



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Interação de Péptidos inibidores de fusão do HIV com
modelos de membranas biológicas: um estudo por dinâmica
molecular**

Catarina Sofia Martins Pronto

Orientador(es) | António Manuel Teixeira Martins do Canto

Évora 2020



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Interação de Péptidos inibidores de fusão do HIV com
modelos de membranas biológicas: um estudo por dinâmica
molecular**

Catarina Sofia Martins Pronto

Orientador(es) | António Manuel Teixeira Martins do Canto

Évora 2020



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | Célia M. Antunes (Universidade de Évora)
- Vogal | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador | António Manuel Teixeira Martins do Canto (Universidade de Évora)

“Não há ventos que não prestem
nem marés que não convenham,
nem forças que me molestem,
correntes que me detenham.

Quero eu e a Natureza,
que a Natureza sou eu,
e as forças da Natureza
nunca ninguém as venceu.”

António Gedeão, in 'Teatro do Mundo'

Agradecimentos

Antes de mais, gostaria de começar por agradecer a todas as pessoas que ao longo do meu percurso académico ajudaram-me, direta ou indiretamente, a crescer e atingir os meus objetivos, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível. Deste modo, gostaria de deixar algumas palavras de agradecimento.

Ao Professor Doutor António do Canto, professor e orientador de estágio, agradeço a oportunidade que me proporcionou, assim como ajuda no desenvolvimento deste trabalho, como também pela simpatia, a disponibilidade, acompanhada de momentos de boa disposição e desconcentração, que contribuíram para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

Aos meus pais agradeço todos os esforços e sacrifícios que fizeram, tendo os feitos porque acreditarem em mim e nas minhas capacidades, permitindo-me chegar onde cheguei hoje. Em particular, agradeço à minha irmã pela sua ingente paciência e compreensão que sempre me motivou e fez-me rir nos momentos mais difíceis do desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu primo, André Caeiro, agradeço o apoio incondicional que me tem dado ao longo destes anos e por me fornecer os melhores conselhos científicos para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Bruno Tomero, à Joana Muchacho e à Raquel Medeiros, que desempenharam um papel importante na minha vida académica e mantiveram-me motivada durante todo este ano, proporcionando-me ótimos momentos, desde os momentos de lazer, ou as longas conversas, ou até mesmo as longas noites de estudo e principalmente pela tranquilidade que me transmitiram nos momentos mais frustrantes.

Ao David Pombo que me apoio incondicionalmente durante a realização deste trabalho, acreditando sempre em mim e nas minhas capacidades par atingir os meus objetivos, permanecendo do meu lado nos momentos mais difíceis e ajudando-me erguer a cabeça e a enfrentar os obstáculos que haviam de surgir pela frente, e acima de tudo pelo carinho e amizade que me deu.

Agradeço à Cláudia Teixeira, que apesar de termos seguidos caminhos diferentes, sei que poderei sempre contar com ela para me apoiar e dar-me uma palavra de amiga.

E por último, mas não menos importantes, a todos os meus colegas do curso de Bioquímica que me acompanharam nesta jornada, que me fizeram crescer enquanto pessoa, pelos momentos de descontração, pelas saídas divertidas como as tardes bem passadas, dando me força durante todo o meu percurso.

Índice

Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	xiii
Abreviaturas.....	xiv
Resumo	xvii
Palavras chave	xvii
Abstract.....	xviii
A. Problemática	xix
B. Objetivos.....	xxi
C. Fundamentos Teóricos.....	23
1. HIV	23
1.1. Virologia do HIV	26
1.1.1. Estrutura do genoma	26
1.2. Ciclo de replicação do HIV	28
1.2.1. Entrada na célula.....	28
1.2.2. Transcrição.....	29
1.2.3. Entrada no núcleo e integração	30
1.2.4. Transcrição, tradução e exportação do vírus do núcleo.....	31
1.3. Péptidos como fármacos anti-HIV	31
1.3.1. Estrutura da gp41 e gp120	32
1.3.2. Péptidos inibidores de fusão	33
2. Membranas Celulares	38
2.1. Perspetiva histórica	38
2.2. Estrutura e composição das membranas.....	42
2.2.1. Estrutura e propriedades dos lípidos de membrana	43
2.2.2. Colesterol	45
2.3. Termodinâmica das membranas lipídicas	46
2.4. Jangadas lipídicas	47
3. Simulação computacional: Dinâmica molecular	51
3.1. Campo de forças.....	52
3.2. Algoritmos.....	54
3.2.1. Passo de integração e restrições.....	54
3.2.2. Condições de fronteira e interações de longo alcance	56

3.2.3. Ensembles	58
D. Metodologia.....	61
E. Resultados e Discussão.....	65
1. Equilíbrio dos sistemas membranares: área por lípido e colesterol e espessura de membrana.....	65
2. Comportamento geral dos péptidos	67
2.1. Distância do centro de massa dos péptidos a superfície das membranas.....	67
2.2. Posição dos C α	69
2.3. Densidade	71
2.4. Estrutura secundária dos péptidos	77
2.5. Interação dos péptidos com as bicamadas - pontes de hidrogénio.....	79
2.6. Interações dos péptidos com as bicamadas- interações energéticas.....	82
2.7. Difusão lateral do péptido	88
2.8. Dinâmica rotacional	92
3. Propriedades das membranas	94
3.1. Área por lípido e espessura de membrana.....	94
3.2. Pontes de Hidrogénio entre as moléculas de POPC/colesterol com o solvente	96
3.3. Difusão lateral do POPC e do colesterol.....	97
3.4. Parâmetros de ordem.....	102
3.5. Dinâmica rotacional dos eixos selecionados da membrana lipídica	105
F. Conclusão	109
G. Referências	112
H. Anexos.....	132

Índice de figuras

Figura 1- (A) Protease; (B) Transcriptase reversa; (C) Integrase, onde esta representado a azul as quatro subunidades da integrase, sendo que a azul claro são as subunidades que fornecem os locais ativos para a junção do DNA e a azul escuro as subunidades desempenham um papel estrutural. Á vermelho corresponde as duas extremidades do DNA viral e a laranja o DNA celular. (Adaptado de http://pdb101.rcsb.org/motm/motm-by-category).....	26
Figura 2- Estrutura do genoma do vírus HIV-1(German Advisory Committee Blood, 2016).....	27
Figura 3- Ciclo da replicação do vírus HIV (adaptado de https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle)	29
Figura 4- Mecanismo da ligação da gp41 e da gp120 aos co-recetores CCR5/CXCR4. (adaptado de Lobritz et al., 2010).....	32
Figura 5- Modelo de fusão do HIV na membrana celular das células alvo. (adaptado de Kim et al., 2008).....	33
Figura 6- Diagrama esquemático da gp41 do HIV-1 e as sequencias de péptidos derivadas do C-HR (adaptado de Naito et al., 2010).....	34
Figura 7- O design do conceito do heptad repeat (adaptado de Naito et al., 2010).....	35
Figura 8- Sequencias de resíduos de aminoácidos dos péptidos usados utilizados no estudo de inibição do HIV. As partes da sequência a vermelho correspondem às sequências PDB, á azul encontram-se os resíduos de glutamato e a amarelo os resíduos de lisina (X=NLE).	37
Figura 9- Modelo membranar proposto por Groter e Grendel em 1925. (adaptado de http://www.biologydiscussion.com/cell-biology/plasma-membrane-organization-function-and-specialization/3751).	39
Figura 10- Modelo "paucimolecular" proposto por Davson e Danielli em 1935 (adaptado de http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/membranes.htm)	40
Figura 11- Modelo original proposto por Singer e Nicolson em 1972. Neste corte seccional da membrana celular os corpos com as superfícies cortadas representam proteínas membranares integradas rearranjadas aleatoriamente na superfície da membrana. Estão também representadas algumas proteínas integrais das membranas de complexos membranares específicos. A figura representa as proteínas integradas na membrana numa fase completamente fluída da bicamada lipídica. (adaptado de Nicholson & Singer, 1972).....	40

Figura 12- Modelo proposto por Vereb onde (A): microdomínios lípidicos, (B e C): citoesqueleto e (D):proteínas integradas(adaptado de Vereb et al., 2003)	41
Figura 13-(A) modelo estrutural de uma molécula de POPC. (B) modelo da estrutura de uma molécula de colesterol (adaptado de Martins do Canto et al., 2012).....	45
Figura 14- Visão geral da heterogeneidade lateral na membrana plasmática, jangadas lipídicas. (adaptado de Sezgin et al., 2017).	50
Figura 15- Snapshots dos modelos finais de POPC com as estruturas finais dos péptidos C34 (A), SC22EK (B), SC29EK (C), SC34 (D), SC34EK (E) e SC35EK (F) [VMD, 2019].	63
Figura 16- Snapshots dos modelos finais de POPC:Chol com as estruturas finais dos péptidos C34 (A), SC22EK (B), SC29EK (C), SC34 (D), SC34EK (E) e SC35EK (F) [VMD, 2019].	64
Figura 17- (A) Área por POPC nos sistemas de POPC ao longo do tempo de corrida. (B) Área por POPC nos sistemas de POPC:Chol ao longo do tempo de corrida. (C) Área por Chol nos sistemas de POPC:Chol ao longo do tempo de corrida.....	66
Figura 18- Espessura de membrana (nm) para todos os sistemas ao longo do tempo de corrida.....	67
Figura 19-(A) Distancia do centro de massa do C34 á superfície das membranas de POPC e POPC:CHOL. (B) Distancia do centro de massa do SC22EK á superfície das membranas de POPC e POPC:CHOL. (C) Distancia do centro de massa do SC29EK á superfície das membranas de POPC e POPC:CHOL. (D) Distancia do centro de massa do SC34 á superfície das membranas de POPC e POPC:Chol. (E) Distancia do centro de massa do SC34EK á superfície das membranas de POPC e POPC:CHOL. (F) Distancia do centro de massa do SC35EK á superfície das membranas de POPC e POPC:CHOL.	68
Figura 20-(A) Posição media dos C α do C34 durante os últimos 100 ns da simulação. (B) Posição media dos C α do SC22EK durante os últimos 100 ns da simulação. (C) Posição media dos C α do SC29EK durante os últimos 100 ns da simulação. (D) Posição media dos C α do SC34 durante os últimos 100 ns da simulação. (E) Posição media dos C α do SC34EK durante os últimos 100 ns da simulação. (F) Posição media dos C α do SC35EK durante os últimos 100 ns da simulação.....	70
Figura 21- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema C34+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema C34+POPC:Chol.....	72

Figura 22- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema SC22EK+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema SC22EK+POPC:Chol.	73
Figura 23- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema SC29EK+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema SC29EK+POPC:Chol.	74
Figura 24- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema SC34+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema SC34+POPC:Chol.	75
Figura 25- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema SC34EK+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema SC34EK+POPC:Chol.	76
Figura 26- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema SC34EK+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema SC34EK+POPC:Chol.	77
Figura 27- A) Estruturas secundárias (%) dos péptidos em água. (B) Estruturas secundárias (%) dos péptidos nas membranas de POPC. (C) Estruturas secundárias (%) dos péptidos nas membranas de POPC:Chol.....	78
Figura 28- (A) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido C34 e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol. (B) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido SC22EK e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol. (C) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido SC29EK e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol. (D) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido SC34 e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol. (E) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido SC34EK e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol. (F) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido SC35EK e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol.....	80
Figura 29-(A) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC+C34. (B) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC+SC22EK. (C) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC+SC29EK. (D) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC+SC34. (E) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC+SC34EK. (F) Variações das interações de Lennard-Jones e Coulomb para o sistema de POPC+SC35EK.	83

Figura 30-(A) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+C34. (B) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+SC22EK. (C) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+SC29EK. (D) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+SC34. (E) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+SC34EK. (F) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+SC35EK..... 84

Figura 31- (A) Curva do potencial de força media (PMF) para a dissociação do péptido C34 nas membranas de POPC e POPC:Chol. (B) Curva do potencial de força media (PMF) para a dissociação do péptido SC22EK nas membranas de POPC e POPC:Chol. (C) Curva do potencial de força media (PMF) para a dissociação do péptido SC29EK nas membranas de POPC e POPC:Chol. (D) Curva do potencial de força media (PMF) para a dissociação do péptido SC34 nas membranas de POPC e POPC:Chol. (E) Curva do potencial de força media (PMF) para a dissociação do péptido SC34EK nas membranas de POPC e POPC:Chol. (F) Curva do potencial de força media (PMF) para a dissociação do péptido SC35EK nas membranas de POPC e POPC:Chol..... 88

Figura 32- Deslocamento quadrado médio (MSD) de todos os péptidos simulados em água ao longo do tempo..... 89

Figura 33-(A) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido C34 nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. (B) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido SC22EK nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. (C) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido SC29EK nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. (D) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido SC34 nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. (E) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido SC34EK nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. (F) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido SC35EK nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. 90

Figura 34- Função de auto-correlação para todos os péptidos simulados em água. (B) Função de auto-correlação de todos os péptidos simulados inseridos num sistema de POPC. (C) Função de auto-correlação de todos os péptidos simulados num sistema de POPC:Chol. 94

Figura 35- (A) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema C34+POPC. (B) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC22EK+POPC. (C) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC29EK+POPC. (D) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC34+POPC. (E) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC34EK+POPC. (F) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC35EK+POPC..... 98

Figura 36-(A) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema C34+POPC:Chol. (B) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC22EK+POPC:Chol. (C) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC29EK+POPC:Chol. (D) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC34+POPC:Chol. (E) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC34EK+POPC:Chol. (F) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC35EK+POPC:Chol..... 99

Figura 37- Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema C34+POPC:Chol. (B) Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema SC22EK+POPC:Chol. (C) Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema SC29EK+POPC:Chol. (D) Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema SC34+POPC:Chol. (E) Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema SC34EK+POPC:Chol. (F) Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema SC35EK+POPC:Chol..... 100

Figura 38- (A) Parâmetros de ordem das cadeias acilo sn-1 das membranas de POPC. (B) Parâmetros de ordem das cadeias acilo sn-2 das membranas de POPC. (C) Parâmetros de ordem das cadeias acilo sn-1 das membranas de POPC:Chol. (D) Parâmetros de ordem das cadeias acilo sn-2 das membranas de POPC:Chol. 105

Figura 39- (A) Função de auto-correlação do eixo P-N para os sistemas de POPC. (B) Função de auto-correlação do eixo P-N para os sistemas de POPC:Chol. (C) Função de auto-correlação do eixo do colesterol para os sistemas de POPC:Chol. 107

Figura 40- (A) Função de auto-correlação para o eixo sn-1 dos sistemas de POPC. (B) Função de auto-correlação para o eixo sn-2 dos sistemas de POPC. (C) Função de auto-correlação para o eixo sn-1 dos sistemas de POPC:Chol.(D) Função de auto-correlação para o eixo sn-2 dos sistemas de POPC:Chol..... 107

Índice de tabelas

Tabela 1- Número de pontes de hidrogénio entre o péptido e a água,o POPC e o Chol nos sistemas de POPC, POPC:Chol e para o péptido simulado em água, para os últimos 100 ns de cada simulação.	81
Tabela 2- Médias e os respetivos desvios padrões das variações das energias de Lennard-Jones e Coulomb entre o solvente e o péptido (sol-pep), POPC e o péptido (POPC-pep) e o colesterol e o péptido (Chol-pep), ao longo do tempo de corrida da simulação.	85
Tabela 3- Variações da energia livre de Gibbs para todos os sistemas simulados e os respetivos desvios padrões.....	86
Tabela 4- Coeficientes de difusão lateral para todos os péptidos simulados em água. ..	91
Tabela 5- Coeficientes de difusão lateral dos péptidos nos sistemas de POPC e POPC:Chol.	91
Tabela 6- Média das áreas por POPC e por colesterol (nm ²) e as respetivas medias da espessura de membrana (nm) para todos os sistemas simulados.....	95
Tabela 7- Média e os respetivos desvios padrões do número de pontes de hidrogénio entre o Sol-POPC e Chol-Sol nas membranas de POPC e POPC:Chol, para os últimos 100 ns da simulação.....	96
Tabela 8- Coeficientes de difusão lateral do POPC e colesterol para todos os sistemas membranares.....	101
Tabela 9- Parâmetros de ordem e os desvios padrões para todos os sistemas simulados e as respetivas variações para todas as cadeias acilo sn-1 e sn-2.	103

Abreviaturas

ApChol- Área por colesterol

ApPOPC- Área por 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

ART- *Antiretroviral Therapy* (terapias antirretrovirais)

ARV- *Antiretroviral* (antirretrovirais)

AZT- *Azidothymidine* (azidotimidina)

Chol- *Cholesterol* (colesterol)

C α - *Alpha carbon* (Carbono alfa)

cDNA- *Complementary DNA* (DNA complementar)

C-HR- *C-terminal Heptad repeat* (*heptad repeat* C-terminal)

Coul- Forças de Coulomb

CT- *Cytoplasmic tail* (cauda citoplasmática)

CTS- *Central termination signal* (sinal de terminação central)

D_{lat}- Coeficiente de difusão lateral

DNA- *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DPPC- *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine* (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina)

DSL- *Disulfide bond* (ligação de dissulfureto)

DRM- *Detergent resistant membranes* (membranas resistentes a detergentes)

DSM- *Detergent soluble membranes* (membranas solúveis aos detergentes)

DOPC- *Dioleyl phosphatidylcholine* (dioleil-fosfatidilcolina)

ET- *Ectodomain* (ectodomínio)

FP- *Fusion peptide* (péptido de fusão)

GEM- *Glycosphingolipids* (glicoesfingolípido)

GL- *Glycolipid* (glicolípido)

GPI- *Glycosylphosphatidylinositol* (glicosilfosfatidilinositol)

GPL- *Glycerolphospholipid* (glicerolfosfolípido)

HIV- *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência adquirida)

HTLV- *Human T leukemia virus* (Vírus linfotrópico da célula T humana)

LAV- *Lymphadenopathy associated virus* (Vírus Associado à Linfadenopatia)

L_α- Fase líquido desordenado

L_β- Fase de gel

L_c- Fase de subgel

LJ- Lennard Jones (Interações de)

L_o- Estado líquido sordenado

LTR- *Long terminal repeat*

MSD- *Mean square displacement* (deslocamento quadrado médio)

MT- *Membrane thickness* (espessura de membrana)

N-HR- *N-terminal heptad repeat* (*heptad repeat* N-terminal)

RNA- *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RNA_t- *Transfer RNA* (RNA transportador)

RnaseH- *Ribonuclease H* (ribonuclease H)

PBC- *Periodic boundary conditions* (condições de fronteira periódicas)

Pbs- *Primer binding site*

PC- *Phosphatidylcholine* (fosfatidilcolina)

PCE- Parâmetro crítico de empacotamento

PBD- *Pocket binding domain*

PE- *Phosphatidylethanolamine* (fosfatidiletanolamina)

PL- *Phospholipid* (fosfolípidos)

PPT- *Polypurine tract* (trato de polipurina)

PS- *Phosphatidylserine* (fosfatidilserina)

POPC- *1-palmitiol-2-oleyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine* (1-palmitiol-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina)

SIDA- Síndrome da imunodeficiência adquirida

SL- *Sphingolipid* (esfingolípido)

SM- *Sphingomyelin* (esfingomielina)

SS- *Secondary structure* (estruturas secundárias)

T-20- *Enfuvirtide* (enfurvitida)

TIFF- *Triton insoluble floating fractions* (fração insolúvel em Triton)

TM- *Transmembrane domain* (domínio transmembranar)

UA- *United atoms* (átomos unidos)

UNAIDS- *United Nations Programme on HIV/AIDS* (Programa das Nações Unidas sobre a SIDA)

Resumo

O HIV interage com as células-alvo pela ação das glicoproteínas virais gp41 e gp120. Estas proteínas são reconhecidas pelos co-receptores CCR5 e CXCR4, considerados como os principais recetores responsáveis pela entrada do vírus nas células alvo. O desenvolvimento de novas terapias e medicamentos para o tratamento da infeção do HIV é um processo contínuo. A forma como certos péptidos inibidores de fusão interagem com as membranas em solução e a manutenção de estruturas helicoidais estáveis têm sido correlacionadas com o aumento da capacidade inibitória do HIV para com as células alvo. Desta forma, no desenvolvimento deste trabalho, com base nos resultados obtidos de Veiga e os seus colaboradores [Veiga *et al.*, 2004], observou-se por dinâmica molecular (MD) a interação de seis péptidos inibidores de fusão (C34, SC22EK, SC29EK, SC34, SC34EK e SC35EK) do HIV com modelos de membranas de POPC e POPC:Chol (1:1). Os resultados aqui apresentados mostram que, uma vez os péptidos adsorvidos, as bicamadas apresentam diferentes comportamentos e sofrem modificações na sua estrutura e difusão, assim como os próprios péptidos. De todos os péptidos simulados o que apresentou uma maior eficácia e, conseqüentemente, uma maior helicicidade foi o péptido SC34EK. Por outro lado, o péptido SC22EK foi o péptido que demonstrou menor capacidade de interagir com as membranas.

Palavras chave

HIV; SIDA; Péptidos inibidores de fusão do HIV; Bicamada lipídica; C34; SC22EK; SC29EK; SC34; SC34EK; SC5EK; Interação péptido-membranas; Dinâmica molecular.

Interaction of HIV fusion inhibitor peptides with biological membrane models: a molecular dynamics study

Abstract

HIV interacts with target cells by the action of gp41 and gp120 viral glycoproteins. These proteins are recognized by the CCR5 and CXCR4 co-receptors, which are considered to be the main receptors responsible for virus entry into target cells. The development of new therapies and medicines to treat HIV infection is an ongoing process. How certain fusion inhibitor peptides interact with membranes in solution and the maintenance of stable helical structures has been correlated with increased inhibitory capacity of HIV to target cells. Thus, in the development of this work, based on the results obtained from Veiga and his collaborators [Veiga et al., 2004], molecular interaction (MD) observed the interaction of six fusion inhibitor peptides (C34, SC22EK, SC29EK, SC34, SC34EK and SC35EK) with membrane models of POPC and POPC: Chol (1: 1). The results presented here show that, once the adsorbed peptides, the bilayers exhibit different behaviors and undergo modifications in their structure and diffusion, as do the peptides themselves. Of all the simulated peptides that showed the highest efficacy and, consequently, the greatest helicity was the SC34EK peptide. On the other hand, SC22EK peptide was the peptide that showed the least ability to interact with membranes.

A. Problemática

O vírus HIV sofre diversas mutações o que leva ao desenvolvimento de resistências dos fármacos inibidores de fusão do vírus [Shi *et al.*, 2016]. Um dos primeiros inibidores de fusão a serem aprovados pela FDA (*Food and Drug Agency*) para o tratamento do HIV, foi o Enfuvirtide (T-20), no entanto estirpes novas do HIV têm surgido, resistentes ao T-20 [Oishi *et al.*, 2010]. Desta forma existe uma necessidade continua de desenvolver novos inibidores para combater a doença de uma maneira eficaz.

A maneira como os péptidos inibidores de fusão se comportam, interagindo com as membranas e a manutenção de estruturas helicoidais estáveis têm sido correlacionadas com o aumento da capacidade inibitória do HIV [Dwyer *et al.*, 2007]. Assim, um aspeto crítico para a inibição da fusão é a capacidade do núcleo N-HR formar uma hélice tripla estável e a capacidade dos péptidos assumirem uma estrutura helicoidal estável [Otaka *et al.*, 2002]. Esta hélice tripla é extremamente estável e pode ser reconhecida por anticorpos monoclonais, apresentando uma estrutura cristalina com três péptidos com hélices N que se associam com três péptidos com hélice C, adotando uma configuração anti-paralela nos bolsos hidrofóbicas, sendo esta região critica para a fusão e estabilidade viral [Liu *et al.*, 2007]. Um dos péptidos inibidores em estudo é o C34, este contem uma sequencia PBD que lhe permite aumentar a sua potencia mas, não inibe logo a fusão do vírus a membrana celular do hospedeiro nem permite a formação de um feixe helicoidal de seis hélices (não apresenta uma estrutura completamente helicoidal).[Chan *et al.*, 1997; Chang & Hsu, 2007; Mo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007]. Com o intuito de formar péptidos mais ativos e com maior helicidade foram desenvolvidos péptidos análogos do C34.

Desta forma, substituíram-se aminoácidos no local do acesso do feixe helicoidal com glutamato e lisina, sendo separados no *heptad repeat* da α -hélice, por quatro posições (i vs $i+4$), também, foram introduzidos motivos de glutamato e lisina consecutivas separadas por três resíduos em diferentes posições do péptido C34[Naito *et al.*, 2010]. Desenvolvendo-se os péptidos inibidores de fusão SC22EK, SC29EK, SC34, SC34EK e SC35EK, estes péptidos apresentam estruturas, tamanhos e estabilidades térmicas diferentes [Miyamoto & Kodama, 2012; Nishikawa *et al.*, 2009; Naito *et al.*, 2010]. O foco deste trabalho é estudar a dimensão e a helicidade dos péptidos C34, SC22EK, SC29EK, SC34, SC34EK e SC35EK, que foram desenhados para contrariar a entrada do

vírus HIV nas células hospedeiras, informando-nos da maneira como estas propriedades influenciam a interação dos péptidos com as membranas, por dinâmica molecular.

B. Objetivos

O foco desta dissertação é estudar por simulação computacional, a interação de seis péptidos inibidores de fusão (C34, SC22EK, SC29EK, SC34, SC34EK e SC35EK) do HIV com modelos membranares de POPC e POPC:Chol (1:1). Por dinâmica molecular estudou-se as propriedades físicas dos péptidos inibidores de fusão, com um foco principal na dimensão dos péptidos, na presença de EK como promotores e estabilizadores de helicicidade dos péptidos. Para este fim, parâmetros como a área e a espessura de membrana, as pontes de hidrogénio entre os lípidos de membrana e a água, os coeficientes de difusão lateral dos lípidos, a dinâmica rotacional de determinados eixos moleculares e os ângulos dos eixos importantes foram calculados e discutidos para as membranas biológicas com e sem péptidos adsorvidos. Da mesma forma, também foram calculados parâmetros que permitem avaliar o comportamento dos péptidos, como a distancia do centro de massa do péptido à superfície das membranas, a densidade, a posição dos C α , estruturas secundarias, pontes de hidrogénio entre os péptidos e a água/lípidos de membrana, as energias de Lennard Jones, Coulomb e de Gibbs nos sistemas finais, a difusão lateral e a dinâmica rotacional dos péptidos.

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time
to understand more, so that we may fear less.”*

Marie Curie (1867-1934)

C. Fundamentos Teóricos

1. HIV

Antes da epidemia do síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ser detetada havia um tom triunfalista e confiante caracterizado pela autoimagem da medicina (o estado geral da saúde humana era caracterizado como um avanço para o século em que se encontravam), nomeadamente nos Estados Unidos, como provam os relatórios e as avaliações coletivas da época [Barre-Sinoussi *et al.*, 1997]. É neste contexto que surgem mudanças rápidas e profundas na humanidade, surgindo a partir de 1973, vinte e nove doenças novas, entre elas, o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) [Benatar, 2002].

O vírus responsável pela SIDA foi descrito pela primeira vez como um retrovírus humano em 1980, pelo investigador Robert Gallo, nos Estados Unidos, sendo primeiro denominado de HTLV (*Human T leukemia virus*) [Vahle, 2009]. Em 1983, os médicos do Instituto Pasteur, em França, relataram a descoberta de um novo retrovírus chamado Vírus Associado à Linfadenopatia (LAV), que poderia ser a causa da SIDA, esta descoberta ficou associada ao nome do chefe de laboratório, Luc Montagnier [Barré-Sinoussi *et al.*, 1983]. Tal como o primeiro retrovírus conhecido, HTLV, o LAV apresentava evidências de atividade da transcriptase reversa, pelo que podia ser classificado como um retrovírus humano. Em 1986 a descoberta do agente causador da SIDA foi atribuída a Robert Gallo e Luc Montagnier, pelo comité internacional recomendando o termo vírus da imunodeficiência humana (HIV) para denominá-lo, reconhecendo-o com a capacidade de infetar seres humanos [Vahle, 2009]. Conhece-se atualmente duas estirpes do HIV, o HIV-1 que apresenta uma extensa diversidade genética e o HIV-2. O HIV-2 foi reportado pela primeira vez na África em 1985, assemelhando-se muito a um vírus símio. Este vírus símio que afeta os primatas africanos pode ser a principal causa para a disseminação do HIV-1 e do HIV-2, devido às múltiplas transmissões entre espécies que sofreu até atingir os humanos [Bhatti *et al.*, 2016].

O HIV é um lentivírus da família dos retrovírus, mas devido à sua complexa regulação, expressão e replicação do seu genoma, o HIV é considerado um retrovírus fora do comum [Wormser, 2004]. Este pode ser transmitido por contacto sexual através das superfícies mucosas como por fluídos corporais (sémen e secreções vaginais), por transmissão perinatal (de uma mãe infetada para o bebé no nascimento) e por inoculação percutânea (transfusões de sangue) [Shaw & Hunter, 2012]. Todavia, a transmissão do

vírus pode ser mediada por outros fatores adjacentes, como por doenças sexualmente transmissíveis, particularmente doenças onde há criação de úlceras na zona genital, aumentando a suscetibilidade de infeção pelo vírus HIV e pela circuncisão. De acordo com ensaios clínicos provou-se que a circuncisão em homens diminui o risco de contrair a doença em cerca de 60% [Gary *et al.*, 2007; Shaw & Hunter, 2012].

O HIV infeta células fulcrais no sistema imunológico humano, como os macrófagos, responsáveis pela fagocitose de corpos estranhos e pelo reconhecimento futuro de corpos nocivos para o sistema imunitário, como as células dendríticas e os linfócitos T CD4⁺ [Whitside, 2008]. O HIV sendo um vírus linfotrópico, tem uma afinidade preferencial para os linfócitos T CD4⁺, responsáveis pelo controlo do sistema imunitário e pela resposta a corpos estranhos e infeções [Weiss, 2001; Whitside, 2008]. Após a infeção das células T CD4⁺ ocorre a morte das células infetadas, seguido por um aumento das taxas de apoptoses em células infetadas e acabando na destruição de células T CD4⁺ infetadas por linfócitos citotóxicos [Migueles *et al.*, 2010]. A perda de linfócitos T CD4⁺ pensava-se ser feita de uma forma gradual, uma vez que o tempo de sob deficiência em pacientes não tratados só começava a ser notada dentro de 10 a 12 anos após a infeção primária. Contudo o conceito do tempo de progressão da doença da SIDA foi questionado por vários experimentalistas [Shaw & Hunter, 2012].

Antes de 1996, existiam poucos tratamentos anti-retrovirais para pessoas portadoras do HIV. Os primeiros tratamentos para o HIV foram desenvolvidos a partir de dois dos três enzimas essenciais do HIV, sendo adaptados para inibirem a transcriptase reversa e as protéases [Arts & Hazuda, 2012].

Com o passar do tempo, surgiu uma compreensão mais clara da replicação viral e a maneira como este interage com as células hospedeiras, levando a um acréscimo do desenvolvimento de drogas antirretrovirais eficazes (ARV). Com o desenvolvimento destas novas drogas surgiram as primeiras terapias anti-retrovirais (ART), deixando para trás o azidotimidina (AZT) e passando para a combinação de inibidores nucleótidos da transcriptase reversa, levando ao surgimento da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) [Desai *et al.*, 2012]. O uso desta terapia resultou em grandes sucessos terapêuticos, alterando gradualmente o percurso da doença e transformando-a numa doença cronicamente maneável, prolongando e aumentando a qualidade de vida e reduzindo a carga viral, mas não cura a infeção crónica pelo HIV (a multiplicação do HIV no interior de células CD4⁺ continua indefinidamente) [Jacob *et al.*, 2017; Lavinson,

2016]. No entanto, o sucesso destes tratamentos só é conseguido a custo dos efeitos adversos das drogas, interações medicamentosas e pela inconveniência da terapia ao longo da vida. Atualmente existem vários pacientes em tratamento que vivem com toxicidade das drogas ou enfrentam a possibilidade de o tratamento falhar, devido as múltiplas resistências do vírus às drogas [Desai *et al.*, 2012].

Neste século, menos de um milhão de pessoas em cada ano têm morrido de SIDA, devido ao acesso sustentado à terapia anti-retroviral. O número anual de pessoas a morrerem por SIDA diminuiu de 1,9 milhões de pessoas, desde 2004, para 940 000 em 2017. Existe, desta forma, um decréscimo de mortes por volta dos 34% desde 2010. Por outro lado, desde 2016 houve um aumento de 2,3 milhões de pessoas a receber tratamento anti-retroviral. Atualmente cerca de 21,7 milhões a recebem e 3 em 4 pessoas sabem o seu estado de doença. Porém, o sucesso de salvar vidas não tem sido compatível com o sucesso de reduzir as infeções por HIV, uma vez que os serviços de prevenção não estão a ser prestados adequadamente e com intensidade suficiente para chegar às pessoas que mais precisam [UNAIDS,2018].

Há que denotar que apesar das Nações Unidas quererem acabar com a epidemia da SIDA até 2030, investindo biliões de dólares e existirem milhões de profissionais de saúde, assistentes sociais e organizações comunitárias a trabalhar para este objetivo muitos portadores do HIV sofrem de discriminação e estigma social. As mesmas pessoas que as deviam proteger e ajudar muitas vezes discriminam os seus doentes, negando-lhes o acesso aos serviços de saúde levando a um aumento de mortes e infeções pelo HIV. Todas as pessoas infetadas com o vírus HIV, independentemente do seu sexo, orientação sexual e etnia têm os mesmos direitos que os outros membros da sociedade e por consequente a mesma proteção segundo a lei [UNAIDS,2018]. Desta maneira, as pessoas portadoras do vírus HIV devem ser legalmente protegidas contra a discriminação de todas as maneiras possíveis, quer públicas ou privadas, inclusive nos serviços de saúde, nos postos de emprego, na educação e no bem-estar social [Maluwa *et al.*, 2002]. As pessoas que enfrentam este tipo de barreiras, geralmente, são as mais marginalizadas, estigmatizadas e vulneráveis ao HIV. Desta forma, é essencial proteger, respeitar e cumprir os direitos humanos dos pacientes, garantindo que os mesmos possam ter acesso a estes serviços, possibilitando uma melhor resposta para com a doença.

1.1. Virologia do HIV

1.1.1. Estrutura do genoma

O HIV apresenta uma estrutura diferente dos outros retrovírus, têm uma estrutura esférica com um diâmetro aproximadamente de 120 nm, sendo cerca de 60 vezes menor que um eritrócito [McGoven *et al.*, 2002]. Quanto ao genoma do vírus, este apresenta duas cadeias idênticas de RNA, que codificam nove genes do vírus, dentro de uma cápsula proteica (p24) com uma forma cônica, protegendo o seu RNA [Zhao *et al.*, 2013]. O RNA de cadeia simples encontra-se ligado as proteínas da nucleocápside (p7), e às enzimas necessárias para o desenvolvimento do virião como, a protéase, a ribonuclease, a integrase e a transcriptase reversa [Kuiken *et al.*, 2008]. A partir desta última o DNA viral é gerado, degradando o RNA e integrando o DNA viral de cadeia dupla no genoma humano. As extremidades de cada cadeia de RNA apresentam uma região denominada de *long terminal repeat* (LTR), onde de 5' para 3' vai ocorrer a codificação do promotor para a transcrição dos genes virais [German Advisory Committee Blood, 2016]. A cápsula viral é revestida por uma matriz composta pela proteína viral (p17) que assegura a integridade do virião. A p17, p24 e a p7 são codificadas posteriormente pelo gene *gag* [German Advisory Committee Blood, 2016; Kuiken *et al.*, 2008].

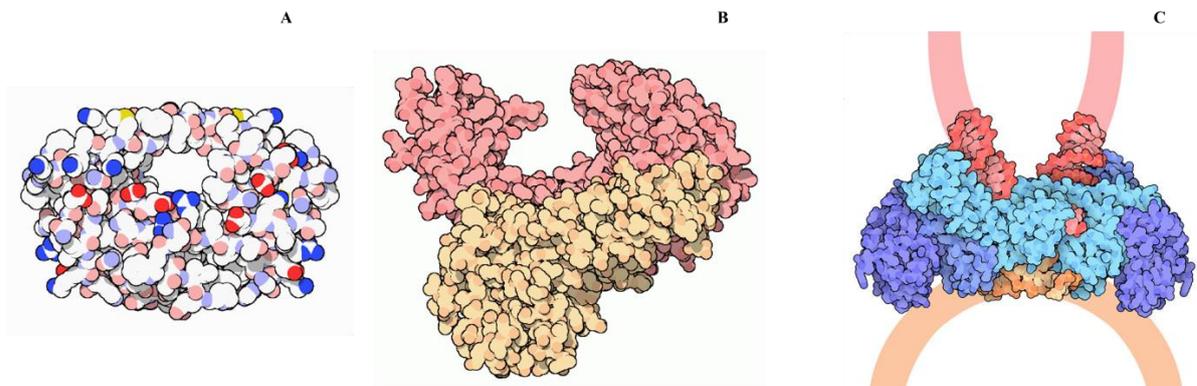


Figura 1- (A) Protease; (B) Transcriptase reversa; (C) Integrase, onde esta representado a azul as quatro subunidades da integrase, sendo que a azul claro são as subunidades que fornecem os locais ativos para a junção do DNA e a azul escuro as subunidades desempenham um papel estrutural. Á vermelho corresponde as duas extremidades do DNA viral e a laranja o DNA celular. (Adaptado de <http://pdb101.rcsb.org/motm/motm-by-category>)

O genoma de RNA consiste em nove genes (*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* e por vezes um decimo *tev* que é uma fusão dos genes *tat*, *env* e *rev*) que codificam 19 proteínas. Os genes *gag*, *pol* e *env* contêm a informação para produzir as proteínas estruturais do vírus [Kuiken *et al.*, 2008]. Em primeira instância o gene *gag* é lido, seguido pelo gene *pol*, que codifica as enzimas necessárias para o desenvolvimento do virião. Adjacente ao gene *pol* encontra-se o gene *env*, a partir deste são formadas duas

glicoproteínas do envelope gp120 e a gp41 [German Advisory Committee Blood, 2016]. Os restantes genes têm uma função regulatória para as proteínas que controlam a capacidade do HIV infetar as células hospedeiras [Kuiken *et al.*, 2008]. O gene *tat* e *rev* são responsáveis pelo início da replicação do vírus, enquanto os outros genes reguladores (*nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*) têm um maior impacto na replicação e no brotamento (*budding*) do vírus e na sua patogénese. O HIV-2 codifica o gene *vpx* (proteína x do vírus) em vez do gene *vpu*, conferindo ao vírus uma menor patogénese [German Advisory Committee Blood, 2016].

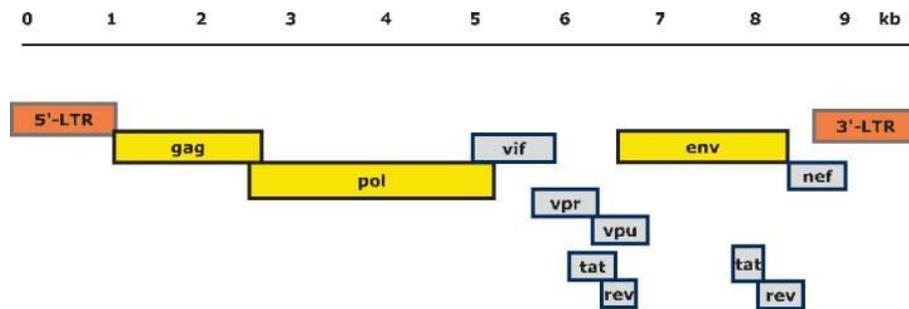


Figura 2- Estrutura do genoma do vírus HIV-1 (German Advisory Committee Blood, 2016).

