



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Bioquímica Médica
Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e
Estruturas Virais Gregorio Weber

*Caracterização Biofísica de um Peptídeo
Membranotrópico Candidato a Peptídeo de
Fusão do Vírus da Hepatite C*

Nathalia dos Santos Alves

***Rio de Janeiro
*2010****

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Nathalia dos Santos Alves

Caracterização Biofísica de um Peptídeo
Membranotrópico Candidato a Peptídeo de Fusão
do Vírus da Hepatite C

*Dissertação apresentada ao corpo docente
do Instituto de Bioquímica Médica do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Ciências.*

Orientador: Prof^a. Dr^a. Andréa Cheble de Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Andre Marco de Oliveira Gomes

Rio de Janeiro
2010

Nathalia dos Santos Alves

Caracterização Biofísica de um Peptídeo Membranotrópico Candidato a Peptídeo de Fusão do Vírus da Hepatite C

Dissertação apresentada ao corpo docente do Instituto de Bioquímica Médica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Andréa Cheble de Oliveira (Orientador)

Prof^a. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Prof. Dr. Andre Marco de Oliveira Gomes (Coorientador)

Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Russolina Benedeta Zingali

Prof^a. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Prof. Dr. Marcius da Silva Almeida

Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Luzineide Wanderley Tinoco

Prof^a. Adjunto do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Bianconi (Revisor e Suplente Interno)

Prof^a. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Prof. Dr. Gilberto Weissmuller (Suplente Externo)

Prof. Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ

FICHA CATALOGRÁFICA

ALVES, NATHALIA DOS SANTOS

Caracterização Biofísica de um Peptídeo Membranotrópico Candidato a Peptídeo de Fusão do Vírus da Hepatite C/ Nathalia dos Santos Alves. Rio de Janeiro, 2010.

XX, 139 f.:il.

Dissertação: Mestrado em Ciências (Química Biológica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, 2010.

Orientador: Andréa Cheble de Oliveira.

1. Vírus da Hepatite C.
2. Peptídeo de Fusão.
3. Fusão de Membranas.
4. Conformação de Peptídeos.
5. Fluorescência.
6. Calorimetria.
7. Ressonância Magnética Nuclear.

-Teses.

I. Oliveira, Andréa Cheble (Orient.).

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Bioquímica Médica.

III. Título.

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregorio Weber**, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Professora **Andréa Cheble de Oliveira** e coorientação do Professor **Andre Marco de Oliveira Gomes**.

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (**FAPERJ**), Fundação Universitária José Bonifácio (**FUJB**) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (**INBEB**).

A meus queridos pais.

Agradecimentos

***“There will be times on this journey
All you'll see is darkness
Out there somewhere daylight finds you
If you keep believing.”***

A Deus, por me dar saúde, me mantendo de pé frente às inevitáveis dificuldades da vida e por me prover amor, me encorajando a seguir em frente... Obrigada por me proteger dos males do mundo e pela graça de ter uma família e amigos tão especiais. Obrigada por me permitir terminar mais uma importante etapa de minha vida e por ter me dado forças ou o suporte necessário para me manter de pé mesmo quando tudo parecia perdido. ***“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”***

Aos meus pais, José e Nidia, pelos momentos únicos de confissões, de emoções e brigas, pela compreensão até nos momentos de decepção, pelos conselhos de valor inestimável, pela batalha sem fim para me oferecer o máximo de conforto possível... Agradeço pelo apoio desde o início, pela mínima cobrança, por me levantarem quando eu teimava em desanimar, pelo consolo, vibração e por todos os momentos de lindas vitórias que já passamos juntos. Obrigada por tornarem cada obstáculo em meu caminho apenas curtas paradas, por me fazerem forte e principalmente, por acreditarem que eu tenho um lindo futuro pela frente. Sem vocês a meu lado eu não conseguiria chegar até aqui, e por isso, mais uma vez, dedico a maior parte desta vitória a vocês, a quem amo incondicionalmente. ***“Eu tenho a fama você a força./ Cuidou de mim como ninguém jamais cuidou./ E sempre o seu rosto escondido, vejo a firmeza no lugar da dor./ Sabia que você é a família que eu quis ter, é tudo aquilo que eu desejava ser./ Eu posso voar, mais alto que uma águia, pois você é o vento sobre as minhas asas.”***

Ao meu irmão, Daniel, a quem amo tanto, que sempre torce por mim, acredita em mim e me ajuda, mesmo que a seu modo. Minha vida não tem graça sem você. Torço muito por seu sucesso e por sua felicidade.

À minha pequena grande família, Vô & Vó, Tias & Tios, Lulu & Mari, por estarem ao meu lado sempre. Pelo carinho, pelo apoio e pelo orgulho com minhas conquistas. Obrigada por serem meu porto seguro. Vocês sempre foram e sempre serão essenciais na minha vida! ***Amo vocês pra todo o sempre!***

“Always standing right beside you, one true friend is there to guide you.”

À minha querida orientadora Andréa, obrigada pelo simples fato de me permitir fazer parte de sua segunda família. Uma família unida, onde todos são igualmente importantes e especiais. E hoje não sei se viveríamos plenamente uns sem os outros. E, embora tenham se passado quatro anos desde que nos conhecemos, ainda me surpreendo com você! Sempre com palavras doces e jeitinho gentil, me encoraja a transpor as piores barreiras: aquelas criadas por mim mesma. Obrigada por me mostrar cada dificuldade e por me trazer metas a transcender, por ser sempre a pessoa que mais acredita em meu potencial e que me incentiva até o fim, reconhecendo meus êxitos e apontando a melhor direção a seguir. Meu mais profundo agradecimento por toda dedicação, compreensão e carinho, por sempre torcer por mim, por tentar me entender mesmo quando sou confusa, e por permitir que a cada ano eu tenha o prazer de conhecê-la melhor e de estreitar nossos laços de amizade... Um dia, quando eu estava muito triste, você me disse que eu iria entender que os obstáculos em nossas vidas a tornam mais interessante, nos fazendo correr atrás de nossos sonhos e nos fortalecendo... Hoje, eu entendo! Obrigada por me mostrar que cada inconveniente é um desafio e que cada circunstância é uma possibilidade. Ser orientador é ser amigo, companheiro, é transmitir aos alunos os segredos da caminhada, é ser exemplo de dedicação, de doação e de amor. Enfim, obrigada por ser, sempre, a melhor orientadora, a mais carinhosa e fofo, que eu poderia um dia imaginar ter. Adoro você e espero preservá-la em minha vida para sempre! Agradeço a Deus por você existir em minha vida. ***“A vida se faz, com essas horas, pequenas maravilhas, na voz do coração. Muitos se vão, mas essas horas, breves horas, ficarão...”***

Ao Andre, cujo brilho é comparável ao de uma estrela. E se autocorrelacionarmos brincadeiras e uma mente brilhante, encontraremos essa pessoa especial, meu querido coorientador, sempre disposto a me ajudar no que eu precisasse. Muito obrigada por compartilhar comigo seus projetos povoados de idéias encantadoras e empolgantes. Em especial, agradeço pela paciência, pelas dicas e correções da tese e do artigo, por todo o incentivo, pelos elogios sinceros e pelos puxões de orelha necessários... Enfim, obrigada por ser um coorientador presente em minha vida. Saiba que eu admiro muito você, pois: ***“O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.”***

"Onde quer que nos sintamos em casa, estaremos à vontade."

À Yga, por ter me aceitado no laboratório, por ter compartilhado seus projetos, por ter me ensinado muito do que sei... Obrigada por entender os meus bons e maus momentos, por tentar me ajudar sempre que possível, pelas idéias, pela companhia, por me incentivar a ser cada vez melhor... Obrigada por estar a meu lado durante esse meu crescimento e por me estender a mão nas horas mais difíceis, me acolhendo como filha mesmo nos momentos em que eu deveria caminhar com as minhas próprias pernas. Sua ajuda durante a seleção foi de valor inestimável e eu jamais vou esquecer todo o apoio, incentivo e confiança! Fiquei feliz de ver sua felicidade e sua satisfação, sinceras, com o resultado da seleção. Obrigada por querer o meu melhor de modo sincero e amigo. Muito obrigada, de coração!

Ao Gui, por sempre me defender, por sua preocupação de irmão, por querer sempre a minha felicidade e por ser meu melhor amigo desde a faculdade. Obrigada por acreditar em mim e me incentivar, pela companhia, pelas caronas, pelas boas risadas... Só com a ajuda de chaperonas como você eu alcanço meu perfeito envelhecimento. E por isso, não me imagino sem você. Obrigada pela paciência de me ouvir quando preciso, por todo o carinho e por todo apoio. Tenho muito orgulho de você, e sei que você vai brilhar muito, e quando isto acontecer, pode ter certeza que estarei na primeira fila te aplaudindo!

Ao Carlos, por estar a meu lado todos os dias, compartilhando angústias, medos... Obrigada por ser o amigo de todas as horas, dos desabafos e daquela sagrada hora, no meio do estresse extremo: preciso comer alguma coisa, tá afim? Nos últimos anos temos alcançado muitas vitórias juntos, e espero alcançar ainda muitas mais. Queria que você soubesse que eu admiro muito sua coragem, força e confiança, e que eu tenho certeza que logo logo você estará voando bem alto!

À Shana, obrigada por ser simplesmente esta pessoa única em minha vida. Somos tão diferentes, mas nos entendemos completamente bem. Obrigada por ser aquela que enxuga as lágrimas da angústia e dos medos, por ser aquela que me acalma e põe minha cabeça no lugar nos momentos de estresse, por ser aquela que com um simples abraço me liberta da solidão e por ser aquela que me arranca as mais puras gargalhadas. Obrigada por me permitir fazer parte de sua vida, por todo carinho, paciência e amizade. De fato, a vida no laboratório não seria a mesma sem você. Obrigada pelo sentimento sincero, puro e verdadeiro...

À Cris Latgé, a pessoa que mais se parece comigo, que entende meus medos e que me faz enxergar que é verdade que amigos são os irmãos que escolhemos. Obrigada pelo carinho, pelas conversas, pelas risadas, pelas caronas e por sempre me tratar como uma irmã, aclamando meus êxitos e enxugando minhas lágrimas nos tropeços da vida. Obrigada por simplesmente estar a meu lado.

Ao Theo, por ser um grande amigo, com o qual posso contar a qualquer hora, a qualquer dia, a qualquer momento... Obrigada principalmente por ainda não ter desistido de me fazer entender termodinâmica, e por sempre me ajudar com os experimentos de calorimetria, bem como por me ajudar a pensar em meus resultados de uma maneira mais química que biológica. Obrigada por me divertir, por me fazer companhia... Agradeço a Deus por ter um amigo como você, sempre disposto a me ajudar, com um sorriso sincero no rosto, e que me faz tão bem!

Ao Ivan, por todo o apoio, incentivo, caronas, e momentos de descontração. Obrigada por me ajudar sempre que precisei, e por se importar comigo, com meu futuro, com minha felicidade...

Ao Daniel, pelas dicas, incentivos, palavras de apoio, pelas caronas e pelos momentos de descontração que sempre me garantem boas risadas. Obrigada por acreditar em mim e em minhas ideias.

À Pati, por todo carinho, pelo abrigo seguro, pela companhia agradável, pelas palavras doces e sinceras...

À Marcella, pela paciência com as ausências, pelo sorriso contagiante e pela oportunidade de guiá-la pelo fantástico mundo dos vírus.

À Clarinha, por seu sorriso puro que me alegra, por seu abraço sincero que me conforta e pelas palavras doces que me enchem de esperanças. É muito bom poder contar com seu apoio. Um dia você descobrirá seu potencial e conseguirá ver o brilhante futuro que está aí, bem diante de seus olhos. E o sucesso será apenas uma consequência. Torço muito por você!

À Vanessa, pela amizade, carinho, companhia, almoços, conversas, *etc...* *E tal.*

Ao Samir, Thaís, Vivian, Amanda e Milena, pelo companheirismo, pelas risadas, pelos projetos em comum, pela companhia... É muito bom acompanhar o crescimento de vocês. Espero que vocês consigam alcançar todos os seus objetivos...

À Cris Ano Bom, colaboradora e amiga, pelos momentos divertidíssimos no RMN ou no LADIE, por compartilhar comigo suas experiências de uma maneira leve e divertida, por me fazer entender, de verdade, um espectro de ressonância... Muito obrigada pelo seu carinho e por toda sua ajuda!

Ao professor Jerson, pelas palavras de carinho e de incentivo nos momentos certos, por querer e incentivar nosso crescimento profissional e por tentar melhorar nosso laboratório sempre que possível. Admiro sua humildade e generosidade, e agradeço por sempre se importar com os integrantes de seu laboratório.

À professora Débora, meus sinceros agradecimentos, por toda dedicação e carinho, sempre buscando o melhor para o laboratório e para o Instituto.

Ao Emerson e à Márcia, pela essencial ajuda, pela infundável dedicação, e pelos momentos de descontração.

À Dona Silvia, por me tratar sempre tão bem e por manter tudo limpo e organizado.

Aos amigos LTPV/LAPA, em especial à Tuane, Mari, Dani, Lú, Rafa, Ana Paula e Wal, que em muito contribuíram para o andamento da minha dissertação. Muito obrigada pelo simples prazer da companhia de vocês.

Aos professores Ana Paula Valente e Fábio Almeida pela ajuda nos experimentos de RMN.

“Just like the patterns in the big sky

We'll be together 'til the end this time

Don't know the answer or the reason why

We'll stick together 'til the day we die”

Aos meus amigos, da infância em Praia Seca, Fê, Rapha, Tinho, Aline; do colégio no Pio XI, Priscila, Ianne e Nessa; e da faculdade na biomedicina, Érika, Fê, Nast, Gabi e Haynna, por se fazerem sempre presentes em meu coração. Por mais que os nossos caminhos tenham sido separados pelo tempo, nossos laços de amizade nos mantêm unidos. Obrigado por entenderem minha ausência, pelo grande incentivo e pelos inúmeros momentos de descontração. Eu já disse, e hoje repito: Amizades verdadeiras são para sempre!

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”

À professora Maria Lúcia Bianconi, por gentilmente aceitar colaborar nos experimentos de calorimetria e ainda revisar esta dissertação.

Às professoras Russolina Zingali e Luzineide Tinoco, e aos professores Marcius Almeida e Gilberto Weissmuller, por terem aceitado, de forma tão gentil, fazer parte da banca examinadora desta dissertação.

***“We keep moving forward, opening up new doors
and doing new things, because we’re curious...
and curiosity keeps leading us down new paths.”***

Walt Disney

Resumo

Alves, Nathalia dos Santos. Caracterização biofísica de um peptídeo membranotrópico candidato a peptídeo de fusão do Vírus da Hepatite C. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A Hepatite C, maior causa de doenças e transplantes hepáticos, acomete cronicamente cerca de 3% da população mundial. O processo de entrada do Vírus da Hepatite C (HCV) na célula é lento, complexo e envolve múltiplas etapas ainda a serem elucidadas. A elucidação dos mecanismos de fusão tem atraído atenção considerável devido à sua importância clínica e ao pouco conhecimento acerca destes mecanismos. Após a interação com receptores celulares, é desencadeado o processo de endocitose e o baixo pH endossomal promove a fusão de membranas através da exposição de uma sequência membranotrópica, o peptídeo de fusão. Entretanto, evidências recentes sugerem que diferentes segmentos das glicoproteínas de fusão E1 e E2 do HCV seriam necessários para que o processo fusogênico ocorra, não estando a localização do peptídeo de fusão ainda totalmente esclarecida. Sendo assim, nesta dissertação, visamos caracterizar a estrutura do peptídeo membranotrópico sintético correspondente aos resíduos 421-455, presente na E2 do HCV, e sua interação com membranas e micelas de diferentes detergentes, a saber brometo de hexadeciltrimetil amônio (CTAB), n-octil- β -D-glicopiranosídeo (n-OGP), dodecilsulfato de sódio (SDS) e dodecifosfolina (DPC). Para tal, utilizamos metodologias biofísicas como espectroscopia de fluorescência, espectrofotometria, dicróismo circular (CD), calorimetria e ressonância magnética nuclear (RMN). Análises espectroscópicas, através do aumento da energia de emissão dos resíduos de triptofano, análises de supressão de acrilamida e dados calorimétricos sugerem que a interação peptídeo-micela é dirigida entalpicamente, e envolve os resíduos de triptofano. Além disso, este peptídeo também é capaz de induzir a agregação vesicular de maneira dependente de concentração. Os dados de CD e RMN sugerem um ganho de estrutura, possivelmente em α -hélice, quando o peptídeo se encontra na presença de 2,2,2 trifluoretanol (TFE) e de micelas de SDS ou DPC. Os espectros de TOCSY e NOESY do peptídeo livre em solução indicam a presença de pouca estrutura nesta condição. Sendo assim, o peptídeo se mostrou capaz de interagir com lipossomos e micelas, tornando-se estruturado nestas condições, o que sugere sua participação no processo de entrada do HCV. Vencer o desafio da elucidação dos mecanismos de entrada dos vírus pode representar um avanço no desenvolvimento de novos inibidores racionais baseados na estrutura e função das proteínas virais.

Abstract

Alves, Nathalia dos Santos. Caracterização biofísica de um peptídeo membranotrópico candidato a peptídeo de fusão do Vírus da Hepatite C. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

The Hepatitis C, the major cause of liver disease and transplants, chronically affects approximately 3% of world population. The entry process of Hepatitis C Virus (HCV) is slow, complex and involves multiple steps that still have to be elucidated. The elucidation of the fusion mechanisms has attracted considerable attention due to its clinical importance and to the little knowledge about these mechanisms. After receptor binding, the endocytosis is triggered and the low endosomal pH promotes the fusion since it exposes a membranotropic region, the fusion peptide. However, recent evidence suggests that different segments of the fusion glycoproteins E1 and E2 of HCV would be required for the fusogenic process, and the location of the fusion peptide is not yet fully clarified. Therefore, in the present work, we aim to characterize the structure of a membranotropic peptide corresponding to residues 421-455, present in E2 of HCV, and its interaction with membranes and micelles of different detergents, such as Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), n-octyl- β -D-glucopyranoside (n-OGP), sodium dodecyl sulfate (SDS) and dodecyl phosphocholine (DPC). With this aim, we used biophysical methodologies such as photometry, fluorescence spectroscopy, circular dichroism (CD), calorimetry and nuclear magnetic resonance (NMR). Spectroscopic analysis, through the increase of Trp emission energy and acrylamide quenching; and calorimetric analysis suggest that peptide-micelle interaction is enthalpically driven and involves Trp residues. Furthermore, this peptide is also able to induce vesicle aggregation in a concentration-dependent. CD and NMR data indicate that HCV₄₂₁₋₄₄₅ become structured, possibly in a helix conformation, when in the presence of 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) and micelles of SDS or DPC. The TOCSY and NOESY spectra of the peptide free in solution indicate the presence of few ordered structure in this condition. Thus, the peptide seems to interact with liposomes and micelles, and becomes structured under these conditions, suggesting its participation in the entry process of HCV. The challenge of elucidating these mechanisms may represent a breakthrough in the development of new inhibitors based on rational structure and function of viral proteins.

***L*ista de Ilustrações**

Figura 1. Distribuição geográfica do Vírus da Hepatite C, destacando os principais genótipos	6
Figura 2. Distribuição do Vírus da Hepatite C no Brasil, destacando os principais genótipos	7
Figura 3. Modelo da estrutura do HCV	15
Figura 4. Organização do genoma e processamento da poliproteína do vírus da Hepatite C	16
Figura 5. Mecanismos de entrada, processamento, maturação e liberação de partículas infecciosas de HCV	23
Figura 6. Mecanismos propostos para a fusão de membranas de proteínas classe I e II	32
Figura 7. Comparação entre as proteínas de envelope dos <u>Flavivírus</u> , <u>Alfavírus</u> e <u>Hepacivírus</u>	35
Figura 8. Espectros típicos de CD de proteínas	60
Figura 9. Representação esquemática do instrumento de ITC	65
Figura 10. Determinação do ΔH e da concentração micelar crítica a partir de experimentos de ITC	68
Figura 11. Hidrogênios em acoplamento escalar de um fragmento peptídico contendo glutamato	71
Figura 12. Conectividade para um aminoácido	72
Figura 13. Análise da hidrofobicidade do candidato a peptídeo de fusão do Vírus da Hepatite C, HCV ₄₂₁₋₄₄₅	79
Figura 14. Termograma da calorimetria de titulação isotérmica do SDS em tampão fosfato de sódio	80
Figura 15. Espectro de absorção e emissão de fluorescência dos resíduos de Trp e Tyr presentes no peptídeo HCV ₄₂₁₋₄₄₅	82
Figura 16. Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de Trp presentes no peptídeo HCV ₄₂₁₋₄₄₅ , na presença de micelas	84
Figura 17. Centro de massa dos espectros de fluorescência do peptídeo HCV ₄₂₁₋₄₄₅ na presença de micelas	85

Figura 18. Análise da interação peptídeo-micela através de supressão de fluorescência do por acrilamida	86
Figura 19. Análise calorimétrica da interação peptídeo-micela	91
Figura 20. Análise estrutural do peptídeo HCV ₄₂₁₋₄₄₅	94
Figura 21. Quantificação da estrutura do peptídeo HCV ₄₂₁₋₄₄₅	95
Figura 22. Espectros de TOCSY e NOESY do peptídeo HCV ₄₂₁₋₄₄₅ livre em solução	97
Figura 23. Espectros de TOCSY e NOESY do peptídeo HCV ₄₂₁₋₄₄₅ na presença de micelas	98
Figura 24. Análise da região amídica do peptídeo HCV ₄₂₁₋₄₄₅ na ausência e na presença de micelas de SDS e DPC	99
Figura 25. Agregação e interação do peptídeo HCV ₄₂₁₋₄₄₅ com vesículas fosfolipídicas	101

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros termodinâmicos das micelas de SDS, CTAB e n-OGP, a 25 °C, em tampão fosfato de sódio 20 mM	81
Tabela 2. Parâmetros espectroscópicos da interação peptídeo-micela, a 25 °C	89
Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos da interação peptídeo-micela, a 25 °C	92

Lista de Esquemas

Esquema 1. Estrutura química do detergente aniônico dodecilsulfato de sódio	47
Esquema 2. Estrutura química do detergente n-octil- β -D-glicopiranosídeo	48
Esquema 3. Estrutura química do detergente catiônico CTAB	48
Esquema 4. Estrutura química do detergente zwitteriônico DPC	49
Esquema 5. Estrutura química do supressor de fluorescência solúvel acrilamida	57
Esquema 6: Ligação peptídica e orientação das transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$	59

Abreviaturas

3'NCR- Região não codificante 3'

5'NCR- Região não codificante 5'

ΔH – Entalpia de ligação

ADN – Ácido desoxirribonucléico

ARN – Ácido ribonucléico

ASPGR - Receptor de asialoglicoproteínas

C-terminal – Carboxi-terminal

CD – Dicroísmo circular

CD 81 – Grupo de diferenciação 81

CLDN - Claudina

CLDN1 - Claudina 1

CMC - Concentração micelar crítica

C_p – Capacidade calorífica

CTAB – Brometo de hexadeciltrimetil amônio

D.O. – Densidade óptica

DC-SIGN - Molécula não integrina captadora da molécula de adesão intracelular 3 específica das células dendríticas

DENV – Vírus da Dengue

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPC – Dodecilsulfocolina

DPPE – 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicerol-3-Fosfolina

E1 – Proteína de envelope 1 do Vírus da Hepatite C

E2 – Proteína de envelope 2 do Vírus da Hepatite C

EBO₁₆ – Peptídeo de Fusão do Vírus Ebola contendo 16 resíduos

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

Fla_G - Peptídeo de fusão do Vírus da Dengue

Fla_H - Peptídeo de fusão do Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapatos

GAGs – Glicosaminoglicanos

GBV-B – GB Vírus B

GBV-C – GB Vírus C

GUV - Vesículas unilamelares gigantes

H77 - Isolado Hutchinson 77
HBV – Vírus da Hepatite B
HCC – Hepatocarcinoma celular
HCV – Vírus da Hepatite C
HCV₄₂₁₋₄₄₅ – Peptídeo candidato a peptídeo de fusão do Vírus da Hepatite C
HDL - Lipoproteína de alta densidade
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HMQC – “Heteronuclear multiple-quantum coherence”
HSQC – “Heteronuclear single quantum correlation”
HVR 1 – Região hipervariável 1
HVR 2 – Região hipervariável 2
I – Intensidade de fluorescência
IRES - Sítio de entrada ribossomal interno
ITC – Calorimetria de titulação isotérmica
K_{sv} – Constante de Stern-Volmer
L-SIGN - Molécula não integrina captadora da molécula de adesão intracelular 3 específica dos linfonodos e fígado
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDLR – Receptor de lipoproteínas de baixa densidade
LEL – Alça extracelular grande
LUV – Vesículas unilamelares grandes
MEK - Quinase ativada por mitógeno
MLV – Vesículas multilameres
NOE – Efeito Overhauser nuclear
NS – Proteínas não estruturais
N-terminal – Amino-terminal
n-OGP – n-octil-β-D-glicopiranosídeo
NOESY- “Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy”
NTPase- Nucleosídeo trifosfatase
OCLN - Ocludinas
ORF – Fase de leitura aberta
PAMPS - Padrões moleculares associados a patógenos
PC – Fosfatidilcolina
PCR – Proteína C reativa

PCR – Reação em cadeia da polimerase
PG - Fosfatidilglicerol
pH – Potencial hidrogeniônico
PKR - Proteína quinase dependente de ARN
PW2 – Peptídeo anticoccidial
RE – Retículo endoplasmático
RMN – Ressonância magnética nuclear
RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase utilizando transcriptase reversa
SDS – Dodecilsulfato de sódio
SEL – Alça extracelular pequena
SFV - Vírus da Floresta de Semliki
SR-BI - Receptor “scavenger” de classe B tipo I
STAT C - “Specifically targeted antiviral therapy for HCV”
SUV – Vesículas unilamelares pequenas
SVR - Resposta virológica sustentada
TBEV – Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapato
TFE - 2,2,2-trifluoroetanol
TIRF – Microscopia de fluorescência por reflexão interna total
TOCSY – “Total correlation spectroscopy”
Tris – Tris (hidroximetil) amino-metano
UV - Ultravioleta
VLDL -Lipoproteínas de muito baixa densidade

Sumário

1-Introdução	01
1.1 Características Estruturais dos Vírus	02
1.2 A Família <i>Flaviviridae</i> e o Gênero <i>Hepacivírus</i>	03
1.3 A hepatite C	04
1.3.1 Epidemiologia	04
1.3.2 Patologia	07
1.3.3 Diagnóstico, Tratamentos e Vacinas	10
1.3.4 Sistemas Modelo	13
1.4 Características Estruturais do HCV	14
1.5 Ciclo Replicativo dos <i>Hepacivírus</i>	21
1.5.1 Fatores de Ligação Específicos e Não-Específicos do HCV	22
1.5.2 Endocitose e Fusão de Membrana	27
1.5.3 Liberação, Replicação e Tradução do ARN	30
1.5.4 Montagem e liberação das partículas	30
1.6 Proteínas de Fusão	31
2-Objetivos	40
2.1 Objetivos Gerais	41
2.2 Objetivos Específicos	41
3-Material e Métodos	43
3.1 Reagentes	44
3.2 Peptídeo	44
3.3 Micelas de detergentes como modelo de membrana	45
3.4 Preparação de Vesículas Unilamelares Grandes	49
3.5 Medidas Espectroscópicas	51
3.5.1 Espectroscopia de Fluorescência	51
3.5.2 Supressão de Fluorescência por Acrilamida	54
3.5.3 Dicroísmo Circular	58
3.5.4 Análises de Agregação Vesicular	62
3.6 Calorimetria de Titulação Isotérmica	64
3.7 Ressonância Magnética Nuclear de Proteínas	69
4- Resultados	75
4.1 Análise Teórica da Hidrofobicidade do Peptídeo de Fusão	76
4.2 Determinação da Concentração Micelar Crítica	79
4.3 Análise Espectroscópica da Interação Peptídeo-Micela	81
4.4 Análise Termodinâmica da Interação Peptídeo-Micela	90
4.5 Análise Conformacional do Peptídeo no Ambiente Micelar	92
4.6 Análise da Interação Peptídeo-Membrana	100
5- Discussão	102
6- Conclusões	120
7- Perspectivas	122
8- Referências Bibliográficas	124
9- Anexo	138

1- Introdução

1.1 Características Estruturais dos Vírus

Passados 100 anos desde a sua descoberta, o entendimento dos vírus ainda representa um grande desafio para a comunidade científica. Desde o início do século XX, os vírus costumam ser classificados como agentes filtráveis extremamente pequenos, que contêm apenas um tipo de material genético (ARN ou ADN), não apresentando metabolismo próprio, sendo assim, parasitas intracelulares obrigatórios (Dimmock *et al.*, 2007). Entretanto, descobertas recentes contrariam tal classificação.

Os vírus são, em sua maioria, partículas extremamente pequenas que apresentam diâmetro variável, de 20 a 450 nm. Contudo, a descoberta dos Mimivírus, em 2003, representou um choque para a comunidade de virologistas e evolucionistas, uma vez que esta partícula viral apresenta 750 nm, não podendo ser filtrada através de um filtro típico, e um genoma de 1,2 milhões de pares de bases (Claverie *et al.*, 2006).

Todos os vírus contêm ácidos nucleicos e proteínas, sendo o conteúdo protéico correspondente a até 90% da massa da partícula. Geralmente, a partícula viral apresenta apenas um tipo de material genético. Porém, algumas famílias de vírus apresentam o fenômeno de encapsidação de ARN, inicialmente descoberto em membros da família *Herpesviridae*; apresentando assim, ADN e ARN na mesma partícula. Esses ARNs podem ser traduzidos em proteínas antes da transcrição do genoma viral, facilitando a organização da estrutura do tegumento através de interações proteína-ARN durante a montagem da partícula (Xing & Tikoo, 2009).

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e por isso sua replicação (e patogenicidade) depende de maneira crítica da habilidade de transmitir seu genoma

de organismos e células infectados a organismos e células não-infectados (Marsh & Helenius, 2006).

Os vírus que infectam animais tipicamente possuem seu ácido nucléico condensando em um complexo de nucleoproteína chamado capsídeo que, por sua vez, pode estar envolto por um envelope lipídico composto pela membrana celular do hospedeiro em combinação com glicoproteínas virais. O material genético viral pode estar na forma de fita simples ou dupla, linear ou circular. O ARN pode estar presente, ainda, na forma de fita simples positiva, atuando como ARN mensageiro; ou negativa, quando este deve ser primeiro replicado para depois formar a fita complementar que atuará como ARN mensageiro (Dimmock *et al.*, 2007).

Os vírus possuem uma extensa variedade de formas, e sua origem, complexidade e classificação ainda fascinam e intrigam grande parte da comunidade científica.

1.2 A Família *Flaviviridae* e o Gênero *Hepacivírus*

A família *Flaviviridae*, composta pelos gêneros *Flavivírus*, *Hepacivírus* e *Pestivírus*, compreende os agentes causadores das doenças emergentes mais conhecidas pelo homem e de grande importância médica (Kunh *et al.*, 2002). Esta família abrange vírus envelopados que possuem um genoma constituído de ARN fita simples e polaridade positiva, que é traduzido em uma grande poliproteína, que posteriormente sofre clivagens originando proteínas estruturais e não estruturais (NS) (Lindenbach *et al.*, 2007).

O gênero *Hepacivírus* agrupa o Vírus da Hepatite C (HCV) e um vírus causador da hepatite não A-E denominado GB Vírus B (GBV-B). O agente GB foi originalmente derivado, através de passagens seriadas em pequenos macacos, do

soro de um cirurgião de 34 anos de idade, “GB”, que desenvolveu hepatite não A-E. O vírus GBV-B pode infectar e causar hepatite em pequenos macacos do Novo Mundo, mas não é capaz de infectar chimpanzés, sendo o vírus com maior semelhança (33% de identidade) ao HCV (Akari *et al.*, 2009). Portanto, devido a essa preferência por primatas pequenos, o vírus GBV-B não deve ser um vírus humano (Lindenbach *et al.*, 2007).

Os primeiros relatos da Hepatite C datam de 1975; entretanto, apenas em 1988, o grupo dos pesquisadores Houghton e Bradley conseguiu identificar e descrever o HCV (Krekulová *et al.*, 2006). Desde sua descoberta, muitos avanços têm sido feitos não só em relação à sua caracterização estrutural e infecciosa, como também em relação às terapias antivirais, embora estas ainda sejam caras e em sua maioria ineficientes (Lindenbach *et al.*, 2007). Cerca de 170 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo HCV e, a cada ano, surgem de 3 a 4 milhões de novos casos.

1.3 A Hepatite C

1.3.1 Epidemiologia

O HCV só é capaz de infectar humanos e chimpanzés e por muitos anos, a doença causada por este vírus foi apenas classificada como hepatite não-A/não-B, não havendo métodos capazes de detectar seu agente causador. Sendo assim, a transmissão da doença se baseou, inicialmente, nas transfusões sanguíneas, nos transplantes de órgão e no uso de hemoderivados. A partir da descoberta do HCV, em 1989, intensificaram-se as buscas por métodos capazes de detectar este vírus no sangue, órgãos para transplantes e hemoderivados até que, a partir de 1992,

esta detecção passou a ser rotineira, diminuindo drasticamente estas formas de contágio (McHutchison, 2004).

Atualmente, a principal forma de transmissão da doença é aquela entre usuários de drogas injetáveis, devido ao compartilhamento de agulhas. A transmissão sexual representa apenas 20% do total, e o avanço dos programas educacionais como medidas de combate a AIDS, acaba minimizando, também, a transmissão do HCV. Outras formas de transmissão são as transmissões acidentais entre agentes de saúde, as transmissões através de máquinas de hemodiálise, através de injeções terapêuticas não seguras, através de procedimentos estéticos, acupuntura, tatuagens, piercings, e as materno-fetais (McHutchison, 2004).

É difícil estimar a quanto tempo o Vírus da Hepatite C circula na população humana. A prevalência do HCV é muito alta (**Figura 1A**) e a presença dos seis maiores genótipos varia de acordo com a região geográfica (**Figura 1B**), sendo o HCV endêmico entre as populações da África Subsaariana e do Leste asiático há mais tempo que nos países ocidentais (Simmonds, 2004).

O genótipo 1 compreende o subtipo: 1a, que apresenta distribuição mundial, e o 1b, vastamente distribuído na Europa e na América do Norte, sendo encontrado em pessoas idosas e em pacientes infectados por transfusão. O genótipo 2 é predominante em pessoas idosas das regiões do Mediterrâneo e da Ásia; o genótipo 3 é particularmente prevalente na Europa, estando associado ao uso de drogas injetáveis; o genótipo 4 é vastamente distribuído no Oriente Médio; o genótipo 5 é comum apenas na África do Sul e o genótipo 6 no Sudoeste da Ásia (Lindenbach *et al.*, 2007). Um estudo realizado em 2005 identificou 5 dos 6 genótipos circulando no Brasil (**Figura 2**), havendo maior frequência dos genótipos 1 (64,9%) e 3 (30,2%), não havendo a detecção do genótipo 6 (Campiotto *et al.*, 2005).

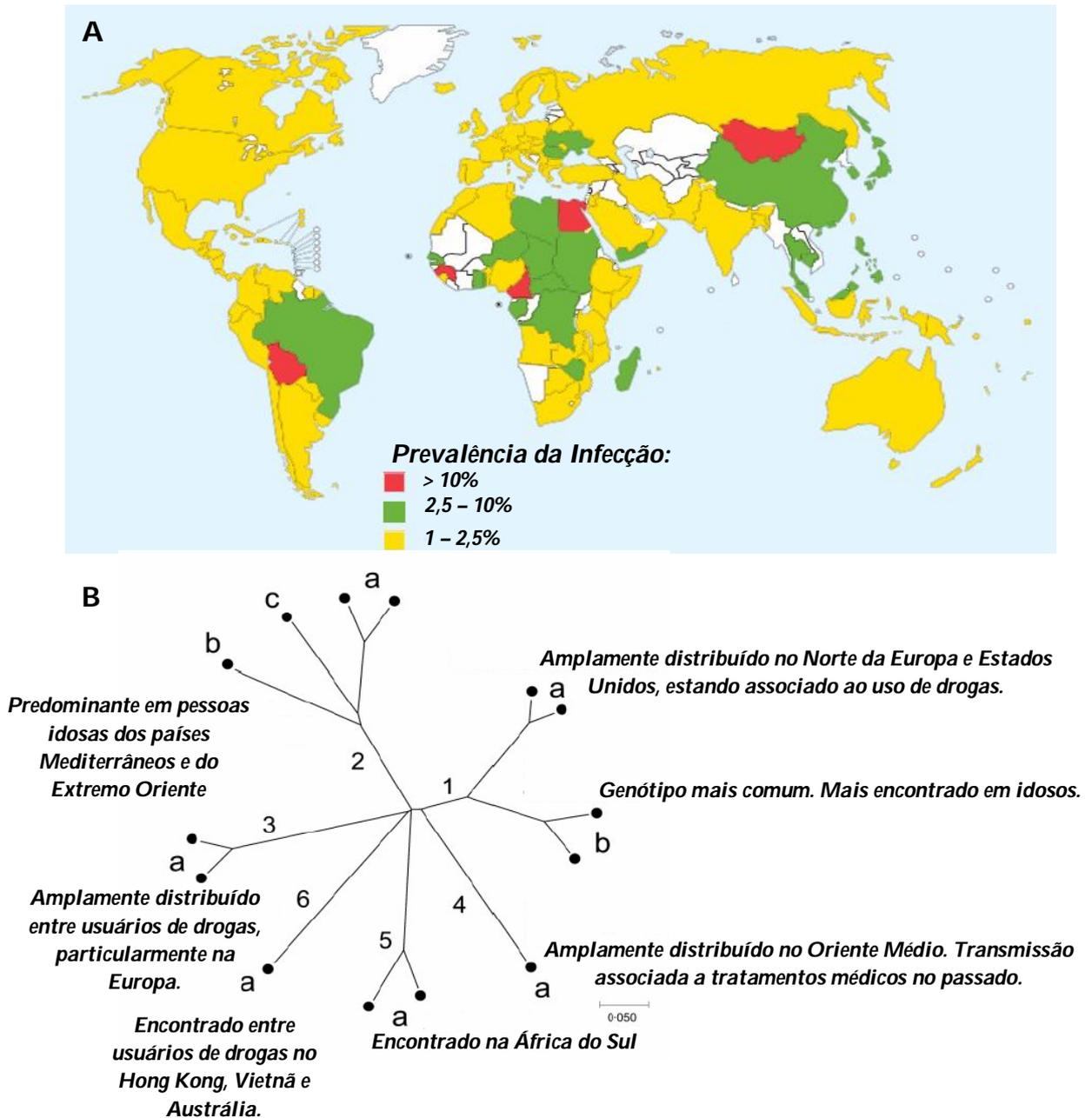


Figura 1: Distribuição geográfica do Vírus da Hepatite C, destacando os principais genótipos. (A) Altas prevalências do HCV foram encontradas em países como Egito, Bolívia, Burundi, Camarões, Guiné, Mongólia, Ruanda e Tanzânia. A Organização Mundial de Saúde estima que as regiões de maior prevalência são a África, o Mediterrâneo Oriental, o Sudeste Asiático e o Pacífico Ocidental. Baixa prevalência foi encontrada na América do Norte e Europa (Adaptado de Hepatitis Learning Guide). (B) Árvore evolutiva dos principais genótipos do HCV encontrados em países industrializados e seus principais grupos de risco. Acredita-se que estes genótipos tornaram-se prevalentes ao longo do século XX (Adaptado de Simmonds, 2004).

