



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP  
CÂMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

---

*Giovanni César dos Santos*

**ESTUDO DAS ESTRUTURAS TERCIÁRIA E QUATERNÁRIA DE  
PROTEÍNAS POR ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS  
ÂNGULOS INTEGRADO A TÉCNICAS DE MODELAGEM.**

Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em  
Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e  
Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOHNNY RIZZIERI OLIVIERI**

São José do Rio Preto - SP

2003

Correspondência: [giovanni@unirpnet.com.br](mailto:giovanni@unirpnet.com.br)

Correspondência: [giovanni@unirpnet.com.br](mailto:giovanni@unirpnet.com.br)

*Aos meus pais*

Este trabalho recebeu o apoio financeiro da:

CAPES / CNPq  
FAPESP

## Agradecimentos

Ao professor doutor Johnny Rizzieri Olivieri pelos ensinamentos, orientação e apoio.

Aos professores Walter Filgueira de Azevedo Jr e Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez pela colaboração.

Ao professor doutor João Ruggiero Neto pela ajuda em vários momentos.

Ao professor doutor Marcelo Andrés Fossey pelo apoio.

Ao professor doutor Ramon Beltran Abrego pelos ensinamentos.

Aos colegas de pós-graduação.

À Márcia, Leandra e Renato pela ajuda e companheirismo.

Aos colegas Fábio, Denis, Patrícia e Henrique pela colaboração.

Aos funcionários Barbosa, Paulinho e Ilva pela assessoria.

À minha família pelo incentivo, apoio, compreensão e amor.

À minha esposa Ana Lúcia e ao meu filho Otávio por estarem sempre presentes, pela paciência e dedicação em todos esses anos e principalmente pelo amor e cumplicidade e por tornarem minha vida melhor.

À CAPES/CNPq pelo apoio financeiro na aquisição de materiais.

# Sumário

---

<b>Índice de Figuras</b> .....	ix
<b>Índice de Tabelas</b> .....	xxii
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	xxiv
<b>Resumo</b> .....	xxv
<b>Abstract</b> .....	xxvi
<b>1 – Introdução</b> .....	1
<b>2 – Objetivos</b> .....	4
<b>3 – Proteínas Estudadas</b> .....	6
3.1 – Hemoglobinas .....	6
3.1.1 - Aspectos gerais .....	6
3.1.2 - Cooperatividade e auto-associação .....	9
3.2 – Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP).....	12
3.3 – 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato (EPSP) .....	17
3.3.1 – Tuberculose .....	17
3.3.2 – EPSP Sintase .....	19
3.4 – Crotoxina .....	22

---

<b>4 - Teoria de SAXS</b> .....	25
4.1 - Espalhamento por uma partícula .....	25
4.2 - Aproximações de Porod e Guinier .....	32
4.3 - Função distribuição de distâncias $p(r)$ e o raio de giro ( $R_G$ ).....	35
<b>5 - Materiais e Métodos</b> .....	37
5.1 - A técnica de SAXS .....	37
5.1.1 - Introdução .....	37
5.2 - Procedimento experimental .....	38
5.2.1 - Calibração do aparelho de raios X .....	38
5.2.2 - Perfil do feixe .....	40
5.2.3 - O detector a gás sensível a posição (PSD).....	42
5.2.4 - Amostras .....	44
5.2.4.1 - Hemoglobinas de serpentes .....	44
5.2.4.2 - Hemoglobina de peixe .....	46
5.2.4.3 - Purina nucleosídeo fosforilase .....	48
5.2.4.4 - EPSP Sintase .....	48
5.2.4.5 - Crotoxina .....	48
5.2.4.6 - Condições das amostras para coleta por SAXS ..	49
5.3 - Tratamento dos dados .....	49
5.3.1 - Normalização das curvas de espalhamento.....	49
5.3.2 - Extrapolação à concentração zero .....	51

---

5.3.3 - <i>Background</i> .....	53
5.3.4 - Programa ITP .....	54
5.3.5 - Máxima dimensão da partícula - $D_{max}$ .....	59
5.3.6 - Programa MULTIBODY .....	60
5.3.7 - Modelagem e <i>Docking</i> de proteínas .....	61
<b>6 - Resultados Experimentais</b> .....	<b>65</b>
6.1 - Introdução .....	65
6.2 - Hemoglobina humana .....	66
6.3 - Hemoglobinas de serpentes .....	70
6.3.1 - <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	70
6.3.2 - <i>Liophis miliaris</i> .....	76
6.3.3 - <i>Boa constrictor constrictor</i> .....	84
6.4 - Hemoglobina de <i>Hoplosternum littorale</i> .....	87
6.5 - Purina Nucleosídeo Fosforilase – PNP .....	90
6.6 – EPSP Sintase .....	93
6.7 – Crotoxina .....	96
6.8 - Modelos teóricos .....	99
6.8.1 - <i>Liophis miliaris</i> .....	99
6.8.2 - <i>H. littorale</i> .....	100
6.8.3 - Purina nucleosídeo fosforilase .....	102
6.8.4 – EPSP Sintase .....	104
6.8.5 – Crotoxina .....	105
<b>7 – Discussão</b> .....	<b>107</b>

---

7.1 - Introdução .....	107
7.2 - Estudo por SAXS sem o uso de extrapolação à concentração zero .....	108
7.3 - Hemoglobinas de serpentes .....	113
7.4 - Purina nucleosídeo fosforilase .....	117
7.5 - 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (EPSP Sintase) .....	121
7.6 - Modelos de Hemoglobinas .....	124
7.6.1 - <i>Liophis miliaris</i> .....	124
7.6.2 - <i>Hoplosternum littorale</i> .....	127
7.6.3 - EPSP Sintase .....	132
7.6.4 - PNP Humana .....	135
7.6.5 - Crotoxina .....	138
<b>8 - Conclusões .....</b>	<b>141</b>
8.1 - Conclusões .....	141
8.2 - Sugestões para trabalhos futuros .....	143
<b>9 - Referências Bibliográficas.....</b>	<b>145</b>



# Índice de Figuras

---

## 3 – Proteínas estudadas

- Figura 3.1** Representação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina. **Pág. 7**
- Figura 3.2** Curva de saturação de oxigênio da mioglobina (linha azul) e hemoglobina (linha vermelha). **Pág. 8**
- Figura 3.3** Rotas do catabolismo de várias purinas de animais mostrando a degradação em ácido úrico. **Pág. 13**
- Figura 3.4** Via metabólica do chiquimato. **Pág. 19**

## 4 – Teoria de SAXS

- Figura 4.1** Espalhamento produzido por dois centros espalhadores O e M. **Pág. 26**
- Figura 4.2** Representação do deslocamento de uma partícula sobre si mesma definindo a função  $V(r)$ . **Pág. 31**

**Figura 4.3** Curva de espalhamento representando as regiões de Porod e Guinier. **Pág. 33**

## **5 – Materiais e métodos**

**Figura 5.1** Comparação entre os espalhamentos parasitas e o espalhamento da amostra padrão Lupolen. **Pág. 38**

**Figura 5.2** Sistema de colimação de Kratky (vista lateral). **Pág. 39**

**Figura 5.3** Gráficos do perfil da largura do feixe obtido pelo sistema de colimação. **Pág. 41**

**Figura 5.4** Gráficos do perfil do comprimento do feixe obtido pelo sistema de colimação. **Pág. 41**

**Figura 5.5** Esquema dos estágios percorridos pelo feixe até a obtenção das curvas de espalhamento. **Pág. 43**

**Figura 5.6** Gráfico de linearidade do detector para conversão de canal para unidade h.. **Pág. 43**

- Figura 5.7** Curva de intensidade da amostra padrão Lupolen, da qual é calculada a intensidade do feixe direto. **Pág. 51**
- Figura 5.8** Esboço de gráfico de  $J(h) \cdot h^3 \times h^3$  representando o afastamento da lei de Porod devido às flutuações da densidade eletrônica da solução. **Pág. 54**
- Figura 5.9** Método da transformação indireta usado no programa ITP. **Pág. 58**
- Figura 5.10** Função  $p(r)$  do modelo teórico de uma esfera para diferentes valores de  $D_{max}$ . **Pág. 60**

## **6 – Resultados experimentais**

- Figura 6.1** Curvas de intensidade de espalhamento normalizadas da hemoglobina de humana em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0. **Pág. 68**
- Figura 6.2** Gráficos de Guinier da hemoglobina humana na concentração de 10mg/ml, sem extrapolação, em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0. **Pág. 68**
- Figura 6.3** Gráficos de Porod da hemoglobina humana em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0. **Pág. 69**

- Figura 6.4** Função distribuição de distâncias da hemoglobina humana na concentração 10mg/ml: (a) em pH7,0 e (b) em pH 8,0. **Pág. 69**
- Figura 6.5** Curvas de intensidade de espalhamento normalizadas das diferentes concentrações da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0. **Pág. 71**
- Figura 6.6** Curvas de intensidade extrapolada à concentração zero da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0. **Pág. 71**
- Figura 6.7** Gráficos de Guinier das hemoglobinas de *Crotallus* em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0. **Pág. 72**
- Figura 6.8** Gráficos de Porod das hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus* em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0. **Pág. 72**
- Figura 6.9** Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Crotalus* obtidas das curvas de intensidade extrapoladas a concentração zero. (a) pH7,0 e (b) pH8,0. **Pág. 73**

- Figura 6.10** Curvas normalizadas de intensidade de espalhamento da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 10mg/ml, sem extrapolação, em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0. **Pág. 74**
- Figura 6.11** Gráficos de Guinier das hemoglobinas de *Crotallus* na concentração de 10mg/ml, sem extrapolação, em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0. **Pág. 74**
- Figura 6.12** Gráficos de Porod das hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus*, na concentração 10mg/ml, sem extrapolação, em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0. **Pág. 75**
- Figura 6.13** Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Crotalus*, concentração 10mg/ml, obtidas das curvas de intensidade não extrapoladas. (a) pH7,0 e (b) pH8,0. **Pág. 75**
- Figura 6.14** Curvas de intensidade de espalhamento normalizadas das diferentes concentrações da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0. **Pág. 77**
- Figura 6.15** Curva de intensidade de espalhamento extrapolada a concentração zero da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0. **Pág. 77**

- Figura 6.16** Gráfico de Guinier da hemoglobina de *Liophis miliaris* da curva extrapolada a concentração zero, em pH 7,0. **Pág. 78**
- Figura 6.17** Gráfico de Porod da hemoglobina de *Liophis miliaris* da curva extrapolada a concentração zero, em pH 7,0. **Pág. 78**
- Figura 6.18** Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Liophis* obtida da curva de intensidade extrapolada em pH7,0. **Pág. 79**
- Figura 6.19** Curva normalizada de intensidade de espalhamento hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0 na concentração de 10mg/ml. **Pág. 80**
- Figura 6.20** Gráfico de Guinier da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0 na concentração de 10mg/ml. **Pág. 80**
- Figura 6.21** Gráfico de Porod da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0 na concentração 10mg/ml. **Pág. 81**
- Figura 6.22** Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Liophis* em pH7,0 na concentração 10mg/ml. **Pág. 81**

- Figura 6.23** Curva normalizada da intensidade de espalhamento da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 8,0 na concentração de 12mg/ml. **Pág. 82**
- Figura 6.24** Gráfico de Guinier da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 8,0 na concentração de 12mg/ml. **Pág. 83**
- Figura 6.25** Gráfico de Porod da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 8,0 na concentração 12mg/ml. **Pág. 83**
- Figura 6.26** Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Liophis* em pH8,0 na concentração 12mg/ml. **Pág. 84**
- Figura 6.27** Curva normalizada da intensidade de espalhamento da hemoglobina de *Boa constrictor* na concentração de 12mg/ml (a) em pH 7,0 e (b) em pH 8,0. **Pág. 85**
- Figura 6.28** Gráficos de Guinier da hemoglobina de *Boa constrictor* na concentração de 12mg/ml (a) em pH 7,0 e (b) em pH 8,0. **Pág. 85**
- Figura 6.29** Gráfico de Porod da hemoglobina de *Boa constrictor* na concentração 12mg/ml (a) em pH 7,0 e (b) em pH 8,0. **Pág. 86**

- Figura 6.30** Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Boa constrictor* na concentração 12mg/ml (a) em pH 7,0 e (b) em pH8,0. **Pág. 86**
- Figura 6.31** Curva normalizada da intensidade de espalhamento da hemoglobina de *H. littorale* nas formas: (a) oxigenada; (b) desoxigenada **Pág. 88**
- Figura 6.32** Gráficos de Guinier da hemoglobina de *H. littorale* nas formas: (a) oxigenada e (b) desoxigenada. **Pág. 88**
- Figura 6.33** Gráficos de Porod da hemoglobina de *H. littorale* nas formas: (a) oxigenada e (b) desoxigenada **Pág. 89**
- Figura 6.34** Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *H. littorale* nas formas: (a) oxigenada e (b) desoxigenada **Pág. 89**
- Figura 6.35** Curva normalizada da intensidade de espalhamento da purina nucleosídeo fosforilase. **Pág. 91**
- Figura 6.36** Gráfico de Guinier da purina nucleosídeo fosforilase. **Pág. 91**
- Figura 6.37** Gráfico de Porod da purina nucleosídeo fosforilase. **Pág. 92**



<b>Figura 6.38</b>	Função distribuição de distâncias da purina nucleosídeo fosforilase.	<b>Pág. 92</b>
<b>Figura 6.39</b>	Curva normalizada da intensidade de espalhamento da EPSP (a) na presença e (b) na ausência de fosfato.	<b>Pág. 94</b>
<b>Figura 6.40</b>	Gráficos de Guinier da EPSP (a) na presença de fosfato e (b) na ausência de fosfato.	<b>Pág. 94</b>
<b>Figura 6.41</b>	Gráficos de Porod da EPSP (a) na presença de fosfato e (b) na ausência de fosfato.	<b>Pág. 95</b>
<b>Figura 6.42</b>	Função distribuição de distâncias da EPSP (a) na presença de fosfato e (b) na ausência de fosfato.	<b>Pág. 95</b>
<b>Figura 6.43</b>	Curva normalizada da intensidade de espalhamento da Crotoxina.	<b>Pág. 97</b>
<b>Figura 6.44</b>	Gráfico de Guinier da Crotoxina.	<b>Pág. 97</b>
<b>Figura 6.45</b>	Gráfico de Porod da Crotoxina.	<b>Pág. 98</b>
<b>Figura 6.46</b>	Função distribuição de distâncias da Crotoxina.	<b>Pág. 98</b>

- Figura 6.47** Modelo da hemoglobina de *Liophis miliaris* construído pelo programa MODELLER com sua respectiva função  $p(r)$ . **Pág. 100**
- Figura 6.48** Modelos das hemoglobinas de *H. littorale* construído pelo programa MODELLER com sua respectiva função  $p(r)$  nas formas (a) oxigenada e (b) desoxigenada. **Pág. 101**
- Figura 6.49** Modelos da purina nucleosídeo fosforilase nas formas: (a) mono; (b) di e (c) trimérica e suas respectivas função  $p(r)$ . **Pág. 103**
- Figura 6.50** Modelo da EPSP e funções  $p(r)$  nas formas (a) fechada e (b) aberta. **Pág. 104**
- Figura 6.51** Modelo da crotoxina e sua respectiva função  $p(r)$ . **Pág. 106**

## 7 – Discussão

- Figura 7.1** Funções  $p(r)$  da hemoglobina de *Liophis* em pH 7,0 obtidas pelos métodos de única concentração e por extrapolação. **Pág. 111**
- Figura 7.2** Funções  $p(r)$  da hemoglobina de *Crotalus* em pH 7,0 e pH 8,0 obtidas pelos métodos de única concentração e por extrapolação. **Pág. 112**

- Figura 7.3** Modelo sugerido para o transporte de O<sub>2</sub> pela hemoglobina de serpente, *in vivo*. **Pág. 113**
- Figura 7.4** Funções distribuição de distâncias das hemoglobinas humanas experimentais nos valores de pH 7,0 e 8,0, e obtidas dos dados cristalográficos (código PDB 1HHO), indicando os respectivos valores de raios de giro. **Pág. 115**
- Figura 7.5** Comparação entre as funções  $p(r)$  das hemoglobinas de serpentes com a função  $p(r)$  calculada dos dados do PDB código 1HHO da hemoglobina humana nas formas dimérica e tetramérica. **Pág. 117**
- Figura 7.6** Comparação entre a função  $p(r)$  experimental com as funções  $p(r)$  obtidas dos dados cristalográficos e modelo. **Pág. 120**
- Figura 7.7** Comparação entre as funções  $p(r)$  da EPSP, com e sem fosfato, com a função  $p(r)$  calculada dos dados dos modelos fechado e aberto. **Pág. 123**
- Figura 7.8** Alinhamento da seqüência primária da hemoglobina de *L. miliaris* com as seqüências das hemoglobinas humanas de códigos PDB 1BAB. (a) cadeia  $\alpha$  e (b) cadeia  $\beta$ . **Pág. 125**

- Figura 7.9** Diagrama de Ramachandran obtido do modelo da *L. miliaris*. **Pág. 126**
- Figura 7.10** Modelo da hemoglobina de *Liophis miliaris* construído pelo programa MODELLER com sua respectiva função  $p(r)$ . **Pág. 127**
- Figura 7.11** Alinhamento da seqüência primária da hemoglobina de *H. littorale* com as seqüências das hemoglobinas humanas de códigos PDB 1BAB e 1HBH. (a) cadeia  $\alpha$  com 1BAB (oxi); (b) cadeia  $\beta$  com 1BAB (oxi); (c) cadeia  $\alpha$  com 1HBH (desoxi) e (d) cadeia  $\beta$  com 1HBH (desoxi). **Pág. 128**
- Figura 7.12** Diagrama de Ramachandran obtido do modelo da hemoglobina de *H. littorale* nas formas (a) oxi e (b) desoxi. **Pág. 130**
- Figura 7.13** Comparação entre as funções  $p(r)$  experimentais e dos modelos das hemoglobinas de *H. littorale* construído pelo programa MODELLER nas formas (a) oxigenada e (b) desoxigenada. **Pág. 131**
- Figura 7.14** Comparação entre as funções  $p(r)$  da EPSP, com e sem fosfato, com a função  $p(r)$  calculada dos dados dos modelos fechado e aberto. **Pág. 133**

- Figura 7.15** Comparação entre as funções  $p(r)$  da EPSP, com e sem fosfato, com a função  $p(r)$  calculada dos dados dos modelos fechado e aberto. **Pág. 134**
- Figura 7.16** Modelos da purina nucleosídeo fosforilase nas formas: (a) mono; (b) di e (c) trimérica e suas respectivas função  $p(r)$ . **Pág. 137**
- Figura 7.17** Funções distribuição de distâncias dos modelos dez melhores modelos da crotoxina sobrepostos com a função  $p(r)$  experimental da mesma proteína. **Pág. 140**

# Índice de Tabelas

---

## 3 – Proteínas estudadas

<b>Tabela 3.1</b>	Exemplos de PNP de diversas fontes que relaciona a massa molecular, o número de subunidades e respectivos autores.	<b>Pág. 16</b>
-------------------	--	----------------

## 6 – Resultados experimentais

<b>Tabela 6.1</b>	Valores de raio de giro e máxima dimensão das hemoglobinas de serpentes.	<b>Pág. 87</b>
<b>Tabela 6.2</b>	Valores de raios de giro e máximas dimensões da hemoglobina de <i>H. littorale</i> obtidos por SAXS para as formas oxi e desoxi.	<b>Pág. 90</b>
<b>Tabela 6.3</b>	Valores de raios de giro e máximas dimensões da EPSP.	<b>Pág. 96</b>
<b>Tabela 6.4</b>	Valores de raio de giro e máxima dimensão calculados para a crotoxina.	<b>Pág. 98</b>

**Tabela 6.5** Valores de raios de giro, máximas dimensões e coeficientes de correlação da hemoglobina de *L. miliaris* e modelo. **Pág. 100**

**Tabela 6.6** Raios de giro dos modelos das hemoglobinas nas formas oxi e desoxi e os coeficientes de correlação. **Pág. 102**

**Tabela 6.7** Raios de giro experimentais e dos modelos da EPSP com e sem fosfato e os respectivos coeficientes de correlação. **Pág. 105**

## **7 – Discussão**

**Tabela 7.1** Apresentação dos valores de raios de giro, máximas dimensões e coeficientes de correlação calculados para a PNP humana dos dados experimentais e dos modelos. **Pág. 136**

**Tabela 7.2** Valores dos coeficientes de correlação calculados entre as funções  $p(r)$  dos modelos da crotoxina e dos dados experimentais. **Pág. 138**

# Lista de Abreviaturas

---

ATP: adenosina trifosfato

$Cu_{k_{\alpha}}$  : radiação  $k_{\alpha}$  do cobre.

$D_{max}$  : máxima dimensão da partícula.

EPSP: 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato

ITP: *indirect transformation for calculation of p(r)*

PDB: *Protein Data Bank*

PEP: fosfoenol piruvato

$p(r)$  : função distribuição de distâncias.

PNP: Purina Nucleosídeo Fosforilase

$R_g$  : raio de giro.

S3P: chiquimato-3-fosfato

SAXS: *small angle X-ray scattering* (espalhamento de raios X a baixos ângulos).



# Resumo

---

O espalhamento de raios X a baixos ângulos foi utilizado para obter informações sobre a estrutura terciária e quaternária de várias proteínas das quais, também, foram verificadas a ocorrência de mudanças conformacionais induzidas por variação de pH e adição de ligantes. A técnica de SAXS integrada a programas de modelagem, como MODELLER e GRAMM, demonstrou ter grande utilidade para a seleção de modelos de proteínas de estruturas desconhecidas e mesmo para a construção de complexos.

A combinação dessas técnicas também ajudou a obter informações importantes que auxiliaram na compreensão do comportamento em solução de algumas proteínas, podendo contribuir no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de determinadas doenças. Nessa linha, entre outros resultados importantes, podem ser destacados os de duas enzimas analisadas: a PNP humana, da qual ficou comprovado que a estrutura cristalina trimérica é conservada em solução; e a EPSP Sintase de *M. tuberculosis*, que passa de um estado mais aberto para outro mais fechado na presença de fosfato.

# Abstract

---

Small angle X-ray scattering has been used to get information on the tertiary and quaternary structure of different proteins including induced conformational changes due to pH variation and ligand addition.

An integration between SAXS techniques and modeling programs like MODELLER and GRAMM, proved to be very useful for models selection of protein with unknown structures and also for building up protein complexes.

Combining SAXS techniques and modeling programs allowed us to get information on the behavior of several proteins in solution what may be used as a new tool in drug development. With this purpose two enzymes have been studied: human PNP, for which we proved that the trimmeric crystalline structure is conserved in solution, and for *M. tuberculosis* EPSP Sintase, which changes from an open state to another more closed due to the presence of phosphate ions.

Correspondência: [giovanni@unirpnet.com.br](mailto:giovanni@unirpnet.com.br)

# 1 - Introdução

---

O espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) é uma técnica que pode ser utilizada nos estudos de macromoléculas em solução. Através dela, podem ser determinados parâmetros geométricos como: raio de giro, volume, superfície, máxima dimensão e função distribuição de distâncias  $p(r)$ . Por permitir o estudo de sistemas compostos de macromoléculas em situações aproximadas das condições biológicas, é possível, também, verificar a ocorrência de mudanças conformacionais induzidas pela variação do meio, como pH, temperatura e presença de ligantes, além de auxiliar na construção de modelos tridimensionais através do uso de programas computacionais apropriados. Devido aos dados de SAXS serem bastante sensíveis às mudanças conformacionais e flexibilidade das proteínas, esta técnica desempenha um importante papel na compreensão dos mecanismos biomoleculares.

Atualmente existem vários programas computacionais que são utilizados desde a análise dos dados coletados e cálculos dos parâmetros possíveis por SAXS, até a construção de modelos tridimensionais. Os modelos gerados a partir dos programas conhecidos, como por exemplo o MULTIBODY (Glatter, 1980b; 1983) e o DAMMIN (Svergun, 1999), se apresentam como formas aproximadas das proteínas e muitas vezes

grosseiras, como elipsóides prolatos, oblatos, prismas, ou mesmo formas conseguidas pela combinação de outras mais simples.

Numa outra linha de modelos de proteínas estão aqueles construídos por técnicas de modelagem molecular que se baseiam nas seqüências primárias das proteínas, como é o caso do programa MODELLER (Sali e Blundell, 1993), ou *docking*, baseado nas coordenadas atômicas de proteínas, para a composição de complexos, como o programa GRAMM (Katchalsky-Katzir *et al*, 1992). O programa MODELLER gera modelos usando como referência estruturas experimentalmente determinadas. Já o programa GRAMM, permite a predição de estruturas quaternárias a partir de uma busca exaustiva de combinações entre posições relativas de duas moléculas conhecidas. Ambos geram modelos com detalhes em nível atômico.

Apesar da quantidade de detalhes presentes nos modelos construídos pelos programas MODELLER e GRAMM ser maior que os obtidos pelos programas MULTIBODY e DAMMIN, não há nenhuma garantia de que representem a real forma das proteínas no ambiente biológico, tanto que algumas interações não são previstas, como é o caso da interação das proteínas com o meio. Os programas podem gerar na saída inúmeros modelos, todos fisicamente possíveis, mas não necessariamente correspondentes à situação estudada.

Mesmo diante de tais incertezas, os modelos têm grande importância na compreensão dos mecanismos envolvidos nas mudanças

conformacionais das proteínas e ainda no desenho de drogas. Nesse caminho, a técnica de SAXS pode oferecer importante contribuição para o estudo de proteínas em que se deseja acessar informações das estruturas terciária e quaternária das mesmas.

## 2 - Objetivos

---

O objetivo deste trabalho foi estudar proteínas em solução pela técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos e delas obter informações sobre a estrutura terciária e quaternária, verificando a ocorrência de mudanças conformacionais induzidas por variação de pH ou pela adição de ligantes.