Incorporados no envelope viral estão cerca de 70 cópias de uma proteína, *Env*, que se projeta através da superfície do vírus [Kuiken *et al.*, 2008]. A proteína *env* consiste numa tampa feita de três moléculas denominadas de gp120 e uma haste que é constituída por três moléculas denominadas de gp41 que ligam a estrutura ao envelope do vírus. O complexo glicoproteico, gp41, permite que o vírus se anexe e se funda com as células alvo, permitindo o início do ciclo de replicação do vírus [Chan *et al.*, 1997]. As duas proteínas *Tat* (p16 e p14) são responsáveis pela ativação da transcrição. A proteína *Rev* (p19) esta envolvida no transporte de RNA's do núcleo e do citoplasma. A proteína que previne a ação da APOBEC3G (uma proteína celular que desamina os híbridos de DNA:RNA e/ou interfere com a proteína *Pol*) é a *Vif* (p14) [German Advisory Committee Blood, 2016]. Quanto a proteína *Nef* (p27) regula o recetor CD4 assim como as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (HMC) de classe I e II [Garcia *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1996; Stumptner-Cuvelette *et al.*, 2001]. Por fim a proteína *Vpu* (p16) é responsável pela libertação das partículas virais para as células-alvo [Kuiken *et al.*, 2008].

1.2. Ciclo de replicação do HIV

1.2.1. Entrada na célula

A primeira fase da replicação do vírus HIV é a entrada nas células alvo. Quando um indivíduo é infetado pelo vírus as células T CD4⁺, os macrófagos e as células dendríticas são os seus principais alvos, constituindo estes os marcadores para identificar a infeção e o progresso da doença. O período inicial da infeção demora entre 2-10 semanas, onde ocorre uma queda acentuada na concentração de células T-CD4⁺ e um grande pico de níveis virais [Hernandez-Vargas, 2019]. Desta forma, foi observado que o vírus HIV ataca e elimina os linfócitos T CD4⁺, sendo estas moléculas os recetores primários do HIV [Freed, 2001].

Numa primeira instância o envelope da glicoproteína gp120 liga-se ao recetor das células CD4, permitindo a interação com os co-recetores de citocina CCR5 ou CXCR4 [Danielson & Hope, 2009; Friedrich *et al.*, 2011]. Esta interação gera uma ligação mais estável de duas pontas, que permite que o N-terminal altamente hidrofóbico (designado por péptido de fusão, FP) da gp41 possa penetrar na membrana celular [Chan & Kim, 1998; Freed, 2001]. As sequências de repetição, HR1 e HR2, da gp41 vão interagir e provocar o colapso da porção extracelular da gp41, levando a uma aproximação da membrana da célula ao vírus, permitindo a fusão das membranas e uma consequente entrada da cápside viral [Chan & Kim, 1998; Wyatt *et al.*, 1998].

Apos a fusão da cápside viral na membrana plasmática da célula alvo, o núcleo é depositado no citoplasma, o RNA do HIV e várias enzimas (transcriptase reversa, integrase, ribonuclease e protease) são inseridas na célula [Chan & Kim, 1998].

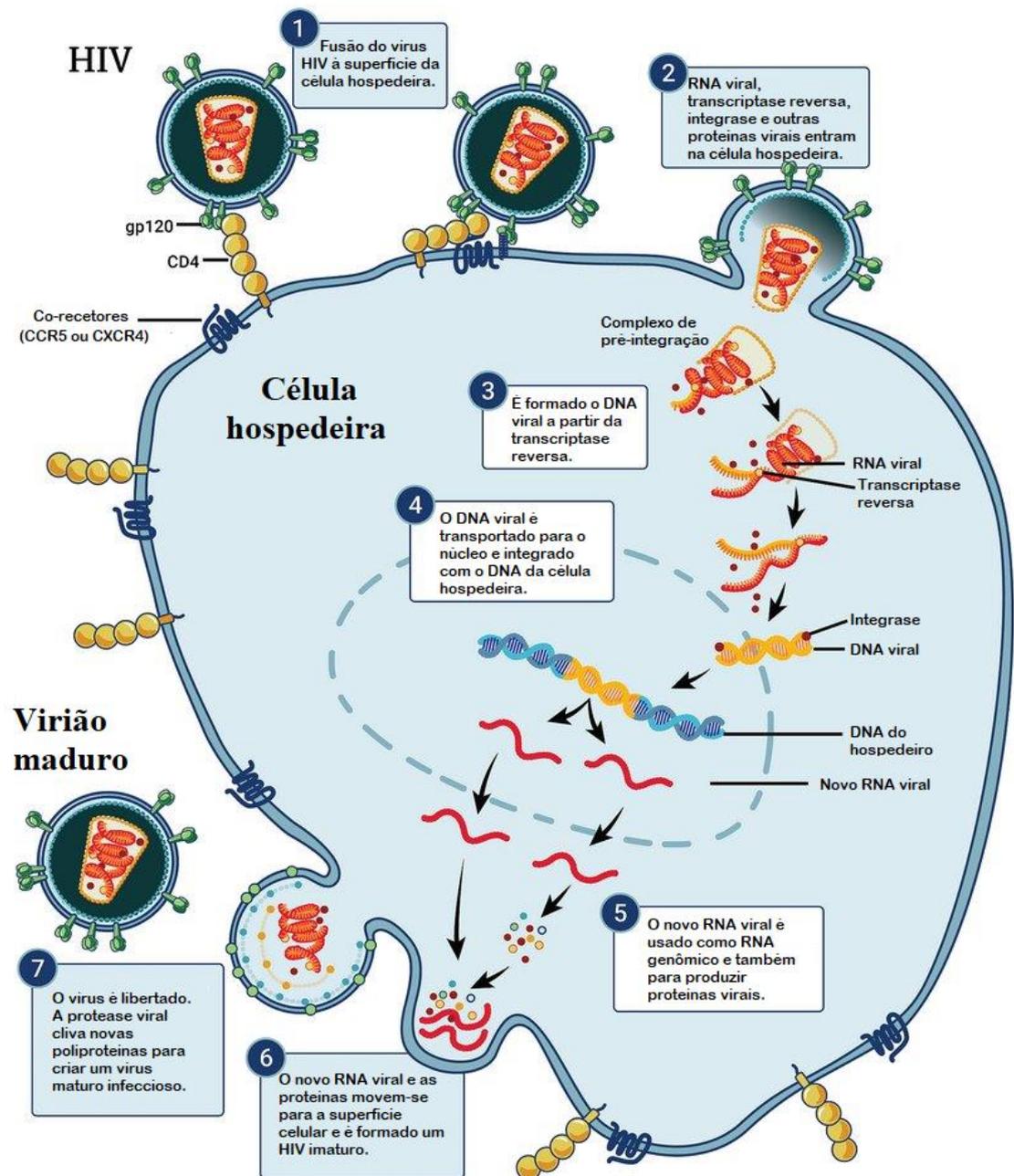


Figura 3- Ciclo da replicação do vírus HIV (adaptado de <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>)

1.2.2. Transcrição

Após a entrada do vírus na célula hospedeira e serem libertados o RNA do HIV e as respectivas enzimas no citoplasma inicia-se a transcrição do vírus [Friedrich *et al.*, 2011]. Assim, inicia-se a síntese do primeiro produto viral, o cDNA viral, a partir do RNA genômico viral com o auxílio da transcriptase reversa [Payne, 2017]. Durante esta fase, o

HIV necessita de anular dois tipos de fatores das células hospedeiras, que bloqueiam a infecção retroviral, a TRIM5 e APOBEC [Zheng *et al.*, 2005].

A transcrição das cadeias de RNA viral são feitas em duas etapas. Em primeiro, a transcriptase reversa vai usar como um *primer* o RNAt que se liga ao pbs (*primer binding site*), para iniciar a transcrição do DNA. Esta vai começar na extremidade 5' da molécula de RNA produzindo um híbrido de DNA/RNA. O RNA híbrido vai ser degradado pela RnaseH (é uma haloenzima da transcriptase reversa) e criar fragmentos de DNA (cadeias de DNA fortes de menor sinal). Estes fragmentos vão atuar como *primers* de uma síntese mais pequena, permitindo que ocorra transferência de cadeias, ou seja, vai permitir um “salto” da extremidade 5' para a 3' do genoma. O resultado desta síntese mais pequena serão fragmentos de RNA que serão então utilizados como *primers* para a síntese de cadeias de DNA [Freed, 2001].

O local de iniciação dos *primers* nos retrovírus, são sequências ricas em purinas, conhecidas como trato de polipurina (PPT). No caso do HIV, o local de iniciação é conhecido como PPT central. Então para a segunda parte da transcrição, o RNAt que se encontra ligado ao pbs vai ser removido pela RnaseH, dando início a transcrição da segunda cadeia. Esta transcrição vai terminar perto do centro do genoma, no local de terminação designado por sinal de terminação central (CTS). Desde o PPT ao CTS vão aproximadamente 100 nucleotídeos de DNA, o que se traduz num retalho de DNA [Freed, 2001]. Posteriormente o DNA e o seu complemento de DNA formam uma cadeia dupla de DNA viral, que é então transportada para o núcleo da célula, num complexo de pré-integração (formado por proteínas virais e celulares) [Friedrich *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2005].

1.2.3. Entrada no núcleo e integração

O complexo de pré-integração para atravessar a membrana vai usar dineína citoplasmática, para percorrer os microtúbulos da célula até ao núcleo [Friedrich *et al.*, 2011]. A enzima integrase, após a entrada no núcleo, vai remover dois nucleótidos da extremidade 3' de cada cadeia de DNA viral, de seguida vai cortar as cadeias de DNA da célula hospedeira para, no final integrar o DNA viral no genoma da célula hospedeira [Payne, 2017; Zheng *et al.*, 2005]. Se o DNA do HIV não for integrado, este vai formar um circulo de 2-LTR, sendo considerado um produto da transcriptase reversa sem saída (o vírus não se irá mais reproduzir) [Friedrich *et al.*, 2011].

A integração do HIV no genoma da célula é geralmente considerado o passo final do início do ciclo de replicação do vírus [Payne, 2017]. O DNA viral integrado na célula pode permanecer dormente durante um longo período, fase de latência, antes do ciclo de replicação continuar [Zheng *et al.*, 2005]. Esta fase de latência constitui um problema para o tratamento da infeção, uma vez que as células podem abrigar o DNA integrado inativo durante um longo período [Payne, 2017]. Todavia para produzir ativamente o vírus, é necessária a presença de alguns fatores de transcrição celular, de todos o mais importante é o NF- κ B, que é ativado ao mesmo tempo que as células T [Hiscott *et al.*, 2001].

1.2.4. Transcrição, tradução e exportação do vírus do núcleo

Para o vírus se replicar, o DNA integrado é transcrito em mRNA e posteriormente sofre *splicing* dividindo-se em partes menores. Tal como acontece na importação nuclear o HIV, usa o mesmo mecanismo para a exportação nuclear dos fragmentos de mRNA e de mRNA para o citoplasma [Friedrich *et al.*, 2011]. Os fragmentos que sofrem *splicing* são exportados a partir do núcleo para o citoplasma, formando proteínas reguladoras (*Tat* e *Rev*) [Pollard & Mallin, 1998]. O *Tat* é o único fator de transcrição que é codificado pelo vírus HIV [Friedrich *et al.*, 2011]. A proteína de regulação *Tat* é o resultado da tradução dos fragmentos de mRNA que sofreram *splicing* e são responsáveis por estimular a produção de novos vírus. A ausência desta proteína vai diminuir o nível da transcrição no citoplasma, não permitindo a continuação do ciclo de replicação do vírus [Payne, 2017]. A proteína *Rev*, a medida que é sintetizada, vai ligar-se aos mRNAs virais que não sofreram *splicing*, permitindo que estes saiam do núcleo. Durante este processo, também são sintetizadas as proteínas estruturais *Gag* e *Env* [Pollard & Mallin, 1998].

1.3. Péptidos como fármacos anti-HIV

Como descrito anteriormente o HIV interage com as células-alvo a partir da gp41 e gp120. Estas proteínas são reconhecidas pelos co-receptores CCR5 e CXCR4, consideradas como os principais co-recetores responsáveis pela entrada do vírus nas células alvo [Krambovitis & Porichis, 2005]. O desenvolvimento de novas terapias e medicamentos para o tratamento da infeção do HIV é um processo contínuo [Payne, 2017]. As estratégias iniciais controlavam a doença, atacando a transcriptase reversa e a protéase, tentando impedir desta forma a transcrição do RNA em DNA e a maturação do

virião [Qian *et al*, 2013]. Atualmente os medicamentos que existem no mercado para o combate da infeção são desenvolvidos de forma direcionada. Isto é, tendo em conta as interações moleculares específicas necessárias de cada etapa do ciclo de replicação do vírus [Payne, 2017]. Contudo o foco deste trabalho não se encontra nos processos referidos acima, mas, sim no processo de entrada do vírus HIV nas células alvo, ou melhor, na forma como péptidos inibidores de fusão contrariam esta entrada do vírus nas células.

1.3.1. Estrutura da gp41 e gp120

Como descrito anteriormente, a glicoproteína do envelope viral *Env* é responsável pela fusão do vírus as membranas celulares das células-alvo. Esta posteriormente é sintetizada como gp160 que, quando clivada pela enzima protéase, forma uma subunidade transmembranar (gp41) e uma de superfície (gp120). Estas proteínas vão permanecer associadas não covalentemente, formando pontas triméricas à superfície dos viriões [Kim *et al.*, 2008].

Ligação do recetor

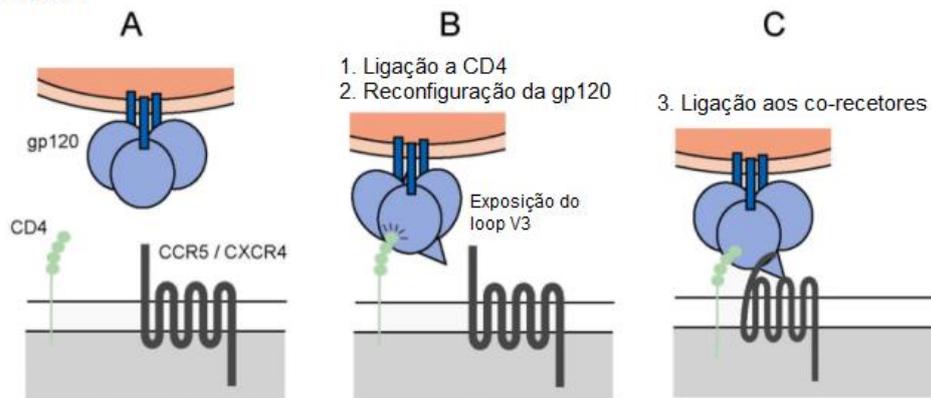


Figura 4- Mecanismo da ligação da gp41 e da gp120 aos co-recetores CCR5/CXCR4. (adaptado de Lobritz *et al.*, 2010)

A gp120, ao interagir com a célula-alvo, entra em contacto com o N-terminal do CD4. Esta interação resulta numa reconfiguração da gp120, expondo os locais de ligação seletivos para os co-recetores (CCR5 ou CXCR4) [Pancera *et al.*, 2009]. Os co-recetores realizam, ainda interações com o loop V3. A fusão com a membrana celular é mediada pela gp41, que é constituída por um ectodómio (ED), por um domínio transmembranar (TM) e por um domínio com uma longa cauda citoplasmática (CT). O ectodómio (ED) é responsável pela fusão, sendo constituído por um N- terminal, por um péptido de fusão

(FP), por uma região com dois motivos helicoidais de repetição (*heptad repeat*) de sete aminoácidos (HR1 e HR2), por o C-terminal e pela ansa de ligação de dissulfureto (DSL) [Kim *et al.*, 2008; Krambovitis *et al.*, 2005].

A ligação dos co-recetores à gp120 vai expor o péptido de fusão da gp41 que vai ser inserido na membrana celular levando a formação de uma dobra em forma de gancho nas subunidades da gp41 [Kim *et al.*, 2008]. Este processo vai ser mediado pelos domínios HR1 e HR2 criando um feixe de seis hélices energeticamente estáveis, quando o domínio HR2 antiparalelo se liga aos locais de ligação externos do domínio HR1 forma uma cadeia tripla em hélice [Lobritz *et al.*, 2010; Pancera *et al.*, 2009]. Este processo leva a fusão do vírus à membrana celular e a criação de poros na membrana da célula-alvo, permitindo a liberação da capsíde viral no citoplasma [Kim *et al.*, 2008]. Desta forma a inibição deste último passo evita a fusão do vírus as membranas celulares alvo e, conseqüentemente, a infecção. Assim, a vantagem de inibidores fusão será interferir nas etapas cruciais da replicação do vírus: a ligação viral, a ligação ao co-recetor, a fusão e a integração do genoma viral no genoma da célula alvo [Krambovitis *et al.*, 2005].

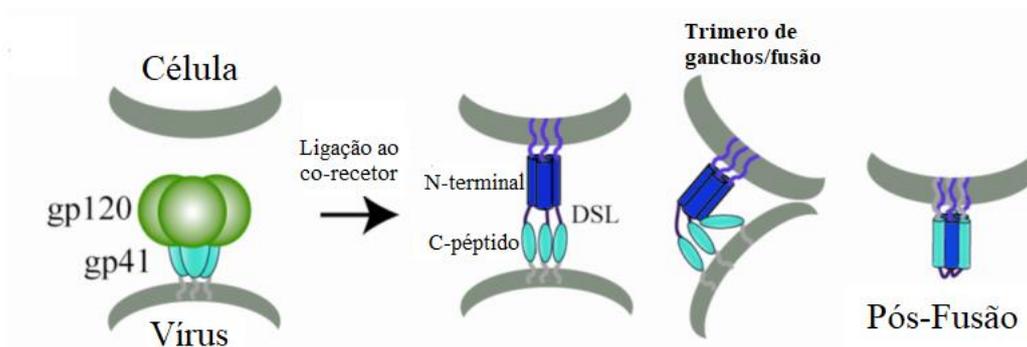


Figura 5- Modelo de fusão do HIV na membrana celular das células alvo. (adaptado de Kim *et al.*, 2008).

1.3.2. Péptidos inibidores de fusão

A descoberta dos principais mecanismos de entrada do vírus na célula-alvo revelou uma série de processos cruciais que poderiam vir a ser possíveis alvos farmacológicos. Os inibidores de entrada na célula do HIV podem dividir-se em três categorias, consoante a etapa da fusão que inibem. Desta maneira existem inibidores de ligação, que bloqueiam a ligação entre o envelope do HIV e as células CD4, inibidores dos co-recetores, que não permitem a ligação do vírus aos co-recetores (CCR5 ou CXCR4) e os inibidores de fusão, que impedem a entrada do núcleo viral no citoplasma da célula alvo [Lobritz *et al.*, 2010]. O HIV sofre diversas mutações o que leva ao

desenvolvimento de resistência para com os fármacos e, por consequência, a uma necessidade contínua de desenvolver novos métodos para combater a infecção de forma eficaz como, por exemplo, o tratamento com péptidos que já é um campo mais versátil e promissor [Shi *et al.*, 2016].

Um dos primeiros inibidores de fusão a serem aprovados pela FDA (*U. S. Food and Drug Agency*) para o tratamento do HIV, foi o Enfuvirtide (T-20), um péptido de 36 aminoácidos, que se liga ao *heptad repeat* do N-terminal (N-HR) da proteína gp41 do vírus [Shi *et al.*, 2016; Veiga *et al.*, 2004]. Apesar da sua eficácia como inibidor de fusão, da transcriptase reversa e da protéase existem atualmente estirpes do HIV que são resistentes ao T-20. Estas estirpes novas (V38A e N43D) apresentam mutações na gp41, [Naito *et al.*, 2010; Oishi *et al.*, 2010]. Portanto, são necessários novos inibidores de fusão que suprimam a entrada destas variantes resistentes ao T-20. Um dos primeiros péptidos desenvolvidos com este intuito foi o C34. O péptido C34 é um péptido inibidor de fusão derivado do *heptad repeat* do C-terminal (C-HR), têm aproximadamente dois terços da sequência do T-20 e estudos realizados indicam que este inibidor de fusão é mais eficiente *in vitro* que o T-20 [Naito *et al.*, 2010; Miyamoto & Kodama, 2012].

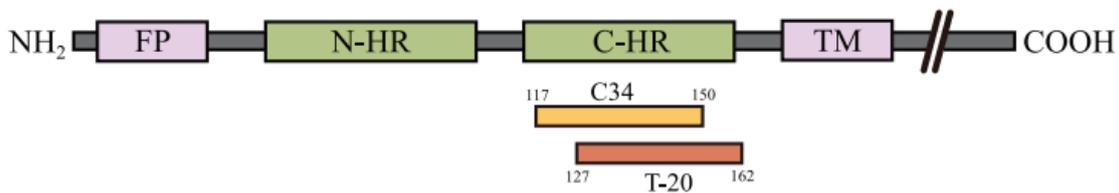


Figura 6- Diagrama esquemático da gp41 do HIV-1 e as sequências de péptidos derivadas do C-HR (adaptado de Naito *et al.*, 2010)

O péptido C34, ao contrário do péptido T-20, contém uma sequência PBD (*pocket binding domain*) na sua extremidade N-terminal essencial para interagir com os bolsos hidrofóbicos do núcleo trimérico do N-HR, resultando num aumento da potência do péptido como inibidor [Chan *et al.*, 1997; Chang & Hsu, 2007; Mo *et al.*, 2004]. Apesar dos péptidos T-20 e C34 partilharem 24 aminoácidos idênticos o C34, ao contrário do T-20, inibe a fusão do vírus a membrana celular hospedeira e, conseqüentemente não permite a formação de um feixe helicoidal de seis hélices (6HB) [Liu *et al.*, 2007]. O 6HB apresenta uma estrutura cristalina com três péptidos com hélices N que se associam com três péptidos com hélice C, adotando uma configuração anti-paralela nos bolsos hidrofóbicos. Em cada um dos bolsos existe uma cavidade hidrofóbica profunda

altamente conservada na região do N-HR, sendo crítica para a fusão e estabilidade viral da HB, interagindo com um domínio de ligação complementar presente nos péptidos C. Este feixe é altamente termoestável e pode ser reconhecido por anticorpos monoclonais [Liu *et al.*, 2005]. Desta maneira, um aspecto crítico para a inibição da fusão é a tendência do núcleo N-HR formar uma hélice tripla estável e a capacidade dos péptidos assumirem uma estrutura helicoidal estável. Porém, nem o péptido T-20 nem o C34 apresentam uma estrutura completamente helicoidal [Otaka *et al.*, 2002].

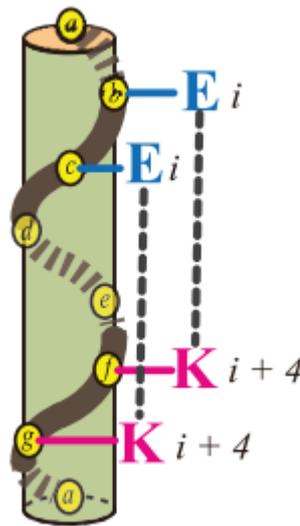


Figura 7- O design do conceito do heptad repeat (adaptado de Naito *et al.*, 2010)

Análogos do C34 (Tabela 1), foram desta forma projetados electrostaticamente substituindo aminoácidos que resultaram em derivados altamente solúveis, ativos e com maior helicidade. Substituíram-se, então os aminoácidos no local de acesso ao solvente do feixe helicoidal com glutamato (E) e lisina (K) e foram mantidos no local interativo (local crítico para a interação com o N-HR). Os resíduos aminoácidos foram então separados, no *heptad repeat* da α -hélice, por três posições (i vs $i+4$) [Naito *et al.*, 2010]. O péptido SC34, é um exemplo em estudo, que por meio de interações eletrostáticas entre os substituintes de glutamato e de lisina nas posições da interação com o solvente anteriormente referidas do péptido C34, conferiram ao péptido uma maior solubilidade e helicidade [Shimura *et al.*, 2010]. Foram, também, introduzidos motivos EK consecutivos, separados por três resíduos, onde E foi substituído nas posições i e $i+1$ e K foi substituído nas posições $i+4$ e $i+5$ no local de acesso do solvente do péptido C34. Isto resultou em repetições de motivos do tipo: X-EE-XX-KK (X indica o aminoácido original

do HIV-1) [Naito *et al.*, 2010]. O péptido SC34EK apresenta dois motivos completos e três incompletos. De acordo com estudos realizados este apresenta uma boa atividade anti-HIV-1, uma maior estabilidade térmica no complexo N36/SC34EK e uma maior helicidade em comparação com o péptido C34 [Miyamoto & Kodama, 2012]. O SC34EK é ainda um inibidor promissor, devido a esta estabilidade térmica formada no complexo N36, uma vez que foi eficaz contra uma grande quantidade de estirpes resistentes de HIV-1, formando uma estrutura de cristal com o N36 que era praticamente idêntica à descrita para os péptidos do gp41 inativo [Nishikawa *et al.*, 2009].

Outro péptido em estudo é o SC35EK, que apresenta cinco repetições completas dos motivos EK [Naito *et al.*, 2010]. Este foi comparado com o péptido SC34EK em termos de atividade anti-HIV-1 e os estudos concluíram que apesar do péptido apresentar cinco repetições do motivo EK estes não são necessários para aumentar a atividade anti-HIV-1 [Miyamoto & Kodama, 2012]. Deste modo, para averiguar quantos motivos EK completos são necessários para influenciar a atividade antiviral do HIV foram sintetizados mais dois péptidos electrostaticamente (SC22EK e SC29EK). O péptido SC22EK apresenta três repetições completas do motivo EK enquanto o péptido SC29EK apresenta quatro repetições completas do motivo EK, ambos são derivados do péptido SC34EK [Naito *et al.*, 2010]. Estudos realizados demonstraram que o péptido SC22EK apresenta uma atividade inibitória menor contra as estirpes resistentes do T-20 em comparação com o SC29EK e o SC34EK [Miyamoto & Kodama, 2012]. Outras investigações, concluíram que o péptido SC29EK perante mutações virais novas (E43K/E49A, Q39R/N43K/N126K, eN43K/E49A/N126K) diminuíram a resistência e a estabilidade de ligação do péptido a membrana celular alvo [Wu *et al.*, 2018].

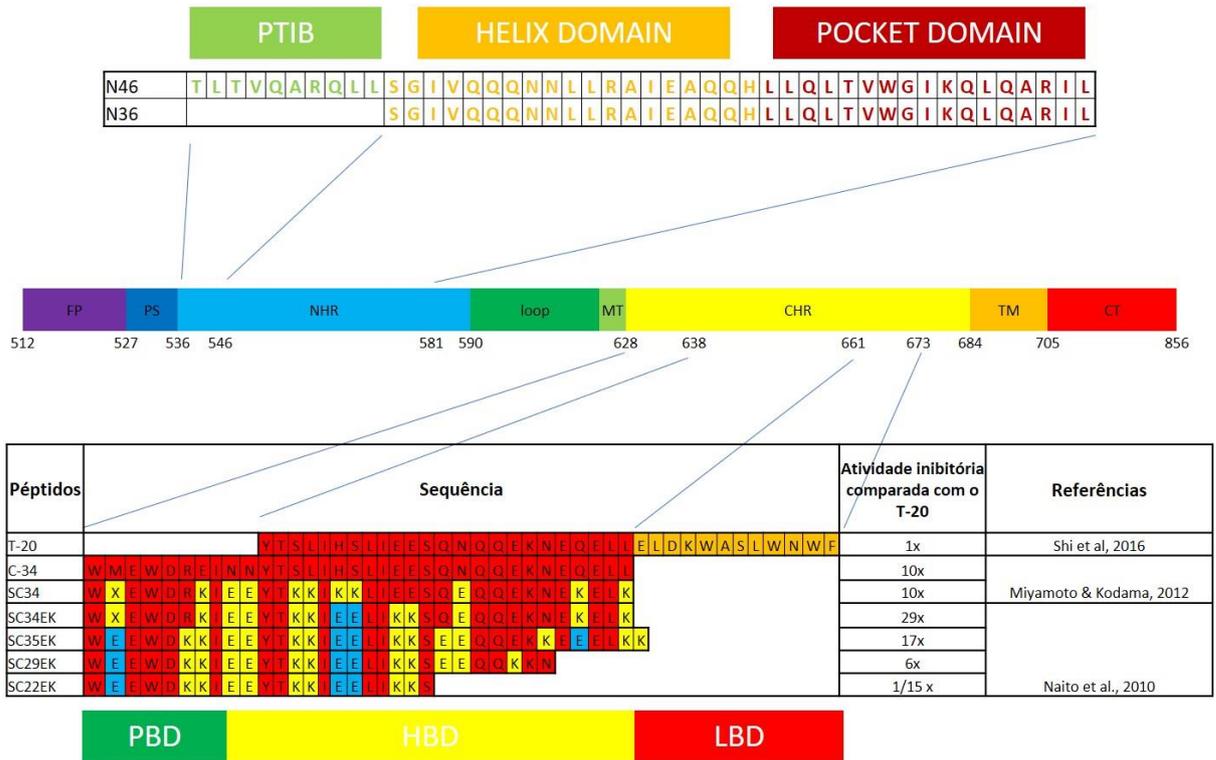


Figura 8- Sequências de resíduos de aminoácidos dos péptidos usados utilizados no estudo de inibição do HIV. As partes da sequência a vermelho correspondem às sequências PDB, á azul encontram-se os resíduos de glutamato e a amarelo os resíduos de lisina (X=NLE).

2. Membranas Celulares

A membrana celular é uma membrana biológica que constitui a fronteira entre as células e o seu exterior (membrana plasmática e citoplasmática). Delimita as células procarióticas e eucarióticas, vegetais e animais assim como os seus organitos/organelos [Gennis, 1989]. Nas células eucarióticas permite também o suporte do citoesqueleto que dá forma à célula, e a ligação à matriz extracelular e a outras células permitindo a formação de tecidos [Moreira, 2014]. Desta forma, as membranas celulares são consideradas a base da evolução das primeiras formas de vida.

Estas são responsáveis por funções essenciais celulares como a comunicação com o meio ambiente, o transporte de moléculas e certas funções [Yeagle, 2016]. Assim, o funcionamento de qualquer ser abarca processos que envolvem as membranas, tais como a biossíntese de proteínas, secreção de proteínas, bioenergética e respostas hormonais [Gennis, 1989]. Apesar do princípio estrutural ser basicamente igual para todas as membranas, elas não o são, existindo assim uma diversidade de membranas que se distinguem pela compreensão da sua base biológica e molecular. Assim, modelos membranares são com frequência desenhados com o intuito de imitar as propriedades das membranas, minimizando as variáveis e facilitando o estudo.

2.1. Perspetiva histórica

Os primeiros registos que se obtêm da história das membranas remontam para o século XVII quando Robert Hooke, em 1665, examinou uma estrutura fina de cortiça através de um microscópio e observou apenas um padrão de caixas retangulares (paredes celulares rígidas) [Harold, 2015]. Em 1895, Ernest Overton propôs a hipótese de as células serem revestidas por lípidos, uma vez que a permeabilidade de uma membrana está diretamente correlacionada com a solubilidade das partículas que a atravessam (teoria da permeabilidade das células) [Kleinzeller, 1997]. Em 1917, Inving Langmuir observou que os lípidos se encontram distribuídos numa monocamada a superfície da água, com os grupos hidrofílicos em contacto com a fase aquosa e também foi possível calcular pela primeira vez a área por lípido na monocamada [Yeagle, 2016].

O primeiro modelo da estrutura da membrana celular foi proposto em 1925 por Gorter e Grendel, extraindo lípidos de eritrócitos humanos e cinco outras membranas de eritrócitos de mamíferos com um solvente orgânico [Gorter & Grendel, 1925]. O objetivo

era compararem a área superficial calculada da célula dos resultados obtidos com a área superfície de uma monocamada de Langmuir. Os resultados mostraram que os lípidos dos eritrócitos cobriram o dobro da área da superfície correspondente à área total da membrana plasmática, o que os levou a propor que a membrana plasmática seria uma bicamada plasmática [Lombard, 2014; Yeagle, 2016].

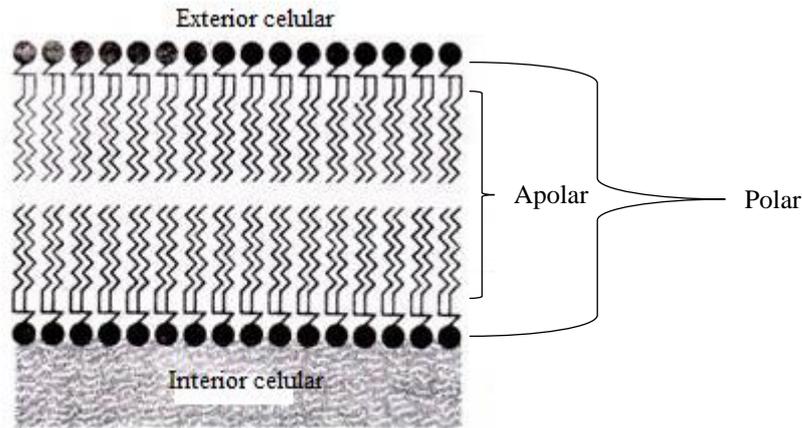


Figura 9- Modelo membranar proposto por Groter e Grendel em 1925. (adaptado de <http://www.biologydiscussion.com/cell-biology/plasma-membrane-organization-function-and-specialization/3751>).

Nos anos 1930, Davson e Danielli criaram um modelo onde se incorporava pela primeira vez as proteínas. Segundo o modelo “paucimolecular” as proteínas revestiam a superfície de ambos os lados da bicamada lipídica, como uma “sandwich” [Davson & Danielli, 1935]. Este modelo, foi alvo de debate devida a permeabilidade da membrana e a hipótese de algumas proteínas conseguirem atravessar a membrana lipídica. Mesmo assim, este modelo foi a base de muitos outros modelos, por mais de 30 anos, e apoiado, pelo menos parcialmente, por algumas evidencias de suporte, como estudos de polarização de luz e de difração de raios-X [Lombard, 2014; Yeagle, 2016].

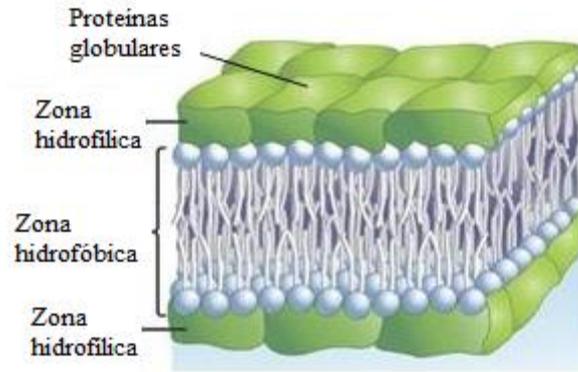


Figura 10- Modelo "paucimolecular" proposto por Davson e Danielli em 1935 (adaptado de <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/membranes.htm>)

Em 1972, Singer e Nicolson apresentaram o seu modelo de estrutura membranar, o modelo do mosaico fluído [Singer & Nicolson, 1972]. De acordo com este modelo, a bicamada lipídica apresenta partes hidrofílicas orientadas para o exterior e partes hidrofóbicas no interior da bicamada, as proteínas podem interagir com as partes hidrofóbicas dos lípidos e podem se encontrar a superfície, parcialmente ou totalmente integradas na bicamada [Lombard, 2014]. De uma maneira geral, tanto as proteínas como os lípidos estão livres para difundir na bicamada, o que implica uma organização mais aleatória do que as dos modelos anteriormente defendidos.

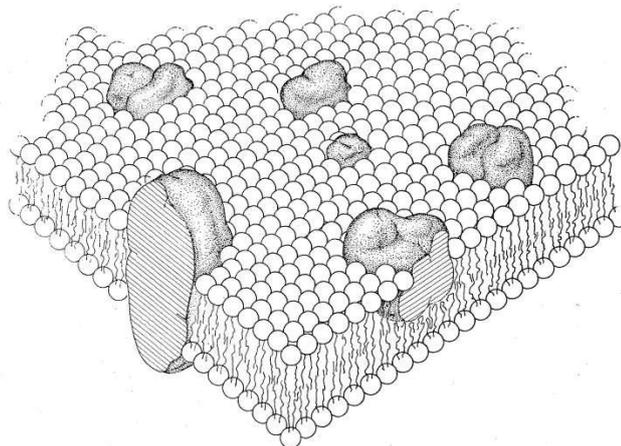


Figura 11- Modelo original proposto por Singer e Nicolson em 1972. Neste corte seccional da membrana celular os corpos com as superfícies cortadas representam proteínas membranares integradas rearranjadas aleatoriamente na superfície da membrana. Estão também representadas algumas proteínas integrais das membranas de complexos membranares específicos. A figura representa as proteínas integradas na membrana numa fase completamente fluída da bicamada lipídica. (adaptado de Nicholson & Singer, 1972).

Este modelo foi apoiado por diferentes estudos, como estudos de permeabilidade e transporte de proteínas transmembranares [Mitchel, 1957], estudos que demonstravam a falta de lípidos para formar bicamadas completas, logo existindo proteínas no plano membranar, por estudos de congelamento e imagens de microscopia elétrica que sugeriam a presença de proteínas dentro das membranas [Brandon, 1966] e por estudos de previsão favoráveis para as proteínas de membrana [Moor, 1963]. Por outro lado, o modelo do mosaico fluído apresenta várias imprecisões devido a sua simplicidade. Contudo as suas imperfeições foram ainda mais influentes e destacadas, como em termos termodinâmicos [Tanford, 1973], pelo modelo ser intrinsecamente fluído [Singer, 1974] e pela assimetria das membranas [Singer & Nicolson, 1972].

No início dos anos 90 Kusumi propôs o modelo de “barreira esqueleto-membranar” [Kusumi, *et al.*, 1993; Kusumi & Sako, 1996] com base nos estudos feitos anteriormente sobre a fraca mobilidade de glicoproteínas de membrana [Damjanovich, *et al.*, 1995; Edidin, *et al.*, 1994]. Este modelo referenciava a existência de uma malha, usada para explicar as restrições dos movimentos de difusão da proteína. Já nos finais da década de 90, em 1997, Simons e Ikonen publicaram o modelo de jangada lipídica, onde propõem a existência de domínios, ricos em colesterol, esfingolípidos e proteínas [Simons & Ikonen, 1997], domínios estes que vieram demonstrar ser a chave de muitos processos fundamentais de mamíferos [Brown & London, 1997; Edidin, 2003; Simons & Vaz, 2004].

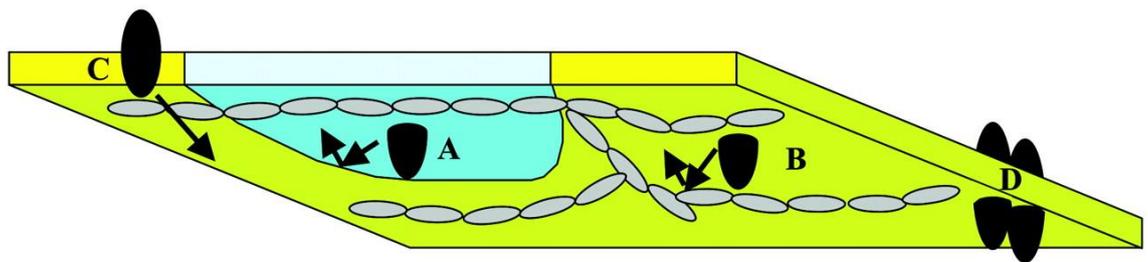


Figura 12- Modelo proposto por Vereb onde (A): microdomínios lipídicos, (B e C): citoesqueleto e (D):proteínas integradas(adaptado de Vereb *et al.*, 2003)

Em 2003, Vereb e colaboradores introduziram uma nova ideia, propondo uma versão modificada do modelo de mosaico fluído de Singer-Nicholson, o modelo de mosaico dinamicamente estruturado. Este modelo defende que não são apenas as interações lípido-lípido, proteína-proteína ou lípido-proteína que tem as forças necessárias para a formação e manutenção destes domínios, mas que também existem

fatores extra membranares como o citoesqueleto e a matriz extracelular, descrevendo mais realisticamente as biomembranas [Vereb *et al.*, 2003].