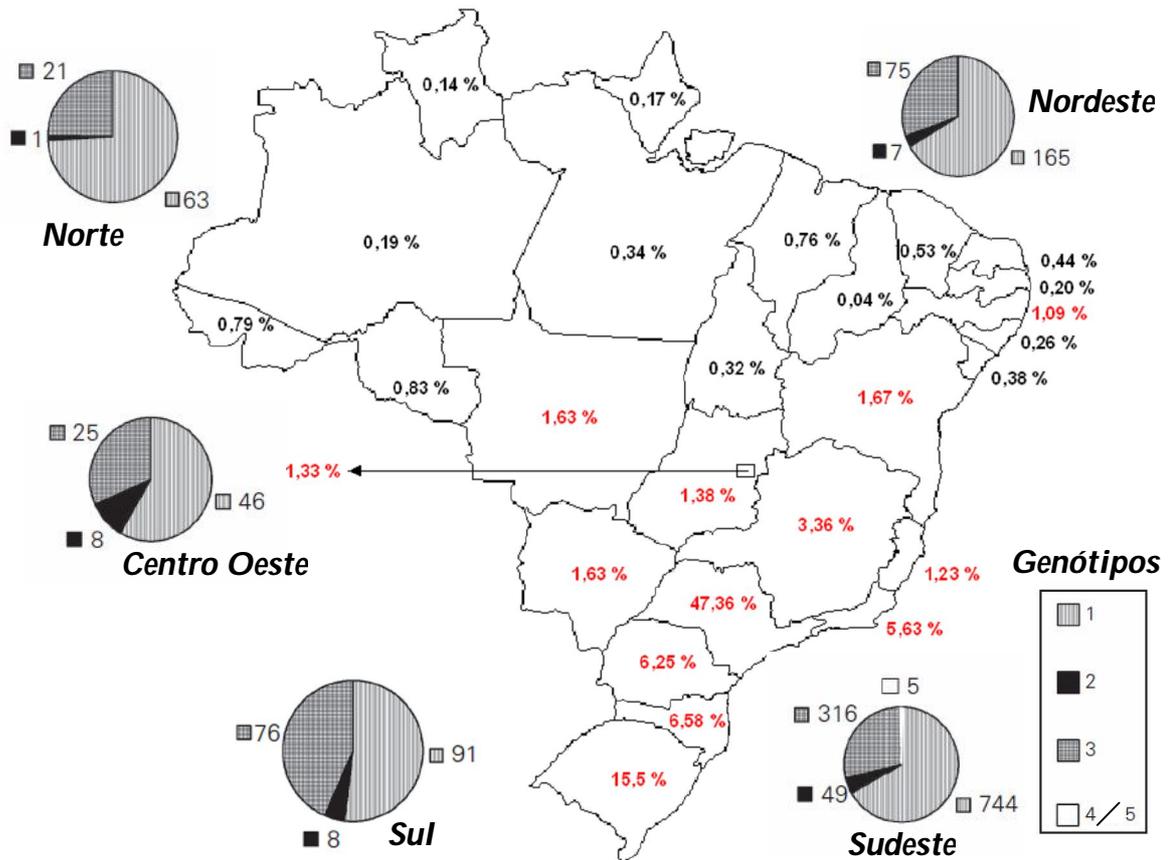


Figura 2: Distribuição do Vírus da Hepatite C no Brasil, destacando os principais genótipos. Altas porcentagens de infectados por estado, mais comum no sul e sudeste, estão mostradas em vermelho, enquanto as porcentagens mais baixas estão representadas em preto. Dados baseados na média dos anos de 2006, 2007 e 2008, segundo os casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Ministério da Saúde. A distribuição dos genótipos segundo cada região brasileira mostra a prevalência do genótipo 1. Os gráficos apresentam o número absoluto de casos, de cada genótipo, por região, baseado no estudo de 1.688 casos brasileiros de Hepatite C (Adaptado de Campiotto *et al.*, 2005).

1.3.2 Patologia

O Vírus da Hepatite C leva ao desenvolvimento de uma inflamação no fígado, patologia denominada Hepatite (*hepato*, do grego, fígado e *ite*, sufixo usual das inflamações). Os hepatócitos são, portanto, os principais alvos destes vírus, que chegam ao fígado através dos capilares sinusoidais, que são capazes de expressar tanto fatores não específicos de ligação como os três principais receptores

celulares para o HCV (Reynolds *et al.*, 2008). O HCV pode ainda infectar células B, células dendríticas e outros tipos celulares (Moradpour *et al.*, 2007).

O período de incubação do HCV varia de 5 a 150 dias a partir do momento da exposição (Czepiel *et al.*, 2008). Embora altos títulos virais sejam observados durante as primeiras semanas de infecção, os processos inflamatórios que levam ao dano hepático surgem no 2º ou 3º mês (Lindenbach & Rice, 2005), e apenas um terço dos pacientes apresenta sintomas de infecção aguda (McHutchison, 2004).

Os níveis de ARN viral encontrados no sangue não determinam a gravidade da doença, maior virulência ou maiores danos hepáticos, mas podem ser usados no seu prognóstico. Os danos hepáticos e o controle da viremia, na fase aguda, estão relacionados a fortes respostas T-CD8⁺ específicas para o HCV, geradas pela interação do vírus com o sistema imune, resultando na substituição do tecido hepático por uma cicatriz fibrosa (Diedrich, 2006; Tang & Grisé, 2009).

A resposta imune inata ao HCV leva à ativação de sensores celulares que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), principalmente duplas fitas de ARN, que por diversos mecanismos geram resposta de sinalização de interferon tipo I, capaz de aumentar a resposta imune adaptativa ao HCV (Chung, 2009).

Em apenas 15% dos pacientes o sistema imune mostra-se capaz de se livrar da infecção espontaneamente. Através de mutantes de escape e da interação de proteínas virais e celulares que o HCV gera a cronicidade em pacientes infectados (Czepiel *et al.*, 2008), caracterizada pela persistência do ARN viral, que pode por sua vez evoluir para um quadro de doença do fígado descompensada, definida pelo aparecimento de ascite, varizes hemorrágicas, encefalopatia hepática, icterícia, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) (Bacon & McHutchison, 2007). Os fatores

de riscos de danos hepáticos progressivos são a idade avançada, o gênero masculino, a raça Caucasiana, a coinfeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou pelo Vírus da Hepatite B (HBV) e a ingestão de altas doses de álcool (Tang & Grisé, 2009).

Cerca de 20% dos pacientes diagnosticados com HCV apresentam cirrose e, como descrito anteriormente, o HCV tem sido relacionado também a desordens malignas, principalmente o carcinoma hepatocelular. O HCV é capaz de alterar o ciclo celular, levando à instabilidade gênica e aneuploidia, induzindo a progressão da fibrose e a senescência celular (Goldberg-Bittman *et al.*, 2009). A oncogênese relacionada ao HCV também pode ser explicada pelas interações de suas proteínas com genes supressores de tumor (Tang & Grisé, 2009).

A infecção pelo HCV, através não só do processo replicativo em si, como também da expressão de proteínas, está relacionada ao aumento do estresse oxidativo e à diminuição da capacidade antioxidante das células que, por sua vez, estão envolvidos na esteatose hepática através de mecanismos ainda não esclarecidos (Bacon & McHutchison, 2007; McLauchlan, 2009; Tang & Grise, 2009). A fibrinogênese acelerada no fígado deve ser, então, considerada como consequência de uma síndrome metabólica complexa (Negro & Alaei, 2009).

O HCC é a terceira causa mais comum de morte associada ao câncer no mundo, sendo a Hepatite C um dos três maiores fatores de risco. Cerca de 2,5% dos pacientes diagnosticados com HCV apresentam a doença (But *et al.*, 2008), que possivelmente está correlacionada com a alteração da expressão de proteínas presentes nas junções apertadas (Burlone & Budkowska, 2009).

1.3.3 Diagnóstico, Tratamentos e Vacinas

Geralmente, qualquer paciente com sinais de hepatite crônica é um candidato em potencial para o tratamento (McHutchison, 2004; Weigand *et al.*, 2007); entretanto, no Brasil, apenas pacientes com resultados positivos por PCR (reação em cadeia da polimerase), níveis de transaminases acima de 50% do considerado normal, e com grau 2 ou superior de fibrose recebem a terapia gratuitamente (Varaldo, 2003).

Antes do início do tratamento, o ARN viral deve ser detectado através de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa) e o genótipo viral deve ser conhecido, pois este é fundamental na determinação da duração da terapia, bem como da dose das drogas utilizadas. Cabe ressaltar que os diferentes genótipos não estão relacionados à virulência ou ao prognóstico da doença, e sim à dificuldade ou demora de resposta à terapia antiviral (Bacon & McHutchison, 2007).

A terapia antiviral inibe a produção de vírus, diminui a infecção de novas células e acelera o “clearance” das células que já estão infectadas. A cura somente é alcançada se houver uma resposta virológica sustentada (SVR), que é definida como a não-detecção de ARN viral após 6 meses do fim da terapia. Esta resposta sustentada mostra-se durável em mais de 95% dos pacientes, permitindo, assim, a interrupção do tratamento. Entretanto, mesmo que a cura não seja alcançada, a terapia é capaz de reduzir a progressão da doença e diminuir as suas complicações (Bacon & McHutchison, 2007).

O tratamento das hepatites virais crônicas teve um grande avanço em 1986, com a introdução dos Interferons (Krekulová *et al.*, 2006), que agem induzindo um estado antiviral não específico nas células alvo, semelhante à resposta por Interferon tipo I desencadeada pelo próprio vírus (Bacon & McHutchison, 2007; Chung, 2009).

Atualmente, o tratamento do HCV baseia-se na combinação de interferon subcutâneo e Ribavirina oral, por 24 a 48 semanas. A Ribavirina (1- β -D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) é um análogo de guanosina com um amplo espectro antiviral (Melnikova, 2008), cuja forma intracelular fosforilada é capaz de inibir diversas polimerases virais.

A monoterapia utilizando Ribavirina apresenta pouco efeito sobre a replicação do HCV, mas sua combinação com Interferon peguilado aumenta a resposta virológica e previne a recaída (Wohnsland *et al.*, 2007). A peguilação é um processo que adiciona um composto biologicamente inerte de polietileno glicol à molécula de Interferon, o que dificulta a saída desta molécula da corrente sanguínea, melhorando a farmacocinética, a meia-vida e a resposta virológica do Interferon (Melnikova, 2008).

A terapia utilizando Interferons peguilados e Ribavirinas é extensa, cara e envolve inúmeros efeitos adversos; apenas 50% dos pacientes atingem uma resposta virológica sustentada. Pacientes portadores dos genótipos 1 e 4 devem manter o tratamento por 1 ano, enquanto os demais, o fazem por apenas 6 meses (Campiotto *et al.*, 2005).

Cerca de 25% dos pacientes tratados não respondem à terapia, e a continuação do tratamento destes pacientes mostra-se controversa (Varaldo, 2003; Weigand *et al.*, 2007; Wohnsland *et al.*, 2007). Sendo assim, a busca cuidadosa de novos tratamentos tem sido proposta por diversos laboratórios farmacêuticos, e o desenvolvimento de novas terapias anti-HCV tem sido focado na inibição de proteínas específicas do vírus como a polimerase ARN-dependente e a serino protease. Algumas destas drogas já estão inclusive na fase de testes clínicos e visam aumentar a eficácia da terapia e diminuir o seu tempo, além de aumentar a

tolerabilidade e aderência ao tratamento ao buscar a administração oral (Melnikova, 2008). A classe de drogas mais promissora no combate ao HCV é a chamada STAT-C, “specifically targeted antiviral therapy for HCV”, que busca uma resposta específica aos epítomos de algumas proteínas virais. Diversos inibidores específicos para as proteínas não estruturais envolvidas na replicação viral estão em desenvolvimento (Thompson & McHutchison, 2009).

Além das proteínas virais, também são alvos das indústrias farmacêuticas, moduladores da resposta imune (Melnikova, 2008); outros tipos de interferons, (Bacon & McHutchison, 2007; Kronenberger & Zeuzem, 2009), inibidores oligonucleotídeos de ADN e ARN antisense, ribozimas, pequenos ARNs de interferência e inibidores da tradução (Pawlotsky, 2009).

A Hepatite C gera cerca de 50.000 mortes por ano no mundo, e estima-se que, entre 2010 e 2020, ocorrerão cerca de 165.900 mortes relacionadas à Hepatite C crônica, sendo 27.200 por HCC. Além disso, quando a terapia antiviral falha, ou há diagnóstico tardio, o que resulta no aparecimento de cirroses descompensadas, doenças hepáticas graves ou HCC, a única saída é o transplante de fígado. Cerca de 50% dos transplantes realizados hoje no ocidente são relacionados à infecção por HCV, e este número deve crescer nas próximas décadas (McHutchison, 2004). Devido ao baixo número de doadores, estima-se que 12% daqueles que esperam pelo transplante acabarão morrendo antes de consegui-lo. Entretanto, o transplante de fígado não representa a cura para a doença, e todos os fígados transplantados acabam sendo reinfectados pelo vírus em até cinco anos após o transplante (Weigand *et al.*, 2007). No Brasil, no período de 1996 a 2006, foram confirmados mais de 70.000 casos da doença, e o número de óbitos foi de aproximadamente 10.000 (Ministério da Saúde, 2006).

Há uma década, uma vacinação efetiva contra o HCV era uma possibilidade remota, uma vez que para que uma vacina seja possível, o vírus deve induzir uma resposta de anticorpos vigorosa e de longa duração, e o desenvolvimento de tal vacina esbarrava na falta de informação sobre os mecanismos de infecção do HCV. Além disso, a alta propensão do vírus de promover infecções crônicas, as altas taxas de reinfeção devido à re-exposição ao vírus, e a heterogeneidade genética também dificultavam o desenvolvimento de vacinas. Hoje, porém, existem, alguns candidatos: vacina recombinante de subunidades protéicas, vacina peptídica, vacina recombinante hepática, vacinas utilizando partículas semelhantes a vírus (utilizando a proteína capsídica do Vírus da Hepatite B), e vacinas de ADN (Mihailova *et al.*, 2007).

1.3.4 Sistemas Modelo

Na ausência de um sistema de cultura de células capaz de amplificar o HCV, diversos modelos de estudo têm sido desenvolvidos. As primeiras abordagens baseavam-se na inoculação de vírus, extraído do soro de pacientes infectados, em hepatócitos primários humanos. Entretanto, devido à baixa produção de partículas, dentre outras limitações, tal tipo de abordagem mostrou-se bastante limitada (Diedrich, 2006; Von Hahn & Rice, 2008; Burlone & Budkowska, 2009).

Atualmente, proteínas de envelope recombinantes, modelos de partículas semelhantes a vírus, principalmente utilizando sistemas de expressão em baculovírus e sistemas de cultura de células de insetos (Lavie *et al.*, 2007; Burlone & Budkowska, 2009), e pseudopartículas de HCV são utilizados em estudos visando elucidar o ciclo infeccioso do HCV (Diedrich, 2006; Burlone & Budkowska, 2009).

Uma vez que o GBV-B, é o vírus mais relacionado com HCV, pesquisadores avaliam a possibilidade de utilizá-lo como modelo, embora dificilmente este vírus seja capaz de causar a manifestação crônica da hepatite (Akari *et al.*, 2009).

Modelos de pequenos animais não são susceptíveis à infecção por HCV. Entretanto, recentemente, diversos modelos de infecção de roedores que permitem a replicação do HCV têm sido desenvolvidos, todavia, estes modelos de baixo custo apresentam limitações que impossibilitam a investigação da infecção e da expressão de proteínas do HCV e o teste de vacinas profiláticas (Akari *et al.*, 2009).

Os chimpanzés constituem o melhor modelo e a primeira escolha para o estudo da infecção e das respostas imunológicas do hospedeiro, uma vez que o HCV é naturalmente capaz de infectar estes animais e gerar a forma crônica da doença em um terço deles. A restrição a este modelo baseia-se no fato de alguns países não permitirem o uso de chimpanzés na experimentação animal por questões éticas ou financeiras (Akari *et al.*, 2009).

Recentemente, a clonagem de um vírus de genótipo 2a, isolado de um paciente japonês, foi bem sucedida e a transfecção de culturas de hepatócitos foi capaz de produzir vírus infecciosos (Diedrich, 2006).

1.4 Características Estruturais do HCV

O HCV apresenta alto grau de heterogeneidade genética, sendo classificado em seis genótipos maiores (que diferem em sua sequência nucleotídica de 30 a 35%), subdivididos em até 50 subtipos (que diferem entre si, dentro de um mesmo genótipo, de 5 a 10%). É um vírus de ARN fita simples, de 9,6 kilobases de comprimento, cujo nucleocapsídeo, supostamente icosaédrico, mede cerca de 50 nm de diâmetro. O nucleocapsídeo (**Figura 3**), formado de cópias da proteína

capsídica e do ARN genômico, apresenta-se, envolvido por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, onde está inserido o heterodímero formado pelas duas glicoproteínas de envelope, E1 e E2 (Von Hahn & Rice, 2008).

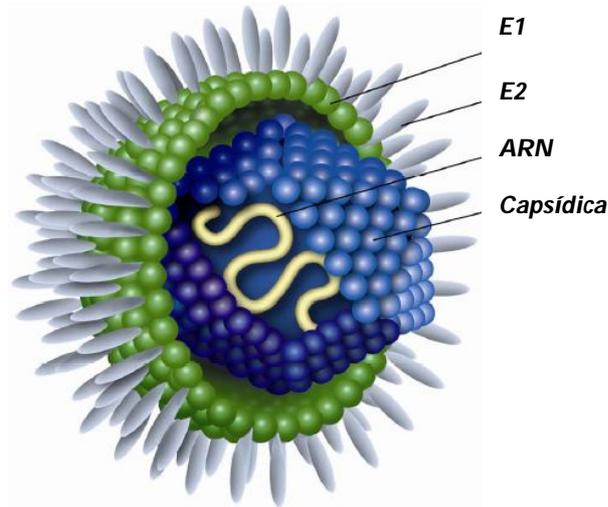


Figura 3: Modelo da estrutura do HCV. A partícula do Vírus da Hepatite C contém múltiplas cópias de três diferentes proteínas estruturais: a proteína capsídica, mostrada em azul, responsável pela proteção do ARN viral, e duas grandes glicoproteínas de envelope, a glicoproteína de envelope 1 (E1), em verde, e a glicoproteína de envelope 2 (E2), em branco. As glicoproteínas virais são importantes para o processo fusogênico (Adaptado de Krekulová *et al.*, 2006).

O genoma do HCV (**Figura 4**) apresenta uma região não codificante 3' (3'-NCR) responsável pela ligação a proteínas celulares (Appel *et al.*, 2006), e uma região não codificante 5' (5'-NCR) altamente conservada (nucleotídeos 341-344), composta por quatro domínios ordenados, sendo os domínios I e II essenciais para a replicação (Moradpour *et al.*, 2007).

Devido ao tamanho reduzido de seu genoma, os vírus são capazes de compactar o máximo de informação em uma sequência polipeptídica mínima. Sendo assim, a maioria das proteínas virais é multifuncional (Cocquerel *et al.*, 2002).

A região codificante é totalmente traduzida a partir de apenas uma ORF (fase de leitura aberta), de maneira similar ao que ocorre com outros membros da família *Flaviviridae*. A poliproteína resultante é proteoliticamente clivada durante e após a

tradução, por enzimas virais e celulares, dando origem às três proteínas estruturais (de envelope E1 e E2, e proteína capsídica), às seis proteínas não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B e NS5A e NS5B) e à p7 (Krekulová *et al.*, 2006).

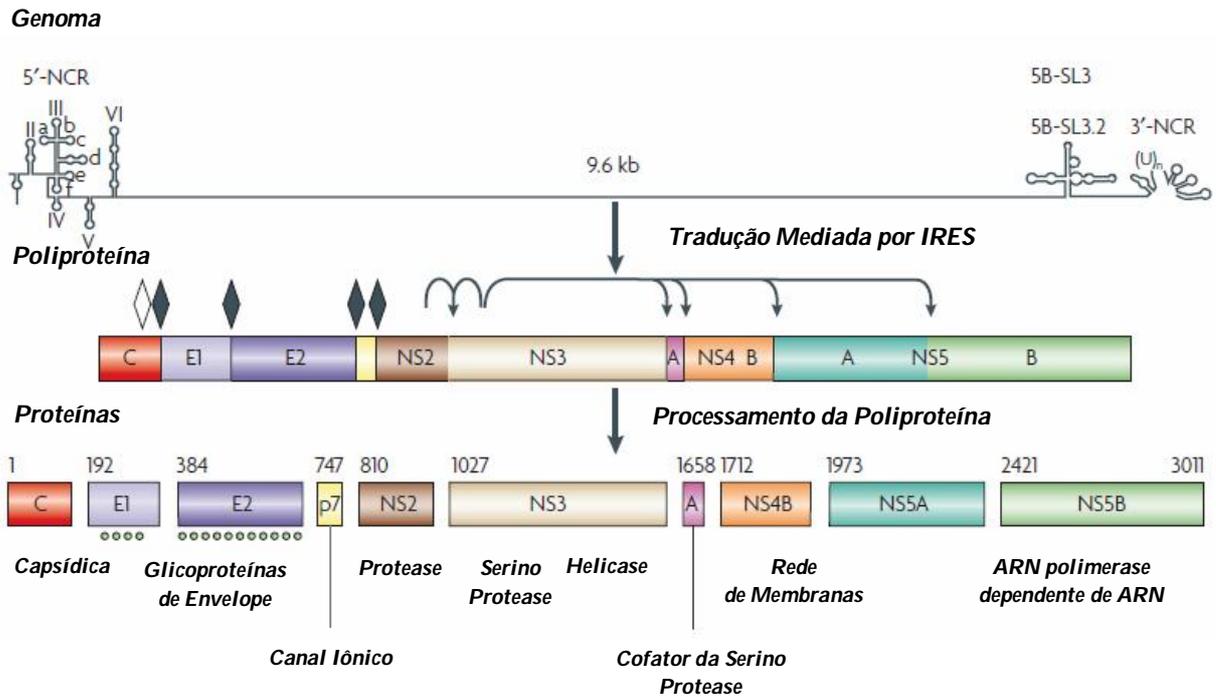


Figura 4: Organização do genoma e processamento da poliproteína do Vírus da Hepatite C. O genoma do HCV consiste de uma ORF de aproximadamente 9400 pares de base, que são traduzidos em uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. O ARN genômico, fita simples positiva está esquematicamente representado, incluindo algumas estruturas secundárias simplificadas, no topo da figura. A tradução do ARN genômico, mediada por IRES, gera a poliproteína precursora que por sua vez dá origem às 10 proteínas maduras: estruturais e não estruturais. A numeração correspondente aos aminoácidos está mostrada acima de cada proteína (HCV genótipo 1a, número de acesso no GenBank AF009606). Os diamantes escuros representam os sítios de clivagem do precursor da poliproteína do HCV por peptidases sinal do retículo endoplasmático. Os diamantes brancos indicam o processamento por uma peptídeo peptidase sinal. As setas indicam as clivagens das proteases virais NS2-3 e NS3-4A. Os círculos verdes presentes em E1 e E2 indicam a glicosilação das proteínas de envelope (Adaptado de Moradpour *et al.*, 2007).

A proteína capsídica é uma proteína básica altamente conservada, responsável pela formação do nucleocapsídeo viral, e que apresenta uma forma madura de aproximadamente 21 kDa, que é liberada da membrana do retículo

endoplasmático (RE) para a superfície de gotículas lipídicas, onde ocorre a montagem das novas partículas virais, e três formas alternativas de menor peso molecular (Tang & Grisé, 2009).

Essa proteína, rica em α -hélice, é dividida em três domínios: o primeiro contém uma alta proporção de resíduos de aminoácidos básicos e estaria envolvido na ligação ao ARN e na oligomerização; o segundo é mais hidrofóbico que o primeiro, sendo importante para o enovelamento; e o terceiro é altamente hidrofóbico, serve como sequência sinal para E1 e contém um domínio transmembranar responsável pelo ancoramento da proteína no retículo endoplasmático (Suzuki *et al.*, 1999; Krekulová *et al.*, 2006; Moradpour *et al.*, 2007).

Além de sua função estrutural, a proteína capsídica é capaz de interagir com gotículas lipídicas e com a apolipoproteína II, o que poderia induzir esteatose; bem como é capaz de interagir com diversos fatores capazes de promover a indução de apoptose, o que leva à liberação de diversas novas partículas em corpos apoptóticos, produzindo inflamação e resposta imune limitadas (Krekulová *et al.*, 2006). Essa proteína também é capaz de alterar a resposta inata do hospedeiro, através de regulação gênica (Suzuki *et al.*, 1999; Chung, 2009), sendo ainda capaz de induzir a carcinogênese e de provocar defeitos na montagem e liberação de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Tellinghuisen & Rice, 2002).

As glicoproteínas de envelope E1 (30-35 kDa) e E2 (70-72 kDa) são proteínas transmembranares tipo 1, cuja região carboxi-terminal (C-terminal) é composta por dois segmentos hidrofóbicos que funcionam como uma âncora hidrofóbica. Estas proteínas são compostas ainda por sequências sinal, responsáveis pela translocação da poliproteína para o retículo, e por domínios transmembranares, que atuam como âncoras de membrana, como sinais de retenção no retículo, como

sequências responsáveis pela heterodimerização e localização subcelular do complexo E1-E2, e que podem ainda estar envolvidos na desestabilização das membranas, na formação de poros e no seu alargamento, de maneira semelhante às regiões pré-transmembranares das proteínas de fusão classe I (Op De Beeck *et al.*, 2000; Cocquerel *et al.*, 2002; Pérez-Berná *et al.*, 2006).

A maturação e o enovelamento das proteínas de fusão são eventos complexos e dependentes não só da formação de ligações dissulfeto, como também de glicosilação e da maquinaria de chaperona do retículo (Voisset & Dubuisson, 2004). As proteínas E1 (resíduos 192-383) e E2 (resíduos 384-746) são altamente glicosiladas. As N-glicosilações são as modificações pós-traducionais mais comuns em proteínas, e ocorrem através da transferência de oligossacarídeos, provenientes de um intermediário lipídico, para um resíduo de Asn na sequência consenso Asn-X-Thr/Ser, onde X pode ser qualquer aminoácido, com exceção da Pro. Esta reação ocorre no retículo endoplasmático (Cocquerel *et al.*, 2002) e é importante para o processo de enovelamento das proteínas virais, bem como para a modulação da resposta imune. As proteínas E1 e E2 apresentam 6 e 11 potenciais sítios de glicosilação, respectivamente, que são altamente conservados (Lavie *et al.*, 2007).

Estas glicoproteínas formam heterodímeros ligados de forma não covalente, resistentes à ação de proteinases, e que são responsáveis pela interação do vírus com a célula hospedeira (Lavillette *et al.*, 2006). Elas podem ainda interagir de maneira covalente, devido a um enovelamento incorreto, produzindo agregados de alta massa molecular responsáveis por disparar a via de estresse de retículo (Lavie *et al.*, 2007).

A glicoproteína E2 apresenta predominância de folhas- β , onde os aminoácidos 384 a 661 representariam seu core estrutural e funcional. Esta proteína

apresenta duas regiões hipervariáveis denominadas HVR1 (resíduos 384-410), que contribui para o escape da resposta imune do hospedeiro (Burlone & Budkowska, 2009) e HVR2, ambas responsáveis pela formação de ligações de hidrogênio (Yagnik *et al.*, 2000). Esta proteína poderia ainda inibir a atividade da proteína quinase dependente de ARN (PKR), sendo este um suposto mecanismo de resistência ao interferon (Tellinghuisen & Rice, 2002).

As glicoproteínas de envelope são encontradas, quase que em sua totalidade, no lúmen do retículo endoplasmático e o seu acúmulo mostra-se necessário para a formação das partículas virais maduras. A liberação das partículas ocorre pela via exocítica, sendo este um mecanismo limitante da resposta imune hospedeira, contribuindo para o estabelecimento da infecção crônica (Krekulová *et al.*, 2006). Entretanto, a retenção destas glicoproteínas no retículo apresenta vazamentos e pequenas frações de E1 e E2 podem ser direcionadas para a membrana plasmática, dando origem a pseudopartículas (Voisset & Dubuisson, 2004).

P7 é uma pequena proteína de 63 resíduos de aminoácidos, altamente hidrofóbica, localizada na região C-terminal de E2 (Krekulová *et al.*, 2006), e sua oligomerização é responsável pela formação de canais iônicos (preferenciais para cálcio), tendo um importante papel na maturação viral e na liberação de novas partículas. Membro da família das vioporinas, a P7 é composta de dois domínios transmembranares, separados por uma pequena alça citoplasmática carregada positivamente. Geralmente, essa proteína é clivada de maneira incompleta, sendo importante para a infecção, apesar de não ser necessária para a replicação do vírus *in vitro* (Moradpour *et al.*, 2007).

A proteína NS2 (23 kDa) possui um domínio amino-terminal (N-terminal) composto por hélices transmembranares responsáveis por ancorar esta proteína no

RE, e um domínio C-terminal protease, capaz de interagir com NS3, formando uma metaloproteinase dependente de zinco, específica para o sítio de clivagem NS2/NS3, sendo esta a primeira clivagem autocatalítica pós-traducional da poliproteína viral (Krekulová *et al.*, 2006).

A proteína NS3 (70 kDa), semelhante ao que ocorre com outros membros da família *Flaviviridae*, consiste de dois domínios: um domínio proteinase na porção N-terminal e um domínio nucleosídeo trifosfatase (NTPase)-helicase na porção C-terminal (Tellinghuisen & Rice, 2002). A NS3 serino-protease é importante para a infecção e para as clivagens co- e pós- traducionais dos sítios NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A e NS5A/B. O completo enovelamento necessário para a atividade serino-protease só é alcançado se um domínio folha- β presente na NS4A estiver intercalado na NS3 e três cisteínas, distantes do sítio ativo, forem coordenadas por átomos de zinco (Lindenbach & Rice, 2005). Já a NS3 helicase é membro do subgrupo Asp-Glu-Cys-His, helicases denominadas “DEAD-box”, onde os cátions Mg^{2+} , Mn^{2+} e o ATP são essenciais para sua atividade (Krekulová *et al.*, 2006).

A NS4A (8 kDa) contém um domínio hidrofóbico em sua porção N-terminal, que é capaz de interagir com membranas e com componentes de replicação. Sua porção central atua como um importante co-fator para a NS3 protease (Krekulová *et al.*, 2006; Tang & Grisé, 2009).

A NS4B (27 kDa) é uma proteína integral de membrana pouco caracterizada, que possui quatro domínios transmembranares e possivelmente forma oligômeros capazes de induzir a formação de redes de membranas importantes para a replicação do HCV (Moradpour *et al.*, 2007).

A NS5A é uma fosfoproteína hidrofílica ligada à membrana e existente em duas formas: de 56 e de 58 kDa. Esta proteína apresenta três domínios definidos,

onde o primeiro, de estrutura dimérica, é responsável pela interação com membranas, ARN e proteínas celulares e virais (Moradpour *et al.*, 2007). A NS5A, quando fosforilada, inibe a atividade PKR, dependente de duplas fitas de ARN, induzida por interferon, e modula a eficiência de replicação e a transição entre o estado replicativo e o estado de montagem viral (Krekulová *et al.*, 2006). A NS5A é capaz de interagir com gotículas lipídicas e com proteínas semelhantes a SNARE (receptores de proteínas solúveis ligantes de fatores sensíveis à N-etilmaleimida), sendo responsável pela organização de membranas durante a infecção (sendo esta última função compartilhada pela proteína NS5B). Essa proteína pode ainda modular a expressão da proteína proto-oncogênica p21 dependente de p53 (Tellinghuisen & Rice, 2002).

A NS5B (68 kDa), uma proteína hidrofílica que contém o motivo GDD comum às ARN polimerases virais dependentes de ARN, possui taxa replicativa de 150 a 200 nucleotídeos por minuto. Sua atividade polimerase é dependente de cátions divalentes, do pH próximo ao neutro e de baixas concentrações de sais. Esta proteína é capaz de interagir com diversas proteínas do hospedeiro necessárias à infecção (Krekulová *et al.*, 2006).

1.5 Ciclo Replicativo dos *Hepacivírus*

O processo infeccioso do HCV (**Figura 5**) é altamente dinâmico, com uma meia vida de poucas horas, sendo produzidas 10^{12} novas partículas virais por dia (Moradpour *et al.*, 2007). O HCV circula no soro dos pacientes infectados como uma população muito heterogênea, de densidade variável, podendo estar em sua forma livre ou, na maioria das vezes, associado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL),

às lipoproteínas de alta densidade (HDL) e às lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Diedrich, 2006).

O início do ciclo infeccioso corresponde à entrada do vírus na célula, um processo no qual a partícula viral deve cruzar a membrana plasmática para liberar seu genoma no interior da célula alvo. A entrada viral é um processo de múltiplas etapas complexas, conectadas e fortemente reguladas no tempo e no espaço, sendo iniciada pela ligação da glicoproteína de envelope a moléculas da superfície da célula (Moradpour *et al.*, 2007).

1.5.1 Fatores de Ligação Específicos e Não-Específicos do HCV

A entrada do vírus na célula geralmente envolve mais de um tipo de fator: os fatores de ligação, responsáveis pela ligação e concentração dos vírus na superfície celular; e os receptores celulares, que promovem ativamente a entrada. A ligação dos vírus a receptores de alta afinidade desencadeia a endocitose, ao converter eventos de sinalização específicos no citoplasma das células, e induz mudanças conformacionais na estrutura das glicoproteínas de envelope do vírus que levam à liberação do genoma viral dentro do citosol, sendo estes os determinantes do tropismo do vírus por determinado órgão e até mesmo por determinada espécie de hospedeiro (Kalia & Jameel, 2009).

Os fatores de ligação não-específicos geralmente envolvem a ligação a glicosaminoglicanos (GAGs), como heparan sulfato, através da região 559-614 de E2, que serviria como um sítio inicial de ancoramento para o HCV, facilitando a interação com receptores de alta afinidade (Von Hahn & Rice, 2008).

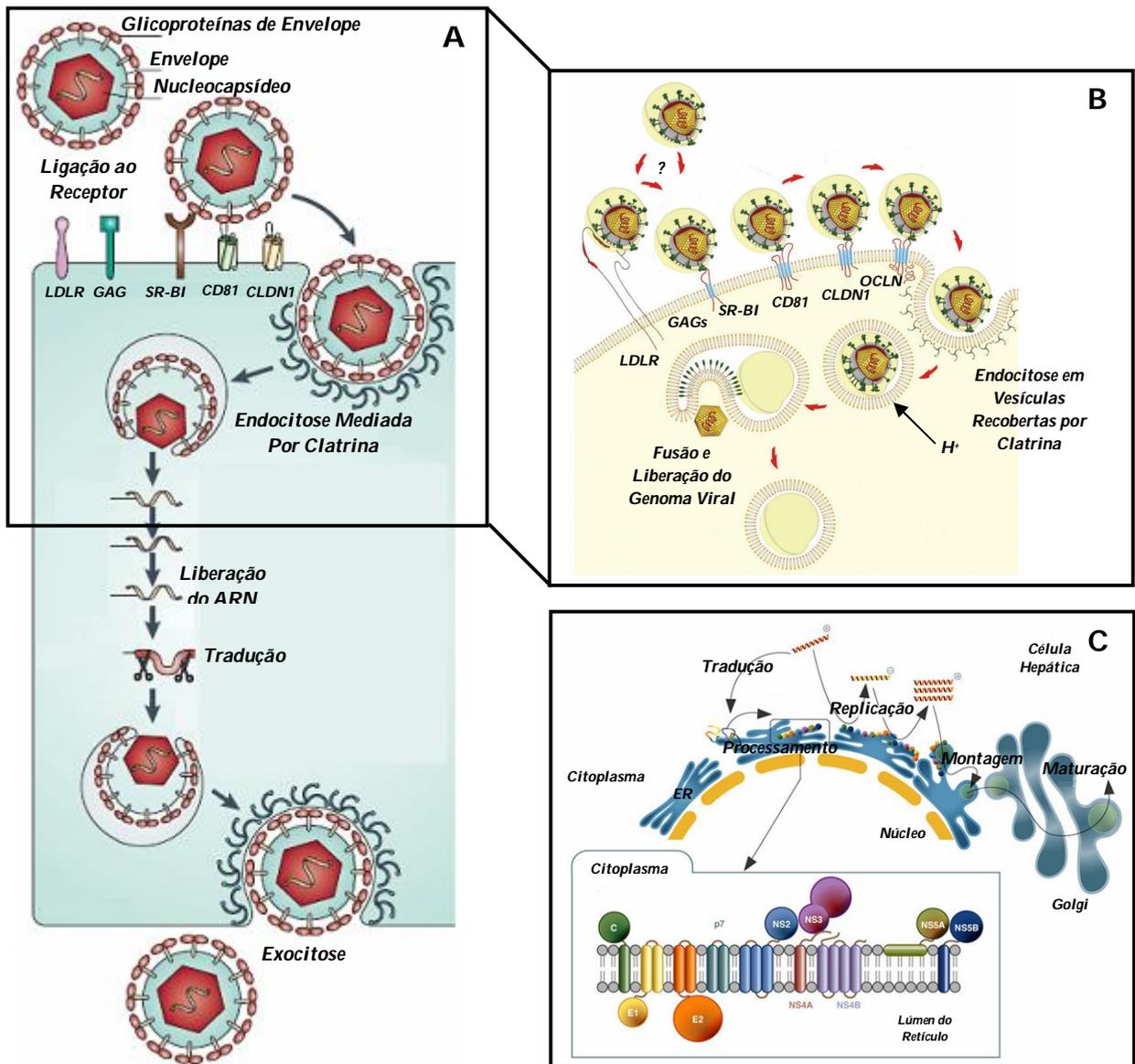


Figura 5: Mecanismos de entrada, processamento, maturação e liberação de partículas infecciosas de HCV. (A) A entrada do HCV requer a ligação a fatores não-específicos e específicos, seguida de endocitose e da fusão de membranas, após a acidificação da vesícula endocítica e consequente exposição do peptídeo de fusão. O material genético é então liberado, traduzido e replicado. Após o processamento das proteínas virais, a partícula é montada e liberada (Adaptado de De Clercq, 2007). (B) Semelhante ao que ocorre com partículas não associadas, o vírus interage com fatores que mediarão a entrada do vírus na célula. Entretanto, as lipoproteínas também são capazes de interagir com tais receptores, facilitando a entrada. A fusão do vírus permite que ele escape da via de degradação das lipoproteínas (Adaptado de Burlone & Budkowska, 2009). (C) Após a fusão de membranas, o RNA é liberado no citoplasma e a tradução é iniciada. Sinais de translocação presentes na poliproteína viral direcionam sua síntese para a membrana do retículo endoplasmático (RE) e a poliproteína é processada por fatores virais e do hospedeiro. O RNA é replicado com a ajuda do complexo replicativo e a partícula é montada, sofrendo o processo de maturação ao longo do complexo de Golgi. Através da via exocítica, a partícula é direcionada à membrana, sendo posteriormente liberada do hepatócito (Adaptado de http://www.tibotec.com/content/backgrounders/www.tibotec.com/hcv_lifecycle.html).

