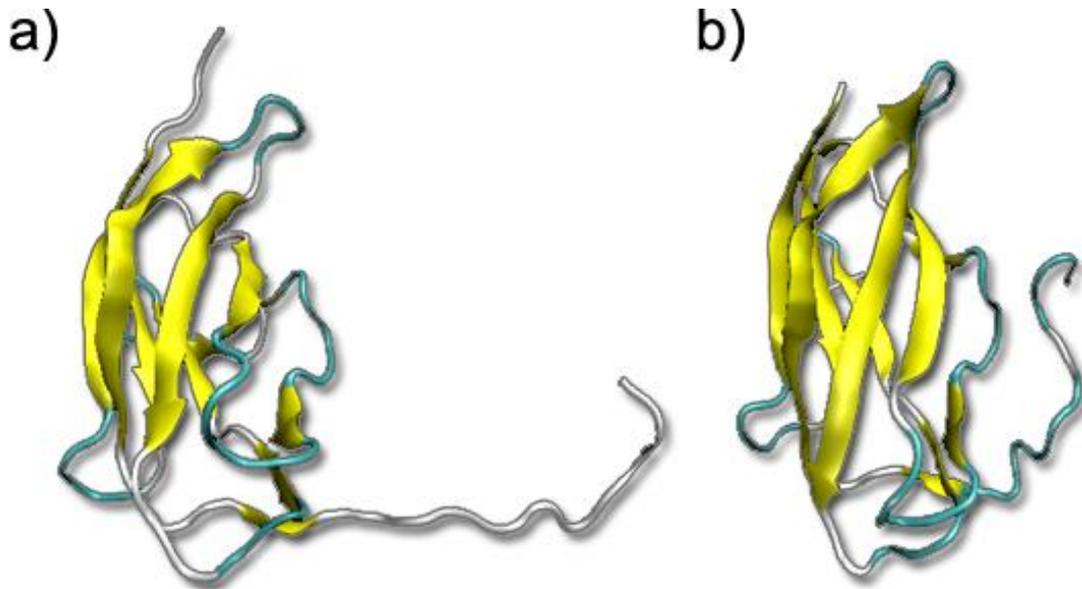
### 2.1.1 – Dinâmica molecular: parâmetros das simulações

Para dar início à construção de nossos sistemas, avaliamos os modelos resolvidos do DIII mais plausíveis e disponíveis no *Brookhaven Protein Data Bank* (<http://www.pdb.org/>):

- **DENV-1:** uma estrutura disponível para o ectodomínio (ausência de âncora e haste) da proteína E e uma estrutura para o fragmento DIII, sob os códigos **3G7T** (difração de raios X)<sup>4</sup> e **3IRC**,<sup>5</sup> respectivamente;
- **DENV-2:** quatro estruturas para o ectodomínio da proteína E e uma para o fragmento DIII são resolvidos. As proteína semi-completas, sob os códigos **1OAN** e **1OKE**,<sup>6</sup> **1TG8**<sup>7</sup> e **1OK8**,<sup>8</sup> e um fragmento de **DIII** sob o código **2SJF** (determinado por ressonância magnética nuclear - NMR);<sup>9</sup>
- **DENV-3:** uma estrutura resolvida por difração de raios X, apenas para a o ectodomínio da proteína E, sob o código de **1UZG**;<sup>10</sup>
- **DENV-4:** uma estrutura resolvida por ressonância magnética nuclear (NMR), apenas o fragmento DIII, sob o código **2HOP**.<sup>11</sup>

De acordo com estes dados, para esta primeira etapa, tínhamos disponíveis diretamente apenas os fragmentos DENV-1/DIII, DENV-2/DIII e DENV-4/DIII para a simulação de solvatação. Desta forma, foi necessário um tratamento na estrutura completa da proteína E do sorotipo 3, para a obtenção de seu domínio DIII. Esse tratamento consistiu na retirada de todos os heteroátomos e da sequência de aminoácidos desde o início do domínio I até a intersecção do domínio II com o III (resultando o fragmento **Met-287 a Lys-392**). Esse processo foi feito com o auxílio do programa VMD e por edição direta do arquivo pdb. Após a edição, o fragmento recém obtido, foi submetido a uma rápida simulação de minimização de

energia, causando o *coil* formado pelos resíduos próximos à região de conexão entre o domínio II e III a se retroceder em direção à grande porção de massa do DIII (Fig. 2.3), causando uma diminuição em seu raio de giração (compactação), e tornando a molécula mais esférica, e com energia potencial menor que anteriormente.

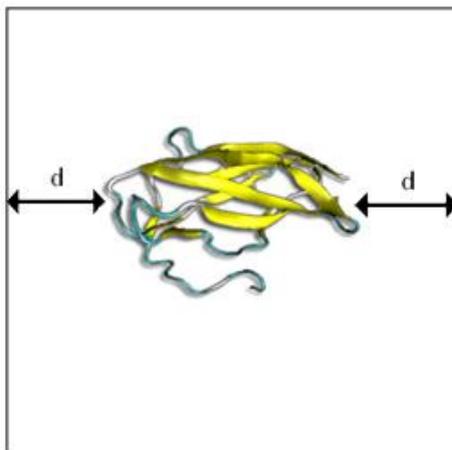


**Figura 2.3.** Detalhes do fragmento DEN3/DIII logo após sua remoção da proteína E. Note o *coil* da proteína (em branco): **(a)** se projetando e **(b)** compactando após o ajuste energético. Note que agora o *coil* inicial está muito mais próximo do centro de massa da molécula, o que nos permitiu a utilização de uma célula de simulação menor, com menos moléculas de água e, portanto, possibilitando uma simulação mais rápida. Fitas beta são representadas em amarelo, regiões de *loops* em azul e de *coils* em branco.

Similarmente, o mesmo processo foi utilizado para a obtenção de modelo inicial para o DENV-1. Apesar da disponibilidade do DENV-1/DIII no banco de dados (PDB ID: **3IRC**), a falta de artigo publicado e associado a esta entrada se mostrou como um fator restritivo à sua confiabilidade. Por isso preferimos editar a estrutura completa do ectodomínio da proteína E do modelo **3G7T**, isolando o DIII dos demais domínios. A preparação do modelo de DENV-2/DIII (PDB ID: **2SJF**) se deu pela remoção da cauda de poli-histidina na porção C-terminal da molécula; um remanescente da metodologia de cristalização para o experimento de difração de raios X, o qual foi utilizado para sua determinação estrutural pelos autores originais.

Para todas as simulações e análises utilizamos o pacote GROMACS na versão 4.x.<sup>12,13</sup> As simulações de dinâmica molecular com inclusão de todos os átomos (peptídeo, íons e água explícita) foram realizados nas mesmas condições fundamentais, com pequenas variações

apenas no número de moléculas de solventes e íons neutralizantes de cargas dos peptídeos. Utilizando o campo de força OPLS-AA,<sup>14</sup> o PME (*Particle mesh Ewald*) foi empregado para calcular as interações eletrostáticas entre os átomos. As proteínas e o solvente explícito, com modelo de água SPC<sup>15</sup> foram inclusos em unidades simulacionais individuais com geometria cúbica, de maneira que, em sua posição inicial, a proteína é centralizada e suas extremidades ao longo do eixo maior se distanciam em 1,2 nm das faces da caixa (Fig. 2.4). Todos os sistemas variam de 24000 a 38000 átomos, com aproximadamente 1700 deles sendo pertencentes às proteínas. Buscando uma carga total neutra dos sistemas em pH 7,0 (o qual é ajustado indiretamente pela fixação do estado de protonação correspondente dos resíduos ionizáveis e terminais), para cada célula de simulação, íons Cl<sup>-</sup> e Na<sup>+</sup> foram adicionados ao custo de moléculas de solvente, de forma a antagonizar a carga pré-existente nas proteínas. Com o propósito de eliminar maus contatos e anomalias energéticas, cada experimento passou por uma fase preparatória de minimização de energia através do método *steepest descent*, com auxílio do algoritmo SETTLE,<sup>16</sup> até a convergência de uma energia potencial menor que  $2 \times 10^3$  kJ mol<sup>-1</sup>. Em seguida, restringindo a movimentação da proteína em simulações de 2 ns, a configuração de moléculas de água SPC foi otimizada à uma solvatação apropriada ao redor da macromolécula. Além desta etapa de restrição, as simulações tiveram uma duração individual de 50 ns. O raio de corte das interações não ligadas foi ajustado para 1,0 nm, com inclusão de condições periódicas de contorno. LINCS<sup>17</sup> foi utilizado para constrição das ligações covalentes. Em uma configuração NPT, a pressão foi mantida constante a 1 atm e a temperatura a 298 K pelo barostato de Parrinello-Rahman<sup>18</sup> e termostato do tipo V-Rescale,<sup>19</sup> respectivamente. O tempo de integração para o algoritmo *leap-frog* no GROMACS foi ajustado para 2 fs, e a trajetória foi salva em disco-rígido a cada 10 ps. As visualizações moleculares e tratamentos gráficos foram feitas através dos softwares VMD<sup>20</sup> e PyMOL.<sup>21</sup>



**Figura 2.4.** O peptídeo de DENV/DIII é inicialmente centralizada em um espaço tridimensional cúbico com dimensões determinadas pela somatória do comprimento distal da proteína (maior distância entre um par de átomos) mais duas vezes uma distância  $d$  pré-determinada, sendo neste caso  $d=1,2\text{nm}$ . Logo em seguida, as moléculas de solvente são adicionadas, preenchendo o volume complementar ao volume da proteína na unidade cúbica.

Terminada a etapa de preparação das moléculas, cada domínio DIII dos quatro sorotipos do Dengue foram submetidos então ao processo de simulação por dinâmica molecular em caixa solvatada. A composição dos sistemas simulados é apresentada na Tabela 2.1. A temperatura do sistema foi mantida a 298K, com pH 7, e força iônica de 150mmol/L.

**Tabela 2-1.** Composição atômica e estado de ionização dos resíduos nos sistemas das simulações iniciais.

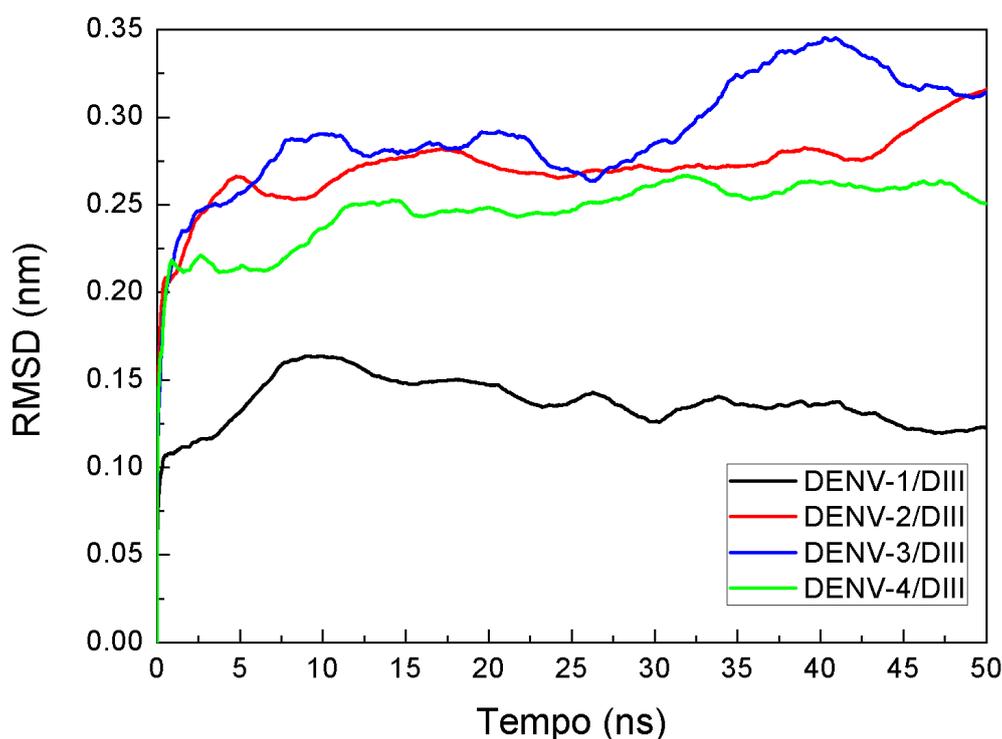
		Total	Proteína	Água	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Ionização <sup>+</sup>	Ionização <sup>-</sup>
DENV-1	pH 7	29345	1667	27678	15	15	13K,1R,1T <sub>N</sub>	4D,10E,1T <sub>C</sub>
DENV-2	pH 7	27371	1715	25656	15	15	11K,3R,1T <sub>N</sub>	5D,9E,1T <sub>C</sub>
DENV-3	pH 7	23755	1678	22077	15	17	14K,2R,1T <sub>N</sub>	4D,10E,1T <sub>C</sub>
DENV-4	pH 7	37672	1732	35940	15	16	11K,4R,1T <sub>N</sub>	3D,9E,1T <sub>C</sub>

Para nosso objetivo, a monitoração da raiz do desvio médio quadrático (*Root Mean Square Deviation – RMSD*) é suficiente para determinar quanto, em cada instante da trajetória, a estrutura se desviou de sua conformação inicial: quanto maior o RMSD, mais distante de seu estado nativo referencial, como determinado experimentalmente, a conformação proteica se encontra o DIII. Todos os valores de RMSDs apresentados neste trabalho contam com o ajuste das estruturas (*fit*) antes do cálculo do desvio em si. Para cada passo da simulação, a proteína é ajustada espacialmente ao modelo inicial, então a seguinte equação (2.1) é aplicada:

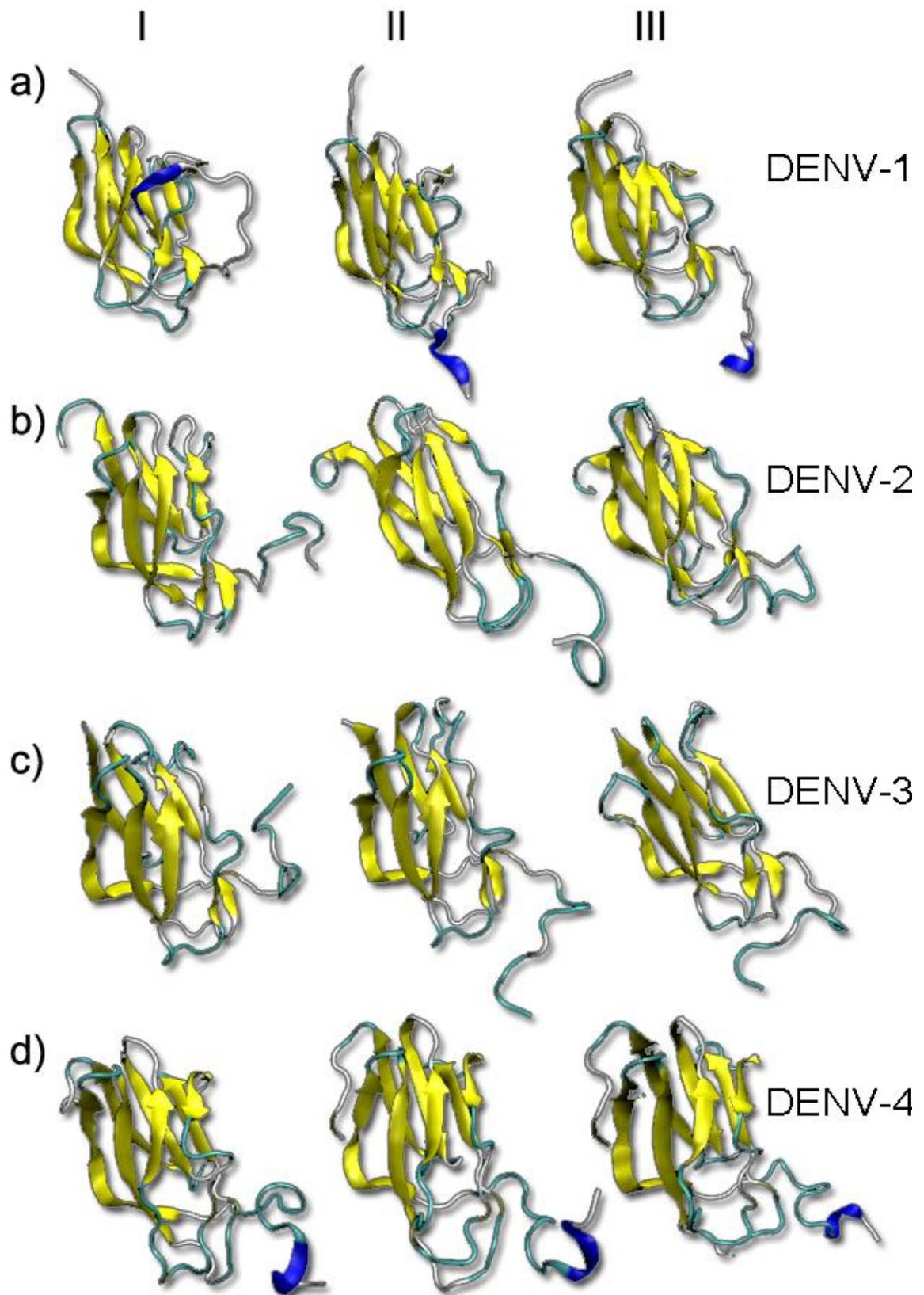
$$\text{RMSD}_{(t_1, t_2)} = \sqrt{\left[ \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|\mathbf{r}_i(t_1) - \mathbf{r}_i(t_2)\|^2 \right]}, \quad (2.1)$$

onde  $M = \sum_{i=1}^N m_i$  e  $\mathbf{r}_i(t)$  é a posição do átomo  $i$  da proteína nas configurações sobrepostas correspondente ao tempo arbitrário  $t$  e tempo inicial  $t = 0$ . Para este cálculo, as duas configurações (no tempo arbitrário  $t$  e tempo inicial  $t = 0$ ) são alinhadas de forma a minimizar o valor de RMSD. Para cálculo do RMSD, no pacote GROMACS utilizamos o programa *g\_rms*.

De acordo com os resultados de RMSD obtidos em 50ns de simulação (**Fig. 2.5**), de forma geral, a solvatação dos modelos de DIII dos quatro sorotipos em temperatura ambiente e pH neutro sofrem apenas ajustes estruturais mínimos, sem caracterização de perda de estrutura secundária (**Fig. 2.6**; vídeo 2-1.mpg no DVD em anexo).



**Figura 2.5.** Valores de RMSD (raiz do desvio quadrático médio) durante a simulação de solvatação dos modelos do DIII (dados intensivos: temperatura de 298K, pH 7 e força iônica de 150mmol/L) apresentam baixo grau de ajuste estrutural, sugerindo a estabilidade estrutural do fragmento de DIII quando isolado dos domínios I e II. A coloração das curvas é relacionada ao sorotipo pela legenda inserida no gráfico.



**Figura 2.6.** Instantes relativos às simulações dos DIII dos quatro sorotipos, como demonstrado na Figura 2.5 (itens a-d). Os algarismos romanos nomeiam três colunas que indicam o estágio da simulação que as imagens representam: I, estágio inicial, II, estágio intermediário e III, estágio final. Fitas beta são representadas em amarelo, regiões de *loop* em azul e de *coils* em branco.

A evolução temporal dos RMSDs, relativo aos quatro sorotipos, apresentam perfis similarmente lineares (indicação de estabilidade configuracional), embora com a distinção de dois patamares para o RMSD, um de  $\approx 0,15$  e o outro ao redor de  $0,35\text{nm}$ : todos os sorotipos apresentam rápida convergência aos valores médios, indicando níveis baixos de ajuste de cadeia, no entanto, DENV 1 estabiliza-se em valores de RMSD entre  $0,10$  e  $0,15$  nm, enquanto os DENV 2, 3 e 4 circundam até a marca dos  $0,35$  nm. No entanto, este fato indica apenas que cada grupo sofreu graus diferentes de ajuste de cadeia, porém como os valores registrados variam apenas entre aproximadamente  $0,10$  a  $0,35$  nm, este intervalo não reflete flutuação de cadeia suficiente para caracterizar desestabilização de estruturas secundárias e desnaturação da conformação molecular nativa para uma proteína deste tamanho. Desta pequena bateria de simulações, foi possível concluir então que apesar da diferença nas suas estruturas primárias, os RMSDs dos diferentes sorotipos se comportam de maneira similar, apresentando pouca flutuação. Estes resultados, em conjunto, constituem forte evidência da manutenção da estrutura terciária suficientemente inalterada, ou seja, os fragmentos DIII se mostraram estáveis nas condições dos experimentos, mesmo na ausência do restante da proteína E (domínios I e II). Esses resultados preliminares permitiram o avanço que levaram aos resultados descritos na próxima seção.

## 2.2 – Variações ambientais de parâmetros termodinâmicos intensivos

Após verificação da estabilidade estrutural do fragmento do DIII isolado, pudemos proceder para os próximos passos, os quais são apresentados nesta seção, a qual é fortemente baseada em nosso artigo recentemente publicado na *Biochimica et Biophysica Acta – Protein and Proteomics* (janeiro de 2013).<sup>3</sup> Aqui descrevemos os efeitos das variáveis termodinâmicas intensivas sobre a partícula viral, especificamente a proteína E. Estas variações são decorrentes da transição entre ambientes em que o vírus se encontra em diferentes estágios de seu ciclo: durante a incubação no trato digestório do mosquito *Aedes*, o DENV é submetido à temperatura ambiente (considerada aqui como  $25^{\circ}\text{C}$ , ou seja  $298\text{K}$ , pH neutro e força iônica fisiológica de  $150$  mmol/L); com sua inoculação na corrente sanguínea do hospedeiro, o vírus passa a enfrentar uma temperatura maior, agora de  $310\text{K}$ ; e finalmente, no processo de infecção, a incorporação do vírus da célula via endossomo é caracterizada pela acidificação do meio (de pH 7 para pH $\sim 5,5$ ). A variação destas condições apresenta consequências

estruturais, as quais são fundamentais para o rearranjo estrutural de seu envelope, e consequente fusão de membranas e inoculação de RNA no citosol da célula hospedeira.

### 2.2.1 – Resposta estrutural do DIII à variação de força iônica, temperatura e pH

Nesta seção nós introduzimos os sistemas de simulação que procuram mimetizar diferentes condições termodinâmicas que os vírus possam sofrer durante sua trajetória, como exemplificado na seção anterior. Apresentamos sistemas do DIII solvatado em dois níveis de temperatura (298K e 310K), com três níveis de pH (3, 5 e 7\*) para cada sorotipo, em cada temperatura, totalizando 24 sistemas independentes de simulação, cada um com duração de 200 ns. As simulações desta seção seguem os mesmos parâmetros descritos na seção 2.0.1, e a composição atômica de cada sistema é descrita na **Tabela 2.1**.

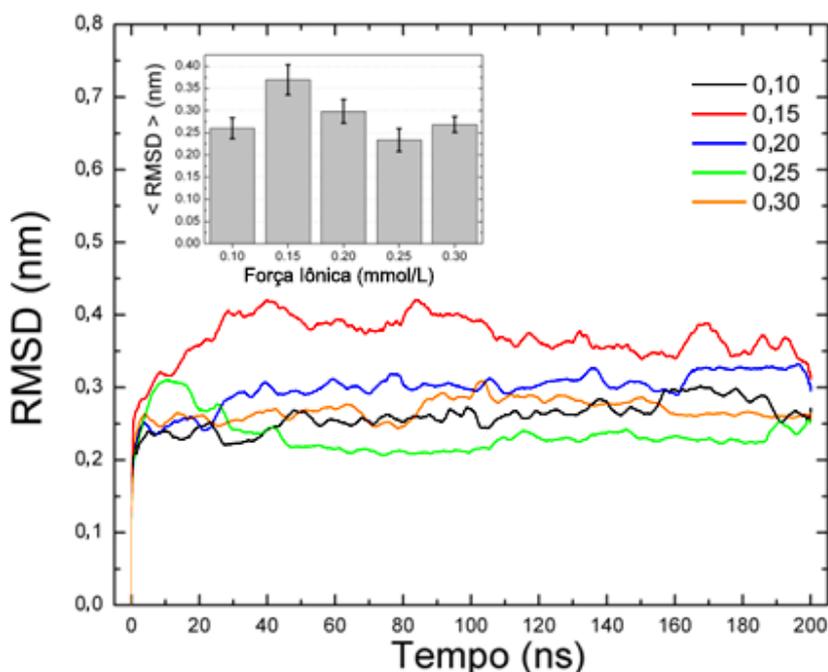
**Tabela 2.1.** Composição atômica e estado de ionização dos sistemas de simulação. Cada coluna descreve o número correspondente de átomos de cada componente. Também é descrito a relação do estado de protonação dos grupos ionizáveis da proteína, e suas respectivas quantidades. T<sub>N</sub> e T<sub>C</sub> indicam a porção N e C-terminal, respectivamente. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>

		Total	Proteína	Água	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Ionização <sup>+</sup>	Ionização <sup>-</sup>
DENV-1	pH 3	41474	1693	39765	0	16	13K,1R,1H,1T <sub>N</sub>	-
	pH 5	41429	1678	39720	15	16	13K,1R,1H,1T <sub>N</sub>	4D,10E,1T <sub>C</sub>
	pH 7	41433	1677	39726	15	15	13K,1R,1T <sub>N</sub>	4D,10E,1T <sub>C</sub>
DENV-2	pH 3	38949	1732	37200	0	17	11K,3R,2H,1T <sub>N</sub>	-
	pH 5	38514	1717	36765	15	17	11K,3R,2H,1T <sub>N</sub>	5D,9E,1T <sub>C</sub>
	pH 7	38507	1715	36762	15	15	11K,3R,1T <sub>N</sub>	5D,9E,1T <sub>C</sub>
DENV-3	pH 3	38963	1678	37266	0	19	14K,2R,2H,1T <sub>N</sub>	-
	pH 5	38921	1663	37224	15	19	14K,2R,2H,1T <sub>N</sub>	4D,10E,1T <sub>C</sub>
	pH 7	38920	1661	37227	15	17	14K,2R,1T <sub>N</sub>	4D,10E,1T <sub>C</sub>
DENV-4	pH 3	41494	1747	39729	0	18	11K,4R,2H,1T <sub>N</sub>	-
	pH 5	41455	1734	39690	13	18	11K,4R,2H,1T <sub>N</sub>	3D,9E,1T <sub>C</sub>
	pH 7	41460	1732	39699	13	16	11K,4R,1T <sub>N</sub>	3D,9E,1T <sub>C</sub>

Em nossos sistemas, a variação de pH é indireta, ou seja, não há a introdução de íons H<sup>+</sup>. A calibração é feita controlando-se individualmente a carga de cada resíduo ionizável (K,R,H,D e E), de acordo com seus valores de pKa.<sup>22</sup> No entanto, a adição de cargas introduz um desequilíbrio eletrostático à estrutura, e para a neutralização do sistema são adicionados íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> nas proporções correspondentes. Essa introdução de íons altera a força iônica do meio, e por isso, primeiramente, foi feita uma investigação dos efeitos dessa alteração

\* O pH 7 representa o pH neutro; pH 5 causa a protonação dos resíduos de histidinas; e pH 3, todos os resíduos ácidos são protonados e possuem carga neutra. Este último valor não tem associação direta com qualquer estágio conhecido do ciclo, mas é uma extrapolação útil a fim de promover mais suporte comparativo às análises finais.

sobre a estrutura. Submetemos o DENV-2 à temperatura de 310K e pH neutro por cinco séries independentes de duração de 200ns cada, com a variação de força iônica em início a 0,10 até 0,30 mol/L, em intervalos de 0,05 mol/L. Analisamos a deformação estrutural por RMSD (*Root Mean Square Deviation*)<sup>†</sup> (Fig. 2.7) e constatamos que os resultados mostram uma relação próxima entre as curvas, evidenciando que, neste problema em particular, a variação de força iônica neste intervalo, interfere *pouco* nesta estrutura em particular.

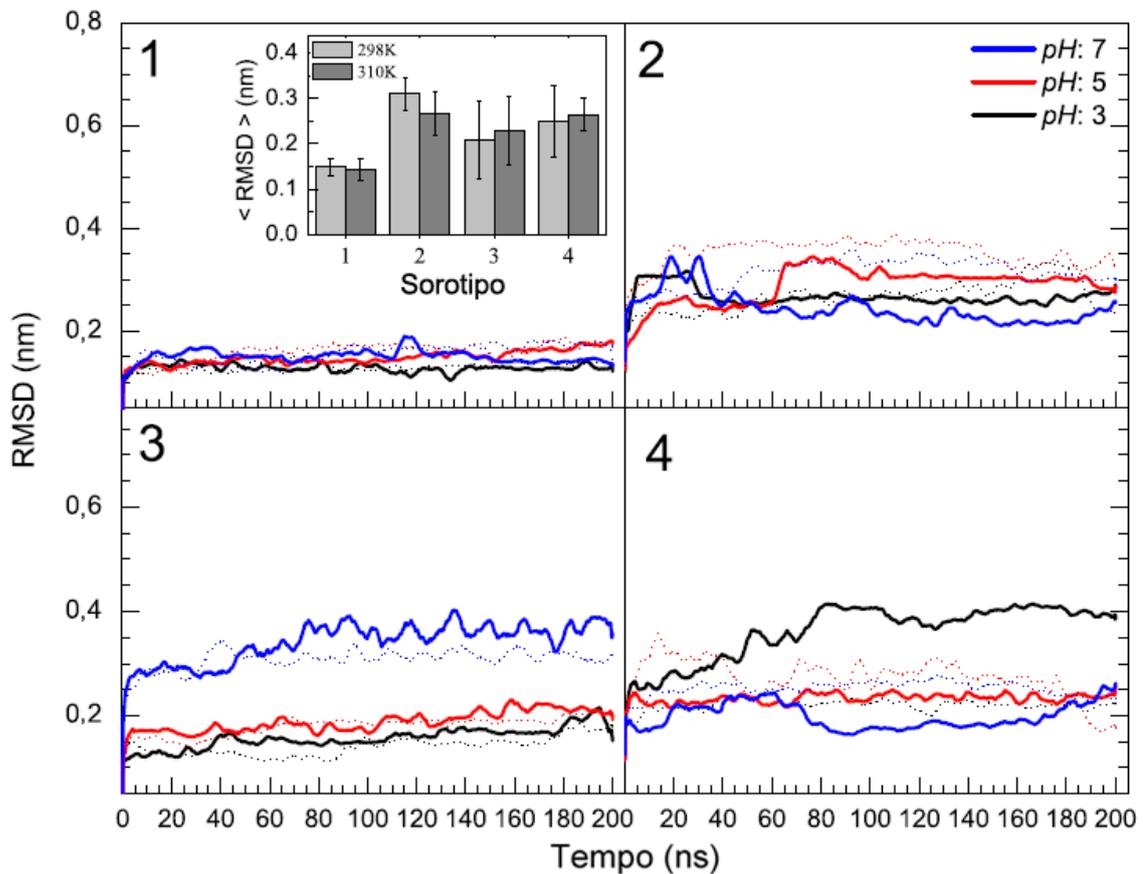


**Figura 2.7.** Evolução do RMSD (Root Mean Square Deviation) durante 200ns de dinâmica molecular, em pH 7 e temperatura 310K. Cada curva representa uma força iônica (segundo as cores indicadas na legenda), sendo o *inset*, um gráfico que indica as médias correspondentes.

Uma vez verificado a relativa insensibilidade do sistema à variação de força iônica, decidimos utilizar daqui para frente o valor fisiológico padrão de 150 mmol/L. Após a simulação de todos os 24 sistemas terem sido concluídas, foi possível uma análise inicial da deformação das cadeias, pela aplicação do RMSD nos carbonos alfa do *backbone* do DIII (Fig. 2.8). Os valores referentes ao DENV-1, apesar de algum nível de predominância de menores valores de RMSD em pH 3, não mostram variação estatística significativa: dentre os sorotipos, o DENV-1 é aquele que se mostrou mais insensível às variações de pH em seu

<sup>†</sup> Como previamente descrito, utilizamos o DIII na ausência de seus domínios vizinhos. Isso gera uma flexibilidade irreal aos seus N e C terminais, os quais são nativamente fixos. Por esse motivo, excluímos estas extremidades de todos os cálculos de RMSD neste trabalho, para evidenciar apenas as propriedades intrínsecas o do DIII.

núcleo rígido (**Fig. 2.8**). Adicionalmente, a compactação da cadeia e o conteúdo de estrutura secundária são mantidos relativamente constantes durante os 200ns.



**Figura 2.8.** Evolução do RMSD (*Root Mean Square Deviation* - carbonos alfa) em de 200ns de dinâmica molecular, diferentes condições de pH e temperatura. Linhas cheias representam temperatura de 310K, enquanto as pontilhadas são referentes a 298K. Os valores de pH seguem a coloração indicada na legenda. As curvas mostram como o DIII responde estruturalmente à mudanças nas condições intensivas do sistema, para cada sorotipo. Os comportamentos são diversos, variando de praticamente nenhuma reação estrutural (DENV-1) até variações conformacionais significativas para pH e temperatura específicos (DENV-3 e 4, em particular). **Inset:** média global do RMSD, ( $\langle \text{RMSD} \rangle$ ), para cada sorotipo às duas temperaturas distintas.  $\langle \text{RMSD} \rangle$  é uma média aritmética global dos valores de RMSD instantâneos das três condições de pH; ele estima a sensibilidade estrutural geral a mudanças no pH do sistema. As barras de erro indicam um desvio padrão de incerteza; elas medem a especificidade da resposta a diferentes níveis de pH: se a resposta é aproximadamente a mesma para todos os pHs, a barra de erro é pequena (DENV-1 e 2), caso contrário, ela tende a aumentar (DENV-3 e 4). Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>

No sorotipo 2 é detectado um afastamento mais significativo da estrutura inicial e também uma menor resposta (ainda que pequena) à variação de temperatura, com a estrutura se mostrando pouco mais rígida a 298K. Isso mostra a estabilidade deste sorotipo para ambas as temperaturas, apenas com pequenas modificações em certas regiões. Grande parte do rearranjo conformacional identificado é decorrente da flutuação dos *loops*  $\beta_2$ - $\beta_3$  e de  $\beta_4$ - $\beta_5$ .