2.2. Estrutura e composição das membranas

As membranas biológicas são fluídas, que compartimentalizam diferentes compartimentos e são essenciais para a proteção das células. Estes têm um papel fundamental como centros organizadores de tarefas para o metabolismo e a sinalização celular, sendo constituídas por proteínas e lípidos [Jacobson & Lagerholm, 2019; Martínez-Ballesta & Carvajal, 2016]. A estrutura da membrana é determinada pela natureza anfipática dos lípidos constituintes das membranas. Anfipático designa que os lípidos de membrana contem uma região hidrofílica (polar), esta em contacto com o meio aquoso, e uma região hidrofóbica (apolar), que é mais estável num ambiente lipídico. Estas moléculas em contacto com um meio aquoso, alteram espontaneamente a sua estrutura, formando pequenas esferas de camada dupla (lipossomas) [Watson, 2015].

A maior parte da massa de uma membrana biológica é composta por proteínas e lípidos. As proteínas são os componentes bioquimicamente mais ativos da membrana, providenciam a catálise de reações, medeiam o curso de nutrientes e de metabolitos e participam na comunicação entre os meios intra e extra celulares. As zonas apolares destas moléculas interagem com a zona hidrofóbica da membrana e a zona polar com grupos polares dos lípidos. Desta maneira consoante esse tipo de interação as proteínas serão transmembranares ou periféricas [Gennis, 1989; Voet & Judith, 2012]. Os lípidos, por sua vez, têm a função de formar a uma matriz estrutural lipídica com a qual as proteínas interagem [Gennis, 1989]. A razão entre a massa de lípidos e a massa de proteínas nas membranas plasmáticas é aproximadamente 1, sendo que a razão se altera em membranas especializadas (2:3). No entanto, outros constituintes das membranas biológicas como os glúcidos representam menos de 10% da massa das membranas e geralmente estão agregados a componentes lipídicos ou proteicos [Guidotti, 1972]. Esta grande diversidade de proporções de moléculas de lípidos e proteínas complica o estudo da relação composição e funcionalidade celular. Desta forma, o trabalho aqui desenvolvido visa descomplicar estas relações de maneira a melhorar a nossa compreensão da dinâmica das membranas.

2.2.1. Estrutura e propriedades dos lípidos de membrana

Os principais lípidos de membrana são os fosfolípidos (PL), os glicolípidos (GL), esfingolípidos (SL) e os esteróis. Os fosfolípidos constituem a maior parte da matriz lipídica, apresentam uma espinha dorsal hidrofóbica que é essencialmente constituída por duas cadeias de ácidos gordos longos (sn-1 e sn-2) ligados a uma molécula de glicerol ou esfingosina e a um grupo fosfato [Watson, 2015; Olsson & Salem, 1997]. Os fosfolípidos ligados a uma molécula de glicerol são referidos como glicerolfosfolípidos ou glicerofosfolípidos (GPL), o mais comum que é encontrado na membrana biológica é a fosfatidilcolina (PC), possuem uma molécula de colina ligada ao grupo fosfato. Existem também outros glicerolfosfolípidos como a fosfatidilserina (PS) e a fosfatidiletanolamina (PE) que apresentam em vez de uma molécula de colina uma molécula de serina e etanolamina, respetivamente ligada ao grupo fosfato [Casares *et al.*, 2019; Watson, 2015]. Em mamíferos, as membranas plasmáticas são mais ricas em fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) na monocamada interior do que na exterior [de Kroon *et al.*, 2013]. Estas diferentes classes de glicerolfosfolípidos apresentam diferentes formas geométricas globais, devido às suas propriedades inerentes, como o tamanho do grupo da cabeça polar e o comprimento e/ou saturação das caudas das cadeias acilo, influenciando as propriedades físicas da membrana [Casares *et al.*, 2019; Zwaal *et al.*, 1977]. Dado isto, apresentam comprimentos variáveis, normalmente dependente do sistema, mas variam entre C14 e C22 [Olsson & Salem, 1997]. O nível de insaturação das cadeias acilo difere entre os diferentes lípidos existindo casos sem insaturações, como as Esfingomielinas (SM), outros podem ter várias ligações duplas, como o DOPC (dioleil-fosfatidilcolina), embora cadeias saturadas também sejam frequentes, como no caso do DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina). Por fim existem aqueles com a composição assimétrica. O POPC (1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina), que apresenta uma composição assimétrica em cada cadeia: sn-1 cadeia acilo saturada e sn-2 cadeia acilo com uma insaturação entre o C24 e C25 (Figura 13). Esta ligação dupla, na insaturação da cadeia, mantém a fluidez da membrana [McElhaney, 1982; Lewis *et al.*, 1988].

Os esfingolípidos são os segundos lípidos estruturais mais abundantes. Estes são fosfolípidos ou glicolípidos que possuem um grupo polar e uma cadeia longa apolar, apresentam na sua constituição uma molécula de esfingosina ou um seu derivado e uma molécula de ácidos gordos [Bartke & Hannun, 2008; Casares *et al.*, 2019]. A

esfingomiéline (SM) são os esfingolípidos mais abundantes das membranas dos mamíferos, originada pela união da ceramida com a fosfatidilcolina. A fração de fosfolípidos na membrana plasmática é cerca de 2% a 15% [Casares *et al.*, 2019]. Os glicolípidos por seu lado contêm sempre um açúcar, como a glicose, no lugar do grupo fosfato [Watson, 2015].

Algumas das propriedades dos lípidos podem ser deduzidas a partir das dimensões das cabeças polares e a relação destas com as caudas apolares. Os agregados podem assumir várias formas que podem ser previstas por um parâmetro que relaciona as partes polares e as partes apolares dos lípidos, o parâmetro crítico de empacotamento (PCE):

$$PCE = \frac{v_c}{a \times l_c} \quad (1)$$

onde é v_c o volume das cadeias hidrofóbicas, l_c o comprimento das cadeias e a é a área ocupada pela cabeça polar do lípido [Vaz, 2008]. Assim, sistemas com $PCE < \frac{1}{3}$ tenderão a formar micelas normais com curvaturas positivas, sistemas com $PCE \sim 1$ estruturas em bicamada e com $PCE > 1$ formar-se-ão micelas invertidas. Os glicerofosfolípidos com cabeça polar de fosfatidilcolina (PC) é uma classe estrutural de grande importância, pois mostram tendência a formas bicamadas planas sendo as cabeças polares resultantes volumosas ($PCE \sim 1$) [Marsh, 2007].

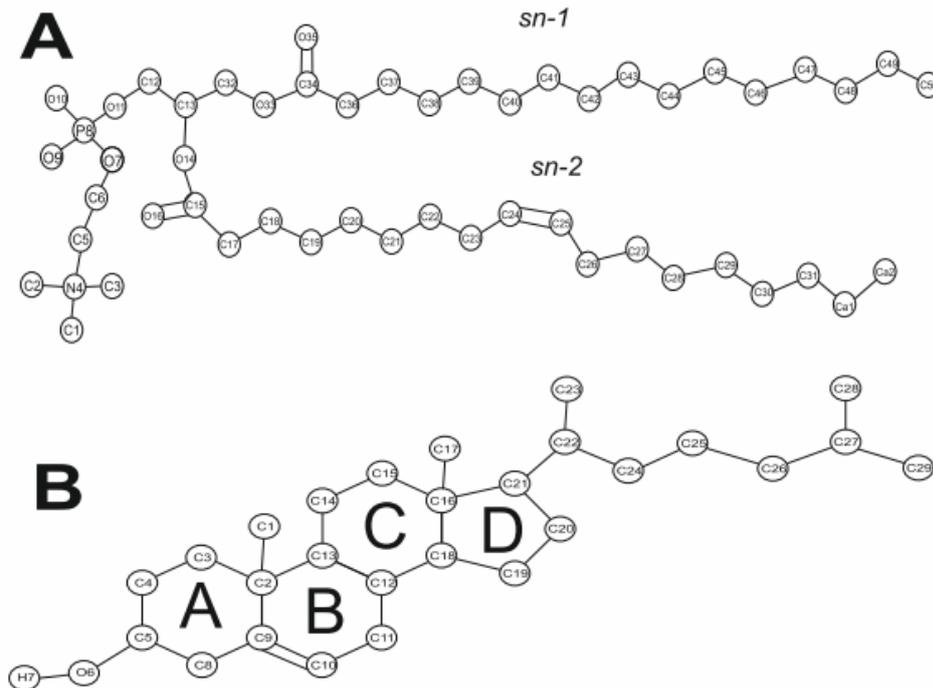


Figura 13-(A) modelo estrutural de uma molécula de POPC. (B) modelo da estrutura de uma molécula de colesterol (adaptado de Martins do Canto et al., 2012)

2.2.2. Colesterol

O colesterol é um esteroide muito abundante nas membranas plasmáticas dos mamíferos, não se encontrando nas células dos procariontes [Berg *et al*, 2002; Casares *et al.*, 2019]. Cerca de 90% do colesterol celular encontra-se na membrana plasmática, representando um total de 40% do total dos lípidos na membrana [Golusko & Nowicki, 2005; van Meer & de Kroon, 2010]. Este também é abundante nas lipoproteínas do plasma sanguíneo onde cerca de 70% do colesterol é esterificado por ácidos gordos de cadeia longa para formar ésteres de colesterol [Voet & Judith, 2012]. O colesterol é responsável pela viabilidade e a proliferação das células, bem como pela sua influência na determinação das propriedades físicas das membranas: fluidez, ordenação da cadeia lipídica, rigidez e permeabilidade [Gennis, 1989; Golusko & Nowicki, 2005; Yeagle, 2016].

O colesterol tem uma estrutura bastante diferente dos fosfolípidos e dos glicolípidos, apresentando um grupo hidroxilo (região hidrofílica da cabeça) e uma estrutura esteroide de quatro anéis e uma cadeia lateral curta de hidrocarboneto [Watson, 2015]. Os quatro anéis de carbono estão representados na figura 13, como A, B, C e D. Enquanto os anéis A, B e C são constituídos por seis carbonos o anel D apenas contém

cinco carbonos, constituem a espinha dorsal e apresentam uma conformação predominante plana (anel A pode adotar outro tipo de conformação) e rígida, responsável pela suas capacidades de ordenação. Os anéis AB e CD estão localizados no mesmo plano esteroide apresentam dois grupos metilo que expandem a funcionalidade da espinha dorsal. [Martinez-Seara, 2008; Róg *et al.*, 2007; Yeagle, 2016]. A cadeia lateral do hidrocarboneto está ligada ao anel D, esta exibe uma considerável flexibilidade conformacional devido as rotações das ligações simples carbono-carbono. [Yeagle, 2016]. O grupo hidroxilo, por sua vez, está ligado ao anel A da molécula, interagindo com a “cabeça” dos grupos fosfolipídicos próximos [Berg, 2002]. Para além deste sistema de anéis, o colesterol possui um comportamento hidrofílico, proporcionado pelo grupo 3 β -hidroxilo no anel A. 3 β -hidroxilo é um grupo apolar este é capaz de doar e/ou aceitar ligações de hidrogénio das moléculas de água, sendo desta maneira responsável pela orientação do colesterol na bicamada [Martinez-Seara, 2008; Yeagle, 2016].

O colesterol, a semelhança dos outros lípidos de membrana, é uma molécula anfipática. Esta característica faz com que o sistema de anéis do colesterol se oriente paralelamente ao longo do eixo das cadeias de hidrocarbonetos e perpendicularmente à superfície da bicamada lipídica. O colesterol é altamente hidrofóbico sendo que é altamente insolúvel em água [Yeagle, 2016]. A espinha dorsal do colesterol favorece, também a interação com os esfingolípido. Estes dois combinados foram o elemento básico das jangadas lipídicas [Casares *et al.*, 2019].

2.3. Termodinâmica das membranas lipídicas

O estudo do comportamento de fase das membranas biológicas está condicionado à variedade de moléculas presentes na composição da membrana, tornando esta tarefa um tanto quanto complexa. Desta forma podemos estudar o comportamento de fases das bicamadas lipídicas. Estas variam a sua fase consoante a temperatura, pH, força iónica, presença de iões polivalentes, pressão, hidratação, o comprimento das cadeias hidrocarboneto e a composição da “cabeça” do lípido [Kranenburg & Smit, 2005; Feigensohn, 2009].

A fase mais comum para os fosfolípidos é o subgel (L_c), a baixas temperaturas onde as cadeias de hidrocarbonetos se encontram extremamente ordenada [Kranenburg & Smit, 2005]. No entanto as bicamadas lipídicas puras geralmente mostram a existência de

duas fases mesomórficas: a fase líquida (L_{α}) e em estado gel (L_{β}). O estado de gel surge com o aquecimento da fase de subgel, a bicamada encontra-se mais hidratada e as cadeias de hidrocarbonetos mais ordenadas, correspondendo a uma configuração *trans*. Dependente da composição estrutural da cabeça lipídica a fase de gel pode ser designada por L_{β} , para as fosfatidiletanoaminas ou L_{β}' , para as fosfoatidilcolinas. A temperaturas mais elevadas encontra-se então a fase líquida, onde as cadeias de hidrocarbonetos se encontram desordenadas e apresentam uma desordem bi-dimensional. A fase líquida é considerada a fase mais importante das três [Gennis, 1979; Kranenburg & Smit, 2005]. Na fase de gel as cadeias acilo encontram-se o mais estendidas possível, logo a sua espessura e a sua densidade são maiores que na fase líquida [Gennis, 1979]. No entanto, a fase de gel mostra coeficientes de difusão lateral, coeficientes de difusão rotacional e áreas por lípido menores que na fase líquida [Dimova *et al.*, 2000; Sugar & Biltonen, 2005]. A transição entre o estado líquido e o estado de gel é designada por transição de fase. A transição de fase ocorre a uma temperatura média (T_M) que pode ser influenciada pelo comprimento das cadeias de hidrocarbonatos, quanto mais longa for a cadeia maior é a T_M necessária para a transição [Yeagle, 2016].

A adição do colesterol a bicamadas lipídicas vai induzir profundas modificações no comportamento de fase das bicamadas lipídicas. O principal efeito é o aparecimento de uma nova fase, estado líquido ordenado (L_o), entre a fase fluída e a fase de gel [de Meyer & Smit, 2009]. A presença da parte rígida esteroide da molécula de colesterol ordena as cadeias acilo dos lípidos em torno de si mesma [Yeagle, 2016], induzindo o efeito de condensação da bicamada lipídica em fase fluída. No entanto, ao se adicionar as moléculas de colesterol a uma bicamada em fase gel estas irão induzir a fluidez desta membrana [Kuo & Wade, 1979]. Em relação à fase L_{α} , a fase L_o continua fluída, os componentes da membrana apresentam difusão lateral, no entanto torna-se mais rígida, ordenada, espessa e menos permeável [Demel, *et al.*, 1972; Hui & He, 1983; Needham, *et al.*, 1988], sendo considerada uma fase líquida ordenada.

2.4. Jangadas lipídicas

As membranas plasmáticas são lateralmente heterogéneas, apresentam uma composição lipídica variável e, consequentemente apresentam propriedades físico-

químicas diferentes. A esta heterogeneidade lateral no plano da membrana dá-se o nome de jangadas lipídicas [Simons & Vaz, 2004].

O primeiro método a definir bioquimicamente as jangadas lipídicas foi feito a partir da extração por Triton X-100 a 4° C, um detergente não iónico [Pike, 2008]. Pelas descrições iniciais feitas, das jangadas lipídicas, observou-se que o colesterol, os esfingolípido e uma classe específica de proteínas formavam complexos insolúveis [Golusko & Nowicki, 2005]. Há que denotar que visão inicial da estrutura estável ligada por interações lípido-lípido foi entre 100 a 500 nm de diâmetro [Pike, 2008]. Desta maneira, as membranas plasmáticas podem ser separadas em frações distintas, como membranas solúveis aos detergentes (DSM) ou como membranas resistentes a detergentes (DRM), sendo que esta última fração ainda pode ser denominada de membrana enriquecida com glicosfingolípido (GEM) ou por fração insolúvel em Triton (TIF) [Golusko & Nowicki, 2005; Sezgin *et al.*, 2017]. O nome jangadas lipídicas foi implementado por Ikonen e Simons em 1997 que propuseram a existência de domínios funcionais líquidos ordenados (jangadas lipídicas) ricos em lípidos de alto ponto de fusão e colesterol rodeado por uma fase fluida mais desordenada composta por lípidos de baixo ponto de fusão [Simons & Ikonen, 1997]. Estudos posteriores revelaram que as DRM's apenas apareciam em misturas de esfingolípido, fosfatidilcolinas (de baixa T_m) e colesterol quando os níveis de esfingolípido estavam suficientemente altos para formar a fase L_o , coexistindo com a fase L_α [Ahmed *et al.*, 1997; London, 2015].

As jangadas lipídicas têm dimensões muito pequenas (nano-escala) o que torna o seu estudo complexo, mas qualquer que seja o seu tamanho, estudos indicam que estes domínios apresentam algumas proteínas [Rajendran & Simons, 2005]. As pesquisas realizadas ainda constataram que para as jangadas lipídicas se envolverem na função membranar precisam de se agrupar, existindo ainda evidências crescentes que as monocamadas de cima e de baixo estão acopladas em jangadas [Gri *et al.*, 2004]. Mais de 100 proteínas foram sugeridas e associadas, desde a sua descoberta, a jangadas lipídicas [Chatterjee & Mayor, 2001]. As proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), proteínas G heterotriméricas, quinases duplamente aciladas da família *Src* e proteínas ligadas ao colesterol (*caveolae*) tem atraído uma grande parte dos investigadores, [Golusko & Nowicki, 2005; Rajendran & Simons, 2005; Simons & Toomre, 2000] existem diversas outras proteínas que têm sido associada a jangadas lipídicas, como proteínas palmitoiladas e miristoiladas, tais como flotilinas e algumas

proteínas transmembranares. Ainda não está claro o facto de algumas proteínas membranares estarem incluídas nas jangadas lipídicas, no entanto estudos realizados, por investigadores, indicam que na membrana externa (exoplasmática) os aminoácidos são indispensáveis [Simons & Toomre, 2000].

As GPI estão ancoradas à monocamada exterior da membrana e expressam modificações hidrofóbicas, o que lhes permite dividirem-se em jangadas graças ao seu empacotamento preferencial das membranas saturadas [Chatterjee & Mayor, 2001; Simons & Toomre, 2000]. Desta maneira as GPI contêm lípidos saturados com fragmentos de ancoragem que melhor se encaixam num ambiente lipídico ordenado, como as das jangadas lipídicas [Schroeder *et al.*, 1994]. Estas foram as primeiras proteínas identificadas em membranas resistentes a detergentes por *Western Blotting* [Pike, 2008]. Por outro lado, temos as *caveolae* que resultam de invaginações da membrana plasmática por polimerização de caveolinas (proteínas integrais da membrana) [Simons & Toomre, 2000]. Estudos indicam que estas participam na endocitose [Parton & Richards, 2003]. A superexpressão destas proteínas nas células, como linfócitos e células neuronais, sem *caveolae* leva a formação de cavéolas. Estas desintegram-se quando existe uma rutura direcionada da caveolina 1, formando proteínas não-caveolares. Um exemplo de proteínas não-caveolares são as flotilinas, que se localizam em microdomínios e são responsáveis por organizar as jangadas lipídicas [Rajendran & Simons, 2005].

As jangadas lipídicas estão envolvidas na transdução de sinal, como por exemplo na sinalização da imunoglobulina E [Sheets *et al.*, 1999], do recetor do antigénio das células T [Janes *et al.*, 2000] do recetor do antigénio das células B [Gupta & DeFranco, 2007] e do recetor de EGF [Coskun *et al.*, 2011]. As jangadas lipídicas ainda têm sido consideradas importantes em outros processos celulares além dos já referenciados como na segregação lateral de componentes celulares, na seleção de proteínas, e na resposta imunológica [Simons & Ehehelt, 2002].

O estudo das jangadas lipídicas continua a ser bastante complexo, devido a falta de visualização direta das membranas em células vivas não perturbadas, bem como dissecar as propriedades físicas destas no ambiente celular. Os modelos computacionais acabaram por comprovar que a compartimentação temporal (milissegundos) e espacial (nanométrica) das moléculas das membranas é crucial para a função membranar. Os avanços tecnológicos nos últimos anos, na área da microscopia, permitem atualmente uma observação direta dos processos celulares que ocorrem com os regimes espaciais e

temporais, diminuindo então o problema da observação das células *in vivo*. No entanto outros problemas prevalecem como a controvérsia sobre a organização e dinâmica das membranas, e a formação das jangadas lipídicas e as suas propriedades biofísicas [Sezgin *et al.*, 2017].

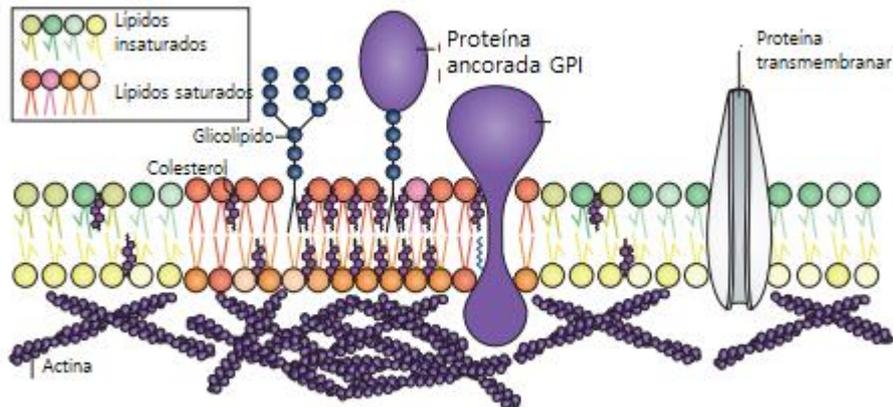


Figura 14- Visão geral da heterogeneidade lateral na membrana plasmática, jangadas lipídicas. (adaptado de Sezgin *et al.*, 2017).

3. Simulação computacional: Dinâmica molecular

A ciência requer tanto observação como compreensão. Sem a primeira não existem fatos para serem compreendidos, e sem compreensão à ciência é apenas documentação. A compreensão tem como base fundamentos teóricos escritos numa linguagem científica, a matemática. Estes fundamentos teóricos são hipóteses, e quanto menor o número maior será o poder de previsão desta linguagem [Rapaport, 2004]. Desta maneira, nas últimas décadas ocorreram grandes avanços tecnológicos que proporcionam o uso de métodos numéricos aplicados a sistemas de múltiplas variáveis utilizadas em diversas áreas da ciência, através da simulação computacional.

A dinâmica molecular (MD) é, a um nível atômico, um método, que se baseia nas equações de movimento de Newton. Desta maneira as condições iniciais como as posições, as velocidades e as forças entre partículas são especificadas antecipadamente de maneira a que o sistema de simulação esteja próximo do estado de equilíbrio. Na simulação os componentes do sistema interagem uns com os outros durante um período de tempo, enquanto as suas propriedades físicas são monitorizadas (volume, pressão, temperatura, número de partículas, velocidade e posições) [Zheng, 2008]. É considerada uma das técnicas mais versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas [Namba *et al.*, 2008]. A primeira vez que este método foi apresentado foi por Alder e Wainwright nos finais da década de 50 [Alder & Wainwright, 1959] e consistiu na simulação de um sistema de esferas rígidas com choque elástico representativas das interações atômicas. Em 1971 foi realizada a primeira simulação de água [Rahman & Stiling, 1971]. Sete anos mais tarde, McCammon reportou a primeira simulação MD de uma proteína pancreática bovina [McCammon *et al.*, 1977]. Estudos mais recentes realizados por Ogata e colaboradores utilizaram a MD para estudar a fotossíntese II [Ogata *et al.*, 2013]. Desde as primeiras simulações os computadores tornaram-se mais rápidos em várias áreas, desde os algoritmos aos campos de força, e hoje em dia as simulações podem ser aplicadas a sistemas maiores e mais complexos em soluções aquosas [Norberg & Nilsson, 2003].

O interesse, atualmente, nas simulações em dinâmica molecular aumentou em várias áreas, como na académica e industrial (nanoescala) [Kim *et al.*, 2019]. As simulações em MD têm sido usadas para dar vida as estruturas biomoléculas, para fornecer médias térmicas de propriedades moleculares, como calcular propriedades gerais de fluidos, para calcular a energia livre do sistema nos processos químicos e para explorar termicamente as conformações moleculares complexas [Hansson *et al.*, 2002]. Assim a

MD tornou-se uma das técnicas modernas mais utilizadas na ciência. Uma técnica bastante poderosa que se apresenta como solução para os problemas clássicos em diferentes contextos ao nível atómico, uma vez que não existem abordagens alternativas capazes de lidar com estes problemas ao detalhe exigido [Rapaport, 2004]. Nesta dissertação, utilizamos as simulações de MD para estudar as propriedades físicas de péptidos inibidores de fusão do HIV a interagir com bicamadas lipídicas.

3.1. Campo de forças

Um campo de forças consiste numa expressão matemática, que descreve a dependência energética dos (micro-) estados (mecânicos) das partículas de um sistema (coordenadas e velocidades), escolhida para modelar a energia potencial (U) e os seus parâmetros associados [González, 2011; Monticelli & Tieleman, 2012]. Os parâmetros associados são obtidos por cálculos de mecânica quântica *ab initio*, semi-empíricos ou com um ajuste aos resultados experimentais (ex: Ressonância Magnética Nuclear RMN, infravermelho, etc.) [González, 2011]. Um campo de forças pode ser atomístico ou grosseiro (*coarse-grained*). Tal como o nome indica, um campo de forças atomístico descreve as interações entre todos os átomos, enquanto o segundo tem o princípio de associar vários átomos em grupo mantendo as propriedades físicas fundamentais subjacentes. Embora o rigor do campo de força atomístico seja maior, este requer mais recursos computacionais, o que por vezes se torna dispendioso à escala monetária e temporal. Assim, uma abordagem *coarse-grained* pode ser utilizada combinando os dois tipos de abordagens [Marrink, *et al.*, 2009]. Um exemplo disso é o campo de força de átomos unidos (UA), usado durante a realização de todo este trabalho, onde os átomos de hidrogénio m ligações pouco polares (por exemplo: em grupo hidroxilo (OH) o H é explícito), são incorporados ao átomo ao qual se encontram ligados (átomos de carbono alifáticos), atuando como um só [Berendsen, 2007].

Existem diversos fatores que podem influenciar a escolha do campo de forças adequado à simulação a efetuar e devem ser tidos em conta, tais como as propriedades que estão na base da parametrização do campo de força ou o equilíbrio entre os recursos computacionais e a qualidade dos resultados. A exatidão e a qualidade com que se consegue reproduzir um determinado conjunto de resultados de qualquer sistema são os pontos chave para a escolha adequada de um campo de força. Para o estudo de sistemas

biológicos existem uma série de campos de força que podem ser utilizados, como CHARMM [Brooks, *et al.*, 1983; Mackerell, *et al.*, 1998], o GROMOS [van Gunsteren & Berendsen, 1987; van Gunsteren, *et al.*, 1998], OPLS [Jorgensen, *et al.*, 1984; Jorgensen & Tirado-Rives, 1988] e o AMBER [Cornell & Keniry, 1983; Weiner, *et al.*, 1984].

Existem cinco termos para descrever a maioria dos campos de força, termos que estão associados à deformação da ligação e à geometria angular das ligações covalentes, mais concretamente ao alongamento de ligações e aos ângulos de flexão, termos associados à rotação dos ângulos diédricos (torções) e os termos que descrevem as interações quando os átomos se sobrepõem (forças de van der Waals) [Monticelli & Tieleman, 2012] Estas duas forças são aplicáveis a todos os pares de átomos, menos a átomos dentro da mesma molécula, que estão separados por três ou menos ligações [Schlick, 2010]. A maioria dos campos de força utiliza a expressão (2) para calcular energia potencial descrita por todos os componentes dos sistemas:

$$U = U_{\text{ligação}} + U_{\text{ângulos}} + U_{\text{torções}} + U_{\text{vdw}} + U_{\text{coul}} \quad (2)$$

No entanto garantir a parametrização destes termos não é fácil e muitas vezes recorre-se a procedimentos que têm vindo a ser desenvolvidos a fim de atribuir a cada átomo ou grupo de átomos cargas parciais, variando o seu valor, dependendo do método utilizado. Em simulação de sistemas biológicos o campo de força utilizado tem de ser flexível e simples, tendo a seguinte forma funcional:

$$U = \sum \text{ligações} \frac{k_l^b}{2} (r_i - r_i^{eq})^2 + \sum \text{ângulos} \frac{k_i^\alpha}{2} (\theta_i - \theta_i^{eq})^2 + \sum \text{torções} \sum n k_{\phi,n} (1 + \cos n\phi - \phi^{ref}) + \sum \text{pares} \left(\left\{ \frac{c_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{c_{ij}^{(16)}}{r_{ij}^{16}} \right\}_{vdw} + \left\{ k_e \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right\}_{coul} \right) \quad (3)$$

As contribuições das ligações e dos ângulos são descritas como um conjunto de átomos que se mantém unido por forças elásticas simples (harmónicas), ou seja, o campo de forças substitui o verdadeiro potencial por um modelo simplificado na simulação [González, 2011]. O termo torsional (diedro) é normalmente representado por uma função periódica, numa série de co-senos. Em certos casos é necessário um termo adicional a equação para garantir a planaridade de alguns grupos particulares, como anéis aromáticos

e carbonos numa conformação sp^2 , que vai contribuir positivamente para os movimentos fora do plano [Berendsen, 2007]. O termo das forças de van der Waals são representadas por funções 12-6 de Lennard-Jones (LJ) [Monticelli & Tieleman, 2012]. As interações de van der Waals surgem em átomos ou grupos de átomos aos pares, cujo quadrado aumenta com o quadrado do número total de partículas, sendo o potencial 12-6 de Lennard-Jones frequentemente utilizado para representar estas interações [González, 2011]. Existem outros potenciais que podem ser usados, como o potencial de Buckingham que é preferencialmente utilizado para estudos de cristais de moléculas orgânicos [Berendsen, 2007]. Por fim as contribuições eletrostáticas regidas pelas forças de Coulomb de longo alcance (Coul) são fáceis de calcular e agem diretamente no núcleo dos átomos [Monticelli & Tieleman, 2012]. No entanto a conjugação da interação de todos estes termos confere uma das grandes limitações à técnica de simulação devido ao tempo que demora a aplicação a todas as partículas dos sistemas biológicos a simular [Loura & Almeida, 2004].

3.2. Algoritmos

3.2.1. Passo de integração e restrições

Para que a simulação a decorrer tenha o *ensemble* correto é necessário escolher corretamente tanto o algoritmo de integração como o campo de força. Muitos algoritmos têm vindo a ser desenvolvidos, visto que este é a ferramenta integradora das equações do movimento. O algoritmo de integração (ou integrador) permite a resolução, pelo uso de técnicas numéricas simples, das equações do movimento de cada partícula num sistema a ser simulado. O algoritmo de integração permite gerar uma nova configuração no momento $t+\Delta t$, em que Δt é o passo de tempo (passo de integração), a partir de um conjunto de posições, velocidades, a um determinado tempo t [Loura & Almeida, 2004; Rapaport, 2004].

A escolha do algoritmo depende de propriedades como a reversibilidade do tempo [Tuckerman *et al.*, 1992] e a conservação da energia e dos momentos [Skeel, 1995; Hairer & Stoffer, 1997], têm de permitir ainda, passos de integração longos. Dois dos integradores mais amplamente utilizados na MD são conhecidos como “*leap-frog*” e método de Verlet [Verlet, 1967]. Estes são equivalentes algebricamente, produzindo coordenadas precisas para a terceira ordem em t , estão envolvidos na

conservação de energia e truncam o erro na quarta ordem, $O(\Delta t^4)$. [Rapaport, 2004]. O nome “*leapfrog*” advém das coordenadas e as velocidades serem avaliadas em tempos diferentes. Este método pode ser reformulado e alterado algebricamente, de maneira a que as coordenadas e as velocidades sejam avaliadas ao mesmo tempo, evitando os ajustes de velocidade [Rapaport, 2004]. No entanto, este algoritmo não permite um cálculo preciso da energia total do sistema, uma vez que não são calculadas as posições e as velocidades de sistema em estudo sem que haja a posição e velocidade do mesmo ponto, o que é uma limitação do integrador, não conhecendo, assim, a energia total do sistema visto que a energia cinética e potencial são conhecidas em tempos diferentes [Loura & Almeida, 2004]. Nesta dissertação foi usado o algoritmo de “*leap-frog*” [Hockney, 1970] que pode ser descrito da seguinte forma:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t \times v(t + \frac{1}{2}\Delta t) \quad (4)$$

$$v = (t + \frac{1}{2}\Delta t) = v(t - \frac{1}{2}\Delta t) + \Delta t \times a(t) \quad (5)$$

Onde Δt é o intervalo de tempo entre os instantes consecutivos que constituem a trajetória da simulação [Rapaport, 2004]. Para a escolha do intervalo de tempo correta é necessário um compromisso, ou seja, a fiabilidade do método está ligada ao tamanho de Δt escolhido [González, 2011]. Por um lado, um valor de Δt curto requer um número mais longo de interações para satisfazer a amostragem, apesar de melhorar a precisão da solução numérica da equação (3). Por outro um Δt mais longo pode resultar em trajetórias imprecisas ou erradas e em instabilidades numéricas nas posições e velocidades, que levam a uma instabilidade na energia total do sistema, o que em sistemas isolados deve ser conservada [González, 2011]. Face ao mencionado anteriormente, como solução para ambos os problemas, o passo de tempo é normalmente definido para 1/10 do período menor. Na prática, o limite é aproximadamente 1-2fs, sendo que neste trabalho, devido as dimensões do sistema, foi escolhido 2fs como passo de integração. Todavia, o algoritmo utilizado neste trabalho é bastante robusto, permitindo a utilização de valores de Δt maiores do que na maioria dos outros métodos de integração [Frenkel & Smit, 2002].

Os sistemas biológicos abrangem diferentes escalas de tempo, o que apesar dos sistemas estarem acoplados, os seus processos biológicos mais relevantes são pouco influenciados por movimentos de alta frequência, com as vibrações de moléculas em

cadeia longa [Allen & Tildesley, 2017; Berendsen, 1998]. Assim, estes efeitos têm de ser limitados e tratados adequadamente na dinâmica molecular clássica, no entanto estes são mal descritos neste contexto [Schlick, 2010]. Para ultrapassar estes problemas, os movimentos mais rápidos são de alguma maneira restringidos. Existem várias maneiras de restringir os movimentos, desde assumir a rigidez total de uma molécula (possibilidade extrema), a um método mais usual como o constrangimento holonómico [Allen & Tildesley, 2017]. O método de restrição de constrangimentos holonómicos consiste num conjunto de equações algébricas que conectam as coordenadas de todas as moléculas, onde é possível construir um conjunto de coordenadas generalizadas que obedecem as equações de movimento livres sob restrições [Berendsen, 2007]. Este método é geralmente utilizado para a fixação de comprimentos de ligações covalentes e ângulos de flexão [Allen & Tildesley, 2017]. Uma restrição holonómica de um comprimento de ligação pode ser dada por:

$$(r_i - r_j)^2 - d_{ij}^2 = 0 \quad (6)$$

Onde d_{ij} é a distância entre os átomos ou grupo de átomos i e j [Memon *et al.*, 1981]. Existem vários métodos para aplicar estas restrições, o mais utilizado é o método SHAKE. O método SHAKE proposto por Ryckaert, Ciccotti e Berendsen resolve sequencialmente cada restrição de um modo iterativo, até se atingir um nível determinado de tolerância [Ryckaert *et al.*, 1977]. Outro método de restrição é o SETTLE, que é amplamente utilizado para moléculas de pequenas dimensões, como por exemplo para a água [Miyamoto *et al.*, 1992]. Existe também métodos que resolvem iterativamente todos os constrangimentos simultaneamente por aplicação de correções para os comprimentos e velocidades até a tolerância que se pretende, como o caso do LINCS [Hess *et al.*, 1997]. Este é cerca de três ou quatro vezes mais rápido, exhibe um melhor comportamento de convergência e pode ser mais facilmente paralelizado do que o algoritmo SHAKE [Hess *et al.*, 1997]. Neste trabalho utilizou-se os algoritmos SETTLE para as moléculas de água do sistema e o algoritmo LINCS para todas as outras ligações.

3.2.2. Condições de fronteira e interações de longo alcance

As condições de fronteira são necessárias para definir um problema e de grande importância nas simulações de dinâmica molecular [Koshizuka *et al.*, 2018]. Em simulações, se tomarmos como exemplo que os sistemas são constituídos normalmente

por 10^2 - 10^6 partículas, sendo este número insignificante, comparado com o número de átomos em sistemas macroscópicos. Ocorre uma discrepância entre o número de partículas na superfície do sistema em comparação com o sistema macroscópico, levando a ocorrência de efeitos de fronteira indesejáveis [Namba *et al.*, 2008]. Desta forma, há que ter um cuidado especial com as partículas colocadas perto dos limites da caixa de simulação, particularmente em sistemas de pequenas dimensões [Leach, 2001].

Para minimizar estes efeitos de superfície, este problema pode ser tratado por condições de fronteira periódicas (PBC) [Allen & Tildesley, 1990]. Nesta técnica os átomos são reproduzidos numa caixa de simulação em todas as direções, de maneira a que as coordenadas dos átomos nas caixas de imagem possam ser facilmente obtidas por subtração ou a adição de múltiplos inteiros dos vetores da caixa [Namba *et al.*, 2008]. Desta forma as condições de fronteira periódicas vão evitar os efeitos de fronteira indesejados.

É de referir que as PBC apresentam limitações. Se o tamanho da caixa de simulação tiver dimensões suficientemente grandes, estes efeitos não são importantes, mas há que ter atenção as interações de longo alcance. No entanto se tivermos perante um sistema desordenado e a distância de correlação for maior que o tamanho da caixa as condições periódicas podem alterar artificialmente as propriedades em estudo e o comportamento do sistema [González, 2011; Leach, 2001]. As interações de longo alcance, por definição, estendem-se por todo o sistema e exigem inerentemente um esforço computacional, $O(N_m^2)$, impedindo o tratamento de sistemas com grandes dimensões diretamente [Rapaport, 2004].

As interações de longo alcance são complexas e difíceis de calcular. Nestas as interações de van der Waals ($1/r^6$) decaem rapidamente e as interações de Columb entre cargas, decaem lentamente ($1/r$), estendendo-se por toda a caixa de simulação [Monticelli & Tieleman, 2012]. Uma alternativa simples é usar o método do campo de reação, que consiste na utilização de raios de corte (*cutoffs*), de modo a que apenas os pares dentro de um determinado *cutoff* sejam considerados [González, 2011]. O uso de *cutoffs* só é válido se a interação com as partículas fora do *cutoff* for zero, contudo, na prática, isto só é parcialmente verificado para as interações de van der Walls, porque as forças de Coulomb decaem lentamente com a distância, como anteriormente referido, de modo a que a quantidade de artifícios de cálculo das interações de Coulomb, com *cutoffs*, seja grande [Baumketner & Shea, 2005; Patra *et al.*, 2004; Patra *et al.*, 2005]. Na prática, verifica-se

que pelo uso de *cutoffs* no tratamento das interações de Coulomb, na melhor das hipóteses, produz resultados qualitativamente corretos, mas interfere na estrutura final dos péptidos, o que leva a que as suas estruturas estejam incorretas e não representem, realisticamente, os péptidos em solução [Martins do Canto *et al.*, 2008].