Outros fatores de ligação não-específicos em potencial seriam o receptor de LDL (LDLR), responsável pela ligação de vírus incorporados a moléculas de LDL/VLDL; ASPGR (receptor de asialoglicoproteínas); DC-SIGN (molécula não integrina captadora da molécula de adesão intracelular 3 específica das células dendríticas), expresso em células de Kupffer, células dendríticas e linfócitos; e L-SIGN (molécula não integrina captadora da molécula de adesão intracelular 3 específica dos linfonodos e fígado), expresso em células endoteliais nos sinusóides hepáticos. Devido à ausência de expressão de DC-SIGN e L-SIGN nos hepatócitos, acredita-se que estas moléculas não atuariam como receptores diretos, sendo, suas funções, capturar e transferir o HCV a hepatócitos adjacentes (Diedrich, 2006).

Já os fatores específicos compreenderiam as moléculas CD81 (grupo de diferenciação 81), SR-BI (receptor “scavenger” de classe B tipo I) e CLDN1 (Claudina 1). A molécula CD81, parte do complexo receptor das células B, faz parte da família das tetraspaninas, conhecida por promover a organização de lipídios e proteínas em microdomínios (Von Hahn & Rice, 2008), sendo expressa na maioria dos tecidos humanos, com exceção das hemácias e das plaquetas. CD81 tem como função promover adesão, motilidade, metástase e ativação celular (Diedrich, 2006). Essa molécula possui 236 resíduos de aminoácidos organizados em quatro domínios transmembranares, duas alças extracelulares pequenas (SEL) e uma alça extracelular grande (LEL), responsável pela ligação de CD81 à região HVR2 presente na proteína E2 (Yagnik *et al.*, 2000; Helle & Dubuisson, 2008).

Diversos estudos demonstram que CD81 é necessário, mas não suficiente, para suportar a infecção por HCV, atuando como uma molécula de ligação mais tardia. A ligação do HCV à CD81 ativa Rho GTP-ases, havendo uma realocização do complexo E2/CD81 para as regiões de contato entre as células, onde a molécula

de CD81 entra em contato com as proteínas presentes nas junções apertadas. As junções apertadas nas células hepáticas separam o domínio canalicular do hepatócito, envolvido na secreção da bile, do domínio luminal da célula, sendo, portanto, responsável por manter a polaridade do hepatócito (Budkowska, 2009).

A molécula de CD81 ativa a cascata de sinalização Raf/MEK (quinase ativada por mitógeno)/ERK (quinase regulada por sinal extracelular), afetando as etapas futuras do ciclo infeccioso do HCV. A molécula de CD81 poderia, ainda, modular a resposta imune adaptativa através de interações com células T e B, contribuindo para a persistência viral e patogênese (Burlone & Budkowska, 2009).

Outro fator de ligação específico, o SR-BI, foi identificado inicialmente como o maior receptor fisiológico de lipoproteínas de alta densidade no fígado. Este receptor, de múltiplos ligantes (HDL, LDL e VLDL), é expresso em diversas células de mamíferos, embora os maiores níveis de expressão sejam encontrados no fígado e em tecidos esteroideogênicos (Dubuisson *et al.*, 2008), estando envolvido na captação seletiva de lipídios, principalmente ésteres de colesterol provenientes de moléculas de HDL e de VLDL (Burlone & Budkowska, 2009).

Diversos estudos demonstram que, da mesma forma que CD81, SR-BI atuaria como uma molécula de ligação mais tardia, onde o domínio HVR1 (presente em E2) seria importante na interação direta com SR-BI, embora também seja proposta a interação através da forma ligada a lipoproteínas (Helle & Dubuisson, 2008). Os ligantes naturais de SR-BI, VLDL e LDL oxidado, são capazes de inibir a entrada de pseudopartículas de HCV nas células, enquanto o HDL facilita a infecção (Budkowska, 2009). O HCV parece se ligar primeiramente à molécula SR-BI antes de interagir com o CD81. Esta molécula poderia, ainda, mediar um rearranjo da membrana plasmática, agindo como um importante provedor de colesterol,

regulando a organização das moléculas de CD81, controlando assim a permissividade da membrana plasmática às partículas de HCV (Burlone & Budkowska, 2009).

Algumas proteínas membros da família das Claudinas (CLDN), em especial a claudina 1, também estariam envolvidas na entrada do HCV, o que foi descoberto uma vez que a expressão de CD81 e de SR-BI não era suficiente para suportar a entrada do HCV na célula. A família das Claudinas é composta por 24 membros responsáveis pela formação das junções apertadas. A CLDN-1 interage com o HCV através de uma alça extracelular altamente conservada e crítica para a entrada do HCV, mostrando-se importante nos eventos tardios do processo de entrada (Von Hahn & Rice, 2008).

Embora a lista de fatores diretos e indiretos envolvidos na entrada do HCV parecesse completa, mesmo quando as células eram manipuladas para expressar todas estas moléculas (CD81, SR-BI, Claudina 1, glicosaminoglicanos e receptores de LDL), elas eram capazes de resistir à infecção por HCV, indicando que ao menos um fator crucial permanecia desconhecido. Descobertas recentes apontam que a interação HCV-CD81 permitiria também a interação das partículas virais com Ocludinas (OCLN), proteínas presentes nas junções apertadas responsáveis por regular a permeabilidade paracelular e a adesão celular (Liu *et al.*, 2009; Ploss *et al.*, 2009).

Cabe ressaltar que estudos recentes mostraram que, embora versões dos receptores SR-BI e CLDN1 presentes em camundongos sejam capazes de permitir a entrada do HCV, apenas as versões humanas de OCLN e CD81 o fazem. As células que apresentam versões humanas ou murinas de SR-BI atuam de maneira equivalente, enquanto as que apresentam CLDN1 humana são mais permissivas à

infecção por HCV. Além disso, a redução de expressão de OCLN leva à inibição da entrada do HCV (Ploss *et al.*, 2009).

Embora os receptores capazes de mediar a entrada do HCV nas células sejam ubíquos, não sendo, portanto, exclusivos do fígado, apenas os hepatócitos humanos são capazes de expressar todos os fatores celulares necessários para que o ciclo replicativo do HCV ocorra (Budkowska, 2009).

1.5.2 Endocitose e Fusão de Membranas

Após a ligação ao receptor, inicia-se o processo de fusão de membranas. Este processo não ocorre necessariamente na membrana plasmática e pode envolver ainda endocitose e o tráfego vesicular (Helle & Dubuisson, 2008).

Embora ainda não haja um consenso entre os pesquisadores, a maioria afirma que a entrada dos vírus nas células segue o seguinte modelo: primeiramente, a proteína de fusão viral é mantida em um estado inativo na superfície viral, até que, após a interação com receptores específicos na superfície celular ou a modificação do pH, a proteína de fusão mude dramaticamente a sua conformação, expondo regiões hidrofóbicas capazes de mediar a fusão, conhecidas como peptídeos de fusão. A proteína de fusão sofre novas modificações capazes de aproximar os domínios transmembranares e o peptídeo de fusão já inserido na membrana celular, levando à hemifusão, ou seja, à mistura de lipídios entre duas monocamadas próximas. Em seguida, ocorre a formação de poros, que consistem em conexões aquosas entre o vírus e a célula, e a fusão completa, quando há mistura total das bicamadas lipídicas como consequência da aposição das membranas celular e viral (Martens & McMahon, 2008).

Pequenos vírus envelopados de ARN fita simples, como os *Alfavírus* e os *Flavivírus*, primeiramente entram na célula por endocitose mediada por receptor e depois fusionam com a membrana endossomal em resposta às condições ácidas (Helenius *et al.*, 1980; Heinz & Allison, 2000).

Como o que ocorre com a maioria dos vírus que infectam animais, o HCV entra nas células hospedeiras por endocitose mediada por receptor em vesículas revestidas por clatrina, onde a penetração no citoplasma é geralmente ativada pelo pH em torno de 6,3 (pH ótimo de 5,5), o que pode ocorrer em endossomos primários ou nos tardios (Pelkmans & Helenius, 2003).

A fusão e a endocitose do HCV seriam processos de cinética lenta e o baixo pH induziria mudanças conformacionais responsáveis pela fusão do vírus com endossomos iniciais (Dubuisson *et al.*, 2008). Uma vez que as lipoproteínas são rapidamente endocitadas, algumas formas do HCV devem utilizar esta associação para adesão e internalização nas células, ao invés de utilizar as glicoproteínas de envelope virais (Diedrich, 2006).

A infecção por HCV se restringe principalmente aos hepatócitos, que são de extrema importância na homeostase do colesterol em mamíferos, e, portanto, diversas são as etapas do ciclo replicativo supostamente dependentes de lipídios. Os lipídios podem participar do processo de ligação, como é o caso do colesterol na fusão do SFV (Vírus da Floresta de Semliki); induzir a formação de regiões de membrana não homogêneas enriquecidas em colesterol e esfingolipídios, formando os microdomínios que constituem plataformas dinâmicas de entrada de diversos vírus; podem induzir curvaturas de membrana específicas, e no caso específico do HCV, o bloqueio da ácido graxo sintase pode ainda regular negativamente a

expressão de CLDN-1, dificultando o processo de entrada do vírus (Lavillette *et al.*, 2006).

No caso de vírus envelopados, as moléculas de água ligadas às cabeças polares das membranas virais e celulares exercem grande força repulsiva quando colocadas em proximidade. As proteínas de fusão virais são capazes de ultrapassar essa barreira de hidratação, devido ao seu re-novelamento que promove a exposição dos peptídeos de fusão, sequências hidrofóbicas responsáveis pela transposição da barreira energética gerada pelas deformações da curvatura devido aos mecanismos de hemifusão e de formação do poro (Martens & McMahon, 2008). Embora dados preliminares proponham uma participação direta de E1 na fusão de membrana, enquanto E2 estaria envolvida na interação com receptores e na heterodimerização, dados recentes sugerem que ambas as proteínas poderiam participar do processo fusogênico (Pérez-Berná *et al.*, 2008).

Alguns autores especulam, ainda, uma possível associação do HCV com exossomos (Diedrich, 2006; Burlone & Budkowska, 2009), vesículas que contêm proteínas do hospedeiro envolvidas na adesão celular e na fusão de membranas. Acredita-se que os exossomos podem fundir com membranas alvo e transportar componentes citosólicos e de membranas de uma célula a outra. Se as partículas de HCV estiverem integradas ao centro destas vesículas, o vírus poderia usar as propriedades altamente fusogênicas dos exossomos para entrar na célula (Diedrich, 2006).

1.5.3 Liberação, Replicação e Tradução do ARN

Após a entrada do vírus, o genoma é, então, liberado no citoplasma da célula hospedeira e as proteínas do HCV são geradas através da tradução mediada por um sítio de entrada ribossomal interno, IRES, no retículo endoplasmático. O início da tradução ocorre após a formação de um complexo binário entre IRES e a subunidade ribossomal 40S (Moradpour *et al.*, 2007); e a ligação da proteína de ligação a regiões ricas em polipirimidina à região codificante da proteína capsídica inibe a tradução do ARN do HCV, facilitando a transição da tradução do ARN a replicação de fitas senso negativo (Polyak, 2003).

O complexo de replicação é, então, formado por alterações induzidas pela NS4B nas membranas derivadas de retículo endoplasmático, formando redes de membrana, intimamente associadas ao transporte intracelular, e ao metabolismo lipídico, que podem estimular ou inibir a replicação (Lindenbach & Rice, 2005; Moradpour *et al.*, 2007; Budkowska, 2009). A NS5B se liga à porção 3' do ARN para iniciar a síntese de novas fitas de ARN, e as fitas negativas geradas servem de molde para a produção de novas fitas positivas de ARN, que podem ser usadas para tradução, replicação ou para a produção de novas partículas que reiniciarão o ciclo infeccioso (Appel *et al.*, 2006).

1.5.4 Montagem e liberação das partículas

Parte das proteínas não estruturais estaria direcionada ao processo de replicação viral e a outra parte, intimamente relacionada ao processo de montagem. Este processo, por sua vez, parece estar associado a gotículas lipídicas, onde a proteína capsídica já foi encontrada recobrimdo a superfície. As proteínas não-estruturais e o ARN seriam recrutados para áreas próximas às gotículas lipídicas

apenas na presença da proteína capsídica. Foi demonstrada recentemente também uma possível ligação entre a montagem e liberação das partículas maduras de HCV e a montagem de VLDL, sugerindo que as partículas de HCV poderiam estar ligadas ou incorporadas a VLDL durante a montagem e liberação desta lipoproteína. Cabe ressaltar que as gotículas lipídicas fornecem os lipídios que serão incorporados à VLDL. Entretanto, essa pode não ser a única via de liberação deste vírus (Huang *et al.*, 2007).

O acúmulo de proteínas estruturais no retículo endoplasmático sugere que o capsídeo viral e o envelope são formados neste compartimento (Diedrich, 2006).

1.6 Proteínas de Fusão

Os vírus, como patógenos intracelulares obrigatórios, precisam encontrar maneiras de cruzar a membrana celular. Esta é a chave para o início do ciclo replicativo, e envolve diversas etapas, que vão desde a ligação do receptor e entrada, até a desestabilização do capsídeo e o desempacotamento do genoma (Kalia & Jameel, 2009). A fusão de membranas é a etapa chave da entrada de vírus envelopados nas células. Esta função é mediada por proteínas de fusão, que em sua maioria sofrem grandes mudanças conformacionais induzidas pela ligação ao receptor (Weissenhorn *et al.*, 1999). Em muitos casos, esta ligação converte a glicoproteína a um estado metaestável de menor energia, havendo exposição do peptídeo de fusão altamente conservado, antes “escondido” (Colman & Lawrence, 2003). Pelo menos duas classes (**Figura 6**) dessas proteínas podem ser distinguidas: as proteínas de classe I e as de classe II (Lescar *et al.*, 2001).

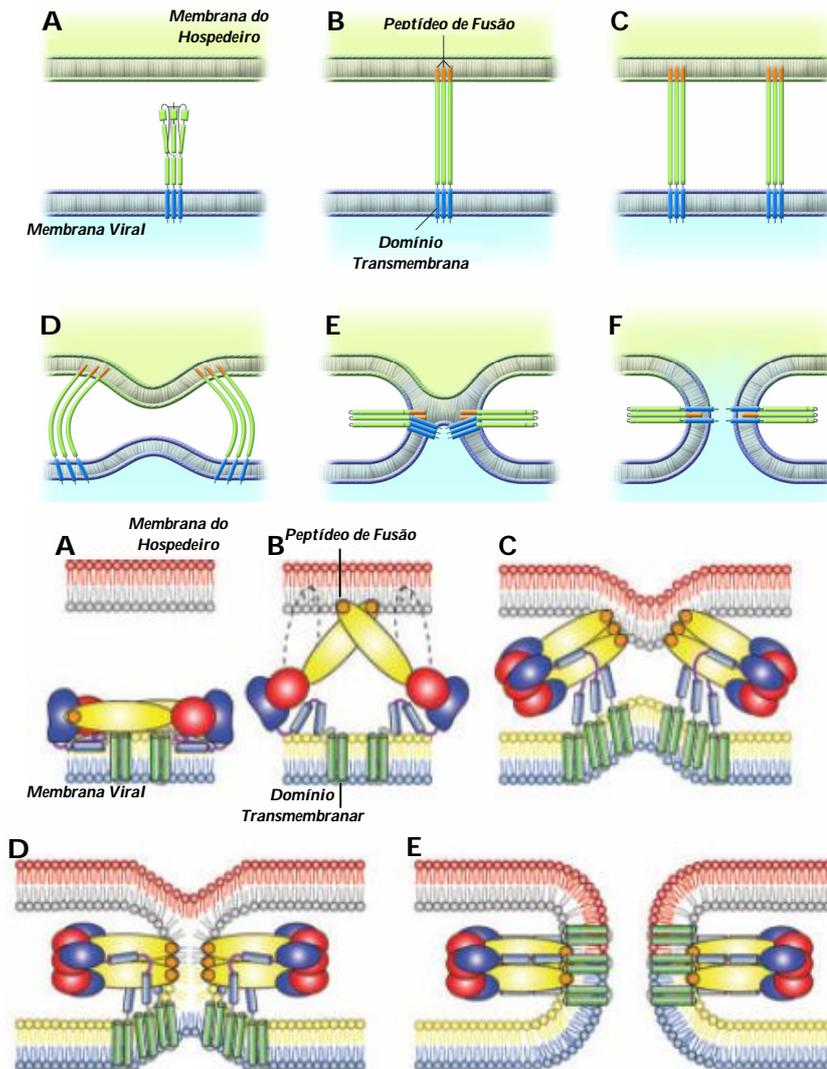


Figura 6: Mecanismos propostos para a fusão de membranas de proteínas classe I e II. *Painel Superior: Modelo da fusão de membrana mediada por proteínas de fusão classe I. A, conformação metastável de uma proteína de fusão trimérica da classe I, com seus dois domínios hidrofóbicos: o peptídeo de fusão e o domínio transmembranar, ambos adjacentes às regiões repetitivas conservadas; B, após a ligação a um receptor sobre a membrana celular, ou sob exposição ao baixo pH (no endossomo), as proteínas adotam uma conformação estendida, e o peptídeo de fusão se insere na membrana alvo; C, vários trímeros estão envolvidos nesta condição; D, as proteínas começam a se re-enovelar, ocasionando a curvatura da membrana viral em direção à do hospedeiro; E, a formação de um talo de hemifusão permite a mistura de lipídios das membranas; F, o re-enovelamento da proteína se completa, e o peptídeo de membrana e o domínio transmembranar estão antiparalelos na mesma membrana, formando uma proteína de fusão mais estável (Adaptado de Moscona (2005)). Painel Inferior: Modelo esquemático dos estágios do processo fusogênico das proteínas de fusão classe II. A, a proteína E dimérica em seu estado metaestável na superfície viral. O domínio I está em vermelho, II em amarelo e III em azul claro e escuro; B, o baixo pH no endossomo leva à dissociação da proteína E, e um giro do domínio II para cima permite que os monômeros se rearranjam lateralmente e a alça de fusão se insere no folheto externo da membrana celular; C, início da formação do grampo e do trímero, onde o domínio III muda e roda para criar contatos, curvando a membrana; D, a formação de mais um contato leva à hemifusão; E, a forma final mais estável da proteína e formação do poro de fusão (Adaptado de Stiasny & Heinz, 2006).*

A classe I de proteínas de fusão é representada pelos *Ortomixovírus*, *Retrovírus*, *Paramixovírus* e *Filovírus*. Após a ligação a um receptor na membrana celular, ou a exposição ao baixo pH encontrado em compartimentos intracelulares (endossomos), a proteína adquire uma conformação estendida trimérica e o peptídeo de fusão hidrofóbico se insere na membrana alvo. A energia livre liberada leva a uma curvatura na membrana, e à formação de uma “haste” de hemifusão permite a mistura de lipídios (Jardetzky & Lamb, 2004). As proteínas de classe I apresentam analogia às proteínas de fusão celulares, SNARES (Sollner, 2004).

Já as proteínas de fusão de classe II, representadas pelos *Alfavírus* e *Flavivírus*, não são proteoliticamente clivadas e apresentam os peptídeos de fusão internos preferencialmente na região amino-terminal. A proteína E se liga a um receptor celular e o vírus é internalizado em endossomos, onde a fusão de membrana irá liberar o vírus para o citosol. O pH ácido dentro do endossomo permite a lateralização e o rearranjo dos monômeros da proteína E em trímeros, levando à exposição do peptídeo de fusão, que se insere na membrana da célula hospedeira. O terceiro domínio da glicoproteína E leva à curvatura da membrana (Jardetzky & Lamb, 2004).

Uma nova classe de proteínas de fusão, classe III, vem sendo proposta para os *Rabdovírus*, *Herpesvírus* e *Baculovírus*, caracterizada por uma mudança conformacional reversível e que não requer ativação por clivagem proteolítica (Da Poian *et al.*, 2005). Estas proteínas de fusão, compostas de cinco domínios, carregariam características comuns tanto às proteínas classe I, ao apresentarem uma hélice trimérica central, quanto às proteínas classe II, ao apresentarem três domínios com predominância de folhas- β (Backovic & Jardetzky, 2009).

As proteínas de fusão apresentam duas regiões capazes de interagir com membranas: um domínio transmembranar C-terminal e um peptídeo de fusão interno ou na região N-terminal (Drummer *et al.*, 2007). Os peptídeos de fusão são responsáveis por vencer a barreira energética formada pela ligação das moléculas de água às cabeças polares dos lipídios das membranas celulares e virais quando estas se aproximam, fornecendo ao sistema a energia necessária para que haja a mistura das bicamadas lipídicas (Colman & Lawrence, 2003). Constituídos de 20 a 30 resíduos apolares bem conservados dentro de uma mesma família, frequentemente assumem estruturas helicoidais quando associados a membranas (Shmulevitz *et al.*, 2004). Em geral, são carregados negativamente, ricos em alaninas, glicinas, leucinas e isoleucinas, podendo estar presentes na extremidade N-terminal ou no meio da sequência da proteína de fusão (Tamm *et al.*, 2002). Essas sequências incluem ainda resíduos de cisteína que estão envolvidos na formação de ligações de enxofre específicas para estabilizar o enovelamento das glicoproteínas de envelope e resíduos hidrofóbicos, especialmente resíduos aromáticos como o triptofano, e em uma minoria a tirosina (Lavillette *et al.*, 2007).

As glicoproteínas do HCV supostamente pertencem à classe II de proteínas fusogênicas virais. Entretanto, não há evidências que essas proteínas sejam maturadas por endoproteases virais durante o seu transporte pela via secretória, como ocorre com outras proteínas desta mesma classe (Voisset & Dubuisson, 2004). Além disso, as glicoproteínas do HCV são altamente glicosiladas (**Figura 7**), enquanto as proteínas de envelope de outros vírus pertencentes à classe II apresentam baixo grau de glicosilação (Lavie *et al.*, 2007).

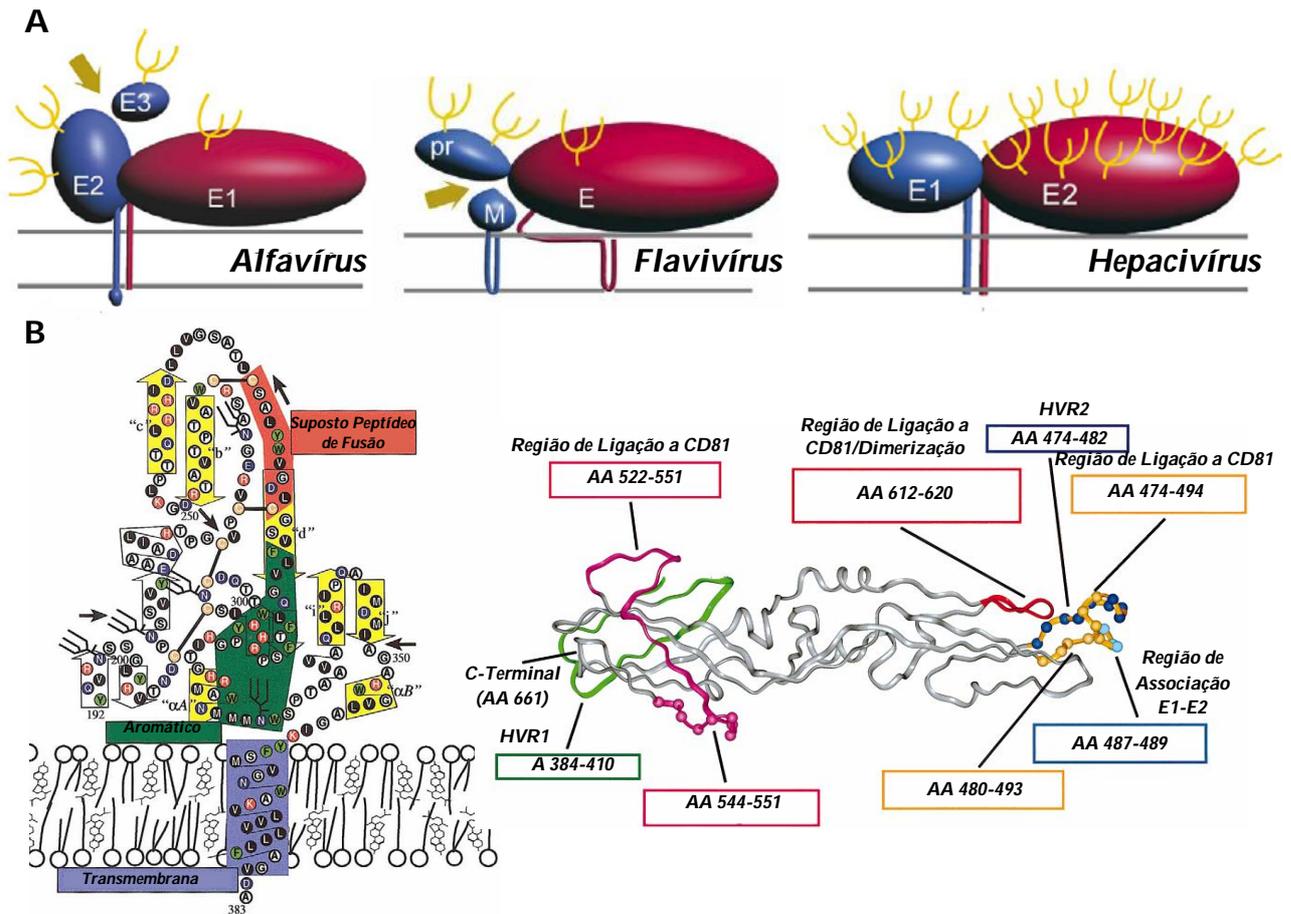


Figura 7: Comparação entre as proteínas de envelope dos *Flavivirus*, *Alfavirus* e *Hepacivirus*. (A) As proteínas de fusão classe II são sintetizadas como um complexo protéico (em vermelho e azul). As proteínas acessórias são clivadas (representação pelas setas amarelas) pouco antes da liberação destas proteínas da célula hospedeira, gerando as proteínas de fusão maduras fusogênicas. Apesar das glicoproteínas do Vírus da Hepatite C supostamente pertencerem às proteínas de fusão classe II, elas não sofrem clivagens para liberação de proteínas acessórias, bem como apresentam alta glicosilação (glicanos representados em amarelo) (Adaptado de Voisset & Dubuisson, 2004). (B) Representações esquemáticas das glicoproteínas de envelope E1 (esquerda) e E2 (direita) do HCV, baseadas na proteína de envelope do Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapatos (TBEV) (Adaptado de Garry & Dash, 2003 e Yagnik *et al.*, 2000).

Normalmente, a região fusogênica dos flavivirus e dos alfavirus inclui ao menos três glicinas, um triptofano, duas fenilalaninas e alguns outros resíduos bastante hidrofóbicos (Lavillette *et al.*, 2007). Mais recentemente, o papel das histidinas como sensor do pH na fusão dos flavivirus tem sido muito discutido, uma vez que o pH fusogênico, em torno de 6, é muito próximo do pKa da histidina (pKa ~6-7). Em pH neutro, as histidinas não estão carregadas e tornam-se duplamente

protonadas e carregadas positivamente quando o pH é acidificado no endossomo (Stiasny *et al.*, 2009).

O alinhamento de sequências altamente conservadas da glicoproteína E1 com os possíveis peptídeos de fusão dos *Flavivírus* revelou inúmeras semelhanças: dois resíduos de cisteína, dois de glicina e um de asparagina altamente conservados, além da presença de resíduos ácidos. Sendo assim, acredita-se que o peptídeo de fusão do HCV estaria presente em E1 (Flint *et al.*, 1999). Entretanto, a proteína E2 apresenta um grande ectodomínio que pode ser dividido em três subdomínios, de maneira homóloga à glicoproteína E dos *Flavivírus*, apresentando os domínios de ligação ao receptor, dimerização e fusão (Drummer *et al.*, 2007).

Algumas evidências recentes indicam que é muito simplificado pensar que uma proteína de fusão interaja com a membrana celular e viral por apenas dois segmentos, o peptídeo de fusão e o domínio transmembranar. Outras mudanças conformacionais seriam necessárias para que as duas membranas pudessem fusionar completamente, e diversas regiões das proteínas de fusão assistiriam de maneira indireta o processo de fusão, como por exemplo, as regiões “stem”. Em contraste à organização simples dos peptídeos de fusão do vírus Influenza e dos *Flavivírus*, duas estruturas cristalográficas recentemente reveladas mostram que o Vírus Herpes Simplex 1 e o Vírus da Estomatite Vesicular apresentam um peptídeo de fusão de estrutura dividida em duas e composta por duas alças hidrofóbicas relativamente apolares (Lavillette *et al.*, 2007). De fato, a existência de dois peptídeos de fusão (um na região N-terminal e um interno) já foi descrita nas proteínas de envelope dos vírus Measles, Sendai e HIV-1 (Pacheco *et al.*, 2006).

Diferentes regiões das proteínas E1 e E2 poderiam cooperar para o evento de fusão. A utilização de sistemas de pseudopartículas revelou três regiões importantes

para a fusão com lipossomos: a primeira estaria presente na E1 (267-290) e representaria o peptídeo de fusão classicamente descrito. Esta sequência hidrofóbica interna apresenta um centro formado por resíduos aromáticos e hidrofóbicos, e duas cisteínas altamente conservadas em relação aos *Flavivírus* (Garry & Dash, 2003). Já as outras duas regiões compreenderiam os resíduos 419-433 e 597-620, presentes na E2 (Helle & Dubuisson, 2008).

A glicoproteína E1 apresenta três regiões membranotrópicas: 265-296, 310-348 e 349-381 (Pérez-Berná *et al.*, 2008). Segundo Drummer e colaboradores (2007), a sequência 272-281 não apresenta grande homologia com os peptídeos de fusão dos *Flavivírus* e dos *Alfavírus*, mas a extensão C-terminal deste segmento incorpora elementos dos peptídeos de fusão classe II como o domínio VFLVG, três resíduos de cisteína totalmente conservados, uma prolina (295) central e um triptofano (299). A fenilalanina (285) presente no motivo VFLVG tem papel fundamental no processo de entrada viral. Sendo assim, o peptídeo de fusão compreenderia o segmento 276 a 286, uma sequência em alça, onde F285 mediaría interações críticas e outros resíduos hidrofóbicos contribuiriam para o anel hidrofóbico. A glicoproteína E1 poderia, portanto, representar uma proteína de fusão classe II que perdeu sua capacidade de se ligar a um receptor durante o processo evolutivo (Drummer *et al.*, 2007).

Um segundo motivo de fusão seria representado pela região 330-347 que precede o domínio transmembranar (Drummer *et al.*, 2007). A região 310 a 348 está localizada de maneira adjacente ao domínio transmembranar, sendo altamente hidrofóbica e capaz de desestabilizar membranas modelo, tendo uma ligação preferencial a membranas compostas por lipídios negativos. Apesar de não apresentar grande quantidade de resíduos aromáticos, como o que ocorre em

proteínas de fusão classe I, essa região seria capaz de desestabilizar membranas como as regiões pré-transmembranares presentes nesta classe de fusão. Essa região seria ainda formada por um misto de regiões não estruturadas e estruturas em hélice. Já o segmento 349 a 381 define um domínio transmembranar (Pérez-Berná *et al.*, 2008). Tem sido descrito que uma sequência com capacidade de interagir com interfaces de membrana, seguida imediatamente por uma região transmembranar, pode constituir novos motivos estruturais envolvidos na fusão (Pacheco *et al.*, 2006).

O grupo de Pérez-Berná (2008) descreveu diversas sequências capazes de promover hemifusão, fusão e extravasamento na glicoproteína E2. Uma das regiões mais membranotrópicas compreenderia os resíduos 715-746, o que corresponde ao domínio transmembranar C-terminal. As regiões adjacentes correspondentes aos resíduos 603-635 e 525-565 também são membranotrópicas e poderiam estar envolvidas no enovelamento e na ligação aos receptores. A região 603-634 é altamente hidrofóbica, apresenta estrutura rica em folhas- β e agregados- β conectados por ligações de hidrogênio, e é rica em aminoácidos aromáticos, uma característica de regiões pré-transmembranares presentes em *Filovírus* e *Retrovírus* (Pacheco *et al.*, 2006; Pérez-Berná *et al.*, 2008). A seguir, encontra-se a região 455-489, que inclui o domínio HVR2, e adjacente encontra-se a região mais membranotrópica de E2, resíduos 423-453, que apresenta o motivo GLF altamente conservado em proteínas de fusão classe I (Drummer *et al.*, 2007). Esta última não é tão ativa quanto o segmento 265-296 de E1, mas, se o peptídeo de fusão estivesse em E2, essa região seria candidata a contê-lo (Pérez-Berná *et al.*, 2006). Apesar desta sequência apresentar características semelhantes às dos peptídeos de fusão,

alguns trabalhos indicam que esta seria uma região de ligação a CD81 (Drummer *et al.*, 2007).

Todos os autores concordam que o heterodímero E1/E2 parece ser a unidade funcional do HCV e o baixo pH induziria a dissociação e oligomerização da forma ativa da proteína de fusão. Um mecanismo alternativo de promover a fusão seria através da cooperação de E1 e E2 através da alça de E1 e da região stem de E2, o que representaria um novo paradigma na fusão viral (Drummer *et al.*, 2007).

Embora muita informação tenha sido fornecida nestes últimos anos acerca das diferentes regiões das glicoproteínas responsáveis pela interação com membranas, pouco ainda se conhece sobre a conformação e sobre os parâmetros que dirigem esta interação. Sendo assim, neste trabalho, nós descrevemos uma análise estrutural e termodinâmica da interação de uma região membranotrópica da glicoproteína E2 do HCV com sistemas biomiméticos de membrana de diferentes cargas.

2- Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo principal desta dissertação se baseia na caracterização biofísica de uma região membranotrópica pertencente à glicoproteína E2 do Vírus da Hepatite C, o possível peptídeo de fusão HCV₄₂₁₋₄₄₅, visando elucidar sua estrutura tridimensional em solução e na presença de modelos biomiméticos de membrana, além de avaliar os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação peptídeo-micela.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar as regiões hidrofóbicas possivelmente envolvidas na interação do HCV₄₂₁₋₄₄₅ com membranas através de escalas de hidrofobicidade semi-empíricas;
- ❖ Investigar a interação do HCV₄₂₁₋₄₄₅ com agregados micelares de diferentes detergentes, capazes de mimetizar membranas, através de análises da fluorescência intrínseca do Trp presente no peptídeo e da supressão de sua fluorescência por acrilamida, o que permite inferir características da interação com diferentes modelos de membrana, tais como a necessidade de cargas para a interação;
- ❖ Avaliar a importância da protonação das cadeias laterais da histidina, investigando seu papel na modulação da interação com modelos de membrana de maneira dependente de pH, através da análise espectroscópica da interação peptídeo-micela no pH neutro e no pH ácido;
- ❖ Estudar os parâmetros termodinâmicos que regem a interação peptídeo-micela, através de calorimetria de titulação isotérmica (ITC);

❖ Avaliar a conformação adotada pelo HCV₄₂₁₋₄₄₅ na ausência e na presença de ambientes micelares, mediante o uso de dicroísmo circular (CD) e ressonância magnética nuclear (RMN).

❖ Investigar a interação do HCV₄₂₁₋₄₄₅ com bicamadas lipídicas (lipossomos) de diferentes composições, mediante análises espectrofotométricas e de espectroscopia de fluorescência, possibilitando a determinação das propriedades fusogênicas do peptídeo.

3- Material e Métodos

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. O dodecilsulfato de sódio (SDS), o 2,2,2-trifluoetanol (TFE) e o n-octil- β -D-glicopiranosídeo (n-OGP) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A dodecilmfosfocolina (DPC) e os lipídios 1,2 – dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) e fosfatidilglicerol (PG) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EUA). A acrilamida foi obtida da Amersham Bioscience (Uppsala, Suécia). O brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) foi obtido da Merck Indústrias Químicas (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O tampão utilizado nos experimentos de fluorescência e dicroísmo circular foi fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 ou pH 5,5. A água utilizada em todos os experimentos foi filtrada e passada através do sistema Synthesis da Millipore (Molsheim, França) que produz água tipo I, Milli-Q.

3.2 Peptídeo

O peptídeo correspondente aos resíduos 421 a 445 da glicoproteína E2 do Vírus da Hepatite C, HCV₄₂₁₋₄₄₅, HINSTALNCNESLNTGWLGLFYQH, correspondente ao genótipo 1a, isolado Hutchinson 77 (H77), foi sintetizado pela Genscript USA Inc. (Piscataway, NJ, EUA). A identidade e a pureza (> 95%) foram determinadas por análise de aminoácidos, espectrometria de massa e cromatografia líquida de alta resolução. Para os experimentos, as soluções estoques de peptídeo foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração do peptídeo em solução aquosa foi determinada a partir do valor de absorbância a 280 nm, levando-se em consideração o coeficiente de extinção molar teórico ($\epsilon = 6900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), baseado na cadeia lateral do Trp e da Tyr presentes na sequência do peptídeo. O

coeficiente de extinção molar foi obtido com a ajuda do programa ProtParam (www.expasy.org). A concentração final de DMSO nos experimentos foi sempre inferior a 1%, com exceção dos experimentos de ressonância magnética nuclear, onde a concentração de DMSO foi de 10%. As amostras analisadas por dicroísmo circular foram preparadas na ausência de DMSO, utilizando solução estoque de peptídeo solubilizada diretamente no tampão de análise contendo TFE ou concentrações micelares de detergente.