Em ambas as temperaturas, existe uma leve predominância de maiores valores em pH 5, o que muito provavelmente ocorre pela ionização dos ácidos aspárticos e glutâmicos em relação ao pH mais ácido. As novas cargas negativas geram novas forças internas na forma de pontes salinas, o que dirige o DIII a conformações discretamente diferentes.

Os valores de RMSD para o DENV-3 são de várias maneiras similares àqueles do DENV-1, com exceção do pH neutro, que neste caso desloca expressivamente a estrutura à maiores deformações. Pela análise de RMSD fracionado, observamos que esse deslocamento de RMSD não se dá exclusivamente pela contribuição de uma única região; a estrutura apresenta um relaxamento generalizado, com um destaque à região entre Glu340 e Arg350, que engloba o *loop*  $\beta_4$ - $\beta_5$ . Isto se deve provavelmente à remoção da carga positiva da HIS347, o que induz uma variação de menos uma unidade elementar ( $-e$ ) na carga local.

De forma similar ao sorotipo dois, o DENV-4 mostra uma amplitude relativamente mais alta entre as diferentes simulações, o que é evidenciado pela diferença das amplitudes das barras de erros das médias entre 310K e 298K (**Fig. 2.8 - inset**). Em 298K (linha pontilhada) a estrutura do DIII em pH 5 mostra um comportamento interessante: durante aproximadamente 180 ns, a evolução da curva de RMSD mostra praticamente os maiores valores para este nível de pH, até que a região que envolve  $\beta_1$  e  $\beta_2$  sofre um pequeno rearranjo, de modo que, sua estrutura é levada a uma configuração mais próxima àquela da estrutura de referência. Em 310K, podemos verificar uma maior diferença entre as curvas. Desta vez é o pH 5 que menos flutua, apresentando comportamento similar à estrutura submetida a pH neutro. A estrutura representativa do ambiente mais ácido (pH 3), por sua vez, apresenta uma clara tendência de uma contínua deformação até por volta de 80ns, quando atinge uma relativa estabilidade assintótica. Novamente, as grandes variações no DIII são fruto majoritário da flutuação da região entre  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , envolvendo os resíduos entre Arg340 e Glu368.

O *inset* da **Fig. 2.8** mostra a media temporal total de RMSD, a qual, ilustra comparativamente a resposta conformacional do DIII às variações das condições intensivas do sistema, para cada sorotipo e temperatura. Tal média é obtida pela equação **2.2**:

$$\langle \text{RMSD} \rangle = (3 \times N)^{-1} \sum_{\{\text{pH}\}} \sum_{\{i\}} \text{RMSD}_i(\text{pH}), \quad (2.2)$$

onde,  $\langle \text{RMSD} \rangle$  é a média tomada sobre todos os três pHs considerados ao longo da trajetória, a qual é composta por um conjunto  $\text{RMSD}_i$  de  $N$  valores instantâneos para cada valor de pH. Estes valores indicam que a maior mudança conformacional ocorre no DENV-2: para esse sorotipo, o DIII desvia-se significativamente de sua configuração original em todas os parâmetros intensivos impostos. No entanto, a diferença estrutural do DIII em diferentes valores de pH parece não ser muito substancial e, neste sentido seu comportamento é um tanto similar àquele do DENV-1.

Sob a variação de pH e de temperatura, os diferentes sorotipos parecem responder de forma similar, mantendo-se estruturalmente estáveis (enovelados) em todas as condições apresentadas. No entanto, apesar da manutenção da estrutura como um todo, cada sorotipo apresenta respostas particulares tanto de forma geral, quanto em porções específicas da cadeia. Esta especificidade foi estudada por fracionamento do RMSD, que consiste na análise independente em blocos formados a cada 10 resíduos. Esta técnica nos permitiu identificar as regiões de maiores flutuações, as quais contribuem mais para o aumento do RMSD global. Estas regiões são basicamente *loops*, com destaque para a recorrência de alta flexibilidade para dois deles ( $\beta_2\text{--}\beta_3$  e  $\beta_4\text{--}\beta_5$ ), a serem mencionados com mais detalhes mais a frente no texto. Esta etapa nos levou à utilização de uma ferramenta mais apropriada para esta busca de flexibilidades distribuídas por regiões, mais especificamente as flexibilidades particulares a cada resíduo, calculando as raízes quadráticas médias da flutuação (RMSF - *Root Mean Square Fluctuation*) pela equação 2.3:

$$(\text{RMSF})_i = \frac{1}{T} \sqrt{\sum_{t_j=1}^T (r_i(t_j) - \bar{r}_i)^2}, \quad (2.3)$$

onde  $T$  é o tempo de amostragem, e  $\bar{r}_i$  é a posição média de referência do átomo  $i$ . Para este cálculo, utiliza-se o programa *g\_rmsf*.

Com o objetivo de comparar resultados experimentais disponíveis para as flexibilidades de cadeia dos DIIIs com aqueles obtidos por nós, seguimos dois protocolos. Para DENV-1 e DENV-3, os quais são originários de estruturas cristalográficas, o fator de temperatura (*B-factor*) de cada átomo é provido no próprio arquivo pdb original e, neste caso, empregamos a equação 2.4 para a conversão em RMSF:<sup>23</sup>

$$\text{RMSF} = \sqrt{\frac{(3 \times B_{factor})}{10(8\pi)^2}} \quad (2.4)$$

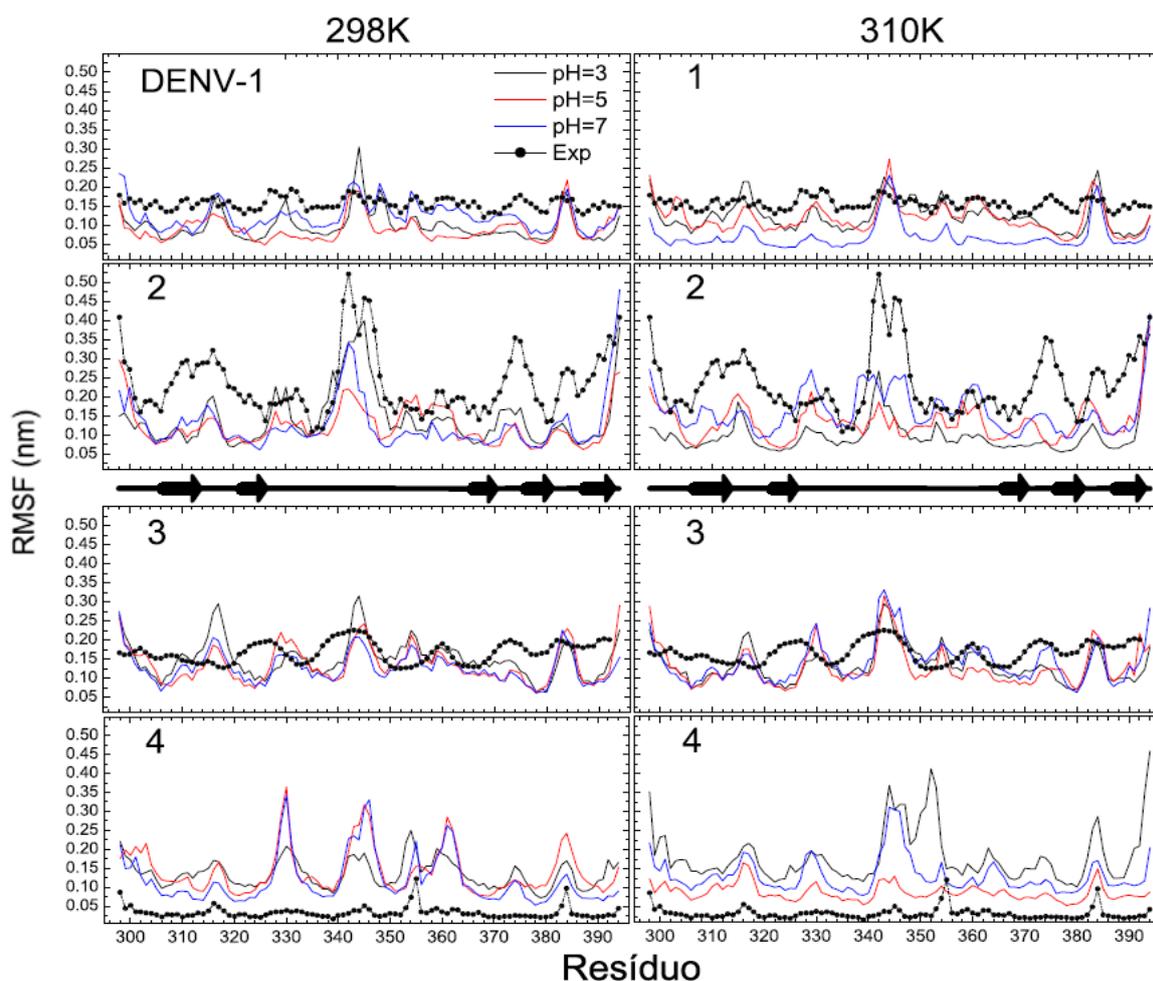
Por outro lado, DENV-2 e DENV-4 foram determinados por NMR e não possuem informação sobre o *B-factor* no arquivo pdb. Então o caminho foi executarmos uma análise de RMSF aplicada diretamente sobre as variações estruturais contidas nas estruturas dos modelos propostos, conforme apresentado no arquivo pdb correspondente. No entanto, devemos ter em mente que os modelos de uma estrutura determinada por NMR, conforme registrado no respectivo arquivo pdb, não refletem corretamente a amostragem necessária de uma distribuição de Boltzmann, podendo resultar (ao contrário daquela obtida de uma trajetória de dinâmica molecular) em uma amostragem muito pobre.<sup>24</sup>

Os dados da **Fig. 2.9** indicam que DENV-1 e DENV-2 mostram uma melhor concordância entre experimento e simulação; apesar de, em geral, subestimarem as amplitudes das flutuações dos dados experimentais, as simulações reproduzem qualitativamente a maioria dos resultados, concordando muito bem nas regiões de picos e vales.

No caso do DENV-4, ao contrário dos casos abordados acima, os valores numéricos dos dados experimentais são significativamente menores do que aqueles indicados pela simulação. Contudo, a alta flexibilidade de  $\beta_4$ – $\beta_5$  é evidente. Por sua vez, os dados experimentais do caso do DENV-3 mostram uma flutuação suavizada pouco usual, delineando, de certo modo, a flexibilidade de  $\beta_2$ – $\beta_3$ .

É importante notar que os dados experimentais dos quatro sorotipos apresentam notáveis perfis distintos sobre os padrões de flutuação entre eles, demonstrando assim que as condições experimentais particulares e coleta de dados devem ser devidamente considerados durante a fase de análise.<sup>3</sup> Ademais, as estruturas que foram originalmente determinadas como um monômero completo do ectodomínio da proteína E (DENV-1), como um dímero (DENV-3), ou isoladamente (DENV 2-4), carregam fatores de temperatura peculiares, já que a interação entre monômeros e/ou domínios vizinhos pode causar interferência significativa nesta variável.<sup>3</sup>

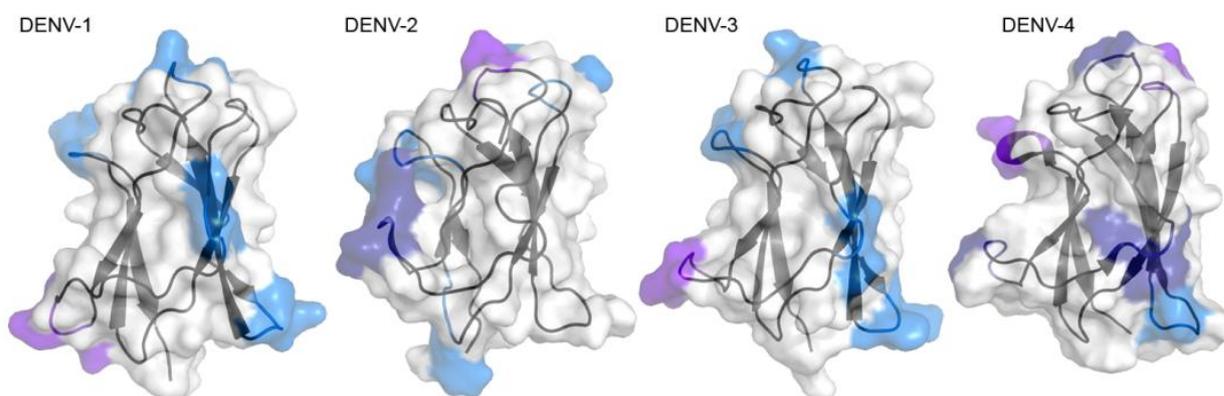
De posse destas análises, ficou evidente a grande flexibilidade das regiões de *loops* para os quatro sorotipos (**Fig. 2.9**). Estas regiões incluem os resíduos Gln316, (Thr,Asp,Glu,Ala)329, (Lys, Glu, Gln, Asn)343; (Asp, Glu, Lys, Asn)360, Phe373, and (Glu, Pro, Asp, Asn)384 (aminoácidos agrupados em parênteses significa que estão na mesma posição nos sorotipos de 1 a 4, respectivamente). Estes resíduos, com exceção do Gln316 e Phe373 –os quais são conservados nos quatro sorotipos– se encontram em regiões de baixa identidade, ou seja, com propensão a mutações, o que reflete nas alterações nas flexibilidades correspondentes. Os resultados de RMSF são importantes, pois corroboram as observações obtidas pela análise do RMSD, e indicam que os *loops*  $\beta_2$ – $\beta_3$  e  $\beta_4$ – $\beta_5$  são de fato duas das regiões mais flexíveis, sendo que a última, devido ao seu elevado fator de temperatura<sup>6</sup>, tem sido sugerido como alvo para reconhecimento imunológico.<sup>25</sup> Note que existem regiões ainda mais flexíveis, os N e C terminais, que não devem ser consideradas para qualquer efeito, visto que na superfície viral, estas regiões encontram-se conectadas à vizinhança, não exibindo a liberdade aqui apresentada.



**Figura 2.9.** Representação do RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) sobre 200ns de dinâmica molecular em diferentes condições de pH e temperatura. Os valores de pH seguem a coloração indicada na legenda. Ao centro, um guia da estrutura secundária nativa correspondente (setas indicam região de fita  $\beta$ ) ao resíduo indicado no eixo x. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>

## 2.2.2 – Áreas de maior flexibilidade: *loops* $\beta_2$ – $\beta_3$ e $\beta_4$ – $\beta_5$

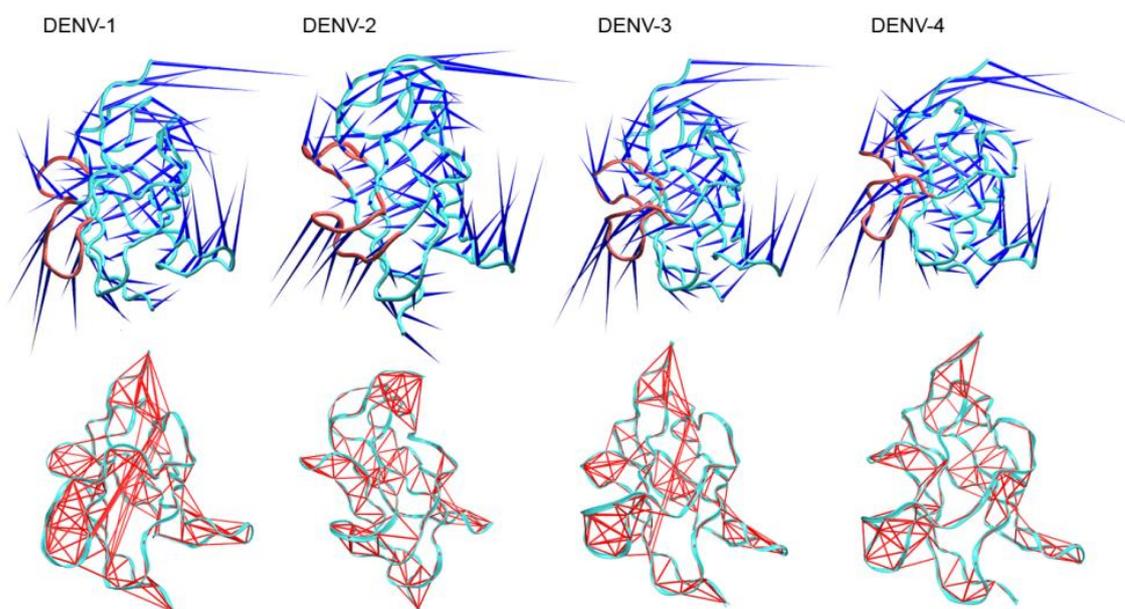
Os resultados obtidos na seção anterior destacam as regiões de *loops* do DIII em particular. Nestes *loops*, suas altas taxas de mutação sugerem especificidade; suas altas flexibilidades sugerem comportamento dinâmico (**Fig. 2.10**); a alta concentração de resíduos ionizáveis, incluindo histidinas, sugere sensibilidade à variação de pH; e seu posicionamento espacial na face interna do poro (veja seção 2.2.3) de simetria pentarradial na superfície do vírus imaturo, são boas evidências de sua particular importância. As flexibilidades descritas ocorrem em praticamente todos os pHs, no entanto, particularmente para o valor de pH neutro, o comportamento destes *loops* pode ser relacionado à uma possível eficiência seletiva da ligação do vírus à membrana celular do hospedeiro. Para cada sorotipo, a redução do pH afeta diretamente pontos distintos da estrutura, aumentando ou reduzindo localmente sua rigidez (**Fig. 2.9**).



**Figura 2.10.** Configurações representativas para os DIIs dos quatro sorotipos, indicando as áreas mais flexíveis da cadeia proteica. As colorações é relacionadas ao aumento do valor de RMSF, e respeitam as seguintes regras: menor que 0,16nm, branco; de 0,16 a 0,25nm, azul claro; de 0,26 – 0,35n, violeta; e maior que 0,36nm, azul escuro. Note que a maior parte das altas flexibilidades está associada a regiões de *loops*. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>

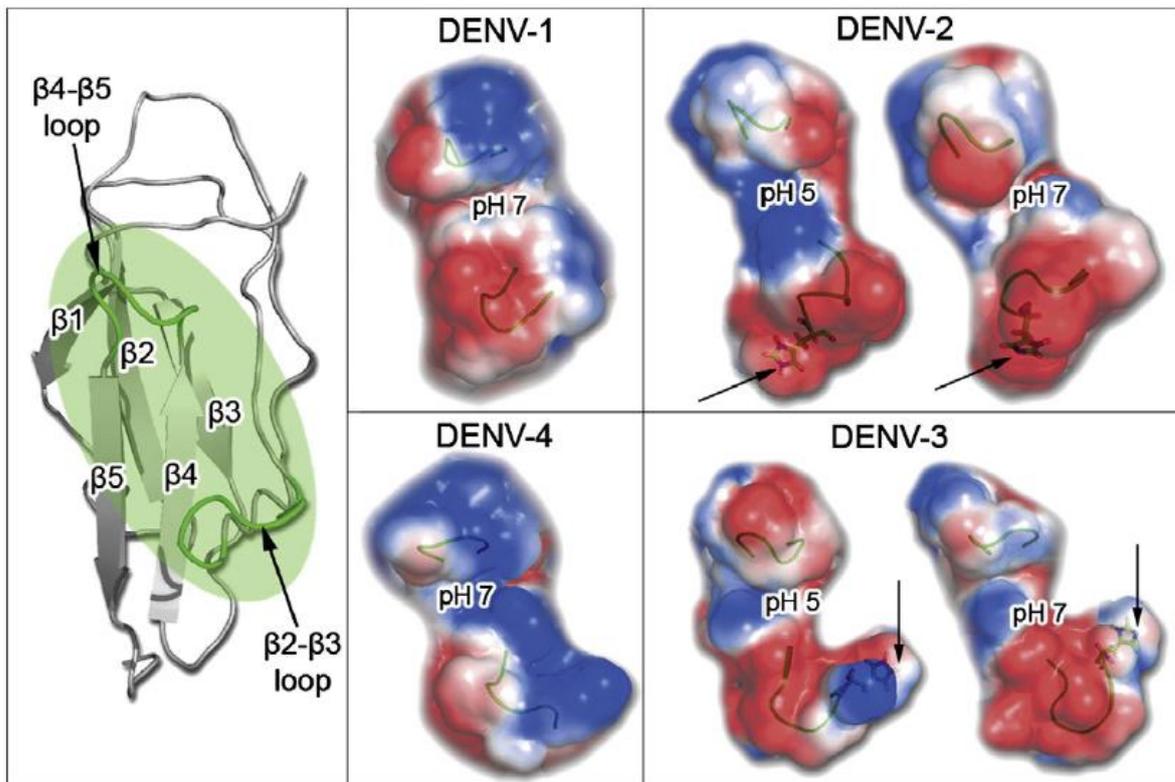
Para complementar nossas observações, calculamos os autovetores do DIII, por PCA (*Principal Component Analysis*),<sup>26</sup> método matemático esse que reduz um conjunto de dados correlacionados a um conjunto menor de dados não correlacionados, revelando assim algumas tendências de movimento (**Fig. 2.11**). Os resultados gerais indicam que os *loops* em questão compartilham praticamente da mesma direção de movimentação, ainda que com sentidos diferentes, de forma semelhante a uma dobradiça. Espera-se que uma nova abordagem na investigação desse local (seção 2.2.3) irá trazer mais detalhes sobre a interação

entre estas duas regiões. Adicionalmente, linhas de correlações atômicas indicam que DENV-1 e DENV-3 partilham de uma correlação de longa distância, outro resultado que indica a possibilidade de que estes sorotipos têm uma natureza de núcleo mais rígido (**Fig. 2.8**). A correlação também é alta dentro dos componentes dos *loops*, caracterizando grande interdependência de movimentos, o que em outras palavras, indicam que apesar de  $\beta_2$ - $\beta_3$  e  $\beta_4$ - $\beta_5$  serem flexíveis como um todo, sua configuração é robusta (**vídeo 2-2.mpg**).



**Figura 2.11. Sequencia superior:** representação tipo “porco-espinho” (*porcupine*) do primeiro autovetor gerado por análise do componente principal das estruturas representativas dos quatro sorotipos em pH neutro e temperatura de 310K. A magnitude dos vetores é proporcional à amplitude do movimento. Os *loops* de interesse são mostrados em vermelho. Deste ângulo em particular, pode-se observar seu movimento antagônico com vetores relativamente grandes. **Sequencia inferior:** representação das linhas de correlação (conjunto de átomos que se movem orquestralmente) a um nível de 70%. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>

As diferenças de identidade entre os quatro sorotipos, apesar da manutenção estrutural do centro rígido do DIII, exercem influência nas regiões de flexibilidade das moléculas, bem como seu superficial eletrostático. Além da histidina conservada na posição 317, apenas o DENV-2 e DENV-3 possuem histidinas adicionais. Elas estão localizadas nos *loops*  $\beta_2$ - $\beta_3$  e respondem ao aumento de uma carga elementar (+e) na passagem de pH neutro para ácido. Essa mudança na ionização modifica o perfil estéreo-elétrico da região (**Fig. 2.12**), o que pode levar a implicações importantes com relação à incorporação ligação de diversos possíveis ligantes (tais como anticorpos e fármacos), bem como ter parte na sinalização e resposta da célula hospedeira.

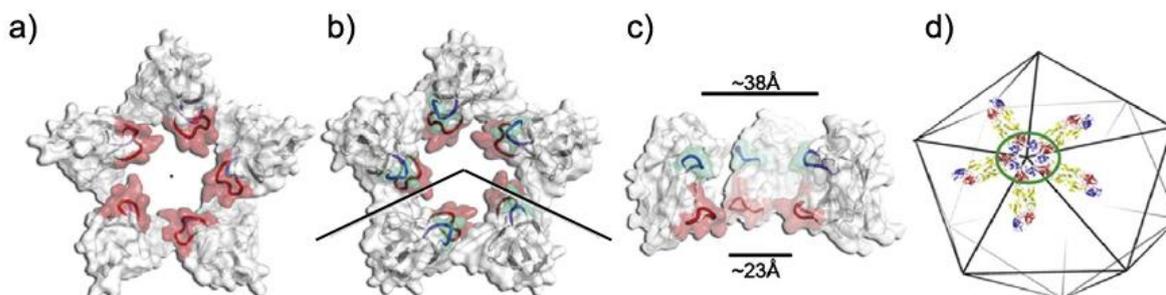


**Figura 2.12.** Detalhes dos mapas eletrostáticos representativos para os sorotipos, à temperatura de 310K e diferentes pHs. Na superfície, azul indica cargas positivas, e vermelho, negativas. Áreas de transição, neutras, são brancas. As estruturas estão alinhadas de uma maneira a evidenciar os *loops*  $\beta_2$ - $\beta_3$  (posicionamento mais inferior) e  $\beta_4$ - $\beta_5$  (superior). À esquerda, uma referência em *cartoon*, mostrando os *loops* correspondentes em verde. Os resíduos de histidinas que variam a carga, presentes nos *loops*, são apontados pelas setas pretas. DENV-1 e 4 aparecem apenas em pH 7 pois não apresentam diferença de cargas nos *loops* nessa variação de pH. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>

### 2.2.3 – Configuração quaternária do DIII: as regiões dos *loops* $\beta_2$ - $\beta_3$ e $\beta_4$ - $\beta_5$ como sítio imunogênico

Como visto anteriormente, as regiões envolvendo os resíduos 338–346 ( $\beta_2$ - $\beta_3$ ) e 380–386 ( $\beta_4$ - $\beta_5$ ) compartilham de características estereoquímicas notáveis. Adicionalmente, elas são localizadas faceando o eixo de simetria pentarradial do vírus maduro (Fig. 2.13; vídeo 2-3.mpg), onde os DIIs são intimamente relacionados, consistindo 12 aberturas (poros) espalhados pela superfície do envelope viral. Cada um destes poros é levemente mais proeminente e projetado da superfície do vírus:<sup>11</sup> uma característica topológica importante para a capacidade de comunicação com moléculas provenientes do ambiente externo, como por exemplo o inibidor fosfolipase A2 (tratada no Cap. 3). De fato, Zhang e colaboradores<sup>7</sup> já destacaram a importância desta região e seus três *loops* proeminentes (os quais todos

compartilham fatores de temperatura relativamente altos), sendo dois deles os nossos referidos  $\beta_2$ - $\beta_3$  e  $\beta_4$ - $\beta_5$ .



**Figura 2.13.** A configuração dos DIIs no poro pentarradial, como encontrado na superfície nativa do DENV. Ilustramos a vista inferior do poro, como vista de dentro para fora do vírus **(a)**, e também a vista de fora para dentro **(b)**. A linha preta delimita duas unidades de DIIs que, uma vez ocultadas, produzem a imagem rotacionada para o plano horizontal em **(c)**, mostrando a distribuição interna dos *loops* (note os diferentes diâmetros médios das regiões do poro). O *loop*  $\beta_2$ - $\beta_3$  é colorido em vermelho, enquanto o *loop*  $\beta_4$ - $\beta_5$  é azulado. Em **(d)** apresentamos a simetria icosaédrica do vírus, indicando a localização do poro de simetria pentarradial na superfície. As proteínas E são representadas de acordo com sua unidade assimétrica original. A circunferência verde indica a região do poro. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>

Aqui nós preparamos uma caixa de simulação com cinco unidades de DIIs na configuração de poro com o objetivo de discutir em detalhe o comportamento conformacional associado com a rede eletrostática nesta região, especificamente para o DENV-2. Cada *loop* entre os domínios constituindo o poro concentra alta ocorrência de (intra) ligações internas (intra *loop*) de hidrogênio (LH) e, em escala bem menor, também externas (inter) *loops* (**Tabela 2.2.**).

<i>Loop</i>	Pares (Doador-Aceptor)	<Ocorrência> (%)	$\Delta G$ (kcal/Mol)	Papel
$\beta_2$ - $\beta_3$	Asp341 <sub>m</sub> -His346 <sub>m</sub>	83.7	-1.01	Conexão da Base
	Glu343 <sub>m</sub> -Asp341 <sub>s</sub>	57.4	-0.18	Conexão da região mediana
	Lys344 <sub>m</sub> -Asp341 <sub>m;s</sub>	60.8	-0.27	Conexão da região mediana
	Arg345 <sub>m</sub> -Asp341 <sub>s</sub>	89.4	-1.31	Conexão da região mediana
	Arg345 <sub>s</sub> -Asp341 <sub>s</sub>	80.4	-0.87	Estabiliza estado fechado
	Val347 <sub>s</sub> -His346 <sub>s</sub>	37.1	0.32	Ligação externa adjacente
	Leu348 <sub>s</sub> -His346 <sub>s</sub>	26.1	0.64	Ligação externa adjacente
$\beta_4$ - $\beta_5$	Ile380 <sub>m</sub> -Leu387 <sub>m</sub>	96.8	-2.10	Conexão da base
	Gly385 <sub>m</sub> -Val382 <sub>m</sub>	56.5	-0.16	Conexão da região mediana
	Gln386 <sub>s</sub> -Gly381 <sub>m</sub>	68.2	-0.47	Conexão da região mediana
	Gln386 <sub>m</sub> -Glu383 <sub>m</sub>	29.0	0.55	Conexão da região mediana
	Leu387 <sub>m</sub> -Ile380 <sub>m</sub>	99.3	-3.05	Conexão da base
Entre <i>loops</i>	Lys344 <sub>s</sub> -Gln386 <sub>s</sub>	12.2	1.21	conexão $\beta_2$ - $\beta_3$ / $\beta_4$ - $\beta_5$
	Lys344 <sub>s</sub> -Glu383 <sub>s</sub>	21.4	0.80	conexão $\beta_2$ - $\beta_3$ / $\beta_4$ - $\beta_5$

**Tabela 2.2.** Interações não covalentes presentes nos *loops*  $\beta_2$ - $\beta_3$  e  $\beta_4$ - $\beta_5$  do poro pentarradial. A primeira coluna lista os pares que interagem através de sua cadeia principal (m: *main chain*) ou cadeia secundária (s: *side chain*). Demais colunas indicam a ocorrência e a energia livre de cada par, bem como seu papel desempenhado na estrutura local. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>

Estas interações são estabelecidas apenas entre um mesmo domínio, pois a distância entre as subunidades na região do *loop* é maior daquela necessária para a formação de LHs ou

pontes salinas (PS).<sup>3</sup> Análise de desvio estrutural na região dos *loops* (por RMSD) revela dois comportamentos distintos:  $\text{RMSD}_{\beta_2-\beta_3}$  apresenta um desvio médio da estrutura de referência quase três vezes maior que  $\text{RMSD}_{\beta_4-\beta_5}$ , com valores de  $0,27 \pm 0,05$  e  $0,11 \pm 0,02$ , respectivamente (**Fig. 2.14**, a). Nota-se que esta afirmação também é verdadeira para o desvio padrão, o qual é uma reflexão direta da flutuação estrutural que surge da troca entre os dois principais estados identificados de  $\beta_2-\beta_3$ , sendo um deles de configuração estreita ( $\alpha_1$ ) e outro mais larga ( $\alpha_2$ ) (**Fig. 2.14**, c-e).<sup>3</sup>

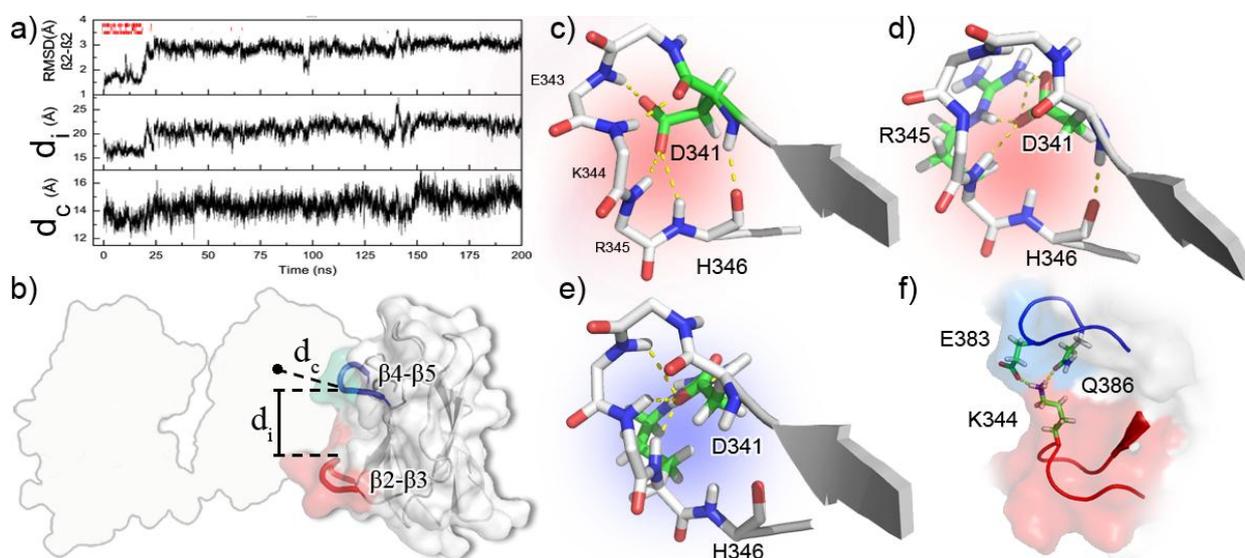
O *loop*  $\beta_2-\beta_3$  apresenta um padrão de ligações de hidrogênio que parece ser centralizado no ácido aspártico na posição 341 (Asp341). As razões principais do porquê Asp341 desempenhar um papel crítico são três: primeiramente, ele liga a região de base do *loop* por uma ligação persistente (*backbone-backbone*) com His346 (ocorrência média  $\phi=83.7\%$ ), estabilizando o *fold* geral desta estrutura secundária em particular, e tornando-a mais estreita ( $\alpha_1$ ). Em segundo lugar os átomos  $O_{\delta_1}$  e  $O_{\delta_2}$  de sua cadeia lateral agem como dois aceptores eficientes, os quais se configuram perfeitamente em uma geometria em grampo com o grupo de doadores da arginina na posição 345 ( $NH_{\eta_1}$  e  $NH_{\eta_2}$ ). Esta interação não é presente na estrutura cristalográfica e parece que, uma vez estabelecida, tende a persistir. Adicionalmente, a Arg345 também interage intensamente com a Asp341 através de seu grupo amida e  $\beta$ -carboxila, respectivamente. Em terceiro lugar, a Asp341 é 100% conservado entre todas as sequências dos quatro sorotipos do Dengue depositadas no banco de dados Uniprot<sup>27</sup> (apesar de não ser conservado entre o grande grupo das flaviviruses),<sup>28</sup> o que evidencia sua importância como uma impressão digital do Dengue.