A existência destes artifícios provenientes dos *cutoffs* levou ao desenvolvimento de abordagens alternativas capazes de lidar com estes problemas de maneira eficiente [Rapaport, 2004]. A maior parte das abordagens desenvolvidas advém da técnica de Ewald [Ewald, 1921], este método foi desenvolvido para o estudo de cristais iónicos, onde predominam as interações eletrostáticas de longo alcance. Esta técnica consiste em reinscrever o potencial de interação como a soma de dois termos tornando a soma absolutamente convergente [Rapaport, 2004]. Na sua forma original este método escala segundo $O(N^2)$ e corrige muitos artifícios observados durante a utilização de *cutoffs* [Leach, 2001].

O problema das interações de Coulomb pode ser, também contornado pela utilização de métodos derivados das somas de Ewald, como P3M (Particle-Particle- Particle Mesh Ewald) [Hockney & Eastwood, 1981], PME (Particle Mesh Ewald) [Darden *et al.*, 1993] e pelo SPME (Smooth Particles Mesh Ewald) [Essmann *et al.*, 1995]. Neste trabalho utilizou-se o método de PME, que é considerado um dos métodos mais fiáveis para simular membranas [Patra *et al.*, 2003; Róg *et al.*, 2003].

3.2.3. Ensembles

Ao conjunto de configurações e propriedades mantidas constantes durante a integração das equações de Newton e que representam o estado do sistema, é chamado de *ensemble* [Allen & Tildesley, 2017]. O *ensemble* nas simulações de MD podem ser microcanónico ou NVE (número de partículas, volume e temperatura constantes), canónico ou NVT (número de partículas, volume e temperatura constantes), grand canónico ou μ VT (potencial químico, volume e temperatura constantes) e isotérmico-isobárico ou NPT (número de partículas, pressão e temperatura constantes) [Allen & Tildesley, 2017; Berendsen, 2007; Huang, 1987].

A temperatura macroscópica de um sistema está diretamente ligada à energia cinética do mesmo, para que seja possível alterar a temperatura modificando velocidade dos átomos. Uma maneira simples de fazer estas modificações à temperatura é pelo

escalamento de velocidades. O escalamento das velocidades é feito por um fator de escala $(c_T) = \sqrt{T_0/T(t)}$, onde T_0 é a temperatura desejada e $T(t)$ é a temperatura instantânea do sistema [González, 2011]. Contudo, aparecem transferências de energia rápidas e outros artifícios, como o bombeamento artificial de energia para modos de baixa frequência [Harvey *et al.*, 1998]. Outra maneira de controlar a temperatura é através do acoplamento do sistema a um banho térmico, em sistemas de acoplamento fraco [González, 2011]. O algoritmo de Berendsen [Berendsen *et al.*, 1984], proporciona um relaxamento exponencial da temperatura em direção ao valor de referência. Assim, o fator de escala (c_T) é dado por:

$$c_T = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T(t)} - 1 \right)} \quad (7)$$

Onde τ_T é a constante de acoplamento da temperatura. Desta forma, quanto maior τ_T mais fraco é o acoplamento ao banho. Para o menor valor possível a $\tau = \Delta t$, ou seja, a expressão é equivalente a forçar a temperatura a ser constante [Berendsen, 2007]. Contudo este método não permite reproduzir o *ensemble* correto, podendo afetar a dinâmica do sistema quando são usados pequenos valores de temperatura [González, 2011]. O problema deste algoritmo pode ser superado pelo uso de um método mais rigoroso, Nosé-Hoover [Hoover, 1985; Nosé, 1984]. Este método demonstra um *ensemble* canónico correto, não produzindo efeitos graves sobre a dinâmica molecular.

Para a pressão as abordagens utilizadas são semelhantes às da temperatura [González, 2011]. Para o controlo da pressão as variáveis da temperatura são substituídas por pressão, e a escala de velocidade dos átomos é substituída pelas coordenadas atómicas [Namba *et al.*, 2008]. Para um esquema de acoplamento fraco, como foi mostrado para a temperatura, é também possível para a pressão constante com o auxílio de uma escala de coordenadas. Desta forma, escalando as coordenadas de todas as partículas e o tamanho da caixa, $r_{nova} = \chi \times r_{anterior}$, é possível expressar o fator de escala das coordenadas (χ) da seguinte forma [Berendsen, 2007]:

$$\chi = \sqrt[3]{1 + \frac{\Delta t}{\tau_p} \beta (P - P_0)} \quad (8)$$

Onde β é a compressibilidade isotérmica do sistema e τ_p é a constante de acoplamento da pressão. Este acoplamento fraco tem a vantagem de dar respostas suaves, no entanto não consegue fornecer um ensemble conhecido e as flutuações não podem ser usadas [Berendesen, 2007]. Desta maneira, existem outros modos de controlo da pressão que reproduzem corretamente o *ensemble*, um destes exemplos é o algoritmo de Parrinello-Rahman [Parrinello-Rahman, 1981]. Este algoritmo apresenta um *ensemble* com a pressão fixa e a caixa de simulação consegue mudar a sua forma para obedecer a uma nova estrutura [Mártonak *et al*, 2003].

D. Metodologia

Os modelos iniciais dos péptidos (SC22EK, SC29EK, SC35EK, SC34EK, SC34 e C34) foram construídos com base na sua sequência de resíduos de aminoácidos, com o programa Arguslab 4.01 [Thompson,2004]. Para conhecer o comportamento dos péptidos em solução aquosa, os modelos peptídicos foram solvatados em caixas de simulação cúbicas com uma distância mínima entre os péptidos e as paredes da caixa de solvatação de 1nm, em água SPC [Berendsen,1981]. Esta distância mínima assegura que existe uma distância suficientemente grande para que não exista interação entre o péptido e as suas imagens periódicas (distancia entre cada modelo de moléculas do péptido e as paredes da caixa). Foi adicionado, também, a quantidade de moléculas de água necessárias para assegurar a completa hidratação de cada péptido em todos os sistemas [Kabsch & Sander, 1983].

O campo de forças usado para descrever todas as interações e as topologias dos modelos peptídicos foi um campo de forças do GROMACS (gmx), de átomos unidos (UA) (*united atoms force field*), que é um campo de forças modificado do GROMOS87. [Jorgensen *et al.*, 1983; Lui *et al.*, 1995; Van Buuren & Berendsen, 1993; Van Buuren *et al.*, 1993; Van Gunsteren & Berendsen, 1987; Van der Spoel *et al.*, 1996]. Desta maneira, os únicos átomos de hidrogénio que foram tratados explicitamente foram os hidrogénios polares do péptido e do colesterol nos sistemas de POPC:Chol (1:1).

Os modelos iniciais membranares (POPC-128 moléculas no total, apresenta duas monocamadas com 64 POPC's em cada, e POPC: Chol (1:1)- 240 moléculas no total, apresentam duas monocamadas com 60 POPC's e 60 Chol's em cada) foram contruídos com o auxílio de um conjunto de ferramentas do pacote de simulação GROMACS 2016 [Abraham *et al*, 2015; Bekker *et al.*, 1993; Berendsen *et al.*, 1995; Hess *et al.*, 2008; Lindahl *et al.*, 2001; van der Spoel *et al.*, 2005; Páll *et al.*, 2015; Pronk *et al.*, 2013;], este software também foi usado para realizar todas as simulações membranares. Os parâmetros ligantes e não ligantes das moléculas de POPC foram obtidos da página web do grupo Tieleman (<http://wcm.ucalgary.ca/tieleman/downloads>). Foram retirados, da referida página web, o pdb disponível de POPC que foi posteriormente modificado [do Canto *et al.*, 2016]. Enquanto que para as moléculas de colesterol foram obtidas da pagina web

(http://www.gromacs.org/Downloads_of_outdated_releases/User_contributions/Molecule_topologies) [Craven, 1979; Shien *et al.*, 1981].

Os sistemas membranares POPC, POPC:Chol (1:1) que foram simulados sem péptido, serviram para verificar as principais propriedades estruturais dos lípidos e das membranas, para efeitos de validação. Enquanto nos sistemas onde se simulou a interação entre a membrana e o péptido, o péptido foi adicionado à caixa de simulação do meio aquoso a uma distância da superfície da monocamada de cima entre 2,0-2,5 nm, paralelos a membrana.

Apos a inserção do péptido na caixa procedeu-se a uma solvatação com água SPC e foram adicionados iões de sódio (Na) aos sistemas de seguida, de maneira a que a carga total dos sistemas fosse zero. Todos os sistemas foram submetidos a uma minimização de energia, utilizando o algoritmo *steepest-descent*, para permitir que as moléculas de água SPC se ajustassem em redor do péptido e/ou da membrana fez-se uma pequena corrida de MD de 100ps. Por fim a simulação MD de produção, foi efetuada com um tempo de corrida de 200 ns para os sistemas de POPC em água, do péptido em água e de POPC integrado com o péptido, enquanto para os sistemas de POPC:Chol (1:1) em água e para o sistema de POPC:Chol com o péptido integrado, o tempo de corrida foi de 500 ns. Este passo de MD extenso foi realizado com um passo de integração de 2 fs, sendo as condições de simulação as mesmas para todos os sistemas: 1 bar de pressão e 300 K de temperatura, com o número de partículas constantes e usando condições de fronteira periódicas. Através dos esquemas de acoplamento fraco de Berendsen [Berendsen *et al.*, 1984] foi realizado o controlo da pressão e o *v-rescale* [Bussi *et al.*, 2007] para a temperatura, com tempos de acoplamento de 1,0 ps e 0,1 ps, respetivamente. O acoplamento da pressão nas simulações dos péptidos em água foi isotrópico e nas simulações com membranas o acoplamento foi semi-isotrópico. Para a água foi usado o algoritmo SETTLE [Miyamoto & Kollman, 1992] e para todas as outras ligações foi usado o algoritmo LINCS [Hess *et al.*, 1997], de maneira a que todas as ligações fossem restringidas aos seus valores de equilíbrio. Foi calculado pelo método de *Particle-Mesh-Ewald* (PME) [Essman *et al.*, 1995] as interações eletrostáticas de longo alcance. Para as interações de van der Waals e para a componente de espaço real da PME nas interações electrostáticas foi utilizado um *cutoff* de 1,0 nm.

A estrutura final de cada péptido em água foi utilizada, respetivamente, como a estrutura inicial das simulações em que o péptido interage com as membranas.

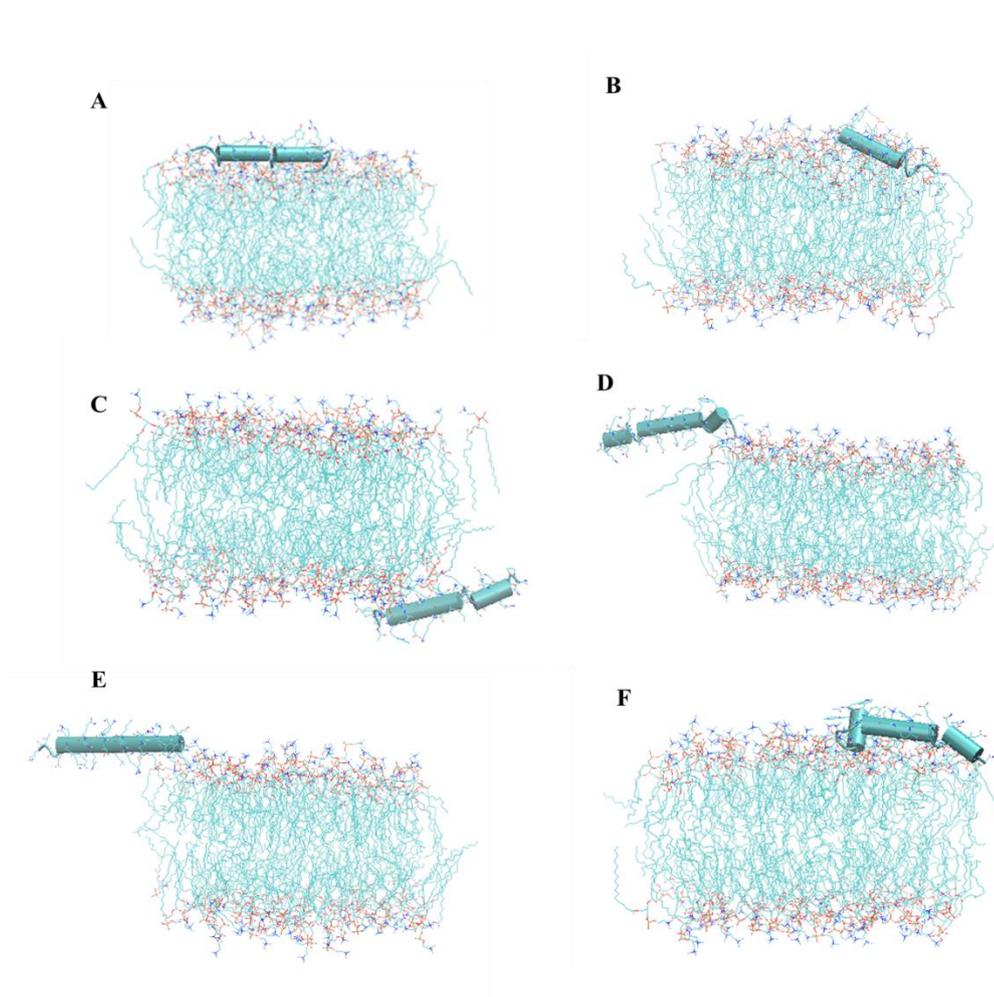


Figura 15- Snapshots dos modelos finais de POPC com as estruturas finais dos péptidos C34 (A), SC22EK (B), SC29EK (C), SC34 (D), SC34EK (E) e SC35EK (F) [VMD, 2019].

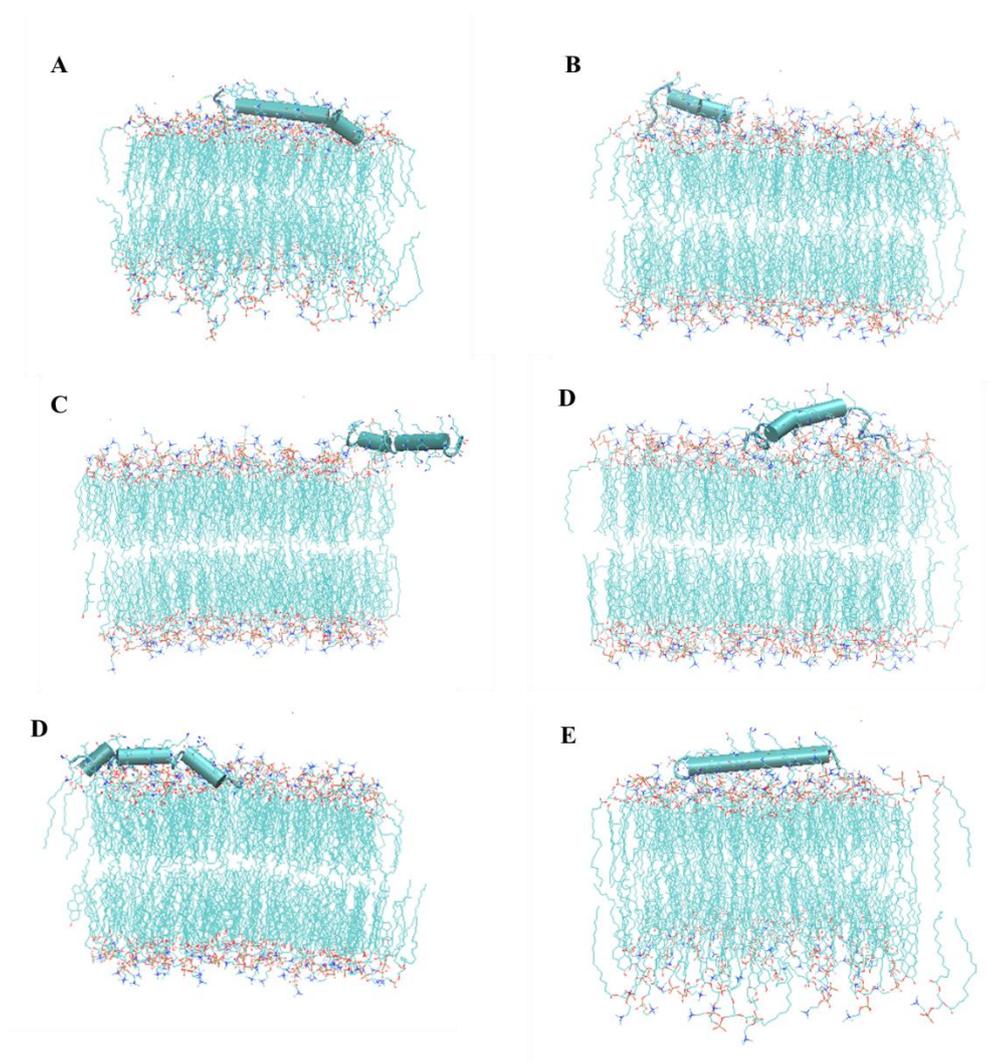


Figura 16- Snapshots dos modelos finais de POPC:Chol com as estruturas finais dos péptidos C34 (A), SC22EK (B), SC29EK (C), SC34 (D), SC34EK (E) e SC35EK (F) [VMD, 2019].

E. Resultados e Discussão

1. Equilibração dos sistemas membranares: área por lípido e colesterol e espessura de membrana

A área superficial entre cada lípido e o solvente foi calculada com dois intuitos: como critério de avaliação do estado da equilibração do sistema e o de avaliar a influencia das interações com o péptido neste parâmetro. Desta forma, para avaliar o processo de equilibração dos sistemas, as áreas por POPC (ApPOPC) e por colesterol (ApChol) foram calculadas a partir de um método usando a abordagem de Monte Carlo [Bois & Maszle, 1997]. Este método rege-se por átomos de referência dos lípidos, para o POPC os átomos P8, C6 e N4 e para o Chol os átomos o H7 e O6 (base na figura 13), para o cálculo das áreas superficiais. O método vai realizar uma regra de três simples para cada *frame* de cada lípido, com base nos átomos de referência seleccionados e os aleatórios adicionados pelo método. Para este cálculo foram usados os últimos 100 ns de cada simulação.

A estabilidade do sistema também foi verificada pela observação da espessura da membrana (MT) que foi por sua vez calculada pela distância média entre os fósforos (*P-P distance*) das monocamadas opostas [Martins do Canto *et al.*, 2013]. Para o cálculo das médias da espessura de membrana, à semelhança da área por lípido e colesterol, foram usados os últimos 100 ns.

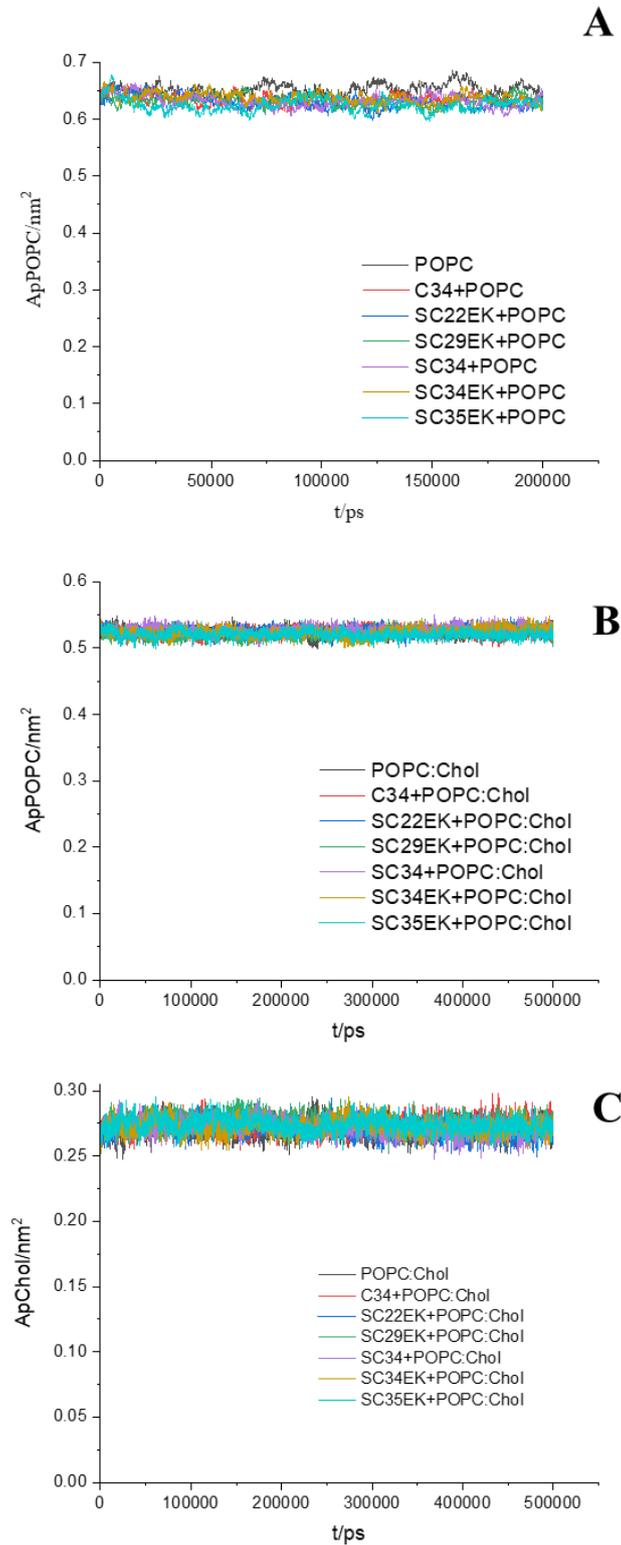


Figura 17- (A) Área por POPC nos sistemas de POPC ao longo do tempo de corrida. (B) Área por POPC nos sistemas de POPC:Chol ao longo do tempo de corrida. (C) Área por Chol nos sistemas de POPC:Chol ao longo do tempo de corrida.

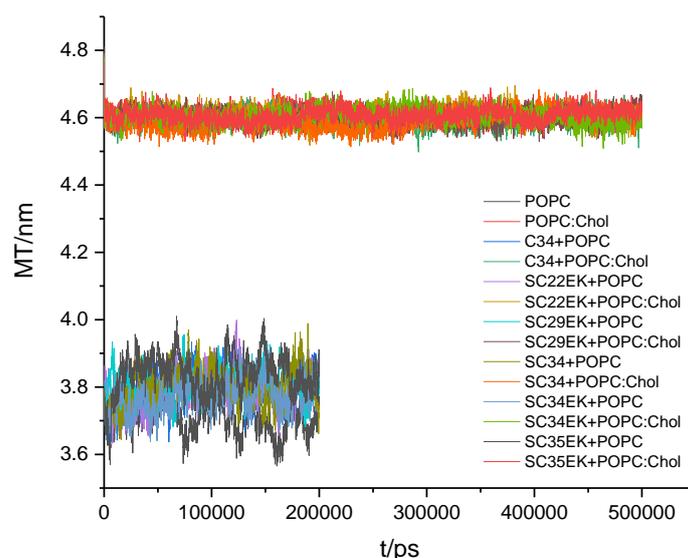


Figura 18- Espessura de membrana (nm) para todos os sistemas ao longo do tempo de corrida.

Com base na observação dos gráficos acima (Figura 17) constatamos que as áreas de POPC nos sistemas sem colesterol oscilam mais do que os sistemas onde o colesterol está presente. Contudo as dos sistemas com colesterol apresentam variações de área por POPC menores ($\approx 0,5 \text{ nm}^2$) que os sistemas sem colesterol presente ($\approx 0,6 \text{ nm}^2$). Pela figura 18, observa-se que os sistemas com colesterol apresentam espessuras de membrana mais altas e com menos oscilação de valores de espessura de membrana que os sistemas sem colesterol. Em suma, face aos gráficos da área superficial e da espessura de membrana apresentados conclui-se que o colesterol confere mais estabilidade as membranas. A área por lípido é um parâmetro que converge lentamente numa simulação de MD, mas os valores médios ficaram estáveis após 20–50 ns da simulação, o que nos levou à conclusão de que os sistemas simulados já haviam atingido um estado estacionário após esse período.

2. Comportamento geral dos péptidos

2.1. Distância do centro de massa dos péptidos a superfície das membranas

Na configuração inicial todos os péptidos (C34, SC34, SC34EK, SC22EK, SC29EK e SC35EK) foram colocados a $\geq 2,0 \text{ nm}$ da superfície da membrana. Com o intuito de

observar o comportamento geral dos péptidos em cada sistema, foi determinada a distância do centro de massa dos péptidos à superfície das membranas. Para tal fez-se a diferença entre a posição do centro de massa do péptido e a posição média, z , dos átomos de fósforo de todos os POPC na monocamada de cima dos sistemas membranares [Martins do Canto *et al.*, 2012].

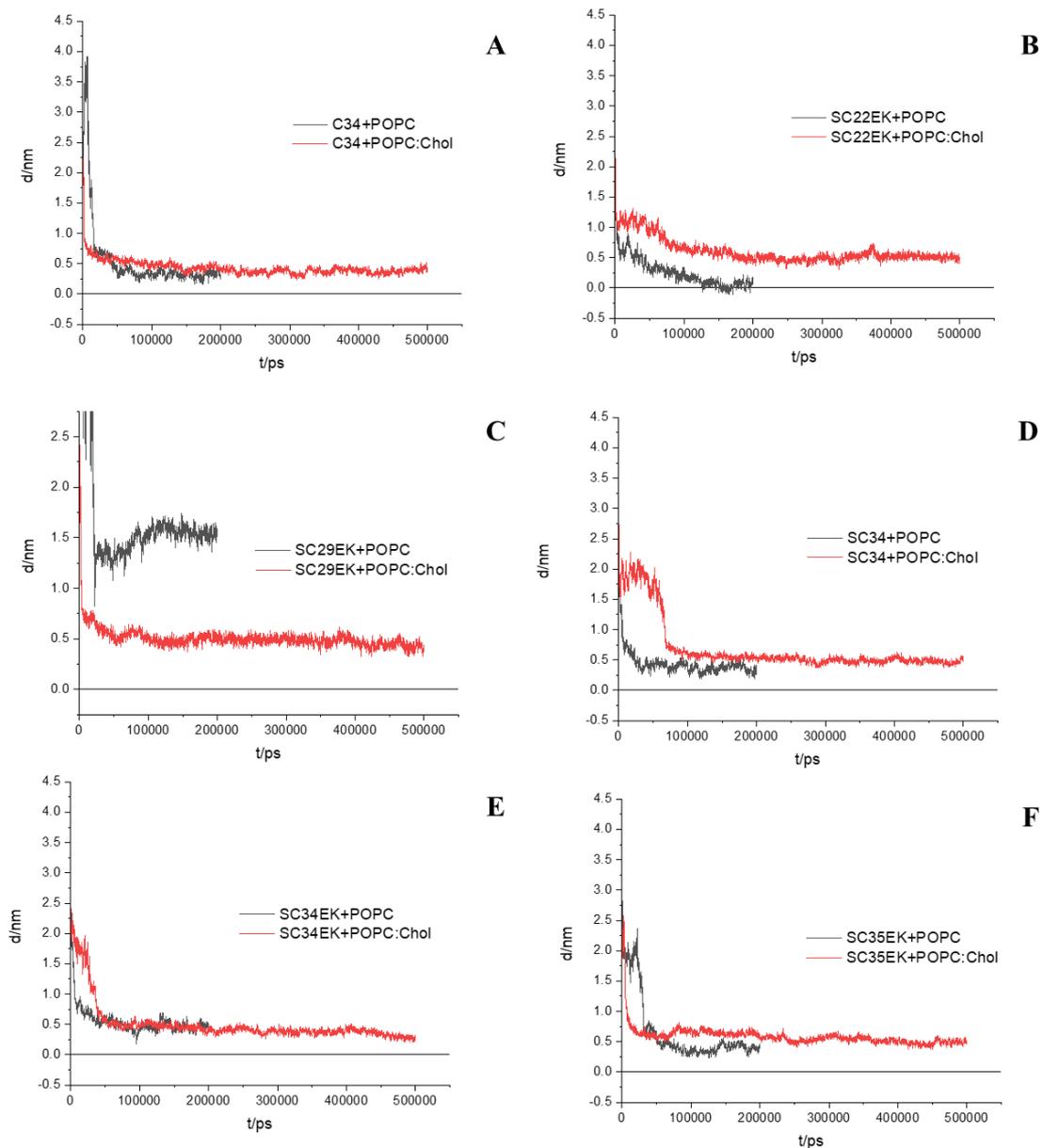


Figura 19-(A) Distância do centro de massa do C34 à superfície das membranas de POPC e POPC:CHOL. (B) Distância do centro de massa do SC22EK à superfície das membranas de POPC e POPC:CHOL. (C) Distância do centro de massa do SC29EK à superfície das membranas de POPC e POPC:CHOL. (D) Distância do centro de massa do SC34 à superfície das membranas de POPC e POPC:Chol. (E) Distância do centro de massa do SC34EK à superfície das membranas de POPC e POPC:CHOL. (F) Distância do centro de massa do SC35EK à superfície das membranas de POPC e POPC:CHOL.

Com base na figura 19, podemos observar que em todos os sistemas membranares o péptido é absorvido à superfície da membrana em menos de 100 ns, exceto o péptido

SC29EK no sistema de POPC. Neste sistema tudo indica que houve um erro e calculo durante a simulação. Há que denotar que em certos sistemas, como o C34+POPC:Chol, existe um aumento, inicial, da distância entre os péptidos e a membrana. Este aumento deve-se ao facto dos péptidos se encontrarem a difundir de uma forma aleatória. Quando estes sentem a membrana, ou seja, começam a existir interações moleculares mais intensas, a distância entre o péptido e a membrana diminui, até os péptidos ficarem adsorvidos a mesma.

2.2. Posição dos C_{α}

Para aprofundar a caracterização da configuração dos péptidos adsorvidos aos sistemas membranares, calculou-se a posição média dos C_{α} para os últimos 100 ns de simulação.

secundária helicoidal [Martins do Canto *et al.*, 2011]. Pela figura 20 podemos constatar que nos sistemas constituídos apenas de POPC os péptidos apresentam posições médias mais variáveis que nos sistemas de POPC:Chol. Isto deve-se à bicamada de POPC estar num estado líquido desordenado e, conseqüente a uma maior permeabilidade e flexibilidade dessas membranas. Estas características dos sistemas de POPC favorecem o aparecimento de zonas de compressão provocadas pela adsorção dos péptidos à superfície da membrana, levando a que certos resíduos de aminoácidos estejam numa posição abaixo da média da posição dos fosfatos ($y=0$) da membrana (figura 20-B, C, D e F). Nos sistemas de POPC, ainda podemos visualizar que o péptido C34 aparenta estar mais próximo da membrana, o que permite interações mais fortes com a membrana do que, por exemplo o péptido SC34EK no sistema de POPC (figuras 20- A e E).

Quanto aos sistemas de POPC:Chol, todos os péptidos adotam uma configuração mais arqueada em alguns resíduos de aminoácidos, levando a que estes se encontrem em posições abaixo da posição média dos fosfatos. No entanto devido à maior rigidez destes sistemas, não ocorre tão frequentemente como nos sistemas de POPC.

2.3. Densidade

O parâmetro da densidade de massa foi calculado para todos os componentes dos sistemas simulados, representados na figuras 21-26, para as bicamadas (POPC e POPC:Chol) com os diferentes péptidos inseridos (C34, SC22EK, SC29EK, SC34, SC34EK e SC35EK). Os perfis de densidade foram calculados para os últimos 20 e 40 ns para as membranas de POPC e POPC:Chol, respetivamente, altura em que todos os péptidos estavam adsorvidos à superfície membranar.

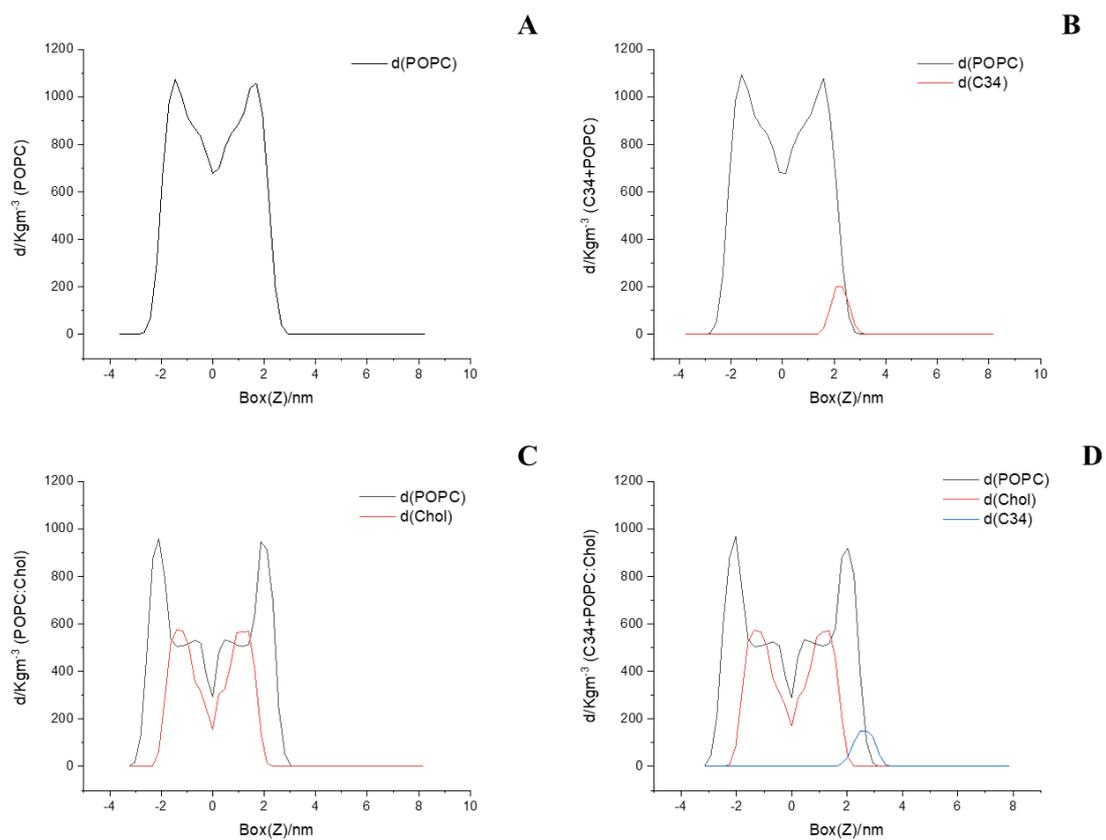


Figura 21- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema C34+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema C34+POPC:Chol.

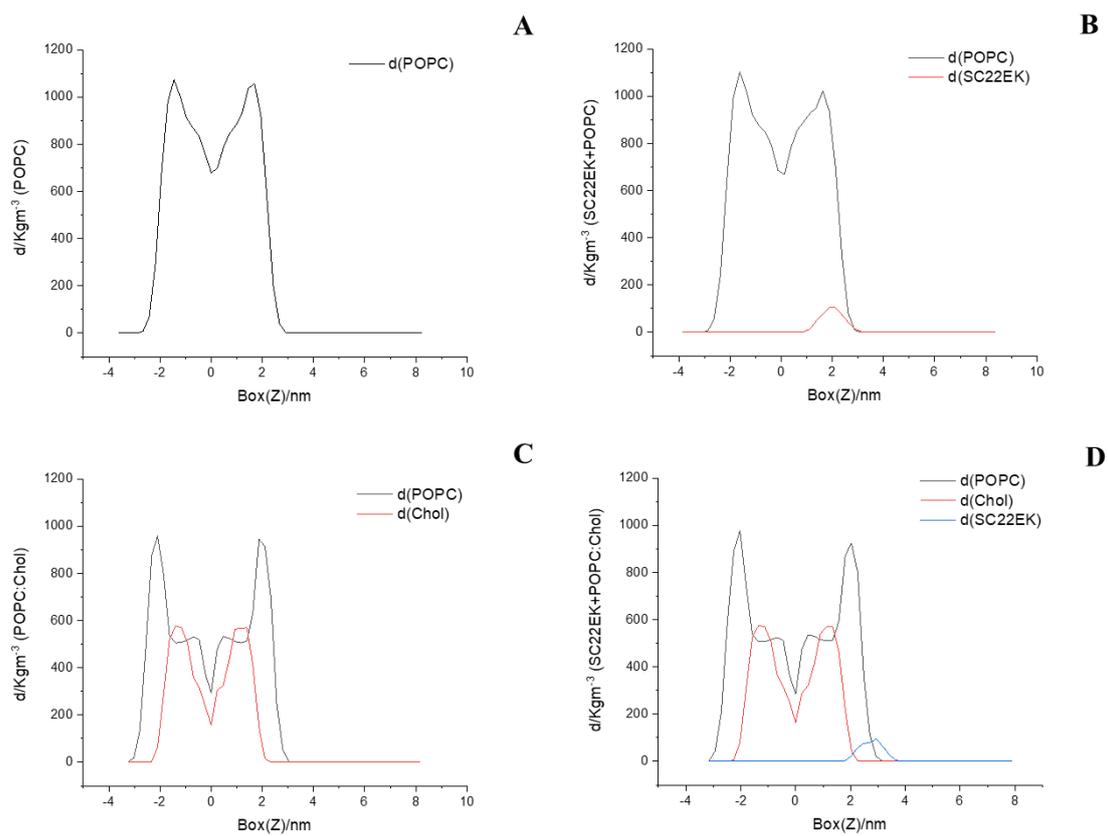


Figura 22- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema SC22EK+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema SC22EK+POPC:Chol.

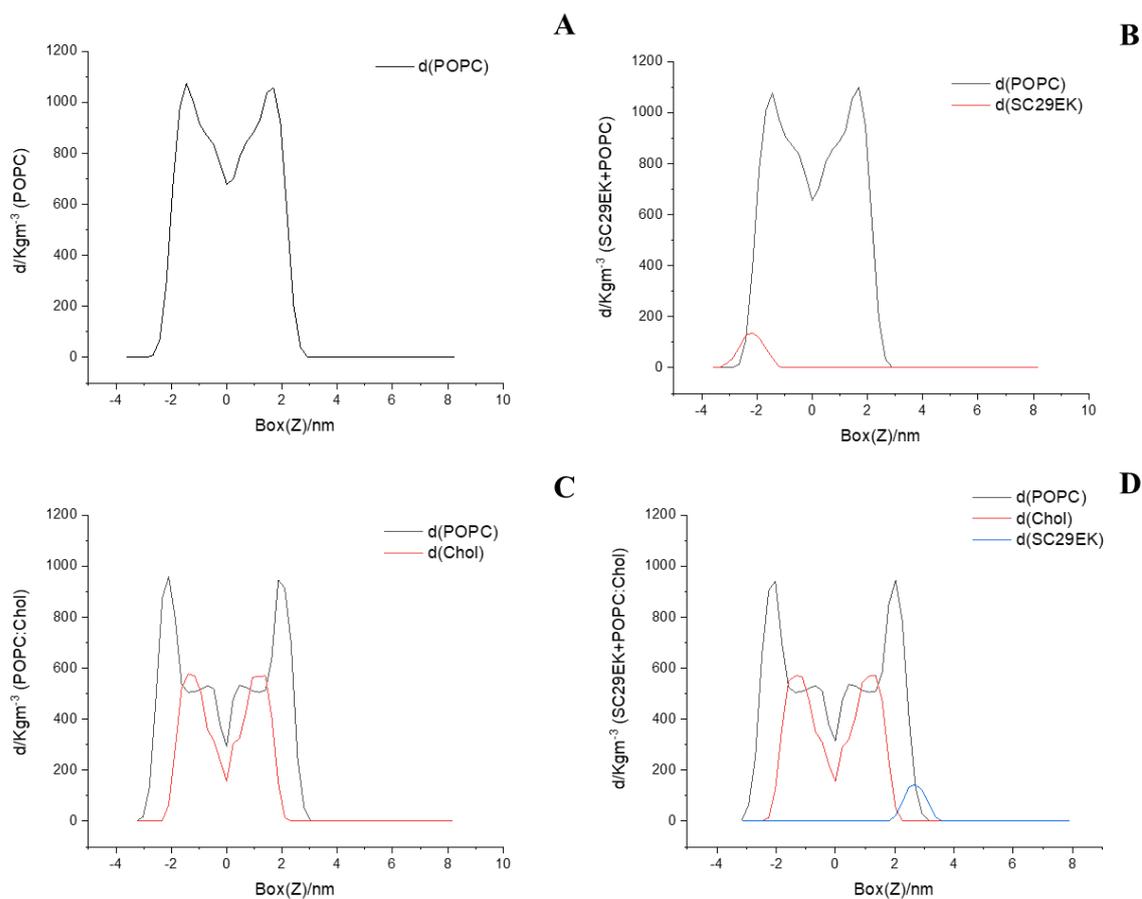


Figura 23- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema SC29EK+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema SC29EK+POPC:Chol.