3.3 Micelas de detergentes como modelo de membrana

Surfactantes são substâncias orgânicas anfifílicas, geralmente de baixa massa molecular, que têm a propriedade de diminuir significativamente a tensão superficial da água, ao formarem uma monocamada na superfície. Estas substâncias são formadas por uma porção lipofílica constituída de cadeias de hidrocarbonetos, e por uma porção hidrofílica constituída de grupamentos polares iônicos ou não iônicos, sendo os grupamentos iônicos muito mais hidrofílicos (Oremusová & Lengyel).

Ao atingirem uma determinada concentração, as moléculas de surfactantes começam a se auto-associar, organizando-se em unidades mais complexas e de tamanho coloidal, denominadas micelas, cuja formação é dirigida principalmente pelo efeito hidrofóbico, devido à interação dos grupos não polares com a água. Interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas também apresentam papel importante no processo de formação de micelas. A auto-associação entre moléculas anfifílicas é baseada nas interações solvofílicas e solvofóbicas, e é dependente não só da molécula anfifílica e da arquitetura

molecular do solvente, como também da temperatura e da presença de outras moléculas em solução, como sais (Jusufi *et al.*, 2009).

A concentração na qual o processo de associação inicia é denominada concentração micelar crítica (CMC), existindo uma faixa de concentração que separa o limite entre a não detecção de micelas e o ponto onde toda a adição de moléculas de surfactantes forma micelas.

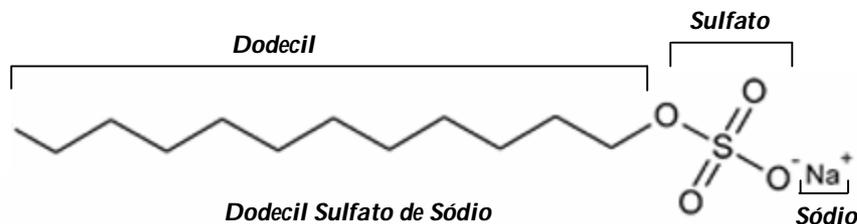
A concentração micelar crítica determina muitas propriedades de soluções surfactantes, sendo determinada experimentalmente através da análise do processo de desmicelinização, utilizando-se diversas metodologias para isto (Oremusová & Lengyel).

As micelas constituem um sistema mimético de membrana e são muito utilizadas em metodologias biofísicas. Diversos peptídeos e proteínas são capazes de interagir fortemente com moléculas anfifílicas e estas interações são de vasta importância. A utilização de surfactantes permite avaliar a influência de monômeros e micelas, carregados ou não, na estrutura adotada por peptídeos. As interações peptídeo-molécula anfifílica podem ainda estabilizar conformações em α -hélice (Langham *et al.*, 2007).

As micelas podem ser constituídas de surfactantes aniônicos, catiônicos, não iônicos ou zwitteriônicos. O dodecilsulfato de sódio (**Esquema 1**) possui um grupamento aniônico em uma das extremidades de sua estrutura e uma cadeia apolar na outra. Quando em solução, o SDS se dissocia no ânion $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3$ e no cátion, contra-íon, Na^+ . Os ânions são adsorvidos na água, formando uma monocamada, onde a porção lipofílica - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}$ é orientada para fora da superfície da água e a porção hidrofílica - OSO_3 é direcionada para o ambiente aquoso. Quando a concentração de SDS atinge o valor da CMC, os ânions

começam a agregar em micelas globulares carregadas negativamente (Oremusová & Lengyel).

A CMC do SDS em água é 8 mM. Entretanto, a adição de sal leva a uma diminuição significativa da CMC, que passa a 3,5 mM em NaCl 10 mM e a 1,4 mM em NaCl 100 mM (piercenet.com). Além disso, a adição de sal leva à perda da conformação esférica de suas micelas, que ganham contornos elipsoidais a cilíndricos, quando formadas por pelo menos 150 moléculas de surfactante. O aumento da concentração do surfactante também pode alterar a conformação esférica das micelas. Sais orgânicos ou inorgânicos facilitam a transição de micelas esféricas a micelas alongadas semelhantes a bastões, devido à diminuição da repulsão entre as cabeças carregadas. As micelas alongadas também podem ser geradas pela fusão de micelas (Jusufi *et al.*, 2009).

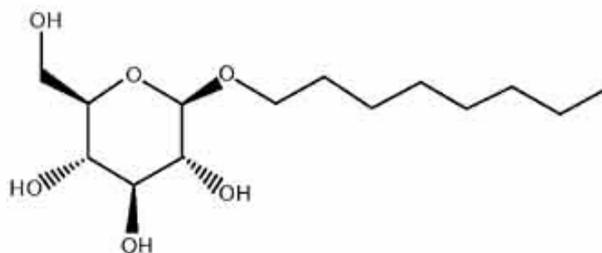


Esquema 1: Estrutura química do detergente aniônico dodecilsulfato de sódio.

Adaptado de www.moleculeoftheday.com em 20/11/2007.

O n-octil- β -D-glicopiranosídeo (**Esquema 2**) é um detergente não desnaturante e não iônico, muito utilizado como surfactante em Biotecnologia. Esse glicolípido de estrutura molecular simples, composta por uma cabeça polar de carboidrato ligada a uma cadeia hidrofóbica alquila, é muito utilizado para solubilizar proteínas de membrana, devido a seu pequeno efeito nas propriedades das proteínas de membrana. Os glicolípidos apresentam interações eletrostáticas com menor repulsão e as micelas formadas possuem baixa massa molecular e são

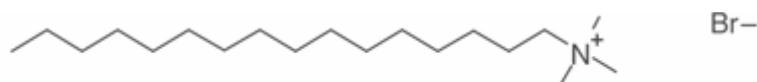
facilmente removidas por diálise devido à alta CMC, que varia de 20 a 25 mM (piercenet.com).



Esquema 2: Estrutura química do detergente *n*-octil- β -D-glicopiranosídeo.

Extraído de www.bio-world.com em 20/11/2007.

O CTAB ((C₁₆H₃₃)N(CH₃)₃Br) (**Esquema 3**) é um surfactante catiônico muito utilizado, capaz de formar micelas esféricas. Entretanto, contra-íons inorgânicos se ligam moderadamente às micelas catiônicas e levam a um aumento das micelas, elevando a razão molar sal/surfactante para valores maiores que 1. Já os contra-íons orgânicos se ligam fortemente à superfície micelar e induzem a formação de micelas alongadas (raio de 2 a 3 nm), com baixas proporções sal/surfactante (Hassan *et al.*, 2002).

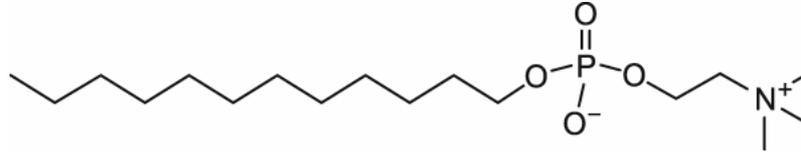


Esquema 3: Estrutura química do detergente catiônico CTAB.

Extraído de Arnold & Linke, 2008.

O DPC (**Esquema 4**), um fosfodiéster sintético, é o surfactante zwitteriônico mais utilizado como modelo de membrana para estudos de RMN e de ligação peptídeo-lipídio, devido à sua semelhança com a fosfatidilcolina (PC). O DPC apresenta um fosfato iônico, além de ligações éster entre a colina ((CH₃)₃N(CH₂)₂OH), que contém uma amina quaternária com carga positiva e o

álcool dodecil (ou lauril) ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$), não polar (Ophardt, 2003). A CMC teórica do DPC em água é 1,1 mM (www.avantilipids.com).



Esquema 4: Estrutura química do detergente zwitteriônico DPC.

Extraído de www.avantilipids.com em 27/12/2009.

A ligação do HCV₄₂₁₋₄₄₅ a micelas aniônicas de SDS, não iônicas de n-OGP, catiônicas de CTAB e zwitteriônicas de DPC foi analisada através de espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, calorimetria de titulação isotérmica e ressonância magnética nuclear. A CMC do SDS, CTAB e n-OGP pode ser determinada, através de calorimetria isotérmica de titulação, em tampão Fosfato de sódio 20 mM.

3.4 Preparação de Vesículas Unilamelares Grandes

As vesículas lipídicas são estruturas quase esféricas, constituídas de bicamadas de lipídios que encapsulam o ambiente aquoso. As vesículas estão presentes de modo ubíquo nas células, e geralmente estão envolvidas no transporte de materiais dentro da célula (Patty & Frisken, 2003).

As vesículas lipídicas são muito importantes em diferentes áreas da Ciência e da Tecnologia. Na pesquisa básica, elas servem como modelos para estudos de membranas celulares e processo fusogênico, bem como para estudos de transporte de macromoléculas e estudos de proteínas de membrana (que podem ser reconstruídas em vesículas). As vesículas também são muito utilizadas como veículos de entrega de drogas, de material genético, de enzimas e de outras macromoléculas a células vivas. Sendo assim, as vesículas são utilizadas para a

transposição de barreiras hidrofóbicas na Farmacologia, Medicina, Engenharia Genética, indústria cosmética e de alimentos (Lasic, 1988).

As vesículas podem ser constituídas de uma única bicamada lipídica capaz de separar o solvente interno do solvente externo. Estas estruturas são chamadas, de acordo com seu tamanho, de vesículas unilamelares pequenas (SUVs), vesículas unilamelares grandes (LUVs) ou vesículas unilamelares gigantes (GUVs). O termo vesículas multilamelares (MLVs) é usado nos casos em que diversas bicamadas concêntricas encapsulam o solvente (Lasic, 1988).

As MLVs são formadas espontaneamente quando filmes secos de fosfolipídios são colocados em contato com água ou tampão (Lasic, 1988). Sendo assim, pequenas quantidades de PC, PG ou PC:PG (1:1), liofilizados, foram pesadas e colocadas em um tubo de vidro de fundo arredondado na presença de clorofórmio. O filme lipídico foi então obtido a partir da secagem, com o auxílio de um fluxo de nitrogênio, do clorofórmio. Os fosfolipídios foram então ressuspensos em tampão fosfato de sódio 20 mM, no pH 7,4 ou no pH 5,5, gerando as MLVs.

As LUVs e as SUVs, por sua vez, possuem maior energia livre e parte desta energia deve ser dissipada para o sistema para que elas possam ser formadas. Um dos métodos mais populares de produção de vesículas é a extrusão, onde soluções contendo MLVs são forçadas através de pequenos poros, em geral longos e estreitos, de diâmetro variável, presentes em membranas de filtro de policarbonato, usando gás pressurizado ou um sistema baseado no acoplamento de seringas. Conforme as MLVs são passadas através dos poros, elas se rompem em vesículas menores formando as LUVs (Patty & Frisken, 2003).

A extrusão produz uma solução relativamente monodispersa de vesículas de tamanho médio controlado, baseado no tamanho do poro presente na membrana de

filtro, onde múltiplas passagens pelo sistema baseado no acoplamento de seringas mostram-se necessárias para que o tamanho e a multilamelaridade das vesículas sejam reduzidos (Patty & Frisken, 2003).

Sendo assim, as MLVs foram passadas através de um extrusor, com membranas de filtro de policarbonato de 100 nm de diâmetro de poro, por 15 vezes, gerando as LUVs utilizadas nos ensaios de agregação de vesículas e supressão de fluorescência por acrilamida.

3.5 Medidas Espectroscópicas

3.5.1 Espectroscopia de Fluorescência

A Espectroscopia é um termo geral para a Ciência que estuda a interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria. A Espectroscopia de fluorescência permite o estudo da dinâmica de proteínas, de sua interação com membranas e micelas, possibilitando a análise de mudanças conformacionais, uma vez que a fluorescência e a dinâmica ocorrem em escala de tempo muito próxima (Lakowicz, 2006).

A radiação eletromagnética é produzida quando uma partícula excitada relaxa para níveis de energia mais baixos, fornecendo seu excesso de energia como fótons. Quando uma substância emite luz a partir de seu estado eletronicamente excitado denominamos tal fenômeno de luminescência.

A luminescência pode ser dividida nos fenômenos de fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. A fosforescência é a emissão de luz a partir de estados tripletos, onde o elétron no orbital excitado tem a mesma orientação de spin do elétron no estado fundamental. Já a fluorescência é a

emissão de luz devido a uma transição eletrônica permitida entre os estados excitado e fundamental que possuem a mesma multiplicidade de spin, geralmente em estados singletos, onde o elétron no orbital de maior energia possui spin com orientação oposta ao segundo elétron no orbital fundamental, sendo estes dois elétrons ditos emparelhados. Sendo assim, o retorno ao estado fundamental ocorre rapidamente pela emissão de um fóton (Lakowicz, 2006).

A dependência temporal da intensidade de fluorescência após a excitação é chamada de tempo de vida, sendo, portanto, o tempo médio da molécula no estado excitado antes da emissão do fóton (Ladokhin, 2000). A fluorescência é um fenômeno dinâmico e o tempo de vida do estado excitado, próximo de 10 ns, é suficiente para que diversas reações químicas e físicas ocorram antes da emissão. Cabe ressaltar que o tempo de vida fosforescente é maior e varia de milisegundos a segundos (Lakowicz, 2006).

Os fluoróforos podem ser extrínsecos, geralmente covalentemente ligados a lisinas e cisteínas, ou intrínsecos, como triptofano, tirosina, fenilalanina e NADH (Ladokhin, 2000). Alguns destes fluoróforos são sensíveis a mudanças do ambiente, que podem ser avaliadas através de espectroscopia de fluorescência.

A intensidade, medida em função do comprimento de onda, é o espectro de fluorescência. A posição do espectro reflete mudanças na energia dos estados excitado e basal, entre a excitação e a emissão de um fóton. O total de intensidade de emissão em todos os comprimentos de onda é chamado de rendimento quântico, sendo mais bem definido pela razão do número de quanta emitido em relação ao absorvido (Ladokhin, 2000).

Os aminoácidos aromáticos, tirosina (Tyr ou Y), triptofano (Trp ou W) e fenilalanina (Phe ou F), são capazes de contribuir para a fluorescência intrínseca de

proteínas. Embora a Tyr e a Phe sejam fluoróforos naturais em proteínas, o Trp é o mais utilizado, sendo a aplicação da fluorescência da Tyr e da Phe limitada a proteínas que não contêm resíduos de Trp. Cabe ressaltar que a fluorescência da Tyr não é sensível, por exemplo, à polaridade do solvente. Já a fluorescência da Phe é fraca e raramente utilizada em estudos de proteínas.

A bem documentada sensibilidade a fatores do meio apresentada pelos resíduos de Trp, tais como polaridade, faz da fluorescência de triptofano uma ferramenta valiosa em estudos de estrutura de proteínas e dinâmica. O Trp apresenta ainda absorção em comprimentos de onda maiores, além de apresentar maior rendimento quântico (Chattopadhyay & Raghuraman, 2004).

As propriedades fluorescentes dos resíduos de triptofano, bastante variáveis e dependentes do enovelamento protéico, fornecem uma sonda intrínseca sensível e informativa para diversos tipos de estudo de proteínas. Em solução aquosa o triptofano apresenta uma fluorescência alargada, com máximo próximo de 350 nm e largura de 60 nm, além de um rendimento quântico de 0,13, onde a absorção do triptofano se deve à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel indólico (Ladokhin, 2000).

Uma vez que o triptofano é um aminoácido bastante sensível a qualquer mudança de polaridade do meio, quando em ambientes apolares, esses resíduos emitem fluorescência em comprimentos de onda menores (em torno de 320 nm) e, portanto, mais energéticos. Em contrapartida, à medida que a proteína expõe seus triptofanos ao meio aquoso, estes passam a emitir fluorescência em comprimentos de onda maiores e menos energéticos, uma vez que parte dessa energia é gasta para reorientar as moléculas do solvente. Sendo assim, a mudança na emissão de fluorescência dos triptofanos, quando excitados em um determinado comprimento de

onda, reflete nada mais que as mudanças de polaridade do meio em que eles se encontram (Lakowicz, 2006).

Os espectros de fluorescência foram realizados em um espectrofluorímetro modelo ISS K2 (ISS Inc., Champaign, IL, EUA). A concentração de HCV₄₂₁₋₄₄₅ utilizada foi 10 µM em tampão fosfato de sódio 20 mM no pH 7,4 ou no pH 5,5. Todos os experimentos foram realizados a 25°C, e as análises espectroscópicas foram baseadas na fluorescência do triptofano, sendo as amostras excitadas a 280 nm e a emissão de fluorescência analisada de 300 a 420 nm, com intervalo de 1 nm. A fenda utilizada na excitação foi de 2 nm e na emissão de 1 nm. As soluções estoque das micelas foram preparadas no mesmo tampão.

O centro de massa espectral $\langle \nu \rangle$, é obtido pela emissão de fluorescência do triptofano, sendo diretamente proporcional à energia de emissão quando expresso em números de onda (cm^{-1}), e pode ser calculado conforme a equação abaixo:

$$\langle \nu \rangle = \frac{\sum \nu_i \cdot F_i}{\sum F_i} \quad (1)$$

onde F_i é a fluorescência emitida em um determinado número de onda ν_i , sendo o somatório realizado a partir de uma grande quantidade de valores F .

3.5.2 Supressão de Fluorescência por Acrilamida

A supressão de fluorescência do triptofano em proteínas é um processo altamente estudado por métodos teóricos e experimentais, sendo muito útil na detecção de mudanças conformacionais de proteínas em diferentes condições, bem como no estudo da interação proteína-ligante (Lakowicz, 2006).

A interação ligante-proteína pode ser percebida caso o ligante aja como supressor de fluorescência ou caso ele interaja fisicamente com o fluoróforo mudando a polaridade ou acessibilidade ao solvente. O ligante pode ainda ligar em

um sítio distante do fluoróforo, mas gerar uma mudança conformacional na proteína capaz de alterar o ambiente deste (Ladokhin, 2000).

A supressão de fluorescência é um processo de diminuição da intensidade de fluorescência de um fluoróforo devido à interação do fluoróforo com uma outra molécula ou grupo, denominado supressor. Após a absorção de um fóton e antes da emissão de radiação, a molécula fluorescente permanece no estado excitado por um curto período de tempo, geralmente nanossegundos, conhecido como tempo de vida do estado excitado. Se ocorrer uma interação do fluoróforo no estado excitado com um supressor, o fluoróforo excitado pode voltar ao estado basal antes da emissão de luz (Chattopadhyay & Raghuraman, 2004).

A magnitude da supressão depende da competição entre o processo de fluorescência, o processo de supressão e outros processos que levam à volta ao estado basal sem que a emissão de luz ocorra. A magnitude da supressão também depende da concentração do supressor, o que está intimamente relacionado com o número de moléculas supressoras que estão em proximidade com o fluoróforo (Chattopadhyay & Raghuraman, 2004).

A interação entre o fluoróforo e a molécula supressora é um requerimento básico para que a supressão ocorra. Isto pode ocorrer de duas maneiras: através da formação de um complexo estático entre o fluoróforo e o supressor, ou através de uma colisão dinâmica com o supressor (Lakowicz, 2006).

A supressão de fluorescência estática ocorre quando a distância entre o fluoróforo e o supressor não modifica durante o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo, ocorrendo no estado basal por formação de complexos não fluorescentes ou por outros mecanismos triviais e não-moleculares que atenuam a incidência de luz (Lakowicz, 2006).

A supressão de fluorescência dinâmica ocorre em soluções não-viscosas, quando a distância entre o fluoróforo e o supressor modifica rapidamente durante o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo, dando informações sobre a acessibilidade ao solvente e sobre a distribuição de cargas ao redor do fluoróforo caso seja usado um supressor conjugado (Ladokhin, 2000). Nestes casos, a supressão ocorre quando supressor e fluoróforo estão muito próximos (Chattopadhyay & Raghuraman, 2004).

Um caso especial de supressão dinâmica ocorre quando o intervalo em que as interações com o supressor ocorrem é suficientemente pequeno, de modo que apenas as colisões entre fluoróforo e o supressor resultam na supressão de fluorescência. Neste caso, a supressão é dita colisional. As moléculas não sofrem mudanças químicas durante a supressão colisional e a taxa com que este tipo de supressão ocorre é limitada pela difusão. Uma vez que a extensão do processo de supressão colisional depende da proximidade (acessibilidade) do fluoróforo ao supressor, este tipo de supressão tem sido utilizado para explorar a topologia dos resíduos de triptofano em proteínas solúveis e em peptídeos (Chattopadhyay & Raghuraman, 2004).

Na supressão colisional, o decréscimo na intensidade de fluorescência é descrito pela equação de Stern-Volmer:

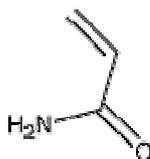
$$F_0/F = 1 + K [Q] = k_q \tau_0 [Q] \quad (2)$$

onde F_0 representa a intensidade de fluorescência na ausência do supressor, F representa a intensidade de fluorescência do ponto que está sendo medido, K representa a constante de supressão de Stern-Volmer, k_q representa a constante de supressão biomolecular, τ_0 representa o tempo de vida da supressão e Q a concentração do supressor. Este tipo de supressão segue uma equação de quase-

primeira ordem, onde há uma dependência linear do supressor (F_0/F) em baixas concentrações da molécula supressora ($[Q]$). A constante de proporcionalidade de Stern-Volmer (K_{sv}) é uma importante variável na interpretação do fenômeno de supressão colisional, onde a acessibilidade do fluoróforo ao supressor e a acessibilidade eletrostática do supressor são responsáveis por determinar tal constante (Eftink & Giron, 1981; Calhoun *et al.*, 1986; Lakowicz, 2006).

Em particular, o triptofano parece ser excepcionalmente sensível à supressão de fluorescência colisional, aparentemente devido a uma tendência dos anéis indol em doar elétrons enquanto no estado excitado. A fluorescência do triptofano pode ser suprimida pela água, por vários grupamentos químicos presentes nas proteínas, por oxigênio, iodetos, brometos, aminas e moléculas deficientes em elétrons, como a acrilamida (Ladokhin, 2000; Lakowicz, 2006).

A acrilamida (**Esquema 5**) foi utilizada como supressor extrínseco solúvel em água. Sendo assim, a intensidade da emissão de fluorescência do Trp diminuirá na presença do supressor, quando ele estiver exposto ao solvente. Concentrações crescentes de acrilamida, 0 a 200 mM, foram acrescentadas às amostras contendo 10 μ M de peptídeo, na presença ou ausência de micelas de SDS, n-OGP, CTAB e DPC. Quando o Trp estiver em contato com as micelas de diferentes detergentes, ele estará protegido do supressor, e, portanto, sua intensidade de fluorescência será menos afetada pelo supressor dissolvido (Lakowicz, 2006).



Esquema 5: Estrutura química do supressor de fluorescência solúvel acrilamida.

Extraído www.3dchem.com/molecules.asp?ID=233.

O peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ foi pré-incubado na presença de micelas por 5 min, em tampão fosfato de sódio 20 mM, no pH 7,4 e no pH 5,5. A fluorescência do triptofano foi medida a 333 nm, quando na presença de micelas ou vesículas, e a 348 nm, quando em solução, sendo o triptofano excitado a 280 nm. As constantes de supressão de fluorescência (Ksv) foram obtidas a partir da regressão linear usando a equação de Stern-Volmer para processos de supressão dinâmicos, onde grandes valores de Ksv são encontrados em fluoróforos livres em solução ou na superfície de uma biomolécula (Lakowicz, 2006). O teste t (Student' t test) foi utilizado a fim de testar a igualdade entre os valores de Ksv obtidos, onde o nível de significância utilizado foi de 5%.

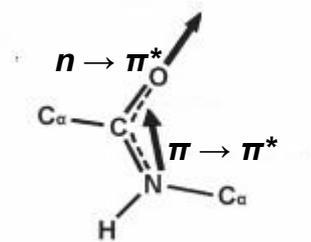
3.5.3 Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular pode ser utilizado para estimar a conformação de proteínas e ácidos nucleicos; determinar mudanças conformacionais geradas pela interação proteína-proteína, proteína-ADN, proteína-lipídio, proteína-ligante e ADN-ligante; determinar a termodinâmica e a cinética de enovelamento ou desenovelamento de proteínas e ácidos nucleicos; e determinar constantes de ligação (Greenfield, 2004). A técnica de dicroísmo circular utiliza uma fonte de luz circularmente polarizada, onde o vetor oscila rotacionalmente para a esquerda e para a direita, formando uma hélice ao redor do eixo de propagação. Moléculas assimétricas e opticamente ativas absorvem a luz polarizada para a direita e para a esquerda em diferentes proporções, resultando na rotação do plano de polarização da luz de maneira dependente do comprimento de onda (Greenfield, 2004). Sendo assim, incide-se uma luz circularmente polarizada em duas direções e mede-se a diferença de absorção, definida como:

$$\Delta\varepsilon(\lambda) = \Delta\varepsilon_E(\lambda) - \Delta\varepsilon_D(\lambda) \quad (3)$$

onde ε_E e ε_D representam os coeficientes de extinção molar para os componentes polarizados circularmente para a esquerda e para a direita, respectivamente, a um determinado comprimento de onda λ ($\Delta\varepsilon = M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, onde M é a concentração molar).

O principal cromóforo utilizado na determinação de estrutura secundária em proteínas é a ligação amida. De maneira bem simplificada, a ligação amida (**Esquema 6**) apresenta os orbitais dos átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio organizados de modo a formar três combinações lineares ortogonais: as ligações π^+ , π^0 e π^- (Greenfield, 2004), e as transições eletrônicas entre estes orbitais gera sinais em regiões específicas do espectro de CD. As transições $n \rightarrow \pi^*$, que envolvem a mudança de um elétron do orbital n para o orbital π^* , são muito fracas, estando próximas de 320 nm no espectro de CD. Já as transições $\pi \rightarrow \pi^*$, que envolvem a mudança de um elétron do orbital π^0 para o orbital π^- , são fortes, sendo representadas na faixa de 170-190 (Greenfield, 2004).



Esquema 6: Ligação peptídica e orientação das transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$.
Extraído de Whitmore & Wallace (2008).

O espectro de CD de proteínas geralmente pode ser dividido em três faixas de comprimento de onda específicos: 1) UV distante (comprimentos de onda menores que 250 nm), onde a contribuição da ligação amida predomina; 2) UV próximo (250 a 300 nm), onde a contribuição das cadeias laterais aromáticas

predomina; e 3) na faixa que varia do UV próximo à região visível (300 a 700 nm), onde a contribuição dos cromóforos extrínsecos predomina (Sreerama & Woody, 2004).

Peptídeos cuja estrutura é desordenada apresentam espectro de CD (**Figura 8**) similares ao da ligação amida, mas com uma magnitude maior. O espectro exibe uma pequena transição positiva $n \rightarrow \pi^*$ em aproximadamente 230 nm e uma única transição $\pi \rightarrow \pi^*$ em aproximadamente 195 nm. Já o espectro de um peptídeo cuja estrutura é em α -hélice (**Figura 8**) apresenta uma grande transição negativa $n \rightarrow \pi^*$ em 222 nm, devido ao ambiente rico em ligações de hidrogênio e relativamente independente do tamanho da hélice (Pelton & McLean, 2000), e uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ que se divide em duas: uma banda negativa em 208 nm e uma positiva em 192 nm, que se mostram reduzidas em intensidade quando em hélices curtas.

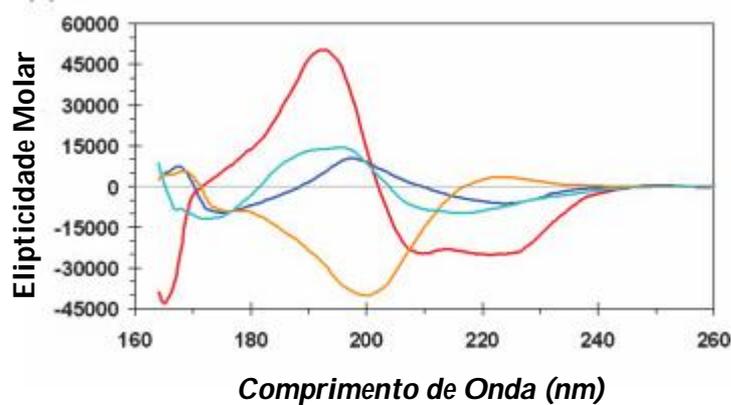


Figura 8: Espectros típicos de CD de proteínas. Em vermelho, espectro da Mioglobina, uma proteína majoritariamente em hélice. É possível observar os dois picos negativos (208 e 222 nm) típicos da estrutura em α -hélice. Em azul, espectro da proteína Concanavalina A, e, em ciano, espectro da proteína beta-Lactoglobulina, proteínas ricas em folha- β . Embora estas duas proteínas apresentem conteúdo muito semelhante de estrutura secundária em β , (46 e 45% respectivamente), as características espectrais são bastante distintas, devido ao diferente enovelamento que adotam. Em laranja, espectro do Colágeno, uma proteína rica em resíduos de prolina (Adaptado de Whitmore & Wallace, 2008).

O espectro de CD de folhas- β antiparalelas (**Figura 8**), por sua vez, apresenta uma banda negativa em 218 nm e uma positiva em 195 nm devido à transição $\pi \rightarrow$

π^* (Greenfield, 2004). Além disso, uma banda negativa pode ser observada próxima a 175 nm. Uma vez que a posição e magnitude destas bandas são variáveis, as predições de estruturas em β são menos exatas (Pelton & McLean, 2000).

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715/1505, utilizando-se cubetas de quartzo, com caminho óptico de 0,02 cm. Os espectros foram realizados à temperatura ambiente com 0,1 nm de resolução e a 50 nm/min de velocidade. O tempo de resposta utilizado foi de 8 s com 100 mgra de sensibilidade. A passagem do feixe de luz foi de 2 nm. Cada espectro representa uma média de 10 varreduras. A concentração do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ utilizada foi de 200 μ M, em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4. A contribuição do sinal do tampão na ausência e na presença de cada reagente foi subtraída dos espectros de CD adquiridos para cada amostra. Cabe ressaltar que não foi adicionado DMSO às amostras analisadas. Para diluir as amostras estoques preparadas em SDS 100 mM e TFE 100%, foi utilizado tampão fosfato de sódio 20 mM. A partir de análises de regressão linear, decomposições em valores singulares e análises de restrição convexas aplicadas aos espectros de CD, é possível quantificar o grau de estruturação em α -hélice, folha β e voltas (Greenfield, 2004). Sendo assim, a desconvolução dos espectros de CD foi realizada através do site dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtm>), utilizando três programas de análise diferentes: SELCON, CONTIN e CDSSTR, e ao menos dois conjuntos de referência diferentes.

O método CONTIN, desenvolvido por Provencher e Glöckner (1981), é capaz de ajustar o espectro de CD de proteínas desconhecidas através de combinação linear com diversos espectros de proteínas de estrutura conhecida presentes no

banco de dados do programa. Este método é relativamente bom para estimar o conteúdo de estrutura de volta- β (Greenfield, 2004).

O método SELCON, desenvolvido por Sreerama e Woody (1994), é uma modificação do programa de seleção de variáveis, mais rápido, e muito bom para estimar o conteúdo de folhas e voltas β em proteínas (Greenfield, 2004).

O método CDSSTR foi desenvolvido por Johnson (1999) e combina diversos métodos. Um novo recurso implementado neste método é a utilização de apenas um número mínimo de proteínas referência (selecionadas aleatoriamente) para que uma boa análise seja obtida (Sreerama & Woody, 2000).

3.5.4 Análises de Agregação Vesicular

Quando a radiação atravessa uma camada de um sólido, líquido ou gás, algumas frequências são seletivamente removidas pela absorção, um processo no qual a energia eletromagnética é transferida para átomos, íons ou moléculas que compõem a amostra. Na região espectral do UV-visível, a radiação promove a transição de elétrons do estado fundamental para o estado excitado. A absorção ocorre quando a energia da mesma é igual à diferença de energia entre dois estados eletrônicos. As medidas de absorção baseadas em radiação ultravioleta e visível encontram vasta aplicação para identificação e determinação de espécies orgânicas e inorgânicas (Skoog *et al.*, 2002).

A espectroscopia de absorção óptica compara a intensidade de um feixe de luz transmitido através de uma amostra, com a intensidade incidente, e as medidas são normalmente feitas em um comprimento de onda correspondente a um pico de absorção, uma vez que a variação na absorbância por unidade de concentração é a

maior possível neste ponto; sendo obtida assim, a máxima sensibilidade (Skoog *et al.*, 2002).

A agregação e a justaposição de membranas lipídicas é um passo essencial no processo de fusão de membranas nos sistemas vivos. De maneira similar, a agregação também é importante nos sistemas modelo de membrana, tais como as vesículas lipídicas, sendo um precursor dos eventos de fusão. Após a agregação, as vesículas podem permanecer como entidades individuais ou podem misturar seus lipídios. Caso haja a mistura de lipídios, dois eventos podem acontecer: a hemifusão e a fusão completa (Cummings & Vanderlick, 2007).

A agregação não é um processo espontâneo, e geralmente requer um agente indutor de agregação. Os peptídeos de fusão são capazes de facilitar o processo de agregação vesicular (Cummings & Vanderlick, 2007).

A agregação de vesículas unilamelares grandes (LUV) pode ser monitorada por medidas de turbidez. As medidas de turbidez apresentam grande confiabilidade e aplicabilidade para medir o tamanho de partículas em crescimento, onde aumentos na turbidez são consequência do aumento de tamanho das vesículas lipídicas (Rodríguez-Crespo *et al.*, 1995). Sendo assim, lipossomos de diferentes composições, com diâmetro de 0,1 μm , foram preparados em tampão fosfato de sódio 20 mM, no pH 7,4 ou no pH 5,5. As mudanças na agregação das vesículas foram monitoradas por medidas de absorbância, a 360 nm, utilizando um espectrofotômetro Ultrospec 100. Alíquotas de uma solução estoque de HCV₄₂₁₋₄₄₅, preparada em 100% DMSO foram adicionadas a 500 μL de suspensão de vesícula cuja concentração final de lipídio era de 130 μM , nas proporções de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 peptídeo/lipídio, sendo a concentração final de HCV₄₂₁₋₄₄₅ 52 μM . As amostras foram incubadas por 30 minutos, na presença de LUVs compostas de PC, PG ou

PC:PG (1:1), em cada uma das proporções peptídeo/lipídio, a 37 °C. A fim de avaliar a absorvância das vesículas lipídicas e do peptídeo sozinho, amostras controle foram analisadas, contendo vesículas acrescidas apenas de quantidades equivalentes de DMSO na ausência de peptídeo, ou contendo apenas o peptídeo. A contribuição do espalhamento de luz das soluções foi devidamente subtraída.

3.6 Calorimetria de Titulação Isotérmica

A calorimetria de titulação isotérmica é a única técnica capaz de medir a mudança entálpica provocada pela ligação entre duas moléculas, ao ser capaz de medir o calor associado à mistura e reação de duas soluções de diferentes composições. Esta técnica pode ser utilizada para acompanhar tanto processos físicos como químicos que envolvam a liberação ou o ganho de calor, através da utilização de um calorímetro, sendo possível ainda derivar toda a termodinâmica envolvida no processo em questão (Heerklotz & Seelig, 2000; Holdgate & Ward, 2005).

A técnica de ITC é utilizada para investigar e entender as forças que estabilizam a conformação enovelada de proteínas, para avaliar as interações entre macromoléculas biológicas, incluindo interações proteína-proteína, proteína-ácido nucléico e proteína-lipídio (Pierce *et al.*, 1999).

O calorímetro é um instrumento altamente sensível e rápido, constituído de duas celas “quase” idênticas (**Figura 9**) compostas de material condutor térmico altamente eficiente: uma cela de referência, geralmente preenchida com água ou tampão, e uma cela que contém a amostra em análise, onde será injetada a molécula a ser titulada, através de uma seringa acoplada a um motor. A molécula reagente é injetada em pequenas alíquotas de 5 a 10 µL e a ponta desta seringa

serve ainda como um agitador, uma vez que a seringa fica em rotação constante, previamente determinada, durante todo o experimento (Heerklotz & Seelig, 2000). Ambas as celas são isoladas do ambiente por uma jaqueta quase adiabática, resfriada por um sistema peltier, e aquecida por um sistema capaz de manter a temperatura do sistema exatamente igual à da cela de referência (http://keck.med.yale.edu/biophysics/VP_ITC_MANUAL_11_20_02a.pdf).

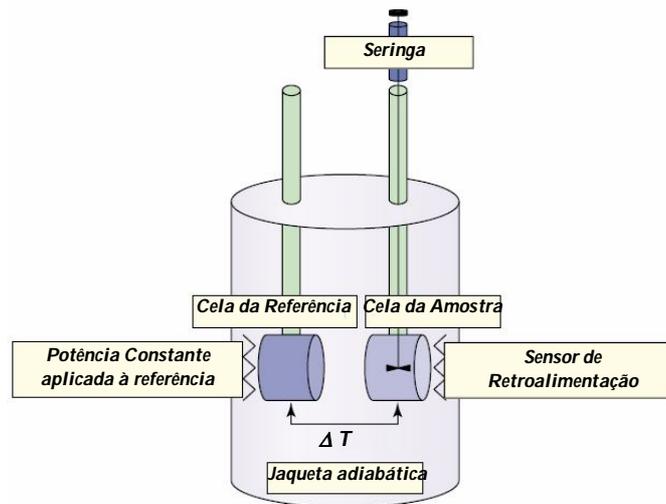


Figura 9: Representação esquemática do instrumento de ITC. Duas celas, uma de referência e outra de amostra, são isoladas do ambiente externo por uma jaqueta quase adiabática. Uma pequena potência constante é aplicada por um aquecedor à cela de referência, ativando um circuito de retroalimentação capaz de aplicar potência variável à cela de amostra. Este sistema mantém as celas em temperaturas idênticas. Dependendo da natureza da reação, há liberação ou ganho de calor na cela de amostra, promovendo a ativação ou desativação do sensor de retroalimentação da cela de amostra, a fim de continuar mantendo as celas em condições isotérmicas (Adaptado de Holdgate & Ward, 2005).

Circuitos termosensíveis são responsáveis pela detecção das diferenças de temperatura entre as celas de referência e de amostra e entre as celas e a jaqueta externa. Aquecedores localizados em ambas as celas são ativados, quando necessário, para manter a temperatura idêntica entre todos os componentes (Pierce *et al.*, 1999). Portanto, o calorímetro é um aparelho adiabático que trabalha com compensação de trabalho, onde a diferença de temperatura gerada pelo ganho ou perda de calor pode ser medida como fluxo de calor (Q/t) em função do tempo (t), e,

a integral deste fluxo representa o calor (Q) envolvido na reação (Heerklotz & Seelig, 2000).