O par Asp341-His346 apresenta uma ocorrência média de  $\phi = 83.7\%$ , a qual foi calculada considerando todos os cinco DIIs do poro, adicionando cada tempo individual de 200ns, somando o total de amostragem de 1 microssegundo. Se considerarmos que a atividade configuracional deste *loop* não é significativamente afetada pela vizinhança, a energia livre ( $\Delta G$ ) relacionada à transição da conformação  $\alpha_1$  para a  $\alpha_2$  (mais larga para mais estreita) pode ser estimada pela relação:<sup>29,30</sup>

$$\Delta G = RT \ln \left[ \frac{\phi}{(1-\phi)} \right], \quad (2.5)$$

que fornece  $\Delta G \approx -1.01$  kcal/mol. Os parâmetros são  $R=1.99$  cal/(K mol) (constante universal dos gases) e  $T = 310$  (temperatura fisiológica absoluta; em K).

Na base do *loop*  $\beta_4$ - $\beta_5$ , os pares Ile380(NH)-Leu387(O) e 387Leu(NH)-Ile380(O) respondem pelas maiores ocorrências ( $\phi = 99.26\%$  e  $\phi = 96.84\%$ , respectivamente); ligações de hidrogênio entre Gly385(N)-Val382(O), Gln386(N<sub>e2</sub>)-Gly381(O) e Gln386(N)-Glu383(O) também são frequentes. Outrossim, interações entre  $\beta_2$ - $\beta_3$  e  $\beta_4$ - $\beta_5$  em uma mesma subunidade são mais ou menos frequentes. Elas são responsáveis pela ligação de ambos os *loops*, os tornando mais próximos quando pontes salinas entre Lys344(N<sub>ε</sub>)-Glu383(O<sub>ε2</sub>) e Lys344(N<sub>ε</sub>)-Gln386(O<sub>ε1</sub>) são estabelecidas (**Fig. 2.14, f**). Isto caracteriza os já mencionados movimentos antagonistas (dobradiça), como ilustrado na Figura 2.11 (sequencia superior). Esta rede dita a proximidade entre os *loops*, bem como seus formatos básicos, tendo também um efeito evidente no diâmetro do poro, de aproximadamente 23Å (**Fig. 2.13, a,b**). Especulamos que esta rede também pode servir como um agente tampão de cargas que ficariam disponíveis pela reconfiguração da superfície eletrostática no evento de uma mudança ambiental, a qual pode ser originada pela introdução de cargas locais externas, desencadeado, por exemplo, pela aproximação de outras moléculas (possíveis ligantes).



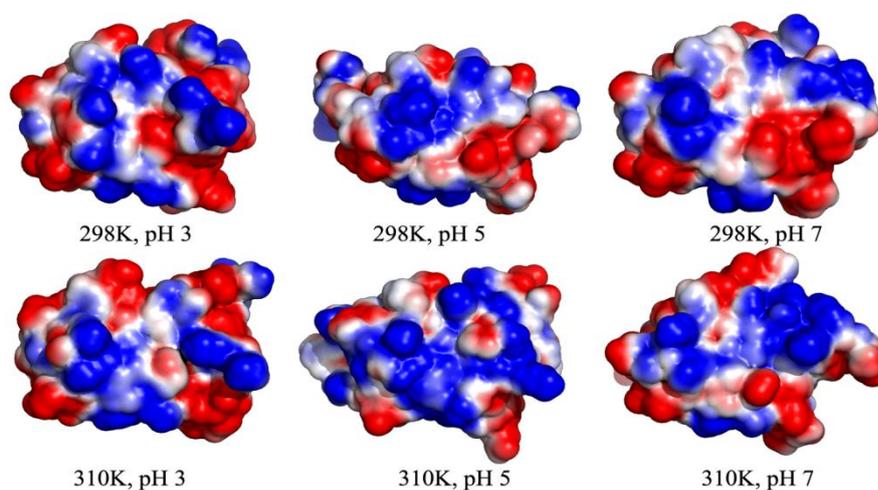
**Figura 2.14.** Detalhes das interações eletrostáticas de DENV-2 sob a esfera da superfície interna do poro pentarradial. **a)** quando desestabilizado, por volta de 25ns, as ligações de hidrogênio e as pontes salinas (barras vermelhas indicam a –mínima– ocorrência de ambos) envolvendo Lys344 [como representado em **(f)**], promove a reconfiguração do *loop*  $\beta_2$ - $\beta_3$ , aumentando a distância entre ambos os *loops* em questão ( $d_i$ ), expandindo levemente o raio do poro ( $d_c$ ), como demonstrado por  $d_i$  e  $d_c$ , respectivamente, em **(b)**. Esta reconfiguração destaca a transição da configuração  $\alpha_1$  (**c-d**) para  $\alpha_2$  (**e**), com modificações sutis na rede de ligações de hidrogênio. Resíduos que interagem através de seu *backbone* e/ou suas cadeias laterais tem seus átomos de carbono coloridos em verde. Ligações de hidrogênio e pontes salinas são coloridas em linhas amarelas pontilhadas. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>

A propriedade de poder responder às variações físico-químicas ambientais tem um efeito direto nas flutuações estruturais do DIII; tal intensidade é dependente do sorotipo e tende a ser mais pronunciada nas regiões dos *loop*  $\beta_2\text{-}\beta_3$  e  $\beta_4\text{-}\beta_5$  (**Fig. 2.7**).<sup>3</sup> O núcleo rígido do DIII é composto principalmente por regiões de alta similaridade, promovendo estabilidade estrutural das fitas  $\beta$ , que funcionam como um apoio aos *loops*  $\beta_2\text{-}\beta_3$  e  $\beta_4\text{-}\beta_5$ , e que, por sua vez, apresenta especificidade do tipo impressão digital, bem como maior capacidade de explorar o espaço configuracional. Como o padrão de flexibilidade interna das proteínas é um fator requerido para reconhecimento molecular ótimo,<sup>31</sup> o comportamento estrutural do DIII parece preencher os atributos conformacionais para o processo de infecção transcorrer: as regiões de baixa identidade implicam propriedades físico-químicas distintas ao DIII dos quatro sorotipos, conseqüentemente induzindo potenciais eletrostáticos particulares na superfície viral e, portanto, um perfil específico de resposta a variações externas de parâmetros termodinâmicos intensivos. As conseqüências de tais especificidades sutis em cada sorotipo poderia, *a priori*, contar como um dos fatores responsáveis para a resposta imune em relação à ineficiência de neutralização de sorotipos distintos, já que o *status* imune e fatores genéticos do hospedeiro também são fatores determinantes para a infecção.<sup>32</sup> A configuração das proteínas E constituindo o poro pentarradial, com os DIII orientados simetricamente ao centro, torna este conjunto uma região interessante a focar futuros esforços. Os *loops* que mostram as maiores flexibilidades, o  $\beta_2\text{-}\beta_3$  e  $\beta_4\text{-}\beta_5$ , são expostos ao lado interno do poro, e uma rede intrincada de ligações de hidrogênio e pontes salinas na região é responsável por manter as interconexões dinâmicas entre os *loops* da mesma subunidade, mas não entre subunidades vizinhas. Esta rede é mantida em todos os sorotipos, no entanto, se tratando de uma área de baixa identidade, resíduos participantes distintos são encontrados, com exceção do Asp341, que é conservado e tem papel fundamental na dinâmica do *loop*. Todas estas características adicionam à sugestão de que esta região interna do poro pentarradial poderia constituir um alvo funcional para estratégias antivirais, já que ele exhibe especificidade estereoquímica e uma rica flexibilidade modulada pelo microambiente circundante. Nesta região, outras moléculas e íons específicos podem efetivamente formar ligações químicas, influenciando (possivelmente impedindo) em passos-chave do rearranjo do envelope viral, o qual, leva à infecção da célula hospedeira.

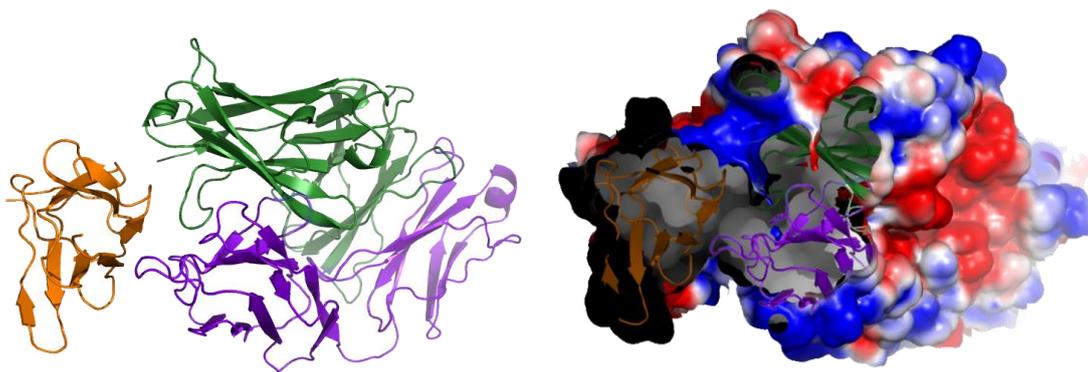
### 2.3 – Interação do DENV-2/DIII com o anticorpo Fab 1A1D-2

Em estudo complementar, nós buscamos analisar quantitativamente a área de contato entre o DIII e o anticorpo monoclonal Fab 1A1D-2 (composto de um heterodímero – fragmento variável a cadeia leve e a cadeia pesada), após uma simulação de equilíbrio, em pH neutro, temperatura de 310K e força iônica de 0,15 mol/L. Aproveitamos nossos resultados da seção anterior, para avaliar os efeitos na superfície eletrostática no sítio de ligação do DIII isolado, quando submetido às alterações descritas de pH e temperatura (**Fig. 2.15**). Os resultados (publicados em Soares e Caliri, 2013)<sup>33</sup> mostram significantes alterações nas polaridades, mesmo que cargas se mantenham aproximadamente na mesma proporção. Estes perfis tendem, porém, a mudar de acordo com seu meio circundante, e serão diferentes na proximidade do anticorpo.

As coordenadas iniciais do complexo DENV-2/DIII-Fab-1A1D-2 foram determinadas por cristalografia de raios X<sup>1</sup> e obtidas do PDB sob o código de 2R29 (**Fig. 2.16**).



**Figura 2.15.** Representação da superfície eletrostática das estruturas isoladas do DENV-2, exibindo a distribuição de cargas variando de acordo com a condição de temperatura e pH. A face mostrada aqui é àquela com a qual o anticorpo em questão interage. A coloração segue o mesmo padrão da Figura 2.10. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>3</sup>



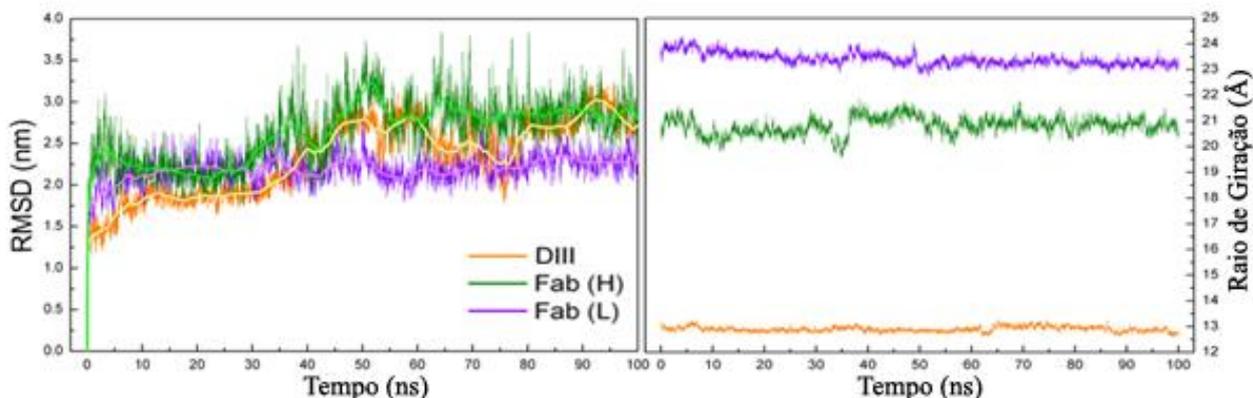
**Figura 2.16.** À esquerda, o complexo DIII/Fab 1A1D-2 em representação de *cartoon*. O DIII é colorido em alaranjado, enquanto os fragmentos das regiões variáveis cadeias pesada e leve, são coloridas em, respectivamente verde e violeta. À direita um esquema da superfície eletrostática do anticorpo (pH 7 e temperatura 298K), em corte, mostrando como a mesma se adéqua ao DIII (em *cartoon*). A coloração eletrostática segue o mesmo padrão da Figura 2.15. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>33</sup>

O complexo proteico de três unidades se mostrou suficientemente estável estruturalmente (**Fig. 2.16; vídeo 2-4.mpg**) na janela de tempo atual de simulação. Esta estabilidade estrutural ocorre de duas maneiras, tanto para a integridade do complexo, que se mantém unido por ligações não covalentes, quanto para os monômeros, estes que conservam sua estrutura terciária. Após uma rápida acomodação estrutural (RMSD  $\approx 2$ nm) o complexo mostra que suas três subunidades sofreram pouca variação durante os 30 nanossegundos iniciais quando então tanto o DIII quanto o fragmento da cadeia pesada do anticorpo, sofreram um pequeno reajuste em um período de 20 ns, enquanto o fragmento da cadeia leve se manteve relativamente estável (com RMSD ao redor de  $2,0 \pm 0,3$ nm) o tempo todo. Dentre as três subunidades, o DIII é o que apresenta maiores flutuações estruturais recorrentes (isto é, flutuações não desnaturantes). Estes valores do RMSD, relativamente baixos, e juntamente com o fato da manutenção das estruturas secundárias, constituem evidências de estabilidade conformacional do sistema.

A compactação das cadeias também foi estudada neste caso. Esta análise é dada pelo parâmetro do raio de giração ( $R_g$ ), o qual aumenta proporcionalmente à medida em que a cadeia peptídica se expande ou deforma. A evolução do  $R_g$  é obtido através do programa *g\_gyrate*, que se utiliza da equação:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i \|\vec{r}_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i}}, \quad (2.5)$$

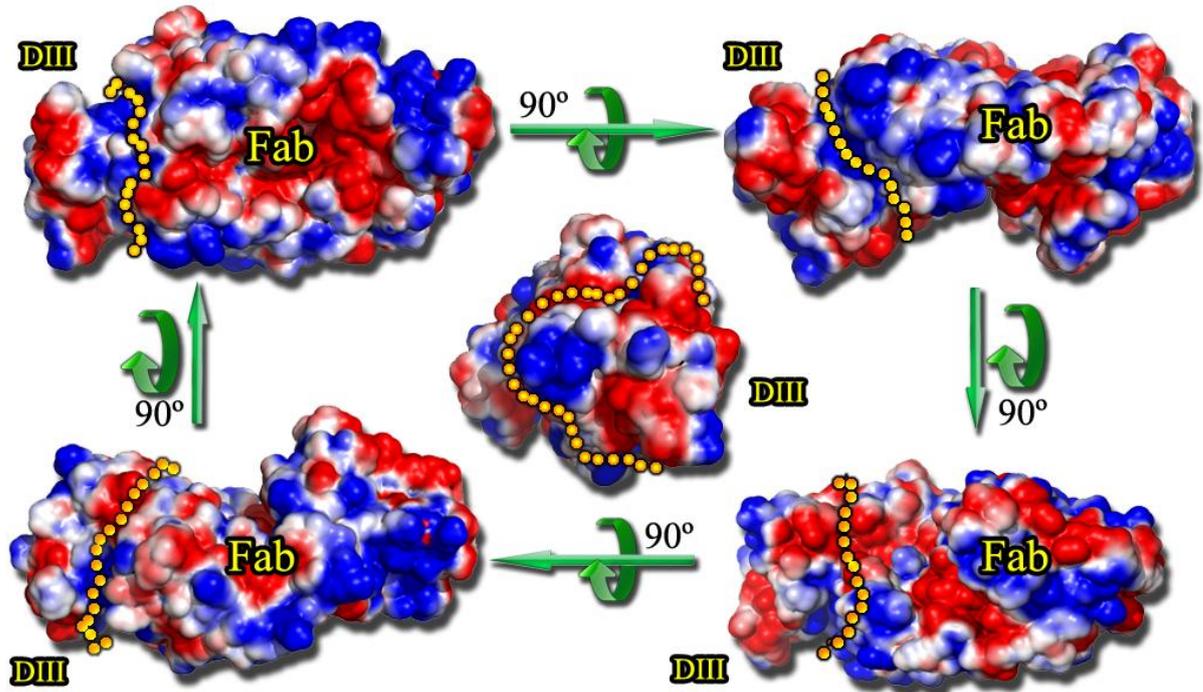
onde  $m_i$  é a massa do átomo  $i$  e  $r_i$  é a posição do átomo  $i$  em relação ao centro de massa da molécula. O raio de giração é apresentado de forma independente para cada subunidade, e revela pequena compressão sistemática na cadeia leve, enquanto que a cadeia pesada apresenta flutuações persistentes ao longo do tempo, especialmente entre 30 e 60 ns (**Fig. 2.17**). A curva do DIII varia suavemente e representa quase nenhuma mudança em sua compactação.



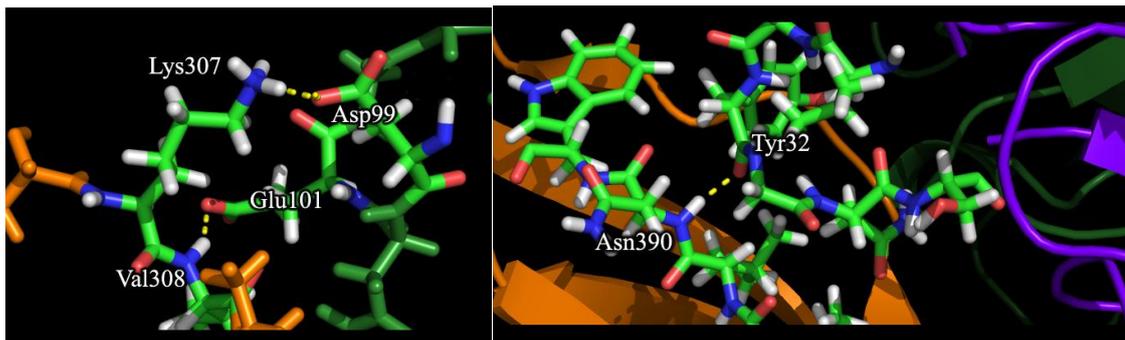
**Figura 2.17.** Evolução do RMSD (à esquerda) e do raio de giração (à direita) para o complexo DIII/Fab 1A1D-2. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>33</sup>

A representação eletrostática de superfície identifica padrões de distribuição de carga (**Fig. 2.18**). As cargas podem ser originadas tanto por cadeias secundárias de aminoácidos ionizados quanto por segmentos do *backbone*, já que estes últimos apresentam nitrogênio e oxigênio, os quais não necessitam apresentar carga líquida para gerarem uma polarização. A presença de água causa a internalização de cadeias secundárias hidrofóbicas, movimentando os grupos polares do *backbone* para uma localização mais superficial. Da mesma maneira, estas mesmas cadeias podem rearranjar-se em outra configuração particular nos arredores de outro meio, tal qual a proximidade de outro peptídeo, como é o caso que ocorre na junção entre DIII e o anticorpo.

Nós fomos capazes de identificar alguns resíduos-chave no sítio de ligação, aqueles que interagem direta e intimamente, sendo aparentemente importantes para a estabilidade estrutural do complexo. Eles são encontrados em ambas as cadeias; nós destacamos (**Fig. 2.19**): Lys307 (DIII) – Asp99 (cadeia pesada Fab), Val308(DIII) – Glu101 (cadeia pesada Fab) e Asn390 (DIII) – Tyr32 (cadeia leve Fab).



**Figura 2.18.** Representação da superfície eletrostática para o complexo DIII/Fab 1A1D-2, mostrando a distribuição de cargas. Azul representa cargas positivas, vermelho representa as negativas e os espaços brancos são de transição. As setas orientam as rotações de visualização, a fim de prover um perfil completo (360°) ao longo do eixo mais longo. No centro, uma visão da face oposta do sítio de ligação do DIII. Os pontos amarelos formam linhas que marcam o contato de ligação entre o DIII e o anticorpo. Note que a maioria das linhas amarelas não corta sítios neutros (em branco), revelando a influência eletrostática recíproca entre as partes, devido ao rearranjo das cadeias. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>33</sup>



**Figura 2.19.** Detalhe das interações não covalentes na face de contato entre DIII/Fab 1A1D-2 no equilíbrio. Os resíduos são nomeados de acordo com sua posição na cadeia. Apenas Val308, Lys307 e Asn390 pertencem à porção viral. Os traços amarelos representam ligações de hidrogênio entre os resíduos. Modificado de Soares e Caliri (2013).<sup>33</sup>

Concluimos que variações de pH tem o potencial de efetivamente modificar as cargas dos resíduos ionizáveis do complexo, permitindo uma eventual quantificação quanto sua importância à eletrostática da ligação, que é de valia para a afinidade entre o ligante e o receptor.

## 2.4 – Referências<sup>‡</sup>

- <sup>1</sup> LOK, S. M. et al. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 3, p. 312-317, 2008.
- <sup>2</sup> LARKIN, M. A. et al. Clustal W and clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- <sup>3</sup> SOARES, R. O. S. ; CALIRI, A. Stereochemical features of the envelope protein Domain III of dengue virus reveals putative antigenic site in the five-fold symmetry axis. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 221-230, 2013.
- <sup>4</sup> NAYAK, V. et al. Crystal Structure of Dengue Virus Type 1 Envelope Protein in the Postfusion Conformation and Its Implications for Membrane Fusion. **Journal of Virology**, v. 83, n. 9, p. 4338-4344, 2009.
- <sup>5</sup> NELSON, C. A.; KIM, T.; WARREN, J. T. ; FREMONT, D. H. Crystal structure analysis of dengue-1 envelope protein domain III - Trabalho não publicado. Depositado em 2009.
- <sup>6</sup> MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D. ; HARRISON, S. C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 6986-6991, 2003.
- <sup>7</sup> ZHANG, Y. et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, v. 12, n. 9, p. 1607-1618, 2004.

---

<sup>‡</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- 8 MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D. ; HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-319, 2004.
- 9 HUANG, K. C. et al. Solution structure and neutralizing antibody binding studies of domain III of the dengue-2 virus envelope protein. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 70, n. 3, p. 1116-1119, 2008.
- 10 MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D. ; HARRISON, S. C. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 1223-1231, 2005.
- 11 VOLK, D. E. et al. Solution structure of the envelope protein domain III of dengue-4 virus. **Virology**, v. 364, n. 1, p. 147-154, 2007.
- 12 HESS, B.; KUTZNER, C.; VAN DER SPOEL, D. ; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, 2008.
- 13 PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845-854, 2013.
- 14 JORGENSEN, W. L. ; TIRADORIVES, J. The Opls Potential Functions for Proteins - Energy Minimizations for Crystals of Cyclic-Peptides and Crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 1657-1666, 1988.
- 15 BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. V. ; HERMANS, J. In: PULLMAN, B. (Ed.). **Intermolecular Forces**. Dordrecht: D. Reidel Publishing Company, 1981. p.331-342.
- 16 MIYAMOTO, S. ; KOLLMAN, P. A. Settle - an Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952-962, 1992.

- 17 HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C. ; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.
- 18 PARRINELLO, M. ; RAHMAN, A. Crystal-Structure and Pair Potentials - a Molecular-Dynamics Study. **Physical Review Letters**, v. 45, n. 14, p. 1196-1199, 1980.
- 19 BUSSI, G.; DONADIO, D. ; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, 2007.
- 20 HUMPHREY, W.; DALKE, A. ; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.
- 21 W.L. Delano. The PyMOL molecular graphics system. 2002. Disponível em: <  
<http://www.pymol.org> >.
- 22 NOZAKI, Y. ; TANFORD, C. [84] Examination of titration behavior. In: HIRS, C. H. W. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 11, 1967. p.715-734. ISBN 0076-6879.
- 23 BECK, D. A. C. et al. Dynameomics: mass annotation of protein dynamics and unfolding in water by high-throughput atomistic molecular dynamics simulations. **Protein Engineering Design & Selection**, v. 21, n. 6, p. 353-368, 2008.
- 24 WASSENAAR, T. **Lista de discussão de usuários do GROMACS**.p.  
<http://lists.gromacs.org/>. Entrada de 10 de outubro 2011.
- 25 CRILL, W. D. ; ROEHRIG, J. T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **Journal of Virology**, v. 75, n. 16, p. 7769-7773, 2001.
- 26 BARRETT, C. P.; HALL, B. A. ; NOBLE, M. E. M. Dynamite: a simple way to gain insight into protein motions. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 60, p. 2280-2287, 2004.

- 27 UNIPROT-CONSORTIUM. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D71-D75, 2012.
- 28 MAZUMDER, R. et al. Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. **Virus Genes**, v. 35, n. 2, p. 175-186, 2007.
- 29 MARTINEK, V. et al. DNA polymerase beta catalytic efficiency mirrors the Asn279-dCTP H-bonding strength. **Febs Letters**, v. 581, n. 4, p. 775-780, 2007.
- 30 UDOMMANEETHANAKIT, T. et al. Dynamic Behavior of Avian Influenza A Virus Neuraminidase Subtype H5N1 in Complex with Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir, and Their Phosphonate Analogues. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 10, p. 2323-2332, 2009.
- 31 JIMENEZ, R.; SALAZAR, G.; BALDRIDGE, K. K. ; ROMESBERG, F. E. Flexibility and molecular recognition in the immune system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 1, p. 92-97, 2003.
- 32 RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution**, v. 59, p. 315-341, 2003.
- 33 SOARES, R. O. S. ; CALIRI, A. Evaluating the effects of intensive thermodynamic variations on the affinity between monoclonal antibodies and Dengue virus glycoprotein E domain III. **Febs Journal**, v. 278, p. 131-131, 2011.

## Capítulo 3

# Interação membrana – proteína E: implicações no processo de infecção

O terceiro capítulo desta tese é também aquele que a finaliza. Seu conteúdo reflete o curso natural da trajetória de nosso trabalho, compilando nossa experiência adquirida sobre o tema e apresentando o estudo de um sistema mais completo que anteriormente. Motivados pela ausência na literatura da resolução da estrutura da proteína E completa, isto é, de seu ectodomínio (domínios I, II e III) com adição da porção basal transmembrana (haste e âncora), nos utilizamos de diferentes técnicas para propor nosso próprio modelo. Em posse da proteína E completa, agora com um domínio transmembrana, nos dedicamos ao desenvolvimento de um ambiente propício que reproduzisse as condições básicas as quais a proteína é nativamente proveniente, ou seja, uma bicamada fosfolipídica interfaceando o solvente circundante. Embora nossa experiência em simulações realizadas até então, assim como a interação com outros pesquisadores interessados no problema, tenham sido cruciais, simulações de dinâmica molecular (DM) envolvendo interfaces impõe novos desafios, pois são bastante diferentes daquelas envolvendo proteínas globulares em solvente explícito. Foi necessário o entendimento de novos conceitos aplicados à simulação, como tensão superficial e transição de estados de fosfolipídios em função de temperatura, ou em função do nível de solvatação.<sup>1-</sup>

<sup>14</sup> Outra necessidade que se impôs, foi a busca extensiva na literatura sobre o *status* atual dos diferentes campos de forças quanto a este tipo de sistema, tanto suas limitações e pontos fortes, bem como a adaptação apropriada para o formato e unidades nativas do GROMACS, software utilizado em nossas simulações.

Complementarmente, em um segundo momento (seção 3.2) apresentamos os destaques de um estudo ainda em desenvolvimento que surgiu através da interação e cooperação estabelecida com o Laboratório de Virologia de Ribeirão Preto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), onde investigamos o mecanismo molecular de interação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> sobre a estrutural viral.

### **3.1 – Interação proteína-membrana\***

A elaboração de uma estrutura que possa reproduzir tanto quanto possível as características da membrana do vírus do Dengue é fundamental para o sucesso desta etapa. Fundamentalmente, as propriedades de uma membrana são oriundas de sua composição e das condições ambientais em que ela se encontra. Desta forma, a formulação de um modelo de membrana para nosso propósito deveria seguir a mesma proporção fosfolipídica encontrada na partícula do Dengue, o que se mostrou uma tarefa impraticável, visto que esta informação até o momento não era direta na literatura. Com a determinação de maiores esclarecimentos quanto quais seriam nossas opções para seguirmos em frente, nos aprofundamos no estudo do ciclo do dengue, e na composição da membrana de outros vírus, notadamente o vírus da imunodeficiência humana HIV-1 e HIV-2.<sup>16</sup> A partir disso, percebemos que, se não podemos saber diretamente a proporção lipídica da composição da membrana constituinte do vírus do Dengue, o melhor que poderia ser feito é utilizar a informação sobre sua estrutura de origem: a membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER). Ao contrário da membrana do Dengue, a membrana do RER é abundantemente descrita na literatura, o que nos permitiu, finalmente, o desenvolvimento de nosso modelo em questão (seção 3.1.2).

Dividimos esta seção 3.1 em basicamente duas partes: a modelagem da porção transmembrana do envelope viral (*âncora*), sua haste e a ligação com o DIII, obtendo um modelo completo da proteína E; e a construção de uma membrana de coerência biológica e apropriada à sua inserção, tanto na forma monomérica quanto na dimérica.

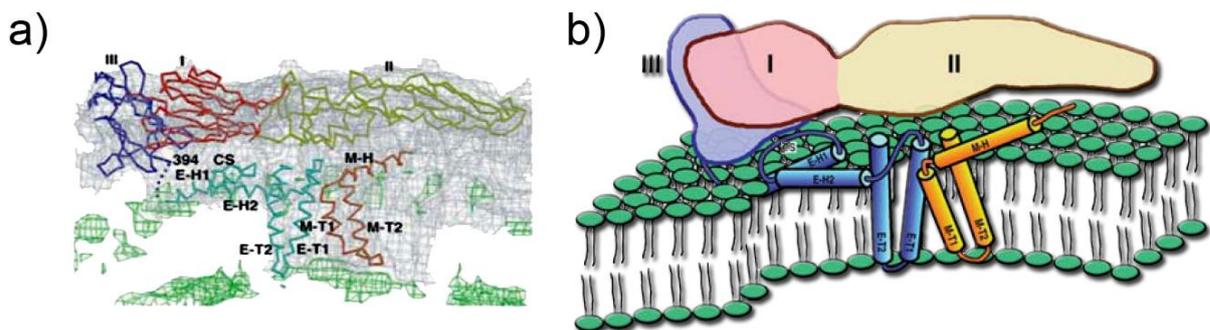
---

\* Uma membrana biológica é uma estrutura composta de uma bicamada fosfolipídica, proteínas e associações de carboidratos, apresentando propriedades físico-químicas bastante complexas. Estruturas artificiais não atendem os critérios para serem consideradas membranas, no entanto, seguindo a convenção da área, não faremos distinção entre membrana e bicamada, a não ser quando especificado explicitamente. Ademais, não abordaremos a questão quanto a denominação da estrutura correspondente nos vírus (portanto a acuidade da expressão “membrana viral”) visto que ainda não há um consenso aparente na comunidade.

### 3.1.1 – Desenvolvimento de um modelo completo da Proteína E

A glicoproteína E é composta por três domínios fixados na bicamada lipídica viral por meio de uma porção transmembrana, sendo estes intercalados por uma haste. Pela natureza hidrofílica dos três domínios, e, portanto, pela facilidade de extração experimental, esta região é chamada de sE (*soluble E*) enquanto o conjunto completo (sE + região hidrofóbica de haste e âncora transmembrana) é o que se pode chamar de proteína E. Vale à pena ressaltar que, apesar de ser o termo correto, nem sempre a literatura faz essa distinção.