Pretendeu-se, também, utilizar a técnica de SAXS integrada aos programas de modelagem MULTIBODY e MODELLER, e *docking* de proteínas, como o programa GRAMM, para obter modelos de proteínas cujas estruturas não sejam conhecidas. A técnica de SAXS podendo, dessa forma, servir de referência experimental para a seleção dos modelos. Um fluxograma representando os passos seguidos para a geração e seleção dos modelos é mostrado na seqüência.

Devido às dificuldades surgidas durante os estudo por SAXS quanto à quantidade de material consumido nas análises, uma outra abordagem deste trabalho foi à discussão de um método alternativo de uso da técnica em situações de escassez de material sem uso de extrapolação à concentração zero, de forma a não comprometer a qualidade dos resultados. Este método pode servir de um estudo prévio de proteínas como as identificadas em projetos genomas.



# 3 - Proteínas Estudadas

---

## 3.1 – Hemoglobina

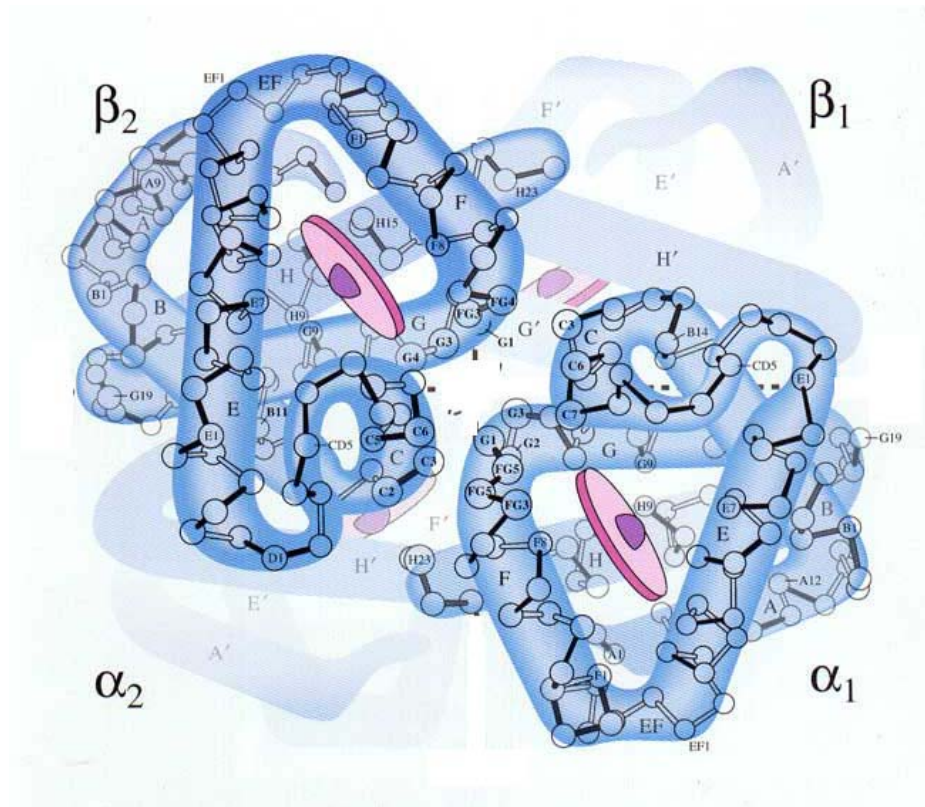
### 3.1.1 - Aspectos gerais

A hemoglobina, uma das proteínas mais estudadas até hoje, é normalmente um tetrâmero constituído de duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ . No caso da hemoglobina humana, as cadeias  $\alpha$ , com 141 resíduos de aminoácidos, são idênticas entre si, da mesma forma que as cadeias  $\beta$ , com 146 resíduos. Ambas possuem grande similaridade na estrutura terciária com a mioglobina, que possui uma única cadeia polipeptídica de 153 resíduos, inclusive pela presença do mesmo grupo heme (ver figura 3.1).

Tanto as hemoglobinas quanto as mioglobinas, tem a capacidade de ligarem-se às moléculas de oxigênio, justamente devido à presença do grupo heme, o qual também é responsável pela cor característica da proteína. Diferentemente da mioglobina, que tem como principal função favorecer a difusão de oxigênio nos músculos, a hemoglobina é responsável pelo transporte do oxigênio no sangue, papel de extrema importância, uma vez que a solubilidade do  $O_2$  é muito baixa neste meio; além de funcionar também como transportadora de dióxido de carbono e íons de hidrogênio. A



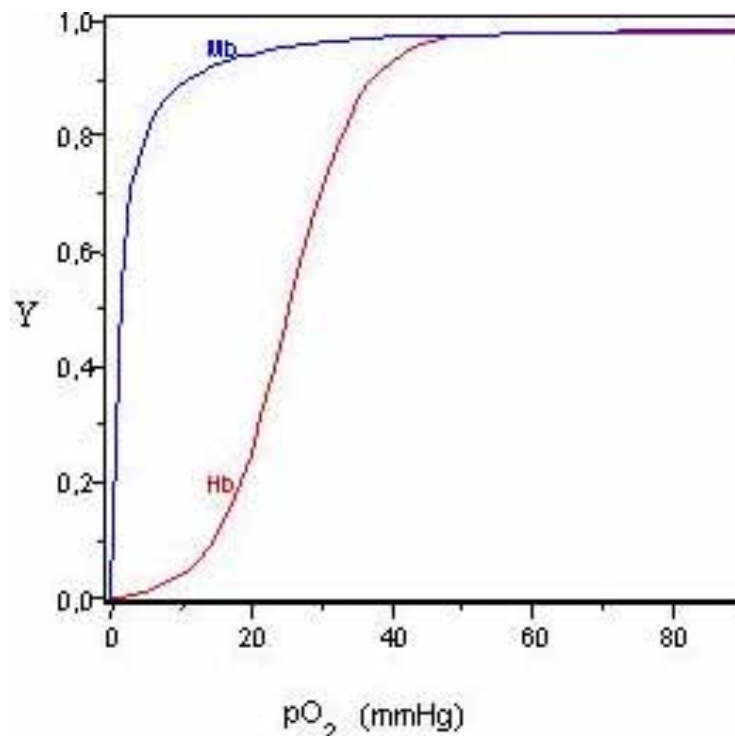
hemoglobina, entretanto, está relacionada evolutivamente com a mioglobina de onde vários resíduos de aminoácidos foram substituídos resultando em estruturas primárias distintas.



**Figura 3.1** – Representação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina (Voet & Voet, 1995).

A ligação do oxigênio à hemoglobina é feita de forma cooperativa, de modo que regiões de alta pressão de  $O_2$  favorecem a forma oxigenada da proteína e regiões de baixa pressão favorecem a forma desoxigenada, ou seja, facilita a liberação do oxigênio. A figura 3.2 mostra uma curva de saturação de oxigênio da hemoglobina e da mioglobina, comparando o comportamento da ligação de  $O_2$  nessas proteínas. O gráfico mostra que 50 por cento dos sítios da mioglobina ficam ocupados a uma pressão parcial de

aproximadamente 1mmHg, ao passo que, para a hemoglobina é necessária uma pressão em torno de 26mmHg. Isso mostra uma maior afinidade por oxigênio da mioglobina em relação à hemoglobina.



**Figura 3.2** – Curva de saturação de oxigênio da mioglobina (linha azul) e hemoglobina (linha vermelha). (Y representa a saturação de O<sub>2</sub> e pO<sub>2</sub> representa a pressão.)

Altos níveis de H<sup>+</sup> e CO<sub>2</sub> ajudam a promover a liberação do O<sub>2</sub> da hemoglobina, da mesma forma que altas concentrações de O<sub>2</sub> também favorecem a liberação de H<sup>+</sup> e CO<sub>2</sub>; este mecanismo é conhecido por efeito Bohr. A ligação de oxigênio à hemoglobina no sangue também é extremamente diminuída na presença de outro ligante, o 2,3-bisfosfoglicerato (BPG), devido a interações entre as cargas negativas e positivas da proteína (Stryer, 1992; Campbell, 2001).

### 3.1.2 - Cooperatividade e Auto-associação

Hemoglobinas de diferentes organismos apresentam um mesmo grupo heme que é o responsável pela ligação do oxigênio. A afinidade é expressa em termos da pressão parcial de O<sub>2</sub>, p<sub>50</sub>, correspondendo a uma saturação de metade dos sítios de ligação do oxigênio das hemoglobinas da solução. A ligação do oxigênio com os sítios de ligação da hemoglobina na forma tetramérica é do tipo cooperativa, onde, a ligação do primeiro ligante facilita a ligação do ligante seguinte.

A oxigenação causa mudanças na estrutura quaternária da hemoglobina, tornando a forma oxigenada diferente estruturalmente da forma desoxigenada. Estas diferenças são percebidas, mais acentuadamente, na interface  $\alpha_1\beta_2$ , sendo que, principalmente nos répteis e anfíbios, a oxigenação freqüentemente, envolve uma mistura em equilíbrio de tetrâmeros, dímeros e monômeros (Voet & Voet, 1995; Brittain, 1991; Riggs, 1998).

Estudos através de técnicas de cromatografia, da hemoglobina de *Liophis miliaris*, uma espécie de serpente de hábito semiaquático, levaram a propor a existência de um mecanismo de transição dímero-tetrâmero nos processos de oxigenação. Foi proposto que, na oxigenação, existiria um único componente de massa molecular 32500Da, similar ao dímero da hemoglobina humana. Para a forma desoxigenada, a massa molecular seria de 65000Da, mostrando-se muito parecido ao tetrâmero da hemoglobina humana de massa molecular 64000Da. A hemoglobina de *Liophis milaris*

apresentou alta afinidade ao oxigênio e coeficientes de Hill (usado para identificar o grau de cooperatividade) próximo de 2 para valores de pH abaixo de 7,5 e, 1, para valores de pH mais altos (Matsuura *et al*, 1987; Focesi *et al*, 1987). Posteriormente, Matsuura e colaboradores, na tentativa de explicar esse mecanismo de transição dímero-tetrâmero, fizeram o seqüenciamento das globinas de *Liophis miliaris*. A análise da seqüência de aminoácidos indicou uma substituição de Glu (G3) por Val e Glu (CD2) por Thr, resíduos que se posicionam na região de interface  $\alpha_1\beta_2$ . Dessa maneira, a troca de dois resíduos carregados por outros dois apolares, eliminando-se duas interações eletrostáticas, poderia levar a uma instabilidade do tetrâmero favorecendo a dissociação para dímeros (Matsuura *et al*, 1989).

Num outro trabalho, onde a hemoglobina da serpente *Bothrops alternatus* foi submetida a uma análise por HPLC (*high-performance liquid chromatography*) e filtração em gel, foi verificada a presença de dois componentes no hemolisado total, sugerindo uma forma tetramérica de massa molecular 64000Da, similar à hemoglobina humana, e uma outra forma dimérica de massa molecular 32000Da (Oyama *et al*, 1993). Os autores sugerem que estes resultados podem estar relacionados ao mesmo mecanismo de transição dímero-tetrâmero observado para a hemoglobina de *Liophis miliaris*, comentado anteriormente.

Bonafé *et al* (1999) estudaram a importância do fosfato orgânico na ligação do oxigênio às hemoglobinas de vertebrados e a tetramerização induzida pelo ATP. Nesse trabalho, os autores sugeriram um modelo para

explicar a necessidade da existência do mecanismo de associação dímero-tetrâmero, em que, nos estados de dormência do animal, a hemoglobina assumiria a forma dimérica e nos estados de estresse ou atividade, assumiria a forma tetramérica induzida pelo ATP.

Recentemente, Lombardi *et al.* (2002) tem determinado em seus estudos por filtração analítica em gel das hemoglobinas das espécies de serpentes, *Crotalus durissus terrificus*, *Helicops modestus*, *Boa constrictor constrictor* e *Liophis miliaris*, o tipo de espécie molecular presente em solução. Verificou-se que o volume de eluição das hemoglobinas das espécies mencionadas são compatíveis com o da hemoglobina humana tetramérica. Esses resultados determinam, então, que as hemoglobinas possuem estruturas tetraméricas estáveis e a dissociação em dímeros, em condições mais próximas às encontradas no meio celular, não são observadas, não concordando com os dados encontrados na literatura, comentados anteriormente.

### 3.2 - Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP)

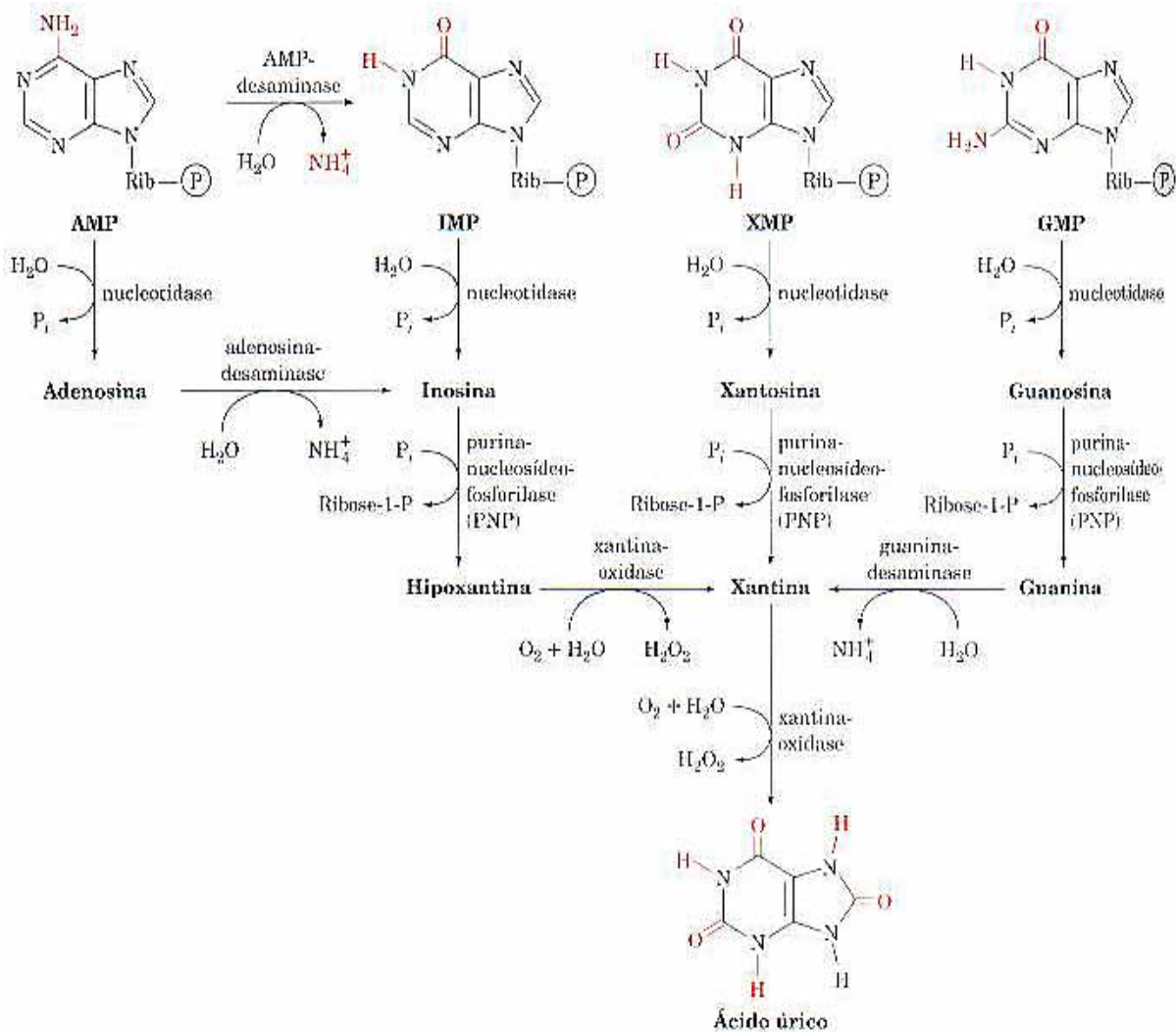
A maioria dos organismos consegue sintetizar nucleotídeos de nucleosídeos ou nucleobases para serem reutilizados na formação de ácidos nucléicos. Estes processos são chamados de rotas de recuperação pois envolvem a utilização de compostos formados de purinas e pirimidinas, as quais seriam eliminadas pela biodegradação (Mathews & van Holde, 1990).

Esta recuperação, ou reutilização, de bases purina ou pirimidina utiliza moléculas liberadas da degradação de ácidos nucléicos, podendo ocorrer tanto intracelularmente quanto pela sua digestão quando ingeridos na dieta alimentar. Neste último caso, os ácidos nucléicos são degradados em nucleotídeos pela ação de enzimas pancreáticas e fosfodiesterases intestinais que, por não atravessarem as membranas celulares, são hidrolisados em nucleosídeos pela ação de nucleotidases e fosfatases.

Nesses processos de recuperação, a purina-nucleosídeo-fosforilase (PNP), destaca-se como uma enzima catalisadora da clivagem da ligação glicosídica de ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos, que na presença de um fosfato inorgânico gera uma base purina e uma ribose-1-fosfato, conforme reação reversível que se segue:



Portanto, a PNP age num dos caminhos intermediários das rotas do catabolismo de nucleotídeos e desoxinucleotídeos permitindo às células recuperarem bases purinas para sintetizarem nucleotídeos de purinas (ver figura 3.3) (Voet & Voet, 1995).



**Figura 3.3** – Rotas do catabolismo de várias purinas de animais mostrando a degradação em ácido úrico (Voet & Voet, 1995).

Giblett *et al* (1975), através do estudo do sangue de uma criança com síndrome da imunodeficiência combinada, apresentando grande deficiência de linfócitos T e atividade normal dos linfócitos B, mostraram baixos níveis de atividade de PNP, sugerindo esta enzima como agente fundamental na proliferação das células T.

Com a deficiência de PNP a imunidade das células T e B são afetadas, mas em apenas um terço dos pacientes é que se observa deficiência nas células B (Market, 1991).

A deficiência de PNP é uma doença rara que ocorre em aproximadamente 4% dos pacientes com síndrome da imunodeficiência combinada. Os portadores de deficiência de PNP sofrem de infecções, que começam desde os primeiros anos de vida e, na maioria dos casos, observa-se desordem neurológica. Cerca de um terço dos pacientes desenvolvem doenças autoimunes, como anemia hemolítica (Market, 1991).

Devido a aplicações clínicas, há grande interesse na determinação de inibidores específicos de PNP como uma forma de terapia de doenças autoimunes, artrites, leucemias, e ainda como agentes imunossupressores, em caso de rejeição nos transplantes de órgãos, entre outras (Gilberten *et al*, 1991). Mas, para que um inibidor tenha aplicação clínica considerável, devido à alta atividade de PNP nos tecidos humanos, a inibição *in vivo* deve chegar a 99,9 por cento, e ainda, o inibidor deve conseguir penetrar nas membranas celulares, o que é difícil de ocorrer devido à presença de cargas nas suas moléculas (Bzowska, 2000). Por estes motivos, entre os vários inibidores conhecidos, o BCX-34 destaca-se pelos avançados testes clínicos



no tratamento de determinadas doenças (Conry *et al*, 1998; Morris & Omura, 2000).

A PNP, dependendo da fonte de onde é extraída, pode apresentar especificidades diferentes. Assim, ao longo dos anos, tem sido purificada de uma grande quantidade de organismos e, de acordo com estudos de diversos autores, formas estruturais variadas são propostas, como, dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros, com massa molecular entre 60kDa e 180kDa. Dessa grande diversidade de formas, as principais são: os trímeros, com massa molecular entre 80 e 100kDa, isolada principalmente de tecidos de mamíferos e alguns microorganismos, tais como, *Bacillus stearothermophilus*, e os hexâmeros, com massa molecular entre 110 e 180 kDa, encontrados sobretudo, em microorganismos; as principais fontes são *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella* e *Sulfolobus solfataricus*.

Alguns exemplos de PNP de diversas fontes são mostrados na tabela 3.1, extraída do trabalho de Bzowska *et al* (2000), relacionando massa molecular, número de subunidades e autores.

<b>Fonte</b>	<b>Massa Molecular (kDa)</b>	<b>Número de Subunidades</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacillus stearothermophilus</i> JTS 859 PNPI	68	dímero	Hori <i>et al.</i> , 1989
<i>Erwinia carotovora</i>	58	dímero	Shirae and Yokozeki, 1991
Eritrócito humano	87-91	Trímero	Stoeckler <i>et al.</i> , 1978; Williams <i>et al.</i> , 1984
Baço bovino (bezerro)	86	Trímero	Stoeckler <i>et al.</i> , 1978; Bzowska <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus stearothermophilus</i> TH 6-2 PNPI	90	Trímero	Hamamoto <i>et al.</i> , 1996, 1997
<i>Bacillus subtilis</i>	95	Tetrâmero	Jensen, 1978; Schuch <i>et al.</i> , 1995
<i>Plasmodium lophurae</i>	122-129	Pentâmero	Schimandle <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i>	138	Hexâmero	Jensen and Nygaard, 1975; Bezirjian <i>et al.</i> , 1986; Hershfield <i>et al.</i> , 1991
<i>Sulfolobus solfataricus</i> MTAP	160	Hexâmero	Cacciapuoti <i>et al.</i> , 1994, 1999; Cacciapuoti, 1995
<i>Salmonella typhimurium</i>	138	Hexâmero	Jensen and Nygaard, 1975

**Tabela 3.1** - Exemplos de PNP de diversas fontes que relaciona a massa molecular, o número de subunidades e respectivos autores.

### **3.3 - 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (EPSP Sintase)**

#### **3.3.1 - Introdução**

Atualmente, há grande interesse no desenvolvimento de drogas que atuem como agentes quimioterápicos para o tratamento de doenças como a tuberculose. Estas drogas devem atuar em substituição aos tratamentos convencionais que utilizam certos antibióticos muitas vezes comprometidos pela resistência dos microrganismos causadores da doença. Nessa linha, como um bom exemplo está o desenho de inibidores de enzimas das vias metabólicas do ácido chiquímico, presentes em plantas e microrganismos e ausentes nos mamíferos.

#### **3.3.2 - Tuberculose**

A tuberculose é uma doença grave que atinge vários órgãos do corpo, em especial os pulmões. O agente causador da doença é o *Mycobacterium tuberculosis*, que, contraído principalmente pelo ar, atinge as vias respiratórias chegando aos pulmões. A prevenção é feita já nos primeiros dias de vida do recém-nascido através da vacina BCG<sup>1</sup>. Em caso de infecção e instalação da doença, o tratamento usual é feito

---

<sup>1</sup> Sigla decorrente da expressão Bacilo de Calmette-Guérin. Sua aplicação é indicada a crianças da faixa etária de 0 a 4 anos, sendo obrigatória para as crianças menores de 1 ano, mesmo nos casos de crianças soropositivos para HIV.

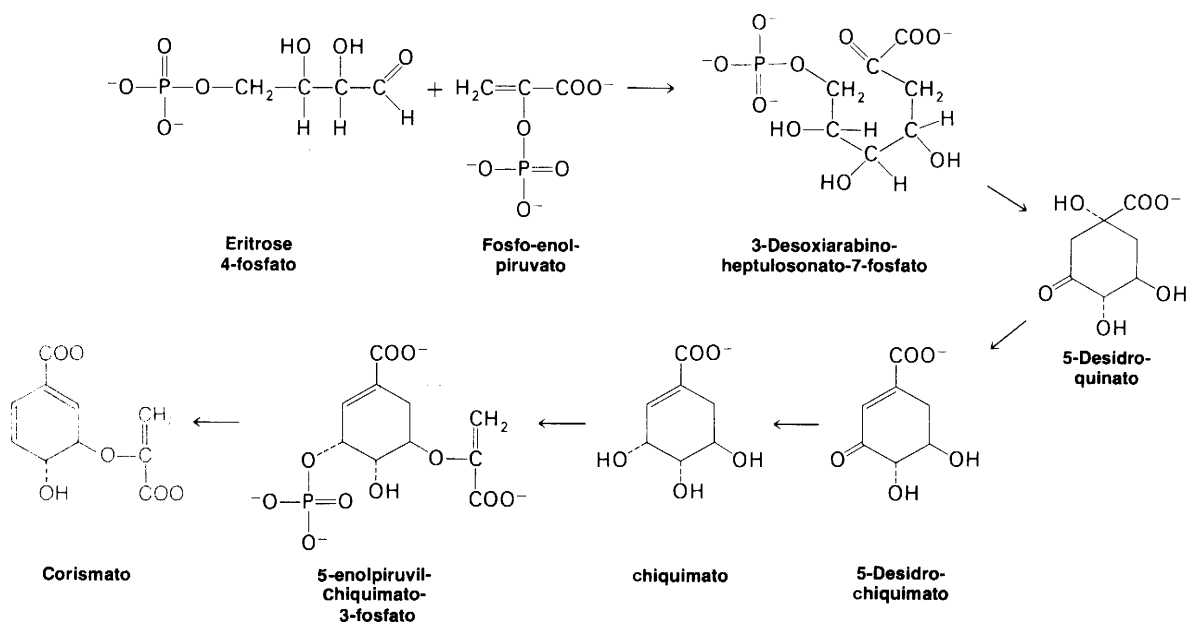
principalmente pela combinação de três drogas: isoniazida, rifampicina e pirazinamida. Outras drogas também podem ser administradas como é o caso da estreptomicina, etambutol e etionamida (Ministério da Saúde, 2002).

Apesar do grande sucesso nos tratamentos com estes medicamentos, acima de 95%, há uma preocupação mundial, não apenas pelo aumento do número de casos, cerca de 2% ao ano, mas principalmente com a forma resistente da tuberculose que pode aumentar ainda mais rapidamente. Assim, o abandono do tratamento ou mesmo o tratamento inadequado vem favorecendo o aparecimento cada vez maior de pacientes que apresentam multi-resistência às drogas, sobretudo à isoniazida e rifampicina, as duas principais drogas de primeira-linha. No ano 2000, estima-se que dos 8,7 milhões de novos casos, 273000 foram de indivíduos com multi-resistência (Dye *et al*, 2002).