A técnica de ITC permite a análise de parâmetros como entalpia (ΔH), entropia, energia livre de Gibbs, afinidade de ligação e estequiometria de reação (Freire, 2004; Holdgate & Ward, 2005). Outro parâmetro que pode ser obtido é a capacidade calorífica (ΔC_p). O ΔC_p pode ser determinado avaliando as mudanças no fluxo de calor e consequente ΔH , em diferentes temperaturas. Valores negativos de ΔC_p indicam que o complexo precisa de menos energia para que a temperatura possa se elevar e geralmente indicam o predomínio de interações hidrofóbicas (Holdgate & Ward, 2005). Sendo assim, os parâmetros acerca da interação peptídeo-micela foram adquiridos utilizando um calorímetro de titulação VP-ITC (MicroCal, LLC., Northampton, MA, EUA), ao titular o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ em uma solução contendo concentrações micelares de diferentes detergentes. As titulações foram realizadas adicionando-se 5 μL de peptídeo/injeção, a partir de uma solução estoque de 100 μM , à cela calorimétrica (de volume final igual a 1.422 μL) contendo SDS a 20 mM ou n-octil- β -D-glicopiranosídeo a 40 mM, ambos diluídos em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 ou 5,5. Cada injeção foi realizada em um período de 5 s, com um espaço de 360 s entre cada injeção.

A técnica de calorimetria de titulação isotérmica também é muito utilizada na quantificação e análise do comportamento de micelização de surfactantes. ITC mede a mudança diferencial de entalpia gerada quando uma solução de surfactante em concentrações acima da CMC é continuamente titulada em um solvente puro (Dai & Tam, 2003). Sendo assim, para a determinação da CMC dos diferentes detergentes empregados, foi utilizado o calorímetro de titulação VP-ITC (MicroCal, LLC., Northampton, MA, EUA), e a seringa foi preenchida por uma solução de detergente

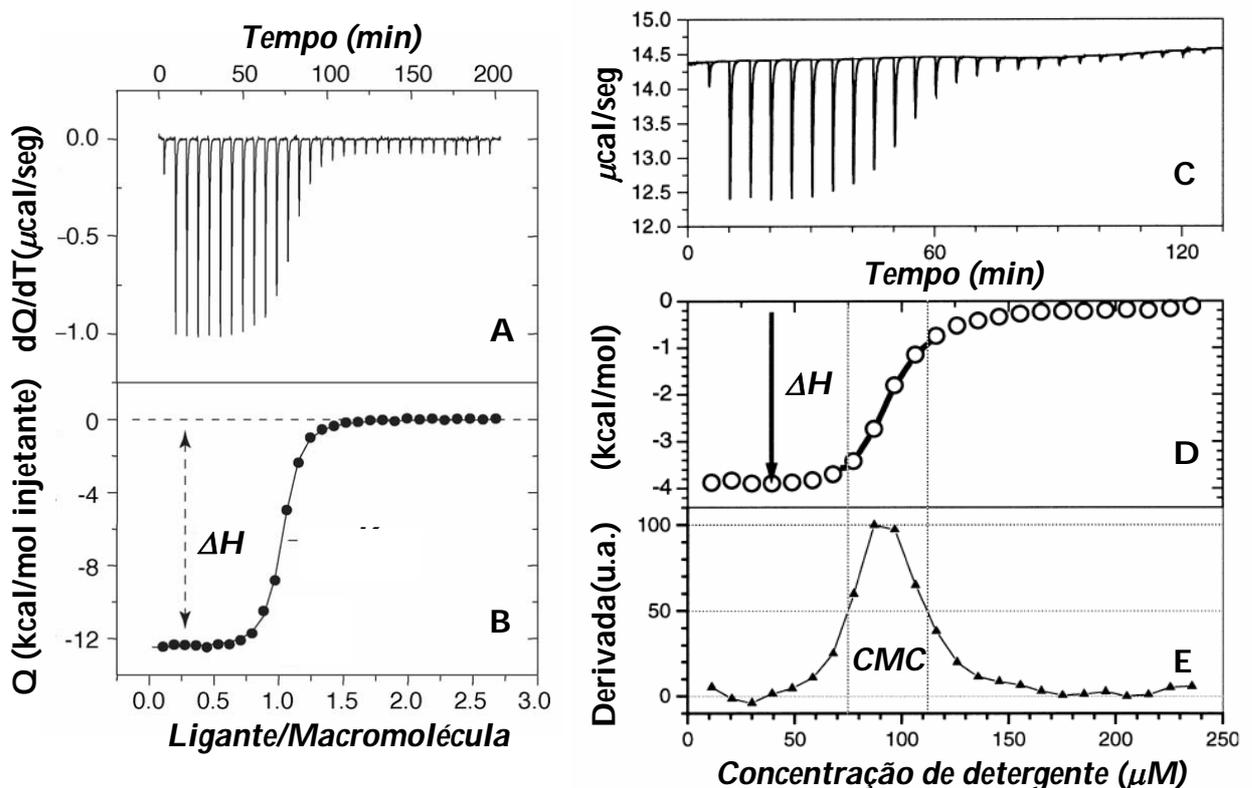
de concentração bastante superior à CMC em água (SDS 100 mM, CTAB 10 mM e n-OGP 300 mM), sendo a cela da amostra, de volume igual a 1.422 μL , preenchida com tampão fosfato de sódio 20 mM, no pH 7,4 ou no pH 5,5. As CMCs foram determinadas a 25 $^{\circ}\text{C}$, mesma temperatura em que os experimentos de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular foram realizados. Foram realizadas 32 injeções de 1,5 μL para a determinação da CMC do SDS, 60 injeções de 3 μL para a determinação da CMC do n-OGP e 110 injeções de 2 μL para a determinação da CMC do CTAB.

O programa Origin 7.0 (MicroCal, LLC., Northampton, MA, EUA) foi utilizado para a determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação peptídeo-micela e da CMC dos surfactantes. Uma vez que o calor associado à ligação/interação da molécula é obtido pela integral dos picos (Holdgate & Ward, 2005), os valores de ΔH (**Figuras 10A-B**) e ΔC_p puderam ser calculados. Para tal, foram utilizadas três temperaturas distintas: 37 $^{\circ}\text{C}$, 25 $^{\circ}\text{C}$ e 15 $^{\circ}\text{C}$. Cabe ressaltar que experimentos controle foram realizados titulando as micelas em uma solução tampão na ausência de peptídeo em todos os valores de pH e em todas as temperaturas para que o calor de diluição pudesse ser calculado e devidamente descontado, embora este tenha sido sempre muito pequeno quando comparado ao calor envolvido na interação peptídeo-micela.

A CMC dos surfactantes pode ser calculada a partir da injeção de pequenas alíquotas de micelas de detergente na cela contendo solução tampão, o que provoca uma grande diluição destas micelas, havendo o seu rompimento e a consequente liberação dos monômeros que é acompanhada de um ganho ou uma perda de calor. Sendo assim, quando a concentração de surfactante na cela é menor que a CMC a entalpia observada contém o calor proveniente da desmicelização e o efeito de

diluição. Quando a concentração de surfactante excede a CMC, apenas a entalpia de diluição da micela é medida, o que permite calcular o ponto médio de uma transição alargada (**Figuras 10C-E**), que representa a CMC do detergente (Heerklotz & Seelig, 2000; Dai & Tam, 2003).

Figura 10: Determinação do ΔH e da Concentração Micelar Crítica a partir de



experimentos de ITC. (A) Exemplo do resultado obtido a partir de uma titulação utilizando a técnica de ITC. A interação ligante/macromolécula libera calor, representado pelos picos negativos. Uma vez que a saturação é alcançada, os picos observados são devido à diluição. (B) O gráfico da área de cada pico versus a razão molar permite o cálculo, utilizando análises não lineares, do ΔH . Cabe ressaltar que a integral é aplicada após a devida subtração do efeito de diluição e normalização por mol de ligante injetado (Adaptado de Freire, 2004). (C) Perfil do fluxo de calor obtido em experimentos de determinação da CMC de surfactantes. (D) Gráfico da área abaixo de cada pico versus a concentração de detergente. Inicialmente as micelas são completamente destruídas e o calor de desmicelização é medido. À medida que a concentração de surfactante aumenta, o processo de desmicelização para e a entalpia da reação se aproxima de zero, restando apenas um pequeno calor de diluição. A CMC é definida como o ponto médio da curva sigmóide obtida. (E) Aplicando-se a primeira derivada na curva sigmóide, é possível uma melhor visualização da faixa correspondente à CMC, representada pelo pico da curva (Adaptado de Heerklotz & Seelig, 2000).

3.7 Ressonância Magnética Nuclear de Proteínas

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) permite a determinação da estrutura de proteínas em solução, sendo capaz de refletir de uma maneira geral, as características da molécula quando em condições fisiológicas (Bierzyński, 2001). Além disso, a RMN é utilizada amplamente em estudos de interação entre biomoléculas, sendo atualmente o único método experimental capaz de revelar informações estruturais de alta resolução de proteínas e peptídeos em solução.

A informação estrutural, menos restrita, básica provida por RMN é derivada do efeito Overhauser Nuclear (NOE), e assume a forma de mapas de contato, indicando os pares de hidrogênios que estão próximos no espaço, cerca de 5 Å (Bierzyński, 2001). A magnitude do NOE é dependente da distância de separação entre os spins que estão interagindo, dentre outros fatores.

Vários tipos de experimentos podem ser realizados para a determinação estrutural, desde experimentos unidimensionais, em três dimensões, e até mesmo 7 dimensões, diferindo de acordo com o tamanho da molécula.

Os experimentos unidimensionais de uma amostra de proteína ou peptídeo são importantes, pois evidenciam aspectos relacionados à pureza e dispersão de deslocamento químico da amostra, sugerindo se a amostra é factível ou não para a determinação da sua estrutura através desta técnica. Estes experimentos só podem ser utilizados para a determinação de estrutura de peptídeos que contenham até 10 resíduos, embora esta não seja uma tarefa fácil devido às inúmeras sobreposições que ocorrem no espectro (Clare & Gronenborn, 1991).

Através da utilização de espectros em duas dimensões tornou-se possível visualizar a interação entre os hidrogênios através de dois deslocamentos químicos, aumentando a resolução do espectro, possibilitando o assinalamento da sequência

de aminoácidos de maneira específica, através da análise e da classificação dos sistemas de spin (Clore & Gronenborn, 1991). Nos espectros bidimensionais, as correlações entre duas frequências são registradas. Os hidrogênios correlacionados são encontrados a partir de projeções ortogonais entre dois eixos de frequência, onde F2 é a dimensão direta e F1 a indireta (Zerbe & Bader, 2002). Sendo assim, os experimentos bidimensionais homonucleares, como o “total correlation spectroscopy” (TOCSY) e o “nuclear Overhauser enhancement spectroscopy” (NOESY), e os heteronucleares como o “heteronuclear single quantum correlation” (HSQC) e “heteronuclear multiple-quantum coherence” (HMQC), são utilizados para a determinação estrutural de peptídeos e proteínas, onde cada um desses experimentos fornece informações relativas aos hidrogênios da molécula, que quando em conjunto propiciam a determinação da estrutura da mesma.

Os experimentos em duas dimensões permitem a determinação da estrutura apenas de pequenas proteínas, de até cerca de 100 resíduos. Acima deste limite há grande sobreposição devido ao grande número de ressonâncias, impossibilitando a interpretação do espectro; além de uma redução na eficiência da transferência de magnetização, levando a uma delimitação incompleta dos sistemas de spin (Clore & Gronenborn, 1991).

O experimento bidimensional TOCSY é baseado no acoplamento escalar, criando correlações entre todos os hidrogênios que compõem um sistema de spin, o que permite seu completo assinalamento. Neste experimento, os picos de correlação cruzados aparecem entre spins que estão ligados covalentemente um ao outro, e a magnetização é transferida até três ligações (exceção prolina e cadeia lateral aromática), sendo interrompida pela presença de um heteroátomo, permitindo que cada linha observada nos espectros de TOCSY contenha apenas picos

correspondentes a hidrogênios pertencentes a um mesmo sistema de spin (Zerbe & Bader, 2002).

As ressonâncias dos hidrogênios são classificadas de acordo com o deslocamento químico característico para HN, H α , H β , H δ . Sendo assim, os espectros são analisados através de regiões características (regiões amídicas, α , β , δ), onde cada aminoácido possui uma faixa de deslocamento químico podendo diferir um pouco de acordo com o ambiente químico.

Nos espectros de TOCSY podemos obter as correlações intra-resíduos, e alguns aminoácidos possuem picos característicos em deslocamentos químicos específicos que são facilmente reconhecidos em um espectro, servindo de base para iniciar o assinalamento (**Figura 11**). Os aminoácidos podem ser identificados através de uma tabela de deslocamentos químicos médios para cada aminoácido.

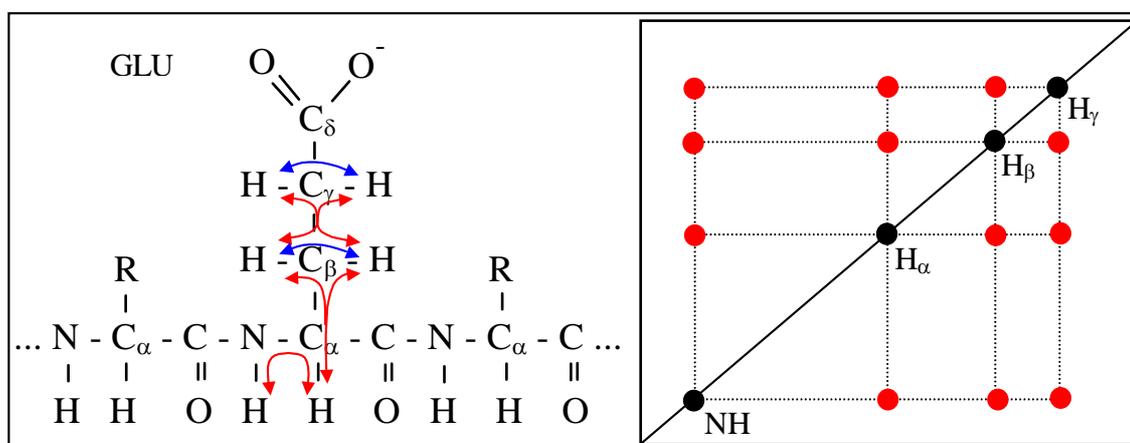


Figura 11: Hidrogênios em acoplamento escalar de um fragmento peptídico contendo glutamato. As setas vermelhas e as azuis indicam acoplamento $^3J_{HH}$ e $^2J_{HH}$, respectivamente, que só podem ocorrer entre hidrogênios de um mesmo aminoácido. A cadeia lateral dos aminoácidos que precedem e sucedem o glutamato é representada pela letra R. Ao lado do fragmento polipeptídico é apresentado o desenho esquemático de um espectro bidimensional de TOCSY, evidenciando os picos de correlação dos prótons do glutamato (círculos vermelhos). Os picos em preto na diagonal do espectro são os sinais de ressonância de cada próton do glutamato (Adaptado de Wüthrich, 1986).

O NOESY é baseado no acoplamento dipolar, correlacionando átomos próximos no espaço. Sendo assim, os espectros de NOESY contêm toda a informação sobre os hidrogênios que estão em proximidade, permitindo a análise do arranjo tridimensional dos átomos, ou seja, permitindo a determinação da estrutura tridimensional de proteínas. Geralmente, o espectro de NOESY de peptídeos apresenta poucos picos e de pequena magnitude, uma vez que os peptídeos são moléculas muito menos compactas (Bierzyński, 2001).

A combinação de acoplamentos escalares entre hidrogênios e conectividades intraresiduais estabelecidas por NOEs permite o assinalamento do esqueleto carbônico de uma proteína caminhando por seus hidrogênios. Em outras palavras, os sistemas de spin de dois aminoácidos vizinhos podem ser conectados via H α -HN ou HN-HN (**Figura 12**).

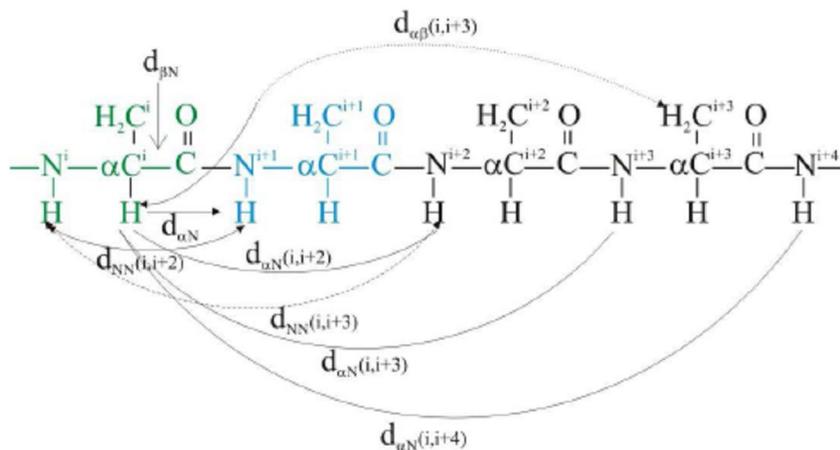


Figura 12: Conectividade para um aminoácido. Segmento hipotético de um peptídeo demonstrando o acoplamento escalar ocorrendo entre os hidrogênios do aminoácido "i+1", compondo o sistema de spin do aminoácido (Extraído de Gomes-Neto, 2009).

Embora a aplicação da espectroscopia heteronuclear seja limitada pela baixa sensibilidade e pela baixa abundância natural do ^{13}C (1,03%) e do ^{15}N (cerca de três vezes menor que a do ^{13}C), estes experimentos são importantes no processo de assinalamento dos espectros de hidrogênio, possibilitando determinar qual

hidrogênio está ligado a qual carbono (ou nitrogênio), uma vez que o HSQC e o HMQC são experimentos que correlacionam o deslocamento químico de hidrogênios com o deslocamento químico do heteronúcleo ligado diretamente a ele, utilizando, portanto, acoplamentos via ligação química. É interessante ressaltar que para este tipo de experimento ser realizado para proteínas maiores do que 8 kDa é necessária a enriquecimento isotópico da molécula.

O HSQC e o HMQC, portanto utilizam ^{15}N ou ^{13}C em uma dimensão, enquanto na outra dimensão observamos a informação do hidrogênio, possibilitando a análise de todos os hidrogênios amídicos da molécula e de cadeia lateral de alguns resíduos, evidenciando fatores como dispersão e pureza da amostra. Ao utilizar o ^{13}C em uma das dimensões, torna-se possível o assinalamento dos hidrogênios das cadeias laterais, CH_2 , CH_3 , CH e CH_α .

A estrutura secundária e a inserção do candidato a peptídeo de fusão do Vírus da Hepatite C podem ser avaliadas a nível atômico utilizando RMN, e micelas como modelo de membrana. As amostras de RMN foram preparadas adicionando SDS-d_{25} ou DPC-d_{38} (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, EUA) a tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, contendo 10% de água deuterada (D_2O) (99,9%, Isotec, Inc.) e 950 μM de $\text{HCV}_{421-445}$. O estoque de $\text{HCV}_{421-445}$ foi preparado em 100% DMSO-d_6 (99,9%, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, EUA), sendo a concentração final na amostra de DMSO-d_6 de 10%. A amostra final continha 950 μM de $\text{HCV}_{421-445}$ livre ou na presença de 50 mM de SDS-d_{25} ou 200 mM de DPC-d_{38} .

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro BRUKER Avance DRX600 operando a 600,13 MHz. Os espectros de TOCSY foram obtidos utilizando a sequência de pulso MLEV-17 (Bax & Davis, 1985), com 256 pontos em f_1 e 2048 pontos em f_2 , com 128 acumulações com tempo de mistura de 60 ms. Os espectros

de NOESY foram adquiridos utilizando a sequência de pulso noesygpph19 (programa de pulso da Bruker), com 256 pontos em f_1 e 2048 pontos em f_2 com 96 acumulações utilizando tempo de mistura de 120 e 300 ms. A supressão da água foi realizada através do uso da técnica de WATERGATE (Piotto *et al.*, 1992). Os experimentos do peptídeo livre, na presença de SDS e na presença de DPC foram adquiridos à temperatura de 25 °C.

A aquisição dos experimentos de RMN foi realizada através do programa TopSpin 1.3 (Bruker BioSpin). Os dados foram processados com NMRPIPE (Delaglio *et al.*, 1995) e analisados com NMRVIEW (Johnson, 2004), versão 5.0.

4- Resultados

A fusão de membranas é um processo fundamental para a sobrevivência de células eucarióticas, além de representar a via de entrada e infecção de vírus envelopados (Sollner, 2004). Em geral, apenas uma proteína viral é responsável pelo processo de fusão de membranas, embora recentemente algumas evidências indiquem que diversas mudanças conformacionais em diferentes regiões das proteínas de fusão seriam necessárias para que as membranas viral e celular pudessem fusionar completamente (Lavillette *et al.*, 2007). Desta forma, uma ou mais proteínas da membrana viral facilitam as várias etapas de fusão.

Embora a fusão entre duas membranas seja termodinamicamente favorável, existe uma barreira cinética alta que é ultrapassada pelas proteínas de fusão viral, através da utilização da energia livre liberada durante alterações conformacionais, responsáveis pela exposição de pequenos segmentos hidrofóbicos conservados, os peptídeos de fusão (Martens & McMahon, 2008). Os peptídeos de fusão podem ser encontrados em três formas: na porção N-terminal da proteína de fusão, como alças internas simples e como alças internas bipartidas, onde os dois peptídeos de fusão interagem com a membrana alvo celular (White *et al.*, 2008).

Embora o princípio geral da fusão de membrana e a importância dos peptídeos de fusão neste processo sejam reconhecidos há bastante tempo, o mecanismo exato de ação dos peptídeos de fusão permanece desconhecido (Li *et al.*, 2003).

4.1 Análise Teórica da Hidrofobicidade do Peptídeo de Fusão

O genoma do HCV codifica duas glicoproteínas de envelope, E1 e E2, que interagem formando um heterodímero que apresenta múltiplas regiões hidrofóbicas que participariam diretamente do processo fusogênico, incluindo a região que

compreende os resíduos 265 a 296, na E1, (Garry & Dash, 2003; Drummer *et al.*, 2007; Pérez-Berná *et al.*, 2008; Bruni *et al.*, 2009), e as regiões que compreendem os resíduos 419 a 433 e 597 a 635, na E2 (Pacheco *et al.*, 2006; Helle & Dubuisson, 2008; Pérez-Berná *et al.*, 2008).

Embora o alinhamento de sequências da glicoproteína E1 com a região fusogênica dos *Flavivírus* tenha revelado inúmeras semelhanças, a proteína E2 apresenta três subdomínios homólogos à glicoproteína E dos *Flavivírus*. Desta forma a identificação definitiva da proteína e do peptídeo de fusão ainda não está concluída (Bruni *et al.*, 2009). Além disso, diferentes regiões das proteínas E1 e E2 poderiam cooperar para o evento de fusão.

A utilização de sistemas de pseudopartículas revelou que as regiões dos resíduos 267-290 (E1), 419-433 (E2) e 597-620 (E2) são bastante membranotrópicas e apresentam características comuns aos peptídeos de fusão virais. Baseado no fato da região fusogênica dos flavivírus e dos alfavírus incluir ao menos três glicinas, um triptofano, duas fenilalaninas e alguns outros resíduos bastante hidrofóbicos (Lavillette *et al.*, 2007), bem como apresentar histidinas possivelmente envolvidas em mecanismos sensores de pH (Stiasny *et al.*, 2009), selecionamos o peptídeo membranotrópico correspondente à sequência 421 a 445 da glicoproteína E2 do HCV para ser sintetizado e purificado pela Genscript USA, Inc. No presente estudo, as propriedades da interação deste candidato a peptídeo de fusão do Vírus da Hepatite C com membranas biomiméticas foram investigadas. Além da caracterização da interação deste peptídeo com micelas e bicamadas lipídicas, a importância das histidinas, que ocupam as posições 421 e 445, para o evento de fusão, também foi avaliada, uma vez que em baixo pH a histidina deixa de estar em sua forma neutra e passa a estar protonada.

Alguns peptídeos de fusão podem ser preliminarmente identificados por análises baseadas na sequência de aminoácidos, na hidrofobicidade e no potencial de ligação a membranas (White *et al.*, 2008).

As escalas de hidrofobicidade são um requisito básico fundamental para a descrição quantitativa da partição do peptídeo e de seu enovelamento. Estas escalas geralmente são provenientes de estudos da energia livre da transferência de aminoácidos da fase não polar à água. A partir dos valores individuais de hidrofobicidade de cada aminoácido é possível construir um gráfico de hidrofobicidade versus posição do aminoácido, onde cada aminoácido é avaliado conforme seu grau de hidrofobicidade, e quanto mais hidrofóbico maior o valor atribuído a este resíduo (White, 1994).

A escala de Wimley e White (1996) é baseada em estudos de duas famílias de peptídeos particionados em LUVs compostas de palmitoiloleoilfosfatidilcolina e leva em consideração a contribuição das ligações peptídicas. De acordo com esta escala de hidrofobicidade (**Figura 13**), HCV₄₂₁₋₄₄₅ apresenta duas regiões que possuem propensão a particionar em membranas, indicadas por valores positivos no gráfico. Os segmentos correspondem à porção 436 a 444, que compreendem os três aminoácidos aromáticos bem como os resíduos comuns a peptídeos de fusão: alanina, glicina e leucina.

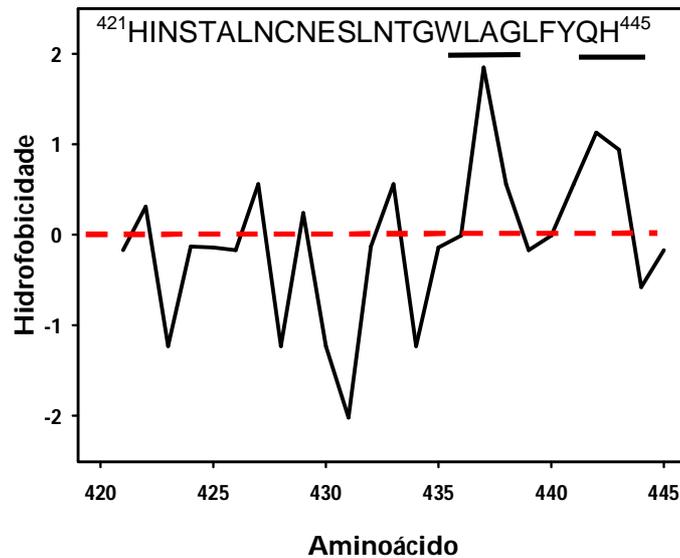


Figura 13: Análise da hidrofobicidade do candidato a peptídeo de fusão do Vírus da Hepatite C, HCV₄₂₁₋₄₄₅. Gráfico de hidrofobicidade do peptídeo correspondente aos resíduos 421-445 da glicoproteína de fusão E2, utilizando a escala de hidrofobicidade de Wimley e White. Os dois segmentos que apresentam propensão a particionar em bicamadas lipídicas estão indicados por barras pretas no topo do gráfico.

4.2 Determinação da Concentração Micelar Crítica

Os agregados de surfactantes podem ser caracterizados pela geometria dos agregados e por sua composição, onde a energia livre de micelização é na verdade a soma de diversas contribuições (energia livre de transferência, de interface, de empacotamento, estérica e eletrostática) de energia livre e da perda de entropia translacional do contra-íon. A formação das micelas é dirigida primeiramente pelo efeito hidrofóbico, embora as forças de van der Waals, as ligações de hidrogênio e as interações eletrostáticas (no caso de surfactantes carregados) também apresentem papel importante em determinar como a formação de micelas ocorre (Stephenson *et al.*, 2006).

A CMC e o número de agregação são específicos de cada surfactante, sob um determinado conjunto de condições, embora algumas generalizações possam

ser feitas: o aumento do tamanho da cadeia hidrofóbica diminui a solubilidade do surfactante em água, e conseqüentemente a CMC; por sua vez, surfactantes iônicos apresentam maior solubilidade em água, apresentando maior CMC (Njus, 2000).

As micelas têm sido utilizadas para solubilizar proteínas ou mimetizar ambientes de membrana, permitindo a análise conformacional de diversos peptídeos. No presente estudo, micelas de SDS, n-OGP, CTAB e DPC foram utilizadas como modelos miméticos de membrana, permitindo a análise espectroscópica, calorimétrica e de ressonância magnética nuclear da interação do HCV₄₂₁₋₄₄₅ com membranas iônicas, não iônicas e zwitteriônicas, possibilitando a análise conformacional e a extração de parâmetros termodinâmicos destes tipos de interação, sendo a CMC, dos diferentes detergentes, determinada através de um calorímetro de titulação, a 25°C. Na figura 12, o termograma que permite a determinação da CMC do SDS pode ser observado (**Figura 14**).

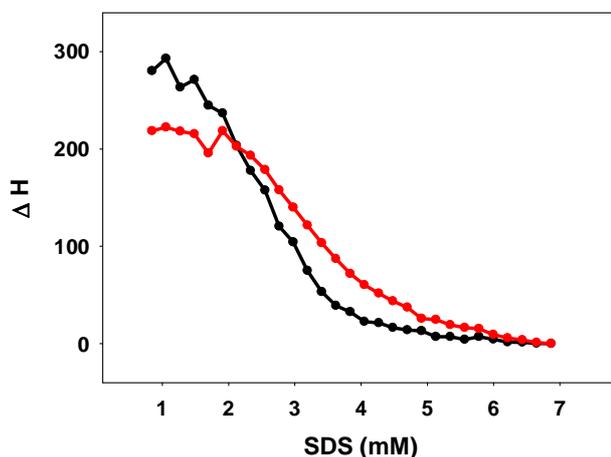


Figura 14: Termograma da calorimetria de titulação isotérmica do SDS em tampão fosfato de sódio. A CMC do detergente SDS foi calculada a partir da primeira derivada do termograma apresentado pela titulação do detergente em tampão fosfato de sódio 20 mM, no pH 5,5, curvas pretas e no pH 7,4, curvas vermelhas, a 25°C.

Quando a concentração do surfactante na cela, durante a titulação, encontra-se abaixo da CMC, a entalpia observada contém o calor de desmicelização do surfactante e o efeito de diluição, e quando a concentração excede a CMC, apenas a entalpia de diluição da micela. Uma vez que as entalpias de diluição do monômero e da micela são negligenciáveis comparadas à entalpia de desmicelização, uma transição próxima da CMC é observada (Dai & Tam, 2003). A partir da primeira derivada do termograma apresentado foi possível determinar a CMC nas condições utilizadas nos experimentos apresentados neste trabalho (**Tabela 1**).

Tabela 1: Parâmetros termodinâmicos das micelas de SDS, CTAB e n-OGP, a 25 °C, em tampão fosfato de sódio 20 mM.

Detergente	pH	CMC (mM)
SDS	5,5	2,62
	7,4	3,37
CTAB	5,5	0,29
	7,4	0,24
n-OGP	5,5	28,6

4.3 Análise Espectroscópica da Interação Peptídeo-Micela

Devido à natureza hidrofóbica dos peptídeos de fusão, acredita-se que eles interagem primeiramente com os lipídios da membrana celular, e inúmeros estudos têm sido feitos utilizando peptídeos sintéticos e micelas ou vesículas fosfolipídicas com composições lipídicas definidas, a fim de simular a fusão mediada pelas proteínas de fusão (Mazzini *et al.*, 2007).

A interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ com micelas de diferentes detergentes foi analisada através de espectroscopia de fluorescência utilizando os resíduos aromáticos presentes na sequência de aminoácido deste peptídeo. O Trp apresenta um máximo de emissão livre da interferência da Tyr em 295 nm. Entretanto, a análise do espectro de absorção do Trp presente no peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ (**Figura 15**)

mostra um máximo de absorção a 280 nm. Análises da emissão de fluorescência foram realizadas utilizando os comprimentos de onda de excitação de 280 nm (**Figura 15**) e 295 nm, não havendo diferença significativa entre os espectros (dado não mostrado). Sendo assim, todos os demais experimentos de espectroscopia de fluorescência foram realizados utilizando o comprimento de onda de excitação 280 nm.

A análise do espectro de emissão de fluorescência do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ livre em solução (**Figura 15**) indica a exposição dos resíduos de Trp ao meio aquoso, uma vez que o espectro apresenta um máximo de emissão em 350 nm e largura de 60 nm, condizente com a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel indólico.

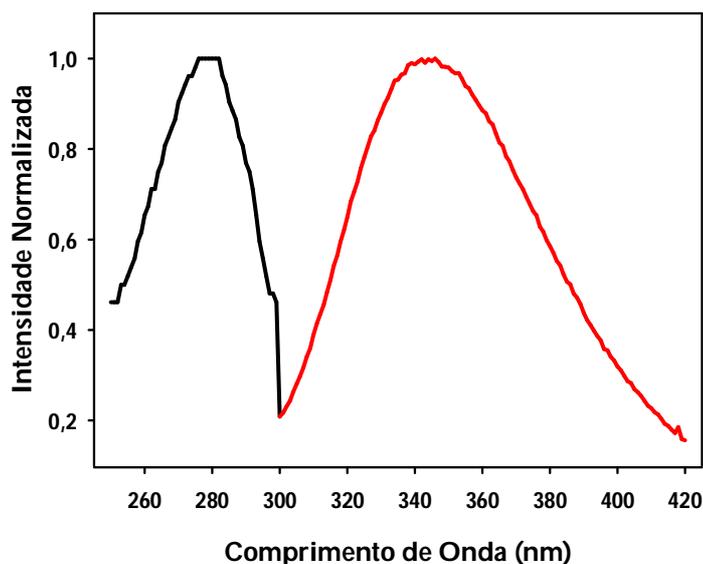


Figura 15: Espectro de absorção e emissão de fluorescência dos resíduos de Trp e Tyr presentes no peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅. A densidade ótica foi escaneada de 250 a 300 nm. Os resíduos de Trp/Tyr foram excitados em 280 nm e a emissão de fluorescência foi varrida de 300 a 420 nm. O espectro de absorção está mostrado em preto e o de emissão, em vermelho. A concentração de peptídeo foi de 50 μ M em tampão Fosfato de sódio 20 mM no pH 7,4.

A obtenção dos parâmetros termodinâmicos da ligação de peptídeos de membrana a micelas é extremamente útil para a formulação de modelos fisicamente relevantes. A partição de peptídeos em membranas é geralmente acompanhada pela formação de estruturas secundárias; e o fato das proteínas apresentarem grande

quantidade de estrutura secundária na presença de SDS é sabido há algum tempo (Wang *et al.*, 1996).

A interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ com micelas foi então primeiramente analisada na presença do detergente aniônico SDS. Na presença de micelas aniônicas de SDS, o pico do comprimento de onda de emissão é desviado de 350 nm para cerca de 330 nm (**Figura 16A**). Este desvio para o azul é representativo dos resíduos de Trp, completamente expostos à água em tampão, sendo particionados dentro de um ambiente mais hidrofóbico fornecido pelas micelas (Lakowicz, 2006).

A análise do centro de massa espectral, calculado a partir do espectro convertido para número de ondas, permite uma melhor avaliação da interação do peptídeo com os monômeros e micelas dos diferentes detergentes nos diferentes valores de pH (**Figura 17**). O centro de massa do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ em solução é de aproximadamente 28,450 cm⁻¹, o que nos indica que na média estes triptofanos estão em ambiente polar, ou seja, estão expostos ao solvente. Conforme o SDS é adicionado à solução em pH 5,5, o centro de massa aumenta (**Figura 17A**), atingindo seu valor máximo de aproximadamente 29,350 cm⁻¹, antes mesmo da adição de 1 mM de SDS à solução, indicando que o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ é capaz de interagir com a forma monomérica do SDS. Quando a concentração micelar crítica é alcançada, micelas são formadas na solução, não havendo variação do centro de massa espectral. Entretanto, em pH 7,4, o máximo de desvio de centro de massa só é alcançado em concentrações superiores a 2 mM de SDS, indicando que interação peptídeo-monômero ocorre em faixas de concentrações maiores, possivelmente devido à repulsão entre o peptídeo carregado negativamente e as cabeças polares do SDS, também carregadas negativamente. No entanto, na faixa onde ocorre a

formação de micelas, o desvio do centro de massa espectral mostra-se semelhante ao que ocorre na interação com micelas em pH ácido.