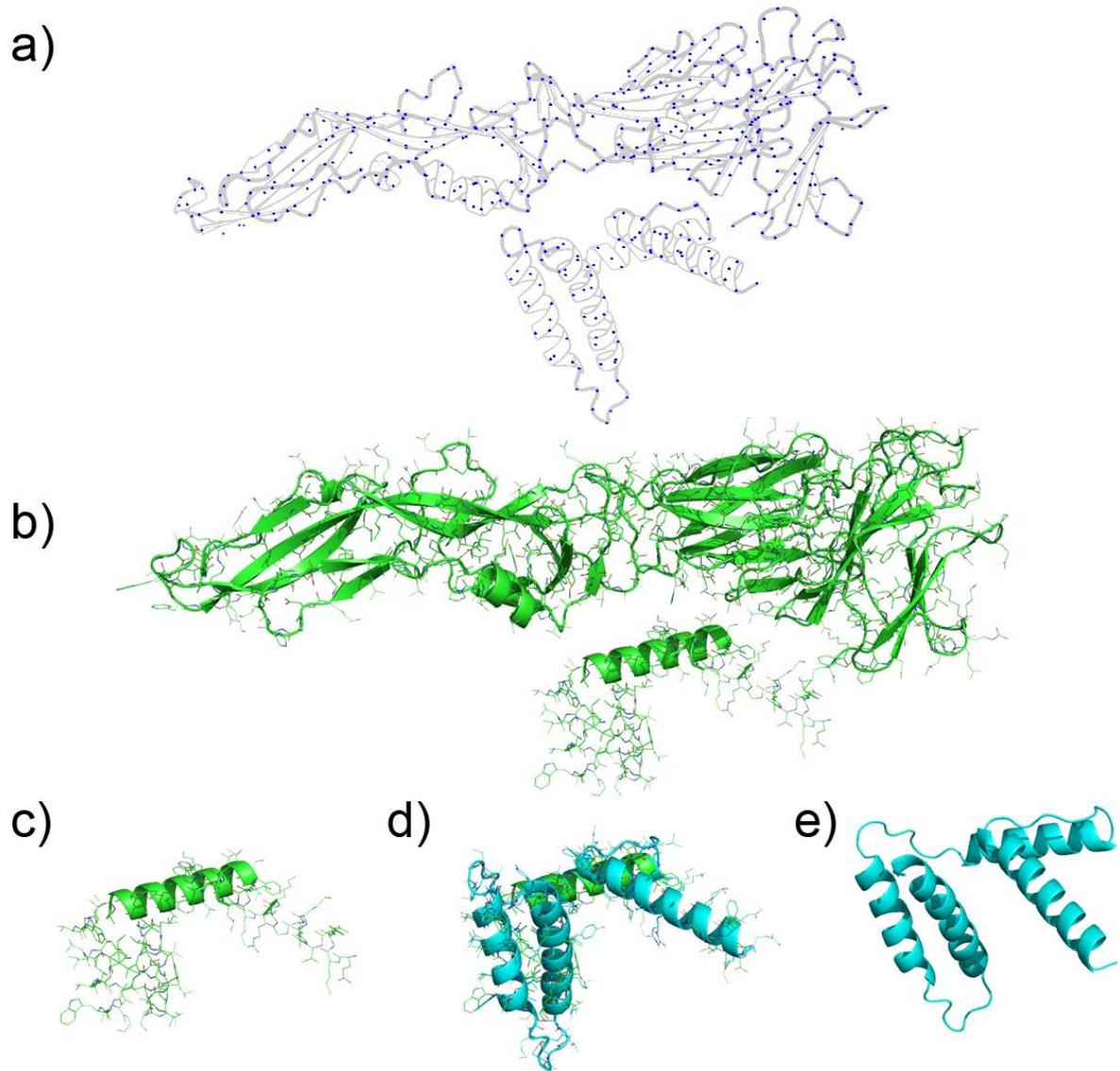
Apesar da ausência até recentemente de um modelo de proteína E completo resolvido disponível na literatura, admite-se que o envelope proteico viral é ancorado no envelope lipídico através das proteínas transmembranas chamadas de âncora, as quais são oriundas de uma extensão C-terminal do domínio III (**Fig. 3.1**).<sup>17,18</sup> Por conta de sua inserção na membrana viral, existe certa dificuldade na determinação experimental exata do conjunto haste+âncora, o que é refletido na ausência dessa estrutura em alta resolução no PBD. Para nossos propósitos, a melhor estrutura que encontramos depositada no PDB é aquela sob o código 1P58, a qual traz as coordenadas da proteína E quase completa (apenas um pequeno fragmento ausente) que, por terem sido obtidas por microscopia eletrônica de criogenia, tratam-se apenas de coordenadas dos carbonos alfa.<sup>17</sup>



**Figura 3.1.** Modo de inserção da região da âncora na membrana viral. **a)** Encaixe dos carbonos alfa no mapa das densidades eletrônicas obtidas a partir do experimento de microscopia eletrônica criogênica. **b)** Representação didática do modelo proposto em **(a)**. Os numerais I, II e III correspondem aos domínios da proteína E; E-H1 e E-H2: hélices de E enterradas não membranas (não transmembrânicas); E-T1 e E-T2: hélices transmembrânicas de E; M-H: hélice não transmembrânica de M; M-T1 e M-T2: hélices transmembrânicas de M. Ambas as figuras são adaptadas de Zhang et al. (2003).<sup>17</sup>

Apesar de tal modelo ser essencialmente insuficiente para simulações de dinâmica molecular, suas informações quanto às coordenadas dos carbonos alfa foram suficientes para

traçarmos um protocolo de reconstrução total da proteína E (**Fig. 3.2**). Primeiramente tomamos como referência os carbonos alfa da região da âncora e haste, promovendo a inserção dos demais átomos constituintes do *backbone*, bem como os das cadeias laterais por meio de ferramentas computacionais disponíveis do servidor SABBAC v. 1.3.<sup>†19</sup> Nesta etapa, a estrutura resultante necessitava de fortes ajustes no posicionamento angular de suas cadeias laterais, o que foi feito através do uso do SCWRL4.0.<sup>‡20</sup>



**Figura 3.2.** Passos para a construção do região de haste e transmembrana da proteína E do DENV-2. **a)** Carbonos alfa obtidos em PDB: 1P58 são representados como pontos azuis, em contraste com o modelo final (para referência visual). **b)** reconstrução parcial do sistema, com inserção de átomos complementares ao *backbone*, e cadeias laterais; alinhamento com a estrutura completa de sE (PDB ID: 10AN). **c)** Detalhe da âncora, como representado em b). **d)** Ajuste das cadeias laterais e superposição com o modelo anterior. **e)** Resultado final do processo de construção.

<sup>†</sup> <http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::SABBAC>

<sup>‡</sup> <http://dunbrack.fccc.edu/scwrl4/>

Após a reconstrução da haste e âncora, promovemos um teste de estabilidade estrutural em bicamadas constituídas do fosfolípido 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) (seção 3.1.1.2), e conseguimos observar a manutenção estrutural do modelo, a partir disso, a base necessária para sua conjugação com sE (PDB ID: 1OAN).<sup>21</sup> Porém, dentre toda a compilação que a literatura oferecia no momento, ainda era ausente uma pequena porção a qual conecta o domínio III de sE com a haste. Claramente não poderíamos simular o sistema completo sem esta parte de conexão, já que nenhuma transmissão direta de forças se daria entre sE e a haste+âncora, inviabilizando a ideia de inserção do conjunto da Proteína E em bicamada lipídica. Pelas informações de sequência depositadas na seção da estrutura 1P58 no *website* do PDB, recuperamos a informação primária sobre os resíduos ausentes (395 a 399, Gly, Ser, Ser, Ile e Gly) e procedemos com a reconstrução e ajuste inicial de forma manual com ajuda do software *PyMol*,<sup>22</sup> unindo todos os componentes. Este protótipo foi então submetido para ajuste secundário por homologia com rotina proveniente do *Modeller*<sup>23</sup> pela plataforma *ModLoop*.<sup>24</sup>

Transposto o período de estudo para devida capacitação em simulações de dinâmica molecular envolvendo interface de bicamada lipídica (seção 3.1.1.1), uma simulação de ajuste final em membrana RER (seção 3.1.2) devidamente equilibrada foi feita, recorrendo a restrições energéticas em todas as regiões da proteína, exceto pela parte modelada. O resultado é mostrado na Figura 1.15, e foi o ponto de partida para os experimentos apresentados na seção 3.1.3.

### **3.1.1.1 – Estudo de metodologias e parâmetros para simulação de sistemas com interface (bicamadas)**

A modelagem e simulação de membranas não segue estritamente as regras que regem a simulação de proteínas globulares em solvente. Primeiramente, é necessária a escolha apropriada do conjunto dos parâmetros energéticos (campo de forças) a ser utilizado nas simulações de membrana. Para nosso estudo, escolhemos o campo de força que atualmente melhor reproduz resultados experimentais com bicamadas,<sup>25</sup> o CHARMM36<sup>1</sup> que, por sua vez, possui vantagens bem determinadas sobre seu antecessor CHARMM27<sup>26</sup>, sendo as duas principais:<sup>1</sup>

- a correção dos (excessivamente) altos valores de tensão superficial ( $\gamma$  de 30 a 40  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) para bicamadas na fase fluida, os quais se estima que devam ser idênticos a zero para bicamadas microscópicas retas,<sup>27</sup> ou apenas pouco maior que zero quando existam ondulações;<sup>28</sup> estas correções permitem exclusividade na utilização do *ensemble* NPT (isotérmico-isobárico) sem mudança de estado da bicamada de cristal líquido para gel;
- e o ajuste de valores de ordem de parâmetro mais concordantes com dados experimentais, resultando em uma descrição mais acertada da organização das cabeças lipídicas na superfície da bicamada.

Estas adequações resultam do refinamento e correção de cargas parciais aberrantes nas cabeças lipídicas do tipo colina, e otimização de parâmetros torcionais entre a cabeça e a região glicerol da cadeia.<sup>1</sup> É interessante também mencionar que o campo de força AMBER generalizado (GAFF – *General AMBER Force Field*) também vem mostrando boa capacidade em descrever propriedades dinâmicas e estruturais mesmo para um campo de força não ajustado a dados experimentais de lipídios. No entanto, foi demonstrado que o GAFF tende a exibir quantidade de solvente por área de lipídio menores que o esperado, bem como valores mais altos de ordem de parâmetro de deutério em comparação com experimentos.<sup>29,30</sup>

Todas as distribuições do GROMACS 4.+ dispõem apenas de uma conversão CHARMM27,<sup>31</sup> por isso fizemos o *download* da versão convertida do CHARMM36 na seção de contribuições de usuários no site do GROMACS.<sup>§</sup> Tal conversão deve ser creditada a Thomas Piggot, com parâmetros de lipídios por Par Bjelkman.<sup>25</sup> Parâmetros da molécula de colesterol foram determinados por Lim et al. (2012),<sup>32</sup> os quais nós convertemos e incorporamos em uma versão própria do campo de forças.

---

<sup>§</sup> [http://www.gromacs.org/Downloads/User\\_contributions/Force\\_fields](http://www.gromacs.org/Downloads/User_contributions/Force_fields)

### 3.1.1.2 – Estudo preliminar da âncora em bicamada simples

Como passo inicial, construímos uma membrana exclusivamente de POPC com a ajuda do software VMD<sup>33</sup> (*Visual Molecular Dynamics*) para começar a entender como funciona a simulação deste tipo de estrutura, até então uma novidade em nosso grupo de pesquisa. A membrana foi gerada pelo módulo “*membrane builder*”, com a composição de 128 lipídios (8x8 em cada uma das camadas, tamanho mínimo para nosso caso) já dispostos em uma bicamada. No entanto, essa bicamada não é construída de forma que seus componentes estejam dispostos em configuração adequada ao correspondente biológico (não equilibrada), o que nos despertou para a necessidade de um aprendizado denso sobre o tema. Por isso, um modelo de POPC com 72 componentes, e já equilibrado, foi obtido eletronicamente no site do Dr. Jeffery B. Klauda.<sup>\*\*</sup> Isso foi feito para otimizar nosso tempo: enquanto essa membrana (pronta para ser utilizada) era simulada em conjunto com o peptídeo âncora, havia tempo para se iniciar o estudo pormenorizado de como montar e equilibrar um sistema dessa natureza, porém de tamanho maior e com diferentes fosfolipídios.

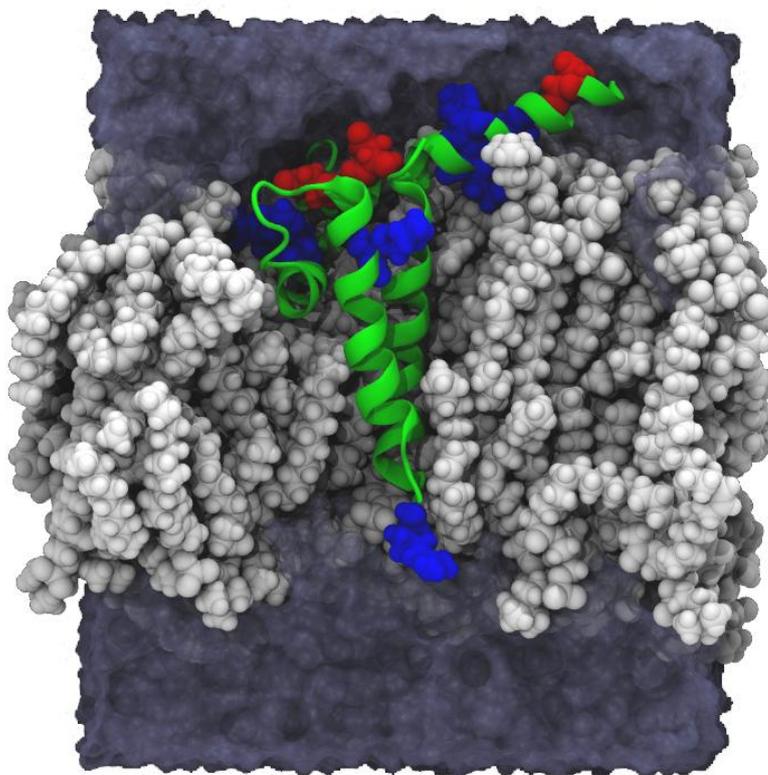
O peptídeo foi inserido no modelo de membrana do Dr. Klauda, em seguida foi então adicionado o solvente e os contra íons, e o sistema foi simulado por 10 nanossegundos com restrições de movimento na proteína, assim as caudas dos lipídios puderam ajustar-se mais adequadamente à proteína. Logo após este passo, o peptídeo teve todas as restrições removidas, e teve início a simulação de produção, a qual correu por 200 ns: o sistema mostrou-se estável até o final da simulação. As duas hélices da âncora ( $E_{H1}$  e  $E_{H2}$ ) foram estabilizadas pelo seu centro hidrofóbico e se mantiveram ortogonais aos eixos longos (XY) da membrana por interação das cargas presentes em suas extremidades com a porção polar superficial da bicamada, bem como a o solvente (**Fig. 3.3; vídeo 3-1.mpg**).

Nesse estágio, porém, não foi feita nenhuma análise em relação à manutenção dos parâmetros de equilíbrio da membrana, já que se tratou de uma bateria de simulações de aprendizado (onde em cada uma se ajustava alguns parâmetros, como eixos semi-isotrópicos de controle de pressão, valor da correção de dispersão de longo alcance, eficácia do modo *shift* para interações de van der Waals, modelo de água mais apropriado – TIP3PS<sub>CHARMM</sub>). Ademais, fatores de indicação de estado da bicamada, como parâmetro de ordem de deutério,

---

<sup>\*\*</sup> <http://terpconnect.umd.edu/~jbklauda/research/download.html>

densidade eletrônica e espessura da membrana, foram estudados e discutidos (em lista de usuários GROMACS e CHARMM) e aqui são tratados em sistema mais complexo (membrana mista), introduzido na seção 3.1.2.



**Figura 3.3.** O peptídeo âncora e haste do DENV-2 inserido na bicamada de POPC. Resíduos em azul são carregados positivamente (Arg e Lys), enquanto aqueles coloridos em vermelho são negativos (Asp e Glu). Note a predominância hidrofóbica do peptídeo (em verde) no centro da bicamada (em cinza).

### 3.1.2 – Um modelo de membrana mais realista

Uma membrana biológica real não é constituída de apenas um tipo de fosfolipídio, como POPC<sup>††</sup> ou POPE, e por isso estruturas equilibradas que melhor mimetizam alguns sistemas biológicos já são disponíveis na literatura e, algumas delas procuram reproduzir, por exemplo, uma membrana plasmática bacteriana,<sup>34</sup> enquanto outras imitam membrana plasmática de levedura.<sup>3</sup> Aqui nós utilizamos MD para modelar um fragmento genérico de membrana do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), com sua composição média (em fígado de rato) de aproximadamente 60% POPC, 20% POPE, 10% POPS e 10% Colesterol

---

<sup>††</sup> POPC: 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina;  
 POPE: 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-etanolamina;  
 POPS: 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina;

(CHOL).<sup>4,35</sup> Nós utilizamos o RER como modelo por duas razões, primeiramente por que ele oferece sua membrana como plataforma à biogênese do complexo de replicação em *Flavivirus*,<sup>36</sup> e por haver falta de estudos na literatura que forneçam a composição lipídica exata das partículas virais do DENV.

As diferentes composições das membranas de fosfolípidios influenciam sua fluidez, já que as cadeias longas hidrofóbicas dos ácidos graxos variam em comprimento. A proporção lipídica depende de vários fatores, sendo eles principalmente a classificação filogenética do organismo em questão, o tipo de célula, e sua localização na mesma. A proporção constituinte de lipídios pode flutuar entre a membrana de origem e sua derivada viral,<sup>37</sup> e o desenvolvimento de modelos para cada uma dessas variações é, atualmente, uma tarefa inviável. No entanto, na prática, uma grande parte dessas variações é modesta, e, para esses casos, nosso modelo se encaixa adequadamente.

A falta de estudos relatando a composição detalhada da porção lipídica do DENV é uma preocupação que ainda é levada em consideração. Recentemente tivemos contato com o trabalho de Aloia et al. (1993),<sup>16</sup> o qual relata a composição da membrana do vírus HIV, tipos I e II, comparando com os componentes originais da membrana plasmática do hospedeiro. Esse estudo mostra como o sequestro de lipídios pode dar pistas sobre o processo de infecção, já que foi encontrado um aumento de até 300% de esfingomiélin na relação hospedeiro: vírus, além de diminuição de 80% de fosfatidil-inositol e 50% na POPC. Este panorama nos motivou a associação com o Laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada - Sistemas Miméticos de Biomembranas, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP) e com o Laboratório de Virologia de Ribeirão Preto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), com o objetivo de determinar a composição lipídica do envelope do Dengue através de espectrometria de massa (Apêndice A). Esta análise nos trará duas possibilidades como interpretação: ou confirmaremos a similaridade de composição do envelope viral com o RER, ou delinearemos as diferenças fundamentais. No primeiro caso, nossos resultados com a membrana mimética do RER, juntamente com nossas análises aqui apresentadas, são válidos; no segundo caso, temos a possibilidade de confeccionarmos uma membrana correspondente, e procederemos com o mesmo protocolo de simulações. Por se tratar de uma informação inédita e importante, estamos aguardando estes resultados para inclusão em artigo em elaboração.

### 3.1.2.1 – Montagem e equilíbrio termodinâmico do modelo mimético de membrana RER

Neste tópico, assim como nos dois seguintes, descrevemos os passos utilizados para a montagem da bicamada lipídica em diferentes *ensembles* simulacionais, incluindo também certos detalhes computacionais. Moléculas fosfolipídicas distintas em cada camada (6<sub>POPC</sub>:2<sub>POPE</sub>:1<sub>POPS</sub>:1<sub>CHOL</sub>) foram montados em uma membrana com 200 unidades (10x10)x2, através dos módulos iniciais da ferramenta online CHARMM-GUI.<sup>3</sup> Já que este serviço não gera uma membrana totalmente equilibrada, ao mesmo tempo em que não provê instruções para minimização de energia para GROMACS, os passos subsequentes aqui descritos são nossos próprios. Começando a partir de uma estrutura bruta, em um estado energeticamente estabilizado e com muitas sobreposições entre as cadeias acil dos fosfolipídios, o processo de minimização de energia pelo método dos gradientes conjugados (*steepest descent method*) não apresentou eficiência satisfatória. Assim, para desfazer as superposições espaciais de átomos, e para lidar simultaneamente com mais de um tipo de lipídio, tivemos que modificar o script *Inflategro*,<sup>5</sup> afim de ampliar cada componente “x” e “y” de todos os vetores posição, aplicando um fator 1,5 sobre suas coordenadas originais. Em seguida, e com restrições no eixo Z, nós então realizamos o processo de minimizações de energia, que agora efetivamente removeram completamente qualquer sobreposição restante. Para os próximos passos, construímos um outro *script* para simular o sistema com uma série de contrações sistemáticas no sistema, por meio da aplicação de um fator 0.95 nas coordenadas “x” e “y” ampliadas, sendo que cada contração era seguida, seguido por uma etapa simulacional de minimização de energia potencial, ajustando termodinamicamente as cadeias oleoil e palmitoil, bem como as moléculas de colesterol. O processo de minimização energética termina quando a área por lipídio atinge aproximadamente daquela calculada como apropriada para nosso sistema, via a seguinte expressão (Eq. 3.1):

$$\left( \frac{N_{(POPC)}}{A_{(POPC)}} + \frac{N_{(POPE)}}{A_{(POPE)}} + \frac{N_{(POPS)}}{A_{(POPS)}} + \frac{N_{(Colesterol)}}{A_{(Colesterol)}} \right) \div 4 = 51,6 \text{ \AA}^2 \quad (3.1)$$

sendo que, para esse sistema, o número de cada lipídio é denominado por  $N_{(POPC)} = 60$ ,  $N_{(POPE)} = 20$ ,  $N_{(POPS)} = 10$ , e  $N_{(Colesterol)} = 10$ ; enquanto as áreas ocupadas por cada molécula são dadas por  $A_{(POPC)} = 55 \text{ \AA}^2$ ,  $A_{(POPE)} = 52 \text{ \AA}^2$ ,  $A_{(POPS)} = 52 \text{ \AA}^2$ , e  $A_{(Colesterol)} = 30 \text{ \AA}^2$ . Estes valores

são relativamente pequenos em relação àqueles típicos para área por lipídio em membranas, mas isso se deve à porcentagem de colesterol (10%), o qual provoca uma certa compactação das moléculas.

Devido às propriedades liotrópicas dos componentes do sistema, nós adicionamos 6759 moléculas de água (modelo TIP3P<sub>(CHARMM)</sub>), satisfazendo a proporção água/lipídio maior que 33,8, garantindo uma solvatação apropriada à membrana na fase correspondente à de cristal-líquido ( $L_{\alpha}$ ).

Nesta etapa inicial de montagem, para prevenir que moléculas de água penetrassem artificialmente nos eventuais espaços vazios na membrana, nós modificamos provisoriamente os raios de *van der Waals* dos átomos de carbono de 0,15 para 0,38 nm antes de adicionar o solvente. Em seguida, considerando pH neutro, como cada grupo fosfato de POPS apresenta carga elementar negativa ( $-e$ ), adicionamos então uma quantidade de íons suficientes para que fosse atingida a eletroneutralidade do sistema, a uma força iônica de 150 mmol/L, o que corresponde a 62 íons  $\text{Na}^+$  e 42 íons  $\text{Cl}^-$ . Ao retornar o raio dos átomos de carbono ao seu valor original, espaços vazios são criados. Tais espaços puderam ser eliminados facilmente com uma simulação de 5ns em *ensemble* NVT (*ensemble* canônico), o que ainda promove a formação da camada de solvatação em ambos os lados da membrana. Contudo, tal procedimento resulta em decréscimo na densidade do solvente. Essa anomalia foi resolvida com mais uma etapa simulacional de 10 ns para se obter o equilíbrio termodinâmico no *ensemble* NPT, e com pistão de ajuste na caixa apenas na direção Z, calibrado para ajustar a pressão do sistema a valores em torno de 1 atm, e valores de 1 kg/L para a densidade do solvente. Ambos os passos, de 5 ns e de 10 ns, foram feitos com restrição de movimento nos átomos de fósforo de cada lipídio em relação ao eixo Z da caixa; assim suas posições verticais permaneceram invariáveis durante o processo, protegendo a membrana contra deformações desnecessárias. Após estes passos iniciais, estas restrições foram todas retiradas, e assim as cadeias lipídicas passaram a se mover livremente, regidos pelo efeito hidrofóbico lipídio/água, permitindo o ajuste em conformações biologicamente consistentes. Para a simulação de equilíbrio termodinâmico no *ensemble* NVT, utilizamos o termostato de Berendsen<sup>38</sup> no ajuste da temperatura para 310K. Esta temperatura corresponde ao valor fisiológico e, sendo superior ao valor de transição  $L_{\alpha}$  para os componentes desse sistema, é apropriada para nosso modelo. Para a etapa de equilíbrio no *ensemble* NPT, nós mantivemos o mesmo termostato, e

adicionamos o barostato de Berendsen<sup>38</sup> para tratar a pressão do sistema com fator de acoplamento  $\tau^{\ddagger}=20$  ps.

### 3.1.2.2 – *Ensembles* NPA<sub>z</sub>T e NP $\gamma$ T

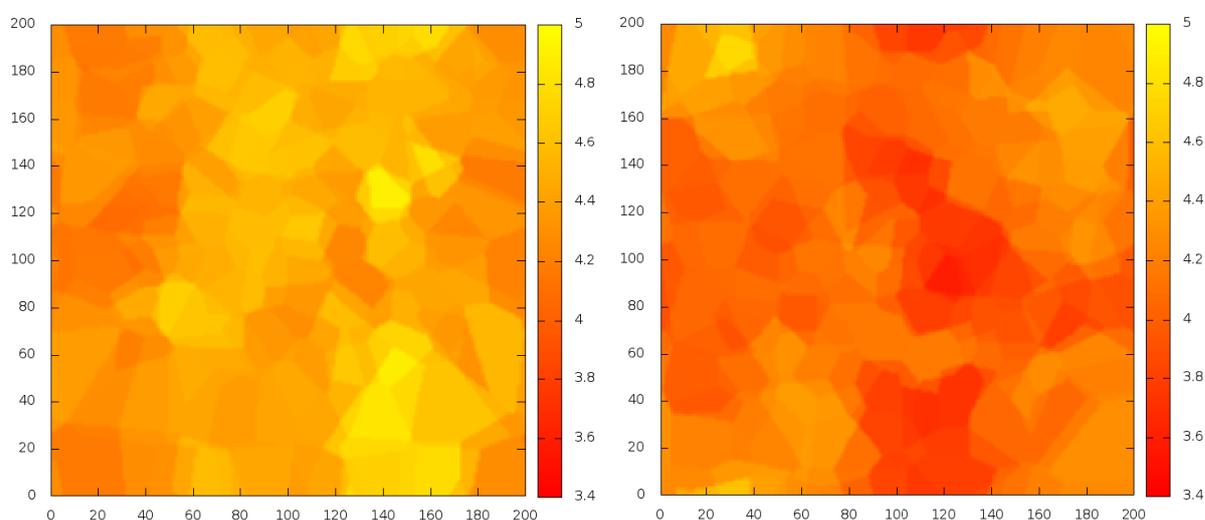
Em geral, os parâmetros de CHARMM parecem apresentar resultados mais concordantes com experimentos quando a tensão superficial do sistema é igualada a zero ( $\gamma=0$  mNm<sup>-1</sup>)<sup>39</sup> no *ensemble* NP $\gamma$ T, e que também são satisfatórios os resultados de um sistema com a fixação da área por lipídio a um valor constante, no *ensemble* NPA<sub>z</sub>T. Aqui, nós executamos duas simulações, na fase de produção, de 50 ns em cada um destes *ensembles*, e os parâmetros utilizados são descritos a seguir. A temperatura e a pressão foram controladas pelo termostato de Nose-Hoover<sup>40,41</sup> e pelo barostato de Parrinello-Rahman,<sup>42</sup> em uma configuração semi-isotrópica (eixos XY independentes de Z) no *ensemble* NP $\gamma$ T (temperatura, pressão normal, e tensão superficial lateral constantes), e com eixos fixos no *ensemble* NPA<sub>z</sub>T (temperatura, pressão normal, e área de superfície lateral constantes). O passo de integração do algoritmo usado para integrações numéricas das equações diferenciais, a saber, *leap-frog*, foi de 1 fs. O algoritmo LINCS<sup>43</sup> foi utilizado para limitar o comprimento das ligações e ângulos entre pares de átomos, após as forças aplicadas no passo de integração. Com condições periódicas de contorno, o raio de corte de van der Waals foi ajustado para 1.2 nm, e 1 nm para as interações eletrostáticas do sistema, que foi tratada por PME (*Particle Mesh Ewald*)<sup>44</sup> com aproximação de sexta ordem nas interpolações. As correlações dispersivas de longo alcance foram zeradas, e as ligações com hidrogênios foram convertidas para constrições. O máximo espaçamento para o *grid* da transformada de Fourier foi igualado a 0,15 nm. As simulações foram produzidas com a utilização de 30% do tempo total do cluster *Silicon Graphics International*® *Altix*® XE 1300. As produções em ambos os *ensembles* apresentados se deram para fins comparativos, a fim de obtermos uma avaliação de ambos os métodos, procurando delinear os melhores parâmetros para nosso sistema em particular.

A espessura de uma membrana, representada pela distância ao longo do eixo-Z entre os átomos de fósforo presente nos grupos polares dos lipídios em ambas as camadas, é uma

---

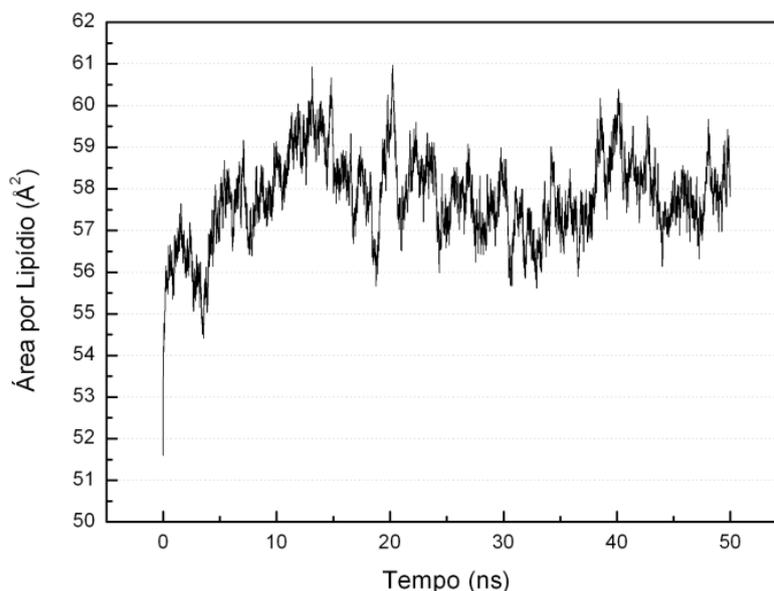
<sup>‡</sup>  $\tau$  é a constante de tempo do acoplamento do barostato, ela determina qual a frequência que o barostato irá influir no tamanho dos lados do cubo e adequar a pressão interna ao valor escolhido pelo usuário (em picossegundos).

variável muito importante na caracterização do equilíbrio da estrutura e, por isso, foram cautelosamente monitoradas. A espessura da membrana depende de vários parâmetros do sistema, como a pressão, temperatura, proporção água/lipídio, tipo de lipídio, entre outros. Já que estamos lidando com uma mistura de lipídios, suas interações produzem um padrão particular de espessura. A presença do colesterol também perturba esse padrão, pois ele introduz um aumento quantitativo nas interações de van der Waals entre as caudas das moléculas.<sup>45</sup> Aos últimos 10 ns de cada simulação, uma espessura média de 4,5 nm foi alcançada; os valores apresentados na **Fig. 3.4** mostram concordância com a variação de valores padrões de membranas puras de POPC ou POPE.<sup>3</sup>



**Figura 3.4.** Os padrões de espessura média dos últimos 10 ns das simulações nos *ensembles* NPA<sub>z</sub>T, à esquerda, e NP $\gamma$ T à direita. Os perfis de espessura seguem as cores da paleta de referência, indicando os valores correspondentes em nm. O eixo X e Y da caixa representa o tamanho do *grid* (unidade arbitrária) usado na análise pelo script GridMAT-MD.<sup>15</sup>

Quando a tensão superficial é controlada com  $\gamma = 0 \text{ m.N.m}^{-1}$ , nós observamos o aumento sistemático na área superficial por lipídio nos 5 ns iniciais, para então convergir lentamente para uma média de 57,8 Å (Fig. 3.5). Baixa temperatura e/ou hidratação da camada lipídica são condições usuais que direcionam o sistema a um estado similar ao de gel, o qual apresenta um maior grau de ordem.



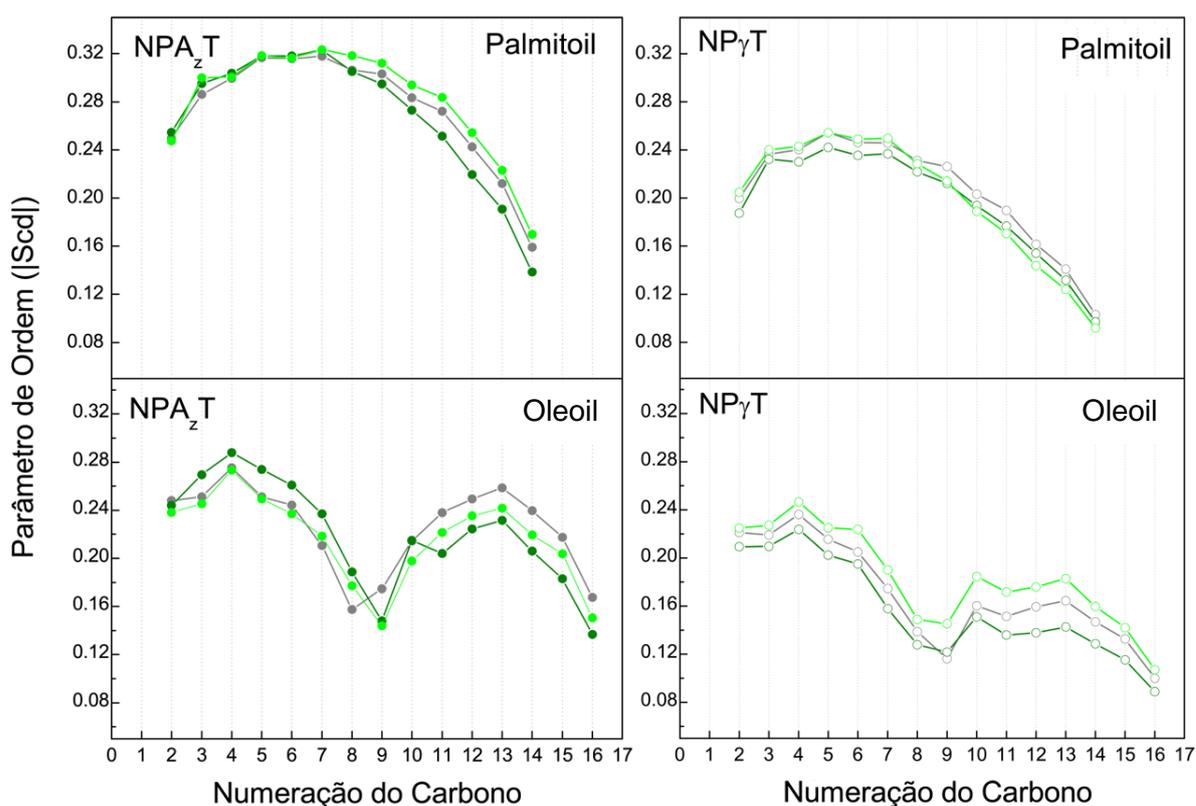
**Figura 3.5** Evolução da área ocupada por cada lipídio na superfície da bicamada. Quando a tensão superficial é controlada em torno de zero, o sistema assume novos valores de área por lipídio, os quais se ajustam com média de 57,8 Å.