Um outro dado preocupante é o da associação entre HIV e tuberculose que constitui, nos dias de hoje, um sério problema de saúde pública. Pessoas com HIV possuem maiores riscos de desenvolvimento de tuberculose devido ao comprometimento de sua imunidade. Em áreas onde uma alta proporção dos casos é de indivíduos com multi-resistência, a co-infecção com HIV pode aumentar ainda mais estes números (Dye *et al*, 2002).

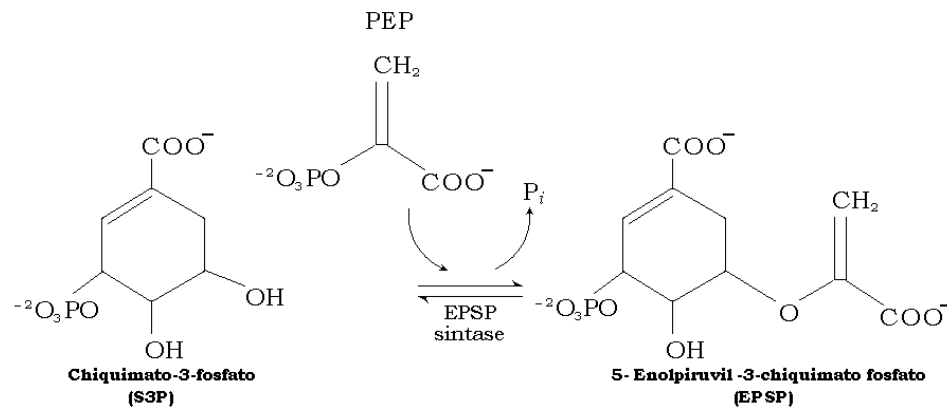
### 3.3.2 – EPSP Sintase

Aminoácidos aromáticos essenciais como, fenilalanina, tirosina e triptofano, são sintetizados por uma via comum nos vegetais e microrganismos. Inicialmente da reação entre eritrose 4-fosfato e fosfo-enolpiruvato resulta o chiquimato e posteriormente ácido corísmico (figura 3.4).



**Figura 3.4** – Via metabólica do chiquimato. (Voet & Voet, 1995).

Nos últimos anos, grande atenção tem sido focalizada na sexta reação das vias do ácido chiquímico, ou seja, na 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase) das plantas superiores. Esta enzima catalisa a transferência do enolpiruvil do fosfoenol piruvato (PEP) para chiquimato-3-fosfato (S3P) resultando em 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato, de acordo com o esquema a seguir (Schonbrunn *et al*, 2001):



A EPSP sintase é essencial para a síntese de aminoácidos aromáticos e da maioria de todos os outros compostos aromáticos em algas, plantas superiores, bactérias e fungos. Devido à ausência desta enzima nos mamíferos, vem se tornando alvo de grande interesse no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra bactérias, fungos e parasitas. Nesse caminho, um inibidor potente e específico de EPSP sintase é o glifosato, ingrediente ativo do herbicida Roundup, usado no controle de ervas daninhas. Roberts *et al* (1998), mostraram que o glifosato é eficiente para inibir o desenvolvimento de parasitas como *Plasmodium falciparum* (malária), *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium parvum*.

Shuttleworth *et al* (1999), estudaram a EPSP sintase de *E. coli* onde verificaram a capacidade da enzima em catalisar a conversão de S3P e PEP para EPSP e P<sub>i</sub>. Em vários mutantes da enzima não foi observada atividade indicando que alguns dos aminoácidos mutados são essenciais para a catálise ou ligação de substrato ou inibidor. Ainda, a estrutura cristalina da EPSP sintase sem substrato apresenta-se numa forma mais aberta,

sugerindo que após a ligação do substrato ou inibidor pode assumir uma forma mais fechada. De acordo com esses autores a presença de S3P resulta em apenas pequenas mudanças na estrutura se comparada com a enzima sozinha. Já, na presença de S3P juntamente com glifosato, a mudança é muito mais significativa, mostrando que o glifosato desempenha um papel importante na mudança estrutural da enzima, que pode estar relacionado com sua inibição.

Em contrapartida, Schönbrunn *et al* (2001), em estudos por cristalografia de raios X da EPSP sintase, mostram que o complexo EPSP sintase-S3P apresenta-se num estado fechado similar ao complexo EPSP sintase-S3P-glifosato. Dessa forma, propõem que o S3P, presente nas condições de cristalização, é o ativador da transição da forma aberta para fechada e não o glifosato.

### 3.4 - Crotoxina

A crotoxina, o componente mais tóxico do veneno da serpente terrestre sul-americana *Crotalus durissus terrificus* (cascavel), foi isolada por Slotta e Fraenkel-Conrat (1938) e representa aproximadamente metade de todo o veneno seco.

Gralen e Svedberg (1938) e Li e Fraenkel-Conrat (1942), através de ultracentrifugação e eletroforese, propuseram que a proteína seria um composto homogêneo e cristalizável. Mas, alguns anos mais tarde, Fraenkel-Conrat e Singer (1956) forneceram evidências da não homogeneidade da crotoxina e da presença de duas frações de solubilidade e massas moleculares distintas, sendo uma delas hidrossolúvel e ácida e a outra insolúvel e básica. Rüksamen e colaboradores (1971), por cromatografia em carboximetil-celulose em meio ácido, encontraram um componente com atividade fosfolipásica de baixa toxicidade, identificada como fosfolipase A<sub>2</sub>, e um outro componente ácido sem toxicidade, que denominaram crotapotina.

A crotoxina é, portanto, um complexo formado pela associação de duas subunidades: a crotapotina, subunidade A (CA), e a fosfolipase A<sub>2</sub>, subunidade B (CB). A crotapotina, apesar de não apresentar atividade tóxica ou fosfolipásica isoladamente, na recombinação do complexo, intensifica a toxicidade e inibe a atividade fosfolipásica da fração básica (Rüksamen *et al*, 1971).

Em 1971, as duas frações foram separadas e analisadas por diferentes técnicas, de onde foram determinadas massas moleculares de



aproximadamente 8.400Da para a crotapotina e 13.000Da para a fosfolipase A<sub>2</sub> (Hendon *et al.*, 1971). Os pontos isoelétricos a pH 3,8 para a crotapotina e pH 8,9, para a fosfolipase A<sub>2</sub>, também foram determinados por Horst e colaboradores (1972). Posteriormente, outros valores de pontos isoelétricos para a crotapotina e fosfolipase em pH 3,4 e pH 9,7 e massas moleculares de 8.900 e 15.800 daltons, respectivamente, foram observados por Breithaupt e colaboradores (Breithaupt *et al.*, 1974). O ponto isoelétrico do complexo está em torno do pH 4,7 e a massa molecular é de 24350Da.

Verifica-se a presença de várias isoformas do complexo crotoxina, em que a análise do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, coletado de uma única serpente, mostra a presença de várias isoformas da subunidade A e duas isoformas da subunidade B (Faure *et al.*, 1994).

Análises por filtração em gel e cromatografia de troca iônica demonstraram que a crotapotina é composta de três cadeias peptídicas ligadas por pontes dissulfeto: cadeia A, com 40 resíduos e massa molecular 4300Da; cadeia B, com 34 resíduos e massa molecular 3700Da e cadeia C, com 14 resíduos e massa molecular 1600Da.

A fosfolipase A<sub>2</sub>, uma única cadeia polipeptídica composta de 122 resíduos de aminoácidos, é responsável pelas várias atividades farmacológicas do veneno, como, atividades neurotóxicas, efeito coagulante, formação de edema, ação bactericida e efeitos de ruptura de lipossomos (Soares *et al.*, 2001).

A crotapotina tem a função de transportar a fosfolipase A<sub>2</sub> para sítios específicos presentes nas membranas através de um mecanismo conhecido como “efeito chaperone”. Desse modo, a crotapotina potencia a toxicidade da fosfolipase fazendo com que o complexo, *in vivo*, sofra modificações conformacionais para facilitar a ligação da fosfolipase a sítios específicos, enquanto que a crotapotina é dissociada e o complexo é desfeito (Jeng *et al*, 1978; Bon *et al*, 1979).

Estudos de SAXS revelaram que a crotapotina de *Crotalus durissus terrificus* em pH 1,5 possui raio de giro de 13,6 Å e máxima dimensão de 46 Å. A função p(r) mostrou-se consistente com a forma de um elipsóide oblato (Abrego *et al*, 1993); resultados compatíveis àqueles encontrados por Paradies e Breithaupt (1975), que determinaram para a crotapotina em pH 5,5, um raio de giro de 13,4 Å e propuseram a forma de um elipsóide oblato.

Em outro trabalho (Mascarenhas *et al*, 1992), a estrutura tridimensional da crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* foi modelada baseada na análise de sua seqüência primária e o refinamento foi feito a partir da estrutura da fosfolipase do veneno de *Crotalus atrox*. A crotoxina em solução foi avaliada por SAXS e da comparação das funções p(r) experimentais e do modelo observou-se um bom acordo entre ambas. Os valores de raio de giro e máxima dimensão calculados da proteína em solução foram, respectivamente, 16,5Å e 52Å, concordando com os valores obtidos do modelo (16,6Å, para o raio de giro e 52Å, para a máxima dimensão).

# 4 - Teoria de SAXS

---

## 4.1 - Espalhamento por uma partícula

A intensidade do espalhamento produzida por um único elétron é dada pela equação 4.1 que é conhecida como fórmula de Thomson (Guinier, 1963). (ver apêndice A)

$$I_e = \frac{r_e^2}{r^2} I_0 \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \quad 4.1$$

Em que:

$I_e$ , intensidade espalhada por um elétron

$I_0$ , intensidade incidente

$r_e$ , raio clássico do elétron

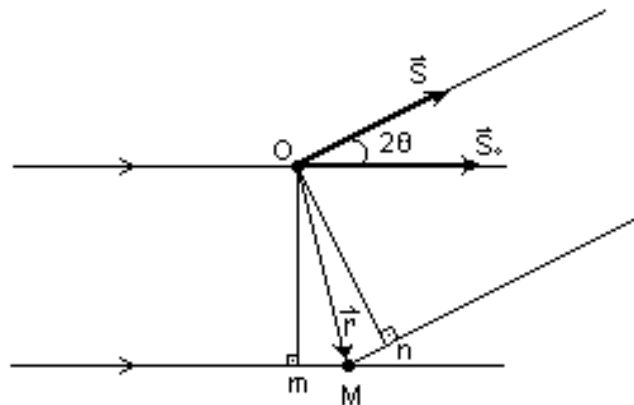
$r$ , distância de um ponto da direção de espalhamento ao elétron (espalhador)

$2\theta$ , ângulo de espalhamento

Em SAXS, os espalhamentos incoerentes ou Compton são desprezíveis pelo fato dos ângulos de espalhamento serem pequenos. Sendo assim, são consideradas apenas as ondas espalhadas coerentes, então, as amplitudes simplesmente se somam e a intensidade se dá pelo quadrado da amplitude resultante. As ondas espalhadas se diferenciam apenas pela fase  $\varphi$ , que depende da posição espacial dos elétrons que, por conveniência, serão

representadas na forma complexa,  $e^{i\varphi}$ . A fase  $\varphi$  é igual a  $\frac{2\pi}{\lambda}$  vezes a diferença no caminho óptico em relação a um ponto de referência arbitrário.

Considerando um feixe monocromático paralelo de raios X incidindo sobre dois centros espalhadores O e M, a radiação espalhada resultante numa dada direção pode ser calculada, conforme esquematizado na figura 4.1.



**Figura 4.1** - Espalhamento produzido por dois centros espalhadores O e M.

Onde as direções dos feixes incidente e espalhado são representadas pelos vetores unitários  $\vec{S}_0$  e  $\vec{S}$ , respectivamente.

A diferença de fase entre as ondas emitidas depende das posições relativas entre os dois centros espalhadores. A onda que incide em M percorre um caminho maior do que a que incide em O, sendo a diferença dada por  $\delta = \overline{mM} + \overline{Mn}$ , em que m e n são projeções de O sobre as direções dos feixes incidentes e espalhado, respectivamente.

Os caminhos podem ser expressos vetorialmente como segue:

$$\overline{mM} = \vec{S}_0 \cdot \vec{r}$$

$$\overline{Mn} = -\vec{S} \cdot \vec{r}$$

$$\delta = -\vec{r} \cdot (\vec{S} - \vec{S}_0)$$

E a diferença de fase será:

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \delta \Rightarrow \varphi = -2\pi \vec{r} \cdot \frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{\lambda}$$

O vetor de espalhamento pode ser definido por  $\vec{s} = \frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{\lambda}$ , ou

$$\vec{h} = 2\pi \vec{s}.$$

Conseqüentemente, o ângulo de fase será,  $\varphi = -\vec{h} \cdot \vec{r}$ .

Dessa maneira, cada onda terá uma amplitude modulada por  $e^{-i\vec{h} \cdot \vec{r}}$ , e a amplitude resultante em uma dada direção será a soma de todas as amplitudes individuais.

Pela teoria de difração de raios X, a amplitude da radiação espalhada por um ponto  $M_k$  na direção definida pelo vetor  $\vec{h}$ , em relação a origem O, é dada por (Guinier, 1963):

$$A_k = A_e f_k e^{-i\vec{h} \cdot \vec{r}} \quad 4.2$$

Em que,  $A_e$  é a amplitude espalhada por um elétron;  $f_k$ , fator de espalhamento, que é dado pela razão entre a amplitude incidente e a amplitude espalhada e é considerado constante para baixos ângulos.

A amplitude total de radiação espalhada por uma partícula é então,

$$A(\mathbf{h}) = \sum_k A_k = A_e(\mathbf{h}) \sum_k f_k e^{-i \vec{h} \cdot \vec{r}} \quad 4.3$$

Considerando uma partícula com o centro de simetria na origem e admitindo que para cada vetor  $\vec{r}$ , existe um outro,  $-\vec{r}$ , podemos simplificar a expressão (4.3) de modo que:

$$A(\mathbf{h}) = A_e(\mathbf{h}) \sum_k f_k \cos \vec{h} \cdot \vec{r} \quad 4.4$$

Dessa forma, define-se o fator de estrutura de uma partícula como a razão entre a amplitude total espalhada pela amplitude da radiação espalhada por um elétron sob as mesmas condições:

$$F(\vec{h}) = \frac{A(\vec{h})}{A_e(\vec{h})} = \sum_k f_k \cos \vec{h} \cdot \vec{r} \quad 4.5$$

A intensidade espalhada será então:

$$I(\vec{h}) = |A(\vec{h})|^2 = I_e(\vec{h}) \cdot F^2(\vec{h}) = I_e(\vec{h}) \cdot \left[ \sum_k f_k \cos \vec{h} \cdot \vec{r} \right]^2 \quad 4.6$$

Em que  $I_e(\vec{h}) = |A_e(\vec{h})|^2$

Para um grande número de centros espalhadores torna-se impossível determinar o espalhamento de todos os elétrons, e por isso, devemos considerar o espalhamento de uma densidade eletrônica, definida como o número de elétrons por unidade de volume, e denotado por  $\rho(\mathbf{r})$ . Assim, um elemento de volume  $dv$  na posição  $\mathbf{r}$  conterá  $\rho(\mathbf{r}) \cdot dv$  elétrons, que também está relacionado com o fator de espalhamento (Guinier, 1963).

O centro espalhador pode, então, ser um elétron ou mesmo uma pequena região definida pela sua densidade eletrônica, ambos em um meio que lhes permite movimentar, como, por exemplo, partículas em solução. Esses movimentos são descritos por uma combinação de translações e rotações, de modo que as translações não influenciam a intensidade espalhada, apenas as rotações é que intervêm nos cálculos de uma intensidade média.

$$\overline{I(\vec{h})} = I_e(h) \overline{F^2(\vec{h})} \quad 4.7$$

Para uma partícula esfericamente simétrica, pode ser considerado

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \overline{F(h)}^2.$$

$$\text{Como } \overline{F(\vec{h})} = \sum_k f_k \overline{\cos \vec{h} \cdot \vec{r}_k} \quad 4.8$$

E sabendo-se que  $\overline{\cos \vec{h} \cdot \vec{r}} = \frac{\text{sen}(hr)}{hr}$ , tem-se,

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \sum_k \sum_j f_k f_j \frac{\text{sen}(h|\vec{r}_k - \vec{r}_j|)}{h|\vec{r}_k - \vec{r}_j|} \quad 4.9$$

Para partículas com distribuição contínua de pontos de espalhamento e densidade  $\rho(r)$ , a expressão (4.9) pode ser generalizada como segue:

$$\overline{F(h)} = \int_v \rho(r) \frac{\text{sen}(hr)}{hr} \cdot dv \quad 4.10$$

$$\text{ou } \overline{F(\mathbf{h})} = \int_0^\infty \rho(r) \frac{\text{sen}(hr)}{hr} \cdot 4\pi r^2 dr \quad 4.11$$

Assim, para se determinar a intensidade média, conforme (4.7), a expressão (4.11) torna-se:

$$\overline{F^2(\mathbf{h})} = \int_{\mathbf{v}} \int_{\mathbf{v}} \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2) \frac{\text{sen } h(\vec{r}_2 - \vec{r}_1)}{h(\vec{r}_2 - \vec{r}_1)} dv_1 dv_2 \quad 4.12$$

Sendo  $\vec{r}_2 - \vec{r}_1 = \vec{r}$ , com  $|\vec{r}| = r$  ou  $\vec{r}_2 = \vec{r}_1 + \vec{r}$ .

Em coordenadas esféricas,  $dv_2 = r^2 d\omega dr$ , e a equação (4.12) torna-se:

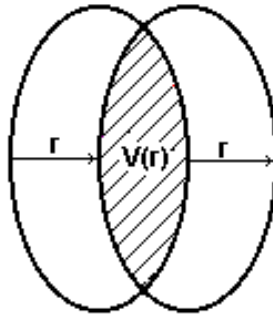
$$\overline{F^2(\mathbf{h})} = \int_{\mathbf{v}} \left\{ \rho(\vec{r}_1) \int_{\mathbf{v}} \rho(\vec{r}_1 + \vec{r}) \frac{\text{sen}(hr)}{hr} r^2 d\omega dr \right\} dv_1 \quad 4.13$$

Considerando que  $\rho(\vec{r}_1 + \vec{r})$  é igual a  $\rho$  se o ponto  $\vec{r}_1 + \vec{r}$  está dentro da partícula e, zero fora dela, determina-se:

$$\int_{\mathbf{v}} \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_1 + \vec{r}) dv_1 = \rho^2 V(\vec{r}) \quad 4.14$$

Considerando que a partícula se desloca de  $r$  sobre si mesma, o volume comum às duas “imagens”, será  $V(\vec{r})$ , que é função da direção do vetor  $\vec{r}$ , de valor médio  $\overline{V(\vec{r})}$  (figura 4.2).





**Figura 4.2** - Representação do deslocamento de uma partícula sobre si mesma definindo a função  $V(r)$ .

A equação (4.13) pode ser resolvida:

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \rho^2 \int_0^{4\pi} d\omega \int_0^\infty \overline{V(\vec{r})} \frac{\text{sen}(hr)}{hr} r^2 dr \quad 4.15$$

ou

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \rho^2 \int_0^\infty \overline{V(\vec{r})} \frac{\text{sen}(hr)}{hr} 4\pi r^2 dr \quad 4.16$$

Fixando-se um ponto dentro da partícula e tomando-se um outro ponto numa direção arbitrária a uma distância  $r$  do primeiro, a probabilidade de que este segundo ponto também pertença à partícula é dada pela função característica  $\gamma(r)$ . Essa função é usualmente normalizada para unidade na distância  $r = 0$ , isto é,

$$\gamma_0(r) = \frac{\gamma(r)}{\gamma(0)}$$

E ainda, pode ser escrita como:

$$\gamma_0(r) = \frac{\overline{V(r)}}{\overline{V(0)}} = \frac{\overline{V(r)}}{V} \quad 4.17$$

Onde  $V$  é o volume total da partícula.

Substituindo (4.17) em (4.16) :

$$\overline{F^2(\vec{h})} = V \rho^2 \int_0^\infty \gamma_0(r) \frac{\text{sen}(hr)}{hr} 4\pi r^2 dr \quad 4.18$$

Então, a função distribuição de distâncias  $p(r)$ , que representa a distribuição de distâncias  $r$  entre dois centros espalhadores dentro da partícula, pode ser definida como:

$$p(r) = 4\pi r^2 V \gamma_0(r) \quad 4.19$$

e a expressão (4.18), torna-se:

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \rho^2 \int_0^\infty p(r) \frac{\text{sen}(hr)}{hr} dr \quad 4.20$$

Multiplicando esse resultado por  $I_e(h)$ , determina-se a intensidade  $\overline{I(h)}$ , conforme proposto pela equação (4.7) (Guinier e Fournet, 1955).

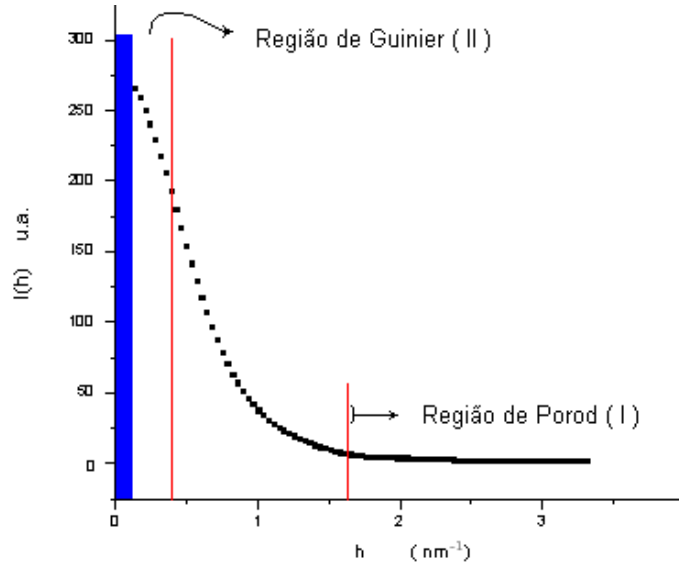
## 4.2 - Aproximações de Porod e Guinier

Na figura 4.3, é apresentada uma curva de intensidade de espalhamento típica de proteína, obtida por SAXS, da qual se pode destacar duas regiões (assinaladas I e II), uma na região de grandes ângulos e outra na de ângulos pequenos.

A região I ou região de Porod é obtida pela expansão de  $\gamma_0(r)$  em uma série (Guinier e Fournet, 1955), de onde se considera apenas os dois primeiros termos, e é dada por:

$$\gamma_o(r) = 1 - \frac{S r}{4 V} + \dots \quad 4.21$$

Onde S representa a superfície externa da partícula.



**Figura 4.3** - Curva de espalhamento representando as regiões de Porod (ver seção 5.3.3) e Guinier (ver seção 6.2). (Área em azul representa a região de atuação do *beam-stop*<sup>1</sup>.)

Considerando uma partícula esférica de raio R, substituindo (4.21) em (4.18) e resolvendo as integrais, temos:

$$\overline{F^2(h)} = \frac{V \rho^2 4 \pi}{h^3} \left[ \frac{2 S}{h 4 V} + A \cos hR + B \sen hR \right] \quad 4.22$$

onde,  $A = \frac{-4h^2RV + Sh^2R - 2S}{4hV}$  e  $B = 1 - \frac{SR}{2V}$

Para valores grandes de h os termos em senos e co-senos podem ser desprezados, resultando na expressão (4.23), conhecida por Lei de Porod.

$$\overline{F^2(h)} = \frac{2 \pi S \rho^2}{h^4} \quad 4.23$$

<sup>1</sup> Neste trabalho optou-se por manter o nome original em inglês do “parador” de feixe.

A região II ou região de Guinier também pode ser obtida por aproximação, desta vez, para valores de  $h$  pequenos (limites discutidos na seqüência do trabalho).

Podemos expandir o termo  $\frac{\text{sen } hr}{hr}$  em uma série ficando então,

$$\frac{\text{sen}(hr)}{hr} = 1 - \frac{h^2 r^2}{6} + \frac{h^4 r^4}{120} - \dots \quad 4.24$$

Para valores pequenos de  $h$ , podemos substituir os dois primeiros termos da (4.24) em (4.18), obtendo:

$$\overline{F^2(h)} = V\rho^2 \left[ \int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^2 dr - \int_0^\infty \gamma_0(r) \frac{h^2 r^4 4\pi}{6} dr \right]$$

A primeira integral é o próprio volume  $V$  e assim,

$$\overline{F^2(h)} = V^2\rho^2 \left[ 1 - \frac{h^2}{6V} \int_0^\infty 4\pi r^4 \gamma_0(r) dr \right] \quad 4.25$$

Fazendo uma analogia com a mecânica, o raio de giro pode ser definido como:

$$R_g^2 = \frac{1}{2V} \left[ \int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^4 dr \right] \quad 4.26$$

e a (4.25) torna-se

$$\overline{F^2(\mathbf{h})} = V^2 \rho^2 \left( 1 - \frac{h^2 R_g^2}{3} \right) \quad 4.27$$

Da série  $e^x = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \dots$ , escreve-se

$$\overline{F^2(\mathbf{h})} = V^2 \rho^2 e^{-\frac{h^2 R_g^2}{3}} \quad 4.28$$

A expressão (4.28) é conhecida como Lei de Guinier.

Assim, para as regiões de pequenos ângulos a função é do tipo exponencial e permite obter uma primeira informação aproximada do raio de giro da partícula.

Portanto, apenas o tamanho da partícula contribui significativamente para a região de Guinier, ao passo que para a região de Porod a forma da partícula é que tem maior relevância.