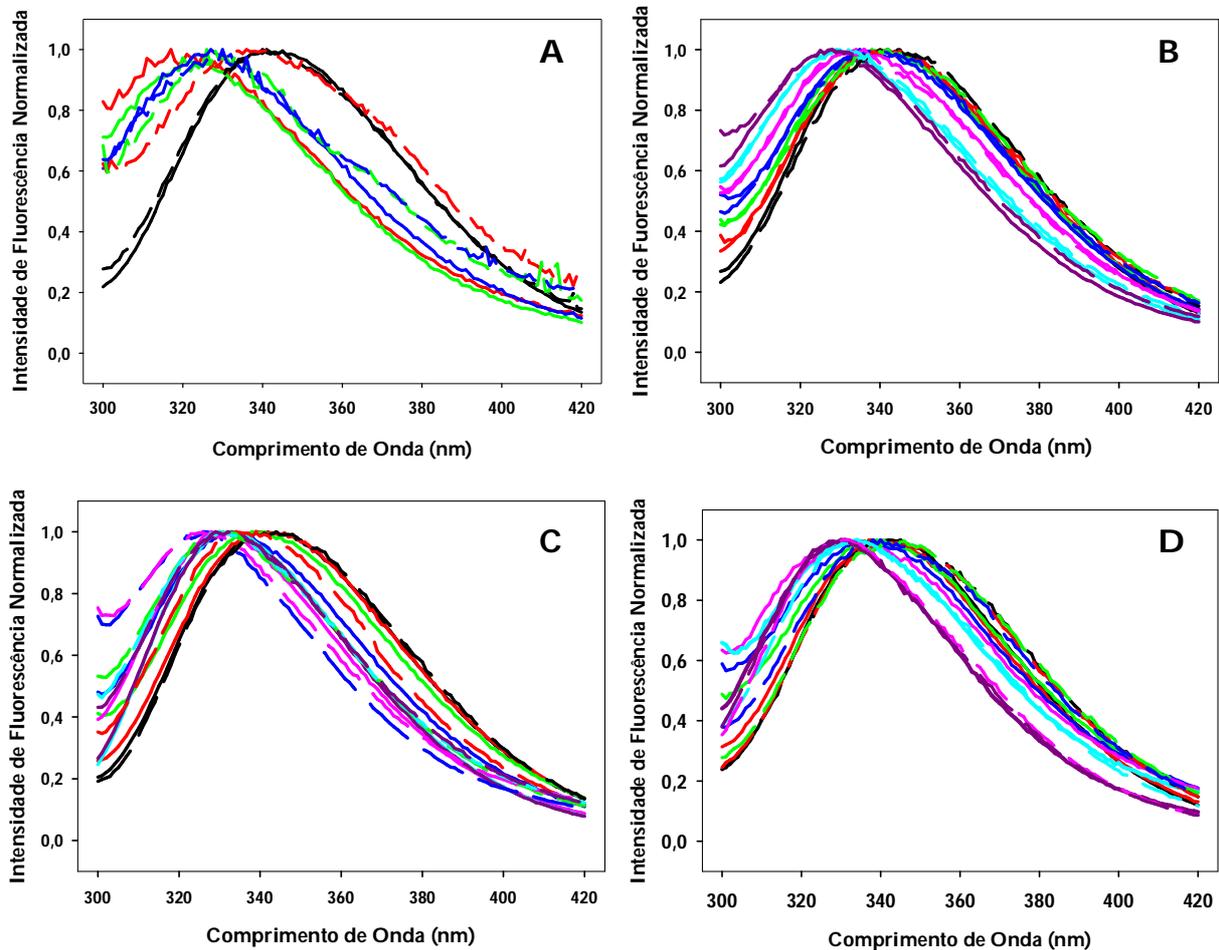


Figura 16: Espectros de emissão de fluorescência dos resíduos de Trp presentes no peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅, na presença de micelas. (A) Espectros de emissão de fluorescência normalizados na presença de diferentes concentrações do detergente aniônico SDS, 1 mM (vermelho), 2 mM (verde), 10 mM (azul), ou na ausência do detergente (linhas pretas). (B) Espectros de emissão de fluorescência normalizados na presença de diferentes concentrações do detergente não iônico n-OGP, 5 mM (vermelho), 10 mM (verde), 15 mM (azul), 20 mM (rosa), 25 mM (ciano), 40 mM (roxo) ou na ausência do detergente (linhas pretas). (C) Espectros de emissão de fluorescência normalizados na presença de diferentes concentrações do detergente catiônico CTAB, 0,01 mM (vermelho), 0,025 mM (verde), 0,05 mM (azul), 0,1 mM (rosa), 0,5 mM (ciano), 1 mM (roxo) ou na ausência do detergente (linhas pretas). (D) Espectros de emissão de fluorescência normalizados na presença de diferentes concentrações do detergente zwitteriônico DPC, 0,01 mM (vermelho), 0,1 mM (verde), 0,5 mM (azul), 1 mM (rosa), 1,5 mM (ciano), 5 mM (roxo) ou na ausência do detergente (linhas pretas). Em todos os casos, o espectro em pH 5,5 está representado pelas linhas cheias, enquanto o espectro em pH 7,4 está representado pelas linhas pontilhadas.

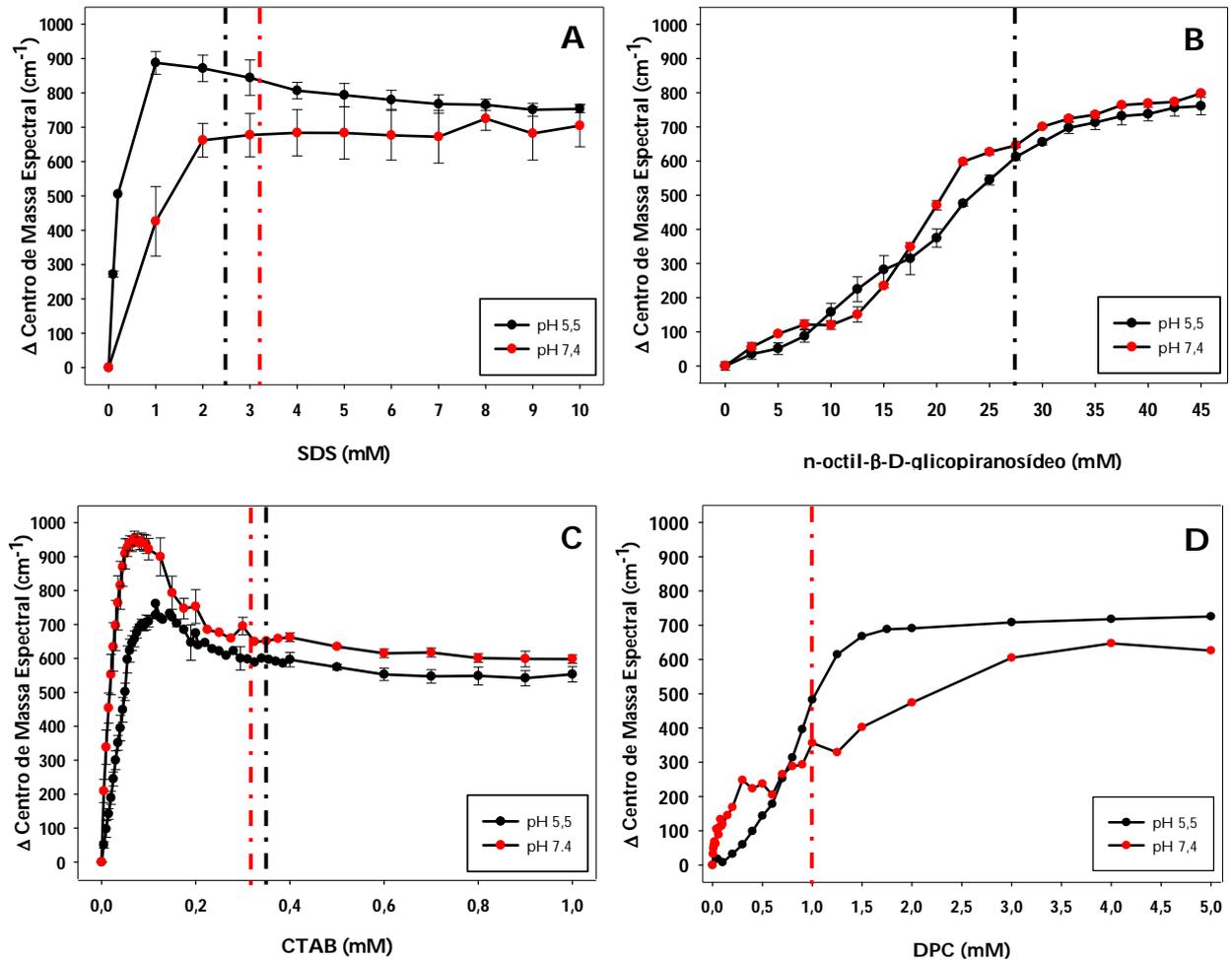


Figura 17: Centro de massa dos espectros de fluorescência do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ na presença de micelas. A interação peptídeo-micela também pode ser avaliada através do centro de massa espectral da emissão de fluorescência na presença de SDS (A), n-OGP (B), CTAB (C) e DPC (D). Em símbolos pretos, centro de massa dos espectros obtidos em pH 5,5. Em símbolos vermelhos, centro de massa dos espectros obtidos em pH 7,4. As linhas pontilhadas em preto indicam a CMC em pH 5,5, e as linhas pontilhadas em vermelho indicam a CMC em pH 7,4.

Na tentativa de melhor avaliar a interação do peptídeo com micelas de diferentes características, foram realizados ensaios de supressão de fluorescência, amplamente utilizados na análise de mudanças conformacionais de proteínas, bem como na análise de interações proteína-ligante (Lakowickz, 2006).

A acrilamida foi utilizada como um supressor de fluorescência extrínseco solúvel em água, sendo adicionada às amostras de peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ na presença

ou na ausência das diferentes micelas, em pH neutro ou ácido (**Figura 18 e Tabela 2**). A reação entre o supressor de fluorescência e o fluoróforo geralmente obedece a uma dependência linear, e os gráficos de Stern-Volmer provêm uma indicação da acessibilidade ao solvente, onde grandes coeficientes angulares indicam que o triptofano está exposto ao solvente, e baixos coeficientes indicam que o triptofano está protegido (Lakowickz, 2006).

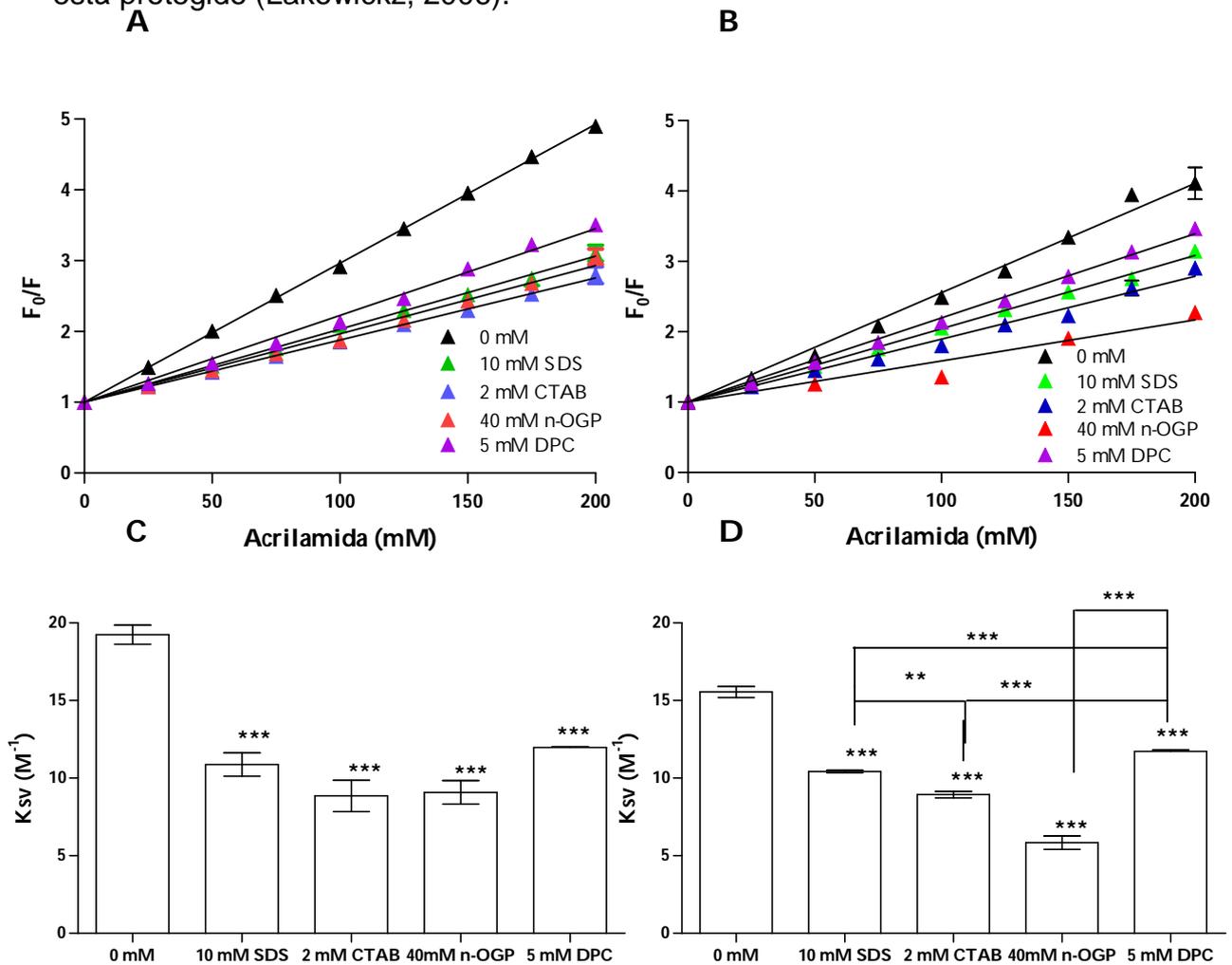


Figura 18: Análise da interação peptídeo-micela através de supressão de fluorescência do por acrilamida. Supressão de fluorescências do Trp presente no peptídeo na presença de micelas de SDS, n-OGP, CTAB e DPC em pH 7,4 (**A e C**) e em pH 5,5 (**B e D**). A excitação foi realizada em 280 nm e a emissão foi analisada em 348 nm na ausência de micelas e 334 nm na presença de micelas. A quantificação da supressão de fluorescência (**C e D**) foi avaliada utilizando a constante de Stern-Volmer que segue: $F_0/F=1+ K [Q]$, onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de supressor, $[Q]$ é a concentração do supressor e K a constante de supressão. A análise estatística foi realizada através do teste t (Student's-t test). *** $P < 0.001$; ** $P = 0.003$

Em solução, o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ apresenta um alto grau de exposição do triptofano, representado por uma constante de Stern Volmer (Ksv) de 16,46 M⁻¹ em pH 7,4 e de 15,6 M⁻¹ em pH 5,5. Já quando micelas de SDS estão presentes no meio, o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ apresenta menor Ksv, de 10,9 M⁻¹ em pH 7,4 e 10,4 M⁻¹ em pH 5,5 indicando uma maior proteção do triptofano devido à interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅. Isto demonstra que o pH não tem efeito significativo sobre a acessibilidade dos Trps presentes no peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ ao supressor, quando na presença de micelas de SDS.

Uma vez que as interações entre peptídeos e membranas podem ser governadas por forças iônicas, um segundo detergente, agora desprovido de cargas, foi utilizado, o n-octil-β-D-glicopiranosídeo, um glicolípido não-iônico, muito utilizado na solubilização e cristalização de proteínas de membrana e no estudo de interações ligante-membrana (Konidala *et al.*, 2006).

A análise do espectro de fluorescência em concentrações crescentes de n-OGP (**Figura 16B**), em ambos os valores de pH analisados, mostrou um desvio do espectro significativo para comprimentos de onda menores a partir da adição de 20 mM de n-OGP, sendo o máximo de desvio alcançado com a adição de 25 mM de n-OGP. Já o centro de massa espectral (**Figura 17B**) mostrou que o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ não interage de maneira significativa com monômeros quando estes estão em baixa concentração. A interação com monômeros apenas se torna significativa a partir de 15 mM de n-OGP. O máximo de desvio de centro de massa só é alcançado próximo da CMC; ou seja, na presença de uma concentração de aproximadamente 30 mM de n-OGP na solução. A acessibilidade dos resíduos de Trp à acrilamida, no entanto, mostrou-se muito semelhante, quando na presença de micelas aniônicas de

SDS ou na presença de micelas não iônicas de n-OGP (**Figura 18 e Tabela 2**). O Ksv obtido foi de $9,1 \text{ M}^{-1}$ em pH 7,4 e de $5,8 \text{ M}^{-1}$ em pH 5,5.

Uma vez que o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ apresenta um aminoácido carregado negativamente, Glu431, apresentando, portanto, carga negativa quando em pH neutro, sua interação com monômeros e micelas catiônicas de CTAB foi avaliada. Na presença destas micelas o pico do comprimento de onda de emissão é desviado de 350 nm para cerca de 330 nm (**Figura 16C**). Enquanto o desvio do espectro já se mostra significativo após a adição de 0,01 mM de CTAB à solução em pH neutro, o desvio significativo do espectro em pH ácido só ocorre após a adição de 0,05 mM de CTAB. Entretanto, o desvio máximo alcançado mostrou-se semelhante em ambos os valores de pH.

A análise do centro de massa espectral (**Figura 17C**) mostrou que a adição de CTAB à solução em pH 7,4 leva a um desvio do centro de massa espectral, sendo o máximo alcançado em 0,07 mM de CTAB. O desvio de centro de massa alcança um platô próximo a 0,3 mM de CTAB, onde micelas já se encontram presentes em solução. A análise do desvio de centro de massa espectral em pH 5,5, na faixa de concentração monomérica de CTAB mostra que o máximo de desvio só é alcançado acima de 0,1 mM de CTAB, sendo este máximo cerca de 200 cm^{-1} menor que o apresentado em pH neutro. Entretanto, o desvio de centro de massa alcança um platô semelhante ao apresentado em pH neutro, sendo próximo a 0,3 mM de CTAB, onde micelas também já se encontram presentes na solução em pH 5,5. Estes resultados indicam que a interação peptídeo-monômero ocorre em faixas de concentrações maiores de detergente catiônico.

A acessibilidade dos resíduos de Trp à acrilamida mostrou-se muito semelhante, em ambos os valores de pH, quando na presença de micelas aniônicas

de SDS, não iônicas de n-OGP e catiônicas de CTAB (**Figura 18 e Tabela 2**), onde o Ksv obtido foi de $8,9 \text{ M}^{-1}$ em ambos os valores de pH.

A interação do peptídeo foi ainda analisada na presença de micelas zwitteriônicas de DPC, um detergente, modelado a partir da fosfatidilcolina, amplamente utilizado em experimentos de RMN (Brown, 1979). O centro de massa espectral apresentado em concentrações crescentes de DPC é significativamente desviado a partir da adição de 1 mM de DPC à solução, sendo o máximo de desvio, para cerca de 330 nm, alcançado com a adição de 5 mM de DPC (**Figura 16D**). A análise do centro de massa espectral mostrou um desvio significativo a partir da adição de 0,5 mM de DPC, sugerindo que a interação com monômeros de DPC pode ocorrer. Entretanto, o máximo de desvio alcançado, cerca de 700 cm^{-1} , é alcançado apenas com a adição de 3 mM de DPC, em pH 7,4 e 1,5 mM de DPC, em pH 5,5 (**Figura 17D**), concentrações acima da CMC deste surfactante. O Ksv obtido foi de $11,97 \text{ M}^{-1}$ em pH 7,4 e de $12,26 \text{ M}^{-1}$ em pH 5,5 (**Figura 18 e Tabela 2**).

Tabela 2: Parâmetros espectroscópicos da interação peptídeo-micela, a 25 °C.

Ksv (M^{-1}) Calculado									
pH	Tampão (tp)	SDS (10 mM)	Razão (tp/SDS)	n-OGP (40 mM)	Razão (tp/n-OGP)	CTAB (2mM)	Razão (tp/CTAB)	DPC (5mM)	Razão (tp/DPC)
7,4	16,46	10,87	1,5	9,078	1,8	8,9	1,8	11,97	1,4
5,5	15,6	10,4	1,5	5,8	2,7	8,9	1,8	12,26	1,3

Os resultados obtidos a partir da análise da fluorescência do Trp demonstram que a carga da micela e o pH não parecem alterar o tipo de interação que ocorre entre o Trp e a micela, não modificando a acessibilidade da acrilamida ao Trp presente no peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅.

4.4 Análise Termodinâmica da Interação Peptídeo-Micela

A calorimetria de titulação isotérmica é uma técnica excelente para a obtenção de parâmetros termodinâmicos fundamentais que governam a interação de peptídeos com membranas (Li *et al.*, 2003), sendo os modelos micelares muito utilizados como mimetizadores de membrana.

A entalpia de ligação da interação peptídeo-micela foi calculada a partir dos fluxos de calor resultantes da injeção de pequenas alíquotas de peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ em tampão contendo micelas de n-OGP ou SDS (**Figura 19**). A interação do peptídeo com as micelas não alcança um nível de saturação, já que existirá sempre muito mais detergente do que peptídeo e, por este motivo não é possível calcular as constantes de ligação.

Em todos os casos, experimentos controle foram realizados e subtraídos com o objetivo de descontar o calor de diluição da amostra. A integração dos perfis calorimétricos permite calcular a quantidade de calor (Q) envolvida na reação, possibilitando obter o ΔH (**Tabela 3**). Na presença de micelas de SDS (**Figura 19A e C**), a reação de ligação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ a micelas foi endotérmica a 37 °C, em ambos os valores de pH e permaneceu endotérmica a 25 °C em pH 7,4, passando a exotérmica nesta mesma temperatura em pH 5,5. Já a 15 °C, a reação mostrou-se sempre exotérmica, independente do pH analisado. Na presença de micelas de n-OGP, a reação foi exotérmica, em qualquer temperatura avaliada, e em ambos os valores de pH, indicando que esta ligação é fortemente governada por variações de entalpia (**Figura 19B e D**).

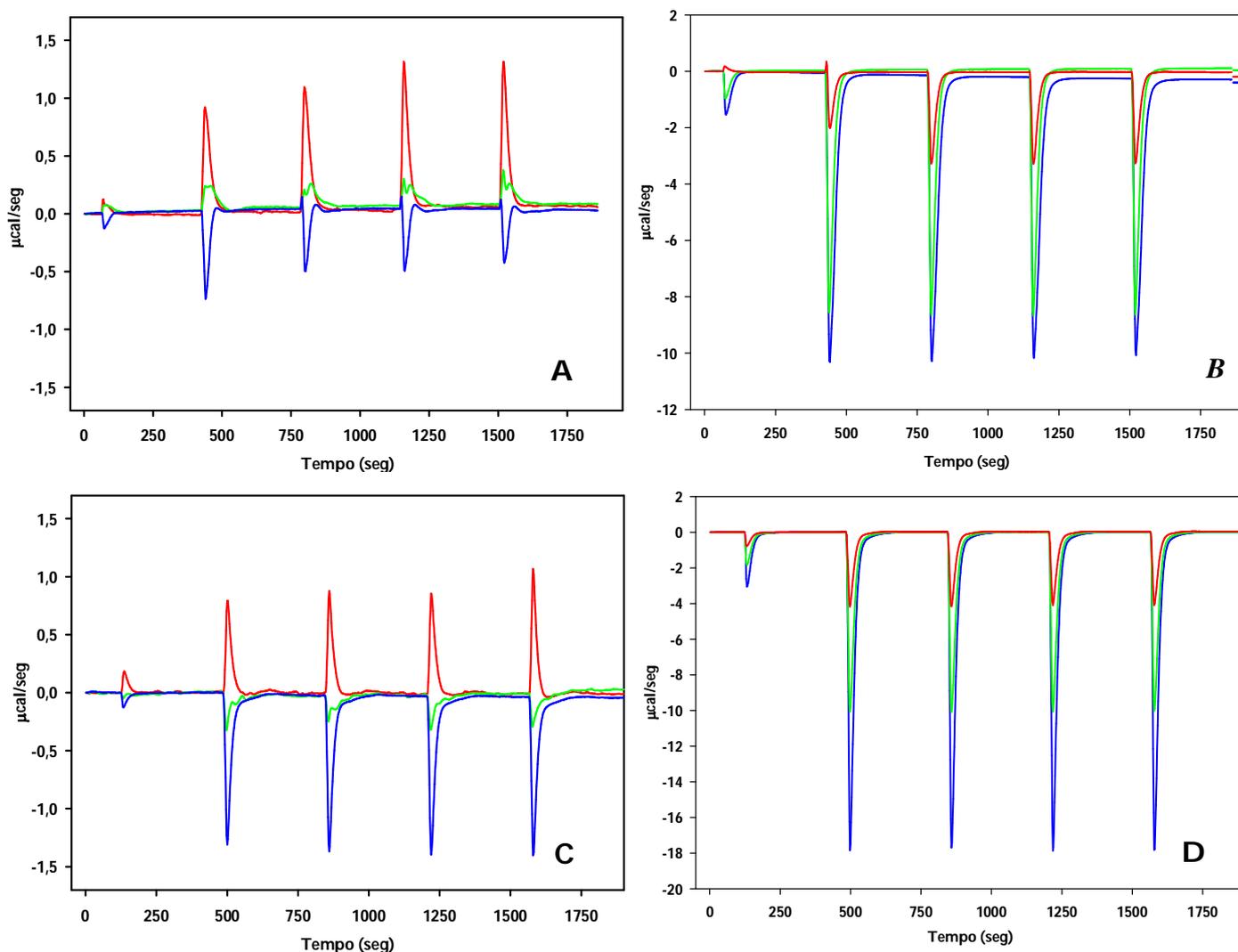


Figura 19: Análise calorimétrica da interação peptídeo-micela. Os perfis calorimétricos após a adição de 5 μL de peptídeo a partir de uma solução estoque de 100 μM de HCV₄₂₁₋₄₄₅, na cela calorimétrica contendo 20 mM de SDS, pH 7,4 (A) 40 mM de n-OGP, pH 7,4 (B), 20 mM de SDS, pH 5,5 (C) 40 mM de n-OGP, pH 5,5 (D). Em azul, experimentos realizados a 15 °C, em verde, a 25 °C e em vermelho, a 37 °C. Cabe ressaltar que em todos os experimentos a primeira injeção de peptídeo foi de 1 μL.

A análise das mudanças no fluxo de calor em diferentes temperaturas permitiu o cálculo da capacidade calorífica (Tabela 3), onde os valores positivos de ΔC_p sugerem o predomínio de interações não hidrofóbicas (Cooper, 2000).

Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos da interação peptídeo-micela, a 25 °C.

Micela	pH	ΔH (kcal/mol)			ΔC_p (kcal/mol.K)
		15 °C	25 °C	37 °C	
<i>SDS</i>	5,5	-68,03	-16,6	36,6	4,74
<i>SDS</i>	7,4	-21,26	22,07	71,52	4,21
<i>n-OGP</i>	5,5	-875,8	-517,3	-200,4	30,55
<i>n-OGP</i>	7,4	-663,6	-442,9	-158,2	22,99

4.5 Análise Conformacional do Peptídeo no Ambiente Micelar

Peptídeos associados a membranas geralmente apresentam um comportamento estrutural polimórfico, que parece ser crucial para o processo fusogênico. Muitos peptídeos de fusão requerem conformação em α -hélice para serem funcionais, enquanto outros dependem de conformação em folha- β para estarem ativos (Ulrich *et al.*, 1999).

Para acessar a estrutura secundária do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅, análises de dicroísmo circular foram realizadas. Uma vez que o peptídeo apresenta caráter altamente hidrofóbico, a adição de DMSO faz-se necessária para sua solubilização. Entretanto, o DMSO apresenta alta absorbância na faixa de 190 a 260 nm, inviabilizando seu uso para a solubilização do peptídeo durante as análises de CD. Sendo assim, não foi possível analisar a estrutura do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ livre em solução através desta metodologia. O efeito de surfactantes na estrutura secundária do peptídeo, no entanto, pode ser investigado mediante solubilização do peptídeo diretamente em solução contendo micelas dos diferentes surfactantes (**Figura 20**). De maneira similar, a estrutura do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ pode ser avaliada na presença de TFE (**Figura 20**). No entanto, a análise da estrutura secundária do

peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ na presença de micelas de n-OGP e de CTAB não foi possível, uma vez que o peptídeo não se mostrou solúvel sem a adição de DMSO.

O TFE é um álcool muito utilizado em estudos de enovelamento de proteínas por afetar fortemente sua estrutura tridimensional, promovendo o aumento das populações de hélice. Este efeito se deve ao fato do TFE agregar ao redor do peptídeo na mistura água-álcool, levando à formação de uma matriz que exclui a água de maneira parcial, promovendo interações locais que ordenariam a estrutura secundária do peptídeo, estabilizando-as (Roccatano *et al.*, 2002). As análises da estrutura do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ na presença de 50% de TFE em solução revelaram a presença de dois picos negativos em 208 e 222 nm, e um pico positivo próximo de 190 nm, evidenciando a presença de estrutura em α -hélice. O espectro na presença de 100% de TFE em solução apresenta perfil similar, entretanto, de maior intensidade, sugerindo a maior estabilização da estrutura em α -hélice.

As análises da estrutura do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ na presença de concentrações micelares de SDS revelaram a presença de dois picos negativos em 208 e 222 nm, e um pico positivo próximo de 190 nm; no entanto, os picos negativos mostraram menor definição, sugerindo a presença de mais de uma estrutura no peptídeo no ambiente micelar.

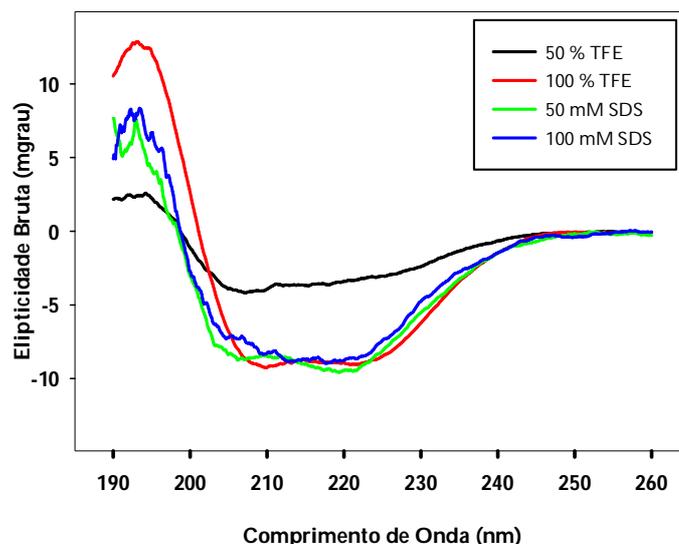


Figura 20: Análise estrutural do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅. Espectros de dicroísmo circular na presença de 50% ou 100% do álcool indutor de hélice TFE e na presença de 50 mM e 100 mM do detergente aniônico SDS, em tampão Fosfato de sódio 20 mM pH 7,4. A concentração de peptídeo foi de 200 μ M.

A quantificação da estrutura secundária apresentada pelo peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ foi possível através da desconvolução dos espectros de CD, utilizando os programas SELCON, CONTIN e CDSSTR (**Figura 21**).

A análise do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ na presença de 50% de TFE (**Figura 21A**) mostrou a presença de estrutura majoritariamente desordenada, o que sugere que o peptídeo não apresenta estrutura ordenada quando livre em solução. Entretanto, o espectro do HCV₄₂₁₋₄₄₅ em 100% de TFE (**Figura 21A**) altera o conteúdo de estrutura secundária, havendo a presença majoritária de α -hélice. Já a análise em 50 mM ou 100 mM de SDS (**Figura 21B**) revelou a presença de diversos tipos de estrutura secundária. Uma vez que o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ apresenta apenas 25 resíduos, torna-se difícil acreditar que voltas, hélices e fitas- β estejam presentes. Sendo assim, tal resultado apenas sugere uma maior mistura de estruturas no peptídeo no ambiente micelar, sem, no entanto revelar que estruturas estariam presentes.

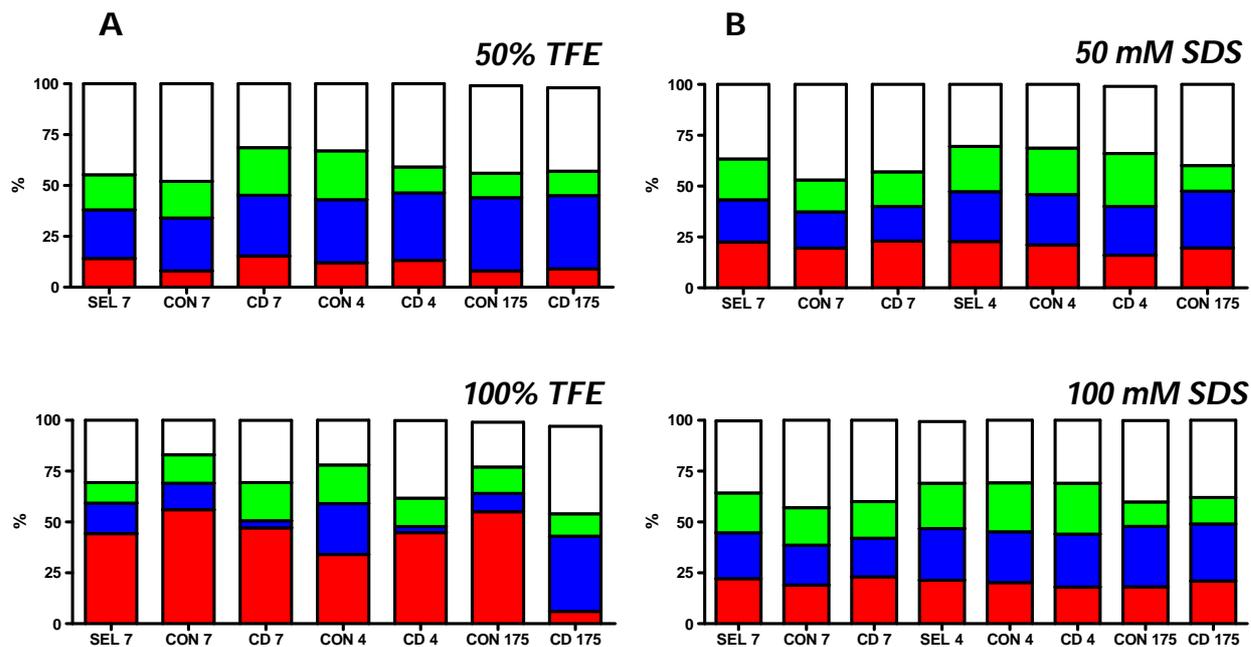


Figura 21: Quantificação da estrutura do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅. A desconvolução dos espectros de dicroísmo circular foi realizada utilizando os programas SELCON, CONTIN e CDSSTR, com no mínimo dois conjuntos de proteínas referência. **(A)** Porcentagem de estrutura secundária apresentada pelo peptídeo na presença do álcool TFE. **(B)** Porcentagem de estrutura secundária apresentada pelo peptídeo na presença de micelas de SDS. A porcentagem de estrutura em α -hélice está representada em vermelho, a de estrutura em folha- β em azul, a de voltas em verde e a estrutura desordenada está representada em branco.

A técnica de ressonância magnética nuclear em solução provê um grande número de restrições geométricas sítio-específicas essenciais para a determinação de estruturas tridimensionais, sendo muito utilizada na caracterização de peptídeos de fusão (Jaroniec *et al.*, 2005). Diversos peptídeos pequenos são tipicamente desordenados em solução, porém, podem tornar-se estruturados devido à interação com outras moléculas dissolvidas em água que mimetizam seu ambiente natural. Mudanças do ambiente químico de um núcleo na interface de ligação de um complexo proteína-ligante induzem mudanças no deslocamento químico do núcleo em questão, indicando assim seu papel na interação (Westermann & Craik, 2008).

O momento magnético dos núcleos individuais interage com pequenos campos magnéticos criados pelo spin do núcleo da vizinhança. Estas interações

entre os spins, que podem ser diretas, via espaço, ou indiretas, via ligações, podem ser utilizadas para correlacionar diferentes núcleos presentes em uma molécula (Wider, 2000).

O espectro de proteínas é baseado nas correlações através do espaço ou através de ligações químicas. As interações através de ligações químicas agrupam sistemas de spin individuais que são utilizados para a análise do espectro. Uma vez que em proteínas acoplamentos através de mais de três ligações químicas são muito pequenos para serem observados, apenas spins dentro de um mesmo resíduo de aminoácido podem ser obtidos no espectro de hidrogênios. As correlações através do espaço, por sua vez, fornecem informações geométricas necessárias para a determinação da estrutura de macromoléculas. Tais correlações são medidas através de NOEs (Wider, 2000).

Através da combinação de espectros bidimensionais é possível assinalar a maioria dos sinais de hidrogênios observados, por RMN, em pequenas proteínas não marcadas (com massas menores de 10 kDa). O TOCSY detecta as interações entre as ligações químicas e correlaciona hidrogênios separados por no máximo três ligações químicas, possibilitando a correlação dos hidrogênios dentro de um mesmo aminoácido, embora aminoácidos vizinhos na sequência polipeptídica não possam ser conectados. Após a completa análise do espectro de TOCSY é possível visualizar todos os sistemas de spin de todos os aminoácidos em uma proteína. Entretanto, como um aminoácido pode ocorrer mais de uma vez em uma mesma cadeia polipeptídica, o assinalamento de acordo com a sequência-específica não é possível. Sendo assim, é necessária a interpretação do espectro de NOESY (Wider, 2000).

As ressonâncias no espectro de NOESY manifestam pequenas distâncias entre pares de hidrogênios, que podem ser correlacionadas entre átomos vizinhos, possibilitando que os sistemas de spin sejam colocados na ordem sequencial adequada (Wider, 2000).

Sendo assim, a estrutura secundária do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ pode ser avaliada através das correlações dentro dos espectros de TOCSY e NOESY, quando na ausência (**Figura 22**) ou presença de micelas de SDS (**Figura 23A**) e DPC (**Figura 23B**), para posterior assinalamento e obtenção de estrutura tridimensional.

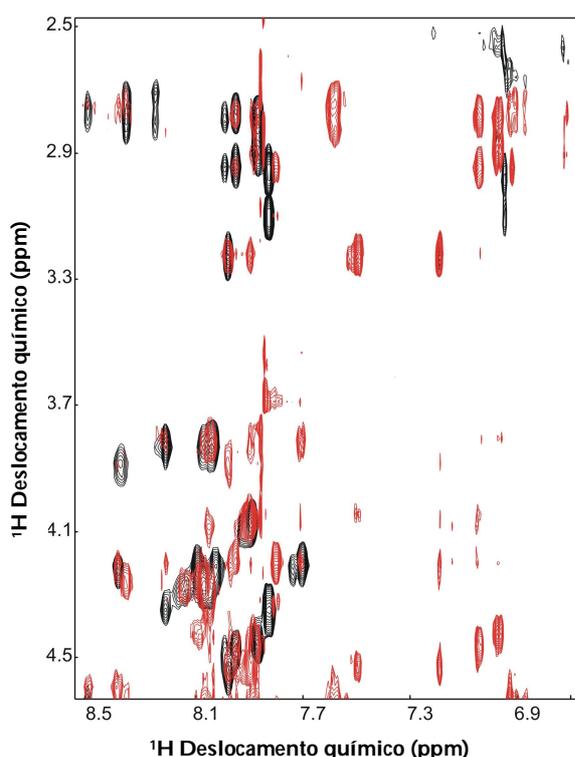


Figura 22: Espectros de TOCSY e NOESY do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ livre em solução. Espectro das regiões amídica do peptídeo. Em preto, estão representadas as ressonâncias pertencentes ao espectro de TOCSY, enquanto em vermelho, estão representadas as pertencentes ao espectro de NOESY.

A flexibilidade do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ é evidenciada pela ausência de NOEs (**Figura 22**) e a análise geral dos espectros do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ livre indicou a presença de alguns resíduos experimentando o mesmo ambiente químico, o que

pode estar relacionado com regiões desestruturadas do peptídeo. Não foi possível observar um grande número de restrições no NOESY e NOEs de longa distância, sendo observado, em sua maioria NOEs intra-resíduos ou inter-resíduos sequencial, o que não gera informação estrutural tridimensional.