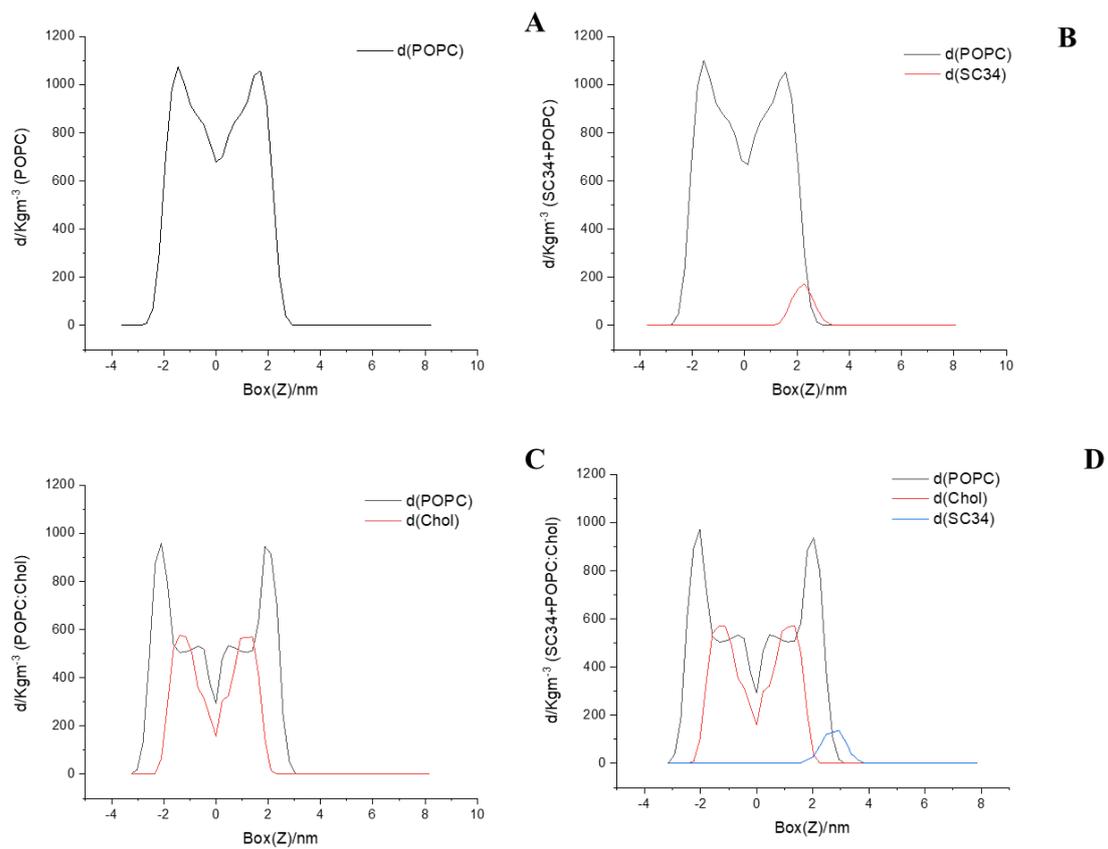


Figura 24- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema SC34+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema SC34+POPC:Chol.

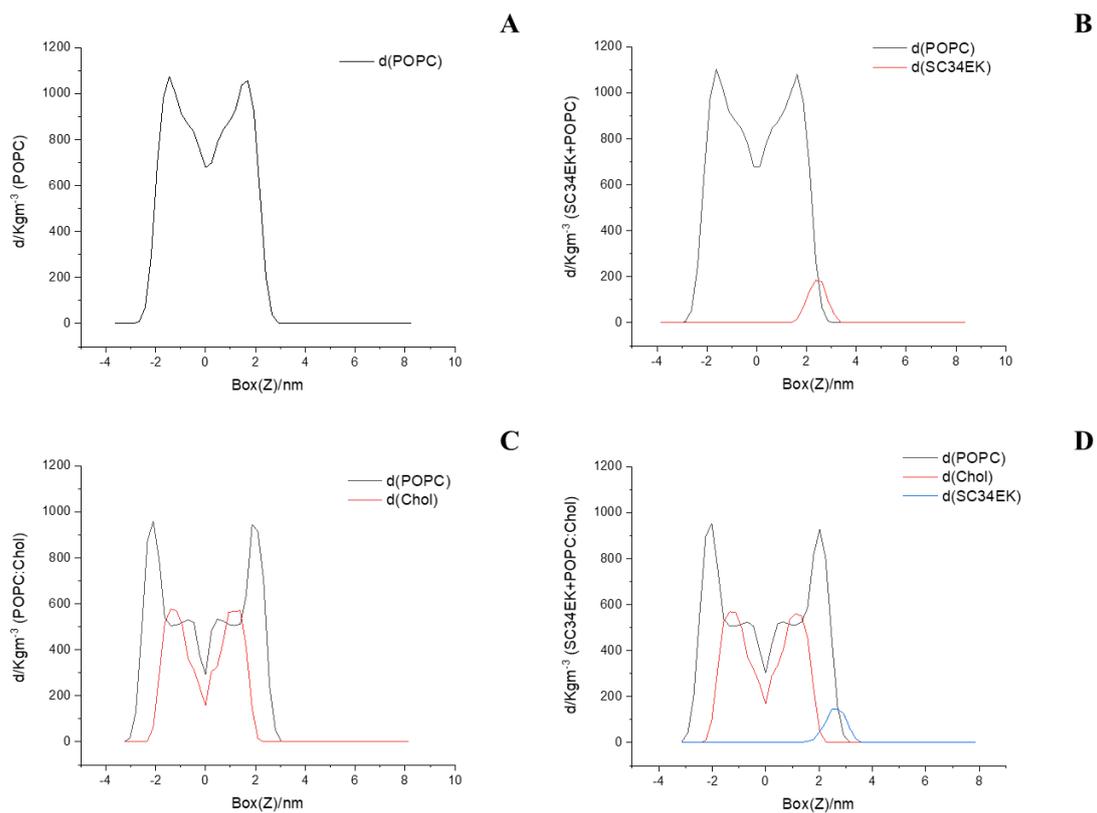


Figura 25- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema SC34EK+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema SC34EK+POPC:Chol.

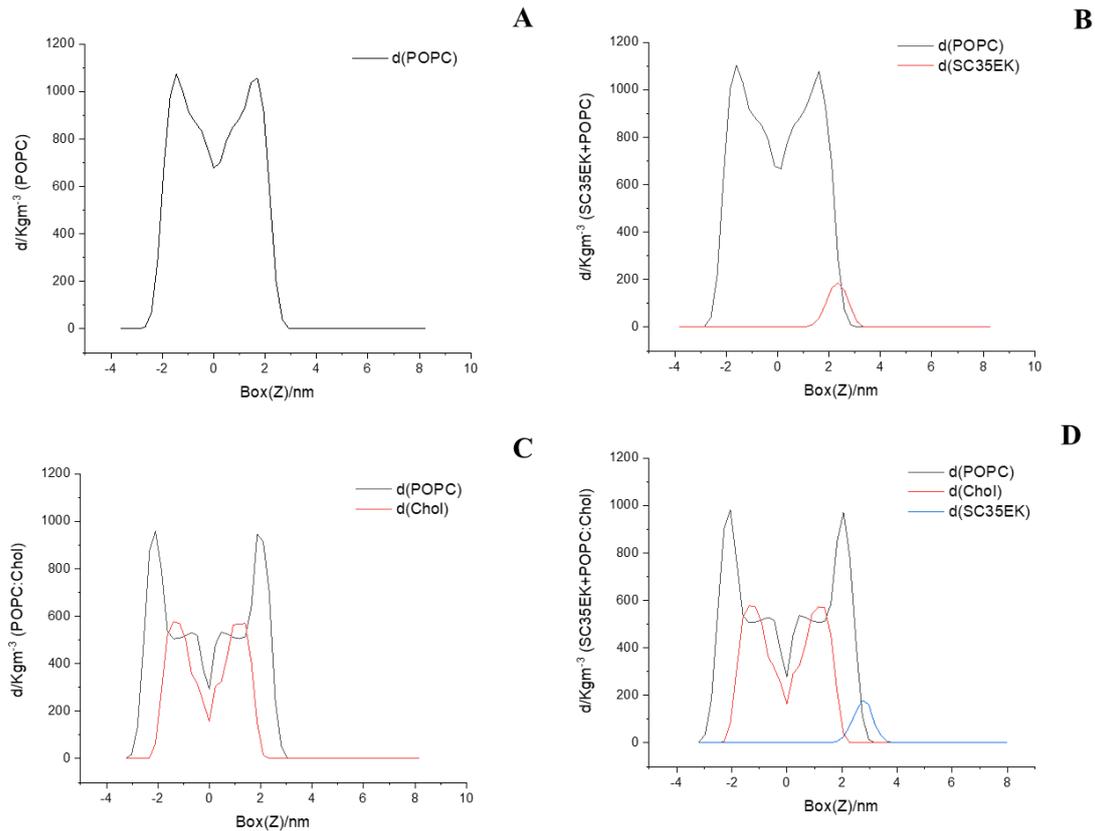


Figura 26- Perfis de densidade de massa: (A) do sistema de POPC. (B) do sistema SC34EK+POPC. (C) do sistema de POPC:Chol. (D) do sistema SC34EK+POPC:Chol.

Comparando os perfis de densidade sem péptido com os dos péptidos inseridos observa-se que existe uma compressão visível na densidade do POPC, na monocamada onde o péptido é adsorvido, mas não na densidade do Chol, como sugerido no ponto 2.2. Isto acontece devido a interação dos péptidos com as monocamadas a que adsorvem. A monocamada onde o péptido adsorve, tem consistentemente um pico de densidade mais baixo de POPC, o que resulta numa pequena distorção do perfil de POPC quando comparado com o da bicamada sem péptido. O perfil de densidade do Chol não sofre alterações, isto pode acontecer devido a uma maior flexibilidade das membranas de POPC e ao facto das moléculas de colesterol provocarem uma maior rigidez nas membranas de POPC:Chol.

2.4. Estrutura secundária dos péptidos

A análise da estrutura secundária dos péptidos, foi feita por recurso ao programa DSSP [Kabsh & Sander, 1983] com o qual calculámos as percentagens das estruturas secundárias de cada péptido para os últimos 100 ns de cada sistema.

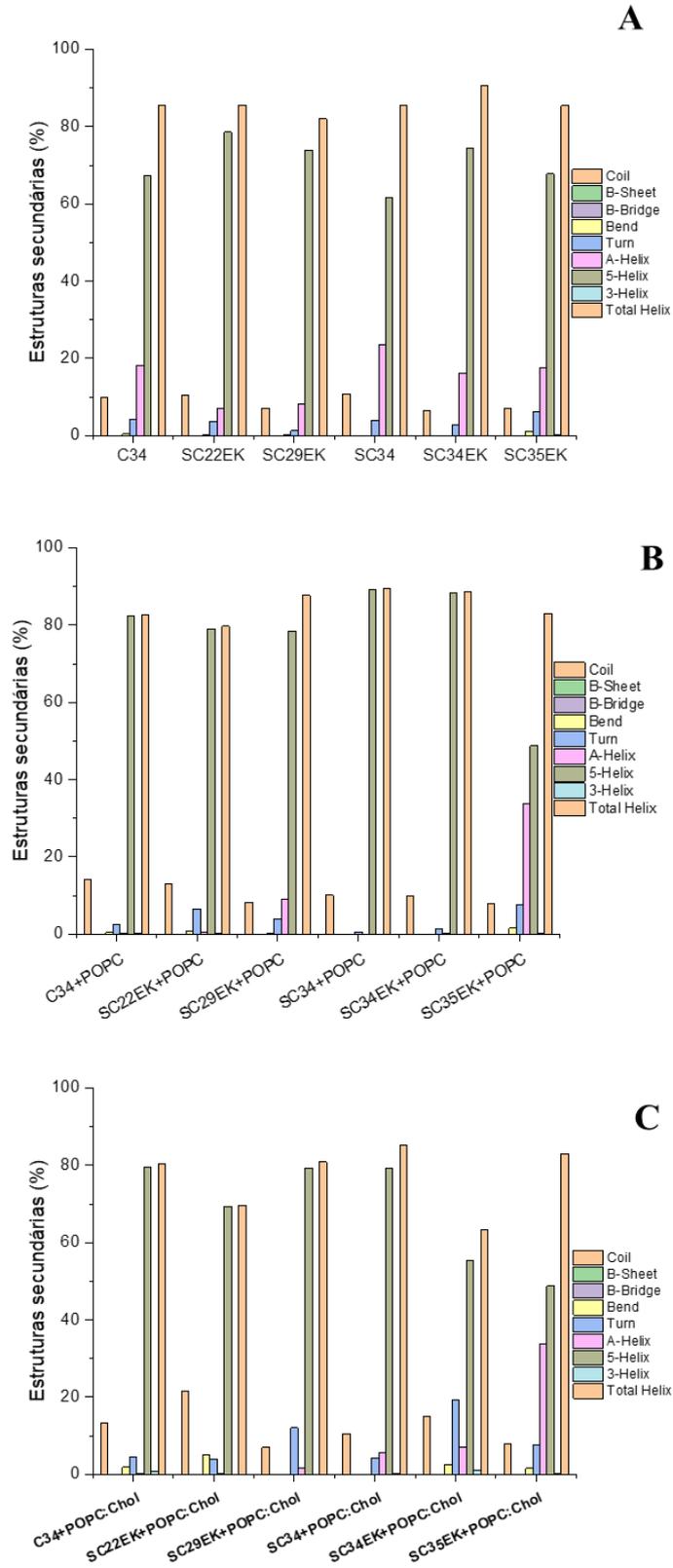


Figura 27- A) Estruturas secundárias (%) dos péptidos em água. (B) Estruturas secundárias (%) dos péptidos nas membranas de POPC. (C) Estruturas secundárias (%) dos péptidos nas membranas de POPC:Chol.

Em todos os sistemas membranares simulados, os péptidos adotam uma estrutura helicoidal, preferencialmente hélice-5', como se pode observar pela figura 27. Esta tendência pela estrutura 5-helice pode ser fundamental para a função dos péptidos. Pela percentagem total das hélices de todos os péptidos nos sistemas simulados, observa-se que mais de 80% são hélices do tipo 5, exceto nos sistemas SC22EK+POPC, SC22EK+POPC:Chol, SC34EK+POPC:CHOL, SC35EK+POPC e SC35EK+POPC:Chol. Isto poderá estar correlacionado com a distância do péptido a membrana.

2.5. Interação dos péptidos com as bicamadas - pontes de hidrogénio

Para a análise da formação de pontes de hidrogénio entre resíduos individuais dos péptidos e os grupos relevantes dos sistemas simulados foi registada uma tríade doadora/aceitadora de hidrogénios para cada vez que estes se encontravam a uma distância menos de 0.35 nm e com um ângulo menor que 30°. Os péptidos têm a capacidade de formar pontes de hidrogénio com os lípidos das bicamadas e este número normalmente aumenta com o progresso da simulação.

Desta maneira, vamos obter gráficos onde se verifica a existência de pontes de hidrogénio ao longo do tempo da simulação, entre o péptido e o solvente (péptido apenas simulado em água), para o POPC e o solvente (em membranas puras de POPC) e para o POPC, solvente e para o colesterol (em membranas de POPC:Chol).

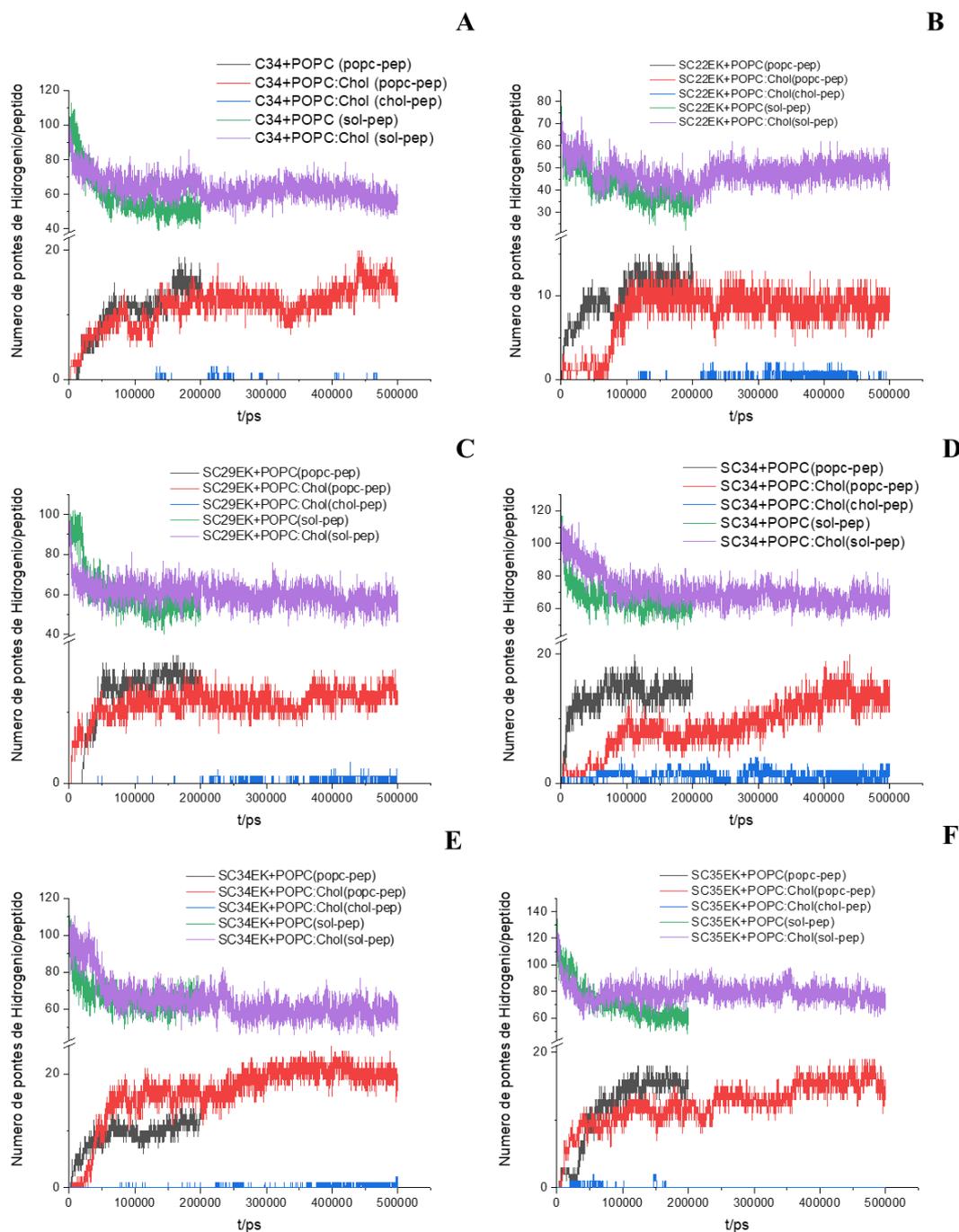


Figura 28- (A) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido C34 e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol. (B) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido SC22EK e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol. (C) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido SC29EK e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol. (D) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido SC34 e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol. (E) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido SC34EK e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol. (F) Número de pontes de hidrogénio entre o péptido SC35EK e o POPC, Chol e a água, nos sistemas de POPC e POPC:Chol.

A partir da figura 28, observa-se que o número de pontes de hidrogénio formadas estabiliza a partir dos 100 ns da corrida de simulação. Existe uma diminuição das pontes de hidrogénio formadas entre o péptido e solvente e um conseqüente aumento do número

de pontes de hidrogénio criadas entre o péptido e o POPC (POPC-pep) e entre o péptido e o colesterol (Chol-pep) nos sistemas.

O número de pontes de hidrogénio formadas nos sistemas de POPC:Chol é consideravelmente mais elevado do que nos sistemas de POPC, em comparação com outros estudos realizados [Martins do Canto *et al.*, 2012]. A capacidade destes péptidos em criar mais pontes de hidrogénio com as membranas de POPC:Chol sugere uma maior eficácia dos péptidos como inibidores do HIV. Uma vez que as membranas de HIV são bastantes rígidas devido ao alto teor de colesterol presente nestas [Lorizate *et al.*, 2013], estes resultados sugerem uma apetência maior para a interação com a membrana do vírus e, deste modo, uma capacidade aumentada de se posicionarem fisicamente mais próximos da gp41 viral, alvo destes péptidos.

Tabela 1- Número de pontes de hidrogénio entre o péptido e a água, o POPC e o Chol nos sistemas de POPC, POPC:Chol e para o péptido simulado em água, para os últimos 100 ns de cada simulação.

Número de pontes de Hidrogénio/péptido				
		Sol-pep	POPC-pep	Chol-pep
Água	C34	96,64±5,90	-	-
	SC22EK	68,05±4,71	-	-
	SC29EK	91,09±5,52	-	-
	SC34	103,27±6,16	-	-
	SC34EK	101,77±5,80	-	-
	SC35EK	112,99±6,08	-	-
POPC	C34	51,99±4,58	12,56±2,18	-
	SC22EK	36,53±3,85	11,81±1,28	-
	SC29EK	61,28 ±11,97	11,97±4,84	-
	SC34	61,75±4,70	14,36±1,43	-
	SC34EK	63,76±4,72	10,36±1,46	-
	SC35EK	62,87±5,30	15,29±1,13	-
POPC:Chol	C34	59,39±4,90	14,74±1,64	0,08±0,27
	SC22EK	49,74±3,73	8,75±1,26	0,37±0,51
	SC29EK	55,88±4,45	12,59±1,09	0,81±0,43
	SC34	64,98±5,08	13,93±1,66	1,10±0,77
	SC34EK	58,82±4,73	20,25±1,38	0,51±0,52

	SC35EK	76,37±5.08	15,72±1,36	0,00±0,00
--	--------	------------	------------	-----------

Observando a tabela 1, podemos confirmar o que foi dito anteriormente. À exceção dos péptidos SC22EK e o SC34 nos sistemas de POPC:Chol todos os outros formam mais pontes de hidrogénio entre o POPC-pep do que com os sistemas de POPC. Há que denotar que este numero inferior de pontes de hidrogénio formadas nos sistemas de POPC:Chol com o péptido SC34 se pode dever ao número de pontes de hidrogénio que este forma com o colesterol, sendo o péptido o que mais pontes de hidrogénio forma com o colesterol, $1,10\pm 0,77$. O péptido SC35EK no sistema de POPC:Chol ao contrário do SC34 não faz qualquer tipo de pontes de hidrogénio com o colesterol.

2.6. Interações dos péptidos com as bicamadas- interações energéticas

De maneira a perceber o motivo para o comportamento dos péptidos, a sua passagem da solução para a adsorção, observaram-se as interações energéticas entre as membranas e os péptidos a partir da variação das interações de Lennard-Jones (LJ) e de Coulomb (Coul), ao longo do tempo de simulação, entre o solvente e o péptido (sol-pep), o POPC e o péptido (POPC-pep) e o colesterol e o péptido (Chol-pep).

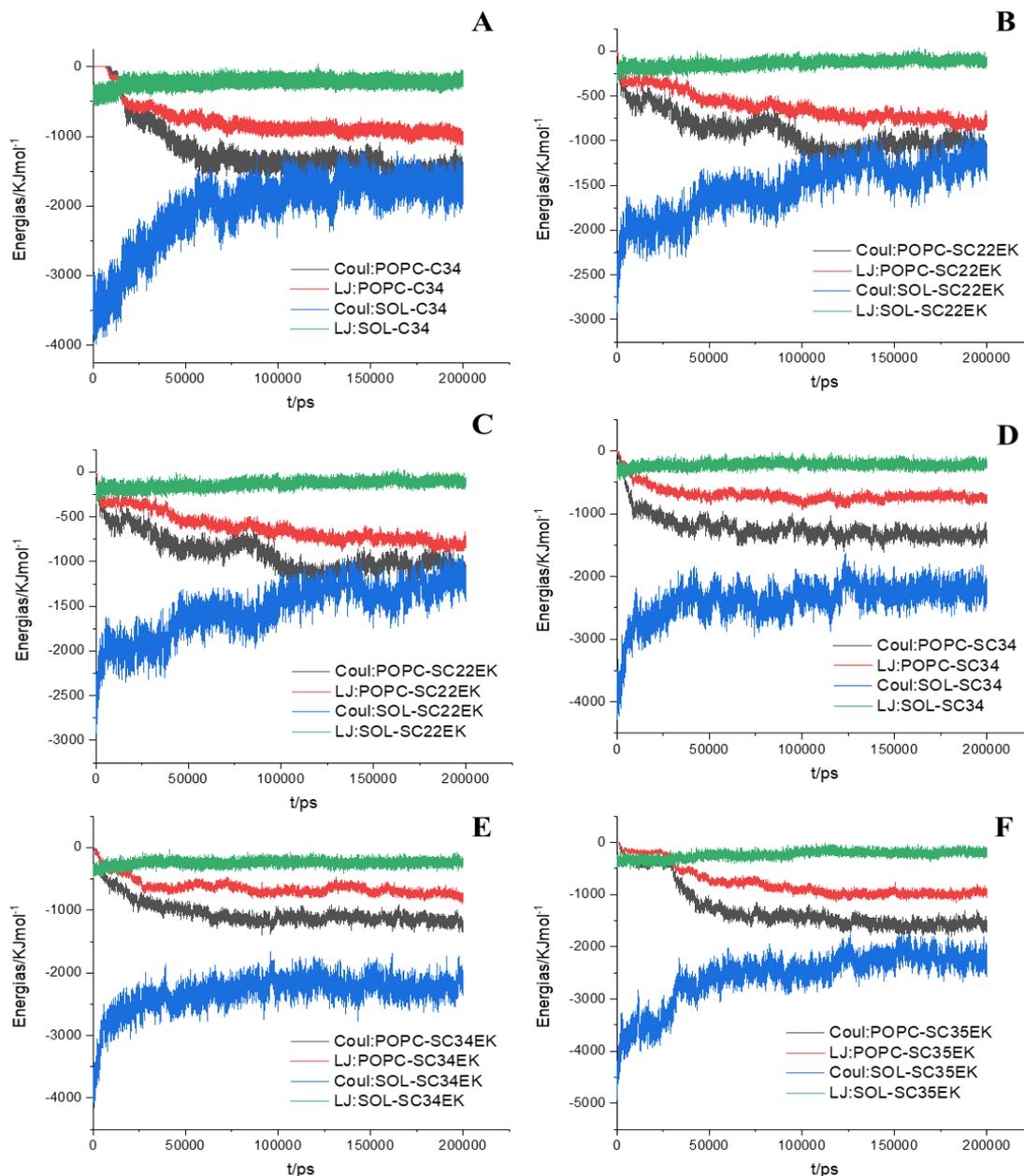


Figura 29-(A) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC+C34. (B) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC+SC22EK. (C) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC+SC29EK. (D) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC+SC34. (E) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC+SC34EK. (F) Variações das interações de Lennard-Jones e Coulomb para o sistema de POPC+SC35EK.

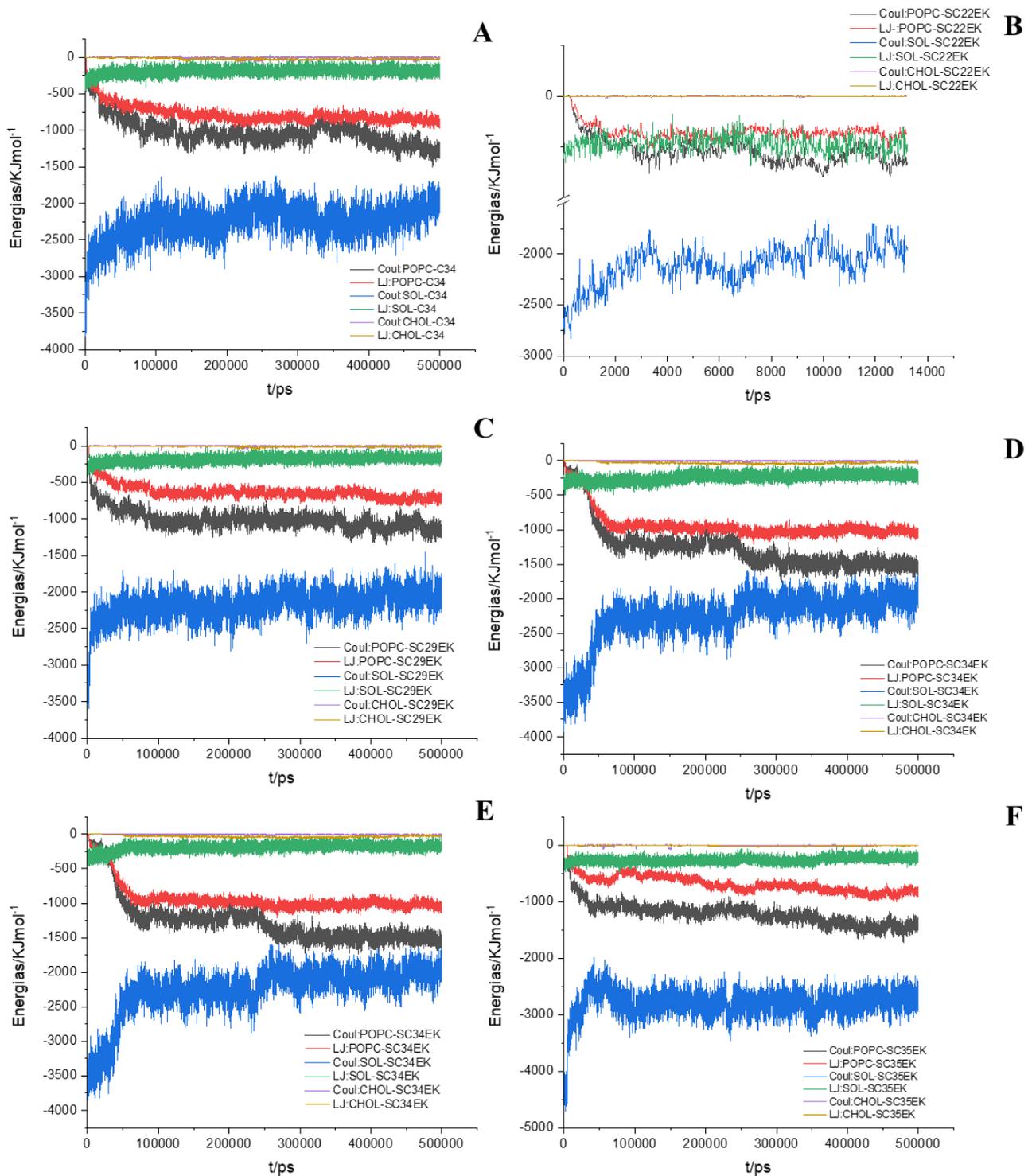


Figura 30-(A) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+C34. (B) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+SC22EK. (C) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+SC29EK. (D) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+SC34. (E) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+SC34EK. (F) Variações das interações de Lennard -Jones e Coulomb para o sistema de POPC:Chol+SC35EK.

Nas figuras 29 e 30, observa-se que, na generalidade, a partir dos 50 ns começam a existir interações entre os péptidos e o POPC, sendo que até este ponto a interação é essencialmente zero. Uma vez que durante este período o péptido se encontra distante das bicamadas, não interagindo com estas, como constatámos no capítulo da distância do centro de massa dos péptidos a superfície da membrana. À medida que as forças de interação atuam sobre o péptido e a membrana vai haver uma diminuição da distância entre o péptido e a superfície da membrana e uma consequente diminuição da liberdade de movimentos do péptido no meio aquoso [Martins do Canto *et al.*, 2012]. Assim as energias de Coulomb e Lennard-Jones aumentam gradualmente entre o péptido e o POPC e vão diminuir, consequentemente entre o péptido e o solvente. Quanto às energias de interação do péptido com o colesterol, ao longo do tempo de simulação, observa-se que são muito pouco significativas, o que já tinha sido observado com outros péptidos [[Martins do Canto *et al.*, 2012].

Tabela 2- Médias e os respetivos desvios padrões das variações das energias de Lennard-Jones e Coulomb entre o solvente e o péptido (sol-pep), POPC e o péptido (POPC-pep) e o colesterol e o péptido (Chol-pep), ao longo do tempo de corrida da simulação.

		Energia de Lennard-Jones (LJ)/kJmol ⁻¹			Energia de Coulomb (Coul)//kJmol ⁻¹		
		Sol-pep	POPC-pep	Chol-pep	Sol-pep	POPC-pep	Chol-pep
POPC	C34	-228,67±61,71	-784,8±236,33	-	-2032,43±505,70	-1204,91±412,83	-
	SC22EK	-134,75±48,11	-621,40±159,54	-	-1528,92±291,90	-910,93±211,94	-
	SC29EK	-201,40±64,17	-576,97±228,63	-	-2234,37±429,30	-985,29±364,52	-
	SC34	-222,41±50,68	-690,84±129,72	-	-2380,88±294,21	-1225,90±219,23	-
	SC34EK	-247,27±51,34	-630,72±135,68	-	-2322,61±276,17	-1032,85±215,87	-
	SC35EK	-235,18±74,58	-774,34±287,65	-	-2560,89±492,13	-1270,03±431,52	-
POPC:Chol	C34	-194,53±52,87	-775,52±125,52	-22,53±9,98	-2256,02±225,94	-1020,69±189,53	-3,86±11,65
	SC22EK	-235,34±41,72	-175,75±40,75	-1,41±0,88	-2104,04±191,33	-266,78±70,80	-0,46±1,73
	SC29EK	-187,27±47,82	-631,99±100,22	-10,32±6,19	-2165,14±185,56	-1005,80±142,56	-3,88±8,05
	SC34	-216,41±59,25	-683,90±205,37	-37,81±21,82	-2571,10±345,27	-953,08±290,51	-18,48±16,46
	SC34EK	-191,96±57,82	-930,69±211,14	-32,47±13,61	-2257,52±363,97	-1258,52±344,62	-3,37±5,19
	SC35EK	-262,05±55,59	-683,64±150,78	-10,63±6,56	-2795,97±234,37	-1208,64±219,57	-2,31±7,30

Pela tabela 2, observa-se que as energias de Coul são mais intensas que as energias de LJ, por exemplo para o sistema de POPC+C34, a energia de interação do POPC-pep é de LJ é $-784,8 \text{ kJmol}^{-1}$ e a energia de Coul é $-1204,91 \text{ kJmol}^{-1}$. O péptido SC22EK nos sistemas de POPC:Chol apresenta energias de LJ e Coul muito baixas para a interação com o POPC, em comparação com os outros péptidos, e uma interação energética quase nula com o colesterol. Por outro lado o péptido SC34 apresenta boas energias de interação, LJ e Coul, com o colesterol em comparação com os outros péptidos dos sistemas de POPC:Chol.

Para determinarmos a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) ao longo das coordenadas de reação (ζ), proximidade com a posição de adsorção, recorremos ao método de *umbrella sampling* [Kästner, 2011]. Ao longo destas coordenadas de reação (corresponde a translação do péptido ao longo da normal da bicamada da posição de adsorção até a uma posição solvatada e afastada da membrana) foram feitas 40 *frames* diferentes dos sistemas, mimetizando o afastamento do péptido da membrana. A partir das 40 *frames* obtivemos o potencial unidimensional da força média (PMF) para cada péptido.

Para obtermos então a ΔG da ligação dos péptidos aos sistemas membranares, calculou-se o mínimo do PMF e subtraiu-se a média do último nm das coordenadas de reação (os histogramas de cada sistema simulado encontram-se em anexo).

Tabela 3- Variações da energia livre de Gibbs para todos os sistemas simulados e os respetivos desvios padrões.

Variação da energia livre de Gibbs (ΔG)/ kJmol^{-1}		
POPC	C34	$-150,76 \pm 2,12$
	SC22EK	$-125,83 \pm 1,82$
	SC29EK	$-135,38 \pm 3,01$
	SC34	$-125,79 \pm 2,81$
	SC34EK	$-120,05 \pm 4,92$
	SC35EK	$-121,94 \pm 2,97$
POPC:Chol	C34	$-129,88 \pm 8,17$
	SC22EK	$-153,70 \pm 9,94$

	SC29EK	-128,43±11,51
	SC34	-166,55±8,93
	SC34EK	-193,03±5,56
	SC35EK	-172,00±11,06

Pela tabela 3, observa-se que todo o ΔG , calculado como a diferença entre a média da região platô e o mínimo da energia da curva de PMF, é negativo para todos os sistemas simulados (Figura 29). A adsorção de todos os péptidos, exceto o péptido C34, é mais favorável nas membranas de POPC:Chol, melhorando a ação dos inibidores de fusão [Lorizate *et al.*, 2013; Veiga *et al.*, 2004]. A adsorção do péptido a membrana vai criar um equilíbrio de partição que vai fornecer um reservatório do péptido adsorvido à membrana, bem como uma concentração de equilíbrio do péptido concomitante em solução. Desta forma os péptidos conseguem interagir com a gp41 do HIV, inibindo assim a fusão do vírus à membrana das células hospedeiras [Veiga *et al.*, 2004]. No entanto, este processo não deve ser irreversível, pois não iria permitir uma quantidade significativa disponível do péptido para desempenhar o papel de inibidor, assim é desejável haver algum grau de reversibilidade na ligação do péptido a membrana.

O péptido SC34EK possui um ΔG de magnitude menor nos sistemas de POPC:Chol, sugerindo uma maior afinidade à solução do que os outros péptidos. Em todos os sistemas o ΔG é moderado, o que sugere uma ligação reversível a membrana, permitindo desta maneira, o papel do reservatório molecular dos péptidos que é atribuído às membranas [Veiga *et al.*, 2004; Veiga *et al.*, 2004].