### 4.3 - Função distribuição de distâncias $p(r)$ e o raio de giro ( $R_G$ )

A função distribuição de distância  $p(r)$  contém informações sobre o meio espalhador. Ela representa o número de pares de elétrons separados pela distância  $r$ , os quais são encontrados pela combinação de qualquer elemento de volume  $i$ , com outro,  $k$ , da mesma partícula. A função distribuição de distância pode ser obtida a partir de  $I(h)$ :

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} \gamma(r) r^2 \frac{\text{sen}(hr)}{hr} dr \quad 4.29$$

com  $p(r) = \gamma(r) r^2$ , ou

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\text{sen}(hr)}{hr} dr \quad 4.30$$

E a transformada de Fourier inversa será:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(h) hr \text{sen}(hr) dh \quad 4.31$$

e o raio de giro  $R_G$  pode ser escrito como:

$$R_G^2 = \frac{\int_0^{\infty} p(r) r^2 dr}{2 \int_0^{\infty} p(r) dr} \quad 4.32$$

O raio de giro dado pela expressão acima oferece a vantagem de ser calculado usando toda a curva de intensidade de espalhamento, ao contrário do método de Guinier, que só é válido para a região onde  $h$  é pequeno.

# 5 - Materiais e Métodos

---

## 5.1 - A técnica de SAXS

### 5.1.1 - Introdução

Os experimentos de SAXS foram feitos usando-se um gerador de raios X com ânodo rotatório, RIGAKU - RU 300. Este equipamento permite operação com alta potência e estabilidade na saída, resultando numa melhor qualidade dos dados coletados. Por utilizar ânodo de cobre, foi selecionada radiação  $K_{\alpha}$  com comprimento de onda de  $1,54 \text{ \AA}$  e, por meio de filtro de Ni de  $20\mu\text{m}$  de espessura, foi eliminada a radiação  $K_{\beta}$ . A potência de operação utilizada neste trabalho foi de  $4,5 \text{ kW}$  ( $50 \text{ kV}$  -  $90 \text{ mA}$ ).

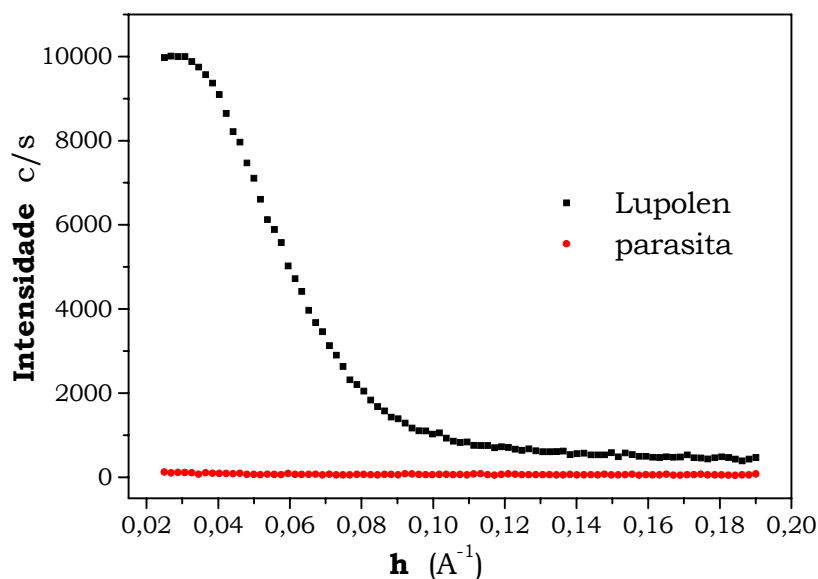
O feixe de raios X foi colimado por um sistema de colimação de Kratky (Glatter e Kratky, 1982), o que lhe confere um perfil retangular. A incidência da radiação é feita, por um tempo preestabelecido, sobre as amostras em solução dentro de capilares de quartzo colocados diretamente no vácuo.

O espalhamento é então registrado por um detector acoplado a um sistema eletrônico e a um multicanal-analisador e os dados coletados são, por fim, armazenados em computador, que através de um gráfico de intensidade (contagens) por ângulo de espalhamento (canal do detector), fornece todas as informações necessárias para análise do material.

## 5.2 - Procedimento experimental

### 5.2.1 - Calibração do sistema de colimação

A calibração do sistema de colimação é de fundamental importância para uma boa qualidade dos dados coletados, pois dela depende não só a forma e a intensidade do feixe, mas também, o alinhamento entre amostra e feixe de incidência, quantidade de espalhamentos parasitas e ainda, alguns parâmetros para posterior correção das curvas de intensidade. Dessa forma, especial atenção foi dada à calibração e alinhamento do feixe antes da análise de qualquer material deste trabalho. Na figura 5.1, é mostrado um gráfico de intensidade de espalhamento que compara os espalhamentos parasitas com o espalhamento da amostra padrão Lupolen, cujas características estão bem determinadas na literatura (Kratky *et al*, 1966; Pilz, 1969; Shaffer e Hendricks, 1973).



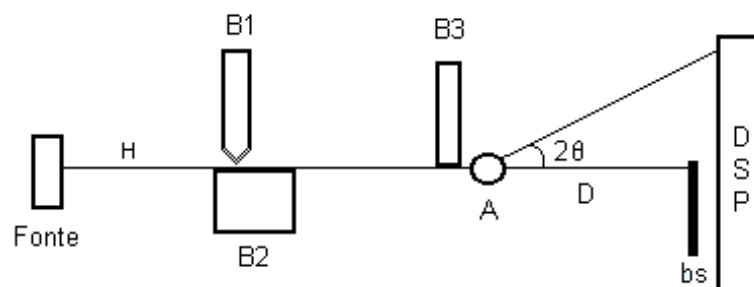
**Figura 5.1** – Comparação entre os espalhamentos parasitas e o espalhamento da amostra padrão Lupolen.



Como mencionado, para aumentar a intensidade da radiação incidente, foi utilizado feixe com seção transversal retangular de aproximadamente 25mm x 1mm. Esse perfil foi conseguido por um sistema de colimação Kratky que utiliza uma configuração de três blocos com a vantagem de diminuir consideravelmente espalhamentos parasitas, muito comuns e intensos nos sistemas mais simples que utilizam apenas dois blocos, principalmente nas regiões de mais baixos ângulos (Glatter e Kratky, 1982).

Um esquema de funcionamento do sistema usado é mostrado na figura 5.2, onde os blocos  $B_2$  e  $B_3$  possuem superfícies extremamente polidas e são posicionados de tal forma que os planos de ambos coincidam formando o plano principal H. Um terceiro bloco ajustável,  $B_1$ , define a fenda de entrada e é localizado atrás da janela de entrada, entre a câmara e o tubo de raios X. No interior da câmara é feito vácuo para impedir a atenuação do feixe pelo ar e também diminuir os espalhamentos parasitas.

A amostra é colocada diretamente após o sistema de colimação e na parte final da câmara está o *beam-stop*, um anteparo usado para evitar danos ao sistema de detecção pela incidência direta do feixe.



**Figura 5.2** - Sistema de colimação de Kratky (vista lateral).  
Onde:

B1, B2 e B3: blocos com superfície polida

D.S.P.: detector sensível à posição

D: distância da amostra ao D.S.P.

bs : *beam-stop*

A : amostra

H : plano principal

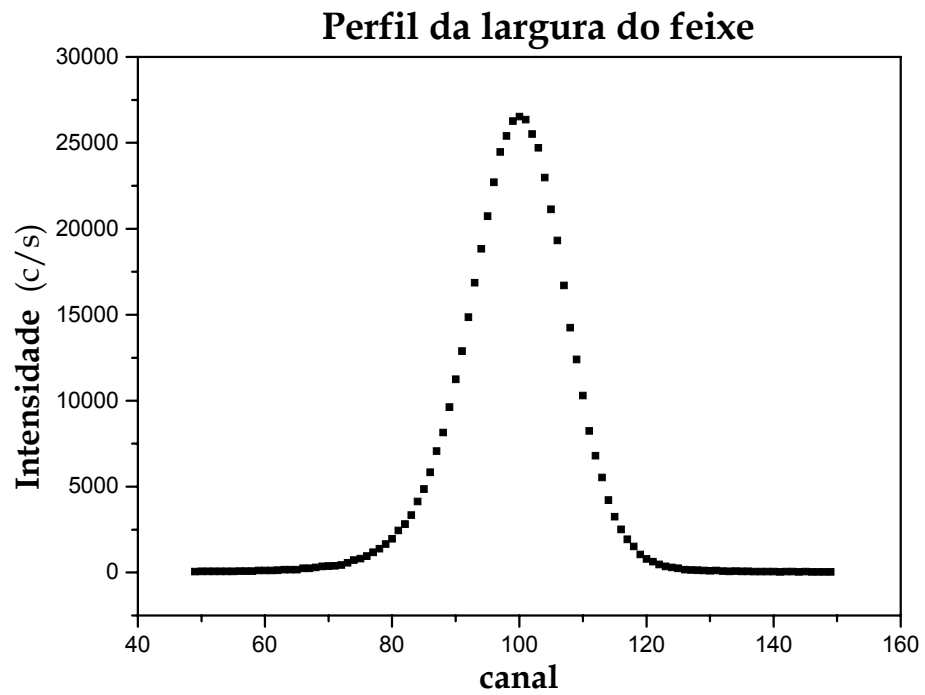
$2\theta$ : ângulo de espalhamento

### 5.2.2 - Perfil do feixe

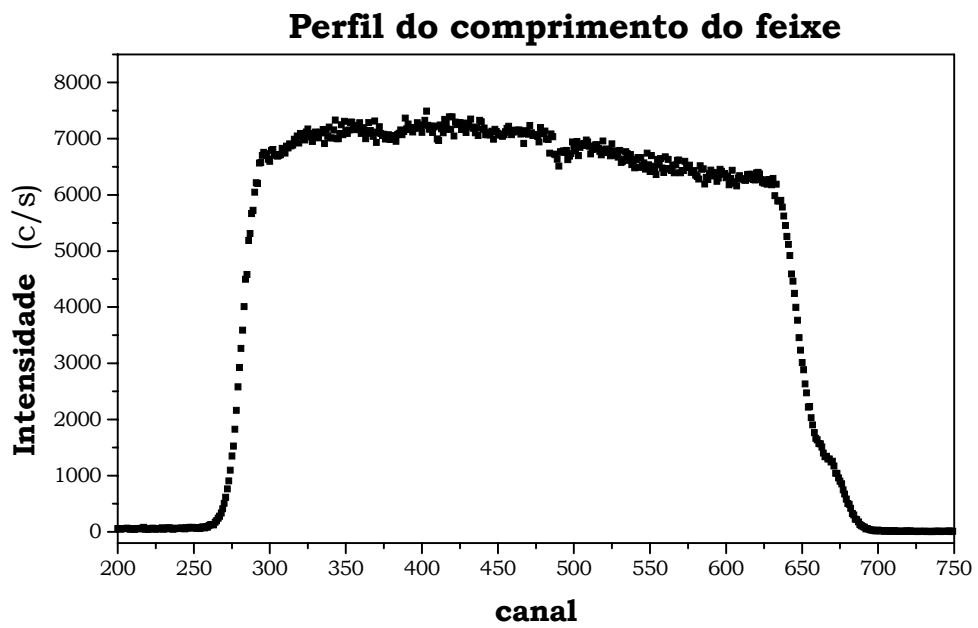
As informações sobre o perfil do feixe são obtidas pelas intensidades registradas ao longo da largura e do comprimento do feixe. Na direção da largura, a medida é feita pela incidência direta sobre o detector sem a presença do *beam-stop*, com o gerador operando com potência mínima e uso de filtro de níquel na janela de entrada. Os valores da intensidade de cada canal são então registrados e armazenados em computador. Posteriormente, um gráfico de intensidade pelo número de canal é construído, conforme figura 5.3, sendo que o pico deste gráfico determina a posição inicial de medida, isto é, o canal zero.

O mesmo procedimento é usado para se obter as informações do comprimento do feixe, mas girando-se o detector 90° em relação à posição original e registrando a intensidade por um tempo determinado. Como resultado, obtém-se um gráfico de intensidade com uma região aproximadamente constante, conforme mostrado na figura 5.4.

Esses dados são utilizados durante o processamento dos dados experimentais de forma a serem feitas as correções necessárias para eliminar a contribuição no espalhamento devida ao sistema de colimação, uma vez que a teoria foi desenvolvida para um feixe pontual e monocromático.



**Figura 5.3** - Gráficos do perfil da largura do feixe obtido pelo sistema de colimação.



**Figura 5.4** - Gráficos do perfil do comprimento do feixe obtido pelo sistema de colimação.

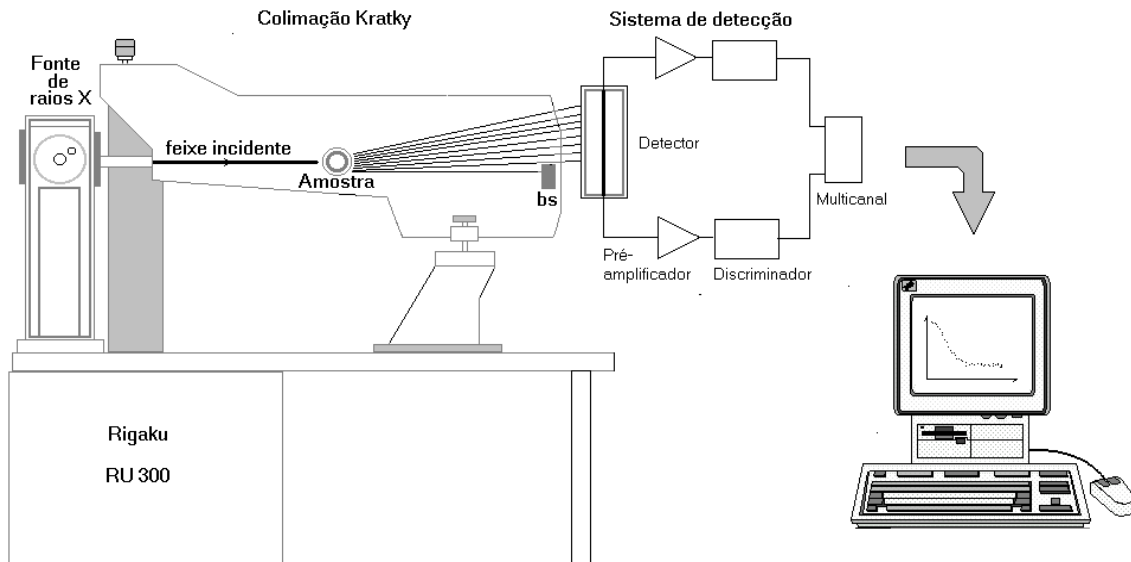
### 5.2.3 - Detector Sensível à Posição (PSD)

As informações da intensidade em função do ângulo de espalhamento foram conseguidas por um detector a gás sensível à posição que registra a posição de incidência de cada fóton sobre um filamento.

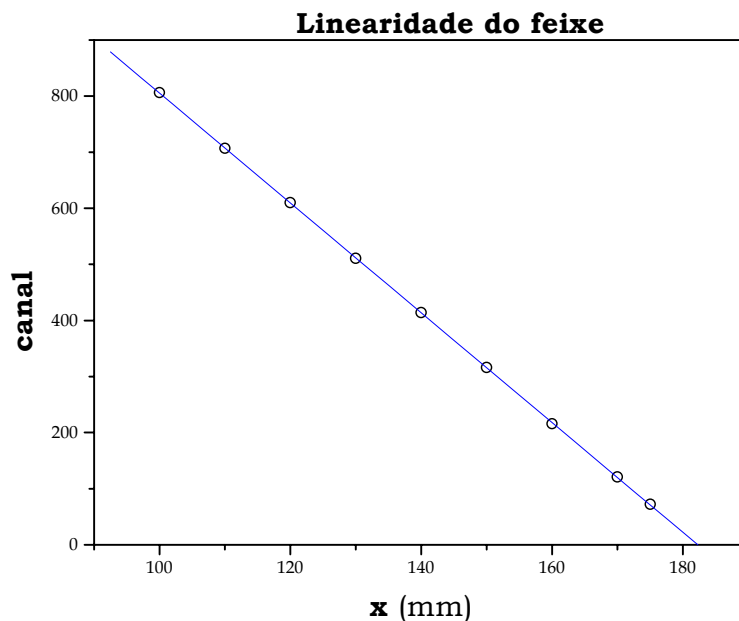
A origem do sinal está na interação, por efeito fotoelétrico, dos fótons incidentes com as moléculas do gás no interior do detector, que se ionizam liberando elétrons que são acelerados por um campo elétrico na direção do filamento. Durante esse trajeto, devido a colisões com as moléculas do gás, outros elétrons são liberados e, por efeito avalanche, uma alta densidade de carga chega à superfície do filamento gerando dois sinais que percorrem caminhos distintos. Assim, a posição de incidência é determinada pela diferença dos tempos de chegada desses sinais a um circuito discriminador de pulsos e um multicanal (Barbosa, 1994). Como resposta, tem-se uma curva de espalhamento cuja intensidade é dada em unidades arbitrárias (chamada na prática de “contagens”), por ser uma medida proporcional ao número de fótons incidentes em função da posição de incidência (canal). Na figura 5.5 é mostrado um esquema de todas os estágios percorridos pelo feixe de raios X, desde a geração até a obtenção das curvas de espalhamento.

Continuando com o processo de calibração, depois de obtidas as curvas do perfil do feixe, é verificada a linearidade do detector através de um gráfico do canal pela posição em milímetros, como mostrado na figura 5.6.

Desse gráfico, é calculado o passo, que é a distância entre dois canais consecutivos, utilizado para posterior conversão de canal para unidade de transferência de momento,  $h$ , por exemplo  $\text{\AA}^{-1}$  ou  $\text{nm}^{-1}$ .



**Figura 5.5** – Esquema dos estágios percorridos pelo feixe até a obtenção das curvas de espalhamento.



**Figura 5.6** - Gráfico de linearidade do detector para conversão de canal para unidade  $h$ .

#### **5.2.4 – Amostras**

Toda as amostras das proteínas estudadas neste trabalho foram conseguidas graças à colaboração entre grupos de pesquisas envolvendo o grupo coordenado pelo prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior, do Departamento de Física da Unesp de São José do Rio Preto-SP, e o grupo do prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, do Departamento de Química da Unesp de São José do Rio Preto-SP.

##### **5.2.4.1 - Hemoglobinas de serpentes**

As amostras de hemoglobinas dos espécimes de *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops alternatus* e *Liophis miliaris* foram fornecidos pelo Instituto Butantan e alguns dos exemplares de *Crotalus durissus terrificus* foram cedidas pelo Bosque Municipal de São José do Rio Preto, purificadas e preparadas pelo grupo do prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez.

A coleta foi feita fazendo punção direta na aorta dos animais que pesaram em média 500g. Para manter a integridade das hemácias, o sangue foi colocado em tubos com solução salina, TRIS-HCl 50mM pH 8,0, 0,9% p/v NaCl, 0,2% p/v glicose e EDTA 1mM, e foram feitas pelo menos três lavagens do sangue coletado antes da hemólise das hemácias em centrífuga Incibrás a 290g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, promoveu-se a hemólise em tampão TRIS-HCl 50mM pH 9,2 e, para a retirada de material celular, o

hemolisado total foi submetido à centrifugação por 90 minutos a 1162g em centrífuga Incibrás refrigerada a 4°C. Posteriormente, concentrou-se o sobrenadante na mesma centrífuga a 653g a 4°C, utilizando-se concentradores Centriprep 50 (Amicon). As amostras foram estocadas em nitrogênio líquido.

O sangue das serpentes foi submetido primeiramente a uma coluna 2,6 x 22cm (Bio-Rad) de filtração em gel preenchida com Sephadex G-25 (Sigma), para exclusão de moléculas de baixa massa molecular (abaixo de 3kDa). Em seguida, o hemolisado total foi aplicado a uma coluna de mesmas dimensões anteriores, a qual foi preenchida com Sephacryl S-100 (Sigma) com o intuito de se excluir proteínas de massas moleculares diferentes da hemoglobina. Ambas as colunas foram equilibradas com tampão TRIS-HCl 50mM pH 9,2 com adição de NaCl 0,2M, para inibir a adsorção de amostra à resina, principalmente com relação a Sephacryl S-100. Estes passos de purificação, por filtração em gel, foram incluídos visando obter amostras mais puras, para não comprometer a qualidade dos resultados dos experimentos com contaminantes.

Apenas o hemolisado total de *Crotalus durissus terrificus* foi submetido a uma coluna 2,6 x 22cm (Sigma) de troca aniônica (DEAE Sepharose Fast Flow (Pharmacia)). Esta foi equilibrada com tampão TRIS-HCl 50mM pH 9,2 e a eluição da amostra foi feita com gradiente salino de 0 a 50mM de NaCl.

Posteriormente, o pH foi trocado, através de diálise, para pH 7,0 usando tampão ADA 30mM e pH 8,0, usando tampão TAPS 30mM, condições nas quais foram efetuadas as medidas de SAXS.

As concentrações das hemoglobinas de serpentes, que foram analisadas por SAXS utilizando extrapolação à concentração zero, variaram de 17mg/ml a 35mg/ml. Nas situações em que não foi utilizada extrapolação, as concentrações foram de 10mg/ml e 12mg/ml.

#### **5.2.4.2 - Hemoglobina de peixe**

A hemoglobina de *Hoplosternum littorale* foi conseguida por intermédio do prof. Dr. Walter Filgueira de Azedo Jr, responsável pela purificação e preparação das amostras. Os exemplares de peixes utilizados foram conseguidos junto ao Biotério da Unesp Ibilce – São José do Rio Preto.

Espécimes adultos de *Hoplosternum littorale* foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (1g para 15 litros de água) por cerca de cinco minutos. O sangue dos animais foi coletado por punção da veia caudal com seringa e agulha descartáveis, contendo 1ml de solução salina tamponada (TRIS-HCl 50 mM pH 8,0 com NaCl a 0,9%p/v, EDTA 1mM e D-Glicose 0,2% p/v). O sangue foi transferido imediatamente para tubos de centrífuga de polipropileno (Corning 50mL) contendo solução salina.

Em seguida os tubos foram centrifugados quatro vezes a 380g durante 7 minutos à temperatura de 4°C, com retirada do sobrenadante no final de



cada rodada e acrescida de tampão salino previamente descrito, porém sem glicose (Honda *et al.*, 2000).

A hemólise foi realizada por acréscimo de tampão 50mM TRIS pH 9,0 seguido por centrifugação (1520g por 20 minutos), sendo o sobrenadante concentrado em concentradores centriprep 50 da Amicon. O hemolisado foi submetido à coluna de filtração em gel preenchida com Sephacryl S-100HR (2,6x18cm) em ambiente refrigerado a 4°C sendo a coluna equilibrada com tampão TRIS-HCl 50mM pH 9,2. Novamente as amostras foram concentradas por centrifugação.

A separação das isoformas da hemoglobina foi feita por cromatografia de troca iônica em colunas (2,6 x 15 cm) preenchidas por DEAE-Sepharose a 4°C, com um gradiente linear salino de eluição (0 a 100mM de NaCl, em volume de 150 ml) em tampão TRIS 50mM pH 9,2. As frações foram concentradas por centrifugação e tiveram acréscimo de volume de tampão TRIS-HCl 50mM pH 9,2 (3 vezes o volume da amostra) com intuito de substituir o tampão anterior, seguido de nova concentração e posterior armazenamento em nitrogênio líquido até o momento de uso.

A hemoglobina na forma desoxigenada foi preparada a partir da mesma amostra, como descrito anteriormente, mantida sob fluxo de N<sub>2</sub> por um tempo mínimo de 1 hora. Logo em seguida, foi inserida em capilar de quartzo o qual foi hermeticamente fechado após a transferência.

As medidas de SAXS das hemoglobinas nas duas condições foram feitas em uma única concentração de 12mg/ml.

#### **5.2.4.3 – Purina nucleosídeo fosforilase (PNP)**

As amostras de PNP, obtidas por clonagem e superexpressão, foram fornecidas pelo prof. Dr. Diógenes Santiago Santos do grupo de Microbiologia Molecular e Funcional do Departamento de Biologia Molecular Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da UFRGS, em colaboração com o prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr.

As medidas de SAXS foram feitas com a amostra em solução na concentração de 12mg/ml em tampão 10mM dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 7,1.

#### **5.2.4.4 – EPSP Sintase**

As amostras de EPSP sintase foram obtidas através dos mesmos processos da PNP humana descrito anteriormente e fornecidas pelos mesmos grupos de pesquisas. As medidas de SAXS foram feitas com as amostras em solução na concentração de 12mg/ml, em dois tampões: 50mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  com 50mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,8 e 50mM de TRIS-HCl, 25mM KCl, 2,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,6.

#### **5.2.4.5 – Crotoxina**

As amostras de crotoxina foram cedidas pelo prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. As amostras liofilizadas foram diluídas em tampão 10mM de  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 60mM de KCl, 10mM de  $\text{MgCl}_2$ , 6mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 3,5, e a concentração final foi de 10mg/ml.

#### **5.2.4.6 – Condições das amostras para coleta por SAXS**

As amostras foram colocadas em capilares de quartzo de diâmetro interno de 1 mm. As medidas que utilizaram extrapolação à concentração zero foram feitas em concentrações que variaram de 10mg/ml a 35mg/ml e sempre foram efetuadas medidas em quatro concentrações diferentes. O tempo de exposição aos raios X foi de 3 horas, tanto para as amostras de proteínas quanto para os tampões. Nos casos em que se utilizou uma única medida, as concentrações ficaram ao redor de 10mg/ml a 12mg/ml e o tempo de exposição foi de 10 horas, inclusive para os tampões.

Em medidas de longo tempo de exposição, após a terceira hora de medida, foi feita uma verificação, de hora em hora, do raio de giro para identificar possíveis degradações das amostras devido aos raios X.

A temperatura foi mantida aproximadamente constante em 20°C.

Como a intensidade espalhada é função da diferença entre as densidades eletrônicas do solvente e soluto, deve-se evitar tampões com altas concentrações de sal para que não haja mascaramento da intensidade espalhada pela proteína.