Horta et al. (2010)<sup>46</sup> descreve como, em função destes parâmetros, simulações de DM em uma escala de 10-100 ns poderiam monitorar a transição Gel-Cristal líquido em bicamadas: a orientação média das cadeias acil em relação ao eixo normal da membrana (eixo-Z) é um bom método para a avaliação da organização dos componentes do sistema, e é dado pelo parâmetro de ordem ( $S_z$ ). Essa variável revela propriedades relativas ao estado em que a membrana se encontra, e é calculado da seguinte maneira:

$$S_z = \frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta_z \rangle - \frac{1}{2}, \quad (3.2)$$

onde  $\theta_z$  descreve, para cada cadeia de fosfolipídio e em cada instante, o ângulo entre o eixo Z, normal à membrana, e a direção de cada ligação C-C ao longo da cadeia acil do fosfolipídio. Para  $\theta_z = 0$ , se obtém o valor máximo  $S_z = 1$ , significando perfeita orientação entre a ligação C-C com o eixo Z, enquanto uma organização isotrópica é representada por  $S_z = 0$ . Para cada cadeia lipídica longa, a cada passo salvo da trajetória, nós extraímos o valor de  $S_z$  e calculamos sua média  $S_{cd}$  entre todos os fosfolipídios. Tendo em mente que a insaturação da cadeia oleoil deve ser considerada nesse cálculo, nós realizamos uma avaliação em dois passos, um para a cadeia insaturada e outra para a saturada (palmitoil). De fato, tem sido discutido na lista de usuários do GROMACS que (pelo menos até a versão 4.6+) o programa

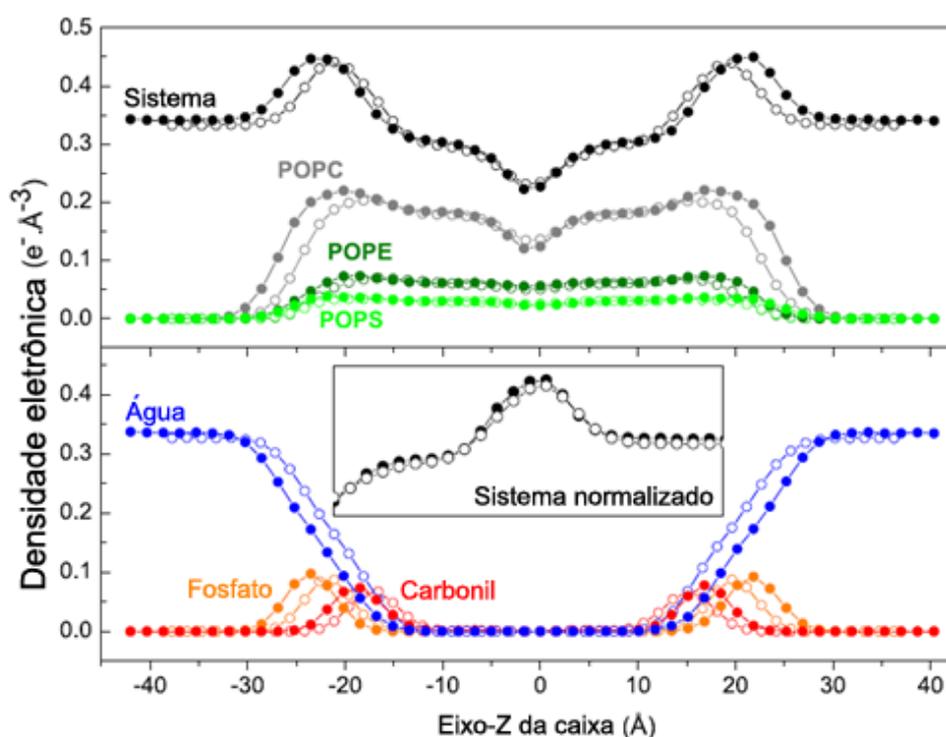
$g\_order$ , que calcula  $S_{cd}$  de uma porção selecionada do sistema, gera valores inconsistentes para as cadeias oleoil, devido a sua mono-insaturação. Esta questão foi resolvida por Dr. Christopher Neale, que disponibilizou um *patch* que corrige  $g\_order$ , e passa a gerar valores mais consistentes (e confirmados por análises no software VMD). Nossos sistemas mostraram seguir o padrão esperado para o parâmetro de ordem médio, no entanto, o *ensemble* NP $\gamma$ T mostra valores menores, mais próximos daqueles da fase cristal-líquido La (Fig. 3.6), fato que nos fez escolher este *ensemble* para ser utilizado nas subsequentes simulações.



**Figura 3.6.** Parâmetros de ordem relativa aos componentes da membrana mista (RER), representados separadamente entre as cadeias palmitoil e oleoil. À esquerda temos os valores para o *ensemble* NPA<sub>z</sub>T e à direita, àqueles relativos a NP $\gamma$ T. Curvas cinzas, verde escuras e verde claras representam POPC, POPE e POPS, respectivamente. Observe que em NPA<sub>z</sub>T, as caudas dos lipídios apresentam maior ordem.

Por conter uma mistura de moléculas com propriedades físico-químicas polares e apolares, esse sistema tende a se auto-organizar de forma a segregar os componentes hidrofóbicos e hidrofílicos, o que se dá eficientemente na forma de bicamadas. Essa

organização cria um perfil característico de densidade de massas ao longo do eixo normal à bicamada (eixo-Z) e, por consequência, também gera um perfil de densidade eletrônica, o que está relacionado com a natureza de cada elemento constituinte. O perfil de densidade eletrônica é uma medida bastante importante para se ter uma ideia da configuração da membrana, permitindo inclusive a determinação experimental da espessura da mesma. Ao término das simulações, pudemos estimar tal densidade em nossos sistemas (Fig. 3.7), e observar que a liberdade para a reestruturação dos eixos da caixa a torna maior, gerando o aumento da área por lipídio, e como consequência, uma membrana menos espessa. No *ensemble* NPA<sub>z</sub>T, os eixos da caixa não podem variar no plano XY, o que, neste caso, força a membrana a atingir níveis maiores de espessura. Apesar destas diferenças, a concordância do perfil resultante em ambos os casos é bastante satisfatória, reproduzindo o resultado de estudos similares, o que valida nosso sistema.<sup>6</sup>



**Figura 3.7.** Perfil da densidade eletrônica resultante das simulações da membrana mista nos *ensembles* NPA<sub>z</sub>T (círculos fechados) e NPγT (círculos abertos). Os componentes verificados estão descritos e associado às cores correspondentes. *Inset*: normalização dos resultados entre os dois *ensembles* para o sistema todo, é evidente um menor valor (menor espessura de membrana) para a estrutura NPγT.

Após extensivas análises, apresentamos dois modelos equilibrados, os quais julgamos serem apropriados para simulações envolvendo derivados virais. Evidentemente diferentes processos bioquímicos podem alterar a proporção fosfolipídica em relação à fonte do retículo endoplasmático rugoso, e tais mudanças devem ser consideradas nestes casos em particular.

Estamos cientes que todas as variações possíveis para a composição de lipídios são presentemente impraticáveis, no entanto, a partir deste modelo, podemos retirar algumas conclusões e parâmetros que nos guiem a eventuais modificações.

### 3.1.2.3 – Adaptação da bicamada lipídica mista às dimensões da Proteína E

O (inesperado) anúncio do estabelecimento da notável parceria entre a USP e a *Rice University* em 27/05/2102, nos possibilitou o uso compartilhado do supercomputador *Blue Gene/P*<sup>§§</sup>. Ao adicionar esse novo poder computacional ao repertório a nós disponível, pudemos explorar sistemas mais complexos e aproximadamente dez vezes mais numerosos que anteriormente, com a possibilidade de tratar sistemas com grande quantidade de átomos, como 300.000 (seções 3.1.3.1 e 3.1.3.3 ) ou mais.

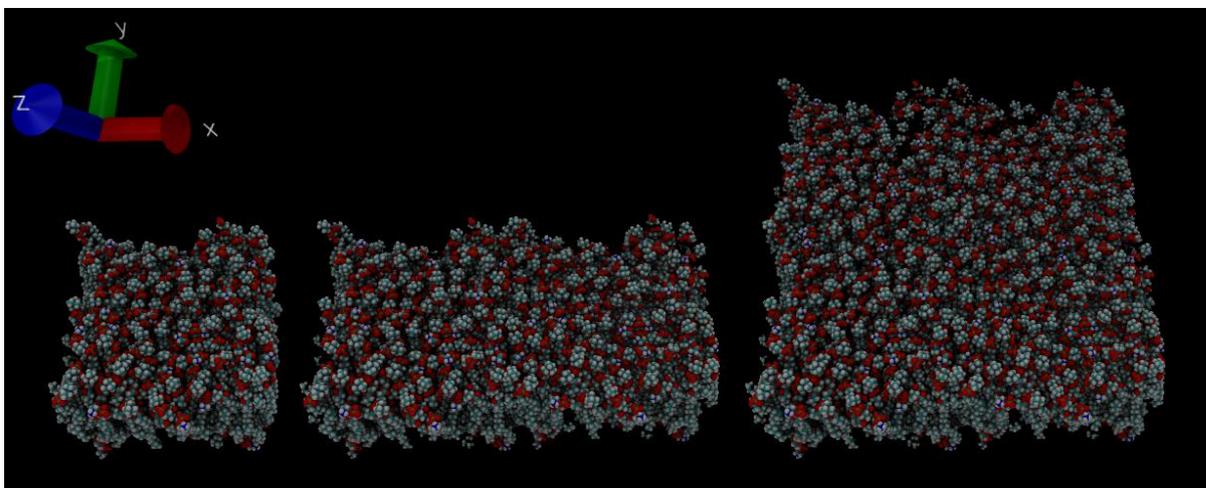
Com a finalização do modelo completo da proteína E, bem como o novo acesso a maior poder computacional, prosseguimos com a ampliação da membrana mista pré-equilibrada (**vídeo 3-2.mpg**). A bicamada resultante possui uma área muito maior que a anterior, o que permitiu a inserção do monômero da proteína E, bem como a inserção de seu dímero. Nas seções seguintes, reportamos os principais resultados referentes às simulações de dois sistemas: um composto de um monômero da proteína E na membrana RER, e outro de um dímero da proteína E na membrana RER. Este último sistema, no entanto, foi tratado de duas formas separadas, uma em pH 7 e outra em pH 6.

A extensão do maior eixo da Proteína E, ou seja, da extremidade do DIII até o *loop* de fusão (no DII) é de aproximadamente 140 Å, enquanto a diagonal da superfície de nosso modelo de membrana possui por volta de 100 Å. Portanto, para a devida inserção desta proteína em nosso modelo de membrana de RER, foi necessário seu aumento pela multiplicação de coordenadas, o que foi realizado pelo uso do programa *editconf*. Desta forma, duas multiplicações foram feitas, primeiramente na direção do eixo-X e em seguida, na direção do eixo-Y, através de duplicação sucessiva, como representado na **Fig. 3.8**. Este

---

§§ “USP e *Rice University* assinam convênio para uso de supercomputador”-  
<http://www.usp.br/imprensa/?p=19683>

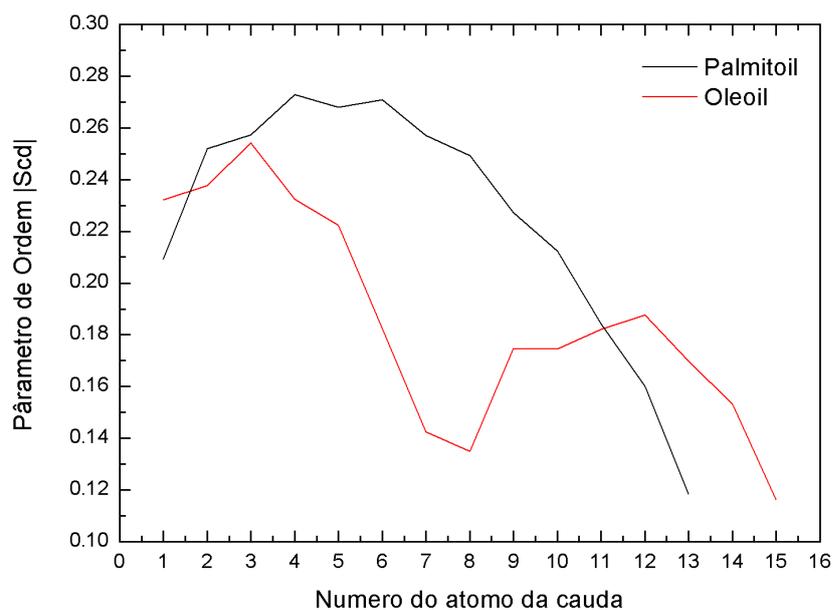
processo foi utilizado para aproveitar o estado inicial já equilibrado, bem como a proporção de lipídios de  $6_{\text{POPC}}:2_{\text{POPE}}:1_{\text{POPS}}:1_{\text{CHOL}}$ .



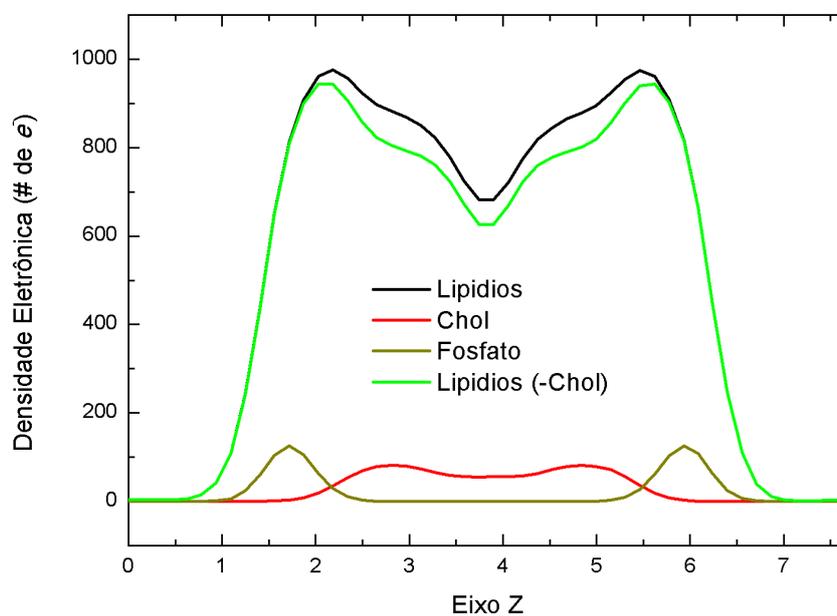
**Figura 3.8.** Padrão de multiplicação das coordenadas na membrana RER (10x10). À esquerda temos o modelo inicial, que foi duplicado uma vez no eixo-X (centro), que por sua vez foi duplicado uma vez mais, agora na direção do eixo-Y, gerando o novo modelo RER 20x20 (à direita).

Após este processo, nos precavemos em ajustar as junções entre as partes multiplicadas, assim como aquelas que fazem a fronteira das condições periódicas de contorno, inicialmente por uma minimização simples de energia, e posteriormente por uma simulação curta de dinâmica molecular com os átomos de fósforo com movimentos restritos ao plano XY, e em seguida uma rodada de simulação mais longa, sem qualquer tipo de restrição.

Ao final, após procedermos com algumas análises, confirmamos a manutenção do estado  $L_\alpha$  de cristal líquido da membrana. Isso se deu pela análise do parâmetro de ordem, o qual caracteriza orientação geral das cadeias lipídicas no sistema (**Fig. 3.9**), bem como pela densidade eletrônica (**Fig. 3.10**), que traça o perfil dos componentes do sistema, de acordo com sua localização e composição atômica.



**Figura 3.9** Parâmetro de ordem de deutério ( $|S_{cd}|$ ) das cadeias palmitoil e oleoil dos lipídios componentes da membrana mista RER (100x100). Os valores são condizentes ao estado de cristal líquido, ou seja, àquele correspondente ao estado biológico. Dados obtidos pelo programa *g\_hbond* (v. 4.5.4 – com *patch* corretor para cadeias insaturadas – Autor Dr.Christopher Neale), pertencente ao pacote GROMACS.



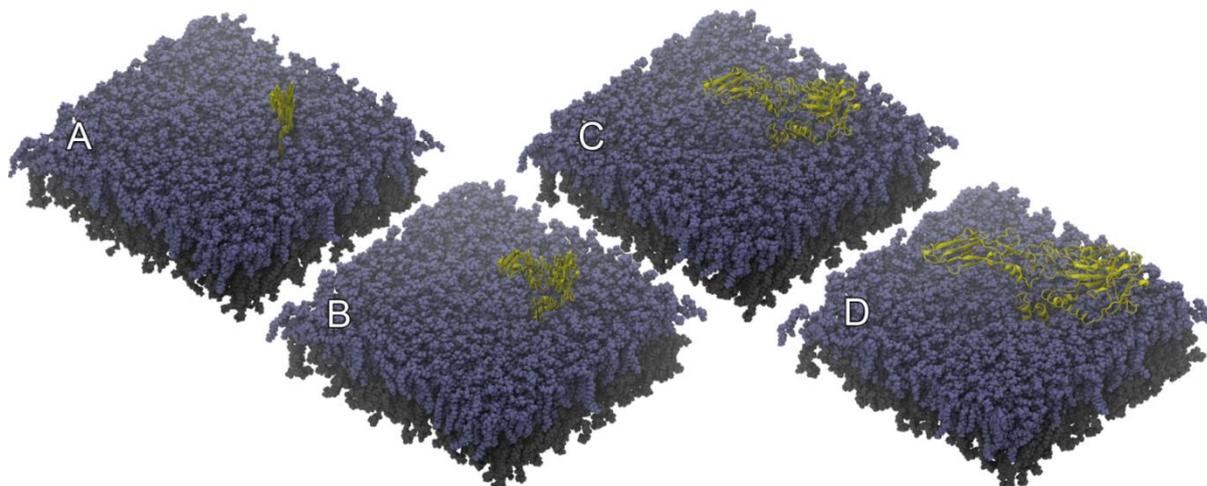
**Figura 3.10.** Densidade eletrônica dos últimos 10 ns de simulação da membrana RER (100x100). A coloração segue a indicação da legenda ao centro do gráfico. Dados obtidos pelo programa *g\_density* (v. 4.5.5), pertencente ao pacote GROMACS.

Com estas confirmações, verificamos e validamos a adequação deste modelo, passo fundamental para o avanço à próxima seção: a inserção da proteína E neste modelo de membrana.

### 3.1.3 – Inserção da Proteína E na bicamada lipídica

Existem várias técnicas para a inserção de uma proteína em bicamada lipídica,<sup>5</sup> sendo que basicamente isso pode ser feito de duas formas: criar a membrana ao redor da proteína e proceder com a termalização, ou construir e termalizar uma membrana, e só então proceder com a inserção da proteína. Aqui o termo “termalizar” se refere ao ajuste da orientação dos fosfolipídios e colesterol sob a ação das forças naturais (representadas no processo simulacional pelo campo de forças), de forma que a membrana apresente propriedades físico-químicas características da fase desejada a qual, em nosso caso, corresponde a fase de cristal líquido. Este tratamento é importante, pois um conjunto destoante de parâmetros pode levar a uma fluidez ou rigidez excessiva da membrana, o que influiria diretamente no comportamento da proteína a ser estudada.

O pacote GROMACS traz o programa *g\_membed* (*Gromacs Membrane Embed*),<sup>2</sup> que tem a função específica de auxiliar o usuário a inserir uma proteína ou qualquer outra molécula que possa ser elegível para a inserção. Este programa trabalha com a técnica de substituição, e seu protocolo segue a seguinte progressão: inicialmente a proteína a ser inserida é ajustada na posição final desejada, com sobreposição à membrana e moléculas de água; em seguida moléculas de água, íons, elementos pertencentes à membrana que estejam sobrepostas à proteína, são todos removidos; no estágio inicial do processo, a proteína é encolhida ao longo do plano-XY, com os átomos da proteína não interagindo entre si (simulação sem a computação de interações não ligadas intra-proteína), a fim de impedir o surgimento de energias espúrias; depois, ao longo da simulação, a proteína vai inflando progressivamente, até atingir seu tamanho natural, ao mesmo tempo em que lipídios circundantes vão se ajustando naturalmente à mesma; ao final, temos um sistema montado (**Fig. 3.11; vídeo 3-3.mpg**). É importante ressaltar que nesta etapa, os átomos da membrana não estão associados a nenhuma força de restrição: a membrana é livre para ajustar-se ao redor da proteína.



**Figura 3.11.** Método utilizado pelo *g\_membed* para a inserção de uma proteína na bicamada. Aqui mostramos a inserção de um monômero da proteína E do vírus do Dengue (em amarelo). **a)** Estágio inicial com a proteína encolhida no plano-XY. **b) e c)** Aumento progressivo da proteína no plano-XY. **d)** Estágio final da inserção da proteína na membrana. Para efeito de separação visual, a camada lipídica superior é colorida em azul, enquanto a inferior é colorida em cinza.

Logo após este estágio, uma breve simulação ( $\cong 5$  ns) é processada com todas as forças de restrições devidamente desativadas. A partir daí podemos proceder para continuar com a simulação de produção, de acordo com o que se pretende estudar.

Uma vez com parâmetros devidamente calibrados, a inserção do monômero da proteína E pelo *g\_membed* não impôs problema algum, como o usual. No entanto, a inserção do dímero se mostrou complicada, não do ponto de vista técnico, mas pelo fato de a adição do segundo monômero induzir o programa a fechar com erro de alocação de memória virtual. Após inserir ambos os monômeros, cada um em sistema separado, ficou claro que o problema é proveniente do código, o que foi confirmado após contato com o autor, Dr. Maarten Wolf, o qual, de posse das mesmas condições, conseguiu reproduzir o problema em seu laboratório.

Por essa questão, tivemos que lançar mão de uma solução diferente. Após a consideração sobre as várias opções disponíveis na literatura, nós afunilamos a inserção de proteínas para dois métodos. Na primeira bateria de simulações, o dímero é posicionado acima da membrana, a uma distância suficiente para não entrarem em contato, e uma força normal ao plano XY da membrana é aplicada na Proteína E, com sentido  $-Z$  (para baixo). A força aplicada move a proteína em direção à membrana, penetrando-a. Uma vez no posicionamento desejado, o movimento cessa e a simulação para. Enquanto este método

atinge seu objetivo de posicionar a âncora dentro da membrana, a inserção forçada e o deslocamento excessivo de fosfolipídios ao longo do eixo-Z causam uma perturbação relativamente grande, a qual poderia ser compensada por um tempo maior de termalização posterior, porém evidentemente à um maior custo de tempo computacional.

O segundo método tem sua constituição bem mais simples: é baseado na inserção por substituição. Inicialmente a proteína é artificialmente inserida na posição desejada na membrana, através do aplicativo VMD (*Visual Molecular Dynamics*).<sup>33</sup> Essa inserção traz os mesmos problemas que o passo inicial do *g\_membed*: sobreposição de átomos entre proteína, água e lipídios. Contudo, no passo seguinte essa sobreposição é eliminada, retirando-se todas as moléculas que estão a menos de 2 Å de distância<sup>\*\*\*</sup> da superfície da proteína E. Desta forma obtemos um protótipo da configuração inicial, o qual é então submetido a uma simulação com forças de restrição em todos os átomos da proteína (exceto hidrogênios) e nos átomos de fósforo (apenas no plano XY) dos componentes da membrana, com a finalidade de acomodar naturalmente a membrana à proteína. Em seguida, todas as restrições são retiradas, e todo o sistema é livre para interagir de acordo com os potenciais descritos no campo de força.

Nos tópicos seguintes nós descrevemos os principais resultados obtidos pela simulação destes sistemas, primeiramente o monômero (seção 3.1.3.1), e depois o dímero (seção 3.1.3.2).

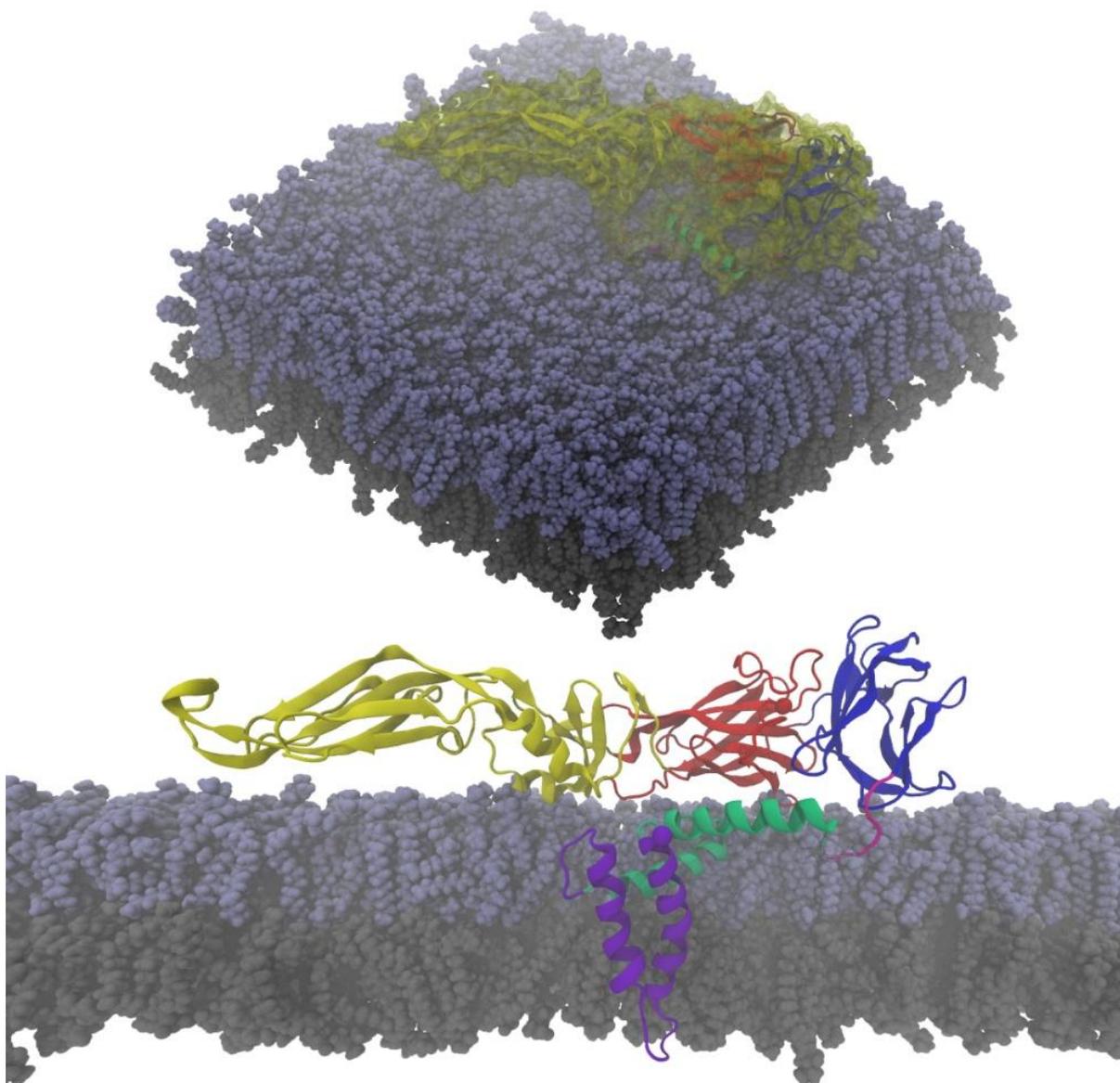
### 3.1.3.1 – Estudo do monômero da Proteína E na bicamada lipídica

Antes de iniciarmos o estudo do conjunto dimérico da Proteína E na membrana RER, optamos por avaliar o comportamento de seu monômero, de modo a obtermos as primeiras informações sobre este tipo de sistema. Nesta etapa, o monômero foi inserido com o auxílio do programa *g\_membed*, como já descrito e representado na Figura 5, com sistema de pH 7 e temperatura 310K. Sendo a proteína E uma molécula tipicamente alongada, esta foi embebida na bicamada seguindo a orientação da diagonal do fragmento (**Fig. 3.12**), com isso nós

---

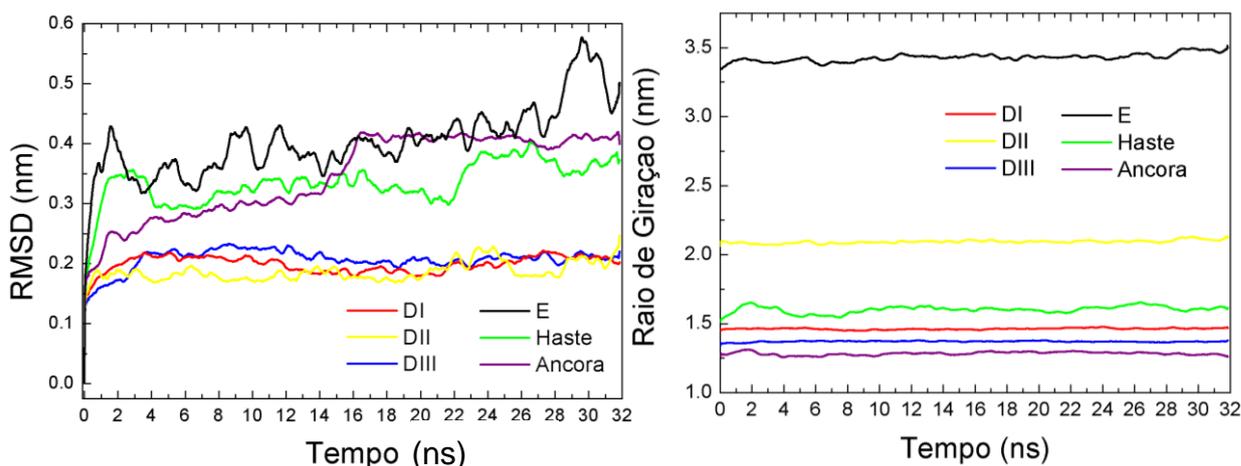
\*\*\* Foi escolhida a distância de 2 Å como uma margem de segurança em relação ao raio de solvatação da molécula de água, que é de aproximadamente 1,4 Å.

evitamos a auto interação por condições periódicas de contorno (já que fornecemos maior distanciamento entre as imagens da própria proteína nas caixas-réplicas) com menor quantidade de lipídios e solvente, acelerando a simulação. O posicionamento da proteína em relação ao plano da membrana RER (**Fig. 3.12**) se deu de acordo com os dados obtidos por microscopia eletrônica de criogenia,<sup>17</sup> atentando-nos a reproduzir mais proximamente possível a profundidade e ângulos descritos no trabalho original.

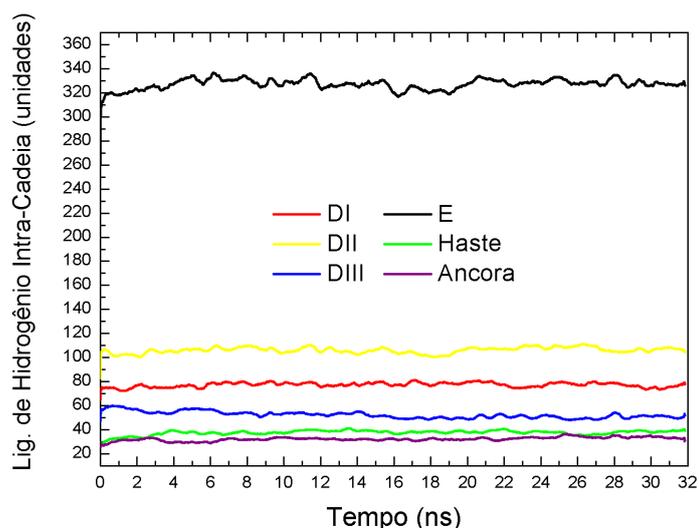


**Figura 3.12.** Visão geral do estágio inicial da simulação do monômero da proteína E inserido na membrana RER. **Acima**, visão em perspectiva sobre o sistema, evidenciando a orientação da proteína E (aqui representada em *cartoon* e em superfície transparente amarela) em relação ao longo da diagonal do fragmento da membrana. **Abaixo**, detalhe da inserção da proteína E na membrana RER. Observe que, para efeito de clareza, a visão da membrana conta com um corte e assim se encontra em um plano mais profundo em relação à visão da proteína, dando a falsa impressão de que o complexo haste+âncora é maior em relação à membrana do que ocorre na realidade. Para uma visualização mais representativa, observe o posicionamento desta região já equilibrada, após o início da simulação (**Fig. 3.15**)

Inicialmente, a fim de verificar o comportamento estrutural da proteína E ao longo do tempo, analisamos a deformação da cadeia proteica através da Raiz do Desvio Médio Quadrático (*Root Mean Square Deviation* – RMSD) (**Fig. 3.13**), assim como o seu nível de empacotamento, pelo raio de giração (**Fig. 3.14**) e pela contabilização de ligações de hidrogênio estabelecidas intracadeia proteica (**Fig. 3.15**).



**Figura 3.13.** Análises do comportamento estrutural da Proteína E e seus componentes individuais. À esquerda, são representadas as curvas de RMSD, e à direita é representado o gráfico com os resultados da evolução do raio de giração. A correspondência de cores com as diversas partes da proteína E é indicada na legenda. As curvas foram suavizadas (programa Origin 8.0) pelo método de redução de ruídos “*Adjacent-Averaging*” com a média de 50 pontos sendo representada por um único valor.