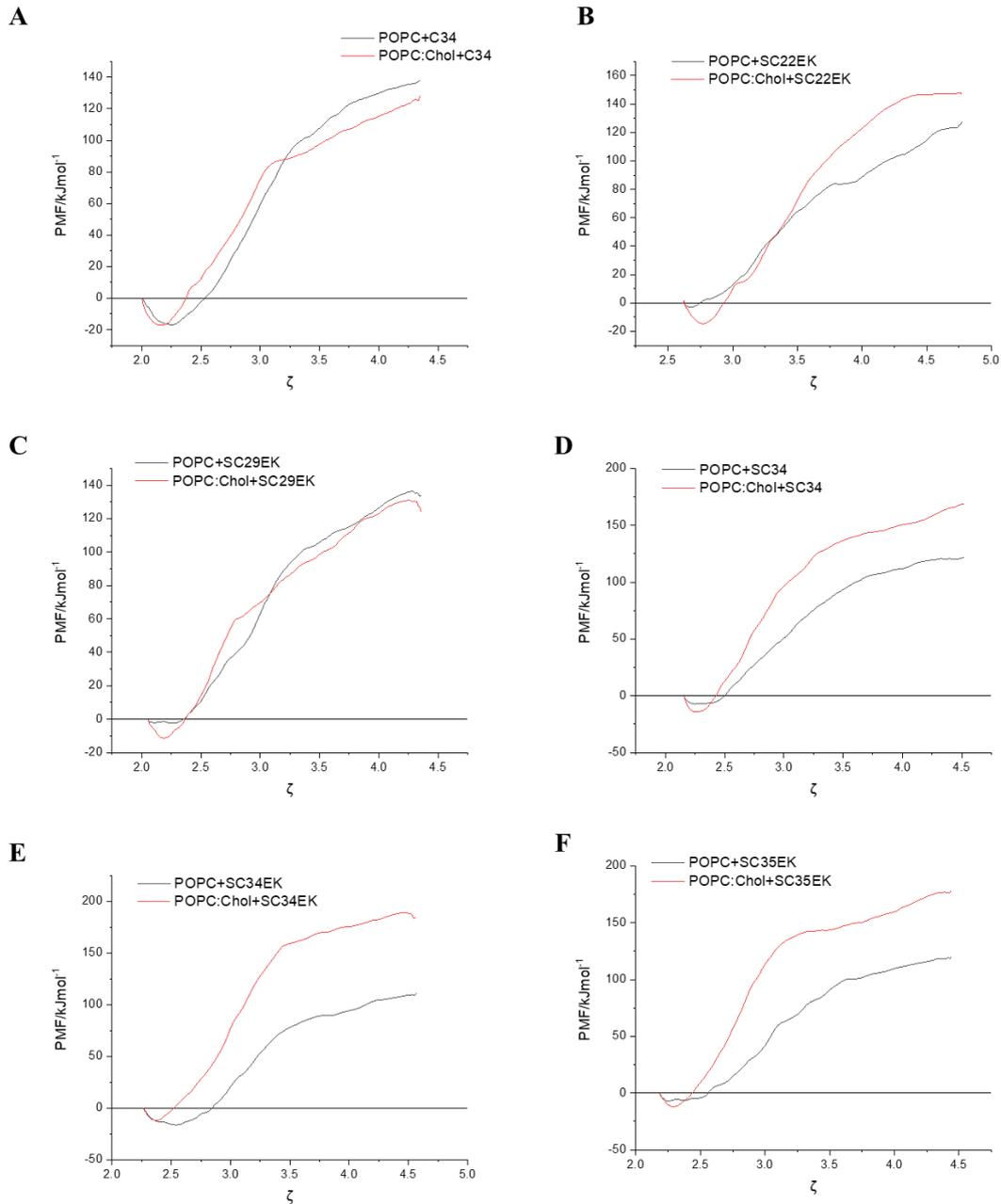


Figura 31- (A) Curva do potencial de força média (PMF) para a dissociação do péptido C34 nas membranas de POPC e POPC:Chol. (B) Curva do potencial de força média (PMF) para a dissociação do péptido SC22EK nas membranas de POPC e POPC:Chol. (C) Curva do potencial de força média (PMF) para a dissociação do péptido SC29EK nas membranas de POPC e POPC:Chol. (D) Curva do potencial de força média (PMF) para a dissociação do péptido SC34 nas membranas de POPC e POPC:Chol. (E) Curva do potencial de força média (PMF) para a dissociação do péptido SC34EK nas membranas de POPC e POPC:Chol. (F) Curva do potencial de força média (PMF) para a dissociação do péptido SC35EK nas membranas de POPC e POPC:Chol.

2.7. Difusão lateral do péptido

O coeficiente de difusão lateral, D_{lat} , dos péptidos foi calculado a partir do deslocamento quadrático médio (*mean square displacement* – MSD) usando a relação de

Einstein ($d=2$ para sistemas com bicamada lipídica, movimento bidimensional, e $d=3$ para os péptidos em água, movimento tridimensional):

$$D_{lat} = \frac{1}{2d} \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{dMSD(t)}{dt} \quad (9)$$

Onde o MSD é definido como:

$$MSD(t) = \langle \|\vec{R}_i(t + t_0) - \vec{R}_i(t_0)\|^2 \rangle \quad (10)$$

Onde \vec{R}_i é a posição (x, y, z) (em água) ou (x, y) (bicamadas) do centro de massa da molécula, i , da espécie em causa, e a média é realizada em todas moléculas deste tipo e origem de tempo. Para eliminar as flutuações de fundo do centro de massa de cada monocamada, todas as análises MSD de todos os lípidos foram realizadas usando trajetórias com centro de massa fixo em cada monocamada [Anezo, *et al.*, 2003; Lindahl & Edhom, 2001]. O MSD e o respetivo D_{lat} foi calculado, dos 3 ns aos 10 ns, para os péptidos em água dos 10ns aos 60 ns para os péptidos adsorvidos nos sistemas membranares.

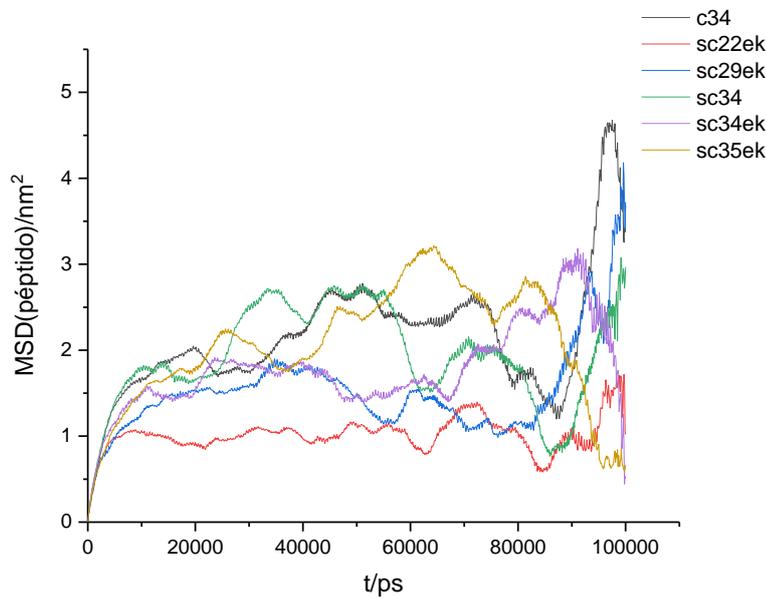


Figura 32- Deslocamento quadrado médio (MSD) de todos os péptidos simulados em água ao longo do tempo.

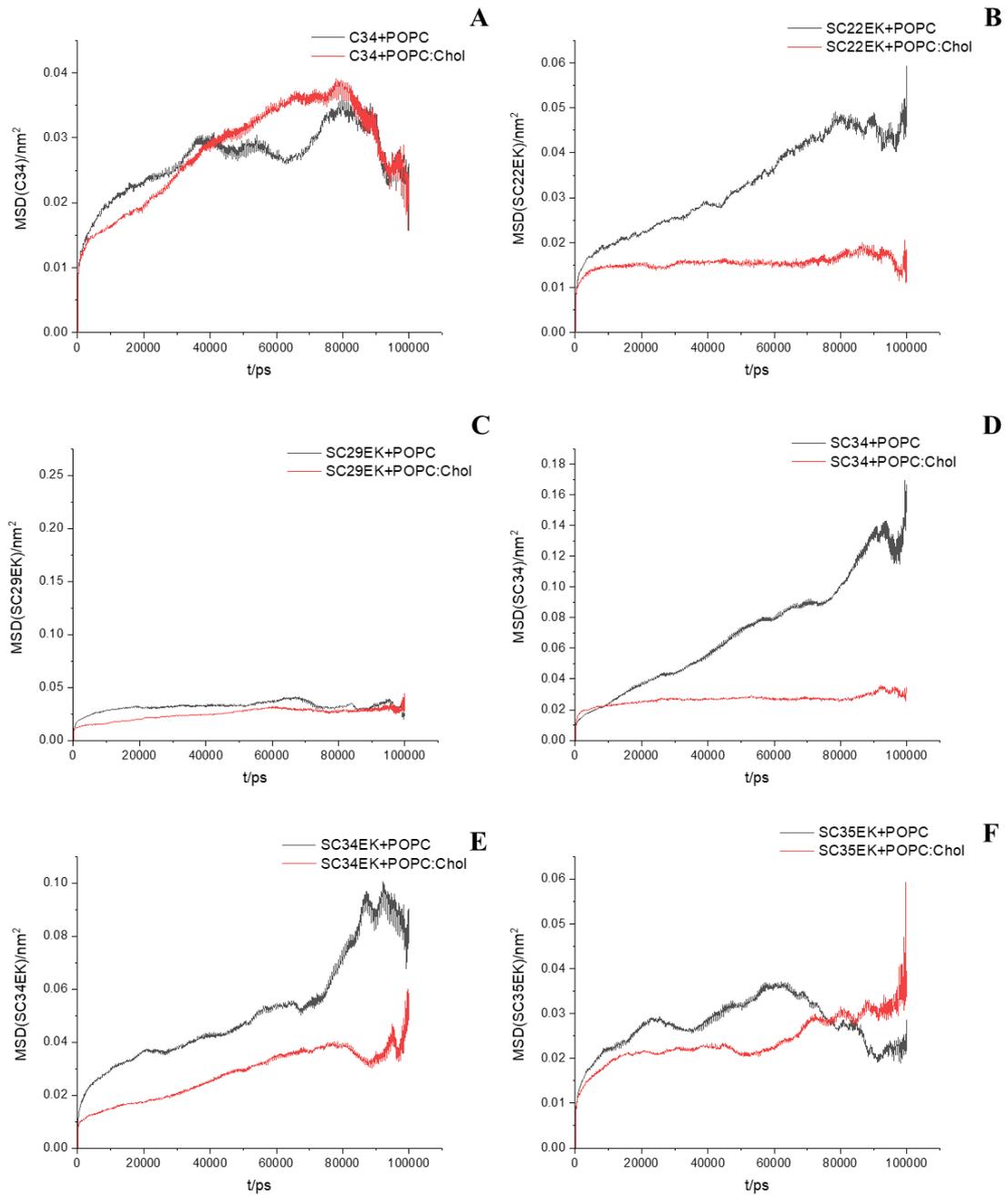


Figura 33-(A) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido C34 nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. (B) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido SC22EK nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. (C) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido SC29EK nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. (D) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido SC34 nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. (E) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido SC34EK nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação. (F) Deslocamento quadrado médio (MSD) do péptido SC35EK nas membranas de POPC e POPC:Chol ao longo do tempo de simulação.

Tabela 4- Coeficientes de difusão lateral para todos os péptidos simulados em água.

$D_{lat}(10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1})$						
	C34	SC22EK	SC29EK	SC34	SC34EK	SC35EK
Água	88,11±3,16	30,36±1,83	66,91±1,92	107,79±3,14	77,853±2,04	96,37±1,62

Tabela 5- Coeficientes de difusão lateral dos péptidos nos sistemas de POPC e POPC:Chol.

Sistemas	$D_{lat} (10^{-10} \text{ cm}^2\text{s}^{-1})$					
	C34	SC22EK	SC29EK	SC34	SC34EK	SC35EK
POPC	2,82±47,44	5,49±21,34	1,80±27,80	19,14±64,52	7,13±40,49	3,85±46,74
POPC:Chol	6,36±23,40	0,33±14,00	4,40±20,10	1,42±23,89	6,61±25,12	0,44±22,89

Com base na figura 32 e 33, observamos que os péptidos se difundem mais em água do que nos sistemas membranares, uma vez que os péptidos quando inseridos nos sistemas membranares sofrem adsorção. A difusão lateral dos péptidos é, na generalidade, mais rápida nos sistemas de POPC do que nos sistemas de POPC:Chol, a exceção dos sistemas com o péptido C34 e SC29EK. Nos quatro sistemas simulados como o péptido C34 e SC29EK observa-se que o coeficiente de difusão, para os péptidos, nos sistemas de POPC:Chol é mais rápido ($D_{lat}=(6,36\pm23,40) \times 10^{-10} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para o C34) e ($D_{lat}=(4,40\pm20,10) \times 10^{-10} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para o SC29EK), do que nos sistemas de POPC ($D_{lat}=(2,82\pm47,44) \times 10^{-10} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para o C34) e ($D_{lat}=(1,80\pm27,80) \times 10^{-10} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para o SC29EK). Desta forma a rapidez da difusão lateral dos péptidos C34 e SC29EK nos sistemas de POPC:Chol pode ser justificada pelas interações energéticas e com o número de pontes de pontes de hidrogénio formadas, que estes péptidos fazem com as membranas. A partir dos resultados obtidos anteriormente, podemos verificar que ambos os péptidos (C34 e SC29EK) interagem mais fortemente com as membranas sistemas de POPC:Chol do que nos de POPC e formam, também mais pontes de hidrogénio nos sistemas de POPC:Chol do que no de POPC. Isto indica-nos que as membranas de POPC:Chol destes dois péptidos estão a movimentarem-se mais e por consequente o péptido também, levando a uma mais célere difusão lateral, a formação de mais pontes de hidrogénio e a interações energéticas mais fortes neste sistema do que nos sistemas de POPC.

2.8. Dinâmica rotacional

O estudo da dinâmica rotacional ao longo do eixo dos péptidos foi realizado através da função de autocorrelação rotacional, $C(t)$, definida por:

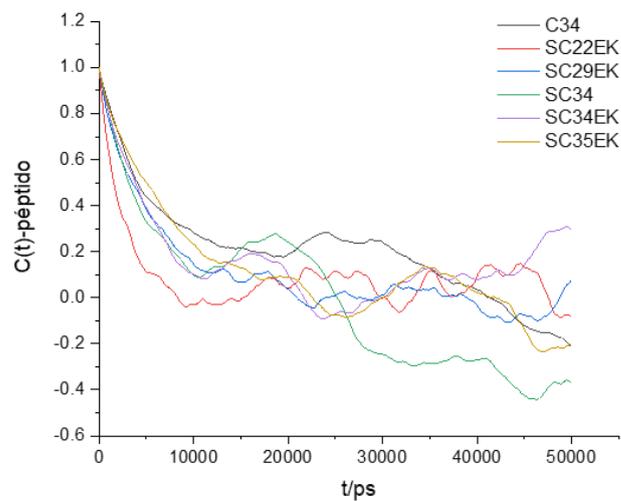
$$C(t) = P_2(\cos \theta(\xi)) \quad (11)$$

Onde $\theta(\zeta)$, é o ângulo ao longo do eixo do péptido nos tempos, ζ e $t + \zeta$ e

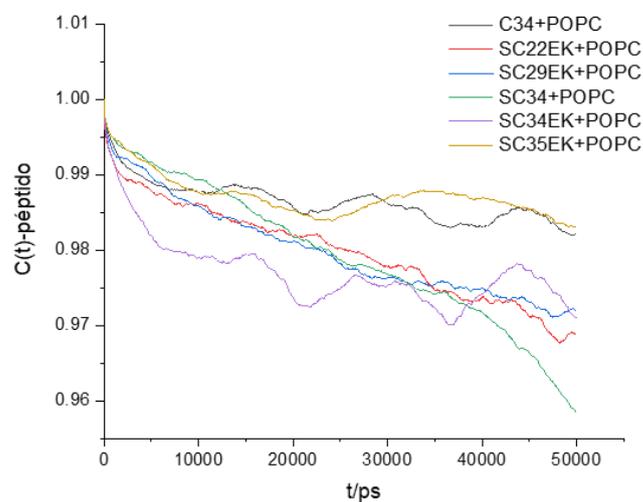
$$P_2(x) = \frac{3x^2 - 1}{2} \quad (12)$$

é o polinómio de Legendre de segunda ordem (12). A média é realizada sobre ζ , que, assumindo uma trajetória suficientemente ergótica, é uma aproximação da média do conjunto.

A



B



C

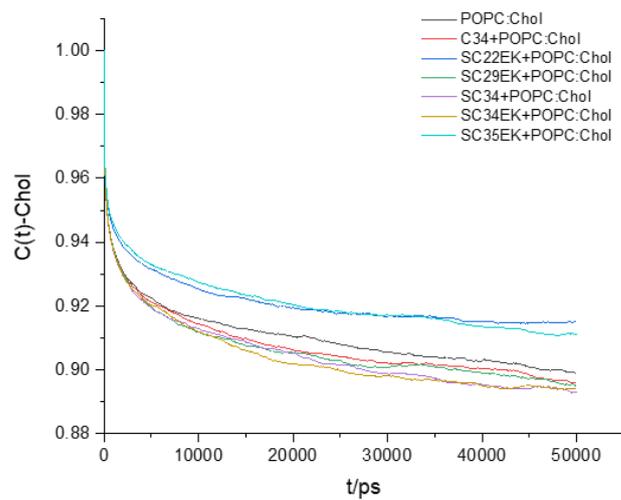


Figura 34- Função de auto-correlação para todos os péptidos simulados em água. (B) Função de auto-correlação de todos os péptidos simulados inseridos num sistema de POPC. (C) Função de auto-correlação de todos os péptidos simulados num sistema de POPC:Chol.

Pela figura 34, observa-se que os péptidos em água rodam mais livremente, o $C(t)$ decai rapidamente para zero, do que adsorvidos nas bicamadas. Os péptidos nos sistemas de POPC em comparação com os de POPC:Chol, encontram-se mais livres. Isto advém de as moléculas de colesterol conferirem rigidez a membrana, o que torna a movimentação do péptido mais lenta ou quase inexistente.

3. Propriedades das membranas

3.1. Área por lípido e espessura de membrana

As áreas por lípido e as espessuras de membrana foram realizadas como está explicado na secção 1. Equilíbrio dos sistemas membranares: área por lípido e colesterol e espessura de membrana.

A partir dos resultados obtidos podemos observar que os valores médios da ApPOPC, ApChol e pela espessura de membrana nos últimos 100 ns da simulação que, nos sistemas de POPC com os péptidos adsorvidos ocorre uma diminuição da ApPOPC e um aumento da MT em relação ao sistema sem péptido, o que sugere um efeito condensador da adsorção do péptido. Nos sistemas de POPC:Chol, com os péptidos adsorvidos, ocorre aumento ou manutenção da ApPOPC, aumento da ApChol e, na generalidade, manutenção da MT em relação ao sistema sem péptido, o que sugere uma resistência das membranas de POPC:Chol a consequências significativas da adsorção dos péptidos em estudo. Este efeito, ou ausência dele, pode ser consequência da maior rigidez destas membranas. É de notar o aumento da ApChol que sugere uma maior exposição destas moléculas ao solvente aquando da adsorção dos péptidos. Foi observado que os péptidos fazem bastantes pontes de H com o POPC nestas membranas, esta interação mais próxima com o POPC pode estar a minimizar o seu efeito protetor, *umbrela*, sobre as moléculas de Chol [Martins do Canto *et al.*, 2012].

Tabela 6- Média das áreas por POPC e por colesterol (nm²) e as respectivas médias da espessura de membrana (nm) para todos os sistemas simulados.

Sistema		ApPOPC (nm ²)	ApChol (nm ²)	MT (nm)
POPC	ambas	0,652±0,010	-	3,71±0,05
C34+POPC	top	0,635±0,009	-	3,79±0,05
	bottom	0,635±0,009	-	
SC22EK+POPC	top	0,630±0,011	-	3,80±0,06
	bottom	0,630±0,011	-	
SC29EK+POPC	top	0,632±0,009	-	3,81±0,04
	bottom	0,632±0,009	-	
SC34+POPC	top	0,632±0,011	-	3,80±0,05
	bottom	0,632±0,011	-	
SC34EK+POPC	top	0,638±0,009	-	3,77±0,04
	bottom	0,638±0,009	-	
SC35EK+POPC	top	0,625±0,012	-	3,84±0,06
	bottom	0,625±0,012	-	
POPC:Chol	ambas	0,524±0,007	0,270±0,006	4,61±0,02
C34+POPC:Chol	top	0,528±0,009	0,270±0,009	4,59±0,02
	bottom	0,521±0,009	0,277±0,008	
SC22EK+POPC:Chol	top	0,523±0,008	0,274±0,008	4,61±0,02
	bottom	0,529±0,009	0,268±0,009	
SC29EK+POPC:Chol	top	0,524±0,009	0,273±0,009	4,60±0,02
	bottom	0,519±0,009	0,278±0,009	
SC34+POPC:Chol	top	0,534±0,009	0,266±0,009	4,59±0,02
	bottom	0,522±0,008	0,277±0,008	
SC34EK+POPC:Chol	top	0,526±0,010	0,271±0,009	4,60±0,02
	bottom	0,522±0,009	0,275±0,008	
SC35EK+POPC:Chol	top	0,520±0,009	0,275±0,009	4,61±0,02
	bottom	0,522±0,008	0,273±0,008	

3.2. Pontes de Hidrogénio entre as moléculas de POPC/colesterol com o solvente

Para analisarmos a formação de pontes de hidrogénio entre o POPC/colesterol com o solvente e entre o POPC e colesterol foi registada uma tríade doadora/aceitadora de hidrogénios para cada vez que as moléculas se encontravam a uma distância menos de 0.35 nm e com um ângulo menor que 30°, como explicado na seção 2.5. das propriedades gerais dos péptidos.

Tabela 7- Média e os respetivos desvios padrões do número de pontes de hidrogénio entre o Sol-POPC e Chol-Sol nas membranas de POPC e POPC:Chol, para os últimos 100 ns da simulação.

Sistema	Número de Pontes de Hidrogénio/lípido		
	Sol-POPC	Sol-Chol	POPC-Chol
POPC	6,51±0,10	-	-
POPC:Chol	6,46±0,12	0,69±0,05	0,76±0,03
C34+POPC	6,15±0,12	-	-
C34+POPC:Chol	6,24±0,12	0,70±0,06	0,75±0,03
SC22EK+POPC	6,18±0,13	-	-
SC22EK+POPC:Chol	6,34±0,11	0,71±0,06	0,76±0,03
SC29EK+POPC	6,17±0,16	-	-
SC29EK+POPC:Chol	6,21±0,13	0,69±0,05	0,78±0,03
SC34+POPC	6,12±0,13	-	-
SC34+POPC:Chol	6,17±0,12	0,65±0,05	0,79±0,04
SC34EK+POPC	6,18±0,13	-	-
SC34EK+POPC:Chol	6,13±0,12	0,65±0,06	0,80±0,03
SC35EK+POPC	6,06±0,13	-	-
SC35EK+POPC:Chol	6,20±0,12	0,69±0,05	0,77±0,03

Com base na tabela 7, observamos que nos sistemas onde os péptidos estão inseridos existe uma diminuição do número de pontes de hidrogénio formadas entre o solvente e o POPC. Este efeito encontra-se mais acentuado nos sistemas SC34+POPC e no SC34EK+POPC:Chol. Por trás deste efeito, observa-se que as pontes de hidrogénio formadas entre o POPC e o colesterol são mais numerosas no sistema

SC34EK+POPC:Chol, levando a que existam mais lípidos a interagir uns com os outros do que com o solvente. Devido às interações dos péptidos com os sistemas membranares, observa-se que o número de pontes de hidrogénio formadas entre o solvente e o colesterol em certos sistemas diminui e noutros aumenta muito pouco. Esta diminuição pode dever-se ao facto de o péptido estar adsorvido a superfície das membranas o que torna as moléculas de colesterol menos acessíveis as moléculas do solvente, levando a um decréscimo da formação de pontes de hidrogénio.

3.3. Difusão lateral do POPC e do colesterol

O coeficiente de difusão lateral, D_{lat} , dos lípidos foi calculado a partir do deslocamento quadrático médio (*mean square displacement* – MSD) usando a relação de Einstein ($d=2$ para sistemas com bicamada lipídica), da mesma maneira como descrito na secção 2.7 do tratamento geral dos péptidos. O MSD e o respetivo D_{lat} foi calculado para o POPC e colesterol, dos 10 ns aos 60 ns, para as bicamadas e para as monocamadas individualizadas.

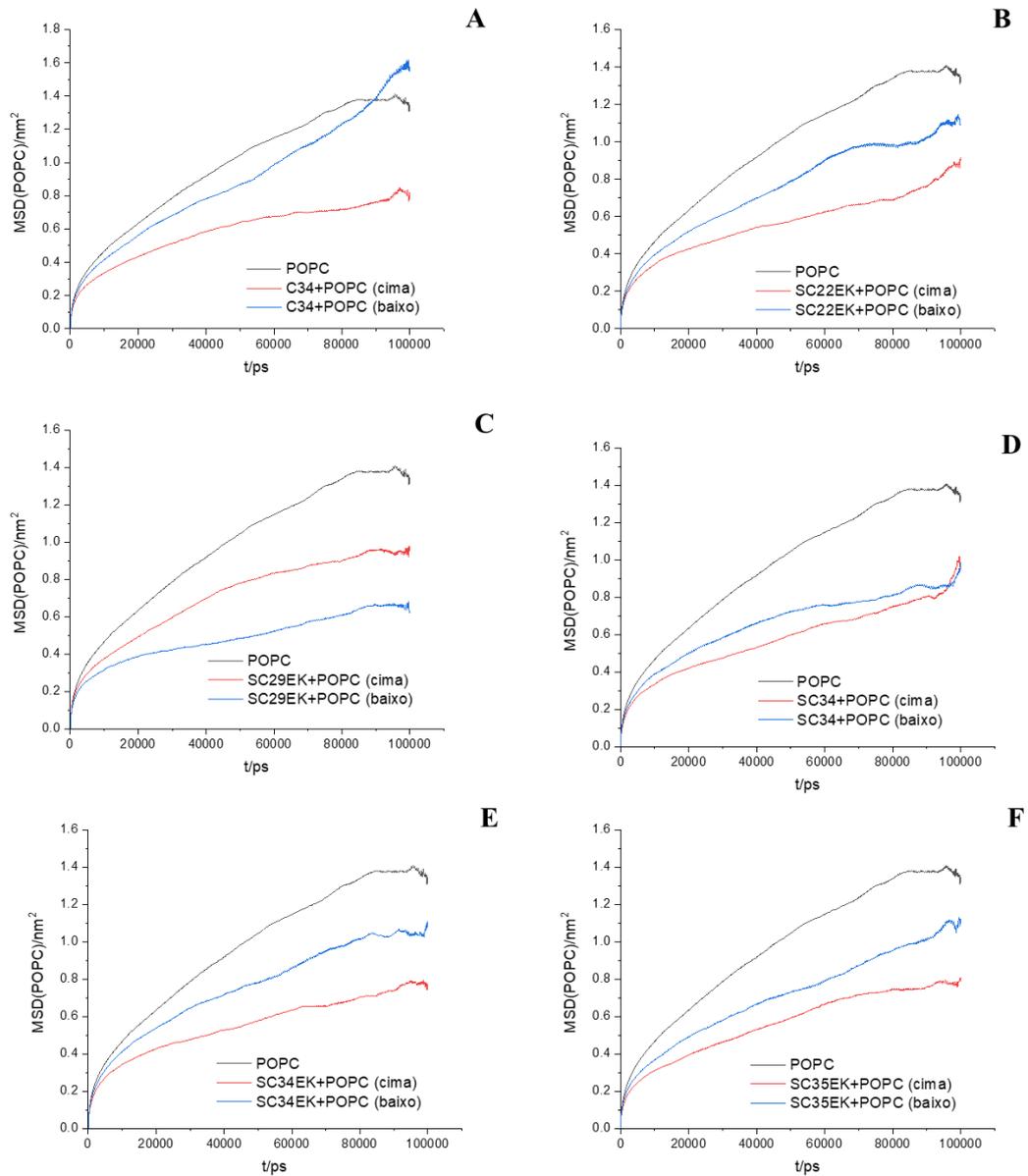


Figura 35- (A) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema C34+POPC. (B) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC22EK+POPC. (C) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC29EK+POPC. (D) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC34+POPC. (E) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC34EK+POPC. (F) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC35EK+POPC.

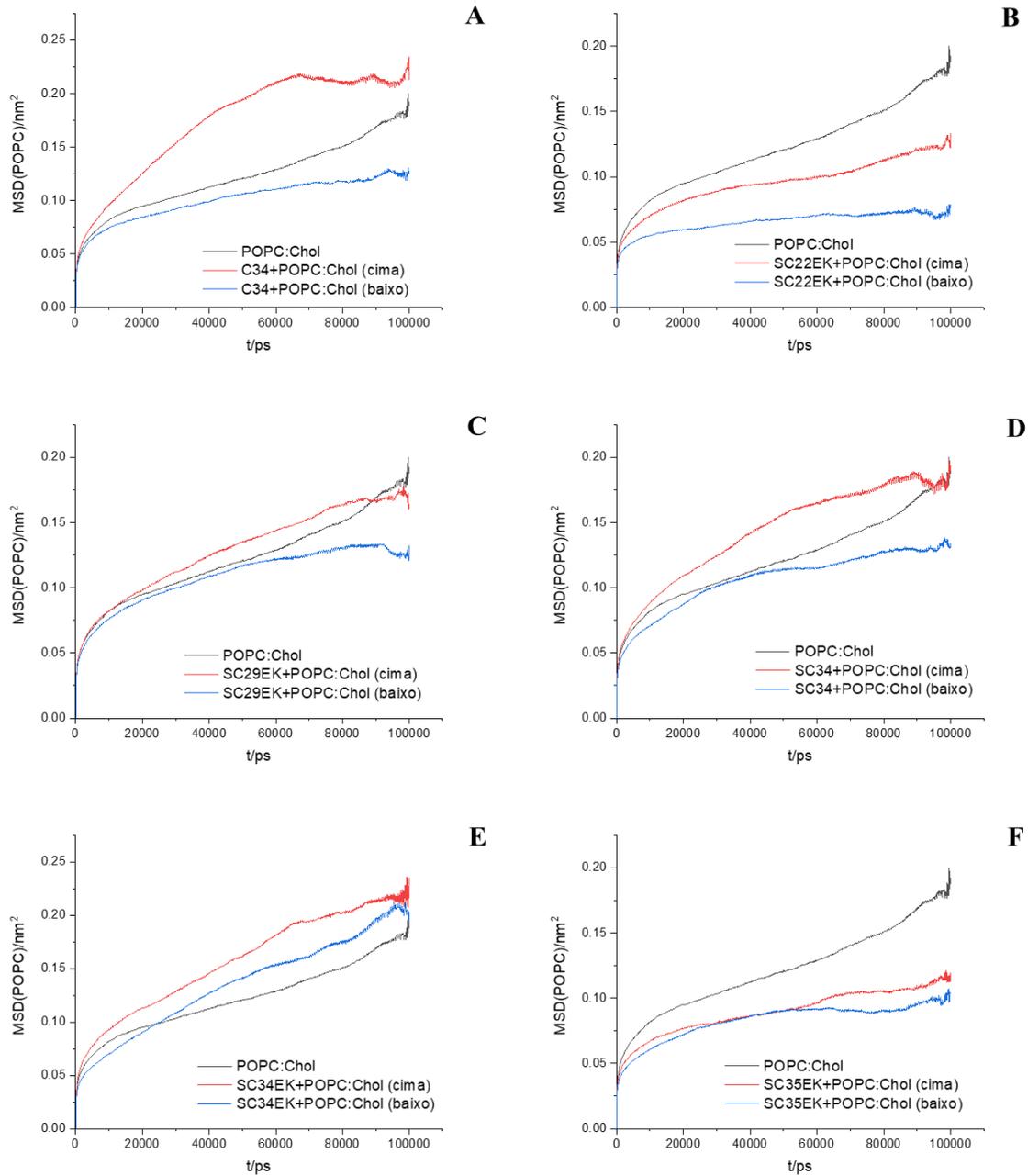


Figura 36-(A) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema C34+POPC:Chol. (B) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC22EK+POPC:Chol. (C) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC29EK+POPC:Chol. (D) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC34+POPC:Chol. (E) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC34EK+POPC:Chol. (F) Deslocamento quadrado médio do POPC (MSD_{POPC}) para o sistema SC35EK+POPC:Chol.

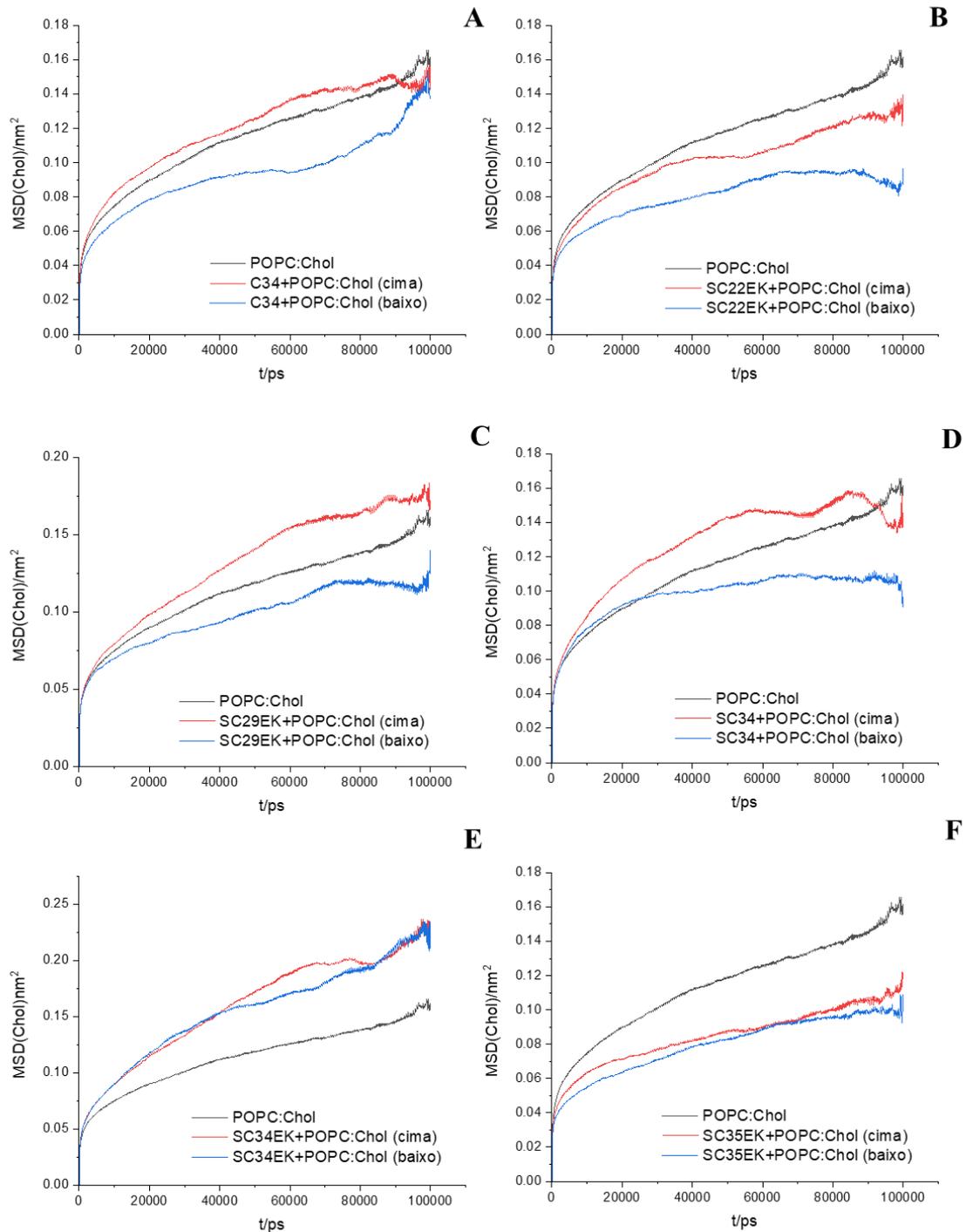


Figura 37- Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema C34+POPC:Chol. (B) Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema SC22EK+POPC:Chol. (C) Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema SC29EK+POPC:Chol. (D) Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema SC34+POPC:Chol. (E) Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema SC34EK+POPC:Chol. (F) Deslocamento quadrado médio do Chol (MSD_{Chol}) para o sistema SC35EK+POPC:Chol.

Com base na figura 35 constata-se que as difusões laterais das monocamadas de baixo são mais rápidas que as de cima em todos os sistemas, a exceção do sistema SC29EK+POPC. Este fenómeno acontece devido à adsorção do péptido à monocamada de cima, consequentemente a dinâmica de difusão da membrana será menor. No caso do sistema SC29EK+POPC o péptido adsorveu na camada de baixo, explicando desta maneira o porque da monocamada de cima ser mais dinâmica que a de baixo.

Nos sistemas de POPC:Chol acontece o efeito contrário, tanto a difusão lateral do POPC como do colesterol nas monocamadas de cima é mais dinâmica que na monocamada de baixo. Este efeito pode ser causado pela influência que o péptido, adsorvido, tem na movimentação dos lípidos com que faz múltiplas pontes de H. Ao mover-se mais depressa, e mantendo as pontes de H, o péptido vai arrastar os lípidos forçando-os a movimentos também eles mais céleres.

Tabela 8- Coeficientes de difusão lateral do POPC e colesterol para todos os sistemas membranares.

Sistema		$D_{lat}(10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1})$	
		POPC	Chol
POPC	ambas	2,277±4,113	-
C34+POPC	cima	1,136±3,930	-
	baixo	1,766±4,615	-
SC22EK+POPC	cima	0,868±2,558	-
	baixo	1,567±2,317	-
SC29EK+POPC	cima	1,567±4,360	-
	baixo	0,588±2,433	-
SC34+POPC	cima	1,012±1,428	-
	baixo	1,245±4,694	-
SC34EK+POPC	cima	0,892±2,021	-
	baixo	1,393±4,926	-
SC35EK+POPC	cima	1,142±1,389	-
	baixo	1,359±4,627	-
POPC:Chol	ambas	0,148±0,238	0,165±0,582
C34+POPC:Chol	cima	0,385±1,388	0,166±0,455

	baixo	0,120±0,300	0,093±0,794
SC22EK+POPC:Chol	cima	0,088±0,650	0,104±1,089
	baixo	0,048±0,173	0,090±0,290
SC29EK+POPC:Chol	cima	0,202±0,486	0,244±0,303
	baixo	0,147±0,447	0,115±0,288
SC34+POPC:Chol	cima	0,259±0,582	0,200±0,852
	baixo	0,146±1,232	0,074±0,786
SC34EK+POPC:Chol	cima	0,281±0,269	0,325±0,456
	baixo	0,283±0,561	0,253±1,545
SC35EK+POPC:Chol	cima	0,084±0,311	0,085±0,309
	baixo	0,101±0,686	0,108±0,317

Pela tabela 8 verificamos pelo coeficiente de difusão das membranas o que foi explicado anteriormente. Observa-se que os D_{lat} , nos sistemas de POPC, são maiores nas monocamadas de cima, exceto o SC29EK (pela razão explicada anteriormente). Todos os D_{lat} de POPC, de ambas monocamadas, dos sistemas membranares de POPC com péptido são inferiores aos do sistema de POPC sem péptido. A membrana movimenta-se mais livremente sem a presença de péptidos do que na presença deles. Quanto aos D_{lat} do POPC nos sistemas de POPC:Chol em alguns sistemas (C34, SC29EK, SC34 e SC34EK) as monocamadas de cima e de baixo (apenas para o sistema SC34EK+POPC) apresentam um D_{lat} superior ao do sistema de POPC:Chol sem péptido. O mesmo acontece com os D_{lat} do Chol, nas monocamadas de cima e de baixo (apenas para o sistema SC34EK+POPC) nos sistemas (C34, SC29EK, SC34 e SC34EK). Este evento observado nos coeficientes de difusão nos sistemas de POPC:Chol sugere uma desordem membranar causada pela adsorção dos péptidos.

3.4. Parâmetros de ordem

O parâmetro de ordem, S , é definido como:

$$S_{ab} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos(\theta_a) \cos(\theta_b) - \delta_{ab} \rangle \quad a, b = x, y, z \quad (13)$$

Onde θ_a ou θ_b é o ângulo feito pelo eixo molecular a (ou b) com a normal da bicamada e δ é o delta Kronecker (o $\langle \rangle$ denota a média do conjunto e do tempo). Nas

simulações efetuadas, usando o campo de força *united atoms*, os parâmetros de ordem para os carbonos saturados e insaturados foram determinados usando as seguintes relações [Aittoniemi *et al.*, 2007]:

$$-S_{CD}^{Sat} = \frac{2}{3}S_{xx} + \frac{1}{3}S_{yy} \quad (14)$$

$$-S_{CD}^{Insat} = \frac{1}{4}S_{zz} + \frac{3}{4}S_{yy} + \frac{\sqrt{3}}{2}S_{xy} \quad (15)$$

O $-S_{CD}$ pode variar entre 0,5 (ordem total ao longo da bicamada normal) e -0,25 (ordem total ao longo do plano da bicamada), enquanto $-S_{CD}=0$ denota uma orientação isotrópica. Devido a convergência lenta dos parâmetros de ordem [Böckmann *et al.*, 2003], a análise foi restrita aos últimos 100 ns de cada simulação. Para uma fácil comparação, foram calculadas as médias e os respectivos desvios padrões para a sn-1 e sn-2 de cada sistema simulado.