### **5.3 - Tratamento dos Dados**

#### **5.3.1 - Normalização das curvas de espalhamento**

A teoria de SAXS é desenvolvida para sistemas constituídos por uma única molécula livre de qualquer influência externa. Na prática, os dados são coletados de proteínas diluídas em tampão e a solução é, então, inserida em

capilares de vidro ou quartzo. Assim, é necessário subtrair, das curvas de espalhamento da solução, as contribuições do espalhamento do tampão e do capilar. Ainda, para que possam ser comparadas, as várias curvas de intensidade das várias amostras devem ser normalizadas em relação ao tempo de exposição à radiação, à intensidade do feixe direto e à espessura dos capilares, de acordo com a expressão (5.1).

$$J_N(h) = \frac{J_{\text{Solução}}(h)}{Fd_{\text{Solução}} \Delta t \cdot \Delta x} - (1 - w) \frac{J_{\text{Tampão}}(h)}{Fd_{\text{Tampão}} \Delta t \cdot \Delta x} \quad 5.1$$

onde:

$J_N(h)$ : intensidade de espalhamento normalizada

$J_{\text{Solução}}(h)$ : intensidade de espalhamento da solução

$J_{\text{Tampão}}(h)$ : intensidade de espalhamento do solvente

$Fd$ : intensidade média do feixe direto entre as medidas

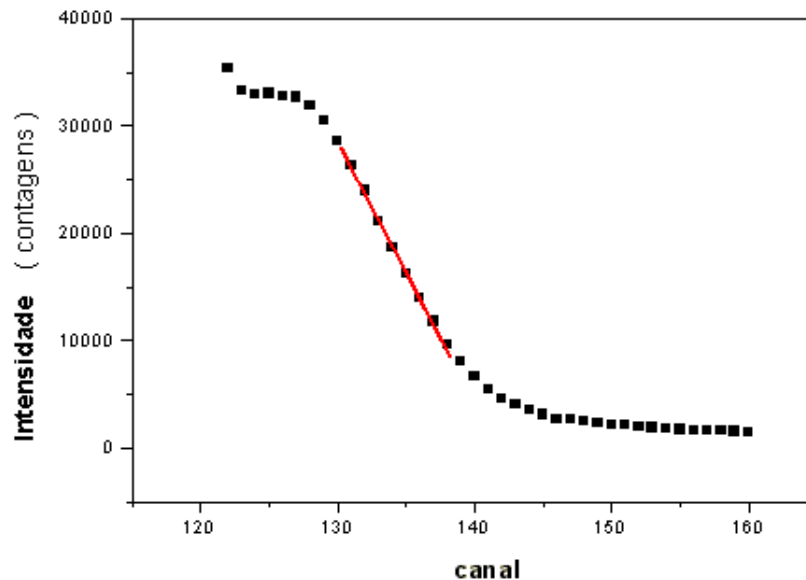
$w$ : fração do volume ocupado pela proteína

$\Delta t$ : tempo de exposição

$\Delta x$ : espessura da amostra

A intensidade do feixe direto é obtida do espalhamento de amostra padrão, neste caso, Lupolen (Kratky *et al*, 1966; Pilz, 1969; Shaffer e Hendricks, 1973), pois a energia do feixe primário é muito intensa, excedendo a capacidade do detector, podendo danificá-lo. O Lupolen foi escolhido como amostra padrão por ser quimicamente estável e suficientemente homogêneo para dar intensidades constantes e não sofrer alterações pela exposição à radiação, mesmo para longo tempo. A figura 5.7

mostra uma curva de espalhamento de Lupolen indicando a região linear, característica desse tipo de material, de onde é extraído o valor da intensidade do feixe direto.



**Figura 5.7** - Curva de intensidade da amostra padrão Lupolen, da qual é calculada a intensidade do feixe direto a partir da região linear (indicada pela linha).

### 5.3.2 - Extrapolação à concentração zero

Como qualquer outra técnica aplicável à biofísica, o espalhamento de raios X a baixos ângulos está sujeito a certas limitações que podem impossibilitar completamente ou em parte a análise de determinados sistemas. Deve ser ressaltado que SAXS é uma técnica de baixa resolução e, mesmo em condições ideais, detalhes em níveis atômicos não podem ser obtidos. Um dos fatores que podem limitar o tipo de material que se consegue analisar com essa técnica é o próprio aparato experimental, pois

dependendo das condições, não se pode atingir as regiões de mais baixos ângulos o que compromete o estudo de moléculas maiores. Já, moléculas muito pequenas produzem baixo espalhamento e conseqüentemente altos erros estatísticos. Sendo assim, existe uma faixa limitada de tamanhos de proteínas dentro da qual se é possível aplicar SAXS.

Um outro fator importante que limita em parte o estudo por SAXS é a quantidade de proteína utilizada numa medida. Uma vez que a teoria de SAXS é desenvolvida para sistemas compostos por uma única partícula, e conseqüentemente, interações interpartículas não são consideradas, para contornar tal problema, a amostra deve ser suficientemente diluída para diminuir tais efeitos. Mas, soluções desse tipo também ficam sujeitas a erros estatísticos elevados, devido à fraca intensidade de espalhamento que produzem. Então, várias medidas, em concentrações diferentes, são feitas para posterior extrapolação à concentração zero. Por esse motivo, uma grande quantidade de material é consumido em uma única condição de medida.

A título de ilustração, uma análise de certa proteína em que são efetuadas medidas de quatro concentrações para posterior extrapolação, por exemplo, concentrações que variam de 20mg/ml a 35mg/ml, seriam gastos, aproximadamente, 10mg de material, o que na maioria das situações é uma enormidade. Perante isso, uma proposta deste trabalho foi também de se realizar uma única medida em concentração mais baixa, cerca de 10mg/ml, compensada por um maior tempo de exposição à radiação. Com isso, os

erros estatísticos são diminuídos, e como conseqüência, obtêm-se apreciável redução na quantidade de proteína, em torno de 1mg, tornando-se mais acessível a análise do material. Foram feitos vários testes pelos dois métodos para comparação com diversas proteínas, sendo que aqueles com hemoglobinas são apresentados na parte de resultados deste trabalho.

### 5.3.3 - *Background*

A teoria de SAXS é baseada em sistemas de duas fases de densidades eletrônicas diferentes, mas sem flutuações dentro de cada uma delas, o que não ocorre nas soluções de proteínas. Portanto, este espalhamento, denominado *background*, deve ser corrigido, pois ignorá-lo pode levar a fortes oscilações na função  $p(r)$  ou a um aumento dos valores na  $p(r)$  quando  $r$  tende a zero.

Uma maneira de se fazer essa correção é através do método desenvolvido por Porod (Porod, 1951) e Luzzati (Luzzati, 1960), baseado na equação (4.23), em que a intensidade de espalhamento a ângulos mais altos pode ser escrita como:

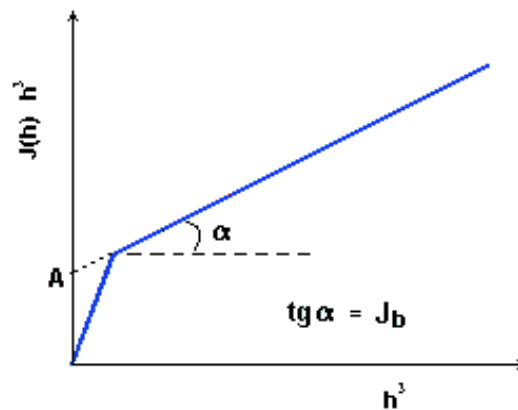
$$I(h) = \frac{A}{h^4} + I_b(h) \quad 5.2$$

ou ainda, na intensidade não corrigida pelo perfil do feixe, tem-se:

$$J(h) = \frac{A}{2\pi h^3} + J_b(h) \quad 5.3$$

onde  $A$  é a constante de Porod, que pode ser determinada pela intersecção da reta do gráfico de Porod com o eixo das ordenadas (figura 5.8), e  $J_b(h)$  é a intensidade de espalhamento devido às flutuações de densidade eletrônica.

$J_b(h)$  pode ser considerado constante ( $J_b$ ) e tem o valor do coeficiente angular da reta obtida de um gráfico de  $J(h) h^3 \times h^3$  (gráfico de Porod), conforme indicado no gráfico da figura 5.8.



**Figura 5.8** - Esboço de gráfico de  $J(h) h^3 \times h^3$  representando o afastamento da lei de Porod devido às flutuações da densidade eletrônica da solução.

#### 5.3.4 - Programa ITP

O último passo para o tratamento dos dados de SAXS é a obtenção das funções  $I(h)$  e  $p(r)$  a partir das curvas de espalhamento experimentais  $J(h)$ . A função  $I(h)$  é calculada subtraindo as contribuições devidas ao sistema de colimação do feixe que estão presentes nas curvas  $J(h)$  experimentais e a função  $p(r)$  é determinada fazendo-se uma transformada inversa de Fourier na  $I(h)$ . Para isso, é utilizado o método da transformação indireta de Fourier desenvolvido por Glatter, através do programa



computacional ITP (Indirect Transformation for the calculation of  $p(r)$ ) (Glatter, 1977; 1980a; 1983; Muller e Glatter, 1982; Pilz *et al*, 1979).

A função  $p(r)$  é proporcional ao número de distâncias de comprimento  $r$  entre dois centros espalhadores, que estejam, obrigatoriamente, dentro da partícula. Cada uma dessas distâncias leva consigo uma dependência angular com a intensidade de espalhamento, a qual pode ser expressa matematicamente por meio de uma transformada de Fourier. O programa ITP, então, calcula essa função distribuição de distâncias -  $p(r)$  - e ainda faz as devidas transformações na intensidade experimental, em relação ao comprimento de onda e ao sistema de colimação.

Para as transformações relacionadas ao sistema de colimação, considera-se que a radiação incidente tenha uma distribuição homogênea ao longo do perfil do feixe. Usando  $t$  como a coordenada do centro do feixe primário na direção do comprimento, e  $x$ , a coordenada perpendicular a  $t$ , a intensidade  $I_0(t,x)$  pode ser escrita, então, como um produto de duas distribuições independentes, tal como:

$$I_0(t,x) = P(t) \cdot Q(x) \tag{5.4}$$

Primeiramente, é analisada a transformação do comprimento do feixe e, para isso, é estabelecido inicialmente que a largura seja infinitamente pequena. Então, o feixe primário, com sua distribuição de intensidade  $P(t)$ , produz uma intensidade espalhada  $I(m)$ , em que  $m$  é a

medida da distância entre o feixe espalhado e o centro do feixe primário no plano de registro.

Portanto, a intensidade espalhada  $I(m)$  é dada por (Glatter e Kratky, 1982) :

$$I(m) = \int_{-\infty}^{\infty} P(t) I(\sqrt{m^2 + t^2}) dt \quad 5.5$$

Agora, com relação à largura do feixe, é considerada uma distribuição de intensidade  $Q(x)$ , que pelo mesmo princípio do comprimento tem-se:

$$I'(m) = \int_{-\infty}^{\infty} Q(x) I(m - x) dt \quad 5.6$$

Vale ressaltar que as transformações referentes ao comprimento de onda não se fazem necessárias neste trabalho, pois foram utilizados feixes aproximadamente monocromáticos obtidos da radiação  $CuK_{\alpha}$  e filtros de Ni para eliminação de  $k_{\beta}$ .

A intensidade experimental pode ser obtida então, pela expressão:

$$I_{\text{exp}}(h) = 8 \pi \int_{-\infty}^{\infty} dx \int_0^{\infty} dt \int_0^{\infty} dr Q(x) P(t) p(r) \frac{\text{sen } \beta}{\beta} \quad 5.7$$

onde  $\beta = r [(h-x)^2 + t^2]^{1/2}$

A função distribuição de distâncias é, então, aproximada por uma série de N funções “ $\beta$ -splines” ( $\phi_v(r)$ ) definida no intervalo  $0 \leq r \leq D_{\text{max}}$ .

$$\text{Ou seja, } p(r) = \sum_{v=1}^N c_v \varphi_v(r) \quad 5.8$$

$D_{\max}$  é um valor estimado para a máxima dimensão  $D$  da partícula.

Fazendo-se uma transformada de Fourier da expressão 5.8, obtém-se a intensidade, sem os efeitos do sistema de colimação, em termos da função  $\Psi_v(h)$ , definida por:

$$I(h) = \sum_{v=1}^N c_v \Psi_v(h) \quad 5.9$$

Em seguida, são introduzidos os efeitos referentes ao perfil do feixe e ao comprimento de onda (quando necessário) através de outra transformação, obtendo-se a função  $\chi_v(h)$ . Esta função representa a intensidade de espalhamento não corrigida e é definida como:

$$I(h) = \sum_{v=1}^N c_v \chi_v(h) \quad 5.10$$

Os coeficientes  $c_v$  devem, então, ser determinados através de um ajuste com os dados experimentais pelo método dos mínimos quadrados, tal que represente uma aproximação ótima, ou seja:

$$\frac{\sum_{i=1}^M [I_{\text{exp}}(h_i) - \sum_{v=1}^N c_v \chi_v(h_i)]^2}{\sigma^2(h_i)} = \text{mínimo} \quad 5.11$$

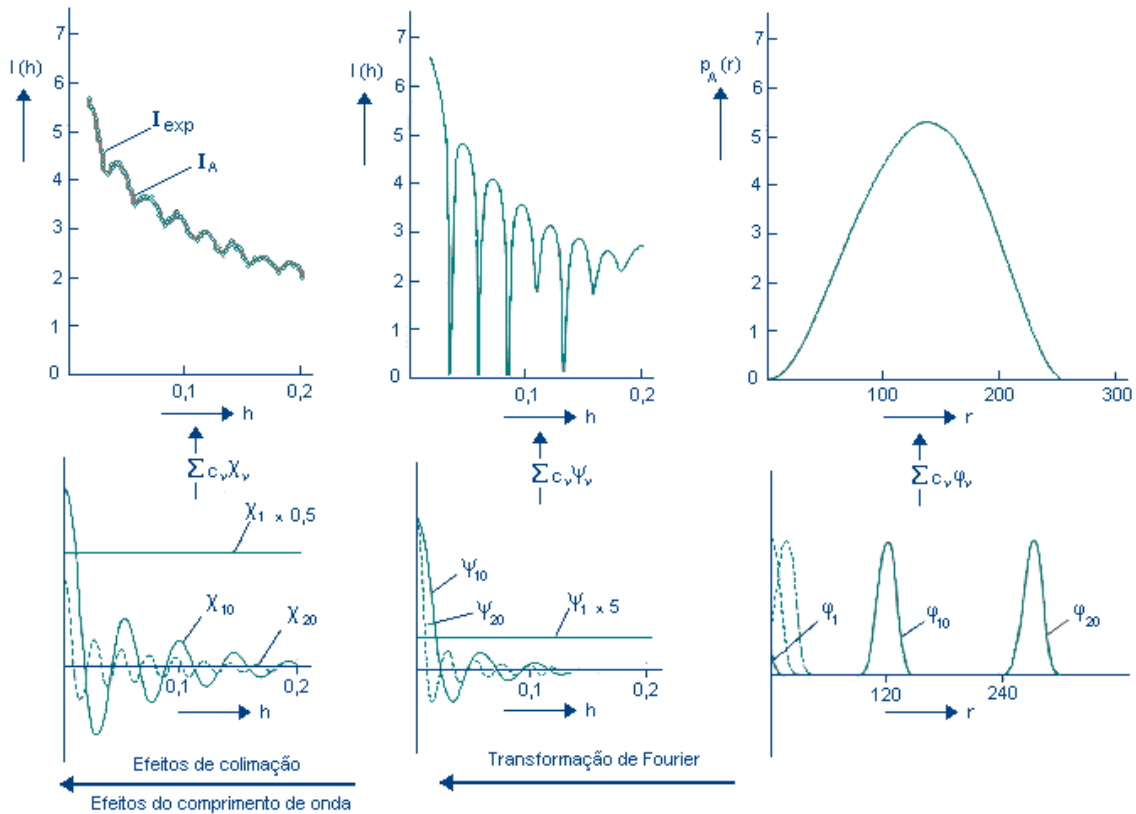
Em que:  $M$ , número de dados experimentais e  $\sigma^2(h_i)$ , variância do  $i$ -ésimo ponto.

Por fim, conhecidos os coeficientes, o programa aplica novamente as todas as transformações mencionadas até a obtenção da função  $p(r)$ . A figura 5.9 mostra um esquema das transformações executadas pelo programa ITP.

O raio de giro pode ser calculado a partir da função  $p(r)$ :

$$R_G^2 = \frac{\int_0^D P(r)r^2 dr}{2 \int_0^D P(r) dr} \tag{5.12}$$

Assim, o raio de giro calculado desta maneira utiliza todos os pontos da curva de espalhamento, e a consequência disto, é uma maior precisão nos resultados se comparado com o método de Guinier.

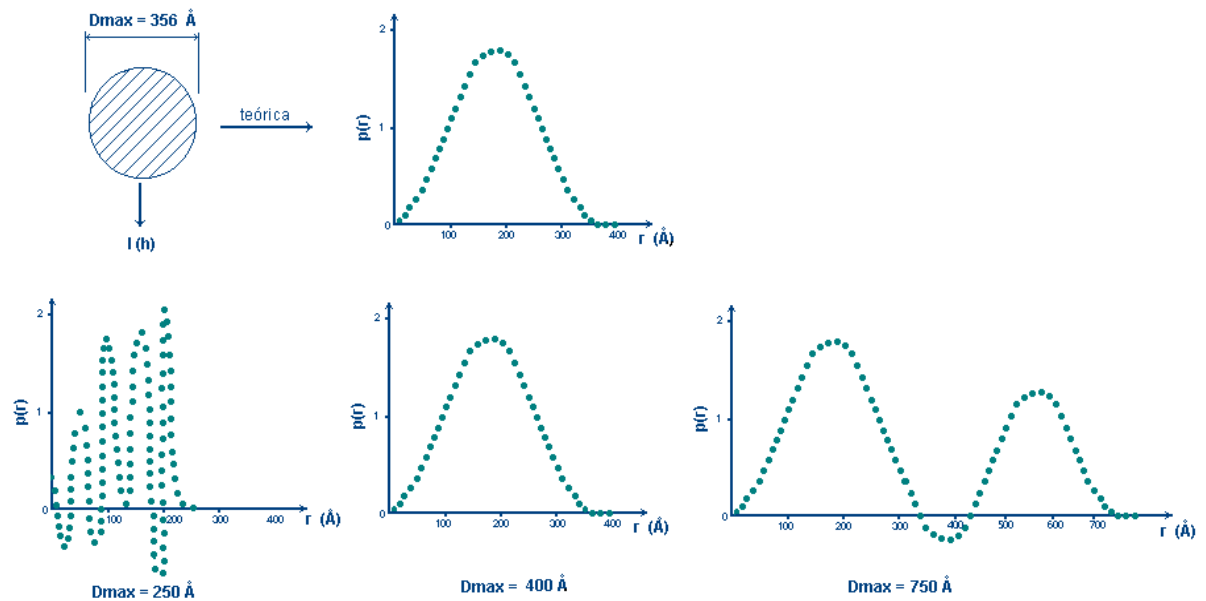


**Figura 5.9** - Método da transformação indireta usado no programa ITP.

### 5.3.5 - Máxima dimensão da partícula - $D_{\max}$

Como comentado, a função distribuição de distâncias  $p(r)$ , assume valor zero, tanto para  $r = 0$ , quanto para  $r \geq D_{\max}$ . A máxima dimensão da partícula, é então, um valor estimado dessa função nesse limite.

Na realidade,  $D_{\max}$  é um dos dados de entrada do programa computacional ITP e quando nenhuma informação sobre as dimensões da macromolécula é conhecida, o valor de  $D_{\max}$  pode ser estimado. Neste caso, a escolha de um valor muito abaixo do real leva a fortes oscilações na  $p(r)$  e, por outro lado, superestimar  $D_{\max}$ , também conduz a erros, ou seja, ocorre formação de mais de uma região na  $p(r)$ . Então, encontrado um valor para  $D$  que não produza as deformações mencionadas, o valor de  $D_{\max}$  será aquele na qual a função corta o eixo  $r$ . A figura 5.10 mostra um exemplo de cálculo de  $D_{\max}$  de um modelo teórico de uma esfera cuja dimensão máxima é conhecida e igual a 356Å.



**Figura 5.10** - Função  $p(r)$  do modelo teórico de uma esfera para diferentes valores de  $D_{\max}$ .

### 5.3.6 - Programa MULTIBODY

Algumas moléculas em estudo não podem ser aproximadas satisfatoriamente por modelos triaxiais simples, como elipsóides, prismas e outros. Porém, alguns métodos podem ser utilizados para a geração de modelos compostos de vários corpos triaxiais distribuídos espacialmente, como é o caso do programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980b; 1983). Esses modelos são constituídos por uma grande quantidade de pequenas subunidades esféricas ou cúbicas idênticas. Assim, o programa calcula uma curva de intensidade teórica do modelo e a sua respectiva função distribuição de distâncias,  $p_{\text{teor}}(r)$ , a qual deve, posteriormente, ser comparada à função  $p(r)$  experimental,  $p_{\text{exp}}(r)$ . Esses modelos são compostos de várias esferas pequenas, de raios predefinidos, distribuídas espacialmente

em coordenadas também definidas. As esferas podem ainda ser separadas em blocos com liberdade de movimento entre si, tanto de rotação quanto de translação.

A intensidade de espalhamento de uma esfera, de densidade eletrônica  $\rho$ , raio  $R$  e volume  $V$ , é dada pela expressão (Glatter, 1980b; Glatter e Kratky, 1982):

$$I_i(h) = \rho^2 V^2 \left[ 3 \frac{\text{sen}(hR) - hR \cos(hR)}{(hR)^3} \right]^2 \quad 5.13$$

Portanto, a intensidade total será obtida a partir das intensidades de todas as esferas que compõem o modelo de acordo com as respectivas posições espaciais (Glatter, 1983).

Neste trabalho, o programa MULTIBODY não foi utilizado para a construção de modelos, apenas para cálculo das funções distribuição de distância teóricas, a partir das coordenadas atômicas dos modelos gerados por outros programas através de modelagem ou *docking* de proteínas.

### **5.3.7 - Modelagem e *docking* de proteínas**

Os modelos propostos neste trabalho foram gerados por algumas técnicas de modelagem ou *docking* de proteínas dos quais foram calculadas as funções  $p(r)$  teóricas ( $p_{\text{teor}}(r)$ ) pelo programa computacional MULTIBODY e

comparadas com as respectivas funções  $p(r)$  experimentais ( $p_{\text{exp}}(r)$ ), obtidas pelo programa ITP a partir dos dados de espalhamento experimentais. De posse dos modelos, foram calculados os coeficientes de correlação entre as  $p_{\text{teor}}(r)$  e as  $p_{\text{exp}}(r)$ , selecionando-se aqueles cujo coeficiente esteja mais próximo da unidade. Portanto, o modelo escolhido não é obrigatoriamente o selecionado pelos critérios dos programas de modelagem, mas, o de melhor correspondência com os dados experimentais.

A correlação entre as funções  $p(r)$  teóricas e experimentais foram determinadas pelo coeficiente de correlação linear (CC), definido como segue (Press et al, 1992):

$$\text{CC} = \frac{\sum_i^n \left[ \left( |p_{\text{exp},i}(r)|^2 - \overline{|p_{\text{exp}}(r)|^2} \right) \times \left( |p_{\text{teor},i}(r)|^2 - \overline{|p_{\text{teor}}(r)|^2} \right) \right]}{\left[ \sum_i^n \left( |p_{\text{exp},i}(r)|^2 - \overline{|p_{\text{exp}}(r)|^2} \right)^2 \times \sum_i^n \left( |p_{\text{teor},i}(r)|^2 - \overline{|p_{\text{teor}}(r)|^2} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}} \quad 5.14$$

Onde,  $\overline{|p_{\text{exp}}(r)|^2}$  é a média do  $|p_{\text{exp},i}(r)|^2$ ,  $\overline{|p_{\text{teor}}(r)|^2}$  é a média do  $|p_{\text{teor},i}(r)|^2$ .

Alguns modelos foram feitos com auxílio do programa computacional MODELLER (Sali e Blundell, 1993) associado a outros programas como o, BLAST<sup>1</sup>, MULTALIN<sup>2</sup> (Corpet, 1988), PROCHECK (Laskowski et al, 1994) e SWISS-PDB VIEWER <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<sup>2</sup> <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>



O MODELLER é um programa computacional de modelagem por homologia ou modelagem comparativa baseado na estrutura tridimensional de proteínas. Antes de executar o programa MODELLER, deve ser feita uma busca, por exemplo pelo BLAST, de outras proteínas que tenham estruturas resolvidas experimentalmente depositadas no PDB (*Protein Data Bank*) e cujas seqüências apresentem identidade (acima de 30%) com a proteína que se deseja modelar. Em seguida é feito o alinhamento pelo MULTALIN. A partir desses dados, o MODELLER gera os modelos e disponibiliza na saída uma quantidade determinada de arquivos no formato PDB.

Estes modelos são gerados para uma cadeia única, não sendo possível, apenas com estes passos, a construção de complexos ou de estruturas quaternárias de proteínas. Nestes casos, um outro passo é necessário; para montar um modelo da estrutura quaternária de determinada proteína, para cada unidade é gerado um modelo nos moldes descritos anteriormente e depois é feita a montagem da estrutura quaternária, usando como referência uma estrutura conhecida de uma outra proteína homóloga (*template*), através do programa SWISS-PDB VIEWER.

Para a construção de modelos por *docking* de proteínas, foi utilizado o programa GRAMM (*Global Range Molecular Matching*) (Katchalsky-Katzir *et al*, 1992). Este programa executa uma exaustiva busca de posições de ligação entre duas moléculas, através de translações e rotações relativas, construindo-se, assim, complexos a partir de coordenadas atômicas. Isso é feito a partir dos arquivos PDB de duas moléculas, que são envolvidas por

um *grid* tridimensional de dimensões definidas, em que uma é fixa e a outra se movimenta por um passo angular preestabelecido varrendo toda a superfície da molécula. Então, funções correlação são calculadas entre todas as orientações relativas das quais se faz uma classificação dos modelos de maior correlação positiva (Katchalsky-Katzir *et al*, 1992).