**Figura 3.14.** Número de ligações de hidrogênio intracadeia, indicando a manutenção de estruturas secundárias, bem como a estrutura da proteína E como um todo, durante todo o tempo da simulação. A correspondência de cores é indicada na legenda. As curvas foram suavizadas (programa Origin 8.0) pelo método de redução de ruídos “*Adjacent-Averaging*” com 50 pontos.

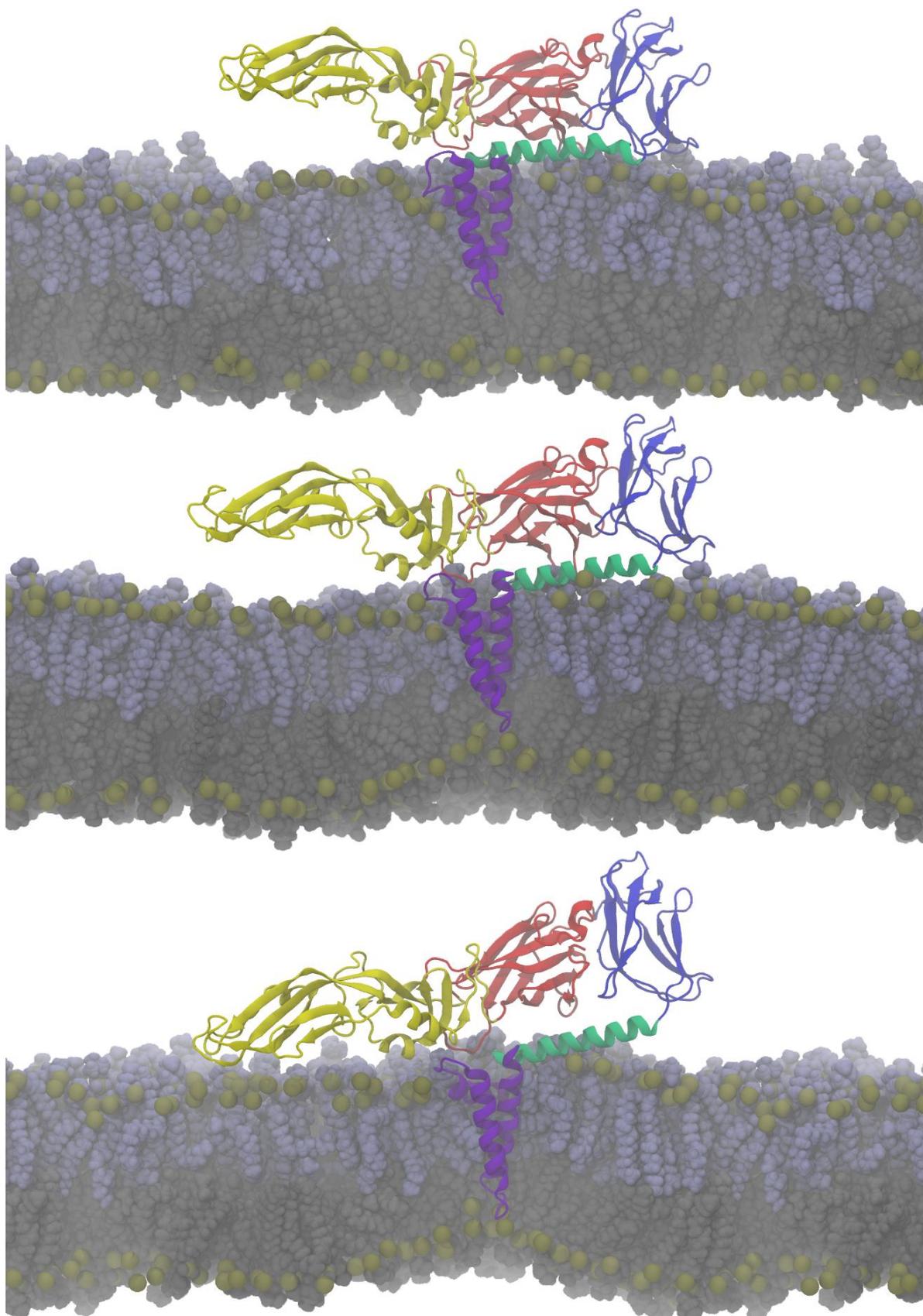
A proteína E, como um todo, sofre um ajuste inicial rápido (até 2 ns), e permanece mais ou menos constante, com relativamente pequenas flutuações até por volta de 28 ns, quando uma nova perturbação estrutural ocorre (**Fig. 3.13**, linha preta). Os domínios I, II e III sofrem apenas ajustes iniciais típicos, permanecendo praticamente inalterados durante a simulação, indicando a manutenção de suas respectivas estruturas nativas. No entanto, a haste e a âncora apresentam acomodações estruturais maiores, atingindo níveis de flutuação compatíveis com aqueles da proteína E como um todo. A âncora sofre sua maior acomodação (um leve ajuste conformacional, de 0.1 nm) no ponto mediano que separa a trajetória (ao redor de 15 ns) em duas metades praticamente constantes. A haste, por sua vez, sofre uma acomodação estrutural, de aproximadamente mesma amplitude que a da âncora, por volta de 22 ns. É natural que a âncora apresente os maiores valores de RMSD, já que se trata da parte mais diretamente envolvida na interação com os lipídios da bicamada, seguindo flutuações decorrentes do movimento individual de seus componentes, bem como das ondulações do conjunto.

Complementarmente, os dados sobre a variação da compactação da cadeia e de seus componentes individuais, a evolução do raio de giração, mostra que não houve nenhuma distensão efetiva em qualquer região da proteína E e seus adendos. Os dados sobre a frequência de ligações de hidrogênios estabelecidas por átomos intracadeia confirmam a ausência de qualquer efeito desnaturante em qualquer estrutura secundária bem como na configuração terciária da proteína E.

Como um todo, tanto a estrutura da membrana quanto da proteína E (global e localmente), se mantêm íntegras (**vídeo 3-4.mpg**). As ondulações da membrana transferem energia para a proteína E, as quais não chegam a ser suficientes para sua desestabilização, mas mesmo assim acabam originando inclinações relativas entre o DI/DIII e o DII, intermediadas pela junção DI/DII, a qual funciona como uma dobradiça. Tratando-se de uma série de movimentos periódicos, em alguns instantes o DII encontra-se relativamente mais elevado em relação ao plano geral da proteína (**Fig. 3.15**, ao meio), enquanto ocasionalmente ocorre o oposto. Estas flutuações poderiam ser esperadas para o DII, já que este é o domínio mais afastado da região de ancoragem na membrana, porém, surpreendentemente, o mesmo acontece com o DIII, que é justamente o domínio diretamente ligado à haste e âncora. O DIII apresenta certa liberdade na direção ortogonal ao plano da membrana e isso é possível por que ele não está diretamente ligado à âncora, mas sim pela haste, a qual parece possuir função

análoga a um amortecedor. Isso é interessante pois, apesar de ser essencialmente uma proteína transmembrana, a região sE parece não receber transmissão direta de energia por sua inserção na membrana (âncora), mas sim por contato direto com a bicamada. Podemos ver claramente que existem implicações ainda inexploradas sobre esse fato no que diz respeito à liberdade de elevação dos monômeros e formação de trímeros, os quais acredita terem sua região de haste quase que totalmente estirada, o que, neste caso, poderia promover a tração mecânica direta entre membrana do hospedeiro–proteína E–membrana viral.

Outra ocorrência que vale destaque é a formação de uma depressão na camada inferior da membrana, o que é causado pela polaridade do *loop* posicionado entre as hélices da âncora (**Fig. 3.15**, ao centro e abaixo), o qual interage diretamente com o grupo fosfato da membrana. Embora poderia se esperar que a bicamada exercesse tração e provocasse um alongamento na estrutura da âncora, isso não ocorre. Acreditamos que essa curvatura local, sendo multiplicada por 180 (número de monômeros na superfície do vírus) e, possivelmente somada à influência das sE interagindo lateralmente entre si, possa ser a grande responsável pelo formato icosaédrico viral, e pode dar alguma luz à origem da curvatura e formato semiesférico viral à partir da superfície mais ou menos plana do RER, com a síntese proteica e montagem das partes durante a gênese da partícula viral.



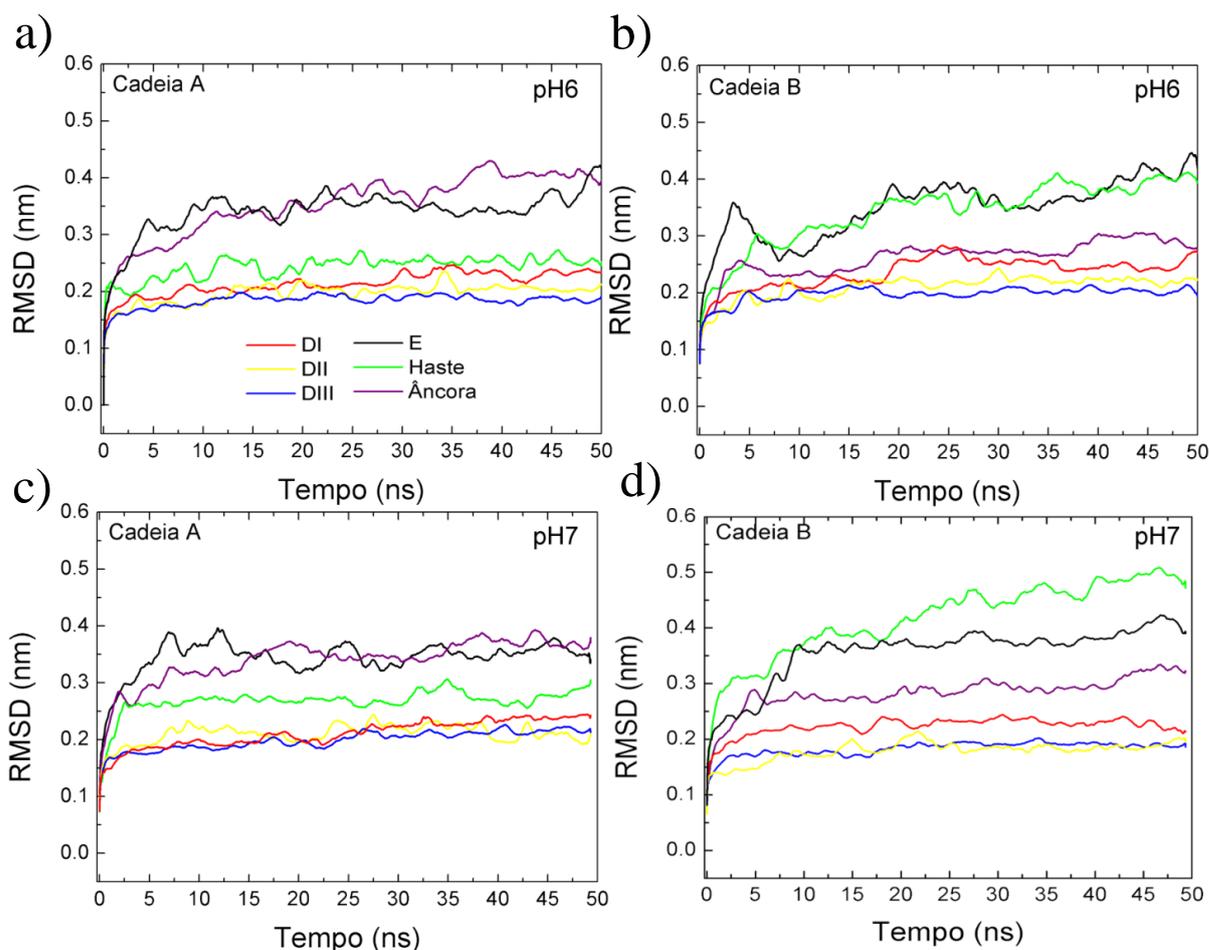
**Figura 3.15.** Três momentos representativos distintos identificados ao longo da simulação do monômero da proteína E devidamente ancorada na membrana RER. **No topo**, ao início da simulação, a âncora (em violeta) não apresenta comprimento suficiente para atravessar a bicamada. **Ao meio**, aproximadamente após 10 ns, o loop polar (por causa de um resíduo de arginina) localizado entre as hélices da âncora causa uma distorção em forma de funil na camada inferior, enquanto o domínio II apresenta-se levemente destacado da base da bicamada. **Abaixo**, a figura mostra a liberdade de deslocamento ao longo do eixo Z que, como o domínio II, o domínio III curiosamente também apresenta.

### 3.1.3.2 – Estudo do dímero da proteína E na bicamada lipídica

Após o estudo inicial do monômero inserido na bicamada lipídica da membrana RER, seguimos para o passo seguinte aqui apresentado. A inserção da proteína E em forma dimérica (cadeia A e B) foi feita pelo método de substituição, onde as hastes foram devidamente posicionadas na membrana, e todos os lipídios que a sobrepujam foram eliminados. Em seguida, 50 ns de uma simulação de restrição de movimentos na proteína e ajuste dos lipídios à porção transmembrana foram mais que suficientes para a eliminação de pontos de vácuo, decorrentes do processo de inserção da proteína no sistema, concluída a sua adequação aos próximos passos.

Diferentemente do monômero, aqui foram feitas duas simulações mais longas e com pHs diferentes: pH 6 e 7. A diferença de pH foi introduzida com o objetivo de estudarmos eventuais diferenças que possam surgir com a diferença da protonação das histidinas nas cadeias A e B do dímero. Para isso, lançamos mão das mesmas análises apresentadas na seção anterior, bem como inspeção direta (visual) da trajetória.

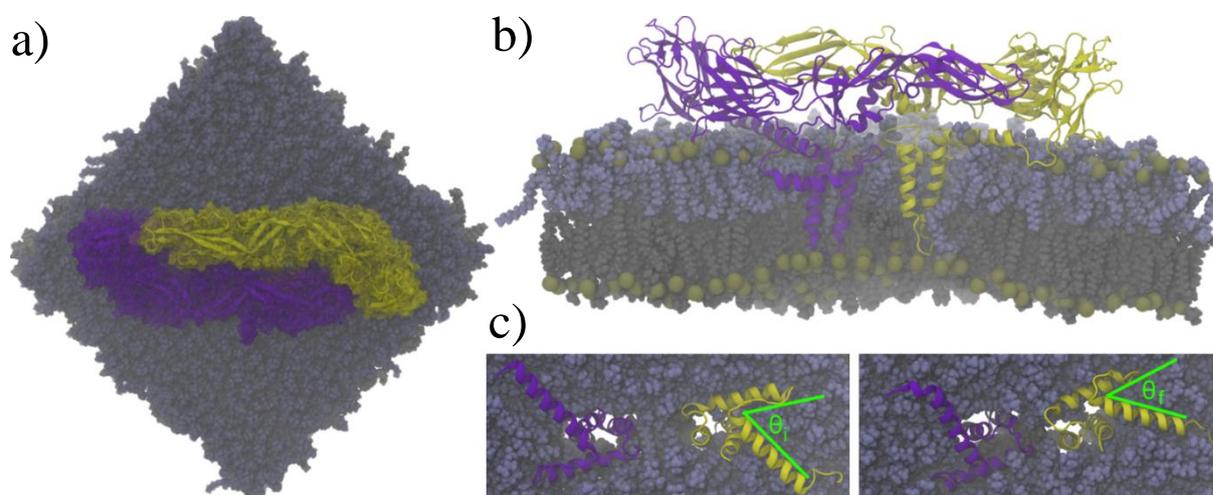
Em primeira análise, percebemos a ausência de grandes flutuações em ambos os pHs e que a deformação do complexo se dá de uma forma similar àquela apresentada no monômero, desde que consideremos as partes isoladas (**vídeo 3-5.mpg**). De fato, como um todo, os monômeros apresentam deformações menores quando em conjunto, do que quando isolados, o que é evidenciado na **Fig. 3.16**. Isso tem como causa direta o efeito que a interface de interação tem sobre seu vizinho, sendo que, as interações fracas estabelecidas fornecem energia estabilizadora adicional, a qual limita consideravelmente a flutuação de sE em relação ao eixo-Z, bem como a separação dimérica, como se observa na **Fig. 3.16**, item (a). Além disso, o efeito que a âncora tem sobre a membrana e a consequente formação de regiões de menor espessura também são observados no dímero, de fato, com maior intensidade, **Fig. 3.17**, item (b).



**Figura 3.16.** Evolução do RMSD em pHs diferentes e para cada cadeia separadamente. Em **a)** e **b)**, temos os dados para o pH6, respectivamente para a cadeia A e B. Em **c)** e **d)**, temos os dados para o pH7, respectivamente para a cadeia A e B. As curvas foram suavizadas (programa Origin 8.0) pelo método de redução de ruídos “Adjacent-Averaging” com 50 pontos.

Os domínios de sE, como unidades isoladas, não apresentam acomodações significativamente distintas em diferentes pHs, o que significa que a estrutura do dímero é mais estável, isto é, não sofre acomodações grandes o suficientes para caracterizar alguma segregação entre os monômeros, na janela de tempo simulado (50ns). De forma geral, como já visto anteriormente, as maiores deformações se concentram na região de direto contato com a membrana, a saber, a haste e a âncora, e são causadas diretamente por perturbações do movimento molecular dos lipídios e colesterol, bem como pelas ondulações deste sistema de interface. Contudo, dada a pequena amplitude das deformações (observe que valores máximos atingem 0,5 nm), as diferenças entre as curvas são insignificantes. Note que elas guardam ainda a memória das condições estruturais iniciais, como mostram as curvas para a mesma cadeia em pHs diferentes. Aqui também, a haste parece propensa a sofrer os maiores rearranjos, como visto para a cadeia B em pH 7, o que é detectado também para pH 6 (cadeia

B). Entre estes últimos, a haste parece sofrer um maior rearranjo maior em pH 7, o que é detectado simultaneamente nas cadeias A e B, eliminando o efeito local que poderia acometer apenas os monômeros isoladamente. Este rearranjo, porém, é mínimo, e consiste apenas em uma leve angulação, a qual é mostrada na Figura 3.17(c). É importante ressaltar que os valores apresentados na Figura 3.16 devem ser interpretados de acordo com o tipo de estrutura de referência utilizada para o cálculo do RMSD. Como nós utilizamos a primeira estrutura como referência (tempo zero), as curvas descrevem bem a transição do estado inicial para o de equilíbrio, mas superestimam os valores em que este equilíbrio se estabelece.

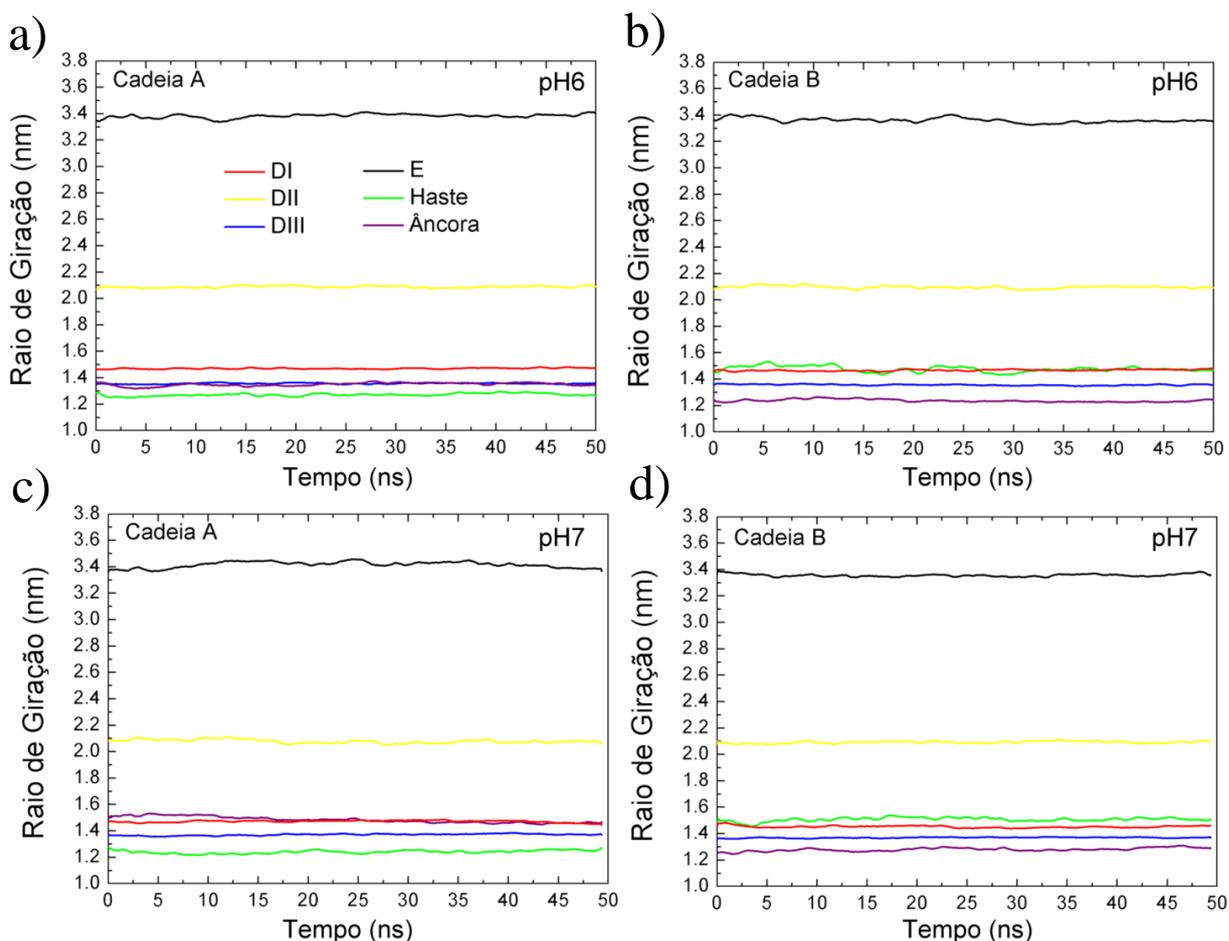


**Figura 3.17.** Resultados relevantes quanto à simulação dimérica. **a)** Uma visão representativa do sistema mostra que até o fim dos 50 ns nenhuma dissociação entre os dímeros ocorre, independente do pH, sugerindo que grandes mudanças conformacionais ocorrem em escalas de tempos maiores. **b)** Uma grande perturbação na espessura da membrana, e consequente em sua curvatura são identificadas a partir de alguns nanossegundos de simulação. Este efeito é mais pronunciado com o dímero do que com o monômero. **c)** A principal modificação responsável pelas diferenças de raio de giração e RMSD na cadeia B, discutidas no texto, é causada pelo ajuste angular entre as hélices componentes da haste, onde o ângulo inicial  $\theta_i$  é maior que o final  $\theta_f$ . A coloração violeta e amarela corresponde, respectivamente às cadeias A e B.

Como a membrana equilibrada possui uma estrutura onde as moléculas de lipídios não são alinhadas regularmente, então obviamente o local de inserção para cada âncora apresenta vizinhança com moléculas de configurações distintas, o que influi diretamente sobre o comportamento de equilíbrio inicial de regiões específicas, em nosso caso as âncoras e hastes. Uma análise apenas entre as cadeias B, pode fornecer mais informações sobre a influencia do pH no sistema, como apontado acima. Esta diferença inicial na inserção nos lipídios, não permite o estabelecimento de uma análise direta entre cadeia A e B, a não ser sobre o efeito da

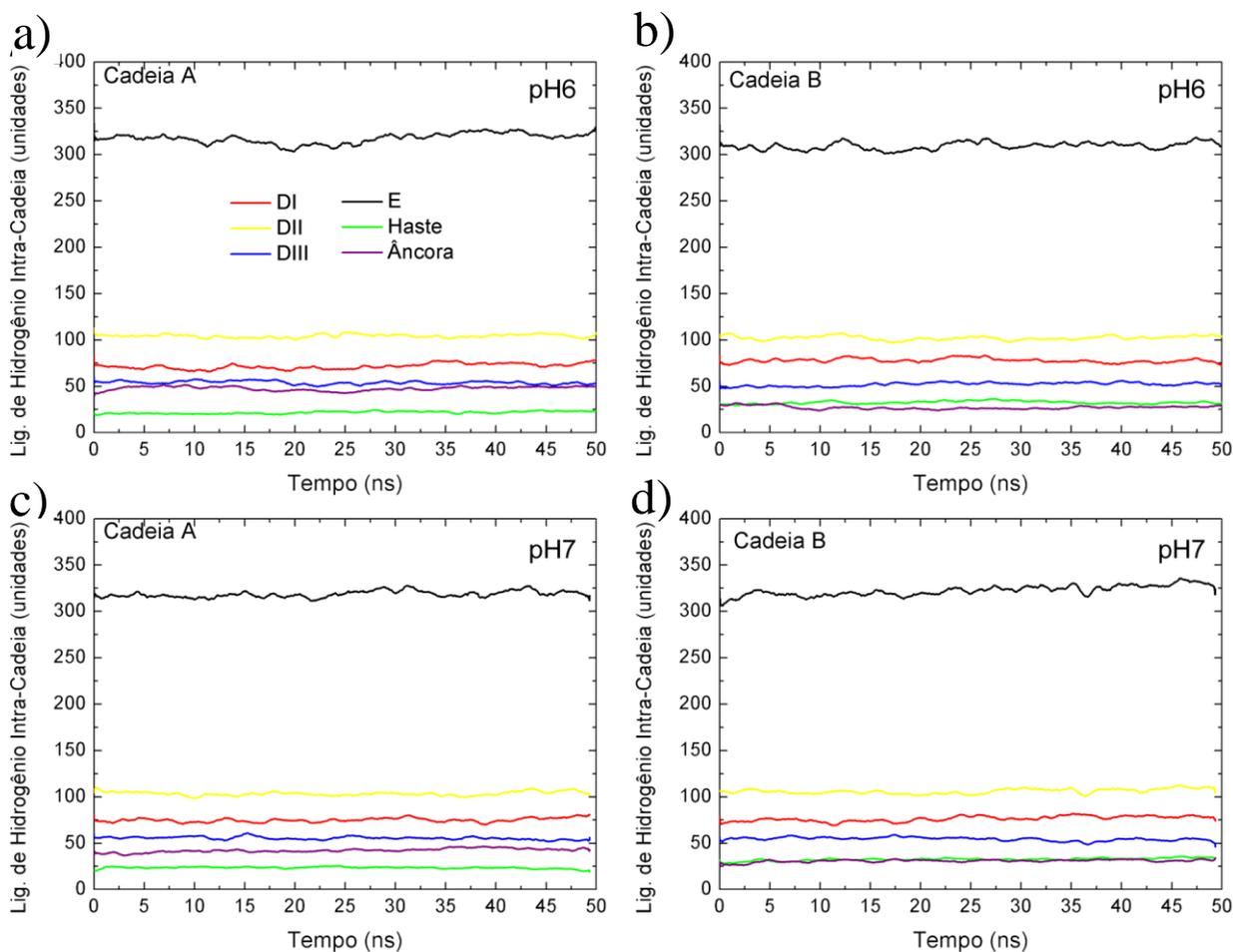
configuração inicial sobre a final. Assim, simulações em janelas de tempo consideravelmente maiores se fazem necessárias.

Como visto acima, nesta janela de tempo (50ns), a variação de pH, não nos fornece resultados definitivos em relação à mudanças estruturais de grande extensões, como também não mostra alterações nas interações que mantêm os monômeros na forma dimérica. De fato, a maior variação observada não ocorreu em diferentes pHs, mas sim em diferentes cadeias (A e B): de fato, os gráficos indicam que, em um mesmo pH e nas condições iniciais adotadas, a cadeia B sempre apresenta um perfil de ajuste inicial mais pronunciado porém, a curva do RMSD alcança um patamar e se mantém praticamente constante a partir do instante de aproximadamente 20ns. O nível de compactação dos diferentes componentes da proteína (domínios de sE, haste e âncora) se mantiveram praticamente constante durante a totalidade das simulações (**Fig. 3.18**), o que reforça a conclusão de que, apesar de flutuações locais para ajuste relativo dos componentes das cadeias, na janela de tempo adotada, estes praticamente não perdem suas respectivas configurações originais.



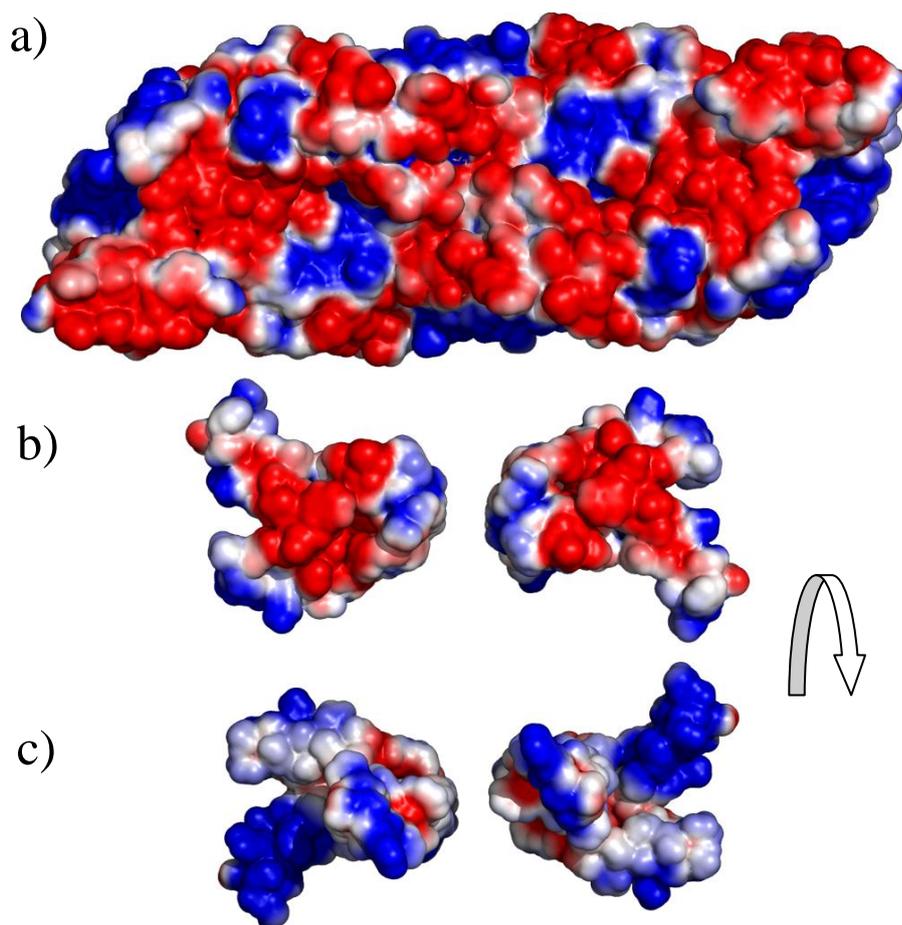
**Figura 3.18.** A evolução do Raio de Giração correspondente às simulações em pHs diferentes e em separado para cada cadeia. Em **a)** e **b)**, temos os dados para o pH6, respectivamente para a cadeia A e B. Em **c)** e **d)**, temos os dados para o pH7, respectivamente para a cadeia A e B. As curvas foram suavizadas (programa Origin 8.0) pelo método de redução de ruídos “*Adjacent-Averaging*” com 50 pontos.

Outra forte evidência da estabilidade estrutural se dá pela apresentação da grande constância das ligações de hidrogênio intracadeia (**Fig. 3.19**). Excluindo-se a já citada diferença inicial na vizinhança da âncora e haste da proteína E, todos os valores se mantêm muito próximos, com uma pequena exceção da âncora na cadeia A, a qual mostrou um leve aumento de ligações de hidrogênio em sua estrutura, decorrente da diminuição do pH6. A análise combinada com o Raio de Giração, no entanto, mostra que este aumento no número de ligações de hidrogênio é acompanhado de uma redução do Raio de Giração, indicando maior compactação. Ambas as perturbações se referem à elongação (detectado apenas na cadeia A) das duas hélices que compõem a âncora, em detrimento do comprimento do *loop* que conecta as mesmas



**Figura 3.19.** O número de ligações de hidrogênio estabelecidos intracadeia correspondentes às simulações de pHs diferentes, separada para cada cadeia. Em **a)** e **b)**, temos os dados para o pH6, respectivamente para a cadeia A e B. Em **c)** e **d)**, temos os dados para o pH7, respectivamente para a cadeia A e B. As curvas foram suavizadas (programa Origin 8.0) pelo método de redução de ruídos “*Adjacent-Averaging*” com 50 pontos.

A distribuição de cargas da proteína E e alguns de seus componentes isolados revela a origem das forças estabilizadoras do sistema, e, traçando o mapa eletrostático de superfície (**Fig. 3.20**) em pH 7, conseguimos uma avaliação mais completa da interação intra-proteína e proteína-membrana. Os cálculos foram feitos utilizando o *plugin APBS*<sup>47</sup> no *PyMol*. Observamos que a distribuição de cargas na superfície externa dos domínios I, II e III é predominantemente negativa, com alguns pontos positivos espalhados ao centro e nas bordas, enquanto a superfície inferior, àquela em contato com a superfície polarizada e levemente negativa da membrana, é predominantemente positiva. Além disso, a superfície de contato da haste com a base da proteína E, também é positiva, o que explica a atração entre as partes, e o papel de amortecimento da primeira sobre a segunda. Finalmente, o perfil da âncora mostra uma predominância de regiões eletroneutras, com exceção da já citada extremidade do *loop* de ligação entre as hélices.



**Figura 3.20.** Perfil eletrostático em pH 7. **a)** dímero da proteína E - visão superior (externa); **b)** haste+âncora – visão superior mostrando a superfície de contato com a parte inferior dos domínios I, II e III; **c)** haste+âncora – visão inferior mostrando a parte embebida na membrana. A coloração segue a seguinte convenção: azul indica carga superficial local positiva (carga elementar  $+e$ ); vermelho indica carga superficial negativa (carga elementar  $-e$ ); colorações mais claras indicam áreas de transição, enquanto áreas esbranquiçadas indicam eletroneutralidade.