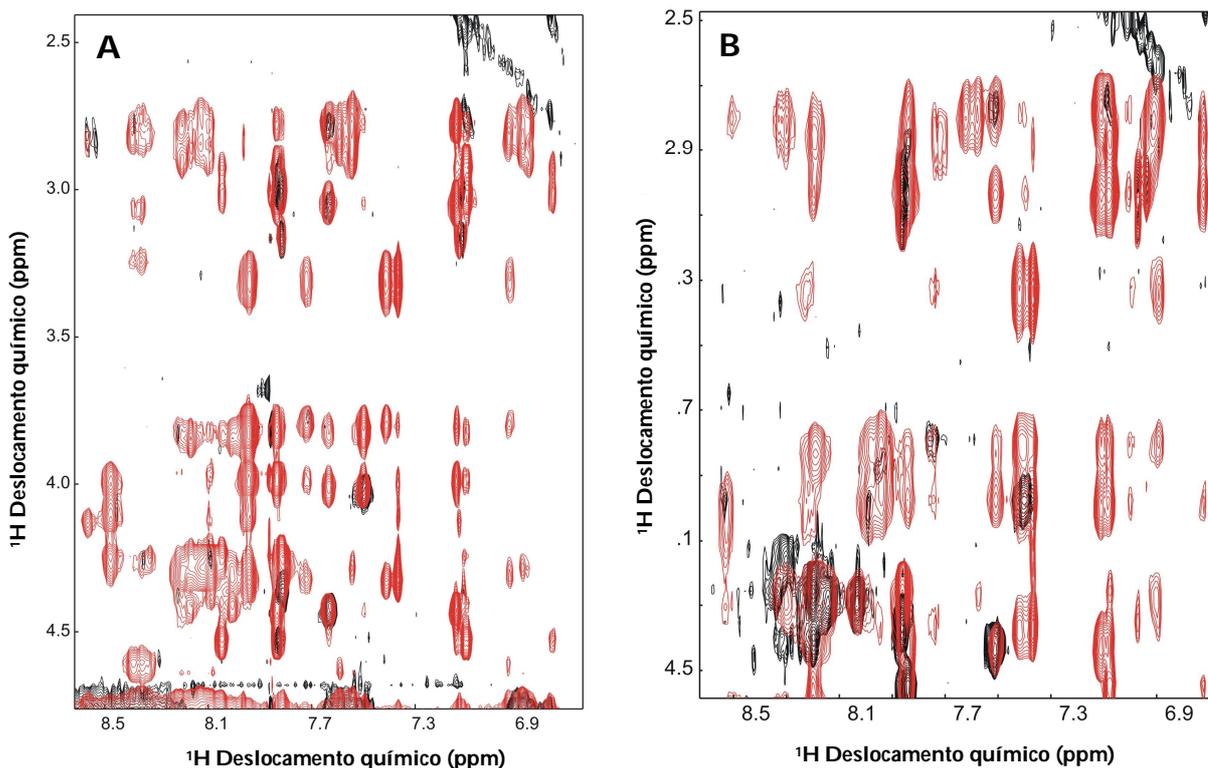


Figura 23: Espectros de TOCSY e NOESY do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ na presença de micelas. (A) Espectro das regiões amídica do peptídeo na presença de micelas de SDS. **(B)** Espectro das regiões amídica do peptídeo na presença de micelas de DPC. Em ambos os quadrantes, em preto, estão representadas as ressonâncias pertencentes ao espectro de TOCSY, enquanto em vermelho, estão representadas as pertencentes ao espectro de NOESY.

No entanto, na presença de micelas de SDS (**Figuras 23A e C**) e DPC (**Figuras 23B e D**) é possível observar um grande número de NOEs gerando assim restrições importantes para o cálculo. Além deste dado importante, a região amídica e aromática evidencia vários NOEs que são indicativos de estrutura em α -hélice (**Figura 24**), sugerindo o ganho estrutural na presença de micelas de SDS e DPC, sendo possível, ainda notar pequenas diferenças pontuais entre os dois espectros.

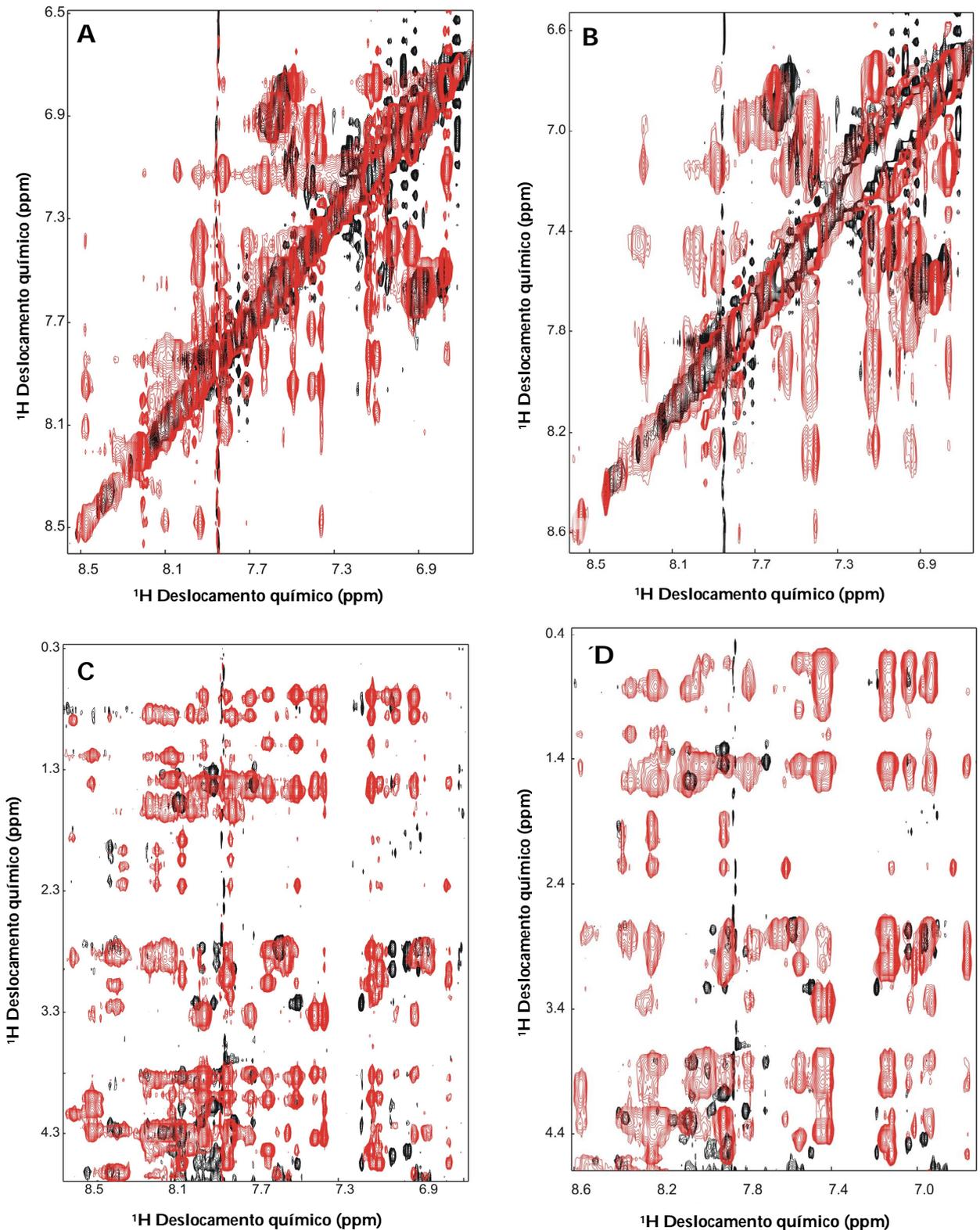


Figura 24: Análise da região amídica do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ na ausência e na presença de micelas de SDS e DPC. (A e C) Espectros de NOESY de diferentes porções do espectro referentes à região amídica do peptídeo na ausência de micelas (preto) e na presença de micelas de SDS (vermelho). **(B e D)** Espectros de NOESY de diferentes porções do espectro referentes à região amídica do peptídeo na ausência de micelas (preto) e na presença de micelas de DPC (vermelho).

4.6 Análise da Interação Peptídeo-Membrana

Muitos processos biológicos importantes envolvem a partição de segmentos de proteínas hidrofóbicos dentro de membranas lipídicas. Diversos peptídeos anfifílicos apresentam grande afinidade por bicamadas lipídicas, entretanto, apenas algumas sequências específicas são capazes de induzir a fusão de membranas (Ulrich, 1999).

Os peptídeos de fusão virais derivados de vírus envelopados são bastante hidrofóbicos, apresentam alta propensão à auto-agregação e capacitam as glicoproteínas de fusão a romperem e conectarem duas membranas biológicas próximas, resultando na fusão de membranas (Tamm & Han, 2000). A agregação de membranas lipídicas é essencial no processo de fusão de membranas nos sistemas vivos, sendo seguida pelos processos de hemifusão e de fusão completa (Cummings & Vanderlick, 2007).

A fosfatidilcolina (PC), é o principal componente das células em mamíferos e das lipoproteínas circulantes, participando ativamente da estrutura e do transporte através de membranas. Já o fosfatidilglicerol (PG) é um lipídio aniônico componente integral de membranas biológicas, sendo crucial na associação de proteínas ou peptídeos com membranas, através de interações eletrostáticas entre as cabeças polares dos lipídios com os resíduos carregados do peptídeo, ou através da repulsão eletrostática envolvida na inserção regulada pelo pH (Chenal *et al.*, 2002).

A agregação facilitada pelo peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ pode ser monitorada por medidas de turbidez apresentadas por soluções contendo uma suspensão de diversos lipídios na presença de diferentes proporções de peptídeo (**Figura 25**). O peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ não se mostrou capaz de induzir a agregação de vesículas de

fosfatidilcolina em nenhum dos valores de pH analisados (**Figura 25A**). Entretanto, na presença de lipídios aniônicos (PG), o peptídeo se mostrou capaz de induzir a agregação apenas quando em pH 5,5 (**Figura 25A**). As análises de supressão de fluorescência (**Figura 25B**) mostraram que os Trps presentes no peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ encontram-se protegidos do solvente quando na presença de vesículas compostas pela mistura PC:PG (1:1), onde o pH ácido parece fornecer maior proteção. Os valores de K_{sv} encontrados na presença de vesículas de PC:PG (1:1) foram: 13,01 M⁻¹ e 11,72 M⁻¹, nos pH 7,4 e 5,5 respectivamente. Entretanto, a acessibilidade da acrilamida mostrou-se mais reduzida quando o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ encontrava-se na presença de vesículas constituídas de PG, onde os valores de K_{sv} encontrados foram de 3,2 M⁻¹ e 5,49 M⁻¹, nos valores de pH 7,4 e 5,5 respectivamente. A interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ com vesículas de PC apenas não ofereceu proteção dos triptofanos à acrilamida (dados não mostrados).

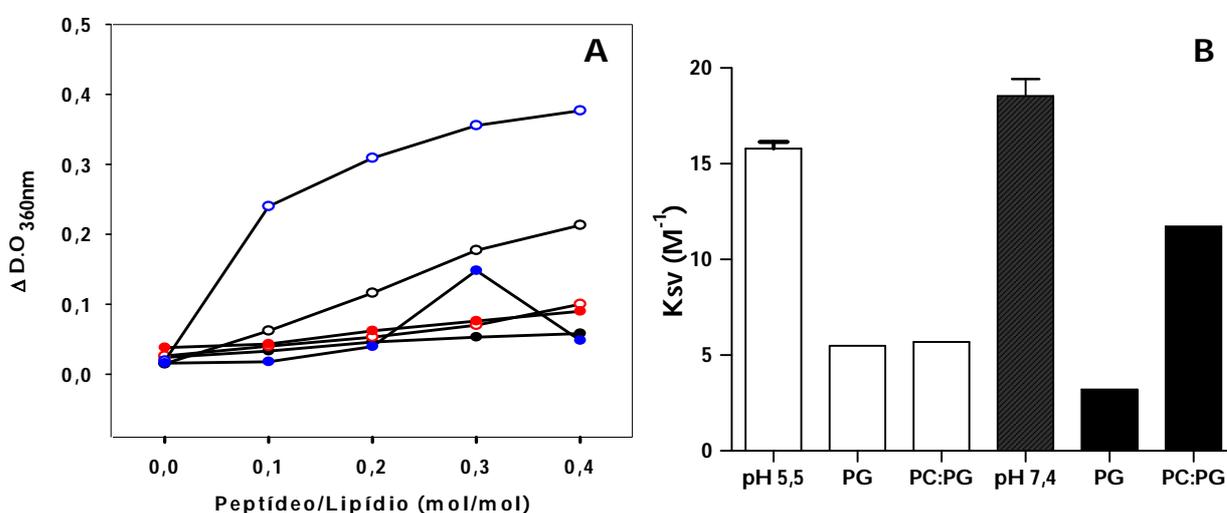


Figura 25: Agregação e interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ com vesículas fosfolipídicas.

(A) A densidade óptica a 360 nm ($\Delta D.O._{360\text{ nm}}$) foi medida 30 minutos após a incubação das vesículas fosfolipídicas, em tampão Fosfato de sódio pH 7,4 (círculos fechados) ou pH 5,5 (círculos abertos), com alíquotas de peptídeo. Vesículas de fosfatidilcolina (PC) estão mostradas em vermelho, de fosfatidilglicerol (PG) em azul, e vesículas formadas por PC:PG (1:1) estão mostradas em preto. (B) A supressão de fluorescência por acrilamida foi avaliada utilizando a constante de Stern-Volmer, como descrito na figura 16. Os experimentos foram realizados a 37 °C.

5- Discussão

A família *Flaviviridae*, uma grande família de patógenos virais responsáveis por causar doenças severas e mortais entre homens e animais (Lindenbach & Rice, 2007), engloba o vírus da Hepatite C, que já infectou cerca de 3% da população mundial e leva a cerca de 50.000 mortes anuais. Na maioria das infecções, o HCV gera uma doença crônica, onde as medidas atuais de combate à doença são caras, limitadas, e com grandes efeitos colaterais. Apesar da descoberta do vírus há mais de 15 anos, o conhecimento sobre a biologia estrutural do mesmo e sobre as respostas imunes protetoras é limitado (Mihailova *et al.*, 2007).

O primeiro passo para que se produza a infecção viral em uma célula consiste na interação das proteínas estruturais do vírus com receptores de membrana específicos. Após esta interação, o vírus pode entrar na célula através da fusão direta com a membrana viral ou através de endocitose. A entrada dos vírus envelopados na célula é mediada por glicoproteínas virais específicas capazes de interagir com a membrana celular, modificando sua conformação, expondo o peptídeo de fusão (Weissenhorn *et al.*, 1999), que fornece ao sistema a energia necessária para que haja a mistura das bicamadas lipídicas, levando à consequente hemifusão e fusão (Colman & Lawrence, 2003; Earp *et al.*, 2005; Martens & McMahon, 2008).

A localização do peptídeo de fusão dos *hepacivírus*, mais especificamente do Vírus da Hepatite C ainda se mostra bastante controversa, e embora inicialmente tenha sido proposto que o peptídeo de fusão se encontrava na glicoproteína E1 (Flint *et al.*, 1999), atualmente acredita-se que diferentes regiões membranotrópicas das glicoproteínas E1 e E2 poderiam auxiliar o processo de fusão.

A glicoproteína E1 apresenta três regiões membranotrópicas: 265-296, 310-348 e 349-381 (Pérez-Berná *et al.*, 2008), onde a primeira região representaria o

peptídeo de fusão classicamente descrito (Garry & Dash, 2003), apesar desta sequência não apresentar grande homologia com os peptídeos de fusão dos *flavivírus* e dos *alfavírus*, uma vez que incorpora elementos característicos dos peptídeos de fusão classe II (Drummer *et al.*, 2007). A segunda região membranotrópica encontra-se adjacente ao domínio transmembranar que configura a terceira região (Pérez-Berná *et al.*, 2008).

A glicoproteína E2, por sua vez, apresenta regiões capazes de promover hemifusão, fusão e extravasamento: 423-453, 525-565, 603-635 e 715-746 (Pérez-Berná *et al.*, 2008). A primeira região apresenta o motivo GLF altamente conservado em proteínas de fusão, e é a região da E2 candidata a conter o peptídeo de fusão. As regiões adjacentes a ela estariam envolvidas na ligação a receptor e no enovelamento da glicoproteína E2, e a última região corresponde ao domínio C-terminal transmembranar (Pérez-Berná *et al.*, 2006).

Devido à localização controversa do peptídeo de fusão, a caracterização estrutural destas regiões membranotrópicas, bem como a obtenção de parâmetros termodinâmicos envolvidos na ligação de tais regiões a modelos de membrana são de grande valia para o entendimento e caracterização dos mecanismos de entrada do HCV nas células.

Não só para o HCV, como também para diversos outros vírus, existe uma leve discordância sobre que região da proteína de fusão corresponde ao peptídeo de fusão. Sendo assim, existe um número de critérios que caracterizam o segmento do peptídeo de fusão, e, embora nenhum destes critérios seja absoluto em defini-lo, em combinação são suficientemente restritivos para identificar tal segmento. Os peptídeos de fusão geralmente são hidrofóbicos, ricos em alaninas, glicinas, leucinas, isoleucinas, e resíduos aromáticos, podendo ainda apresentar motivos

conservados dentre diversos peptídeos de fusão virais. Através da análise da sequência de aminoácidos da glicoproteína E2 do Vírus da Hepatite C e de estudos prévios descritos na literatura acerca de sua capacidade fusogênica, a região $^{421}\text{HINSTALNCNESLNTGWLAGLFYQH}^{445}$ foi analisada estruturalmente, e a termodinâmica de sua ligação a modelos biomiméticos de membrana foi estudada.

A sequência do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ consiste de um intervalo de 25 resíduos de aminoácido, e apresenta apenas um resíduo carregado negativamente (Glu431). Uma vez que a inserção de peptídeos de fusão em membranas pode ser determinada através do monitoramento de mudanças na fluorescência intrínseca de aminoácidos aromáticos presentes na sequência do peptídeo (Pécheur *et al.*, 1999), os aminoácidos aromáticos Trp437, Phe442 e Tyr443 mostraram-se importantes para o presente estudo.

Ao menos em teoria, uma vez que as cargas presentes na vizinhança, as ligações de hidrogênio e a solvatação determinam o pKa aparente dos aminoácidos e mudanças na vizinhança de tais resíduos podem levar a alterações do pKa, o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ exibe carga -1 em pH neutro. Entretanto, em pH abaixo de 6, o peptídeo apresentaria carga +1, devido à provável protonação das His421 e His445.

Este candidato a peptídeo de fusão do HCV apresenta, portanto, características comuns aos peptídeos de fusão virais, como a carga negativa e a presença de alaninas, glicinas, leucinas, isoleucinas, cisteínas, triptofano e fenilalanina, totalizando mais de 40% dos resíduos presentes nesta sequência. Além disso, apresenta o motivo GLF altamente conservado em proteínas de fusão, bem como duas histidinas que podem apresentar um papel importante como sensores do pH.

A interação inicial entre peptídeos de fusão e membranas envolve a partição do oligopeptídeo na interface de membrana, promovendo a formação de estrutura secundária. A identificação de regiões hidrofóbicas baseada na sequência de aminoácidos e nas escalas de hidrofobicidade, que representam a afinidade relativa dos aminoácidos por fases hidrofóbicas, possibilita um maior entendimento e uma descrição quantitativa da partição do peptídeo e também de seu enovelamento.

A escala de Kyte & Doolittle, baseada no cálculo da hidrofobicidade média e no momento hidrofóbico, permite avaliar a hidrofobicidade de um peptídeo/proteína a partir de sua sequência de aminoácidos. Esta escala utiliza as energias livres de transferência água-vapor e a distribuição interior-exterior das cadeias laterais dos aminoácidos, determinados por Chothia (1976) (Kyte & Doolittle, 1982). A identificação das regiões hidrofóbicas presentes no peptídeo de fusão foi avaliada através desta escala (dados não mostrados), possibilitando a identificação de duas regiões hidrofóbicas. Através da utilização da escala de hidrofobicidade de Wimley e White, que reflete a capacidade de partição de sequências peptídicas em membranas (Wimley & White, 1996), foi possível notar que as duas regiões hidrofóbicas compreendidas na sequência de aminoácidos do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ apresentam capacidade de particionar em membranas. As duas regiões hidrofóbicas compreendem a porção C-terminal (resíduos 436 a 444) e abrigam não só os três aminoácidos aromáticos como também resíduos que conferem plasticidade à sequência, além do motivo GLF, comum a peptídeos de fusão, sugerindo que esta região poderia estar diretamente envolvida no processo de fusão do peptídeo com membranas, sendo responsável pela interação com bicamadas lipídicas.

Uma vez que o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ mostrou propensão de particionar em membranas, sistemas micelares foram utilizados para a caracterização da interação

peptídeo-membrana. As micelas são agregados, normalmente esféricos, de detergentes, capazes de mimetizar membranas (Wymore & Wong, 1999). Inicialmente, foram empregadas micelas aniônicas para a análise da interação peptídeo-micela, através de espectroscopia de fluorescência. A escolha de micelas aniônicas se deu devido ao fato da membrana plasmática de células hepáticas, que são o alvo do Vírus da Hepatite C, apresentar muitos lipídios carregados negativamente (Jain & Wagner, 1980).

As análises espectroscópicas de fluorescência intrínseca do triptofano, resíduo muito sensível às variações de polaridade do meio em que se encontra, em pH neutro, revelaram que o pico do comprimento de onda de emissão é desviado cerca de 20 nm, indicando uma mudança do ambiente do Trp, que passa de completamente exposto à água em tampão, a parcialmente escondido, sugerindo a partição do Trp no ambiente hidrofóbico fornecido pelas micelas ou uma reestruturação conformacional do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ nesta condição. É possível verificar, ainda, que o máximo desvio de centro de massa só é alcançado em concentrações próximas à CMC do SDS, sugerindo que a interação peptídeo-monômero é prejudicada pela repulsão que ocorre entre o peptídeo e as cabeças polares do detergente, ambos carregados negativamente. A titulação do peptídeo em baixíssimas concentrações de SDS, inferiores a 100 μ M, leva à agregação do peptídeo (dados não mostrados). Entretanto, na faixa de concentração correspondente à formação de micelas, o desvio do centro de massa espectral alcança seu máximo.

Recentemente, o papel das histidinas como sensores de pH tem sido descrito no processo de fusão dos flavivírus (Stiasny *et al.*, 2009). O HCV entra nas células por endocitose e a fusão é disparada em valores de pH em torno de 6,3, sendo o pH

ótimo descrito como 5,5, e a histidina é o único resíduo de aminoácido cujo estado protonado muda próximo a este pH. O peptídeo membranotrópico HCV₄₂₁₋₄₄₅ utilizado no presente estudo possui duas histidinas, uma em cada extremidade, responsáveis por uma mudança da carga adotada pelo peptídeo no pH neutro e no pH ácido, passando de -1 a +1, respectivamente. Sendo assim, as análises espectroscópicas foram realizadas também em pH ácido (5,5) e revelaram que, da mesma forma que ocorre em pH 7,4, há uma mudança do ambiente do Trp, de exposto a parcialmente escondido, sugerindo a partição do Trp no ambiente hidrofóbico fornecido pelas micelas ou uma re-estruturação conformacional do peptídeo também nesta condição. A interação peptídeo-monômero se dá em concentrações abaixo da CMC do SDS, confirmando a mudança de carga do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅, capaz de diminuir e até mesmo acabar com a repulsão entre o peptídeo e as cabeças polares do detergente. A interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ com as micelas parece ocorrer de maneira similar a em pH neutro.

A necessidade de interações eletrostáticas para que a interação com micelas de SDS possa ocorrer pode ser analisada através da adição de concentrações crescentes de sal. Cabe aqui ressaltar que a CMC do SDS é dependente de sal, sendo em 10 mM de NaCl de 3,5 mM, e em 100 mM de NaCl de 1,4 mM (piercenet.com). As concentrações de 100, 200 e 250 mM de NaCl foram adicionadas ao sistema (dados não mostrados), entretanto, ainda assim a interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ com as micelas foi possível, atingindo desvio de centro de massa semelhante ao apresentado na ausência de sal, cerca de 800 cm⁻¹.

A interação peptídeo-micela foi ainda avaliada na presença do detergente não iônico n-OGP, na tentativa de elucidar a necessidade da carga presente na cabeça polar das micelas para que a interação possa ocorrer; em presença do detergente

catiônico CTAB, uma vez que a carga global do peptídeo é -1, quando em pH neutro, devido à presença da Glu243; e em presença do detergente zwitteriônico DPC, devido à sua semelhança com o fosfolípido fosfatidilcolina. Em todos os casos, o mesmo desvio do espectro, cerca de 20 nm para comprimentos de onda menores foi observado, sugerindo, que de maneira similar ao que ocorre na presença de micelas de SDS, o Trp presente no peptídeo encontra-se particionado no ambiente hidrofóbico fornecido pela micela. A interação com micelas se mostrou independente do pH.

As análises de centro de massa espectral, em relação à interação com micelas, revelaram que o máximo de desvio de centro de massa é alcançado em concentrações abaixo da CMC no caso dos detergentes n-OGP e CTAB. Entretanto, apesar de um desvio significativo de centro de massa ser alcançado nesta condição para o detergente DPC, o máximo de desvio alcançado, é um pouco menor (cerca de 700 cm^{-1}) que o apresentado quando o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ está na presença de micelas de SDS, sendo apenas alcançado em uma concentração cerca de três vezes acima da CMC.

Já as análises de centro de massa espectral, em relação à interação com monômeros, revelaram que o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ demonstra uma certa necessidade de cargas, uma vez que os desvios de centro de massa significativos só são alcançados em concentrações altas de n-OGP, e o máximo de desvio só é alcançado em concentrações próximas à CMC deste detergente. Esta interação se mostrou independente do pH no caso dos monômeros de n-OGP. Já a interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ com monômeros de CTAB necessita de cerca de cinco vezes mais monômeros para ocorrer em pH ácido, corroborando que ocorre a protonação das histidinas H421 e H445 neste pH, o que alteraria a carga global do peptídeo,

que passaria de -1 a +1, aumentando a repulsão entre o peptídeo e as cabeças polares do CTAB, de maneira semelhante ao que ocorre na interação peptídeo-monômeros de SDS em pH neutro.

O desvio do espectro de Trp para a faixa de comprimento de onda do azul na presença de micelas indica que este aminoácido está inserido na micela. Esta inserção pode ser acessada de maneira mais direta através de estudos de supressão de fluorescência por acrilamida. A partir da análise da supressão de fluorescência em concentrações crescentes de acrilamida obtêm-se os gráficos de Stern-Volmer, que possibilitam avaliar a acessibilidade dos resíduos de Trp ao solvente, onde uma maior inclinação da reta indica que os resíduos de Trp estão mais expostos ao solvente, enquanto uma menor inclinação indica que o Trp está mais protegido da acrilamida. O grau de supressão pode ainda ser quantificado a partir dos valores da constante de Stern-Volmer, obtida a partir da angulação da reta apresentada no gráfico de Stern-Volmer. Em solução, o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ apresentou um valor de Ksv de 16,46 M⁻¹ em pH 7,4 e de 15,6 M⁻¹ em pH 5,5. Embora triptofanos livres em solução apresentem Ksv de aproximadamente 21 M⁻¹ (Tallmadge *et al.*, 1989, Esbjörner *et al.*, 2007), os valores de Ksv obtidos são condizentes com valores obtidos para triptofanos, presentes em uma cadeia peptídica, bastante expostos ao solvente. Cabe ainda ressaltar que não houve uma diferença significativa em relação à exposição do Trp nos dois valores de pH analisados.

O valor do Ksv encontrado para o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ em tampão é comparável ao obtido para outros pequenos peptídeos, que variam de 12 a 17 M⁻¹ (Breukink *et al.*, 1998). O Ksv encontrado é comparável ainda ao obtido para outros peptídeos de fusão virais, sendo o valor encontrado para o peptídeo de fusão do

vírus Ebola (EBO₁₆) de 15,8 M⁻¹, (Freitas *et al.*, 2007); para o peptídeo de fusão do Vírus da Dengue – DENV (Fla_G) de 12,7 M⁻¹ (pH 7,4) e 12,13 M⁻¹ (pH 5,5) (Mendes, 2009); e para o peptídeo do Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapatos - TBEV (Fla_H) de 14,95 M⁻¹ (pH 7,4) e 16,17 M⁻¹ (pH 5,5) (Mendes, 2009).

A acessibilidade dos resíduos de Trp à acrilamida, quando na presença de micelas aniônicas de SDS, não-iônicas de n-OGP, catiônicas de CTAB e zwitteriônicas de DPC, mostrou-se similar. A adição de micelas de SDS reduz o valor da constante para 10,9 M⁻¹ em pH 7,4 e 10,4 M⁻¹ em pH 5,5, de maneira semelhante ao que ocorre devido à exposição do EBO₁₆ a micelas de SDS (10,2 M⁻¹), sugerindo que o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ apresenta uma mudança estrutural quando no ambiente micelar. Esta redução mostrou-se independente de pH e maior que a que ocorre para os peptídeos Fla_G (11,76 M⁻¹ e 12,13 M⁻¹, no pH 7,4 e 5,5 respectivamente) e Fla_H (12,23 M⁻¹ e 11,75 M⁻¹, nos pH 7,4 e 5,5 respectivamente), indicando uma maior proteção do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ em relação ao solvente devido ao ambiente micelar. Na presença de micelas de DPC a redução da constante foi um pouco menor, sendo o K_{sv} encontrado de 11,97 M⁻¹ e 12,26 M⁻¹, nos pH 7,4 e 5,5 respectivamente. Na presença de micelas de CTAB, o K_{sv} encontrado foi de 8,9 M⁻¹, bastante similar ao K_{sv} encontrado na presença de micelas de n-OGP em pH 7,4, que foi de 9,1 M⁻¹. No pH 5,5, no entanto, o K_{sv} obtido na presença de micelas de n-OGP foi de 5,8 M⁻¹, demonstrando um comportamento semelhante ao peptídeo de fusão do TBEV, que apresentou uma maior redução do valor de K_{sv} quando na presença de micelas de n-OGP em pH 5,5 (11,72 M⁻¹) (Mendes, 2009).

Juntos estes resultados indicam que a interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ pode ocorrer com micelas e monômeros, sendo parcialmente dependente de cargas neste último. Diferente do que ocorre para o peptídeo de fusão dos vírus da Dengue e

TBEV (Mendes, 2009), a associação à membrana não parece ser dependente de cargas e tenderia a ocorrer de maneira similar, independente da micela utilizada, sempre envolvendo o ambiente do Trp.

A interação do peptídeo com modelos de membrana lipídica pode ser dividida em três passos termodinâmicos: (1) ligação induzida por atrações eletrostáticas, levando a um aumento significativo da concentração do peptídeo próximo à superfície da membrana; (2) transição do peptídeo para o plano de ligação, de maneira dependente do balanço hidrofóbico/hidrofílico dos grupos moleculares e forças envolvidas; (3) mudança da conformação do peptídeo ligado, onde muitas vezes o peptídeo passa de uma conformação desordenada para uma conformação em α -hélice (Seelig, 2004).

Visando à melhor compreensão da interação peptídeo-micela de SDS, foi realizada a análise calorimétrica da titulação do peptídeo em excesso de micelas, em diferentes temperaturas, possibilitando a obtenção dos parâmetros termodinâmicos desta interação. A termodinâmica da interação peptídeo-micela depende não só da natureza química do detergente, mas, também, de sua dinâmica na formação de micelas, do mecanismo e da natureza do processo de interação, onde as forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio desempenham papéis igualmente importantes, e das mudanças conformacionais adotadas pelo peptídeo.

Através dos perfis calorimétricos é possível obter parâmetros como a entalpia e a entropia, permitindo compreender como as membranas podem ser convertidas a intermediários de alta energia durante a fusão, energia esta fornecida pela inserção de peptídeos de fusão em bicamadas lipídicas (Li *et al.*, 2003). Cabe ressaltar que o calor envolvido no processo de desestabilização das micelas, promovido pela

ligação dos peptídeos, contribui para os valores de calor obtidos a partir da interação peptídeo/micela. Os perfis de calor obtidos são, inclusive, muito similares ao calor de desmicelização nas diferentes temperaturas analisadas (dados não mostrados), o que explica os valores de entalpia de ligação extremamente elevados.

A adição do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ às micelas de SDS, a 37 °C levou a um aumento transiente do fluxo de calor em pH 7,4, indicando se tratar de uma reação endotérmica. Quando variamos a temperatura, a reação que era endotérmica, a 37 e 25 °C, passou a ser exotérmica, a 15 °C. Pequenas variações foram observadas para o pH 5,5, onde a reação mostrou-se exotérmica também a 25 °C. Estas mudanças observadas na entalpia são provenientes, principalmente, das mudanças nas ligações de hidrogênio, ganho ou perda do número de ligações, cuja magnitude depende ainda do ângulo e do comprimento das ligações (Holdgate & Ward, 2005). A capacidade calorífica, obtida através da variação da entalpia em função da temperatura, foi positiva, indicando a prevalência de interações não-hidrofóbicas (Cooper, 2000). Interações não covalentes envolvendo macromoléculas frequentemente envolvem grandes mudanças na capacidade calorífica do sistema.

Já a interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ com micelas de n-OGP, em qualquer uma das temperaturas avaliadas, e em ambos os valores de pH, foi exotérmica, sugerindo que embora a interação entre o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ e micelas de SDS, e micelas de n-OGP seja similar na região próxima ao Trp, e envolvam predominantemente interações não-hidrofóbicas, a termodinâmica destas interações são diferentes.

As variações de capacidade calorífica mostraram-se expressivamente positivas, e isto pode ser devido a uma inserção parcial do peptídeo nas micelas, devido ao aumento do número de monômeros de detergente em solução ocasionada

pela perturbação do equilíbrio da micela, ou devido a mudanças na forma das micelas.

Os peptídeos Fla_G e Fla_H também são capazes de interagir com micelas de SDS e n-OGP de maneira diferenciada, apresentando um processo de ligação a micelas de SDS endotérmico, quando a 37 °C e exotérmico, quando a 25 e 15 °C. Por sua vez, quando estes peptídeos se encontram na presença de micelas de n-OGP, apresentam um processo de ligação exotérmico. Além disso, o ΔC_p também se mostrou expressivamente positivo, indicando o predomínio de interações não-hidrofóbicas (Mendes, 2009). Sendo assim, a termodinâmica que governa a interação dos peptídeos de fusão dos membros da família *Flaviviridae* se mostrou semelhante.

A fim de investigar as alterações estruturais do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ em micelas foram utilizados o dicroísmo circular e a ressonância magnética nuclear. Através da técnica de dicroísmo circular não foi possível determinar a estrutura do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ em solução, uma vez que o peptídeo, devido a seu caráter altamente hidrofóbico, necessita da adição de DMSO, que apresenta alta absorvância na faixa do espectro ultravioleta analisado no dicroísmo circular, para que sua solubilização seja possível. As análises de RMN, no entanto, sugerem uma alta flexibilidade do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ livre em solução, apesar de haver um baixo conteúdo de estrutura em hélice. De fato, diversos peptídeos são tipicamente desordenados em solução e apresentam grande plasticidade conformacional (Seelig, 2004). A ausência de uma estrutura ordenada quando em solução também foi observada em outros peptídeos de fusão, como o peptídeo do vírus Influenza (Han *et al.*, 2001), do vírus Ebola (Freitas *et al.*, 2007), do vírus da Dengue e do TBEV (Mendes, 2009).

Uma vez que o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ apresentou alguma propensão à formação de hélice, o álcool TFE foi utilizado nas análises de dicroísmo circular. Este solvente mimetiza um ambiente menos hidrofílico que a água, e geralmente induz a formação de hélice em peptídeos (Damberg *et al.*, 2001; Roccatano *et al.*, 2002). Os picos negativos em 208 e 222 nm e o pico positivo próximo de 190 nm sugerem a presença de estrutura em α -hélice já em 50% de TFE, estrutura essa que é estabilizada na presença de 100% de TFE, uma vez que, embora o perfil espectroscópico tenha sido similar, apresentou maior intensidade. Além disso, as análises de desconvolução do espectro através dos diversos algoritmos utilizados revelaram um maior conteúdo da estrutura em α -hélice, cerca de 41% da estrutura, quando na presença de 100% de TFE.

A presença de micelas de SDS, por sua vez, também levou à formação de estruturas em α -hélice, evidenciadas pelos picos negativos em 208 e 222 nm e positivo próximo a 190 nm. O estado conformacional helicoidal é semelhante ao observado na literatura para os vírus Influenza, HIV-1 e Ebola (Yang *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2007), e bem diferente daquele encontrado para os vírus da Dengue e TBEV, que adotam uma estrutura secundária não convencional, possivelmente adotando a forma de um grampo. No entanto, os picos negativos apresentaram menor definição, e a quantificação através dos algoritmos revelou a presença, em proporções bem similares, de diversas estruturas. De fato, resultados contraditórios já foram vistos para outros peptídeos de fusão virais. A proteína gp41 do vírus HIV-1 apresenta conteúdo em α -hélice e em folha- β de maneira dependente da razão peptídeo-lipídio, sugerindo a inserção inicial do peptídeo na membrana como monômeros helicoidais e ao atingir determinada concentração no ambiente de

membrana há um realinhamento na superfície que permite a oligomerização em estruturas de conformação- β (Reichert *et al.*, 2007).

Diversos grupos têm utilizado a ressonância magnética nuclear em solução para resolver a estrutura tridimensional de peptídeos de fusão ligados a micelas. Na ressonância magnética nuclear, normalmente, os sistemas de bicamadas lipídicas não são muito utilizados devido a sua alta massa (superior a 10^5 Da), o que ocasiona um movimento molecular lento, que por sua vez conduz a um alargamento das linhas de ressonância, dificultando ou mesmo impossibilitando a determinação da estrutura tridimensional de proteínas ligadas a tal estrutura, em solução. Sendo assim, as micelas de detergente, geralmente pequenas (10^4 Da), mostram-se como alternativa nos estudos da interação peptídeo-membrana e na determinação de estruturas tridimensionais, apresentando alta mobilidade, mesmo quando complexadas às proteínas ou peptídeo. As micelas provêm um ambiente hidrofóbico similar àquele oferecido pelas bicamadas lipídicas, promovendo uma estruturação similar à adotada pelo estado ligado a membrana.

Não só a estrutura dos peptídeos de fusão do vírus Influenza (Han *et al.*, 2001), HIV (Li & Tamm, 2007), Ebola (Freitas *et al.*, 2007), GBV-C (Mazzini *et al.*, 2007) e da Dengue (Melo *et al.*, 2009), como também de outros pequenos peptídeos, como o peptídeo anticoccidial PW2 (Tinoco *et al.*, 2007), já foram resolvidas através de RMN.

Sendo assim, a RMN foi utilizada na tentativa de elucidar o conteúdo de estrutura secundária presente no peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ livre em solução e na presença de micelas. A partir das análises entre os espectros de NOESY do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ livre e do peptídeo na presença de micelas de SDS é possível notar um enorme aumento do número de picos, que evidencia um maior número de

ligações via espaço dos átomos do peptídeo, indicando uma maior estruturação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ quando na presença de micelas de SDS. A análise na região amídica mostra o aparecimento de NOEs nesta região devido à interação entre os hidrogênios amídicos, indicando a estrutura em α -hélice.