Por fim, através do programa PROCHECK, são construídos os gráficos de Ramachandran e verificada a qualidade dos modelos. Esta etapa é comum para os dois métodos de construção de modelos.

Para cada modelo proposto neste trabalho, foi gerado um total de mil modelos e selecionado o de melhor correlação entre a  $p_{\text{teor}}(\mathbf{r})$  e a  $p_{\text{exp}}(\mathbf{r})$ .

# 6 - Resultados Experimentais

---

## 6.1 - Introdução

Todas as amostras utilizadas neste trabalho, conforme mencionado anteriormente, foram conseguidas pela colaboração com outros grupos de pesquisa. Algumas foram recebidas em grande quantidade, como é o caso de determinadas hemoglobinas, outras não, e a pouca quantidade de material serviu de incentivo para a busca de métodos alternativos de utilização da técnica de SAXS.

Em princípio, as hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus* e *Liophis miliaris* foram analisadas pelo método tradicional, em que várias concentrações são feitas para posterior extrapolação a concentração zero. Posteriormente, devido à quantidade razoavelmente grande de material disponível, foram realizados vários testes, dos quais se pesquisaram os limites de concentração e tempo de exposição à radiação, para se efetuar medidas de SAXS em uma única concentração sem comprometer os resultados; não utilizando, portanto, extrapolação. Assim, obteve-se uma concentração mínima de aproximadamente 10mg/ml e um tempo de exposição em torno de 8 horas, para compensar a baixa intensidade produzida nestas concentrações. Estes resultados são mostrados na seqüência deste trabalho.

Independentemente do método utilizado, foram necessários eliminar as contribuições de espalhamento do tampão fazendo-se medidas de cada um nos respectivos valores de pH e, pela utilização da equação (5.1), as curvas de espalhamento foram normalizadas e, conseqüentemente, obtidas as curvas de  $J_N(h)$ . A partir desses dados, e após a subtração do *background*, foram eliminadas das curvas de intensidade as contribuições do sistema de colimação e calculadas as funções distribuição de distâncias com a utilização do programa ITP.

## 6.2 – Hemoglobina humana

Apenas para ser usada como referência, a hemoglobina humana foi analisada por SAXS em solução pH 7,0 e pH 8,0, numa única concentração de 10mg/ml e com um tempo de exposição de 8 horas.

Inicialmente, foram obtidas as curvas de intensidade normalizadas, mostradas na figura 6.1, a partir das quais, gráficos de Guinier foram construídos (figura 6.2) para cálculo do raio de giro.

Isto é feito através de um gráfico de  $\log J(h) \times h^2$  das curvas de espalhamento extrapoladas, dos quais os raios de giro são calculados a partir da inclinação da região linear, ou seja, da região de mais baixos ângulos. Assim, o raio de giro está relacionado com a intensidade  $J(h)$  na região de Guinier, conforme a equação (4.28), pela expressão :

$$J(h) = J_0 e^{-\frac{h^2 R_g^2}{3}} \quad 6.1$$

Então, a (6.1), pode ser escrita como:

$$\log J(h) = - \frac{R_g^2}{3} 0,434 h^2 + \log J_0$$

Pelo coeficiente angular da reta do gráfico de  $\log J(h)$  x  $h^2$ , tem-se:

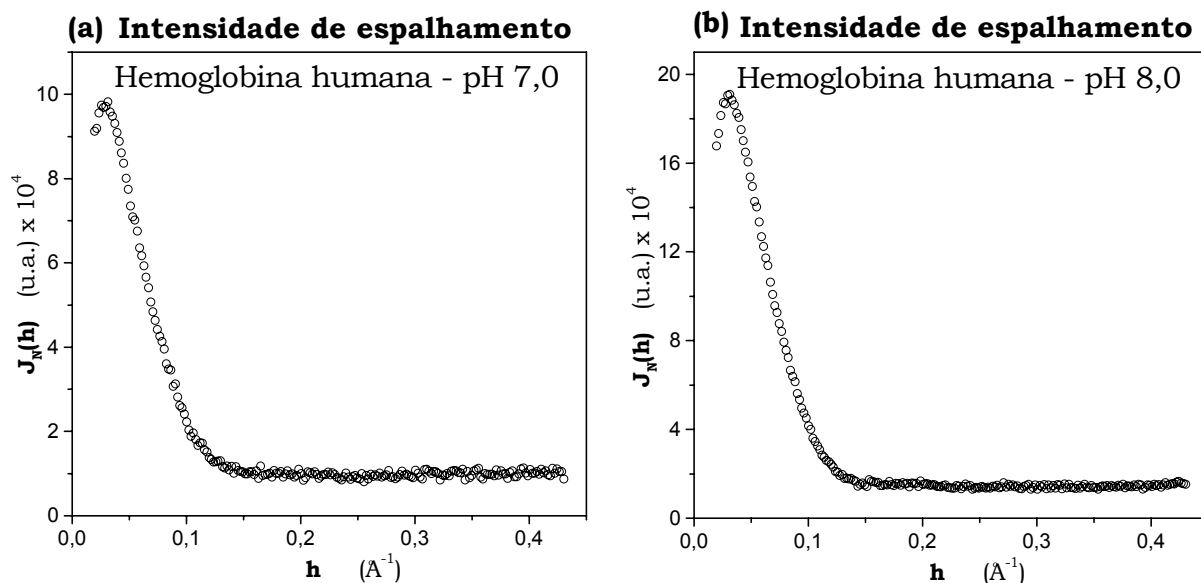
$$\operatorname{tg} \alpha = - \frac{R_g^2}{3} 0,434 = - 0,1448 R_g^2, \text{ e:}$$

$$R_g = 2,628 \sqrt{-\operatorname{tg} \alpha} \quad 6.2$$

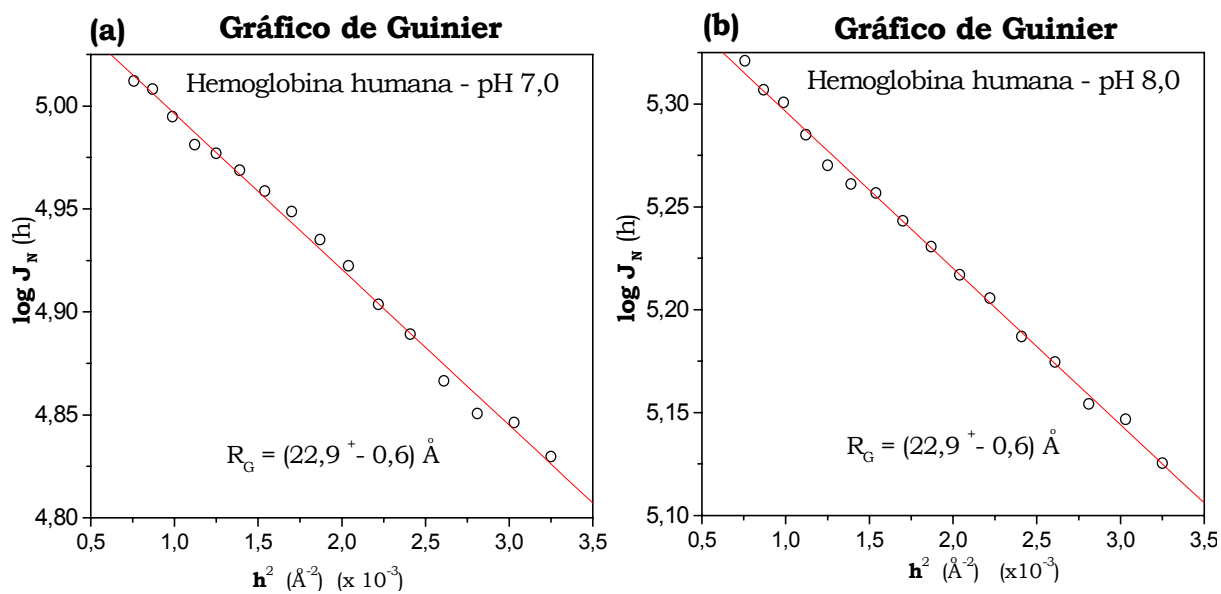
A aproximação da lei de Guinier é válida dentro de certos limites de valores de  $h$ . Para partículas esféricas, pode ser considerado como valor máximo,  $h_{\max} = \frac{1,3}{R_G}$ , e como valor mínimo,  $h_{\min} = \frac{h_{\max}}{2}$  (Guinier e Fournet, 1955).

Em seguida, das curvas de intensidade, são calculadas as constantes de Porod para eliminação do *background*. Os gráficos de Porod são mostrados na figura 6.3.

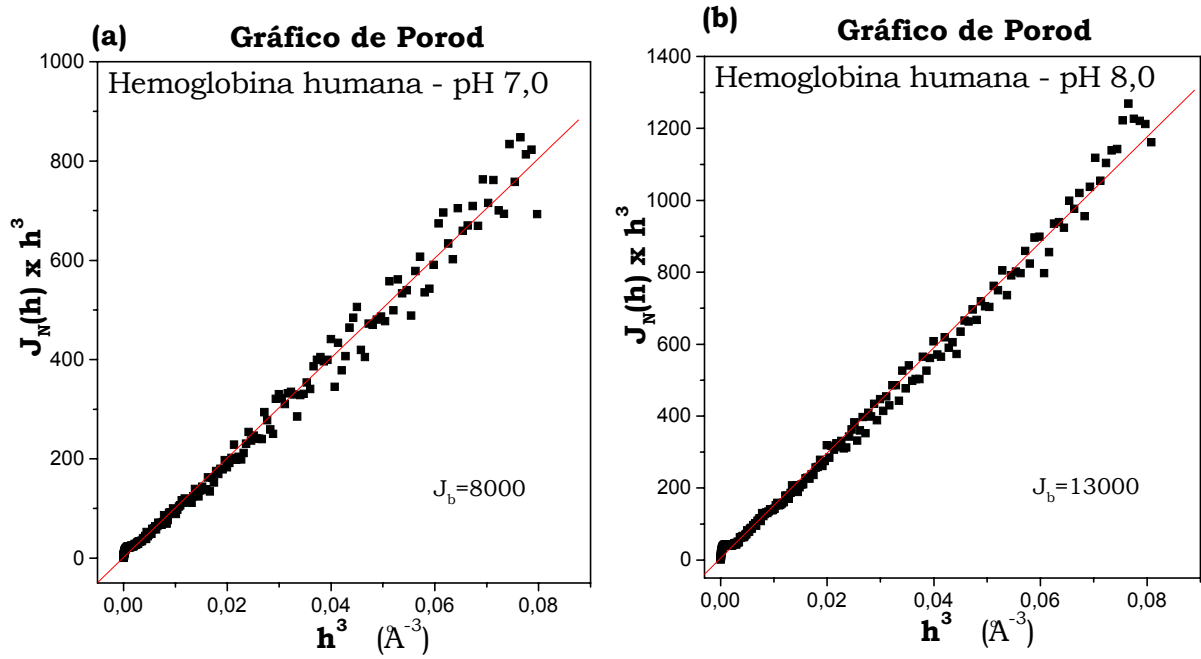
Feitas as correções preliminares, através do programa ITP, são eliminados os efeitos do perfil do feixe e calculadas a funções distribuição de distâncias das hemoglobinas nos dois valores de pH, mostrado na figura 6.4.



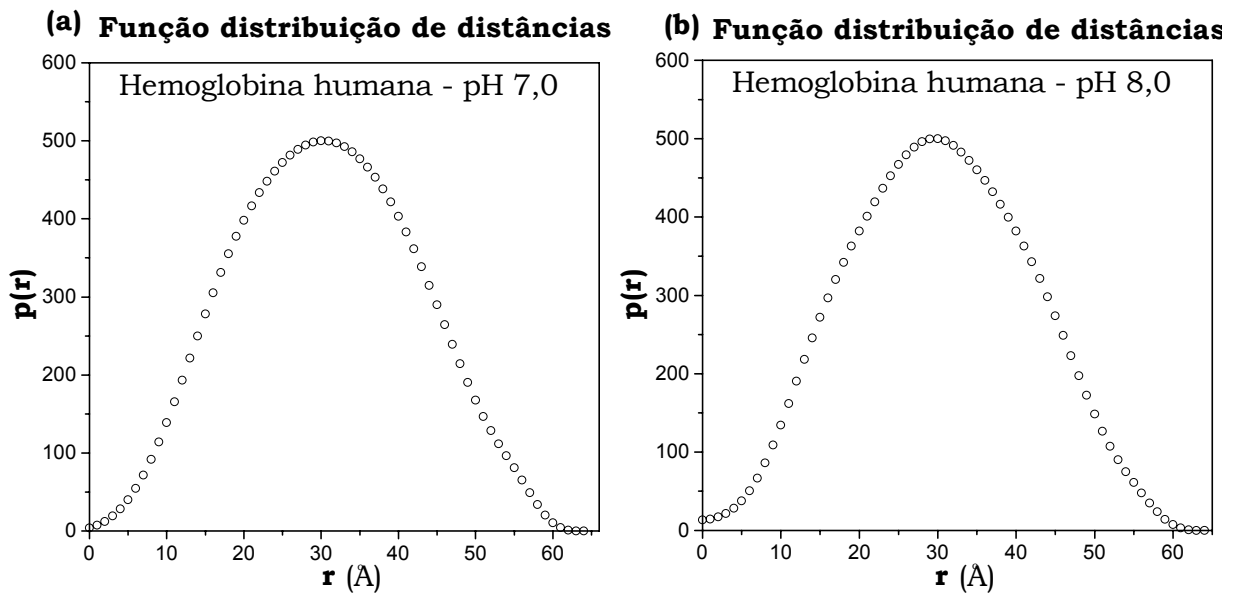
**Figura 6.1** – Curvas de intensidade de espalhamento normalizadas da hemoglobina humana em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0.



**Figura 6.2** – Gráficos de Guinier da hemoglobina humana na concentração de 10mg/ml, sem extrapolação, em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0.



**Figura 6.3** – Gráficos de Porod da hemoglobina humana em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0.



**Figura 6.4** - Função distribuição de distâncias da hemoglobina humana na concentração 10mg/ml: (a) em pH7,0 e (b) em pH 8,0.

### 6.3 - Hemoglobinas de serpentes

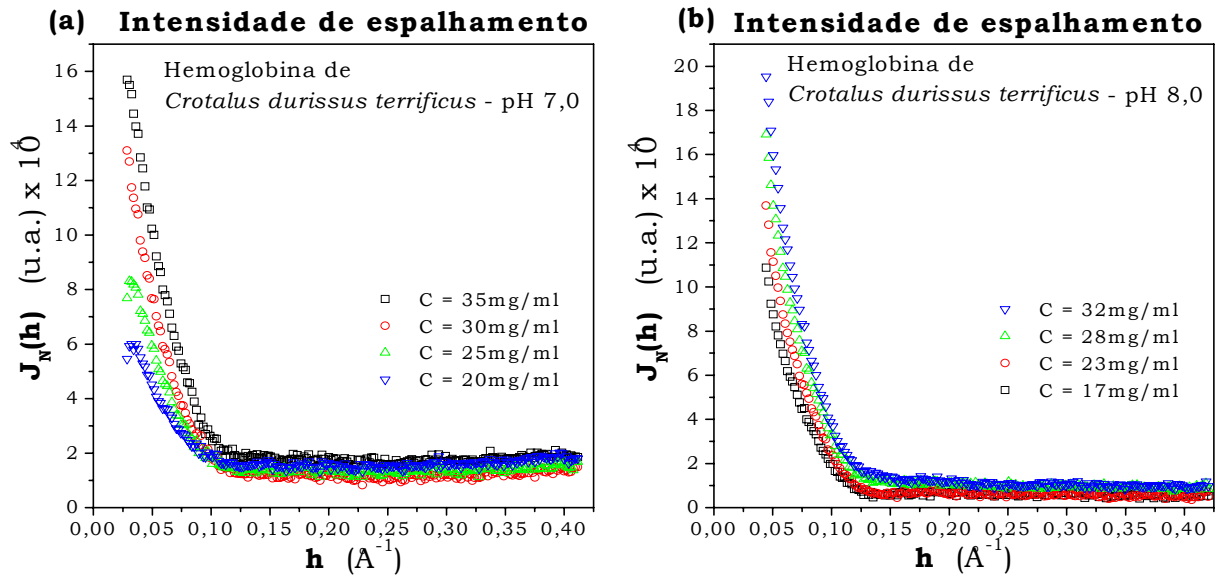
As amostras das hemoglobinas de serpentes foram obtidas conforme descrito anteriormente. As hemoglobinas foram analisadas em pH 7,0 e pH 8,0, sendo que para as amostras de *Crotalus durissus terrificus* e *Liophis miliaris* foram empregados dois métodos: por extrapolação e em uma única medida em concentração mais baixa. A hemoglobina de *Boa constrictor constrictor* também foi analisada em pH 7,0 e pH 8,0, utilizando uma única medida em baixa concentração.

#### 6.3.1 - *Crotalus durissus terrificus*

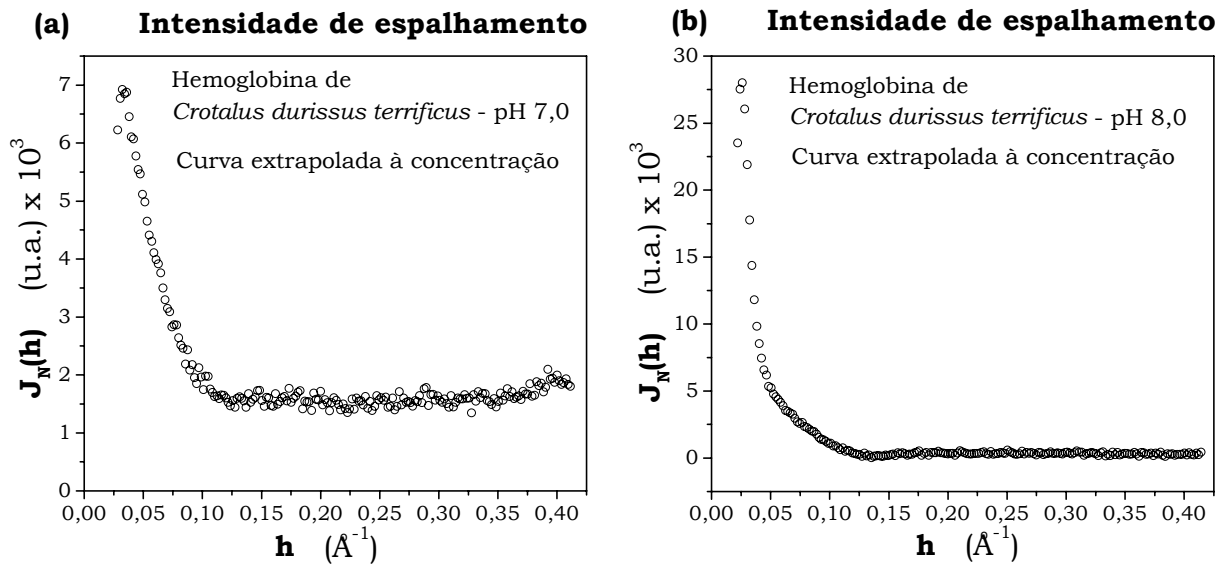
Na figura 6.5 podem ser observadas as curvas de intensidade de espalhamento normalizadas da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* nas diferentes concentrações e pHs, conforme indicado. Cada amostra de concentração diferente foi medida por um tempo de 3 horas, incluindo os respectivos tampões. Depois de normalizadas, foram feitas as extrapolações à concentração zero para cada pH, mostrado na figura 6.6, para serem construídos os gráficos de Guinier (figura 6.7) de onde foram calculados os raios de giro. A seguir são construídos gráficos de Porod (figura 6.8), para determinação das constantes  $J_b$  e eliminação do *background*.

Com o auxílio do programa ITP, os efeitos do sistema de colimação são eliminados e as funções de distribuição de distâncias  $p(r)$  também são determinadas. Os gráficos das funções  $p(r)$  podem ser vistos na figura 6.9.

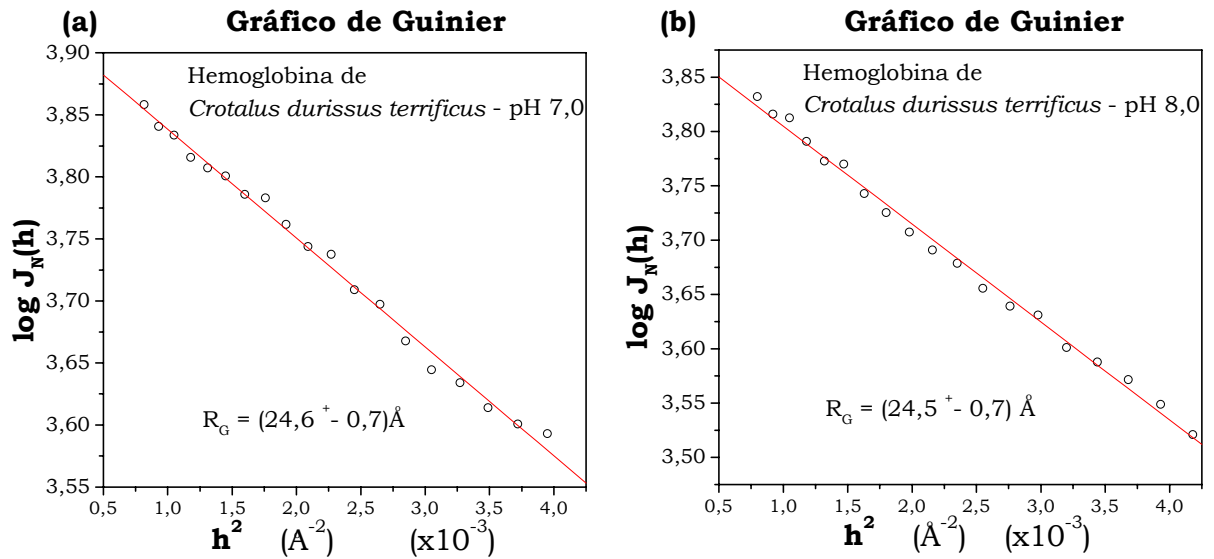




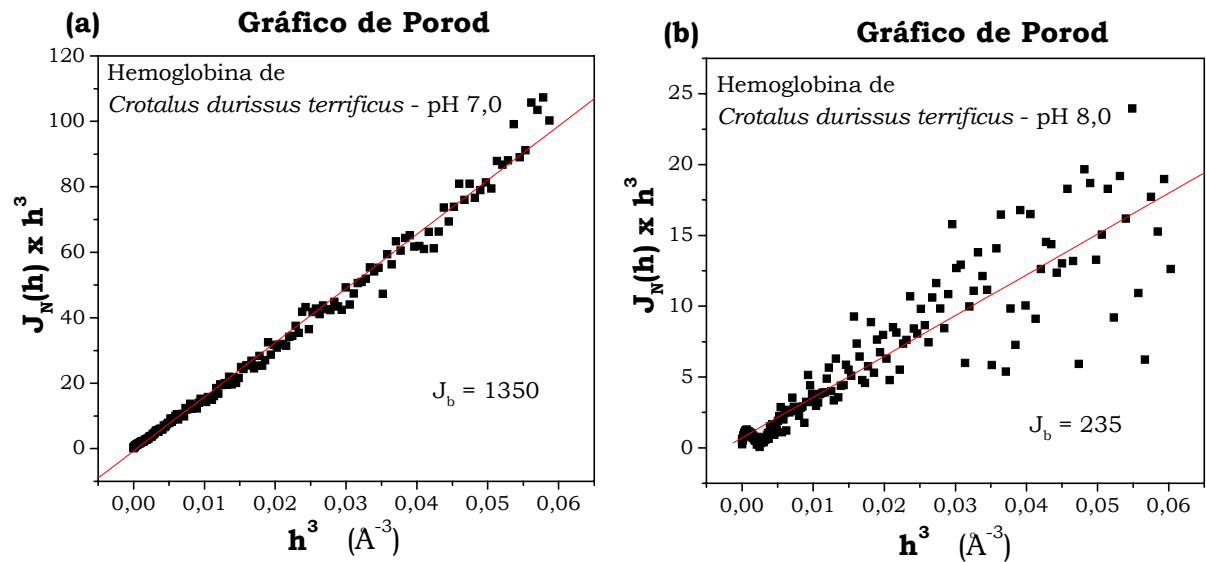
**Figura 6.5** – Curvas de intensidade de espalhamento normalizadas das diferentes concentrações da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0.



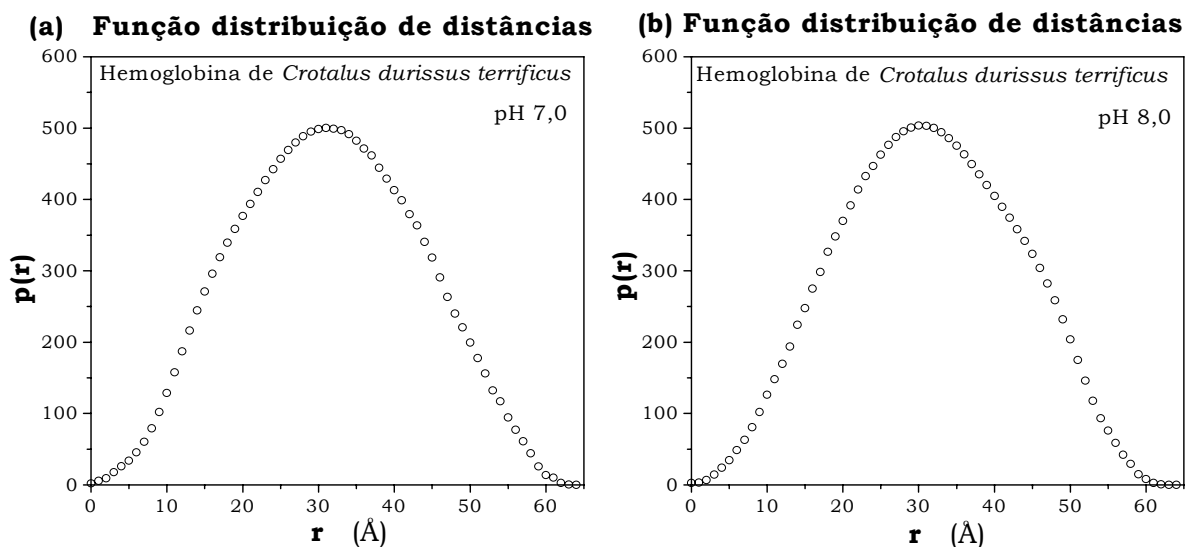
**Figura 6.6** – Curvas de intensidade extrapolada à concentração zero da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0.