Compilando todas estas informações do perfil eletrostático de superfície, fica evidente que a interação proteína E (inclusive entre seus componentes) e membrana é finamente ajustada de modo que haja atração mútua, e, portanto, o estabelecimento de forças atrativas de estabilização.

### **3.2 – Inibição da infecção viral pela Fosfolipase A<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus*: estudo teórico e experimental**

Nesta seção descrevemos um experimento computacional sobre inibição da infecção viral. Esta parte de nosso trabalho se desenvolveu em cooperação com o grupo do Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana (*Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP*). Tal estudo consiste na utilização da Crotoxina e a Fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>-CB), proteínas provenientes da peçonha da cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*), como agentes inibidores da infecção do Dengue em células Vero E6. Nesta cooperação, exploramos a topologia do envelope viral a fim de propor possíveis mecanismos estruturais que possam explicar a maneira pelas quais a PLA<sub>2</sub> promove tal inibição.

A PLA<sub>2</sub> apresenta uma alta eficiência *in vitro* na inibição da infecção de células hospedeiras pelo vírus do Dengue (resumo dos resultados experimentais no Apêndice B). Sendo uma fosfolipase, a hipótese inicial é que sua ação se daria agindo diretamente sobre a bicamada lipídica viral, contudo como a PLA<sub>2</sub> é uma proteína, poderia se sugerir que seu sucesso na inibição viral se deve ao estabelecimento de interações do tipo proteína-proteína (com o envelope viral que protege a bicamada lipídica), por ligações de hidrogênio ou pontes salinas, por exemplo. A PLA<sub>2</sub> poderia apresentar certas regiões em sua superfície com afinidade a certas regiões da superfície do vírus do Dengue, mais especificamente com a proteína E, e de alguma forma bloqueando a infecção. Sua suposta complexação com o vírus do Dengue poderia dificultar eficientemente a evolução configuracional da proteína E na formação de trímeros, quando os *loops* de fusão estão posicionados em uma maneira ótima para promover a fusão de membranas com o hospedeiro. Evidências mostram, no entanto, que este muito provavelmente não é o caso. Experimentos adicionais de inibição pela PLA<sub>2</sub> foram feitos pelo grupo do Prof. Victor Hugo, onde a efetividade da inibição viral pela PLA<sub>2</sub> foi testada para diferentes famílias virais (Rocio – Flavivirus; Mayaro – Alfavirus; Oropoche – Buniavírus; Coxsackie – Enterovírus), com taxa similar de sucesso. Estas famílias distintas

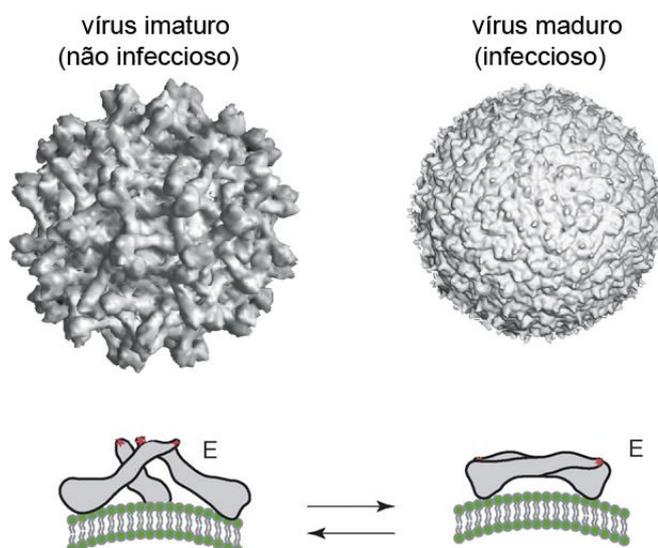
apresentam composições diferentes de aminoácidos, levando a composições proteicas diferentes, o que sugere a impossibilidade deste ser o fator comum sobre o qual a PLA<sub>2</sub> age.

Por outro lado, todos estes vírus apresentam uma camada lipídica interna mais ou menos acessível através do envelope proteico, e este pode ser um fator comum, o qual escolhemos para estudar e justificar os resultados obtidos pelos ensaios de inibição do crescimento viral em cultura de tapetes de células de macaco. Então, estudamos aqui possíveis hipóteses de como a PLA<sub>2</sub> age sobre a partícula viral não através de uma interação proteína-proteína, mas sim através de seu caminho catalítico, agindo sobre fosfolipídios individuais sob o envelope viral.

Aliando a ação conhecida de hidrólise em ligações *sn*-2 de glicerofosfolipídios da PLA<sub>2</sub>,<sup>48</sup> bem como os resultados experimentais que confirmam sua eficácia de inibição viral apenas em partículas envelopadas aqui descritas, decidimos investigar a possibilidade da PLA<sub>2</sub> conseguir, de alguma maneira, transpor a barreira física externa imposta pelo envelope proteico e acessar seu substrato, a bicamada lipídica. Existem evidências que indicam que vírus de simetria icosaédrica, tal qual o vírus do Dengue, exibem um padrão de equilíbrio de forças bem determinado<sup>49</sup> e que pequenas perturbações poderiam desestabilizar sua estrutura, principalmente neste caso, onde a destruição de porções da bicamada podem levar a um consequente impedimento de rearranjo estrutural, essencial na dinâmica de fusão de membranas.

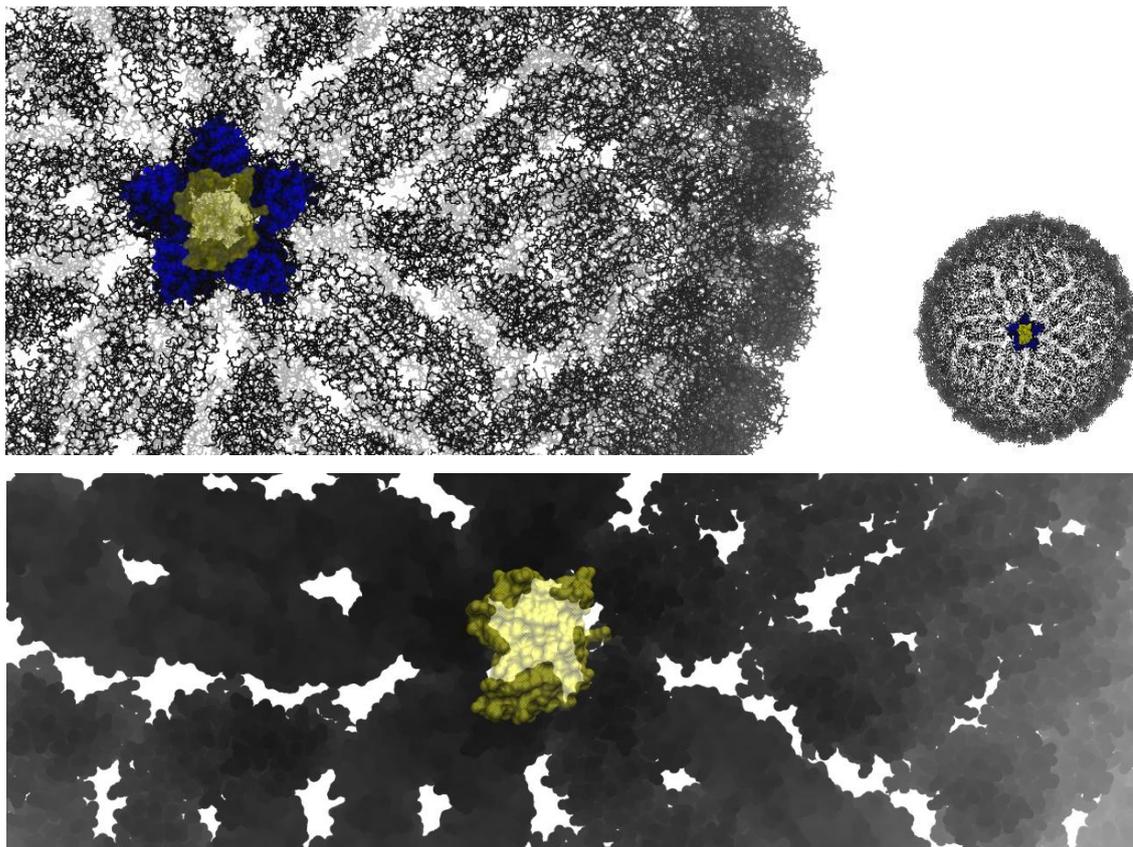
Uma vez sintetizado pelo hospedeiro, o vírus do Dengue pode ser encontrado principalmente em dois estágios: maduro e imaturo (**Fig. 3.21**). Até o começo de 2013, a literatura sugeria que o vírus maduro teria uma cobertura proteica hermética, sem qualquer abertura prontamente larga o suficiente para prover acesso de uma molécula das dimensões da PLA<sub>2</sub> à bicamada lipídica, através do envelope proteico. Nós estudamos computacionalmente estas regiões, e nossas evidências indicam claramente que os únicos sítios no vírus maduro que exibem um diâmetro de maior acesso à bicamada são justamente os poros pentarradiais encontrados nos vértices da assimetria icosaédrica, o qual descrevemos com detalhes no Capítulo 2, seção 2.2.3. Estas são as aberturas de maior diâmetro no envelope proteico, as quais permitem a comunicação do ambiente externo com a bicamada lipídica, tornando nossa principal hipótese de que a PLA<sub>2</sub> poderia utilizar justamente esta via de acesso ao substrato.

Estes poros (12 ao todo na superfície viral), no entanto, mesmo sendo as aberturas mais largas na estrutura, não oferecem espaçamento suficiente para o livre acesso da PLA<sub>2</sub> à bicamada lipídica, como podemos ver por simples sobreposição na Figura 3.22.



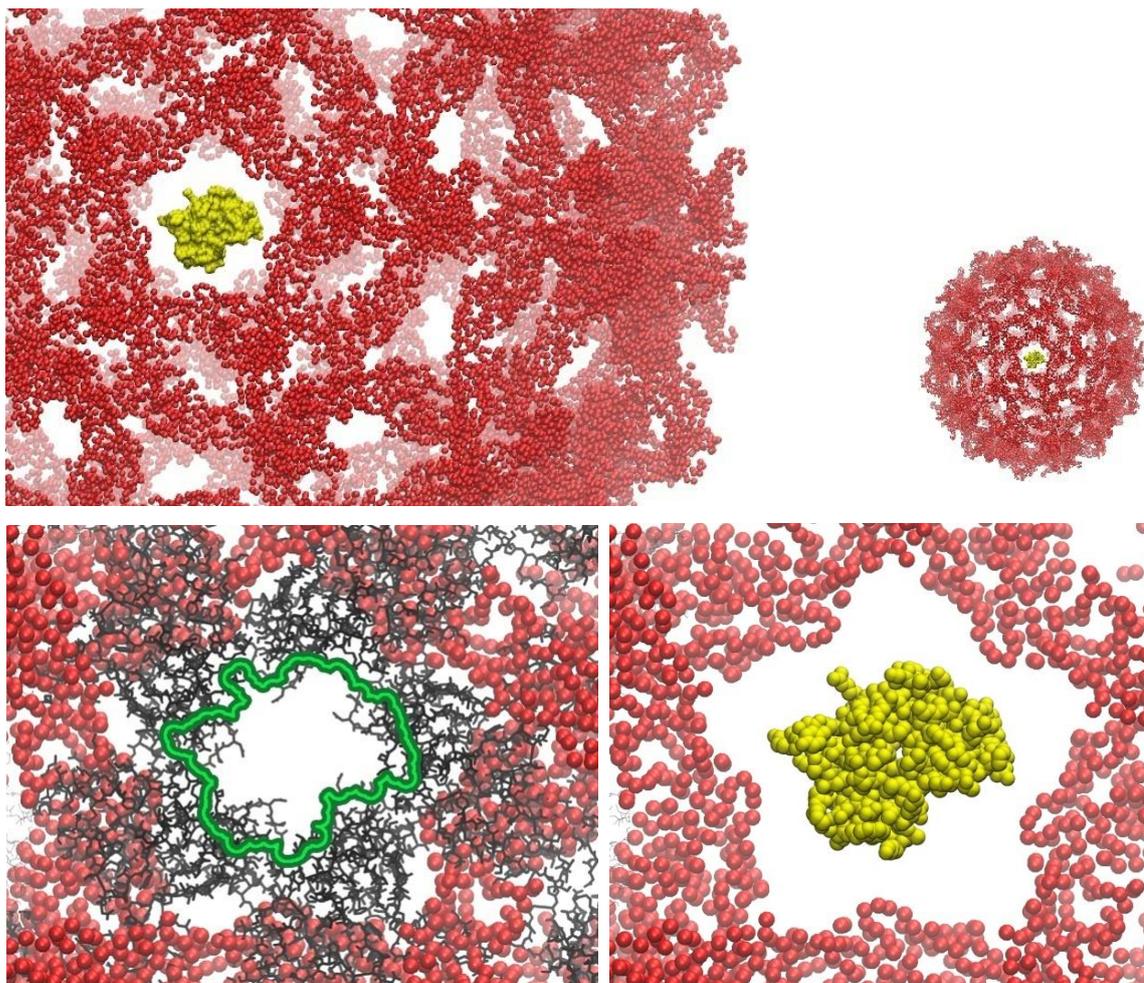
**Figura 3.21.** Reconstrução de microscopia eletrônica por criogenia das partículas virais imatura (à esquerda) e madura (à direita) do Dengue. Abaixo de cada uma das estruturas está ilustrado como as proteínas E estão dispostas em ambos os estágios, sendo que no vírus imaturo, o espaçamento entre estas subunidades é muito maior, o que causa grande aumento na exposição da bicamada lipídica ao ambiente. Figura adaptada de Perera e Kuhn (2008).<sup>105</sup>

O modelo utilizado para a base de reconstrução do vírus do Dengue foi o de código PDB 1THD,<sup>50</sup> com o alinhamento de um modelo refinado das unidades da proteína E (PDB ID: 1OAN)<sup>21</sup>, enquanto que o modelo utilizado da PLA<sub>2</sub> foi o de código 2QOG.<sup>51</sup> Este empacotamento de alta densidade do envelope viral, no entanto, é transitório. Ele ocorre apenas no estágio maduro, onde as proteínas E estão dispostas paralelamente à superfície viral, em 90 conjuntos diméricos. O estágio imaturo é constituído por uma formação muito mais espaçada, com aberturas mais frequentes e maiores (Figura 3.23), as quais permitem mais facilmente a passagem através do envelope proteico e o estabelecimento de contato entre a PLA<sub>2</sub> e seu substrato: os fosfolipídios da bicamada.



**Figura 3.22.** Os pontos de acesso à bicamada lipídica na superfície da partícula viral madura. Acima: à direita uma vista geral do vírus maduro, com detalhe aumentado à esquerda, destacando um poro pentarradial (em azul), com uma molécula de PLA<sub>2</sub> acoplada (amarelo transparente). Abaixo: uma superfície com átomos representados em seus respectivos raios de van der Waals, mostrando a grande quantidade de pequenas fissuras que causam comunicação da bicamada com o ambiente, ao mesmo tempo em que acoplamos a PLA<sub>2</sub> à maior abertura de todas, àquela correspondente ao poro (o qual ainda se mostra estreito para a difusão da PLA<sub>2</sub>).

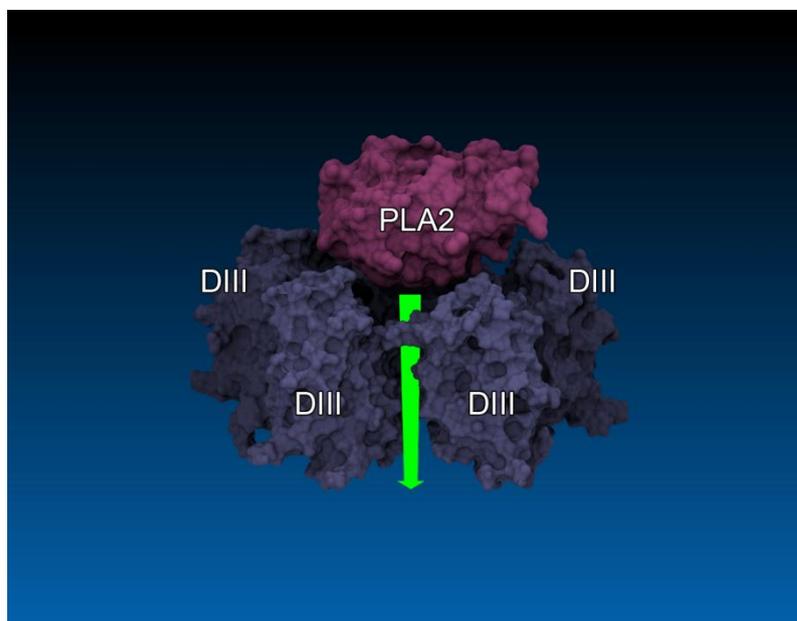
É importante salientar que um terceiro grupo, os vírus parcialmente maduros (podemos incluir aqui também partículas com pequenas imperfeições), são perfeitamente capazes de infectar a célula hospedeira, mas também são suscetíveis à desestabilização direta da bicamada nas regiões imaturas.



**Figura 3.23.** Os pontos de acesso à bicamada lipídica na superfície da partícula viral imatura. Acima: à direita uma vista geral do vírus imaturo (em vermelho), com detalhe aumentado à esquerda, com uma molécula de PLA<sub>2</sub> acoplada (amarelo) à abertura do poro pentarradial, que se encontra cercado por outras aberturas largas. Abaixo: à esquerda, o contorno da PLA<sub>2</sub> (em verde) posicionada sobre uma superfície do vírus imaturo com seus carbonos-alfa representados em seus respectivos raios de van der Waals (vermelho), em comparação à mesma região no vírus maduro (em preto). Observe a grande diferença no raio de abertura entre os dois estágios, evidenciado pelo contorno do local em que estaria posicionada a PLA<sub>2</sub>. À direita, uma molécula de PLA<sub>2</sub> (em amarelo) centralizada na abertura do poro imaturo, evidenciando o espaçoso caminho de difusão até a bicamada lipídica.

Até este ponto, nossa análise foi de caráter preliminar, mas a simples superposição da PLA<sub>2</sub> ao topo do poro pentarradial nos permite perceber que o tamanho do primeiro é significativamente maior que a abertura do segundo, o que sugere a impossibilidade estérica de difusão espontânea através do envelope proteico até a bicamada lipídica enterrada. Apesar de ser uma hipótese válida, a sobreposição as partes envolvidas apenas proveem evidência visual, a qual não é suficiente para se tirar conclusões mais definitivas. Com o objetivo de avaliarmos mais a fundo as interações ocorridas entre as partes envolvidas, nós fizemos uma série de simulações exploratórias, as quais duas delas são relevantes, e por isso serão descritas aqui. Uma delas consiste no sistema em equilíbrio, como um controle, enquanto a outra conta

com a inserção de uma força (perpendicular ao plano da bicamada) aplicada à PLA<sub>2</sub>, provocando seu deslocamento do topo do poro até sua base (Fig. 3.24), ou seja, mimetizando o trajeto que ela teria de fazer *in vivo* para ter acesso ao substrato.

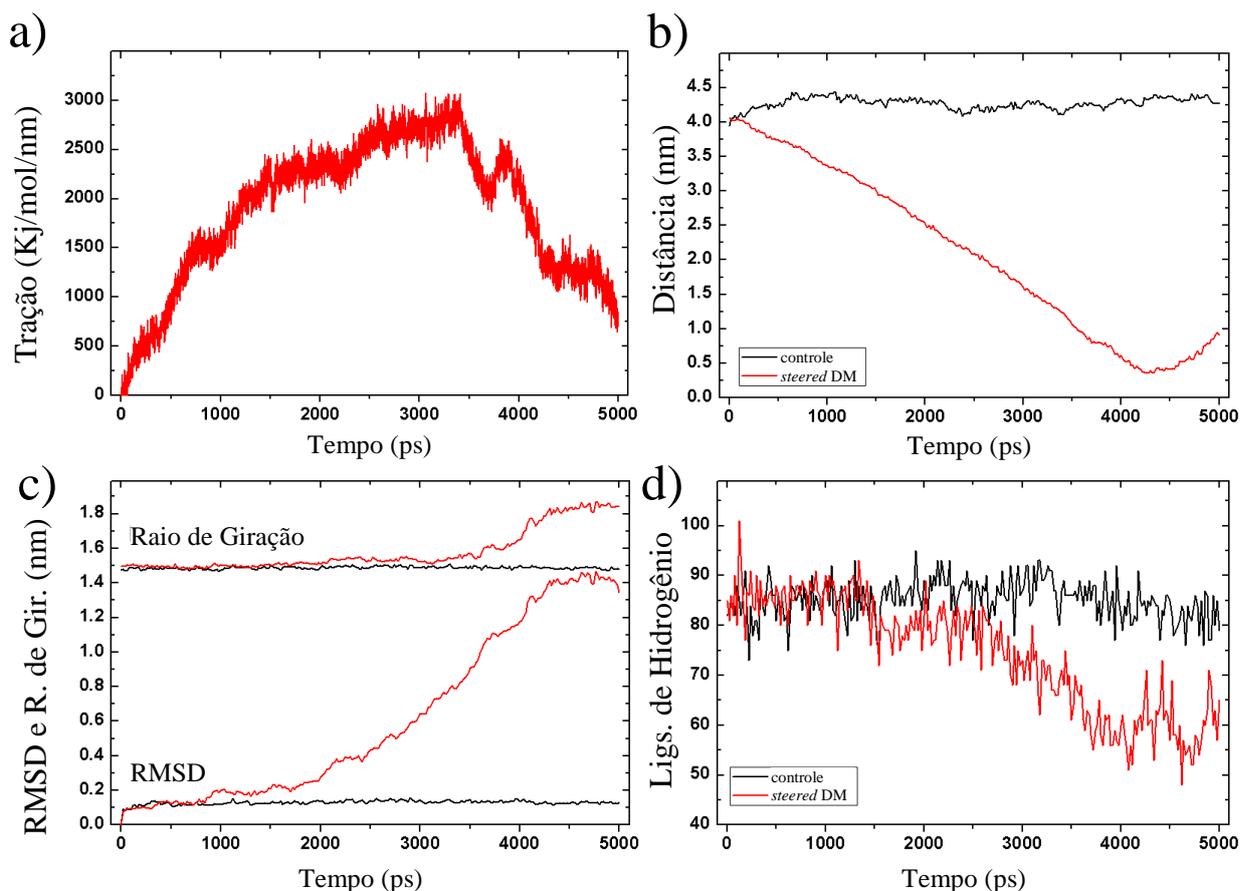


**Figura 3.24.** Sistema montado para a simulação de controle sobre o comportamento do complexo PLA<sub>2</sub>/5DIIIs (em magenta e roxo, respectivamente) quando os componentes entram em contato (moléculas de água foram omitidas por clareza). A seta verde indica a direção da força aplicada na molécula de PLA<sub>2</sub>, forçando seu trajeto através do poro formado por cinco DIIIs.

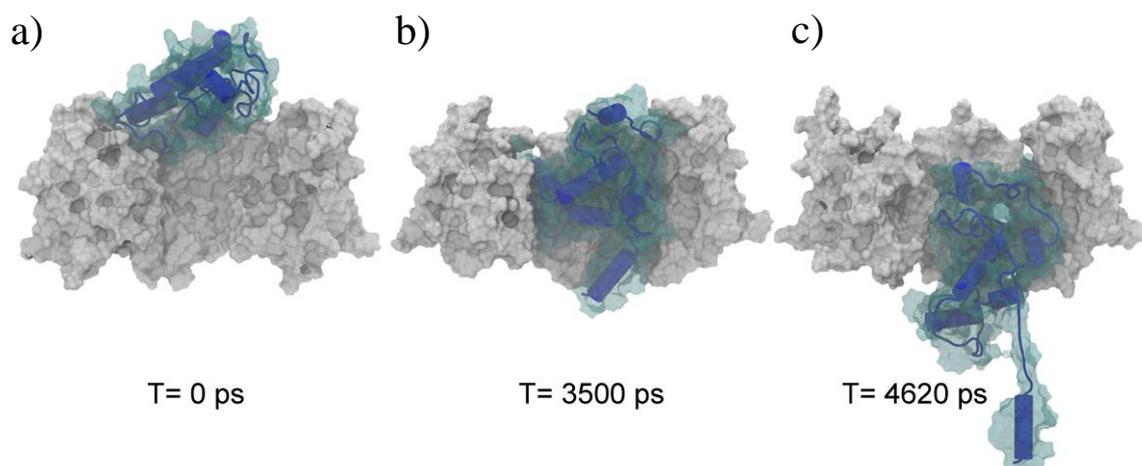
Inicialmente, nós submetemos nosso modelo pré-equilibrado do pentâmero do domínio III da proteína E (o mesmo descrito na seção 2.2.3) acoplado à PLA<sub>2</sub>, de acordo ao serviço “*GRAMM-X Protein-Protein Docking Server*”,<sup>52</sup> e separamos, entre os resultados de menor energia de ligação, o modelo que representava a melhor orientação relativa ao sítio ativo da fosfolipase em relação ao plano da bicamada. A simulação de equilíbrio foi útil para checar como a estrutura da PLA<sub>2</sub> se comporta na proximidade de um dos poros do envelope, avaliando se, e como, um componente exerce uma modulação estrutural no outro, como certo alargamento do diâmetro do poro ou mesmo se a PLA<sub>2</sub> sofreria alguma deformação espontânea que permitisse a ocorrência da difusão para o centro do poro. Após um tempo longo o suficiente (50 ns), uma análise geral do sistema mostrou que, enquanto a PLA<sub>2</sub> apresenta certa mobilidade, ela ainda permanece parcialmente ligada a dois a três DIIIs, na porção apical. Além disso, uma análise estrutural mais específica aponta a manutenção da estrutura praticamente inalterada de todos os componentes do sistema, como agora

demonstraremos em comparação à dinâmica molecular guiada por uma força artificial (*Steered MD*).

A Figura 3.25 (a) mostra a força aplicada ao centro de massa da PLA<sub>2</sub> ao longo de 5 ns de simulação. Já que a velocidade da PLA<sub>2</sub> em direção ao interior do poro foi mantida constante, a variação de resistência gerou o perfil de força descrito na curva. O aumento da força de tração mostra a crescente resistência da abertura estreita do poro ao trânsito da PLA<sub>2</sub>, até o momento do início de sua desestruturação (~3,5 ns) devida à alta tensão aplicada. Na Figura 3.25 (b), nós comparamos a distância percorrida do centro de massa da PLA<sub>2</sub> ao centro da base do poro, onde se encontra a camada lipídica. Na simulação controle, a PLA<sub>2</sub> não difunde espontaneamente, então a distância se mantém a mesma. Quando a força é aplicada, o centro de massa da PLA<sub>2</sub> alcança a região da bicamada por volta de 4250 ps. No entanto, como descrito anteriormente, a abertura do poro mostrou-se demasiadamente estreita para permitir a chegada da PLA<sub>2</sub> na região da bicamada sem a consequência de uma grande deformação estrutural. Através do RMSD e Raio de Giração, nós pudemos quantificar tais deformações [Fig. 3.25 (c)], as quais mostram que tão logo a marca do 1 ns foi ultrapassada, a PLA<sub>2</sub> começa a desnaturar-se progressivamente. Tal desnaturação é também confirmada pelo declínio numérico de ligações de hidrogênio [Fig. 3.25 (d)] intracadeia por parte da PLA<sub>2</sub>, o que é causado pelo destaque e grande estiramento da hélice N-terminal, bem como uma desestabilização generalizada do núcleo da estrutura (Fig. 3.26; vídeo 3-6.mpg).



**Fig. 3.25.** Análise comparativa estrutural entre as simulações de controle (preto) e com aplicação de força (vermelho). **a)** A força aplicada na PLA<sub>2</sub> ao longo de 5000 ps de simulação; esta força foi introduzida para gerar o movimento artificial ao encontro da abertura no eixo de simetria pentarradial no envelope viral. **b)** a distância percorrida do centro de massa da PLA<sub>2</sub> e a base central do poro. **c)** O raio de giração da PLA<sub>2</sub> e o RMSD em relação à sua estrutura original. **d)** A contagem de ligações de hidrogênios estruturais da PLA<sub>2</sub> ao longo tempo em que ela é arrastada para dentro do poro e perde progressivamente a maior parte do perfil de sua configuração nativa.



**Fig. 3.26.** Momentos da passagem forçada da PLA<sub>2</sub> através do poro pentarradial. **a)** Ao início da simulação, a PLA<sub>2</sub> (mostrada em *cartoon* azul e superfície transparente) é ligada à abertura do poro pentarradial (representado em superfície cinza) em um estado de equilíbrio. **b)** Após 3500 ps, a PLA<sub>2</sub> está totalmente inserida dentro do poro, e mostra sinais de grande desestabilização. **c)** Próximo do fim do movimento de difusão forçado, em 4620 ps, o centro de massa da PLA<sub>2</sub> está próximo de completar a difusão, no entanto a cadeia como um todo se encontra totalmente desestruturada.

O conjunto de análises mostra que as dimensões PLA<sub>2</sub> são demasiadamente grandes para que mesma muito grande para possa difundir espontaneamente através do poro pentarradial do vírus maduro, o que acontece apenas com a aplicação de uma força artificial, com conseqüente desestabilização da estrutura da fosfolipase. Por isso, concluímos que tal difusão só poderia acontecer na estrutura viral de partículas imaturas, parcialmente maduras ou mesmo naquelas imperfeitas, quando em temperatura ambiente (25°C). No entanto, Zhang et al. (2013)<sup>77</sup> mostraram muito recentemente que a estrutura do Dengue em temperatura fisiológica (37°C) apresenta configuração drasticamente diferente do que a literatura vinha descrevendo, e que, de fato, o vírus exhibe áreas de exposição de membrana significativamente maiores que a dimensão da PLA<sub>2</sub> [Fig. 1.13, itens (d) e (e)] em angulação de acesso ao substrato. Esta informação indica que a PLA<sub>2</sub> age diretamente sobre vários pontos da superfície viral, o que provavelmente desestabiliza sua configuração típica de proteínas do envelope, característica essencial à infecção.

É neste cenário, porém, que apresentamos um dado importante: por volta de 40% das partículas virais produzidas e exportadas pelo hospedeiro contêm a proteína prM associada à proteína E,<sup>53,54</sup> configuração encontrada apenas em configurações imaturas. Só esta percentagem já nos descreve que quase metade da carga viral é passível de sofrer diretamente a desestabilização pela livre ação da PLA<sub>2</sub> na bicamada lipídica em temperatura ambiente. A parte restante, na qual as partículas são maduras (pelo menos parcialmente), quando expostas à temperatura fisiológica, podem ter pontos da bicamadas hidrolisados por contato direto com a PLA<sub>2</sub>. Toda a carga viral poderia, ainda, sofrer interferências adicionais, proveniente dos subprodutos resultantes das partículas imaturas destruídas pela PLA<sub>2</sub>. De fato, como demonstrado na literatura,<sup>55</sup> a introdução de fragmentos de porções de domínio III da proteína E no ambiente viral previne a ocorrência do evento de trimerização, obstruindo a exposição ótima dos *loops* de fusão, assim evitando o desenvolvimento do processo de infecção. Enquanto, neste cenário, o DIII ainda se encontraria associado ao resto da proteína E, seus padrões eletrostáticos de superfície e sua topologia não são significativamente diferentes daquela dos domínios III isolados, o que pode perfeitamente causar a ligação do DIII da proteína sobrenadante à proteína E ancorada na superfície do vírus maduro.

### 3.3 – Referências<sup>†††</sup>

- <sup>1</sup> KLAUDA, J. B.; VENABLE, R. M.; FREITES, J. A.; O'CONNOR, J. W.; TOBIAS, D. J.; MONDRAGON-RAMIREZ, C.; VOROBYOV, I.; MACKERELL, A. D. ; PASTOR, R. W. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 23, p. 7830-7843, 2010.
- <sup>2</sup> WOLF, M. G.; HOEFLING, M.; APONTE-SANTAMARIA, C.; GRUBMULLER, H. ; GROENHOF, G. *g\_membed*: Efficient Insertion of a Membrane Protein into an Equilibrated Lipid Bilayer with Minimal Perturbation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 11, p. 2169-2174, 2010.
- <sup>3</sup> JO, S.; LIM, J. B.; KLAUDA, J. B. ; IM, W. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 1, p. 50-58, 2009.
- <sup>4</sup> VAN MEER, G.; VOELKER, D. R. ; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 112-124, 2008.
- <sup>5</sup> KANDT, C.; ASH, W. L. ; TIELEMAN, D. P. Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. **Methods**, v. 41, n. 4, p. 475-488, 2007.
- <sup>6</sup> PANDIT, K. R. ; KLAUDA, J. B. Membrane models of E-coli containing cyclic moieties in the aliphatic lipid chain. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1818, n. 5, p. 1205-1210, 2012.
- <sup>7</sup> TOBIAS, D. J.; TU, K. C. ; KLEIN, M. L. Atomic-scale molecular dynamics simulations of lipid membranes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 2, n. 1, p. 15-26, 1997.
- <sup>8</sup> FELLER, S. E.; YIN, D. X.; PASTOR, R. W. ; MACKERELL, A. D. Molecular dynamics simulation of unsaturated lipid bilayers at low hydration: Parameterization and comparison with diffraction studies. **Biophysical Journal**, v. 73, n. 5, p. 2269-2279, 1997.
- <sup>9</sup> FELLER, S. E. ; PASTOR, R. W. Constant surface tension simulations of lipid bilayers: The sensitivity of surface areas and compressibilities. **Journal of Chemical Physics**, v. 111, n. 3, p. 1281-1287, 1999.
- <sup>10</sup> ROG, T. ; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Cholesterol effects on the phospholipid condensation and packing in the bilayer: a molecular simulation study. **Febs Letters**, v. 502, n. 1-2, p. 68-71, 2001.