O DPC também é muito utilizado na RMN e apresenta propriedades similares ao SDS, como a de formar pequenas micelas (Henry & Sykes, 1994). A partir das análises entre os espectros de NOESY do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ livre e do peptídeo na presença de micelas de DPC, também é possível notar um maior número de ligações via espaço dos átomos do peptídeo, indicando uma maior estruturação do mesmo. A análise na região amídica também indica a estrutura em α -hélice. Já as análises de NOESY do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ na presença de micelas de SDS e de micelas de DPC (dados não mostrados) sugerem que o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ adquire estrutura similar quando na presença destas micelas, apresentando apenas pequenas modificações pontuais na estrutura adotada. A estrutura helicoidal na presença de micelas de DPC já foi vista para o peptídeo do vírus Influenza (Han *et al.*, 2001).

De fato, a sequência que forma o candidato a peptídeo de fusão do HCV, HCV₄₂₁₋₄₄₅, apresenta uma propensão à formação de hélices, uma vez que análises de predição computacional de estrutura secundária, utilizando diferentes métodos, revelaram a formação de uma hélice compreendendo os resíduos próximos ao Trp, sendo composta pelos resíduos ⁴³¹ESLNTGWLGLF⁴⁴², segundo o Network Protein Sequence Analysis (Combet *et al.*, 2000), ou pelos resíduos ⁴³⁷WLAGLFYQ⁴⁴⁴, segundo o CLC Protein Workbench (www.clcbio.com). Entretanto, o potencial de um peptídeo assumir a conformação em α -hélice é geralmente mais alto em um ambiente hidrofóbico quando comparado ao ambiente aquoso, uma vez que as

moléculas de água desestabilizam as ligações de hidrogênio intramoleculares da hélice, explicando o fato de não ser possível observar tal estrutura quando o peptídeo está livre em solução.

Uma vez comprovada a interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ com micelas de diferentes detergentes, a habilidade do peptídeo de interagir com membranas foi avaliada. A etapa inicial do processo de fusão é composta pela agregação e a justaposição das membranas lipídicas viral e celular. A agregação de vesículas unilamelares grandes foi monitorada e revelou a capacidade do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ em promover a fusão de vesículas compostas somente de fosfatidilglicerol ou da mistura de fosfatidilglicerol e fosfatidilcolina, de maneira dependente de pH, não sendo capaz de induzir a agregação de vesículas de fosfatidilcolina em nenhum dos valores de pH analisados. Este resultado vai de encontro aos apresentados por Pacheco e colaboradores, 2006, onde a sequência correspondente aos resíduos ⁴³⁰NDSL⁴⁴⁹YTGWL⁴⁴⁹AGL⁴⁴⁹FLFY⁴⁴⁹HHK⁴⁴⁹FNS⁴⁴⁹ mostra-se capaz de promover a agregação de vesículas lipídicas constituídas apenas de fosfatidilcolina de maneira dependente de pH (Pacheco *et al.*, 2006). Ainda de acordo com Pacheco e colaboradores (2006), esta sequência em solução apresenta cerca de 50% de conteúdo de estrutura secundária em folha- β , e este conteúdo não é modificado na presença de fosfolipídios. Cabe aqui ressaltar que o peptídeo correspondente aos resíduos 430-449 difere do analisado nesta dissertação (resíduos 421-445), não só nos resíduos que compõem a sequência, como também na carga global apresentada pelos peptídeos que é de 0 e -1, em pH 7,4, e de +2 e +1, em pH 5,5, respectivamente, indicando que não só os resíduos como também a carga global do peptídeo podem influenciar nos padrões de interação com membranas e na estrutura secundária adotada por peptídeos sintéticos.

Em conclusão, o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ é capaz de desestabilizar membranas lipídicas contendo fosfatidilglicerol de maneira dependente de pH, bem como mostrou-se capaz de interagir com micelas de maneira independente da carga e de pH. Em solução, o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ apresenta baixo conteúdo de estrutura secundária, e ao interagir com micelas, adquire a conformação em hélice. Estes dados sugerem que esta região deve ser determinante para o processo fusogênico, apresentando papel importante na interação e desestabilização de membranas. Sendo assim, a região 421-445 estaria diretamente envolvida nos mecanismos que possibilitam a entrada do HCV na célula, podendo realmente atuar como o peptídeo de fusão, corroborando a ideia de que ambas as glicoproteínas E1 e E2 estariam envolvidas diretamente no mecanismo de entrada na célula, onde todas as regiões membranotrópicas descritas até o presente momento seriam excelentes alvos para intervenções terapêuticas.

6 – Conclusões

A partir dos estudos realizados obtivemos dados que nos levaram às seguintes conclusões:

O peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅:

- É capaz de interagir com micelas, sendo esta interação dirigida entalpicamente, envolvendo predominantemente interações não hidrofóbicas, e os resíduos de Trp;
- É capaz de induzir agregação de vesículas lipídicas apenas quando em pH ácido, de maneira dependente de concentração.
- Apresenta pouca ou nenhuma estrutura ordenada quando em solução, entretanto, a adição de TFE e micelas de SDS e DPC resultam em um ganho de estrutura em hélice;

Nossos resultados sugerem que o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ participa do processo de entrada do vírus da Hepatite C. Uma vez que, para se identificar fármacos que especificamente inibam etapas críticas no ciclo de infecção dos vírus, é necessário conhecer detalhes bioquímicos e caracterizar estruturalmente as proteínas virais essenciais neste processo, neste caso, as glicoproteínas de envelope, mais precisamente o seu peptídeo de fusão, o presente trabalho é de grande valia para a busca de novas alternativas na luta contra o vírus da Hepatite C.

7 – Perspectivas

- Assinalar toda a sequência do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ livre em solução e na presença de micelas, permitindo adquirir os parâmetros de restrição necessários para a obtenção da estrutura tridimensional deste peptídeo;
- Avaliar as mudanças na fase de membrana de vesículas compostas por diferentes lipídios, ocasionadas pela interação do peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅, através de calorimetria de varredura e ensaios espectroscópicos;
- Utilizando os parâmetros de restrição adquiridos por RMN, avaliar a interação do peptídeo com membranas, através de dinâmica molecular;
- Investigar a importância de determinados lipídios no mecanismo de fusão, através de microscopia de fluorescência;
- Avaliar as etapas envolvidas na oligomerização das glicoproteínas de envelope E1 e E2 do HCV, através de FCS, microscopia multifotônica e microscopia TIRF (microscopia de fluorescência por reflexão interna total);
- Avaliar se o peptídeo HCV₄₂₁₋₄₄₅ correspondente aos resíduos 421-445, bem como outros peptídeos membranotrópicos presentes nas glicoproteínas de fusão do HCV, são capazes de interagir, formando oligômeros;
- Utilizar pseudopartículas de HCV e plasmídeos capazes de estabelecer a infecção em sistemas celulares, no estudo dos mecanismos envolvidos na oligomerização das glicoproteínas e regiões de fusão na partícula viral íntegra.

8– Referências Bibliográficas

Abbott Diagnostics. **Hepatitis learning guide**. Disponível em www.abbottdiagnostics.co.uk. Acesso em 12 de abril de 2008.

Acrylamide @ 3Dchem.com. Disponível em <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=233>. Acesso em 27 de março de 2010.

AKARI, H.; IWASAKI, Y.; YOSHIDA, T.; IJIMA, S. Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n.1, p.53-57, jan.2009.

APPEL, N.; SCHALLER, T.; PENIN, F.; BARTENSCHLAGER. From structure to function: New insights into hepatitis C virus ARN replication. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.15, p.9833-9836, abril, 2006.

ARNOLD, T; LINKE, D. The use of detergents to purify membrane proteins. **Current Protocols in Protein Science**, capítulo 4: unidade 4.8.1-4.8.30, ago., 2008.

Avantis Polar Lipids. **Dodecylphosphocholine**. Disponível em http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=964&Itemid=191&catnumber=850336. Acesso em 27 de dezembro de 2009.

BACKOVIC, M.; JARDETZKY, T.S. Class III viral membrane fusion proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, n.2, p. 189-196, abril, 2009.

BACON, B.R.; MCHUTCHISON, J.G. Into the Light: Strategies for battling hepatitis C. **The American Journal of Managed Care**, suppl. 12, p. S319-326, dez.2007.

BAX, A.; DAVIS, D.G. Mlev 17 based two dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, v.65, n.2, p.355-360, 1985.

BIERZYŃSKI, A. Methods of peptide conformation studies. *Acta Biochimica Polonica*, v.48, n.4, p.1091-1099, 2001.

Bio world molecular tools and laboratory essentials (2007). Disponível em www.bio-world.com. Acesso em 20 de novembro de 2007.

BREUKINK, E.; VAN KRAAIJ, C.; VAN DALEN, A.; DEMEL, R.A.; SIEZEN, R.J., DE KRUIJFF, B.; KUIPERS, O.P. The orientation of nisin in membranes. **Biochemistry**, v.37, n.22, p.8153-8162, jun.1998.

BROWN, L.R. Use of fully deuterated micelles for conformational studies of membrane protein by high resolution ¹H nuclear magnetic resonance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.557, n.1, p.135-148, out.1978.

BRUNI, R.; CONSTANTINO, A.; TRITARELLI, E.; MARCANTONIO, C.; CICCOCCHI, M.; RAPICETTA, M.; EL SAWAF, G.; GIULIANI, A.; CICCAGLIONE, A.R. A computational approach identifies two regions of Hepatitis C virus E1

protein as interacting domains involved in viral fusion process. **BMC Structural Biology**, v.9, n.48, jul.2009.

BUDKOSWKA, A. Mechanism of cell infection with hepatitis C virus (HCV) – a New paradigm in virus-cell interaction. **Polish Journal of Microbiology**, v.58, n.2, p.93-98, 2009.

BURLONE, M.E. & BUDKOWSKA, A. Hepatitis C virus cell entry: Role of lipoproteins and cellular receptors. **Journal of General Virology**, v.90, n.5, p.1055-1070, mar.2009.

BUT, D.Y.; LAI, C.; YUEN, M. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, n.11, p.1652-1656, mar.2008.

CALHOUN, D.B.; VANDERKOOI, J.M.; HOLTORN, G.R.; ENGLANDER, S.W. Protein fluorescence quenching by small molecules: protein penetration versus solvent exposure. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v.1, p.109-115, 1986.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.R.; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.D.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L.M.M.B.; COELHO, H.S.M.; SILVA, A.O.; FONSECA, J.C.; ROSA, H.; LACET, C.M.C.; BEARNRDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.1, p.41-49, jan. 2005.

CHATTOPADHYAY, A.; RAGHURAMAN, H. Application of fluorescence spectroscopy to membrane protein structure and dynamics. **Current Science**, vol.87, n.2, p.175-180, jul.2004.

CHENAL, A.; SAVARIN, P; NIZARD, P; GUILLAIN, F; GILLET, D.; FORGE, V. Membrane protein insertion regulated by bringing electrostatic and hydrophobic interactions into play. A case study with the translocation domain of the diphtheria toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.45, p.43425-43432, nov.2002.

CHUNG, R.T. **Mechanisms of response and nonresponse to HCV treatment**. Clinical Care Options Hepatitis Annual Update 2009. Disponível em <http://www.clinicaloptions.com/Hepatitis/AnnualUpdates/2009AnnualUpdate/MODULES/Chung.aspx>. Acesso em 24 de Julho de 2009.

CLAVERIE, J.; OGATA, H.; AUDIC, S.; ABERGEL, C.; SUHRE, K.; FOURNIER, P. Mimivirus and the emerging concept of “giant” virus. **Virus Research**, v.117, n.1, p.133-144, abril, 2006.

CLC Protein Workbench. Disponível em <http://www.clcbio.com>. Acesso em 28 de Maio de 2008.

CLORE, G.M.; GRONENBORN, A.M. Structures of larger proteins in solution: three and four dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. **Science**, v.253, n.5011, p.1390-1399, jun.1991.

COCQUEREL, L.; OP DE BEECK, A.; LAMBOT, M.; ROUSSEL, J.; DELGRANGE, D.; PILLEZ, A.; WYCHOWSKI, C.; PENIN, F.; DUBUISSON, J. Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **The EMBO Journal**, v.21, n.12, p.2893-2902, jun.2002.

COLMAN, P.M.; LAWRENCE, M.C. The structural biology of type I viral membrane fusion. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.4, n.4, p.309-319, abril, 2003.

COMBET, C.; BLANCHET, C.; GEOURJON, C.; DELÉAGE, G. NPS@: Network protein sequence analysis. **TIBS**, vol. 25, n.3, p.147-150, mar.2000.

COOPER, A. Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics. **Biophysical Chemistry**, v. 85, n.1, p.25-39 maio, 2000.

CORRÊA, D.H.; RAMOS, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, vol., 3, n.5, p.164-173, maio, 2009.

CUMMINGS, J.E.; VANDERLICK, T.K. Aggregation and hemi-fusion of anionic vesicles induced by the antimicrobial peptide cryptdin-4. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1768, n.7, p.1796-1804, jul.2007.

CZEPIEL, J.; BIESIADA, G; MACH, T. Viral hepatitis C. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v.118, n.12, p.734-740, dez. 2008.

DA POIAN, A.T.; CARNEIRO, F.A.; STAUFFER, F. Viral membrane fusion: is glycoprotein G of rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.6, p.813-823, jun.2005.

DAI,S.; TAM.K.C. Isothermal titration calorimetric studies of alkyl phenol ethoxylate surfactants in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, v.229, n.1-3, p.157-168, 2003.

DAMBERG,P.; JÜRI, J.; GRÄSLUND, A. Micellar systems solvents in peptide and protein structure determination. **Methods in Enzymology**, v.339, p.271-285, 2001.

DE CLERCQ, E. The design of drugs for HIV and HCV. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.6, n.12, p.1001-1018, dez.2007.

DELAGLIO, F.; GRZESIEK. S.; VUISTER, G.W.; ZHU, G.; PFEIFER, J.; BAX, A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. **Journal of Biomolecular NMR**, v.6, n.3, p.277-293, nov.1995.

Dichroweb. Disponível em <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtm>. Acesso em 03 de abril de 2009.

DIEDRICH, G. How does hepatitis C virus enter cells? **The FEBS Journal**, v.273, n.17, p.3871-3885, set.2006.

DIMMOCK, N.J.; EASTON, A.J.; LEPPARD, K.N. Towards a definition of a virus. In: DIMMOCK, N.J.; EASTON, A.J.; LEPPARD, K.N. **Introduction To Modern Virology**. 6^a ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, p.3-16.

DRUMMER, H.E.; BOO, I.; POUMBOURIOS, P. Mutagenesis of a conserved fusion peptide-like motif and membrane-proximal heptad-repeat region of hepatitis C virus glycoprotein E1. **Journal of General Virology**, v.88, n.pt4, p.1144-1148, abril, 2007.

DUBUISSON, J.; HELLE, F.; COCQUEREL, L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. **Cellular Microbiology**, v. 10, n.4, p.821-827, jan. 2008.

EARP, L.J.; DELOS, S.E.; PARK, H.E.; WHITE, J.M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. **Current. Topics in Microbiology. Immunology**, v.285, p.25-66, 2005.

EFTINK, M.K.; GIRON, C.A. Fluorescence quenching studies with proteins. **Analytical. Biochemistry**, v.114, p.199-227, 1981.

Enlarged HCV life cycle. Disponível em http://www.tibotec.com/content/backgrounders/www.tibotec.com/hcv_lifecycle.html. Acesso em 12 de dezembro de 2009.

ESBJÖRNER, E.K.; OGLECKA, K.; LINCOLN, P.; GRÄSLUND, A.; NORDÉN, B. Membrane binding of pH-sensitive influenza fusion peptides. positioning, configuration and induced leakage in a lipid vesicle model. **Biochemistry**, v.46, n.47, p. 13490-13504, nov.2007.

Expasy Proteomics Server. **Prot Param tool.** Disponível em <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>. Acessado em 20 de setembro de 2008.

FLINT, M.; THOMAS, J.M.; MAIDENS, C.M.; SHOTTON, C.; LEVY, S.; BARCLAY, W.S.; MCKEATING, J.A. Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. **Journal of Virology**, v.73, n.8, p.6782-6790, ago. 1999.

FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. **Drug Discovery Today**, v.1, n.3, p.295-299, 2004.

FREITAS, M.S.; GASPAR, L.P.; LORENZONI, M.; ALMEIDA, F.C.; TINOCO, L.W.; ALMEIDA, M.S.; MAIA, L.F.; DEGRÈVE, L.; VALENTE, A.P.; SILVA, J.L. Structure of the Ebola fusion peptide in a membrane-mimetic environment and the interaction with lipid rafts. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.37, p.27306-27314, set.2007.

GARRY, R.F.; DASH, S. Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. **Virology**, v.307, n.2, p.255-265, mar.2003.

GOLDBERG-BITTMAN, L.; AMIEL, A.; HADARY, R.; FEJGIN, M.D.; QUITT, M.; KITAY-COHEN, Y. Telomere capture in hepatitis C infection. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.191, n.2, p.63-66, jun.2009.

GOMES-NETO, F. **Utilização de modelos explícitos de membrana para cálculos de estrutura de proteínas solúveis que se associam a membrana a partir de dados de ressonância magnética nuclear**. 2009. Tese (Tese em Ciências – Área de Concentração: Química Biológica). Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GREENFIELD, N.J. **CD basics handout**. Department of Chemistry and Biochemistry, Chemistry Analytical Lab, Northern Illinois University. Disponível em <http://www.niu.edu/ANALYTICALLAB/cd/index.shtml>. Acesso em 20 de novembro de 2009.

HAN, X., BUSHWELLER, J.H., CAFISO, D.S., TAMM, L.K. Membrane structure and fusion triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. **Nature Structural Biology**, v.8, n.8, p.715-720, ago.2001.

HASSAN, P.A.; RAGHAVAN, S.R.; KALER, E.W. Microstructural changes in SDS micelles induced by hydrotropic salt. **Langmuir**, v.18, p.2543-2548, 2002.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1508, n.1-2, p.69-85, nov.2000.

HEINZ, F.X.; ALLISON, S.L. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. **Advances in Virus Research**, v.55, p.231-269, 2000.

HELENIUS, A.; KARTENBECK, J.; SIMONS, K.; FRIES, E. On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells. **The Journal of Cell Biology**, v.84, n.2, p.404-420, fev.1980.

HELLE, F.; DUBUISSON, J. Hepatitis C virus entry into host cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, n.1, p.100-112, jan.2008.

HENRY, G.D.; SYKES, B.D. Methods to study membrane protein structure in solution. **Methods in Enzymology**, v.239, p.515-535, 1994.

Hepatites Virais. Casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação – Sinan Net. Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>. Acesso em 25 de junho de 2009.

HOLDGATE, G.A.; WARD, W.H.J. Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.10, n.22, p.1543-1550, nov.2005.

HUANG, H.; SUN, F.; OWEN, D.M.; LI, W.; CHEN, Y.; GALE-JR, M.; YE, J. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. **PNAS**, v.104, n.14, p.5848-5853, abril, 2007.

JAIN, M.K.; WAGNER, R.C. **Introduction to biological membranes**. 2^a ed.: Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1980, 398pp.

JARDETZKY, T.S.; LAMB, R.A. A class act. **Nature**, v.427, n.6972, p.307-308, jan.2004.

JARONIEC, C.P.; KAUFMAN, J.D.; STAHL, S.J.; VIARD, M.; BLUMENTHAL, R.; WINGFIELD, P.T.; BAX, A. Structure and dynamics of micelle-associated human immunodeficiency virus gp41 fusion domain. **Biochemistry**, v.44, n.49, p.16167-16180, dez.2005.

JOHNSON, B.A. Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. **Methods in Molecular Biology**, v.278, p.313-352, 2004.

JOHNSON, W.C. Analysing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. **Proteins**, v.35, n.3, p.307-312, maio 1999.

JUSUFI, A.; HYNINEN, A.P.; HAATAJA, M., PANAGIOTOPOULOS, A.Z. Electrostatic screening and charge correlation effects in micellization of ionic surfactants. **The Journal of Physical Chemistry**, v.113, n.18, p.6314-6320, maio, 2009.

KALIA, M.; JAMEEL, S. Virus entry paradigms. **Amino Acids**, Epub ahead of print, out. 2009.

KONIDALA, P.; HE, L.; NIEMEYER, B. Molecular dynamics characterization of n-octyl- β -D-glucopyranoside micelle structure in aqueous solution. **Journal of Molecular Graphics and Modeling**, v.25, n.1, p.77-86, set.2006.

KREKULOVÁ, L.; REHÁK, V.; RILEY, L.W. Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. **Folia Microbiologica**, v.51, n.6, p.665-680, 2006.

KRONENBERGER, B.; ZEUZEM, S. Current and future treatment options for HCV. **Annals of Hepatology**, v.8, n.2, p.103-112, abril-jun. 2009.

KUNH, R.J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M.G.; PLETNEV, S.V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C.T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P.R.; STRAUSS, E.G.; BAKER, T.S.; STRAUSS, J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v.108, n.5, p.717-725, mar. 2002.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v.157, n.1, p.105-132, 1982.

LADOKHIN, A.S.; JAYASINGHE, S.; WHITE, S.H. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? **Analytical Biochemistry**, v.285, n.2, p.235-245, out.2000.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3^a ed. New York: Springer Science Business Media, 2006, 954p.

- LANGHAM, A., WARING, A. J. & KAZNEISS, Y. N. Comparison of interactions between beta-hairpin decapeptides and SDS/DPC micelles from experimental and simulation data. **BMC Biochemistry**, v.8, n.11, jul.2007.
- LASIC, D.D. The mechanism of vesicle formation. **The Biochemical Journal**, v.256, n.1, p.1-11, nov.1988.
- LAVIE, M., GOFFARD, A., DUBUISSON, J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. **Current Issues in Molecular Biology**, v.9, n.2, p.71-86, jul.2007.
- LAVILLETTE, D.; BARTOSCH, B.; NOURISSON, D.; VEMEY, G.; COSSET, F.; PENIN, F.; PÉCHEUR, E. Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.7, p.3909-3971, fev.2006.
- LAVILLETTE, D.; PÉCHEUR, E.; DONOT, P.; FRESQUET, J.; MOLLE, J.; CORBAU, R.; DREUX, M.; PENIN, F.; COSSET, F. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. **Journal of Virology**, v.81, n.16, p.8752-8765, ago.2007.
- LESCAR, J.; ROUSSEL, A.; WIEN, M.W.; NAVAZA, J.; FULLER, S.D.; WENGLER, G.; WENGLER, G.; REY, F.A. The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus. An icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. **Cell**, v.105, n.1, p.137-148, abril, 2001.
- LI, Y.; HAN, X.; TAMM, L. K. Thermodynamics of fusion peptide-membrane interactions. **Biochemistry**, v.42, n.23, p.7245-7251, jun.2003.
- LI, Y.; TAMM, L.K. Structure and plasticity of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain in lipid micelles and bilayers. **Biophysical Journal**, v.93, n.3, p.876-885, ago.2007.
- LINDENBACH, B.D; RICE, C.M. Unraveling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v.436, n.7053, p.933-938, ago.2005.
- LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.; RICE, C.M. *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., GRIFFIN D.E., LAMB, R.A., MARTIN, M.A., ROIZMAN, B. & STRAUS, S.E. **Fields Virology**. 5^a ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1101-11152.
- LIU, S.; YANG, W.; SHEN, L.; TURNER, J.R.; COYNE, C.B.; WANG, T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus 1 entry and are down regulated during infection to prevent super infection. **Journal of Virology**, v.83, n.4, p.2011-2014, fev. 2009.
- MARSH, M.; HELENIUS, A. Virus entry: Open sesame. **Cell**, v.124, n.4, p.729-740, fev.2006.

MARTENS, S.; MCMAHON, H. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, n.7, p.543-556, jul. 2008.

MAZZINI, S.; FERNANDEZ-VIDAL, M.; GALBUSERA, V., CASTRO-ROMAN, F., BELLUCCI, M. C., RAGG, E., HARO, I. 3D-Structure of the interior fusion peptide of HGV/GBV-C by 1H NMR, CD and molecular dynamics studies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.465, n.1, p. 187-96, set.2007.

MCHUTCHISON, J.G. Understanding hepatitis C. **The American Journal of Managed Care**, v.10, n.2, p. S21-S29, mar. 2004.

MCLAUCHLAN, J. Lipid droplets and hepatitis C vírus infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1791, n.6, p.552-559, jun.2009.

MELNIKOVA, I. Hepatitis C therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.7, p.799-800, out. 2008.

MELO, M.N.; SOUSA, F.J.R.; CARNEIRO, F.A.; CASTANHO, M.A.R.B.; VALENTE, A.P.; ALMEIDA, F.C.L.; DA POIAN, A.T.; MOHANA-BORGES, R. Interaction of the dengue virus fusion peptide with membranes assessed by NMR: The essential role of the envelope protein Trp101 for membrane fusion. **Journal of Molecular Biology**, v.392, n.3, p.736-746, set.2009.

MENDES, Y.S. **Biologia estrutural de flavivírus: propriedades biofísicas da interação de peptídeos de fusão com membranas biomiméticas e implicações para o desenvolvimento de uma vacina inativada por alta pressão hidrostática**. 2009. Tese (Tese em Ciências – Área de Concentração: Química Biológica). Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MIHAILOVA, M.; SOMINSKAYA, I.; VIAZOV, S.; PUMPENS, P. Is vaccine against HCV possible? **Acta Universitatis Latviensis**, vol. 723, p.123-143, 2007.

Ministério da Saúde (2006). Casos Confirmados de Hepatite C. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1996-2006. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_hepatite_c.pdf. Acesso em 20 de janeiro de 2010.

Molecule of the Day (2007). Disponível em <http://www.moleculeoftheday.com>. Acesso em 20 de novembro de 2007.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C.M. Replication of hepatitis C virus. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.6, p.453-463, jun.2007.

MOSCONA, A. entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. **The Journal of Clinical investigation**, v.115, n.7, p.1688-1698, jul.2005.

NEGRO, F.; ALAEI, M. Hepatitis C virus and type 2 diabetes. **World Journal of Gastroenterology**, v.15, n.13, p.1537-1547, abril, 2009.

NJUS, D. **Thermodynamics of micelle formation**. Fundamental Principles of Membrane Biophysics 2000. Disponível em <http://sun.science.wayne.edu/~bio669/index716.html>. Acesso em 22 de junho de 2009.

OP DE BEECK, A.; MONTSERRET, R.; DUVET, S.; COCQUEREL, L.; CACAN, R.; BARBEROT, B.; LE MAIRE, M.; PENIN, F.; DUBUISSON, J. The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.40, p.31428-31437, out.2000.

OPHARDT, C.E. **Micelles**. Virtual chembook Elmhurst College 2003. Disponível em <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/558micelle.html>. Acesso em 27 de dezembro de 2009.

OREMUSOVÁ, J.; LENGYEL, A. **Critical micelle concentration of ionic surfactants**. Disponível em http://www.fpharm.uniba.sk/fileadmin/user_upload/english/Physical_Chemistry/10-Critical_micelar_concentration.pdf. Acesso em 27 de dezembro de 2009.

PACHECO, B.; GÓMEZ-GUTIÉRREZ, J.; YÉLAMOS, B.; DELGADO, C.; RONCAL, F.; ALBAR, J.P.; PETERSON, D.; GAVILANES, F. Membrane-perturbing properties of three peptides corresponding to the ectodomain of hepatitis C virus E2 envelope protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1758, n.6, p.755-763, jun.2006.

PATTY, P.J.; FRISKEN, B.J. The pressure-dependence of the size of extruded vesicles. **Biophysical Journal**, v.85, n.2, p.996-1004, ago.003.

PAWLOTSKY, J. **Update on investigational HCV agents**. Clinical care options hepatitis annual update 2009. Disponível em <http://www.clinicaloptions.com/Hepatitis/AnnualUpdates/2009AnnualUpdate/Modules/Pawlotsky/Pages/Page1.aspx>. Acesso em 10 de Agosto de 2009.

PÉCHEUR, E.I.; SAINTE-MARIE, J.; BIENVENÜE, A.; HOEKSTRA, D. Peptides and membrane fusion: towards an understanding of the molecular mechanism of protein-induced fusion. **The Journal of Membrane Biology**, v.167, n.1, p.1-17, jan.1999.

PELKMANS, L.; HELENIUS, A. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, n.4, p.414-422, ago.2003.

PELTON, J.T.; MCLEAN, L.R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. **Analytical Biochemistry**, v.277, n.2, p.167-176, jan.2000.

PÉREZ-BERNÁ, A.J.; MORENO, M.R.; GUILLÉN, J.; BEARNBEU, A.; VILLALAÍN, J. The membrane-active regions of the hepatitis c virus E1 and E2 envelope glycoproteins. **Biochemistry**, v.45, n.11, p.3755-3768, mar.2006.

PIETSCHMANN, T. Final entry key for hepatitis C. **Nature**, v.457; n.7231, p.797-798, fev.2009.

PILLAY, D.; ZAMBON, M. Antiviral drug resistance. **British Medical Journal**, v.317, n.7159, p.660-662, set.1998.

PIERCE, M.M.; RAMAN, C.S.; NALL, B.T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. **Methods**, v.19, n.2, p.213-221, out 1999.

Pierce Protein Research Products. **Remove Detergent From Protein Samples**. Disponível em <http://piercenet.com> . Acesso em 16 de novembro de 2007.

PIOTTO, M.; SAUDEK, V.; SKLENAR, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. **Journal of Biomolecular NMR**, v.2, n.6, p.661-665, nov.1992.

PLOSS, A.; EVANS, M.J.; GAYSINSKAYA, V.A.; PANIS, M.; YOU, H.; DE JONG, Y.P.; RICE, C.M. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature**, v.457, n.7231, p.882-886, fev.2009.

POLYAK, S.J. Hepatitis C virus-cell interactions and their role in pathogenesis. **Clinics in Liver Disease**, v.7, n.1, p.67-88, fev.2003.

PROVENCHER, S.W.; GLÖCKNER, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. **Biochemistry**, v.30, n.33, p.33-37, jan. 1981.

RAGHURAMAN, H; CHATTOPADHYAY, A. Effect of micellar charge on the conformation and dynamics of melittin. **European biophysical Journal**, vol.33, n.7, p.611-622, abril 2004.

REICHERT, J.; GRASNICL, D.; AFONIN, S.; BUERCK, J.; WADHWANI, P.; ULRICH, A.S. A critical evaluation of the conformational requirements of fusogenic peptides in membranes. **European Biophysical Journal**, v. 36, n.4-5, p.405-413, abril, 2007.

REYNOLDS, G.M.; HARRIS, H.J.; JENNINGS, A.; HU, K.; GROVE, J.; LALOR P.F.; ADAMS, D.H.; BALFE, P.; HÜBSCHER, S.G.; MCKEATING, J.A. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. **Hepatology**, v.47, n.2, p.418-427, fev. 2008.

ROCCATANO, D.; COLOMBO, G.; FLORONI, M.; MARK, A. E. Mechanism By Which 2,2,2 – Trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. **PNAS**, v.99, n.19, p. 2179-12184, set.2002.

RODRIGUÉZ-CRESPO, I.; NÚÑEZ, E.; GÓMEZ-GUTIÉRREZ, J.; YÉLAMOS, B.; ALBAR, J.P.; PETERSON, D.L.; GAVILANES, F. Phospholipid interactions of the putative fusion peptide of hepatitis B virus surface antigen S protein. **Journal of General Virology**, v.76, n.2, p.301-308, fev.1995.

SEELIG, J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1666, n.1-2, p.40-50, nov.2004.

SHMULEVITZ, M.; EPAND, R.F.; EPAND, R.M.; DUNCAN, R. Structural and functional properties of an unusual internal fusion peptide in a nonenveloped virus membrane fusion protein. **Journal of Virology**, v.78, n.6, p.2808-2818, mar.2004.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. **Journal of General Virology**, v. 85, p.3173-3188, nov. 2004.

SKOOG, D.A.; HOLLER, J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, 968p.

SOLLNER, T.H. Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, n.4, p.429-435, ago.2004.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. **Journal of Molecular Biology**, v. 30, n.4, p.497-507, set.1994.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v.287, n.2, p.252-260, dez. 2000.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. **Methods in Enzymology**, v.383, p.318-351, 2004.

STEPHENSON, B.C.; BEERS, K.; BLANKSCHTEIN, D. Complementary use of simulations and molecular-thermodynamic theory to model micellization. **Langmuir**, v.22, n.4, p.1500-1513, fev.2006.

STIASNY, K. & HEINZ, F. Flavivirus membrane fusion. **Journal of General Virology**, v.87, n.10, p.2755-2766, out.2006.

STIASNY, K.; FRITZ, R.; PANGERL, K.; HEINZ, F.X. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. **Amino Acids**, Epub ahead of print, nov. 2009.

SUZUKI, R.; SUZUKI, T.; ISHII, K; MATSUURA, Y.; MIYAMURA, T; Processing and functions of hepatitis C virus proteins. **Intervirology**, v.42, n.2-3, p.145-452, 1999.

TALLMADGE, D.H; HUEBNERT, J.S.; BORKMAN, R.F. Acrylamide quenching of tryptophan photochemistry and photophysics. **Photochemistry and Photobiology**, v.49, n.4, p. 381–386, abril,1989.

TAMM, L. K.; HAN, X. Viral fusion peptides: a tool set to disrupt and connect biological membranes. **Bioscience Reports**, v.20, n.6, p.501-518 dez.2000.

TAMM, L.K.; HAN, X.; LI, Y.; LAI, A.L. Structure and function of membrane fusion peptides. **Biopolymers**, v.66, n.4, p.249-260, 2002.

TANG, H.; GRISÉ, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clinical Science**, v.117, n.2, p.49-65, jun.2009.

TELLINGHUISEN, T.L.; RICE, C.M. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, n.4, p. 419-427, ago. 2002.

THOMPSON, A.J.V.; MCHUTCHISON, J.G. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). **Journal of Viral Hepatitis**, v.16, n.6, p.377-387, fev.2009.

TINOCO, L.W.; NETO, F.G.; VALENTE, A.P.; ALMEIDA, F.C.L. Effect of micelle interface on the binding of anticoccidial PW2 peptide. **Journal of Biomolecular NMR**, v.39, n.4, p.315-322, dez.2007.

ULRICH, A.S.; TICHELAAR, W.; FÖRSTER, G.; ZSCHÖRNING, O.; WEINKAUF, S.; MEYER, H.W. Ultrastructural characterization of peptide-induced membrane fusion and peptide self-assembly in the lipid bilayer. **Biophysical Journal**, v.77, n.2, p.829-841, ago.1999.

VARALDO, C.N. **A cura da hepatite C: Manual do paciente em tratamento**. Rio de Janeiro: MAUAD, 2003. 316p.

VOISSET, C.; DUBUISSON, J. Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Biology of the Cell**, v.96, n.6, p.413-420, ago.2004.

VON HAHN, T.; RICE, C.M. Hepatitis C virus entry. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.7, p.3689-3693, fev.2008.

VP-ITC MicroCalorimeter user's manual. Disponível em http://keck.med.yale.edu/biophysics/VP_ITC_MANUAL_11_20_02a.pdf. Acesso em 28 de março de 2010.

WANG, G.; TRELEAVEN, W. D.; CUSHELEY, R. J. Conformation of human serum apolipoprotein A-I(166-185) in the presence of sodium dodecyl sulfate or dodecylphosphocoline by 1H-NMR and CD. Evidence for specific peptide-SDS interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1301, n.3, p.174-184, jun.1996.

WEIGAND, K.; STREMMEL, W.; ENCKE, J. Treatment of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.13, p.1897-1905, abril, 2007.

WEISSNENHORN, W.; DESSEN, A.; CALDER, L.J; HARISSON, S.C.; SKEHEL, J.J.; WILEY, D.C. Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. **Molecular Membrane Biology**, v.16, n.1, p.3-9, jan.-mar.1999.

WESTERMANN, J.; CRAIK, D.J. NMR in peptide drug development. In: OTVOS, L. **Peptide-Based Drug Design**. Series Methods in Molecular Biology, v. 494. Nova Jersey: Springer Protocols, 2008, p.87-113.

WHITE, S.H. Hydrophathy plots and the prediction of membrane protein topology. In: WHITE, S.H. **Membrane Protein Structure. Experimental Approaches**. Nova York: Oxford University Press, 1994. p.97-124.

WHITE, J.M.; DELOS, S.E.; BRECHER, M; SCHORNBERRA, K. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.43, n.3, p.189-219, maio-jun.2008.

WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and references databases. **Biopolymers**, v. 89, n.5, p.392-400, maio 2008.

WIDER, G. Structure determination of biological macromolecules using NMR. **Biotechniques**, v. 29, p.1278-1294, 2000.

WIMLEY, W.; WHITE, S.H. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. **Nature Structural Biology**, v. 3, n.10, p.842-848, out.1996.

WOHNSLAND, A.; HOFMANN, W.P.; SARRAZIN, C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C, **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.1, p.23-38, jan.2007.

WÜTHRICH, K. **NMR of protein and nucleic acids**. New York: Wiley, 1986.

WYMORE, T.; WONG, T. C. Molecular dynamics study of substance P peptides partitioned in a sodium dodecylsulfate micelle. **Biophysical Journal**, v.76, n.3, p.1213–1227, mar.1999.

XING, L.; TIKOO, S.K. Packaging of viral ARNs in virions of adenoviruses. **Virology Journal**, v.6, n.6, fev.2009.

YAGNIK, A.T.; LAHM, A.; MEOLA, A.; ROCCASECCA, R.M.; ERCOLE, B.B.; NICOSIA, A.; TRAMONTANO, A. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v.40, n.3, p. 355-366, ago.2000.

YANG, J.; GABRYS, C.M.; WELIKY, D.P. Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for an extended β strand conformation of the membrane-bound HIV-1 fusion peptide. **Biochemistry**, v.40, n.27, p.8126-8137, jun.2001.

ZERBE, O.; BADER, R. **Peptide NMR**. Disponível em <http://dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/science/2002/k.a.feenstra/c6.pdf>. Acesso em 30 de dezembro de 2009.

9– Anexo

CURRICULUM VITAE

Nome: Nathalia dos Santos Alves

Nascimento: 12/03/1985

Naturalidade: Rio de Janeiro

➤ **Formação Acadêmica**

- Ciências Biológicas – Modalidade Médica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, março de 2004 a fevereiro de 2008.

- Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

➤ **Orientação de Estudante**

- Marcella Valentim Monteiro Ferreira – Iniciação Científica, desde agosto de 2009.

➤ **Comunicações em Congressos**

19 Comunicações em congressos nacionais.

6 Comunicações em congressos internacionais.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)