**Figura 6.7** – Gráficos de Guinier das hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus* em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0.



**Figura 6.8** – Gráficos de Porod das hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus* em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0.

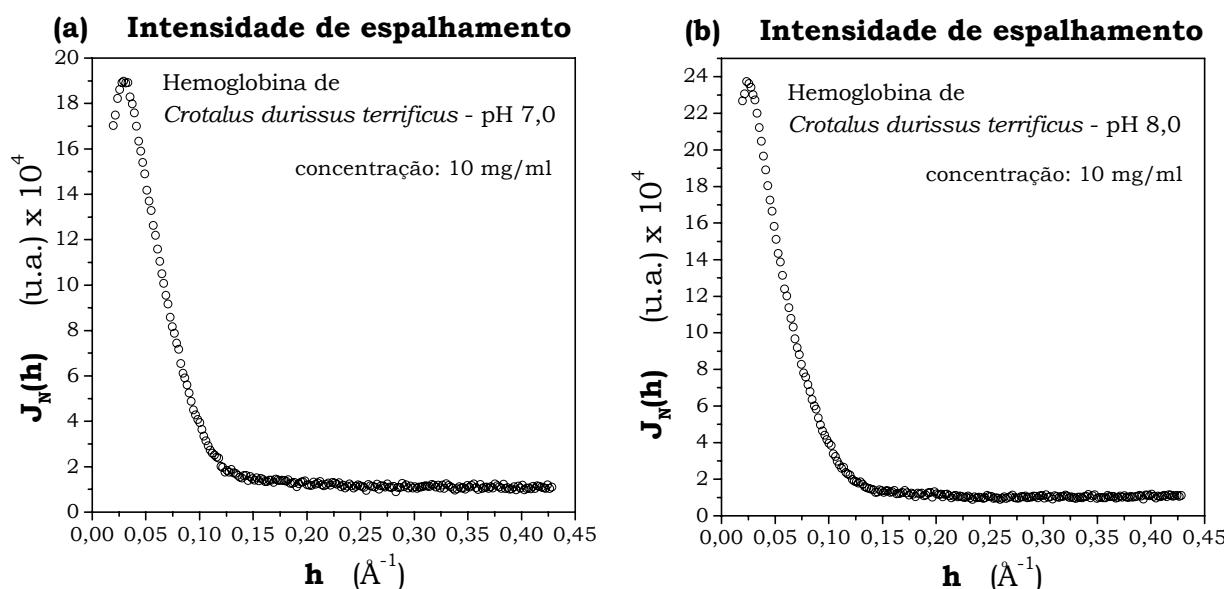


**Figura 6.9** - Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* obtidas das curvas de intensidade extrapoladas a concentração zero. (a) pH7,0 e (b) pH8,0.

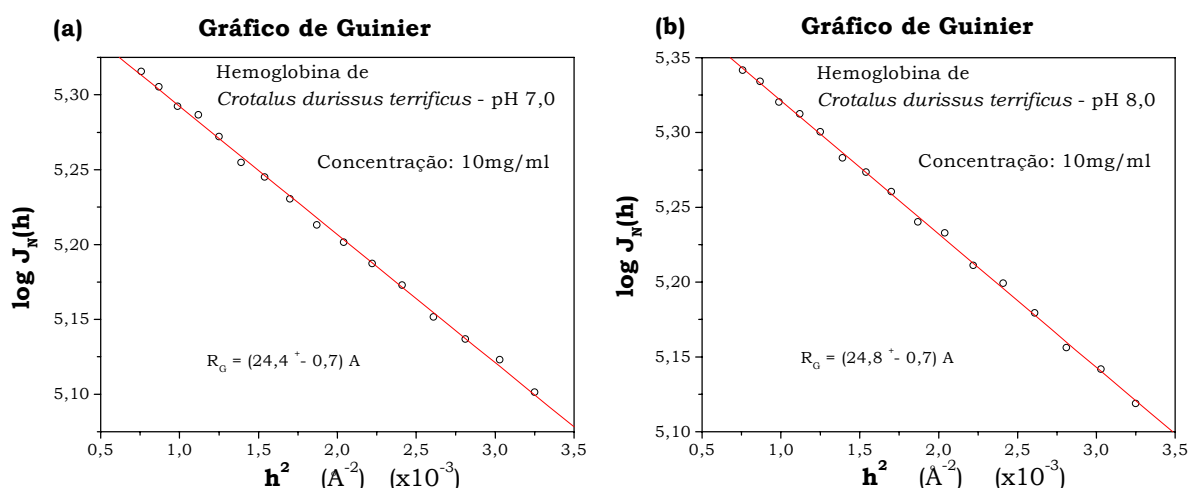
Com a finalidade de se determinar uma condição que dê resultados satisfatórios sem a necessidade de extrapolação e, conseqüentemente, diminuir a quantidade de amostra utilizada nas análises, as hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus* foram estudadas exaustivamente por SAXS de forma a se estabelecer limites de concentração e tempo de exposição aos raios X. Depois de vários testes foram obtidos os resultados a seguir.

Utilizando uma única concentração de 10 mg/ml, e analisando as hemoglobinas nas mesmas condições anteriores, foram obtidas as curvas de intensidade normalizadas, mostradas na figura 6.10, e destas, gráficos de Guinier foram construídos (figura 6.11) para cálculo do raio de giro. Ainda, das curvas de intensidade, as constantes de Porod foram calculadas para eliminação do *background*, conforme gráficos mostrados na figura 6.12.

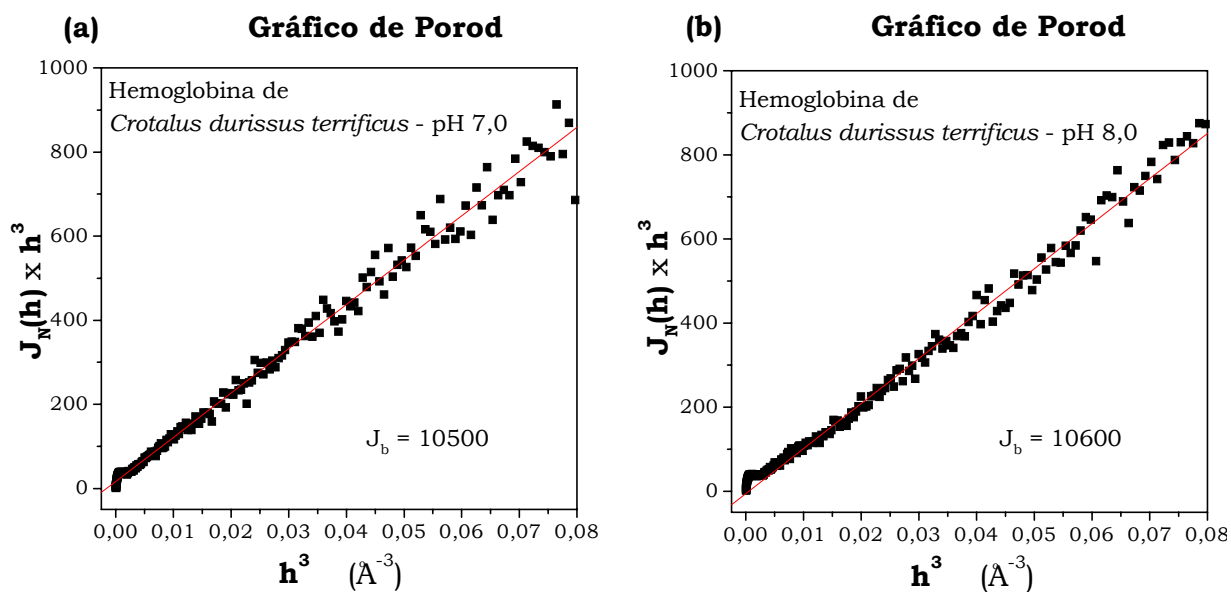
Posteriormente, através do programa ITP, foram eliminados os efeitos do perfil do feixe e calculadas as funções distribuição de distâncias das hemoglobinas nos dois valores de pH, conforme mostrado na figura 6.13.



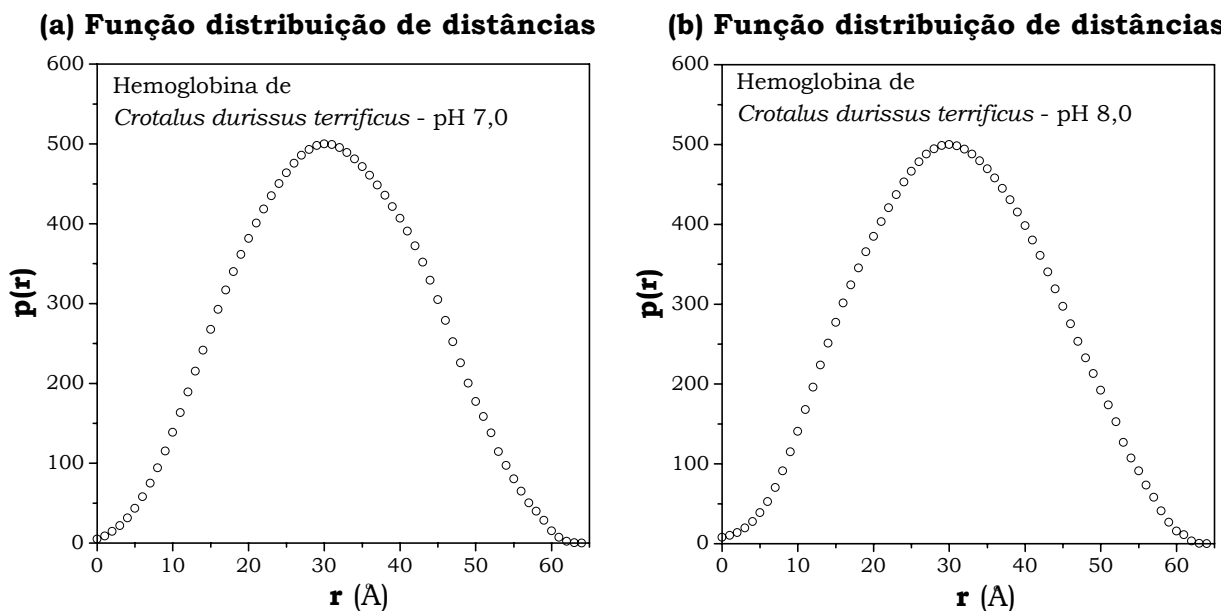
**Figura 6.10** – Curvas normalizadas de intensidade de espalhamento da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 10mg/ml, sem extrapolação, em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0.



**Figura 6.11** – Gráficos de Guinier das hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 10mg/ml, sem extrapolação, em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0.



**Figura 6.12** – Gráficos de Porod das hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus*, na concentração 10mg/ml, sem extrapolação, em (a) pH 7,0 e (b) pH 8,0.



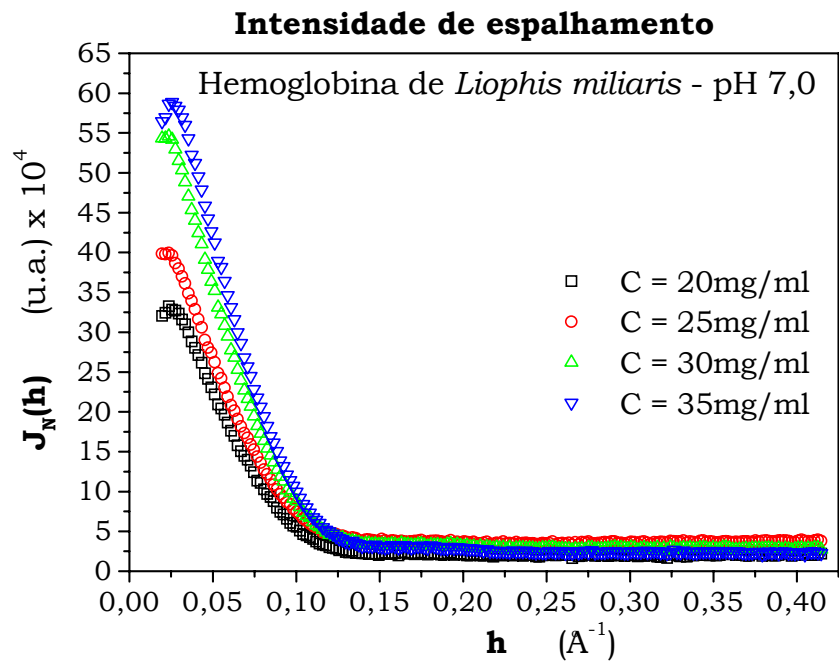
**Figura 6.13** - Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus*, concentração 10mg/ml, obtidas das curvas de intensidade não extrapoladas. (a) pH7,0 e (b) pH8,0.

### **6.3.2 - *Liophis miliaris***

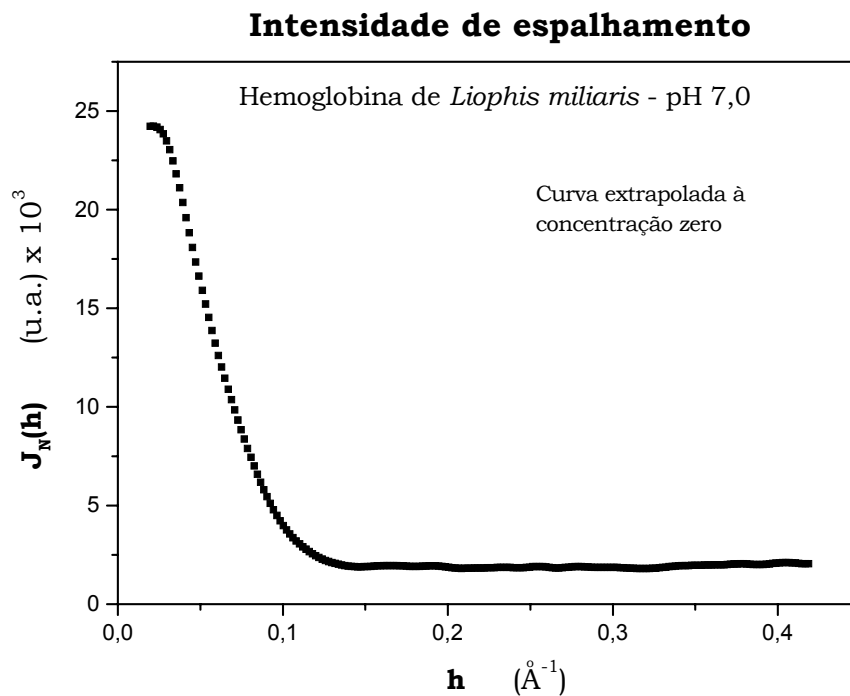
A hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0 também foi analisada pelos mesmos métodos e condições descritos para a hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus*. Primeiramente, serão mostrados os resultados obtidos através de extrapolação à concentração zero das curvas de intensidade das várias concentrações e depois, os resultados das medidas feitas em uma única concentração.

As curvas normalizadas de intensidade de espalhamento da proteína e nas diferentes concentrações (20mg/ml, 25mg/ml, 30mg/ml e 35mg/ml), podem ser vistas na figura 6.14. A partir destas curvas, foi feita uma extrapolação à concentração zero, conforme apresentado na figura 6.15. Um gráfico de Guinier foi construído (figura 6.16) para cálculo do raio de giro. Os efeitos das flutuações de densidade eletrônica dentro da macromolécula foram eliminados subtraindo-se a constante de Porod, calculada do gráfico de Porod mostrado da figura 6.17.

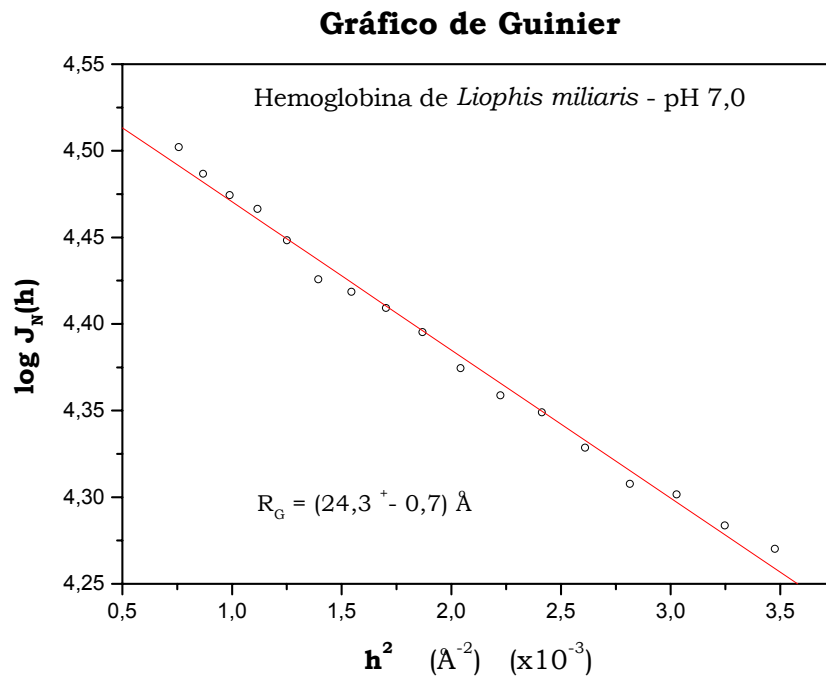
Através do programa ITP, foram eliminados os efeitos do perfil do feixe devido ao sistema de colimação e calculada a função distribuição de distância, mostrada na figura 6.18.



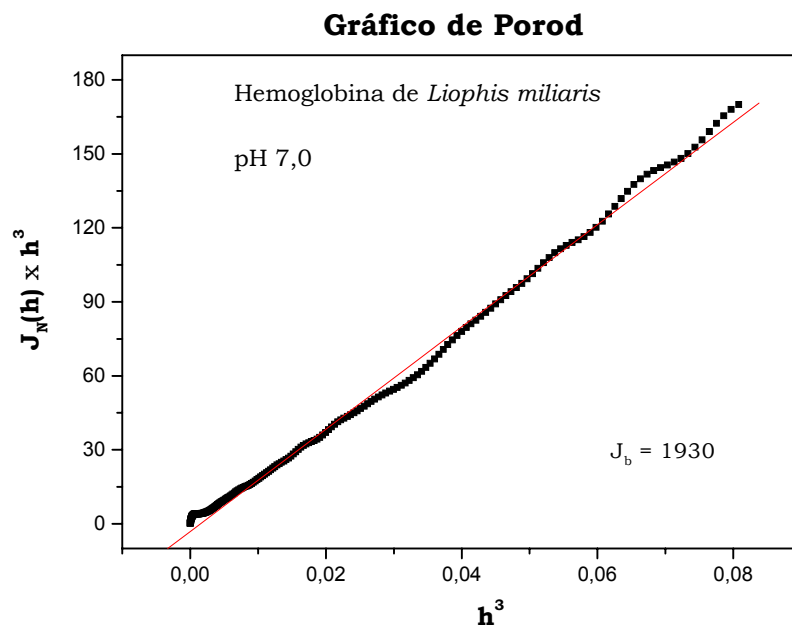
**Figura 6.14** – Curvas de intensidade de espalhamento normalizadas das diferentes concentrações da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0.



**Figura 6.15** – Curva de intensidade de espalhamento extrapolada a concentração zero da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0.

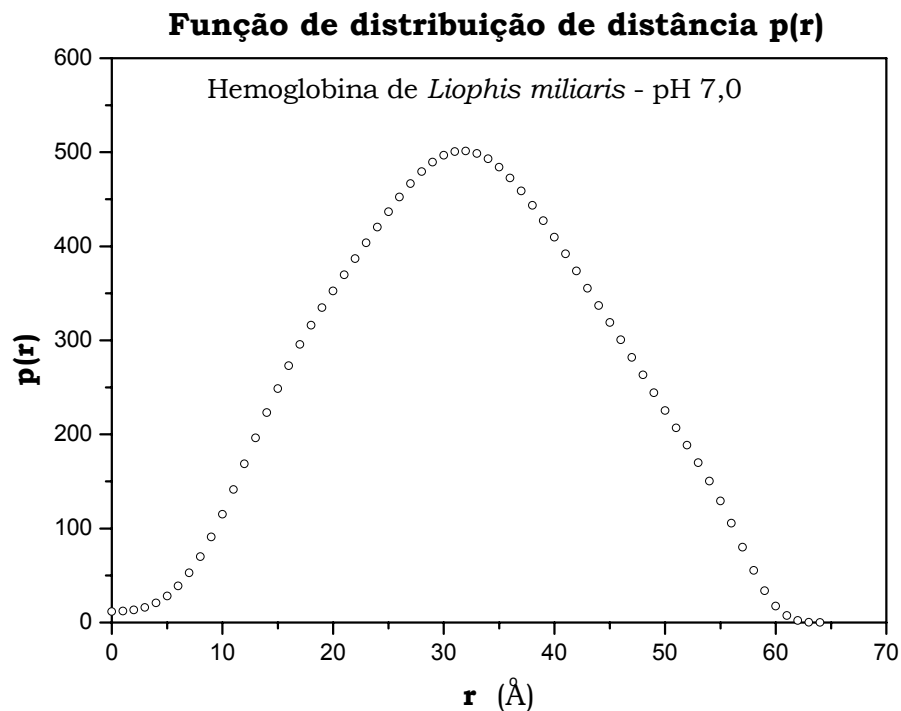


**Figura 6.16** – Gráfico de Guinier da hemoglobina de *Liophis miliaris* da curva extrapolada a concentração zero, em pH 7,0.



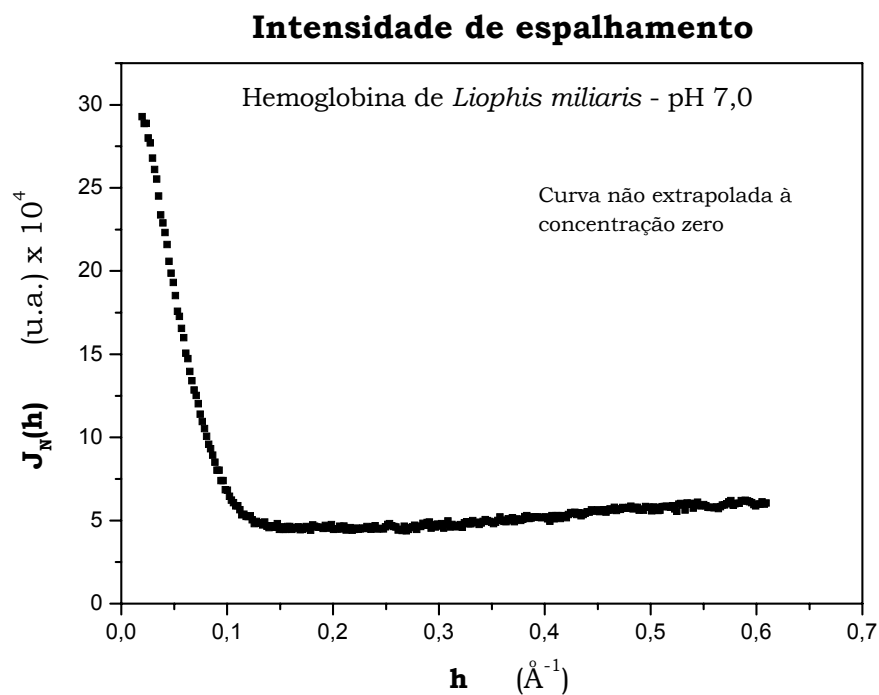
**Figura 6.17** – Gráfico de Porod da hemoglobina de *Liophis miliaris* da curva extrapolada a concentração zero, em pH 7,0.



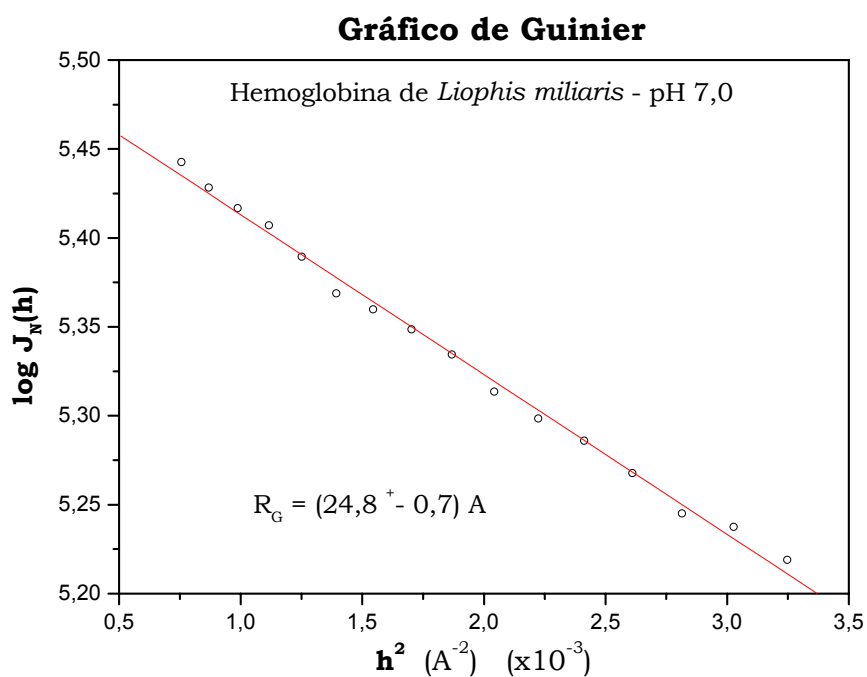


**Figura 6.18** - Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Liophis miliaris* obtida da curva de intensidade extrapolada em pH7,0.