---

<sup>†††</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- 11 CHIU, S. W.; JAKOBSSON, E.; MASHL, R. J. ; SCOTT, H. L. Cholesterol-induced modifications in lipid bilayers: A simulation study. **Biophysical Journal**, v. 83, n. 4, p. 1842-1853, 2002.
- 12 SIU, S. W. I.; VACHA, R.; JUNGWIRTH, P. ; BOCKMANN, R. A. Biomolecular simulations of membranes: Physical properties from different force fields. **Journal of Chemical Physics**, v. 128, n. 12, 2008.
- 13 YOO, J. ; CUI, Q. Does arginine remain protonated in the lipid membrane? Insights from microscopic pK(a) calculations. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 8, p. L61-L63, 2008.
- 14 PASTOR, R. W. ; MACKERELL, A. D. Development of the CHARMM Force Field for Lipids. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 2, n. 13, p. 1526-1532, 2011.
- 15 ALLEN, W. J.; LEMKUL, J. A. ; BEVAN, D. R. GridMAT-MD: A Grid-Based Membrane Analysis Tool for Use With Molecular Dynamics. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 1952-1958, 2009.
- 16 ALOIA, R. C.; TIAN, H. R. ; JENSEN, F. C. Lipid-Composition and Fluidity of the Human-Immunodeficiency-Virus Envelope and Host-Cell Plasma-Membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 11, p. 5181-5185, 1993.
- 17 ZHANG, W.; CHIPMAN, P. R.; CORVER, J.; JOHNSON, P. R.; ZHANG, Y.; MUKHOPADHYAY, S.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H.; ROSSMANN, M. G. ; KUHN, R. J. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 11, p. 907-912, 2003.
- 18 ZHANG, Y.; CORVER, J.; CHIPMAN, P. R.; ZHANG, W.; PLETNEV, S. V.; SEDLAK, D.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H.; KUHN, R. J. ; ROSSMANN, M. G. Structures of immature flavivirus particles. **Embo Journal**, v. 22, n. 11, p. 2604-2613, 2003.
- 19 MAUPETIT, J.; GAUTIER, R. ; TUFFERY, P. SABBAC: online structural alphabet-based protein backbone reconstruction from alpha-carbon trace. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. W147-W151, 2006.
- 20 KRIVOV, G. G.; SHAPOVALOV, M. V. ; DUNBRACK, R. L. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 77, n. 4, p. 778-795, 2009.
- 21 MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D. ; HARRISON, S. C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 6986-6991, 2003.
- 22 W.L. Delano. The PyMOL molecular graphics system. 2002. Disponível em: < <http://www.pymol.org> >.

- 23 FISER, A.; DO, R. K. G. ; SALI, A. Modeling of loops in protein structures. **Protein Science**, v. 9, n. 9, p. 1753-1773, 2000.
- 24 FISER, A. ; SALI, A. ModLoop: automated modeling of loops in protein structures. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2500-2501, 2003.
- 25 PIGGOT, T. J.; PINEIRO, A. ; KHALID, S. Molecular Dynamics Simulations of Phosphatidylcholine Membranes: A Comparative Force Field Study. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 11, p. 4593-4609, 2012.
- 26 FOLOPPE, N. ; MACKERELL, A. D. All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 86-104, 2000.
- 27 KLAUDA, J. B.; VENABLE, R. M.; MACKERELL, A. D. ; PASTOR, R. W. Considerations for lipid force field development. **Computational Modeling of Membrane Bilayers**, v. 60, p. 1-48, 2008.
- 28 MARSH, D. Renormalization of the tension and area expansion modulus in fluid membranes. **Biophysical Journal**, v. 73, n. 2, p. 865-869, 1997.
- 29 JOJART, B. ; MARTINEK, T. A. Performance of the general amber force field in modeling aqueous POPC membrane bilayers. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2051-2058, 2007.
- 30 ROSSO, L. ; GOULD, I. R. Structure and dynamics of phospholipid bilayers using recently developed general all-atom force fields. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 24-37, 2008.
- 31 BJELKMAR, P.; LARSSON, P.; CUENDET, M. A.; HESS, B. ; LINDAHL, E. Implementation of the CHARMM Force Field in GROMACS: Analysis of Protein Stability Effects from Correction Maps, Virtual Interaction Sites, and Water Models. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 2, p. 459-466, 2010.
- 32 LIM, J. B.; ROGASKI, B. ; KLAUDA, J. B. Update of the Cholesterol Force Field Parameters in CHARMM. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 1, p. 203-210, 2012.
- 33 HUMPHREY, W.; DALKE, A. ; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.
- 34 ZHAO, W.; ROG, T.; GURTOVENKO, A. A.; VATTULAINEN, I. ; KARTTUNEN, M. Role of phosphatidylglycerols in the stability of bacterial membranes. **Biochimie**, v. 90, n. 6, p. 930-938, 2008.
- 35 LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. ; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th. New York: W.H. Freeman, 2008. ISBN 9780716771081 071677108X.

- 36 GILLESPIE, L. K.; HOENEN, A.; MORGAN, G. ; MACKENZIE, J. M. The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10438-10447, 2010.
- 37 CARTER, J. B. ; SAUNDERS, V. A. **Virology : principles and applications**. Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007. xix, 358 p.
- 38 BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VANGUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A. ; HAAK, J. R. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. **Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984.
- 39 SONNE, J.; JENSEN, M. O.; HANSEN, F. Y.; HEMMINGSEN, L. ; PETERS, G. H. Reparameterization of all-atom dipalmitoylphosphatidylcholine lipid parameters enables simulation of fluid bilayers at zero tension. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 12, p. 4157-4167, 2007.
- 40 NOSE, S. A Unified Formulation of the Constant Temperature Molecular-Dynamics Methods. **Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 1, p. 511-519, 1984.
- 41 HOOVER, W. G. Canonical Dynamics - Equilibrium Phase-Space Distributions. **Physical Review A**, v. 31, n. 3, p. 1695-1697, 1985.
- 42 PARRINELLO, M. ; RAHMAN, A. Crystal-Structure and Pair Potentials - a Molecular-Dynamics Study. **Physical Review Letters**, v. 45, n. 14, p. 1196-1199, 1980.
- 43 HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C. ; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.
- 44 DARDEN, T.; YORK, D. ; PEDERSEN, L. Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993.
- 45 PLESNAR, E.; SUBCZYNSKI, W. K. ; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Saturation with cholesterol increases vertical order and smoothes the surface of the phosphatidylcholine bilayer: A molecular simulation study. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1818, n. 3, p. 520-529, 2012.
- 46 HORTA, B. A. C.; DE VRIES, A. H. ; HUNENBERGER, P. H. Simulating the Transition between Gel and Liquid-Crystal Phases of Lipid Bilayers: Dependence of the Transition Temperature on the Hydration Level. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 8, p. 2488-2500, 2010.
- 47 BAKER, N. A.; SEPT, D.; JOSEPH, S.; HOLST, M. J. ; MCCAMMON, J. A. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10037-10041, 2001.

- 48 SCHALOSKE, R. H. ; DENNIS, E. A. The phospholipase A(2) superfamily and its group numbering system. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.
- 49 ZINK, M. ; GRUBMULLER, H. Mechanical Properties of the Icosahedral Shell of Southern Bean Mosaic Virus: A Molecular Dynamics Study. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 4, p. 1350-1363, 2009.
- 50 ZHANG, Y.; ZHANG, W.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; STRAUSS, J. H.; BAKER, T. S.; KUHN, R. J. ; ROSSMANN, M. G. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, v. 12, n. 9, p. 1607-1618, 2004.
- 51 MARCHI-SALVADOR, D. P.; CORREA, L. C.; MAGRO, A. J.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M. ; FONTES, M. R. M. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A(2) formed by two isoforms of crotoxin B from *Crतालुs durissus terrificus* venom. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 72, n. 3, p. 883-891, 2008.
- 52 TOVCHIGRECHKO, A. ; VAKSER, I. A. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. W310-W314, 2006.
- 53 VAN DER SCHAAR, H. M.; RUST, M. J.; WAARTS, B. L.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; KUHN, R. J.; WILSCHUT, J.; ZHUANG, X. W. ; SMIT, J. M. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. **Journal of Virology**, v. 81, n. 21, p. 12019-12028, 2007.
- 54 ZYBERT, I. A.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; WILSCHUT, J. ; SMIT, J. M. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 3047-3051, 2008.
- 55 LIAO, M. F. ; KIELIAN, M. Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion. **Journal of Cell Biology**, v. 171, n. 1, p. 111-120, 2005.

# Epílogo

A metodologia central deste trabalho consiste na investigação de propriedades estereoquímicas de macromoléculas de interesse biológico em seu microambiente, por meio de simulação computacional de parâmetros que modelam as características físico-químicas do sistema soluto-solvente. A Dinâmica Molecular é capaz de fornecer uma série de informações sobre um sistema suficientemente pequeno e em tempos curtos, por meio de interpretações físicas da movimentação atômica de cada um de seus componentes, e suas interações. Esta técnica é relativamente nova, especialmente no emprego em sistema contendo macromoléculas, e se apresenta em um panorama de plena expansão. Por se tratar de uma área de vanguarda, durante a execução deste trabalho estivemos sempre em contato com outros autores de diversos aplicativos/ferramentas, frequentemente trocando códigos/scripts de análises, contribuindo, muitas vezes informalmente, ao desenvolvimento do campo. Não há abundância de protocolos bem definidos e a parametrização de sistemas inovadores muitas vezes depende de adaptações cuidadosamente consideradas. Pela inerência multidisciplinar da DM aplicada a sistemas biológicos, bem como seu pleno desenvolvimento aliado ao avanço vertiginoso do poder computacional das últimas décadas, a atenção às inovações técnicas sempre consome muito tempo, e deve ser ponderada com as análises dos resultados.

A presente tese compila a investigação de sistemas com configurações fundamentalmente distintas, sendo, porém, essencialmente relacionados. Isso se deve principalmente ao escopo da DM, a qual, como qualquer outra abordagem teórica, tem seu corpo de atuação delineado e atinge seu ápice quando associada à dualidade: teoria modulando a investigação experimental (teoria-experimento) ou resultado experimental sendo explicado pela teoria (experimento-teoria). Por isso, grande parte de nosso esforço foi direcionado ao estabelecimento de cooperações que pudessem confirmar ou refutar experimentalmente nossas hipóteses, estas que, por sua vez, poderiam servir como base teórica ou complementar na elaboração e/ou análise de experimentos de caráter imunológico,

viroológico e bioquímico. Os ensaios de variação de parâmetros termodinâmicos intensivos influenciando sob a estrutura do DIII (Capítulo 2) revelam características com possíveis implicações antivirais, passíveis de futura investigação, principalmente quando se leva em consideração a configuração quaternária assumida na superfície viral (os 12 poros pentarradiais) em temperaturas diferentes. Adicionalmente, a identificação de resíduos-chave na interface de ligação do DIII com o anticorpo Fab 1A1D-2 fornece pistas quanto à influência de possíveis mutações sítio-dirigidas sobre a estabilidade do complexo e, portanto, ao poder neutralizante deste fragmento.

Um exemplo interessante da via experimento-teoria se deu pela investigação em cooperação sobre o mecanismo de ação da inibição da infecção viral pela fosfolipase  $A_2$  (Capítulo 3). A descrição prévia das dimensões e propriedades estruturais e eletrostáticas do DIII na configuração de poro pentarradial nos forneceu fundamento para tecer a associação de que este seria um ponto ideal para o acesso da fosfolipase  $A_2$  à seu substrato típico, a bicamada lipídica. A partir de resultados experimentais, nos utilizamos da DM para testar hipóteses as quais seriam muito difíceis/dispêndiosas de serem testadas experimentalmente.

Seguindo o caminho natural de se estudar as partes e depois o todo, associamos dados provenientes de resultados experimentais com nossos métodos teóricos, para a construção de um modelo completo da proteína E, até então inédito na literatura. Da necessidade de acomodação da região transmembrana da proteína, após uma série de ajustes, desenvolvemos um modelo pertinente de bicamada lipídica cuja composição se remete à mesma da membrana da organela celular que a origina (RER). No momento, através de outra parceria, desenvolvemos um estudo que consiste na determinação da composição lipídica da bicamada que compõe o vírus, buscando confecção de um modelo ainda mais realista.

Tal modelo será de grande importância nos estudos porvindouros, onde iremos estender nossa hipótese em relação a uma característica peculiar ao mecanismo de fusão de membranas. De fato, tem sido proposto que em pH ácido a proteína E sofre grandes alterações conformacionais, as quais acabariam por expor a parte extrema do DII, onde se localiza o *loop* de fusão. E como tem sido verificado nos resultados discutidos acima, muito provavelmente tais mudanças conformacionais se dariam por meio das conexões inter-domínios. O fato de termos observado mudança conformacional apenas discreta na proteína E (a rigor, sequer a sua dissociação dimérica foi observada) pode ser devido a pelo menos duas possibilidades:

primeiramente, a janela de tempo utilizada neste nosso estudo pode ter sido ainda insuficiente para que o fenômeno fosse observado, visto que o tempo característico do processo de infecção viral envolve várias ordens de grandeza superiores a 50 ns. Contudo, de outra forma, nossos resultados poderiam também sugerir que durante o processo de infecção, com o vírus já no interior da célula, eventualmente ocorreria o contato entre a superfície viral e a parte interior da membrana do endossomo, quando então o peptídeo de fusão, mais livre devido ao ambiente de reduzido pH e por meio de eventuais flutuações estruturais, seria induzido a interagir mais intimamente com a membrana do endossomo. Assim, podemos testar por DM nossa tese de que o contato do envelope viral com a membrana do endossoma poderia estabelecer uma rede de interações hidrofóbicas, iniciando uma indução de grandes transformações estruturais das proteínas E, isto é: todos os demais rearranjos estruturais –como a formação de trímeros– por exemplo, se dariam quase que "enzimaticamente" induzidas por esta ligação inicial.

# Apêndice

## **A – Determinação dos componentes da bicamada lipídica do vírus do Dengue por espectrometria de massa**

Para a determinação dos componentes da bicamada lipídica do vírus do Dengue, o Prof. Dr. Pietro nos orientou que a melhor opção disponível para nós seria a espectrometria de massa, de fácil acesso em seu laboratório (*Laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada - Sistemas Miméticos de Biomembranas - FFCLRP*). Estão sendo utilizados em conjunto o UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) Acquity (*Waters*) com sistema de bomba quaternária e espectrômetro de massas Xevo TQ-S com fonte de ionização por ESI equipado (*Waters*). No entanto, este o novo aparelho (muito mais sensível – exige menor quantidade de material viral) havia acabado de ser implementado, e ainda necessitava passar pelo protocolo de calibração. Desde a primeira etapa, onde 50% dos componentes candidatos foram calibrados com sucesso, o avanço do projeto encontra-se em fase final, restando a prospecção de apenas alguns tipos de lipídios.

Enquanto isso, a amostra viral já foi preparada e encontra-se acondicionada no Laboratório de Virologia da FCFRP pela mestrandia Sra. Raquel Rinaldi Russo, a qual gentilmente cedeu as informações referentes ao cultivo celular e preparação da semente viral aqui descritas. Estas mesmas informações fazem parte do artigo de coautoria entre os participantes do experimento (em elaboração).

O cultivo celular das células do mosquito *Aedes albopictus*, linhagem C6/36, cultivadas à 28°C em meio de cultura *Leibowitz* (L-15; Cultilab, Campinas) e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB; Cultilab, Campinas). Para os repiques das monocamadas contínuas de células, o meio de cultivo do frasco foi desprezado, a monocamada será lavada por duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) e as células foram desprendidas do frasco com o auxílio de um espalhador de células. Finalmente, as células foram homogeneizadas em meio L-15 suplementado com 10% de SFB e distribuídas igualmente em garrafas de 75cm<sup>2</sup>, contendo um volume final de 20mL de meio de cultivo.

A multiplicação do vírus foi obtida em cultivo de células da linhagem C6/36. As mesmas foram escolhidas por serem permissivas ao DENV, possibilitando sua multiplicação e demonstrando efeito citopático (mudança detectável na célula hospedeira devido à infecção viral) bem visível e reprodutível ao microscópio óptico. As células C6/36 foram crescidas em frascos de 75cm<sup>2</sup> contendo meio L-15 suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas a 28°C por 24h para formação da monocamada celular com 80-90% de confluência. Após esse período, as células foram inoculadas com 100µL de DENV-2 NGC (1,25x10<sup>7</sup>UFP\*/mL) e incubadas a 28°C durante 1h, com agitação moderada de 15 em 15min. Posteriormente, foi adicionado 20mL do meio L-15 suplementado com 2% de SFB. A infecção foi acompanhada através do efeito citopático por cinco dias. Transcorrido esse período, o sobrenadante da monocamada foi colhido, separado dos restos celulares por centrifugação (5min a 4000rpm) e armazenado a -80°C.

Na perspectiva iminente da liberação do equipamento de espectrometria para o ensaio de determinação lipídica do envelope do DENV, a amostra viral foi descongelada (resultando em um volume de 20 mL), sendo submetida aos sucessivos passos experimentais pela Dra. Ana Maria Sper Simão, sob supervisão do Prof. Dr. Pietro Ciancaglini:

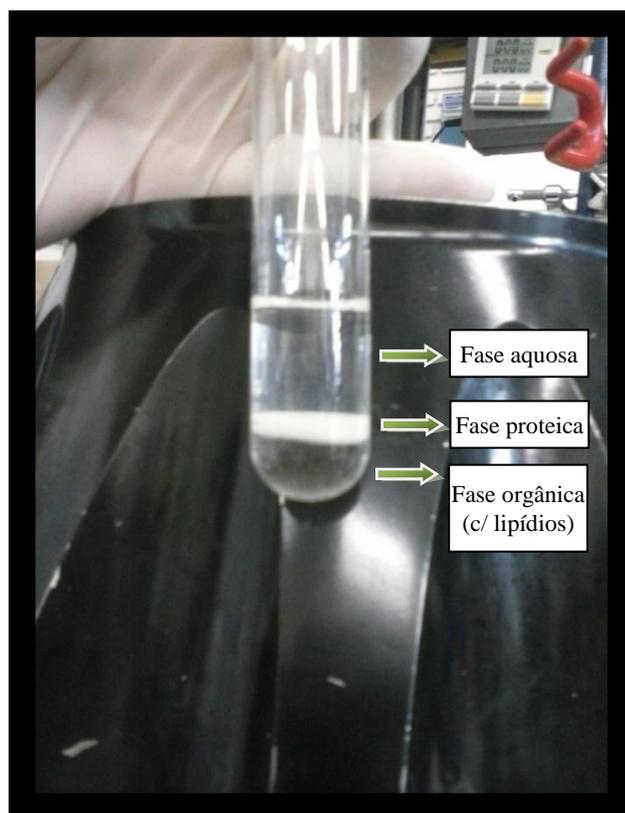
- centrifugação a 11.000 rpm por 10 minutos, em temperatura de 4°C (*Eppendorf Centrifuge 5804R*); neste passo não houve formação de *pellet*;
- centrifugação a 50.000 rpm por 100 minutos, em temperatura de 4°C (*Hitachi angle rotor P50AT2*);
- descarte do sobrenadante;
- adição de 1 mL de solução tampão (50 mMol/L TRIS<sup>†</sup> + 2 mMol/L MgCl<sup>2</sup>, pH 7,5) no *pellet*;
- homogeneização manual tipo *potter* ;
- adição de 1 mL do tampão;
- adição de 1 mL de suspensão (1mg/mL de clorofórmio/metanol), e levado ao agitador por 10 s.;
- adição de 1mL de clorofórmio 100%;

---

\* UFP: unidade formadora de placa.

† tris(hidroximetil)aminometano

- centrifugação por 3 min. Na centrífuga clínica, para separação de fases (**Fig. A.1**);
- extração da fase orgânica (~ 0,5 mL) e acondicionamento para iminente submissão ao espectrômetro de massa.

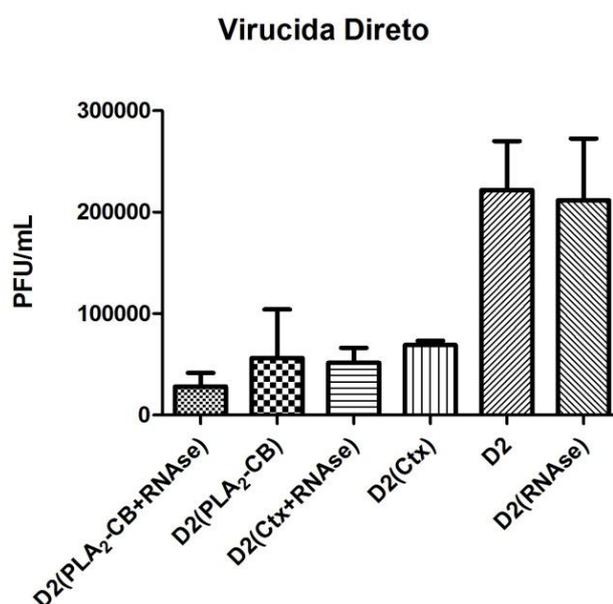


**Figura A.1.** Separação de fases após os passos de ultra centrifugação e adição de tampão e solventes orgânicos (clorofórmio e metanol). Observe a formação de três fases: a aquosa, proteica e a fase orgânica (contendo os lipídios de interesse).

## B – Principais resultados experimentais sobre o efeito da PLA2 sobre o vírus do Dengue

Nesta seção, ilustramos resumidamente um dos resultados experimentais principais obtidos pelos nossos colaboradores no Laboratório de Virologia da FCFRP, liderados pelo Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana, com envolvimento direto da Dra. Vanessa Danielle Menjon Müller e da mestrandia Sra. Raquel Rinaldi Russo. A descrição da metodologia completa e o detalhamento maior são relatados em nosso artigo em elaboração.

Os experimentos foram realizados com o objetivo de analisar o efeito virucida da crotoxina (ctx) (fosfolipase+crotamina) e da fosfolipase isolada (PLA<sub>2</sub>-CB). Após a replicação do sorotipo de DENV-2, quantidades iguais de  $1,17 \times 10^3$  PFU\* tiveram separadamente a adição de PLA<sub>2</sub>-CB à 8 ng/μl, crotoxina também à 8 ng/μl, e tampão PBS† por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as misturas foram tratadas com 8 μl de RNase A (20 μg/mL) ou PBS por 1h a 37°C. Para a análise dos resultados, foi utilizado a detecção do RNA viral sobrenadante (o qual é indicativo de lise do envelope) via PCR em tempo real. Abaixo apresentamos um resumo dos resultados.



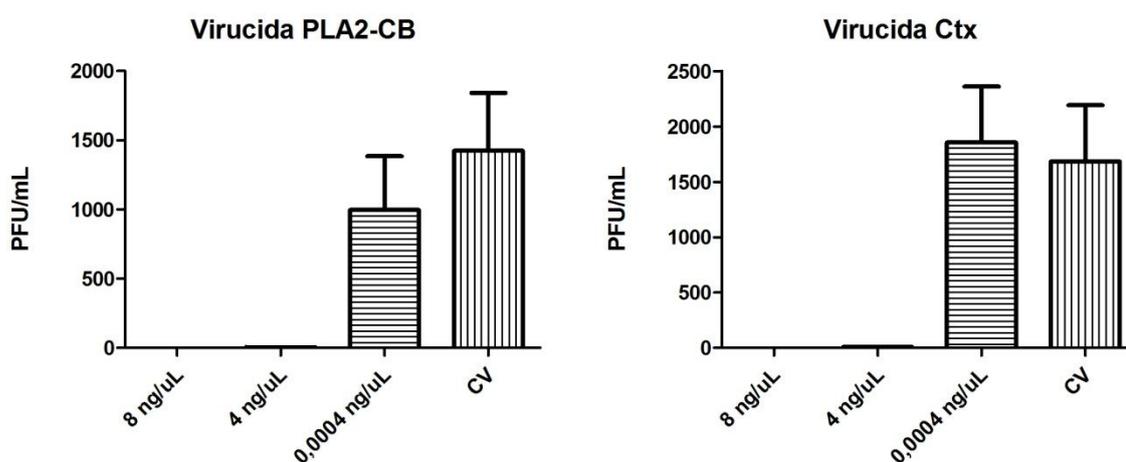
**Figura B.1.** Resultado dos experimentos virucida direto, indicando as eficiências de diferentes composições sobre inibição na formação de PFUs. D2: vírus do dengue, sorotipo 2; PLA<sub>2</sub>-CB: fosfolipase A2; RNase: enzima responsável pela detecção de RNA, pela sua hidrólise; Ctx: crotoxina (PLA<sub>2</sub>-CB+Crotapotina). Figura gentilmente cedida pela Dra. Müller.

\* *Plaque Forming Units*

† *Phosphate Buffered Saline*

De acordo com a **Figura B-1**, podemos ver diretamente que "D2(PLA2-CB+RNase) vs D2" e "D2(PLA2-CB+RNase) vs D2(RNase)" apresentaram diferença significativa entre si, o que indica que houve a redução estatística da formação de placas virais nas amostras tratadas com a crotoxina ou a fosfolipase.

Um ensaio virucida mais direto com o objetivo de determinar as concentrações efetivas para a inibição viral foi realizado, e tem os resultados representados abaixo.



**Figura B.2.** Resultado dos experimentos de ensaios virucida indicando as concentrações indicando efetivas para a inibição viral pela PLA<sub>2</sub>-CB, à esquerda, e pela Crotoxina, à direita. Figura gentilmente cedida pela Dra. Müller.

As concentrações de PLA<sub>2</sub>-CB e a Crotoxina à 8 e 4 ng/μL apresentaram ação direta sobre a infecção viral em células Vero E6, como é possível observar por comparação com o controle viral (CV). Podemos ainda observar uma maior eficiência na ação da PLA<sub>2</sub>-CB em relação à crotoxina mesmo na concentração de 0,0004 ng/μL, o que justifica nosso interesse nesta parceria com o estudo desta molécula por dinâmica molecular, identificando mecanismos de ação de o porquê essa inibição ocorre, mesmo em concentrações bastante baixas (o que é típico de reações catalíticas enzimáticas, como a degradação de membranas celulares).

# Índice Remissivo

---

## A

aciclovir · 28  
 ADE · 22, 23, 24  
   Antibody Dependent Enhancement · *Consulte* ADE  
*Aedes* · 7, 8, 9, 12, 16, 42, 44, 65, 138  
   *A. aegypti* · 7, 8, 10, 12, 42, 44  
   *A. albopictus* · 7, 42, 44, 138  
   *A. mediovittatus* · 7  
   *A. polynesiensis* · 7  
*Alfavirus* · 20, 121  
 anticorpo · 23  
 anticorpos  
   não neutralizantes · 23  
 antivirais · 27, 79

---

## B

barostato  
   Parrinello-Rahman · 61, 99  
 bicamada lipídica · 1, 20, 28, 58, 90, 92, 104, 107, 109,  
 115, 121, 122, 123, 125, 129, 138  
 Brasil · 11, 12, 13, 25, 26, 27

---

## C

campo de força · 34  
   CHARMM36 · 37, 92, 93  
   OPLS-AA · 37, 53, 54, 61  
 capsídeo · 29  
 células  
   dendríticas · 15, 16  
   estromais · 16  
 células Vero · 121, 142

---

## Ch

CHARMM-GUI · 38, 55, 97, 130  
 choque hipovolêmico · 2

---

## C

ciclo apoptótico · 22  
 ciclo viral · 14, 19  
 citocinas · 16, 17, 23  
   IL-1 $\beta$  · 17  
   TNF- $\alpha$  · 17  
 clatrina · 20  
 ClustalW2 · 57, 58  
*cluster*  
   *BlueGene/P* · 40  
   Silicon Graphics International® · 40, 99  
 colesterol · 37, 93, 98, 100, 107, 116

Coulomb · 37  
 cristal-líquido · 98, 102  
*Crotalus durissus terrificus* · 121  
 Crotoxina · 121, 142

---

## D

dengue · 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,  
 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,  
 33, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53,  
 56, 58, 59, 62, 77, 84, 85, 86, 87, 89, 96, 121, 122,  
 131, 134  
 dengue severa · 3, 24  
 densidade eletrônica · 21, 29, 95, 103, 105  
 DENV-1 · 1, 5, 32, 33, 57, 59, 60, 67, 68, 69, 70, 71, 74, 75  
 DENV-2 · 5, 31, 33, 57, 59, 60, 67, 70, 71, 74, 76, 78, 80,  
 139, 141  
 DENV-3 · 5, 57, 59, 68, 69, 70, 71, 74  
 DENV-4 · 5, 13, 31, 59, 69, 71  
 DI · 21, 31, 33, 112  
 DII · 21, 31, 104, 112, 136  
 DIII · 21, 22, 31, 32, 33, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 65, 66, 67,  
 68, 69, 70, 73, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 89, 104,  
 112, 129  
 dinâmica molecular · 33, 36, 37, 38, 39, 59, 60, 62, 68,  
 71, 72, 88, 90, 92, 105, 127, 142  
 dissulfeto · 17, 57

---

## E

ectodomínio · 31, 59, 60, 71  
 endocitose · 20, 23  
 endossomo · 20, 33, 65  
 energia livre · 76, 77  
*ensemble*  
   NPAzT · 99, 103  
   NPT · 93  
   NP $\gamma$ T · 99, 102  
   NVT · 98  
 envelope · 5, 15, 19, 21, 27, 29, 30, 31, 45, 47, 48, 49, 52,  
 53, 66, 75, 79, 84, 85, 89, 90, 96, 121, 122, 123, 125,  
 126, 131, 139, 141

---

## F

fagocitose · 23  
   Fc $\gamma$ R · 23  
 FAPESP · 40  
 febre · 2, 3, 4, 8, 24, 25, 27  
 filogenia · 4  
*Flaviviridae* · 1, 4  
*Flavivirus* · 1, 4, 42, 46, 49, 51, 96, 121, 133  
 flexibilidades · 70, 72, 73, 79  
 fluidez · 96, 107  
*fold*ing · 34, 38, 39, 53  
 folhas- $\beta$  · 31, 57

força iônica · 62, 65, 66, 67, 80, 98  
 fosfolipase A<sub>2</sub> · *Consulte* PLA<sub>2</sub>  
 furina · 22  
 fusão · 15, 19, 20, 21, 22, 30, 31, 33, 56, 66, 104, 121,  
 122, 129, 136

---

## G

GROMACS · 37, 38, 39, 55, 60, 63, 85, 86, 88, 93, 95, 97,  
 101, 107, 132  
*g\_membed* · 107, 108, 109  
*g\_rms* · 63  
*g\_rmsf* · 70

---

## H

hemorragia · 2, 4, 15  
 hepatomegalia · 4  
 HIV · 45, 89, 96

---

## I

*in silico* · 1, 36  
*in vitro* · 15, 46, 121

---

## L

*leap-frog* · 61, 99  
*Lennard-Jones* · 35, 37  
 LH · *Consulte* ligação de hidrogênio  
 ligação  
   de hidrogênio · 33  
 ligações  
   covalentes · 34, 35, 36, 61  
 ligações de hidrogênio · 76, 77, 78, 79, 83, 111, 119, 121,  
 127  
 LINC · 61, 86, 99, 133  
 lipídios · 36, 37, 93, 94, 96, 98, 99, 104, 105, 107, 109,  
 110, 112, 115, 116, 117, 138  
 lisossomo · 20  
*loop*  
    $\beta_2$ - $\beta_3$  · 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79  
    $\beta_4$ - $\beta_5$  · 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 79  
*loops* · 20, 21, 56, 58, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78,  
 79, 121, 129, 132  
 L <sub>$\alpha$</sub>  · *Consulte* cristal líquido

---

## M

mapas eletrostáticos · 75  
 megacariócitos · 2, 15, 16  
 minimização de energia · 60, 61, 97

---

## O

oleoil · 92, 95, 101

---

## P

palmitoil · 92, 101  
 parâmetro de ordem · 94, 101, 102, 105  
*Particle Mesh Ewald* · *Consulte* PME  
 PCA · 73  
 PDB  
   1OAN · 59, 92, 123  
   1OK8 · 59  
   1OKE · 59  
   1TG8 · 59  
   1THD · 123  
   1UZG · 59  
   2HOP · 32, 59  
   2QOG · 123  
   2SJF · 59, 60  
   3G7T · 59, 60  
   3IRC · 59, 60  
 PLA<sub>2</sub> · 121, 122, 123, 125, 126, 127, 129, 141, 142  
 plaquetas · 2, 4, 15, 16, 17  
 plasminogênio · 17  
 PME · 61, 99  
 pontes salinas · 69, 77, 78, 79, 121  
 POPC · 92, 94, 95, 96, 97, 100, 132  
 POPE · 95, 97, 100  
 POPS · 95, 97, 98  
 poro  
   de fusão · 20, 22  
   pentarradial · 76, 79, 125, 129  
*Principal Component Analysis* · *Consulte* PCA  
 prM · 21, 23, 129  
 propriedades  
   liotrópicas · 98  
 proteína E · 1, 5, 19, 20, 22, 28, 31, 32, 33, 56, 57, 58, 59,  
 60, 65, 71, 88, 89, 90, 91, 104, 106, 108, 109, 111,  
 112, 115, 119, 120, 121, 123, 126, 129, 136  
 PyMOL · 61, 86, 131

---

## R

rede trans-Golgi · 21  
 relógio molecular · 5  
 replicação · 14, 21, 23, 28, 96, 141  
 RER · *Consulte* retículo endoplasmático rugoso  
 retículo endoplasmático rugoso · 21, 89, 103  
 RNA · 21, 29, 30, 51, 141

---

## S

SABBAC · 91, 131  
 SCWRL4.0 · 91  
 SETTLE · 61  
 sorotipos · 1, 4, 5, 6, 11, 13, 23, 24, 27, 56, 57, 58, 62, 63,  
 65, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 79  
*steepest descent method* · 97

sulfato de heparana · 19

---

**T**

termostato

Berendsen · 98

Nose-Hoover · 99

V-Rescale · 61

TIP3P · 98

trimerização · 22, 33, 57, 129

trombinas · 17

trombocitopenia · 2, 4, 15, 16, 17, 18

---

**U**

Uniprot · 77

---

**V**

vacina · 24, 26, 27, 52

quimera · 27

viremia · 2, 14, 23, 24

virulência · 27

vírus

maduro · 22, 31, 75, 122, 129

VMD · 59, 61, 86, 94, 102, 109, 132

---

**Δ**

$\Delta G$  · *Consulte energia livre*