Tabela 9- Parâmetros de ordem e os desvios padrões para todos os sistemas simulados e as respectivas variações para todas as cadeias acilo sn-1 e sn-2.

Sistemas	sn-1	variação (%)	sn-2	variação (%)
POPC	0,163±0,039		0,117±0,052	
C34+POPC	0,178±0,040	9,4	0,127±0,052	8,7
SC22EK+POPC	0,185±0,038	13,5	0,131±0,048	12,3
SC29EK+POPC	0,181±0,041	11,0	0,135±0,051	15,6
SC34+POPC	0,180±0,039	10,3	0,129±0,053	11,1
SC34EK+POPC	0,178±0,041	9,0	0,126±0,051	8,5
SC35EK+POPC	0,188±0,040	15,3	0,135±0,055	15,8
POPC:Chol	0,372±0,063		0,269±0,077	
C34+POPC:Chol	0,368±0,064	-1,2	0,267±0,075	-0,8
SC22EK+POPC:Chol	0,374±0,064	0,5	0,265±0,075	-1,3
SC29EK+POPC:Chol	0,369±0,064	-0,8	0,268±0,076	-0,3
SC34+POPC:Chol	0,368±0,063	-1,2	0,266±0,074	-0,9
SC34EK+POPC:Chol	0,367±0,063	-1,3	0,269±0,076	0,0
SC35EK+POPC:Chol	0,370±0,065	-0,5	0,274±0,077	1,8

Os perfis de $-S_{CD}$ das cadeias sn-1 e sn-2 de todos os sistemas simulados são demonstrados na figura 38. Nas membranas de POPC, a adsorção dos péptidos provoca um aumento dos valores de $-S_{CD}$ e, portanto, as bicamadas encontram-se mais ordenadas. Esta situação pode dever-se a uma reordenação dos lípidos de membrana para acomodar o péptido adsorvente. Nas membranas de POPC:Chol, acontece o contrario, geralmente a adsorção dos péptidos leva a uma diminuição de $-S_{CD}$. Como observamos anteriormente as membranas de POPC:Chol são mais rígidas e ordenadas que as membranas de POPC, com a inserção do péptido inibidor de fusão vai ocorrer uma desordem a superfície da membrana, interagindo fortemente, por ligações de H, com a superfície da membrana (de acordo com os resultados anteriores) [do Canto *et al.*, 2011; do Canto *et al.*, 2012].

Pela tabela 9, podemos confirmar o dito anteriormente, que a adsorção dos péptidos leva a uma ordenação das membranas. No entanto nos sistemas de POPC:Chol, onde devia haver uma desordem dos sistemas, o sistema com o péptido SC35EK apresenta uma variação positiva o que vai contra o suposto. Isto pode dever-se ao péptido interagir mais fortemente com a membrana de POPC:Chol assumindo uma localização mais distante da superfície da membrana, levando a que esta seja submetida a uma menor compressão e os lípidos interagem com o péptido de maneira mais ordenada, pelo menos localmente.

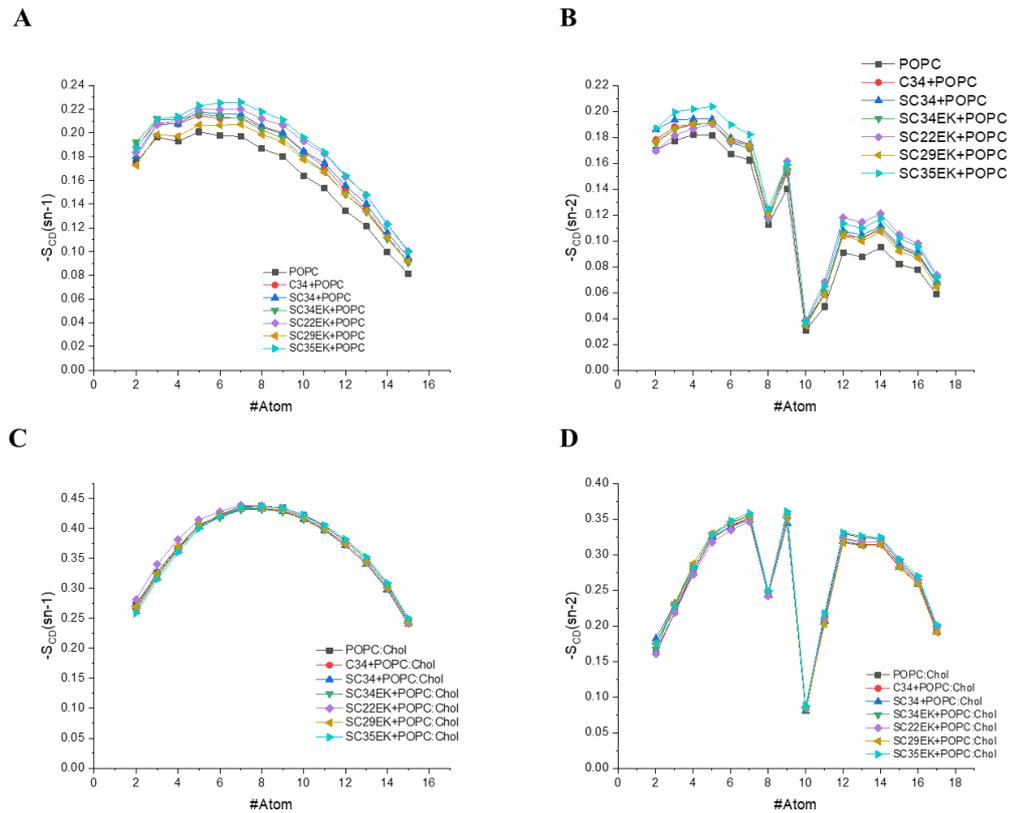


Figura 38- (A) Parâmetros de ordem das cadeias acilo $sn-1$ das membranas de POPC. (B) Parâmetros de ordem das cadeias acilo $sn-2$ das membranas de POPC. (C) Parâmetros de ordem das cadeias acilo $sn-1$ das membranas de POPC:Chol. (D) Parâmetros de ordem das cadeias acilo $sn-2$ das membranas de POPC:Chol.

3.5. Dinâmica rotacional dos eixos selecionados da membrana lipídica

À semelhança do descrito no tratamento geral dos péptidos, estudou-se a dinâmica rotacional, mas para vários eixos da membrana lipídica, eixo P-N (POPC, P8 \rightarrow N4), eixo $sn-1$ (C36 \rightarrow C49), eixo $sn-2$ (C17 \rightarrow CA1) e o eixo do colesterol (Chol, (C5 \rightarrow C21). Desta forma, os movimentos tanto na cabeça polar como nas regiões hidrofóbicas são abordados. Para este fim, as funções de autocorrelação rotacional $C(t)$, definidas como explicado no capítulo 2.8 do comportamento geral dos péptidos. Todas as funções $C(t)$ calculadas decaem para um valor residual, $C_{\infty} > 0$, provavelmente denotando uma rotação impedida [Lindahl & Edholm, 2001].

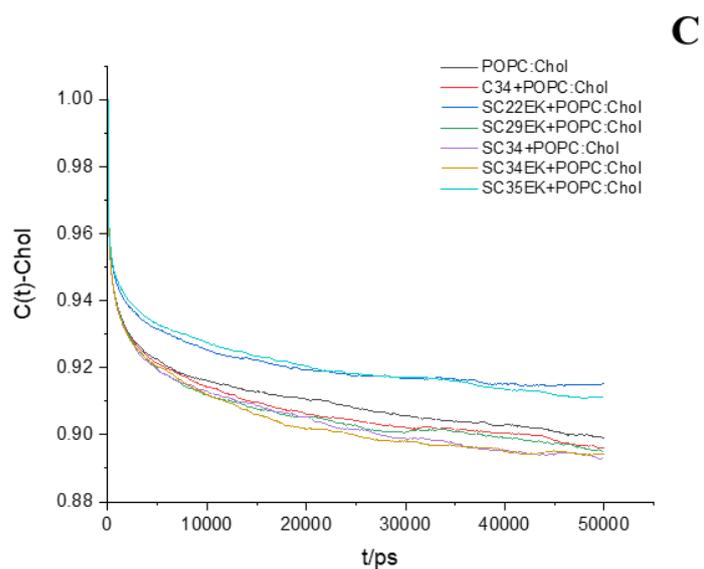
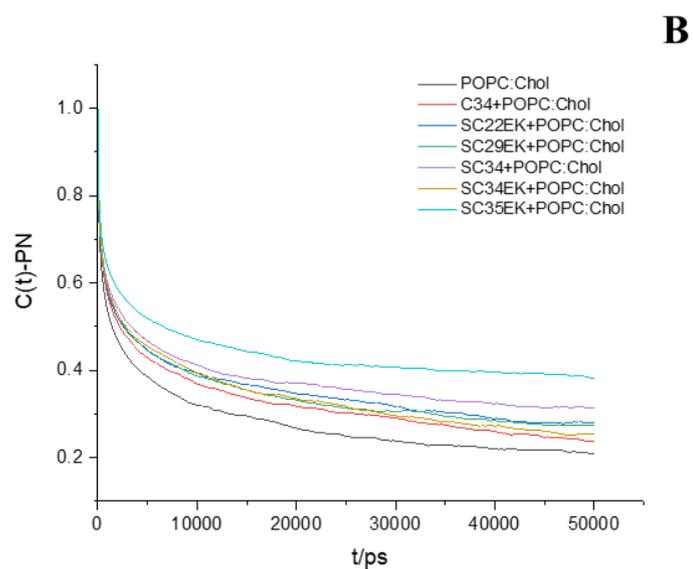
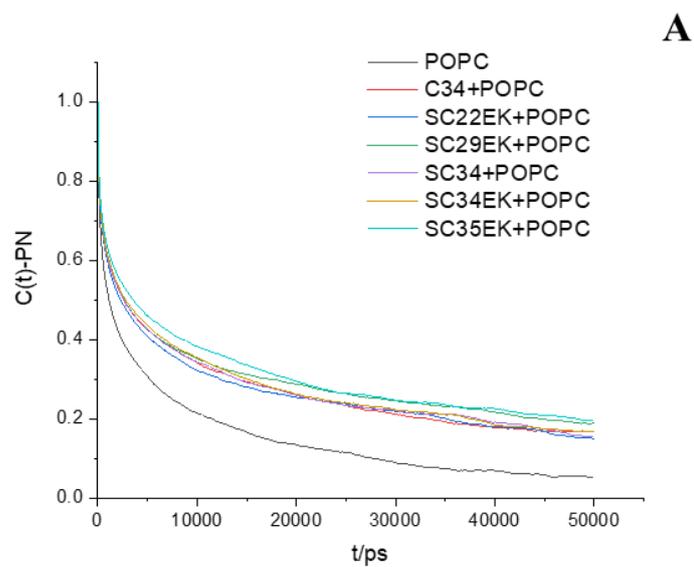


Figura 39- (A) Função de auto-correlação do eixo P-N para os sistemas de POPC. (B) Função de auto-correlação do eixo P-N para os sistemas de POPC:Chol. (C) Função de auto-correlação do eixo do colesterol para os sistemas de POPC:Chol.

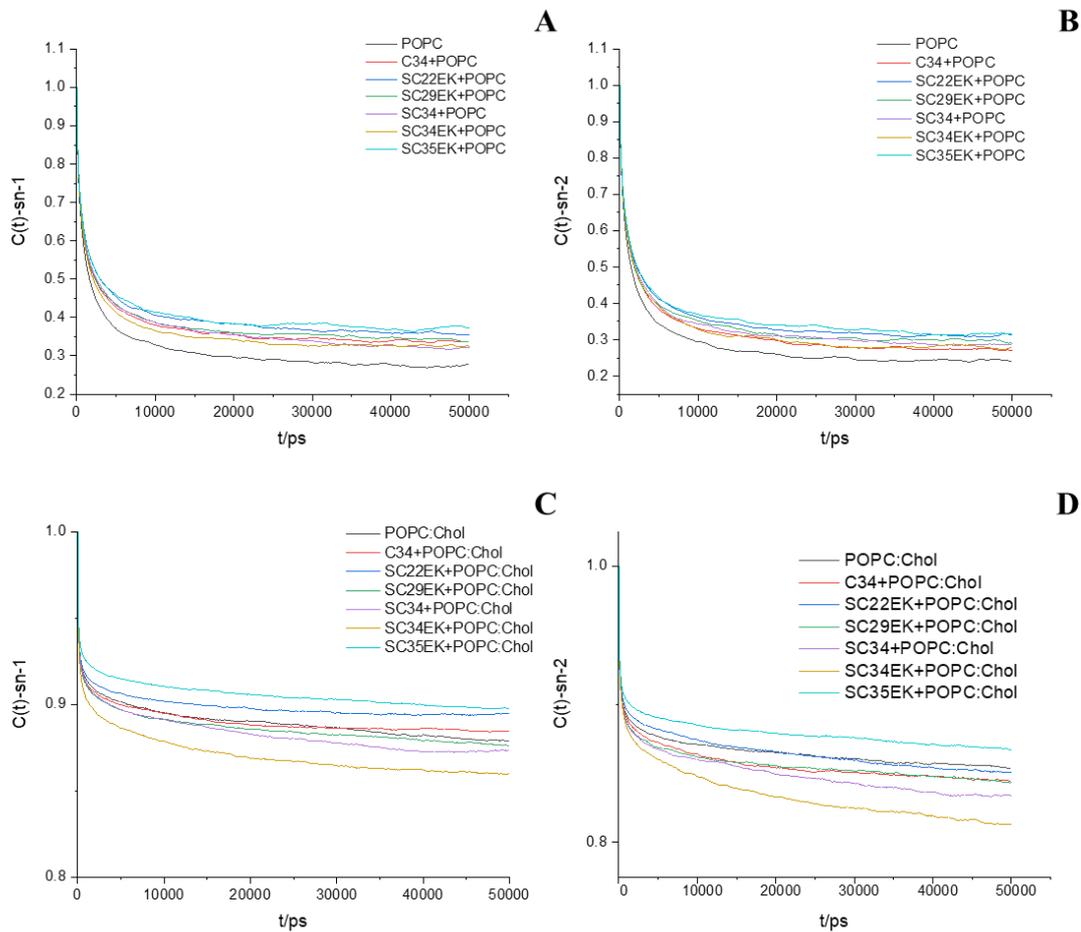


Figura 40- (A) Função de auto-correlação para o eixo sn-1 dos sistemas de POPC. (B) Função de auto-correlação para o eixo sn-2 dos sistemas de POPC. (C) Função de auto-correlação para o eixo sn-1 dos sistemas de POPC:Chol. (D) Função de auto-correlação para o eixo sn-2 dos sistemas de POPC:Chol.

Nos sistemas de POPC, as interações dos péptidos com as membranas causam um maior impedimento de movimentos rotacionais, como pode ser visto pela Figura 39-A. Esta restrição do movimento sugere que o péptido está adsorvido a bicamada, levando a que a interação entre as moléculas de POPC diminua e, conseqüentemente diminuído o movimento rotacional do eixo P-N na interface. No entanto, este efeito não se encontra restrito à interface, uma vez que um efeito similar é observado no eixo sn-1 e sn-2 no núcleo hidrofóbico das moléculas de POPC (Figura 39-A e B).

Nos sistemas de POPC:Chol, quanto ao movimento rotacional no eixo P-N, à semelhança do que acontece nos sistemas de POPC, existem restrições ao movimento da monocamada, causadas pela adsorção do péptido. No entanto, a dinâmica do colesterol, nestes mesmos sistemas (Figura 39-C), indica que o movimento rotacional é mais acelerado nos sistemas com os péptidos C34, SC29EK, SC34 e SC34EK do que nos sistemas com os outros dois péptidos. Este efeito é de maior magnitude na adsorção destes péptidos, o que implica uma correlação direta com o grau de interação do péptido com a membrana. Este efeito é apoiado pela função de autocorrelação rotacional do eixo sn-1 e sn-2 (Figura 40-C e D). Onde os péptidos SC29EK, SC34 e SC34EK, no eixo sn-1, têm uma função de autocorrelação que tende para valores inferiores, indicando uma rotação menos restrita do péptido. Quanto ao eixo da sn-2 dos sistemas de POPC:Chol observa-se que todos os sistemas com péptidos á exceção do sistema com o péptido SC35EK apresentam movimentos de rotação mais acelerados (função de autocorrelação rotacional tende para valores inferiores).

Dos péptidos referenciados nos sistemas de POPC:Chol, o que tende para valores mais baixos da função de autocorrelação rotacional é o péptido SC34EK. Estes não interagem muito com a membrana, tendo em conta a posição dos $C\alpha$ do péptido em relação a membrana, apresenta uma difusão lateral mais rápida que a da bicamada sem péptido e interage fortemente por pontes de hidrogénio com o POPC e com o Chol. Isto induz a que o colesterol tenha uma dinâmica mais rápida, interferindo assim com a dinâmica rotacional do núcleo da bicamada.

F. Conclusão

Era o objetivo desta tese contribuir para uma melhor compreensão do comportamento molecular dos péptidos (C34, SC34, SC22EK, SC29EK, SC34, SC34EK e SC35EK) inibidores de fusão e as suas propriedades físicas em modelos membranares de POPC e POPC:Chol. Os resultados aqui apresentados mostram que, uma vez os péptidos adsorvidos, as bicamadas apresentam diferentes comportamentos e sofrem modificações na sua estrutura e difusão, assim como os próprios péptidos. O trabalho desenvolvido teve como primeiro passo determinar o estado de equilíbrio de todos os sistemas simulados, bem como a maneira como os péptidos adsorvidos nas membranas influenciam o equilíbrio. Desta forma, procedeu-se a determinação da área por lípido de cada membrana e as respetivas espessuras de membrana. Estabeleceu-se que os sistemas de POPC com os péptidos inseridos apresentavam uma área inferior aos de POPC:Chol e que a espessura de membrana dos sistemas de POPC era inferior aos de POPC:Chol. Estas duas primeiras propriedades além, de nos terem permitido averiguar que todos os sistemas simulados se encontravam em equilíbrio permitiu, ainda verificar que o colesterol confere uma maior ordenação e, por consequente uma maior estabilidade às membranas, como era de esperar [Martins do Canto *et al.*, 2008; Martins do Canto *et al.*, 2011; Martins do Canto *et al.*, 2013].

Propriedades como, a distância ao centro de massa dos péptidos a superfície da membrana, a posição dos C_{α} e a densidade permitiram comprovar a adsorção dos péptidos as membranas de POPC e POPC:Chol. Em todos estes parâmetros observou-se que os péptidos adsorveram mais rapidamente às membranas de POPC do que às de POPC:Chol. As bicamadas de POPC estão num estado líquido desordenado, o que resulta numa maior permeabilidade e flexibilidade, permitindo uma adsorção mais rápida.

A forma como os certos péptidos inibidores de fusão se comportam em solução e a manutenção de estruturas helicoidais estáveis têm sido correlacionadas com o aumento da capacidade inibitória, destes péptidos, da fusão do HIV às células alvo [Dwyer *et al.*, 2007]. Pelo comportamento geral dos péptidos em estudo foi possível verificar a efetividade superior do péptido SC34EK em comparação com os outros e que esta diferença podia ser relacionada com a diferente capacidade de os péptidos interagirem com as membranas [Veiga *et al.*, 2004; Veiga *et al.*, 2004]. Esta diferença ficou clara quando comparamos as estruturas secundárias dos diferentes péptidos nas membranas, a

maioria dos péptidos quando adsorvidos às membranas aumentam a sua helicidade. As diferenças no aumento da formação de hélices têm a ver com as suas sequências de resíduos de aminoácidos, mas a diferença mais significativa parece ser a presença ou ausência de sequências características que os tornam capazes de interagir com as glicoproteínas virais, quer com os lípidos [Naito *et al.*, 2008].

Os resultados das pontes de hidrogénio, sugerem a maior eficiência dos péptidos como inibidores do HIV. As membranas do HIV são bastantes rígidas, devido ao alto teor em colesterol assim, consequentemente, um maior número de pontes de hidrogénio formadas com as membranas de POPC:Chol estabelece uma maior eficácia dos péptidos em estudo como inibidores de fusão. A variação da energia livre de Gibbs permitiu observar a espontaneidade dos processos. Foi possível, pelos resultados obtidos, perceber que o processo de todos os sistemas membranares simulados é reversível, permitindo que os péptidos desempenhem o seu papel de inibidores de fusão.

Ao analisarmos também as propriedades das membranas observou-se que a adsorção dos péptidos às membranas afeta a sua dinâmica, os coeficientes de difusão bem como os parâmetros de ordem.

Ao compararmos os resultados obtidos dos nossos péptidos com a atividade inibitória do péptido T-20 (Figura 8), como já sabido todos apresentam uma atividade inibitória superior. E comprova-se, com o estudo realizado, que o péptido SC34EK apresenta as melhores características e propriedades como inibidor de fusão do vírus HIV.

Com este conjunto de resultados, obtivemos uma melhor compreensão do comportamento dos péptidos nas membranas. Foi possível obter péptidos que adsorvidos nas membranas apresentavam uma estrutura modelo de helicidade elevada e que a dimensão do péptido influencia a sua capacidade inibitória. Um facto importante da capacidade inibitória dos péptidos foi descrito por Veiga e os seus colaboradores. De acordo com os resultados destes experimentalistas os inibidores de fusão que interagem mais fortemente com as membranas ficariam concentrados, preferencialmente, na interface celular, encontrando-se mais disponíveis para interferirem com o funcionamento das gp virais [Veiga *et al.*, 2004; Veiga *et al.*, 2004]. No entanto, os nossos péptidos não se inseriram nas membranas modelo. Outro facto que poderá ter influenciado esta ausência de inserção dos péptidos nas bicamadas foi a escala de tempo curta, quando comparada com a dos experimentalistas, limitando as nossas observações e obstruindo

processos que ocorrem numa escala de tempo mais longa. Com uma escala de tempo mais longa poderíamos ter a certeza, de forma inequívoca, que os sistemas teriam parado de evoluir ao fim do tempo de simulação imposto. Há que denotar, também que ao simularmos os péptidos isoladamente nos sistemas membranares poderemos estar a obstruir possíveis fenómenos de cooperação entre dois ou mais péptidos a agir em conjunto.

Em suma, este trabalho permite assim um olhar mais tangível a todo este processo de interação destes inibidores de fusão com as membranas e da interação diferencial que as caracteriza. Contudo, isto é somente um final de um capítulo de um livro extenso. É importante, no futuro, olhar com maior clarividência e pormenor para a amostragem, uma amostragem mais abrangente das condições iniciais poderá ser esclarecedora. Nas nossas simulações os péptidos começaram a ser solvatados a uma distância moderada da superfície de membrana (2,0-2,5 nm). Seria interessante o péptido, nas configurações iniciais, estar mais longe da membrana ou até mesmo adsorvido ou inserido na membrana, ajudando à compreensão dos fenómenos em que estes péptidos estão envolvidos.

Uma abordagem feita desta maneira pode então levar a exploração e otimização do desenvolvimento dos péptidos com helicidade e capacidade de interagir com membranas elevadas, aumentando assim a sua eficácia.

G.Referências

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., Lindahl, E. (2015).
- Ahmed, S., Brown, D. and London, E. (1997). On the Origin of Sphingolipid/Cholesterol-Rich Detergent-Insoluble Cell Membranes: Physiological Concentrations of Cholesterol and Sphingolipid Induce Formation of a Detergent-Insoluble, Liquid-Ordered Lipid Phase in Model Membranes. *Biochemistry*, 36(36), pp.10944-10953.
- Aittoniemi, J., Niemelä, P., Hyvönen, M., Karttunen, M. and Vattulainen, I. (2007). Insight into the Putative Specific Interactions between Cholesterol, Sphingomyelin, and Palmitoyl-Oleoyl Phosphatidylcholine. *Biophysical Journal*, 92(4), pp.1125-1137.
- Alder, B., & Wainwright, T. (1959). Studies in molecular dynamics. I. General studies. *J. Chem. Phys.*, 459.
- Allen, M. & Tildesley, D. (1990). *Computer simulation of liquids*. New York: Oxford University Press.
- Allen, M. P., & Tildesley, D. J. (2017). *Computer simulation of liquids: Second edition*. *Computer Simulation of Liquids: Second Edition*, 1–626.
- Anezo, C., de Vries, A., Holtje, H., Tieleman, D., & Marrink, S. (2003). Methodological issues in lipid bilayer simulations. *J. Phys. Chem.B*, 107, 9424-9433.
- Arts, E. & Hazuda, D. (2012). HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring*.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Bastos, C. (1997). A pesquisa médica, a SIDA e as clivagens da ordem mundial: uma proposta de antropologia da ciência. *Análise Social*, vol. xxxii (140), 75-111.
- Bartke, N. and Hannun, Y. (2008). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), pp.S91-S96.
- Baumketner, A. and Shea, J. (2005). The Influence of Different Treatments of Electrostatic Interactions on the Thermodynamics of Folding of Peptides†. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(45), pp.21322-21328.

Bekker, H., Berendsen, H. J. C., Dijkstra, E. J., Achterop, S., van Drunen, R., van der Spoel, D., Sijbers, A., Keegstra, H., Reitsma, B., Renardus, M. K. R. Gromacs: A parallel computer for molecular dynamics simulations. In *Physics Computing 92* (Singapore, 1993). de Groot, R. A., Nadrchal, J., eds. . World Scientific.

Benatar, S. R. (2002). The HIV/AIDS Pandemic: A Sign of Instability in a Complex Global System. *The Journal of Medicine and Philosophy*, 27(2), 163–177.

Berendsen, H. (2007). *Simulating the physical world*. Cambridge: Cambridge University Press.

Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D., van Drunen, R. (1995) GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp. Phys. Comm.* 91:43–56.

Berendsen, H., Postma, J., van Gunsteren, W., DiNola, A. and Haak, J. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8), pp.3684-3690.

Berendsen, H.J.C., (1988) Molecular Dynamics Simulations: The Limits and Beyond, in: *Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas*, Springer Verlag, pp. 3-36.

Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., Hermans, J. (1981) Intermolecular Forces, chapter Interaction models for water in relation to protein hydration, pp 331-342. Dordrecht: D. Reidel Publishing Company Dordrecht.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry* (2002). 5th edition. New York: W H Freeman. Section 12.3, There Are Three Common Types of Membrane Lipids.

Bhatti, A., Usman, M. and Kandi, V. (2016). Current Scenario of HIV/AIDS, Treatment Options, and Major Challenges with Compliance to Antiretroviral Therapy. *Cureus*.

Böckmann, R., Hac, A., Heimburg, T. and Grubmüller, H. (2003). Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer. *Biophysical Journal*, 85(3), pp.1647-1655.

Bois, Frederic Y. & Maszle, Don R., 1997. "[MCSim: A Monte Carlo Simulation Program](#)," [Journal of Statistical Software](#), Foundation for Open Access Statistics, vol. 2(i09).

- Branton, D. (1966). Fracture faces of frozen membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 55(5), pp.1048-1056.
- Brown, D., & London, E. (1997). Structure of detergent-resistant membrane domains: Does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Bioph Res Co*, 240, 1-7.
- Bussi, G., Donadio, D. and Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, 126(1), p.014101.
- Kuiken C, Leitner T, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Wolinsky S, & Korber B (2008). Eds. Published by Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, NM, LA-UR 08-03719.
- Casares, D., Escribá, P. and Rosselló, C. (2019). Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), p.2167.
- Chan, D. & Kim, P. (1998). HIV Entry and Its Inhibition. *Cell*, 93(5), pp.681-684.
- Chan, D., Fass, D., Berger, J. e Kim, P. (1997). Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein. *Cell*, 89(2), pp.263-273.
- Chang, D. & Hsu, C. (2007). Biophysical evidence of two docking sites of the carboxyl heptad repeat region within the amino heptad repeat region of gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Research*, 74(1), pp.51-58.
- Chatterjee, S., & S. Mayor. (2001). The GPI-anchor and protein sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:1969–1987.
- Cornell, B., & Keniry, M. (1983). The Effect of Cholesterol and Gramicidin-a' on the Carbonyl groups of Dimyristoylphosphatidylcholine Dispersions. *Biochimica Et Boiphysica Acta*, 732, 705-710.
- Coskun, U., Grzybek, M., Drechsel, D. e Simons, K. (2011). Regulation of human EGF receptor by lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), pp.9044-9048.
- Craven, B. (1979). Pseudosymmetry in cholesterol monohydrate. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 35(5), pp.1123-1128.

Damjanovich, S., Vereb, G., Schaper, A., Jenei, A., Matko, J., Starink, J., Fox, G., Arndt-Jovin, D. e Jovin, T. (1995). Structural hierarchy in the clustering of HLA class I molecules in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(4), pp.1122-1126.

Danielli, J. & Davson, H. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 5(4), pp.495-508.

Danielson, C. & Hope, T. (2009). Imaging of HIV/Host Protein Interactions. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp.103-123.

Darden, T., York, D. & Pedersen, L. (1993). Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems, *J Chem Phys*, 98, 10089-10092.

de Almeida, R. & Loura, L (2004) Tópicos de Biofísica de Membranas, LIDEL, Lisboa.

de Kroon, A., Rijken, P. e De Smet, C. (2013). Checks and balances in membrane phospholipid class and acyl chain homeostasis, the yeast perspective. *Progress in Lipid Research*, 52(4), pp.374-394.

de Meyer, F. & Smit, B. (2009). Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), pp.3654-3658.

Demel, R. A., Bruckdorfer, K. R., & Van Deenen, L. L. M. (1972). *The effect of sterol structure on the permeability of lipomes to glucose, glycerol and Rb+*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 255(1), 321–330.doi:10.1016/0005-2736(72)90031-4

Desai, M., Dikshit, R. and Iyer, G. (2012). Antiretroviral drugs: Critical issues and recent advances. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(3), p.288.

Dimova, R., Pouligny, B., & Dietrich, C. (2000). *Pretransitional Effects in Dimyristoylphosphatidylcholine Vesicle Membranes: Optical Dynamometry Study*. *Biophysical Journal*, 79(1), 340–356.doi:10.1016/s0006-3495(00)76296-5

Dwyer, J., Wilson, K., Davison, D., Freel, S., Seedorff, J., Wring, S., Tvermoes, N., Matthews, T., Greenberg, M. and Delmedico, M. (2007). Design of helical, oligomeric

HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(31), pp.12772-12777.

Edidin, M. (2003). The state of lipids rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Bioph Biom*, 32 , 257-283.

Edidin, M., Zuniga, M., & Sheetz, M. (1994). Truncation Mutants Define and Locate Cytoplasmic Barriers to Lateral Mobility of Membrane-Glycoproteins. *P Natl Acad Sci USA*, 91, 3378-3382

Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M., Darden, T., Lee, H. & Pedersen, L. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(19), pp.8577-8593.

Ewald, P (1921). "Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale". *Ann. Phys.* **369** (3): 253–287

Feigenson, G. (2006). Phase behavior of lipid mixtures. *Nature Chemical Biology*, 2(11), pp.560-563.

Feigenson, G. (2009). Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(1), pp.47-52.

Freed, E. (2001). *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 26(1/6), pp.13-33.

Frenkel, D. and Smit, B. (2002). *Understanding molecular simulation*. San Diego: Academic Press.

Friedrich, B., Dziuba, N., Li, G., Endsley, M., Murray, J. and Ferguson, M. (2011). Host factors mediating HIV-1 replication. *Virus Research*, 161(2), pp.101-114.

Garcia, J. and Miller, A. (1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature*, 350(6318), pp.508-511.

Gennis, R. (1989). Biomembranes. *Springer Advanced Texts in Chemistry*.

German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup ‘Assessment of Pathogens Transmissible by Blood’ (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3), pp.203-222.

Goluszko, P., & Nowicki, B. (2005). *MINIREVIEWS Membrane Cholesterol : a Crucial Molecule Affecting Interactions of Microbial Pathogens with Mammalian Cells*. 73(12), 7791–7796.

González, M. (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique de la Société Française de la Neutronique*, 12, pp.169-200.

Gorter, E. e Grendal, F. (1925). ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *Journal of Experimental Medicine*, 41(4), pp.439-443.

Gray RH, Kigozi G, Serwadda D, Makumbi F, Watya S, Nalugoda F, Kiwanuka N, Moulton LH, Chaudhary MA, Chen MZ, et al. 2007. Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: A randomised trial. *Lancet* 369: 657–666

Gri, G., Molon, B., Manes, S., Pozzan, T. and Viola, A. (2004). The inner side of T cell lipid rafts. *Immunol. Lett.* 94, 247-252.

GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2:19–25.

Guidotti, G. (1972). The Composition of Biological Membranes. *Archives of Internal Medicine*, 129(2), p.194.

Gupta, N. and DeFranco, A. (2007). Lipid rafts and B cell signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(5), pp.616-626.

H.R. Gelderblom, H.R. (1997) Fine structure of HIV and SIV, in: Robert Koch-Institut, Nordufer 20, D-13353 Berlin, Germany.

Hairer, E. and Stoffer, D. (1997). Reversible Long-Term Integration with Variable Stepsizes. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 18(1), pp.257-269.

Hansson, T., Oostenbrink, C., & Gunsteren, W. F. Van. (2002). *Molecular dynamics simulations Hansson, Oostenbrink and van Gunsteren* 191. 190–196.

Harbor Perspectives in Medicine, 2(4), pp.a007161-a007161.

Harold, F. M. (2015). In Search of Cell History. In *In Search of Cell History*.
<https://doi.org/10.7208/chicago/9780226174310.001.0001>

Harvey, S., Tan, R. and Cheatham, T. (1998). The flying ice cube: Velocity rescaling in molecular dynamics leads to violation of energy equipartition. *Journal of Computational Chemistry*, 19(7), pp.726-740.

Hernandez-Vargas, E. A. (2019). Modeling HIV Infection. In E. Sánchez (Ed.), *Modeling and Control of Infectious Diseases in the Host* (pp. 105–127).

Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. and Fraaije, J. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12), pp.1463-1472.

Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., Lindahl, E. (2008) GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* 4(3):435–447.

Hiscott, J., Kwon, H. and Génin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- κ B pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 107(2), pp.143-151.

Hockney, R. (1970). The potential calculation and some applications in: *Methods in Computational Physics*, 1970, pp. 136–211.

Hockney, R. W. & Eastwood, J. W. (1981). “Computer Simulation Using Particles,” McGraw-Hill, New York.

Hoover, W. (1985). Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A*, 31(3), pp.1695-1697.

Huang, K. (1987). *Statistical mechanics*. New York: Wiley.

Hui, S. and He, N. (1983). Molecular organization in cholesterol-lecithin bilayers by x-ray and electron diffraction measurements. *Biochemistry*, 22(5), pp.1159-1164.

- Iacob, S., Iacob, D. and Jugulete, G. (2017). Improving the Adherence to Antiretroviral Therapy, a Difficult but Essential Task for a Successful HIV Treatment—Clinical Points of View and Practical Considerations. *Frontiers in Pharmacology*, 8.
- Jacobson, K., Liu, P. and Lagerholm, B. (2019). The Lateral Organization and Mobility of Plasma Membrane Components. *Cell*, 177(4), pp.806-819.
- Janes, P., Ley, S., Magee, A. and Kabouridis, P. (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Seminars in Immunology*, 12(1), pp.23-34.
- Jorgensen, W., & Tirado-Rives, J. (1988). The Opls Potencail Functions for Proteins - Energy Minimizations for Chrystals of Cyclic-Peptides and Crambin. *J Am Chem Soc*, 110, 16757-1666.
- Jorgensen, W., Chandrasekhar, J., Madura, J., Impey, R. and Klein, M. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), pp.926-935.
- Jorgensen, W., Madura, J., & Swenson, C. (1984). Optimized Intermolecular Potencial Functions for Lipid Hydrocarbons. *J An Chem Soc*, 106, 6638-6646.
- Kästner, J. (2011). Umbrella sampling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(6), pp.932-942.
- Kabsch, W., Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.
- Kim, H. S., Kim, J. H., Cha, S. H., & Cho, S. (2019). Optimal determination of force field parameters for reduced molecular dynamics model. *Computer Physics Communications*, 236, 86–94.
- Kim, S., Pang, H. and Kay, M. (2008). Peptide Mimic of the HIV Envelope gp120–gp41 Interface. *Journal of Molecular Biology*, 376(3), pp.786-797.
- Kleinzeller, A. (1997). Ernest Overton's Contribution to the Cell Membrane Concept: A Centennial Appreciation. *Physiology*, 12(1), pp.49-53.

- Koshizuka, S., Shibata, K., Kondo, M., & Matsunaga, T. (2018). *Boundary Conditions. Moving Particle Semi-Implicit Method*.
- Krambovitis, E., Porichis, F. & Spandidos, D. (2005). HIV entry inhibitors: a new generation of antiretroviral drugs. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(10), pp.1165-1173.
- Kranenburg, M., & Smit, B. (2005). *Phase Behavior of Model Lipid Bilayers†. The Journal of Physical Chemistry B*, 109(14), 6553–6563.
- Kuo, A. and Wade, C. (1979). Lipid lateral diffusion by pulsed nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 18(11), pp.2300-2308.
- Kusumi, A., & Sako, Y. (1996). Cell surface organization by the membrane skeleton. *Current opinion in Cell Biology*, 8, 566-574.
- Kusumi, A., Sako, Y. and Yamamoto, M. (1993). Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophysical Journal*, 65(5), pp.2021-2040.
- Leach, R. (2001). *Molecular Modeling: Principles and applications*, 2nd ed.(PearsonPrentice Hall, England).
- Lindahl, E. and Edholm, O. (2001). Molecular dynamics simulation of NMR relaxation rates and slow dynamics in lipid bilayers. *The Journal of Chemical Physics*, 115(10), pp.4938-4950.
- Lindahl, E., & Edhom, O. (2001). Molecular dynamics simulation of NMR relaxation rates and slow dynamics in lipid bilayers. *J. Chem. Phys.*, 115, 4938-4950.
- Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D. (2001). GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.* 7:306–317.
- Liu, H., Mueller-Plathe, F. and van Gunsteren, W. (1995). A Force Field for Liquid Dimethyl Sulfoxide and Physical Properties of Liquid Dimethyl Sulfoxide Calculated Using Molecular Dynamics Simulation. *Journal of the American Chemical Society*, 117(15), pp.4363-4366.

- Liu, J., Dietz, T., Carpenter, S., Alberti, M., Folke, C., Moran, E., Pell, A., Deadman, P., Kratz, T., Lubchenco, J., Ostrom, E., Ouyang, Z., Provencher, W., Redman, C., Schneider, S. and Taylor, W. (2007). Complexity of Coupled Human and Natural Systems. *Science*, 317(5844), pp.1513-1516.
- Liu, S., Lu, H., Niu, J., Xu, Y., Wu, S. and Jiang, S. (2005). Different from the HIV Fusion Inhibitor C34, the Anti-HIV Drug Fuzeon (T-20) Inhibits HIV-1 Entry by Targeting Multiple Sites in gp41 and gp120. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), pp.11259-11273.
- Lobritz, M., Ratcliff, A. and Arts, E. (2010). HIV-1 Entry, Inhibitors, and Resistance. *Viruses*, 2(5), pp.1069-1105.
- Lombard, J. (2014). Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biology Direct*, 9(1).
- London, E. (2015). Lipid Rafts/Membrane Rafts. In *Encyclopedia of Cell Biology* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.10026-4>
- Lorizate, M., Sachsenheimer, T., Glass, B., Habermann, A., Gerl, M. J., Kräusslich, H.-G., & Brügger, B. (2013). Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines. *Cellular Microbiology*, 15(2), 292–304.
- Loura, L., & Almeida, R. (2004). *Tópicos de Biofísica de membranas*. LIDEL- Edições Técnicas Lda.
- Mackerell, A., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R., Evanseck, J., Field, M., . . . Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecule modeling and Dynamics studies of proteins. *J. Phys Chem B*, 102, 3586-3616
- Maluwa, M., Aggleton, P., & Parker, R. (2002). HIV- and AIDS-Related Stigma, Discrimination, and Human Rights: A Critical Overview. *Health and Human Rights*.
- Marrink, S., de Vries, A., & Tieleman, D. (2009). Lipids on the move: Simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. *Biochim. Biophys. Acta Biomem.* 1788, 149-168.

Marsh, D. (2007). Lateral Pressure Profile, Spontaneous Curvature Frustration, and the Incorporation and Conformation of Proteins in Membranes. *Biophysical Journal*, 93(11), pp.3884-3899.

Martínez-Ballesta, M. and Carvajal, M. (2016). Mutual Interactions between Aquaporins and Membrane Components. *Frontiers in Plant Science*, 7.

Martinez-Seara, H., Róg, T., Pasenkiewicz-Gierula, M., Vattulainen, I., Karttunen, M. and Reigada, R. (2008). Interplay of Unsaturated Phospholipids and Cholesterol in Membranes: Effect of the Double-Bond Position. *Biophysical Journal*, 95(7), pp.3295-3305.

Martins do Canto, A., Carvalho, A., Ramalho, J. and Loura, L. (2011). Molecular dynamics simulations of T-20 HIV fusion inhibitor interacting with model membranes. *Biophysical Chemistry*, 159(2-3), pp.275-286.

Martins do Canto, A., Carvalho, A., Ramalho, J. and Loura, L. (2013). Effect of Amphipathic HIV Fusion Inhibitor Peptides on POPC and POPC/Cholesterol Membrane Properties: A Molecular Simulation Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), pp.14724-14743.

Martins do Canto, A., Palace Carvalho, A., Prates Ramalho, J., & Loura, L. (2011). Molecular dynamics of T-20 HIV fusion inhibitor interacting with model membranes. *Biophysical Chemistry* 159, pp. 275-286.

Martins do Canto, A., Palace Carvalho, A., Prates Ramalho, J., & Loura, L. (2012). Molecular dynamics of HIV fusion inhibitor T-1249: Insights on peptide-lipid interaction. *Comp. Math. Methods*, 2012.

Martins do Canto, A., Robalo, J., Santos, P., Carvalho, A., Ramalho, J. e Loura, L. (2016). Diphenylhexatriene membrane probes DPH and TMA-DPH: A comparative molecular dynamics simulation study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(11), pp.2647-2661.

Martins do Canto, A.M., Palace Carvalho, A., Prates Ramalho, J. and Loura, L. (2008). T-20 and T-1249 HIV fusion inhibitors' structure and conformation in solution: a molecular dynamics study. *Journal of Peptide Science*, 14(4), pp.442-447.

- Martoňák, R., Laio, A., & Parrinello, M. (2003). Predicting Crystal Structures: The Parrinello-Rahman Method Revisited. *Physical Review Letters*, 90(7).
- Mavioso, I. C. V. C., de Andrade, V. C. R., Palace Carvalho, A. J., & Martins do Canto, A. M. T. (2017). Molecular dynamics simulations of T-2410 and T-2429 HIV fusion inhibitors interacting with model membranes: Insight into peptide behavior, structure and dynamics. *Biophysical Chemistry*, 228(July), 69–80.
- McCammon, J., Gelin, B. and Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267(5612), pp.585-590.
- McGovern, S.L., Caselli, E., Grigorieff, N., Shoichet, E.K. (2002). A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *Journal of Medical Chemistry*, 45 (8):1712-22.
- Memon, M., Hockney, & Mitra, S. (1981). *Molecular dynamics with constraints. Journal of Computational Physics*, 43(2), 345–356.
- Migueles, S. A., Tilton, J. C., and Connors, M. (2006). Qualitative host factors associated with immunological control of HIV infection by CD8 T cells. *Curr. Opin. HIV AIDS* 1, 28–33.
- Mitchell, P. (1957). A General Theory of Membrane Transport from Studies of Bacteria. *Nature*, 180(4577), pp.134-136.
- Miyamoto, F. and Kodama, E. (2012). Novel HIV-1 Fusion Inhibition Peptides: Designing the Next Generation of Drugs. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 22(4), pp.151-158.
- Miyamoto, S. and Kollman, P. (1992). Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of Computational Chemistry*, 13(8), pp.952-962.
- Mo, H., Konstantinidis, A., Stewart, K., Dekhtyar, T., Ng, T., Swift, K., Matayoshi, E., Kati, W., Kohlbrenner, W. and Molla, A. (2004). Conserved residues in the coiled-coil pocket of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are essential for viral replication and interhelical interaction. *Virology*, 329(2), pp.319-327.

- Monticelli, L. & Tieleman, D. (2012). Force Fields for Classical Molecular Dynamics. *Methods in Molecular Biology*, pp.197-213.
- Moor, H. (1963). FINE STRUCTURE IN FROZEN-ETCHED YEAST CELLS. *The Journal of Cell Biology*, 17(3), pp.609-628.
- Moreira, C. (2014), *Revista de Ciência Elementar*, 2(02):0062
- Naito, T., Izumi, K., Kodama, E., Sakagami, Y., Kajiwara, K., Nishikawa, H., Watanabe, K., Sarafianos, S., Oishi, S., Fujii, N. and Matsuoka, M. (2008). SC29EK, a Peptide Fusion Inhibitor with Enhanced-Helicity, Inhibits Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutants Resistant to Enfuvirtide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), pp.1013-1018.
- Namba, A. M., Da Silva, V. B., & Da Silva, C. H. T. P. (2008). Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, 33(4), 13–24.
- Needham, D., McIntosh, T. and Evans, E. (1988). Thermomechanical and transition properties of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biochemistry*, 27(13), pp.4668-4673.
- Nishikawa, H., Nakamura, S., Kodama, E., Ito, S., Kajiwara, K., Izumi, K., Sakagami, Y., Oishi, S., Ohkubo, T., Kobayashi, Y., Otaka, A., Fujii, N. and Matsuoka, M. (2009). Electrostatically constrained α -helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(4), pp.891-899.
- Norberg, J. & Nilsson, L. (2003). Advances in biomolecular simulations: methodology and recent applications. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 36(3), pp.257-306.
- Nosé, S. (1984). A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of Chemical Physics*, 81(1), pp.511-519.
- Ogata, K., Yuki, T., Hatakeyama, M., Uchida, W. and Nakamura, S. (2013). All-Atom Molecular Dynamics Simulation of Photosystem II Embedded in Thylakoid Membrane. *Journal of the American Chemical Society*, 135(42), pp.15670-15673.

Oishi, S., Watanabe, K., Ito, S., Tanaka, M., Nishikawa, H., Ohno, H., Shimane, K., Izumi, K., Sakagami, Y., Kodama, E., Matsuoka, M., Asai, A. and Fujii, N. (2010). Affinity selection and sequence-activity relationships of HIV-1 membrane fusion inhibitors directed at the drug-resistant variants. *MedChemComm*, 1(4), p.276.

Olsson, N. and Salem, N. (1997). Molecular species analysis of phospholipids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 692(2), pp.245-256.

Otaka, A., Nakamura, M., Nameki, D., Kodama, E., Uchiyama, S., Nakamura, S., Nakano, H., Tamamura, H., Kobayashi, Y., Matsuoka, M. and Fujii, N. (2002). Remodeling of gp41-C34 Peptide Leads to Highly Effective Inhibitors of the Fusion of HIV-1 with Target Cells We thank Dr. Terrence R. Burke, Jr., NCI, NIH, Frederick, MD 21702-1201, for proofreading the manuscript and providing useful comments. This research was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, the Japan Society for the Promotion of Science, and the Japan Health Science Foundation. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(16), p.2937.

Páll, S., Abraham, M. J., Kutzner, C., Hess, B., Lindahl, E. (2015) Tackling exascale software challenges in molecular dynamics simulations with GROMACS. In: Solving Software Challenges for Exascale. Vol. 8759. Markidis, S., Laure, E. eds. Vol. 8759. Springer International Publishing Switzerland London 2015 3–27.

Pancera, M., Majeed, S., Ban, Y., Chen, L., Huang, C., Kong, L., Kwon, Y., Stuckey, J., Zhou, T., Robinson, J., Schief, W., Sodroski, J., Wyatt, R. and Kwong, P. (2009). Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), pp.1166-1171.

Parrinello, M. & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52(12), pp.7182-7190.

Parton, R. G. and Richards, A. A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4, 724-738.

Patra, M., Karttunen, M., Hyvönen, M., Falck, E. and Vattulainen, I. (2004). Lipid Bilayers Driven to a Wrong Lane in Molecular Dynamics Simulations by Subtle

Changes in Long-Range Electrostatic Interactions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(14), pp.4485-4494.

Patra, M., Karttunen, M., Hyvönen, M., Falck, E., Lindqvist, P. and Vattulainen, I. (2003). Molecular Dynamics Simulations of Lipid Bilayers: Major Artifacts Due to Truncating Electrostatic Interactions. *Biophysical Journal*, 84(6), pp.3636-3645.

Payne, S. (2017). Replication and Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus. *Viruses*, 303–320. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803109-4.00037-4>

Pike, L. (2008). The challenge of lipid rafts. *Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), pp.S323-S328.

Pollard, V. and Malim, M. (1998). THE HIV-1 REV PROTEIN. *Annual Review of Microbiology*, 52(1), pp.491-532.

Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B., Lindahl, E. (2013) GROMACS 4.5: a highthroughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* 29(7):845–854.

Rahman, A., & Stlinger, F. (1971). Molecular dynamics study of liquid water. *J. Chem. Phys.*, 60, 3336-&

Rajendran, L. and Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science*, 118(6), pp.1099-1102.

Rapaport, D. (2004). *The art of molecular dynamics simulation*. Cambridge: Cambridge University Press.

Róg, T., Murzyn, K. and Pasenkiewicz-Gierula, M. (2003). Molecular dynamics simulations of charged and neutral lipid bilayers: treatment of electrostatic interactions. *Acta Biochimica Polonica*, 50(3), pp.789-798.

Róg, T., Pasenkiewicz-Gierula, M., Vattulainen, I. and Karttunen, M. (2009). Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(1), pp.97-121.

- Ryckaert, J., Ciccotti, G. and Berendsen, H. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23(3), pp.327-341.
- Schlick, T. (2010). *Molecular modeling and simulation*. New York: Springer.
- Schwartz, O., Maréchal, V., Gall, S., Lemonnier, F. and Heard, J. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine*, 2(3), pp.338-342.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S. and Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(6), pp.361-374.
- Shaw, G. and Hunter, E. (2012). HIV Transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), pp.a006965-a006965.
- Shaw, G. M., & Hunter, E. (2012). *HIV Transmission. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a006965–a006965.
- Sheets, E. D., Holowka, D., & Baird, B. (1999). Membrane organization in immunoglobulin E receptor signaling. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(1), 95-99.
- Shi, S., Nguyen, P., Cabral, H., Diez-Barroso, R., Derry, P., Kanahara, S. and Kumar, V. (2016). Development of peptide inhibitors of HIV transmission. *Bioactive Materials*, 1(2), pp.109-121.
- Shieh, H., Hoard, L. and Nordman, C. (1981). The structure of cholesterol. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 37(8), pp.1538-1543.
- Shimura, K., Nameki, D., Kajiwara, K., Watanabe, K., Sakagami, Y., Oishi, S., Fujii, N., Matsuoka, M., Sarafianos, S. and Kodama, E. (2010). Resistance Profiles of Novel Electrostatically Constrained HIV-1 Fusion Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50), pp.39471-39480.

- Simons, K. and Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110(5), pp.597-603.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), pp.569-572.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), pp.31-39.
- Simons, K. and Vaz, W. L. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 269-295.
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572.
- Simons, K., & Vaz, W. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 33, 269-295
- Singer, S. (1974). The Molecular Organization of Membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 43(1), pp.805-833.
- Singer, S. and Nicolson, G. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, 175(4023), pp.720-731.
- Skeel, R. (1995). Numerical Hamiltonian Problems (J. M. Sanz-Serna and M. P. Calvo). *SIAM Review*, 37(2), pp.277-279.
- Stumptner-Cuvelette, P., Morchoisne, S., Dugast, M., Le Gall, S., Raposo, G., Schwartz, O. and Benaroch, P. (2001). HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), pp.12144-12149
- Sugár, I. P., & Biltonen, R. L. (2005). *Lateral Diffusion of Molecules in Two-Component Lipid Bilayer: A Monte Carlo Simulation Study. The Journal of Physical Chemistry B*, 109(15), 7373–7386. doi:10.1021/jp045669x
- Tanford C. (1973). The Hydrophobic Effect. Formation of Micelles and Biological Membranes. New York: Wiley.
- Thompson, M.A.(2004). ArgusLab 4.0.1. , in, Planaria Software LLC., Seattle, WA.

- Tuckerman, M., Berne, B. and Martyna, G. (1992). Reversible multiple time scale molecular dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, 97(3), pp.1990-2001.
- UNAIDS. (2018). UNAIDS DATA 2018. Obtido de UNAIDS: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/unaids-data-2018_en.pdf
- Vahlne, A. (2009). A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology*, 6(1).
- Van Buuren, A. e Berendsen, H. (1993). Molecular dynamics simulation of the stability of a 22-residue α -helix in water and 30% trifluoroethanol. *Biopolymers*, 33(8), pp.1159-1166.
- van Buuren, A., Marrink, S. and Berendsen, H. (1993). A molecular dynamics study of the decane/water interface. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(36), pp.9206-9212.
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., Berendsen, H. J. C. (2005) GROMACS: Fast, Flexible and Free. *J. Comp. Chem.* 26:1701–1718.
- van der Spoel, D., van Buuren, A., Tieleman, D. and Berendsen, H. (1996). Molecular dynamics simulations of peptides from BPTI: A closer look at amide—aromatic interactions. *Journal of Biomolecular NMR*, 8(3), pp.229-238.
- van Gunsteren, W., & Berendsen, H. (1987). Gromos-87 Manual. *Biomos BV, Groningen, The Netherlands*.
- van Gunsteren, W., Daura, X., & Mark, A. (1998). Gromos force field. *Enciclopedia of Computational Chemistry*, Wiley, 1211-1216.
- Van Gunsteren, W.F. e Berendsen H.J.C. (1987). Gromos-87 Manual, (Biomos BV, Groningen, The Netherlands).
- van Meer, G. and de Kroon, A. (2010). Lipid map of the mammalian cell. *Journal of Cell Science*, 124(1), pp.5-8.
- Vaz, W. (2008). Lipid Bilayers: Properties. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*.

- Veiga, A., Santos, N., Loura, L., Fedorov, A. and Castanho, M. (2004). HIV Fusion Inhibitor Peptide T-1249 Is Able To Insert or Adsorb to Lipidic Bilayers. Putative Correlation with Improved Efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, 126(45), pp.14758-14763.
- Veiga, S., Henriques, S., Santos, N. & Castanho, M. (2004). Putative role of membranes in the HIV fusion inhibitor enfuvirtide mode of action at the molecular level. *Biochemical Journal*, 377(1), pp.107-110.
- Vereb, G., Szöllösi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vígh, L., Mátyus, L., Waldmann, T. and Damjanovich, S. (2003). Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), pp.8053-8058.
- Verlet, L. (1967). Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, 159(1), pp.98-103.
- Voet, D., & Judith G., V. (2013). *Bioquímica* (4th edition). [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... et al.] ; revisão técnica: Carlos Termignoni ... [et al.]. - 4. ed. - Dados eletrônicos. -Porto Alegre: Artmed.
- Watson, H. (2015). Biological membranes. *Essays In Biochemistry*, 59(0), pp.43-69.
- Weiner, S., Kollman, P., Case, D., Singh, U., Ghio, C., Alagona, G., . . . Weiner, P. (1984). A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic-acids and proteins. *J Am Chem Soc*, 106, 765-784.
- Whiteside, A. (2008). *HIV A very short Introduction*. Oxford: Oxford University Press.pp
- Wormser, G. (2004). *AIDS and other manifestations of HIV infection*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp.53-100.
- Wu, X., Liu, Z., Ding, X., Yu, D., Wei, H., Qin, B., Zhu, Y., Chong, H., Cui, S. and He, Y. (2018). Mechanism of HIV-1 Resistance to an Electronically Constrained α -Helical Peptide Membrane Fusion Inhibitor. *Journal of Virology*, 92(7).

Wyatt, R., Kwong, P., Desjardins, E., Sweet, R., Robinson, J., Hendrickson, W. and Sodroski, J. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*, 393(6686), pp.705-711.

Yeagle, P. L. (2016). *The Membranes of Cells The Membranes of Cells Third Edition*.

Zhao, G., Perilla, J., Yufenyuy, E., Meng, X., Chen, B., Ning, J., Ahn, J., Gronenborn, A., Schulten, K., Aiken, C. and Zhang, P. (2013). Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature*, 497(7451), pp.643-646.

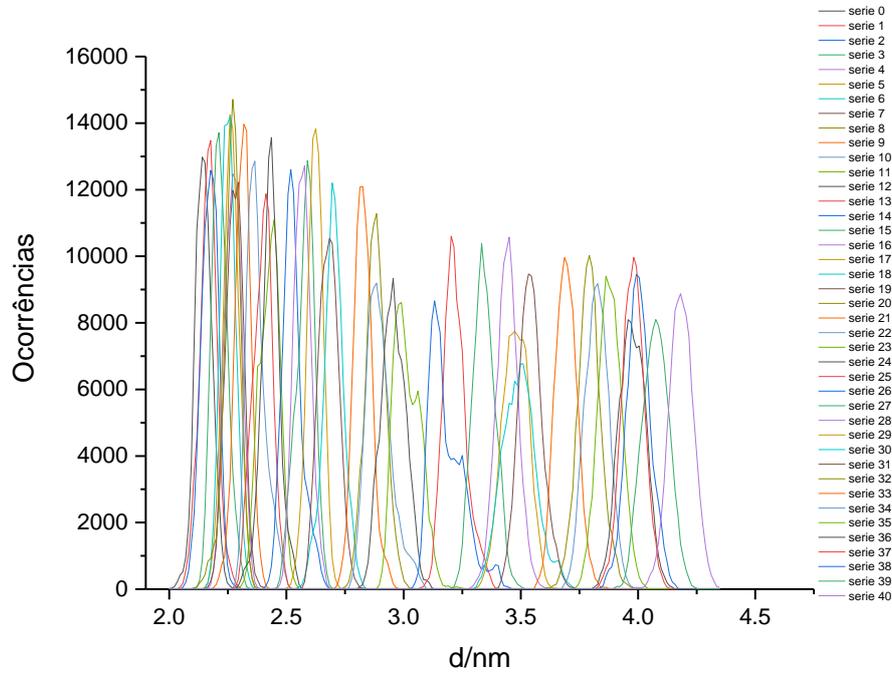
Zheng, L., Alhossary, A. A., Kwoh, C.-K., & Mu, Y. (2019). Molecular Dynamics and Simulation. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, (V), 550–566.

Zheng, Y., Lovsin, N. and Peterlin, B. (2005). Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunology Letters*, 97(2), pp.225-234.

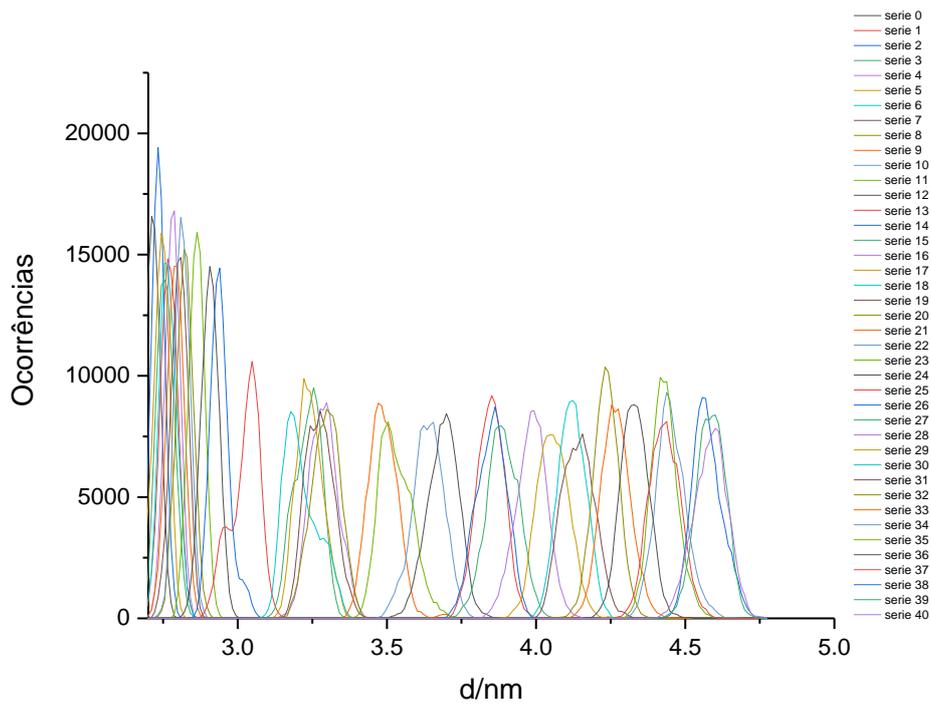
Zwaal, R., Comfurius, P. and van Deenen, L. (1977). Membrane asymmetry and blood coagulation. *Nature*, 268(5618), pp.358-360.

H. Anexos

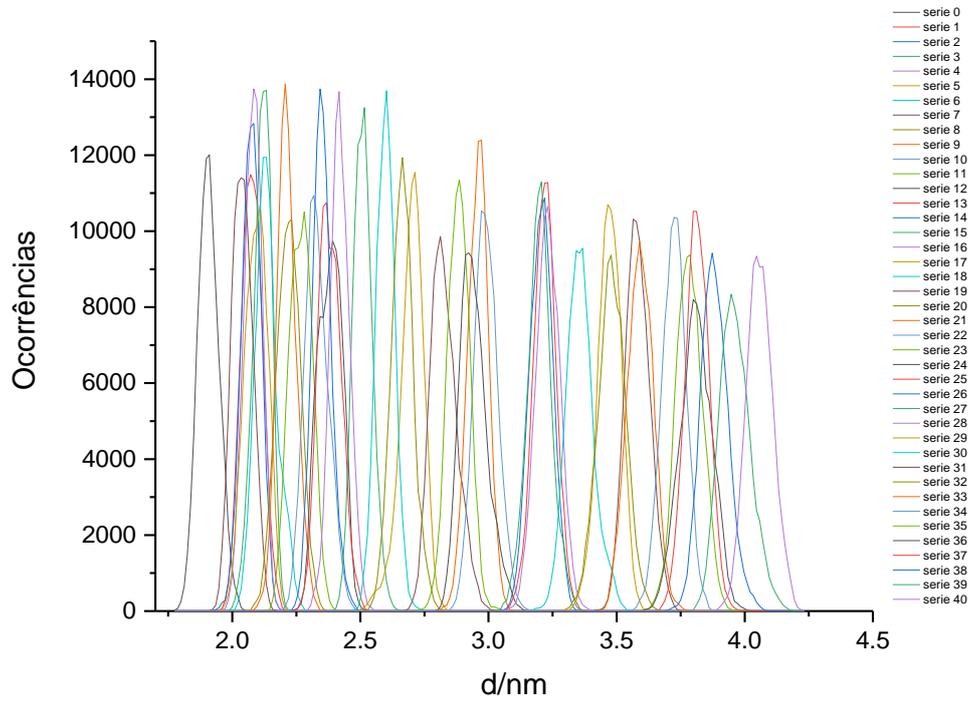
Anexo I- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido C34 no sistema de POPC.



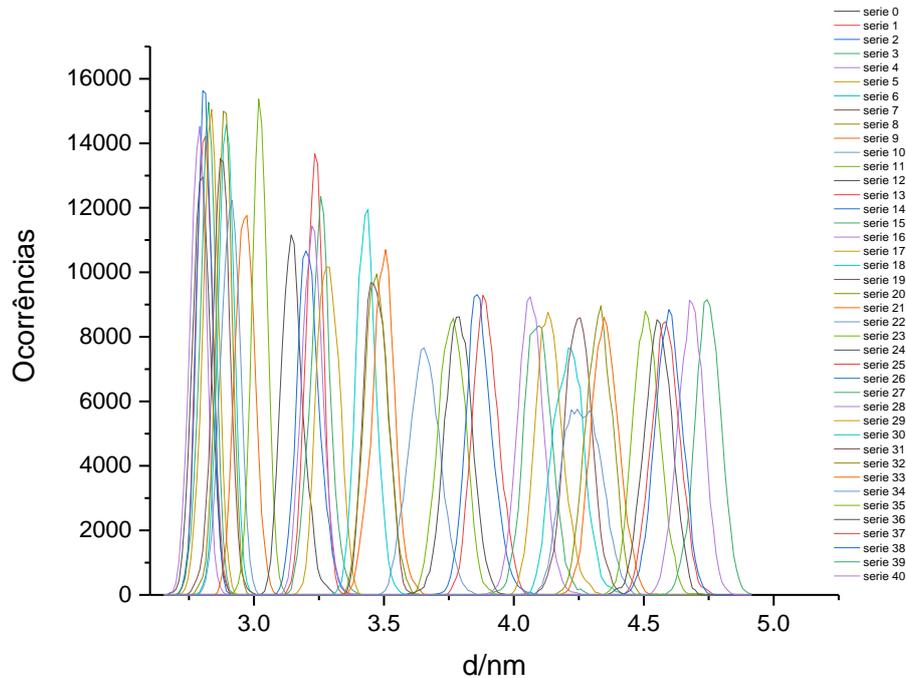
Anexo II- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido C34 no sistema de POPC:Chol.



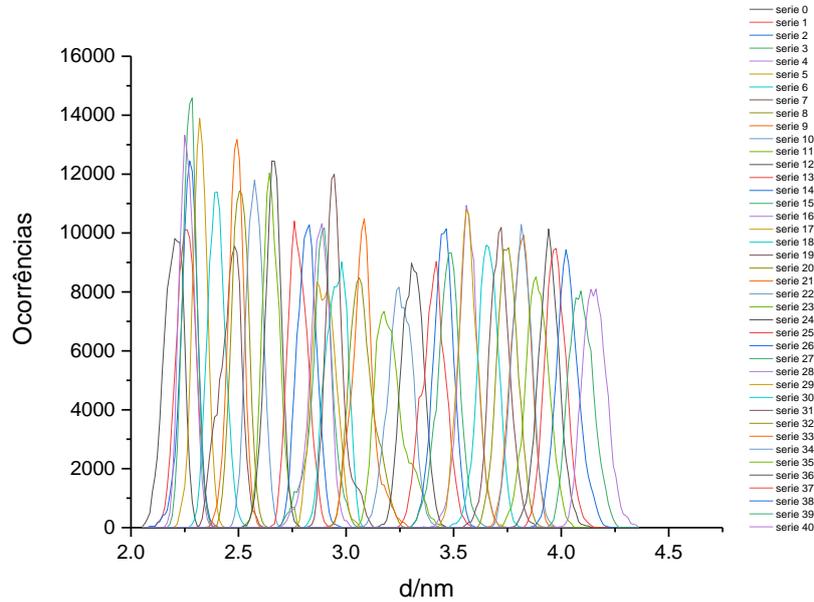
Anexo III- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido SC22EK no sistema de POPC.



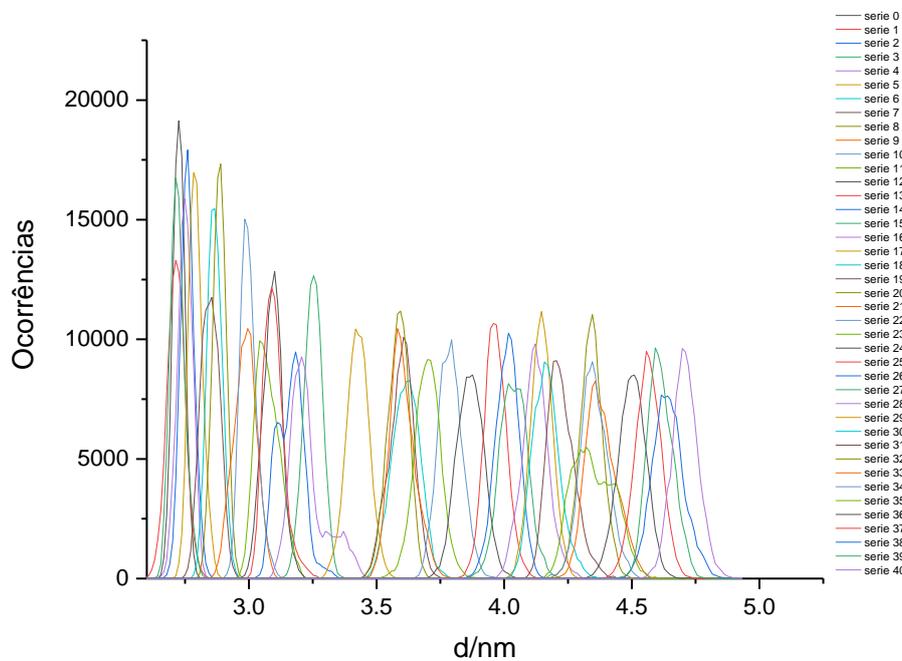
Anexo IV- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido SC22EK no sistema de POPC:Chol.



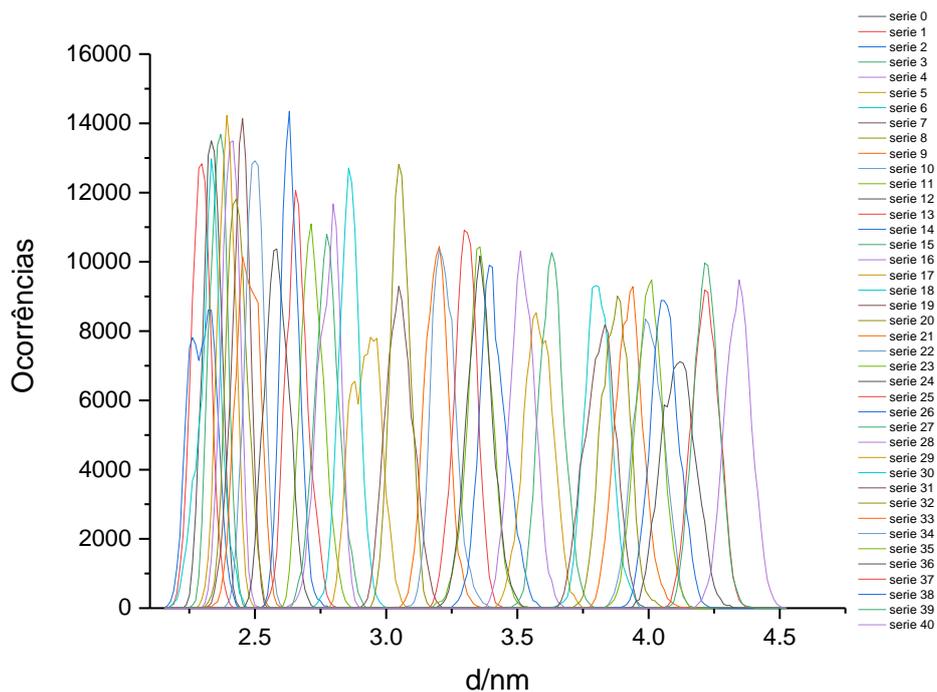
Anexo V- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido SC29EK no sistema de POPC.



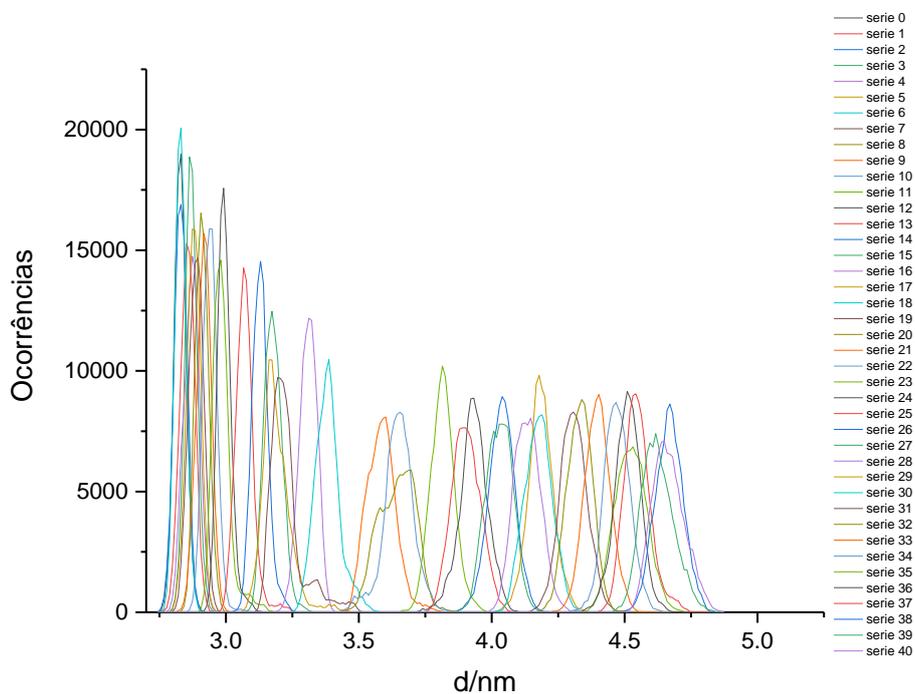
Anexo VI- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido SC29EK no sistema de POPC:Chol.



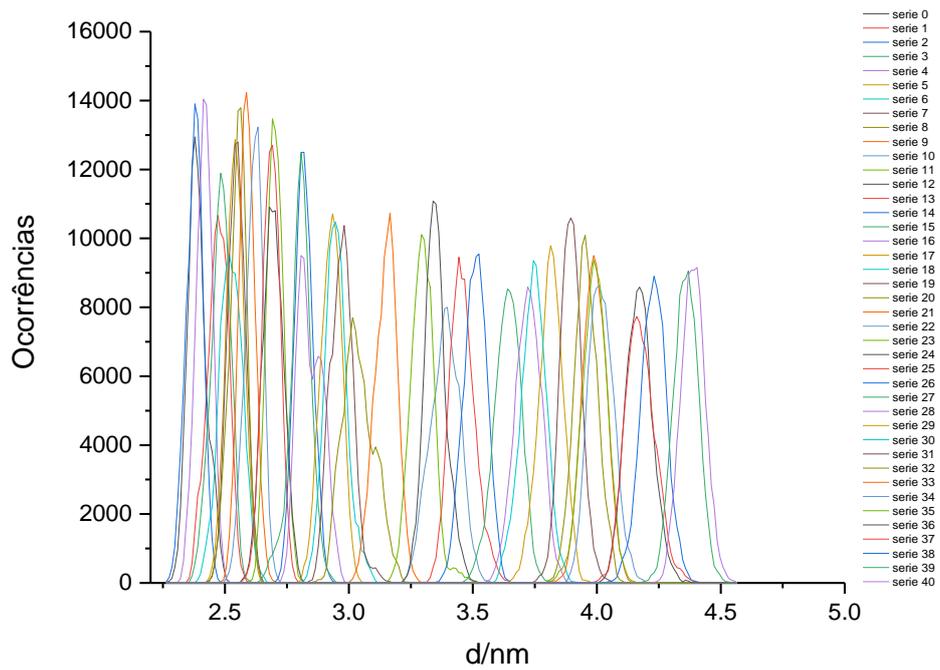
Anexo VII- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido SC34 no sistema de POPC.



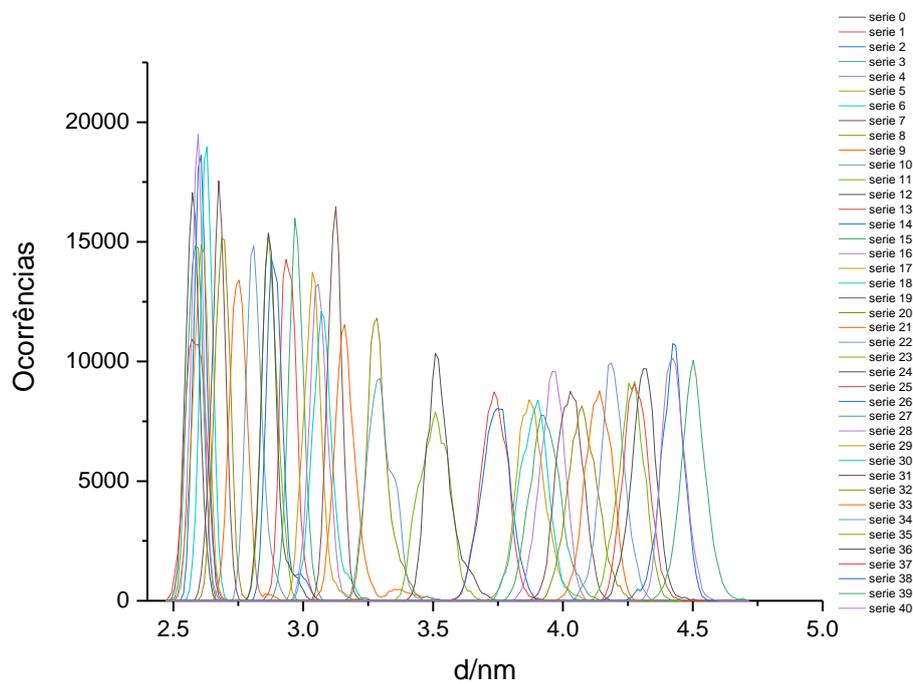
Anexo VIII- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido SC34 no sistema de POPC:Chol.



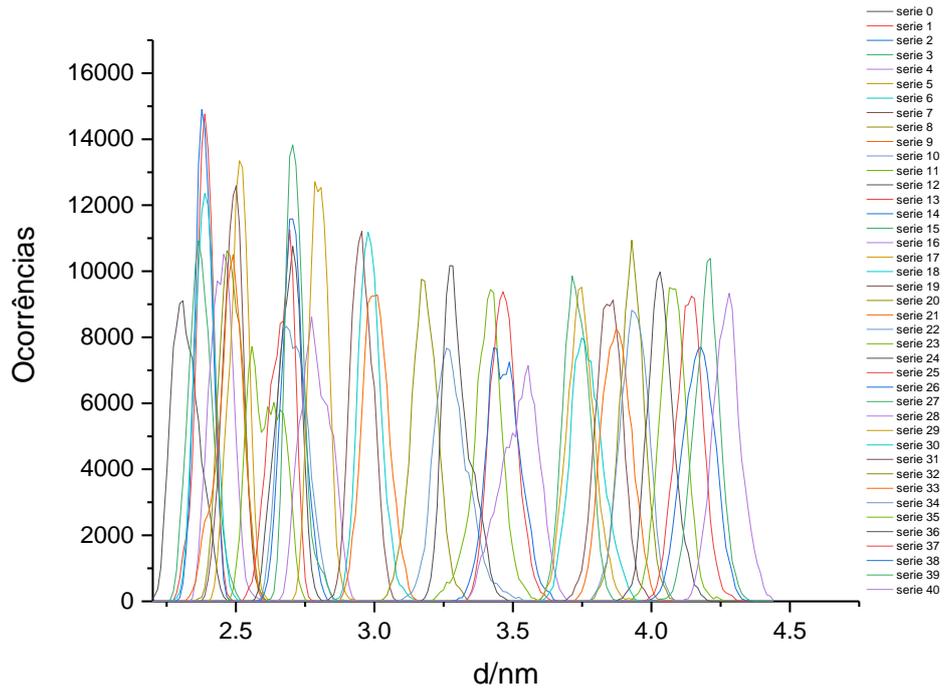
Anexo IX- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido SC34EK no sistema de POPC.



Anexo X- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido SC34EK no sistema de POPC:Chol.



Anexo XI- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido SC35EK no sistema de POPC.



Anexo XII- Histograma do número de ocorrências em função da distância para o péptido SC35EK no sistema de POPC:Chol.