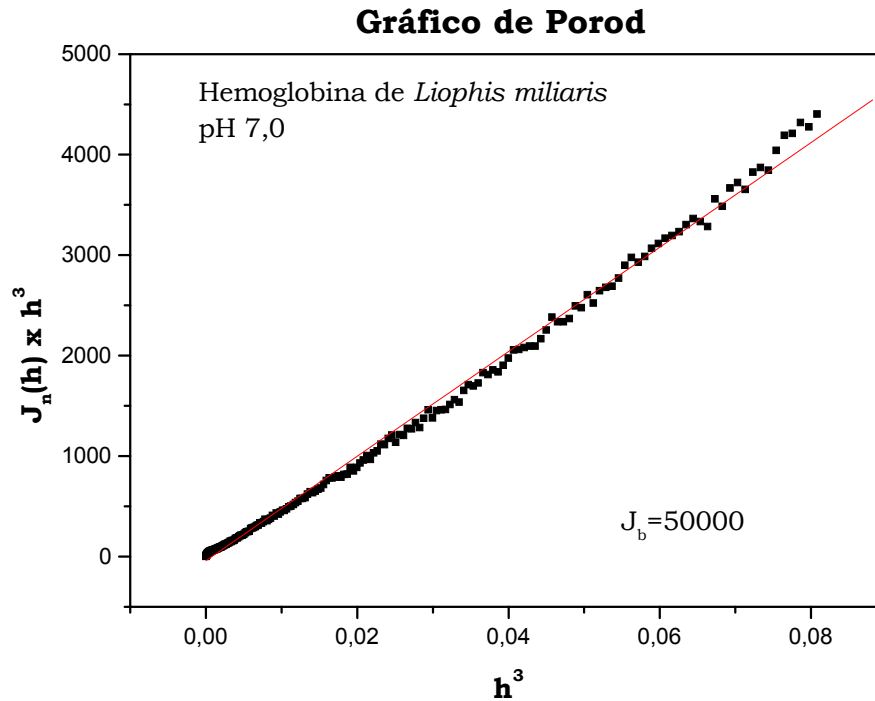
Em uma única concentração de 10mg/ml, a hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0 foi analisada seguindo os mesmos critérios da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus*. O gráfico de intensidade foi determinado e pode ser visto na figura 6.19, do qual foi calculado o raio de giro da região de Guinier a partir do gráfico da figura 6.20. Ainda, a constante de Porod foi obtida de acordo com a figura 6.21, para eliminação do *background*. A função  $p(r)$  foi calculada pelo programa ITP (figura 6.22).



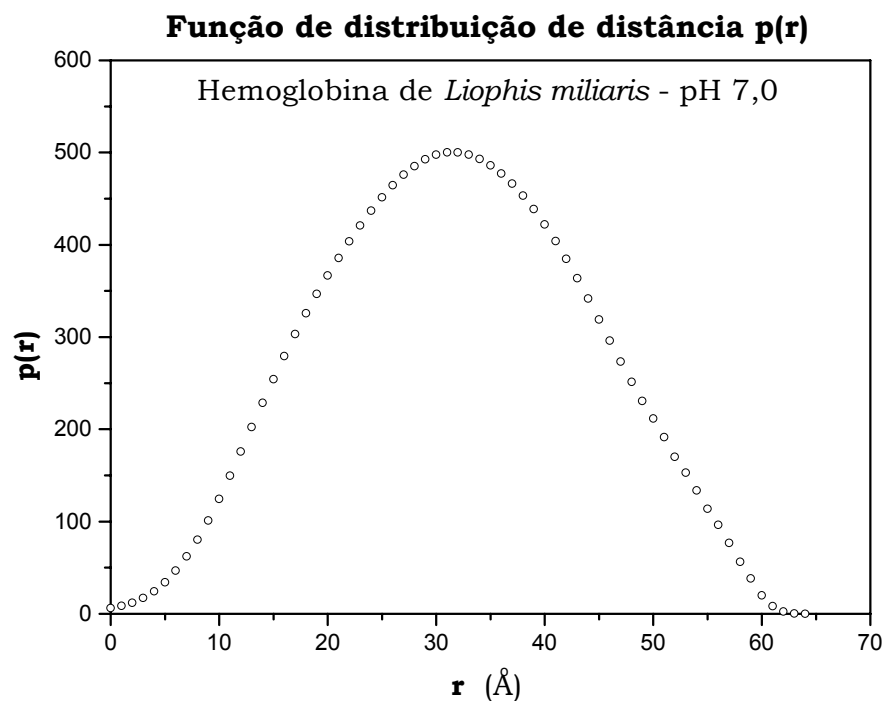
**Figura 6.19** – Curva normalizada de intensidade de espalhamento hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0 na concentração de 10mg/ml.



**Figura 6.20** – Gráfico de Guinier da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0 na concentração de 10mg/ml.



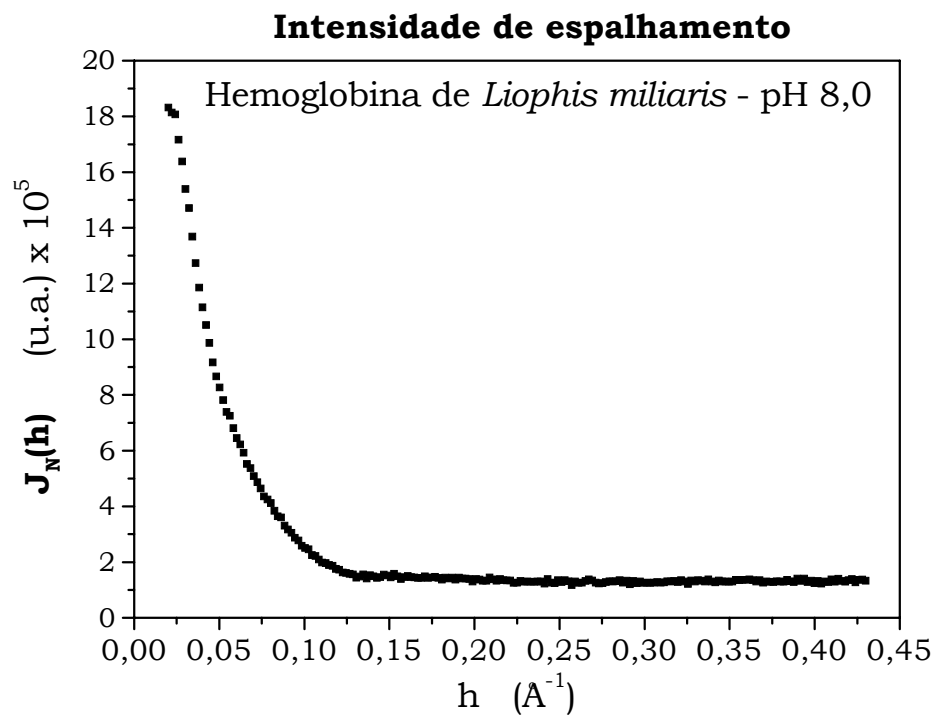
**Figura 6.21** – Gráfico de Porod da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 7,0 na concentração 10mg/ml.



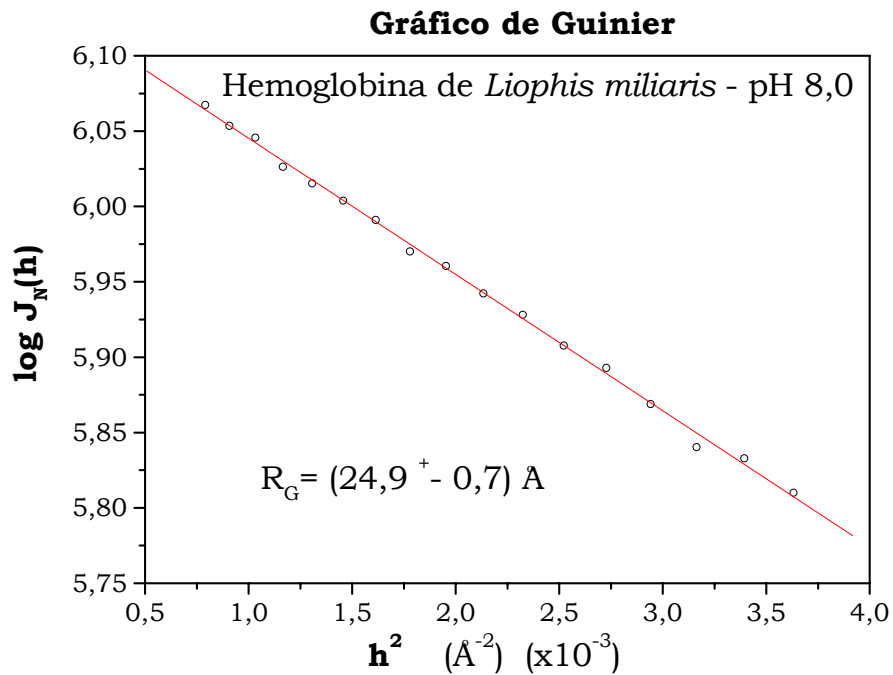
**Figura 6.22** - Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Liophis* em pH7,0 na concentração 10mg/ml.

A hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 8,0 foi estudada apenas em uma única concentração de 12mg/ml, para depois serem feitas as comparações com os resultados dos outros valores de pH.

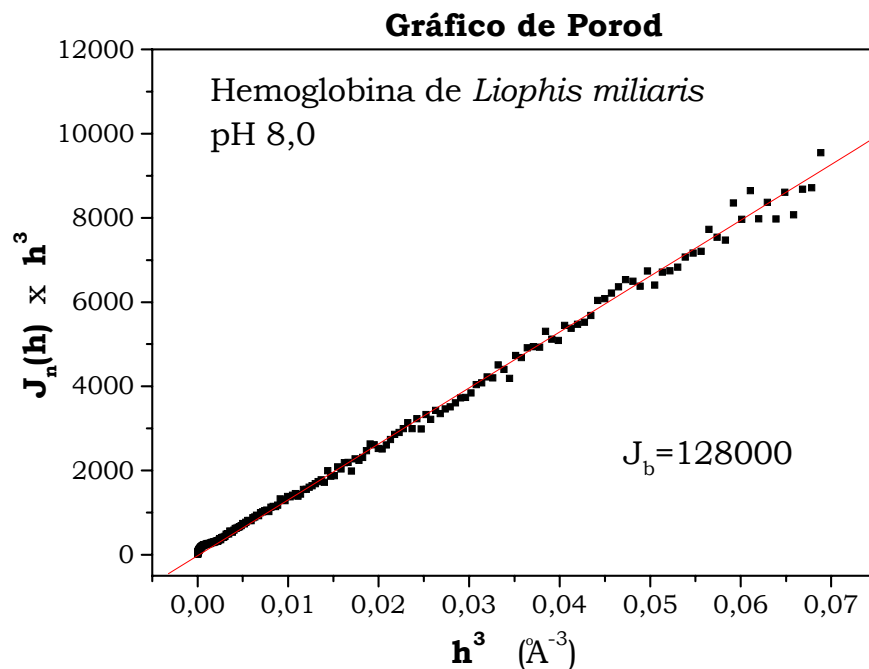
Seguindo os passos anteriores, na figura 6.23 vê-se o gráfico de intensidade de espalhamento obtido para a concentração mencionada, do qual foi calculado o raio de giro pelo gráfico da figura 6.24. Depois de eliminado os efeitos do *background* (figura 6.25), foi determinada a função  $p(r)$ , figura 6.26.



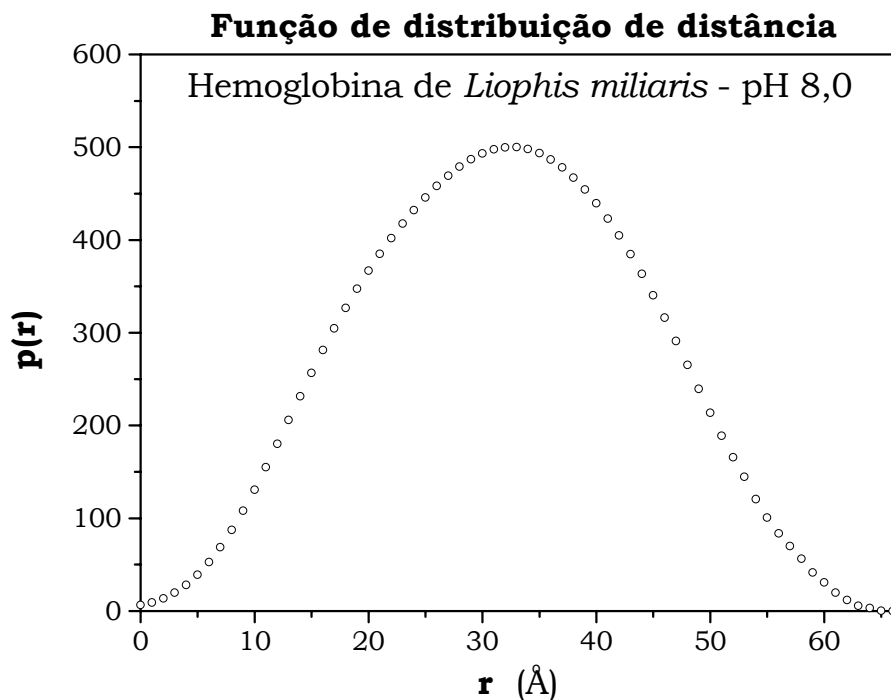
**Figura 6.23** – Curva normalizada da intensidade de espalhamento da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 8,0 na concentração de 12mg/ml.



**Figura 6.24** – Gráfico de Guinier da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 8,0 na concentração de 12mg/ml.



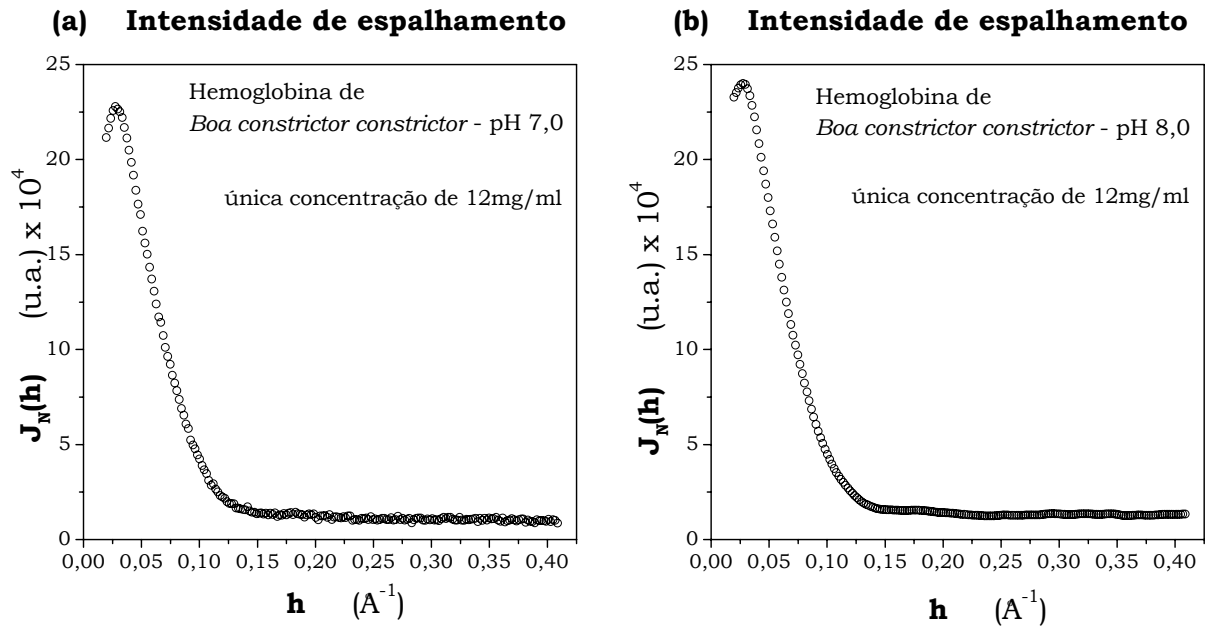
**Figura 6.25** – Gráfico de Porod da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH 8,0 na concentração 12mg/ml.



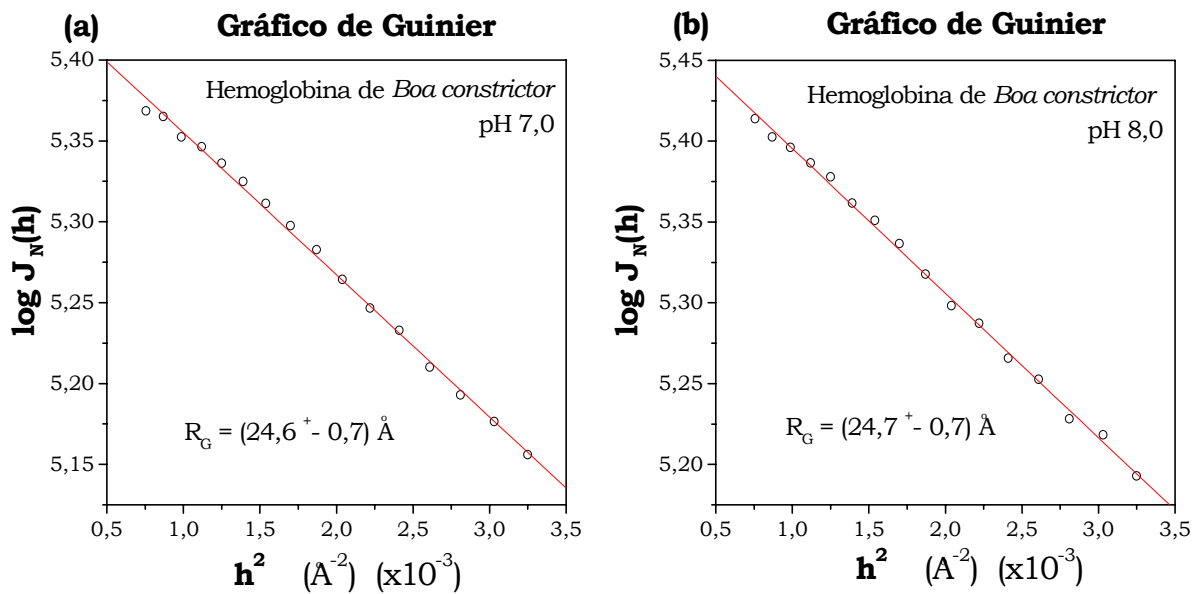
**Figura 6.26** - Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Liophis miliaris* em pH8,0 na concentração 12mg/ml.

### 6.3.3 - *Boa constrictor constrictor*

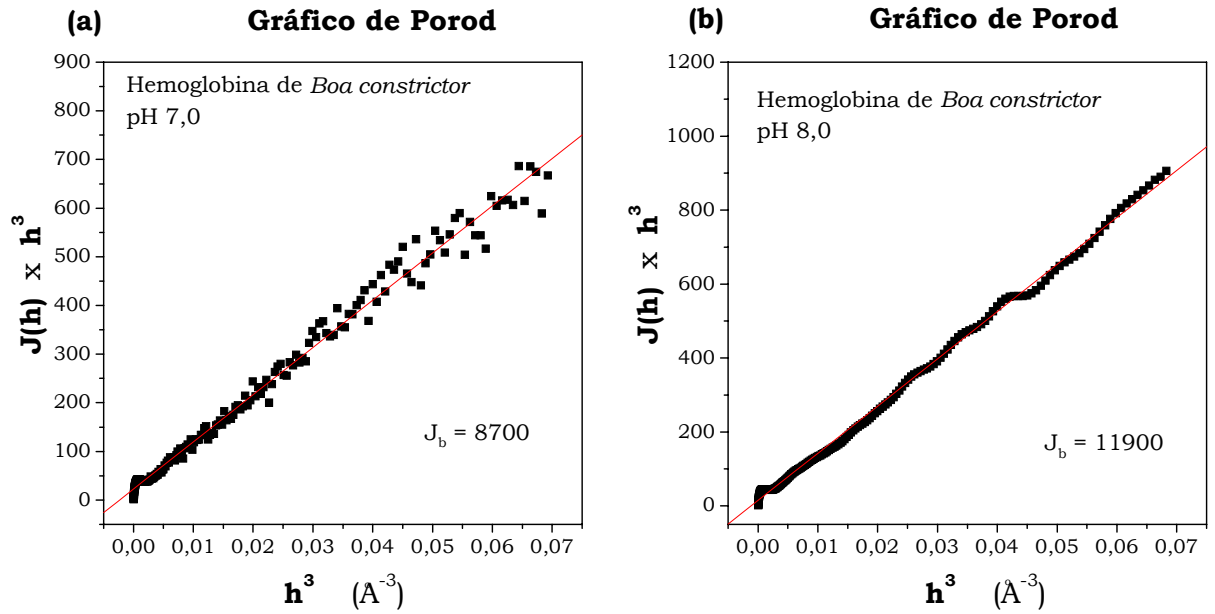
As hemoglobinas de *Boa constrictor constrictor* foram estudadas em pH 7,0 e pH 8,0 na concentração 12mg/ml sem extrapolação à concentração zero. As curvas de intensidade podem ser vistas na figura 6.27, em seus respectivos valores de pH 7,0 e 8,0, de onde foram calculados os raios de giro da região de Guinier, mostrados na figura 6.28. A partir das curvas de intensidade corrigidas pela constante de Porod, calculada e mostrada na figura 6.29, foram eliminados os efeitos do sistema de colimação e determinadas as funções distribuição de distâncias  $p(r)$ , com auxílio do programa ITP (ver figura 6.30).



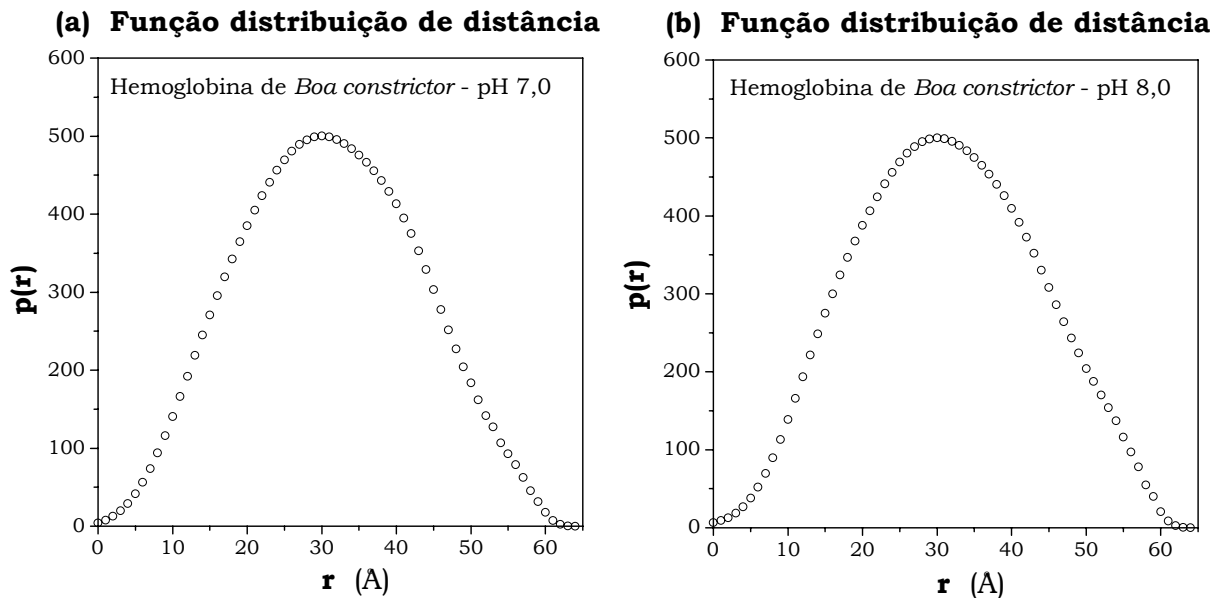
**Figura 6.27** – Curva normalizada da intensidade de espalhamento da hemoglobina de *Boa constrictor constrictor* na concentração de 12mg/ml (a) em pH 7,0 e (b) em pH 8,0.



**Figura 6.28** – Gráficos de Guinier da hemoglobina de *Boa constrictor constrictor* na concentração de 12mg/ml (a) em pH 7,0 e (b) em pH 8,0.



**Figura 6.29** – Gráfico de Porod da hemoglobina de *Boa constrictor constrictor* na concentração 12mg/ml (a) em pH 7,0 e (b) em pH 8,0.



**Figura 6.30** - Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *Boa constrictor constrictor* na concentração 12mg/ml (a) em pH 7,0 e (b) em pH8,0.



A tabela 6.1 reúne os valores de raio de giro e máxima dimensão das hemoglobinas de serpentes determinados pelos diferentes métodos.

		<i>Humana</i>		<i>Liophis miliaris</i>		<i>Crotalus durissus terrificus</i>		<i>Boa constrictor constrictor</i>		
		pH 7,0	pH 8,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 7,0	pH 8,0	
Raio de giro (Å)	Extrapolação	Guinier	-	-	24,3 ±0,7	-	24,6 ±0,7	24,5 ±0,7	-	-
		p(r)	-	-	24,2 ±0,7	-	23,7 ±0,7	23,8 ±0,7	-	-
	Única concentração	Guinier	22,9 ±0,6	22,9 ±0,6	24,8 ±0,7	24,9 ±0,7	24,4 ±0,7	24,8 ±0,7	24,6 ±0,7	24,7 ±0,7
		p(r)	23,2 ±0,7	22,9 ±0,6	24,1 ±0,7	24,2 ±0,7	23,6 ±0,7	23,8 ±0,7	23,8 ±0,7	23,9 ±0,7
Máxima dimensão (Å)	Extrapolação	-	-	63±2	-	63±2	63±2	-	-	
	Única concentração	-	-	63±2	65±2	63±2	63±2	63±2	63±2	

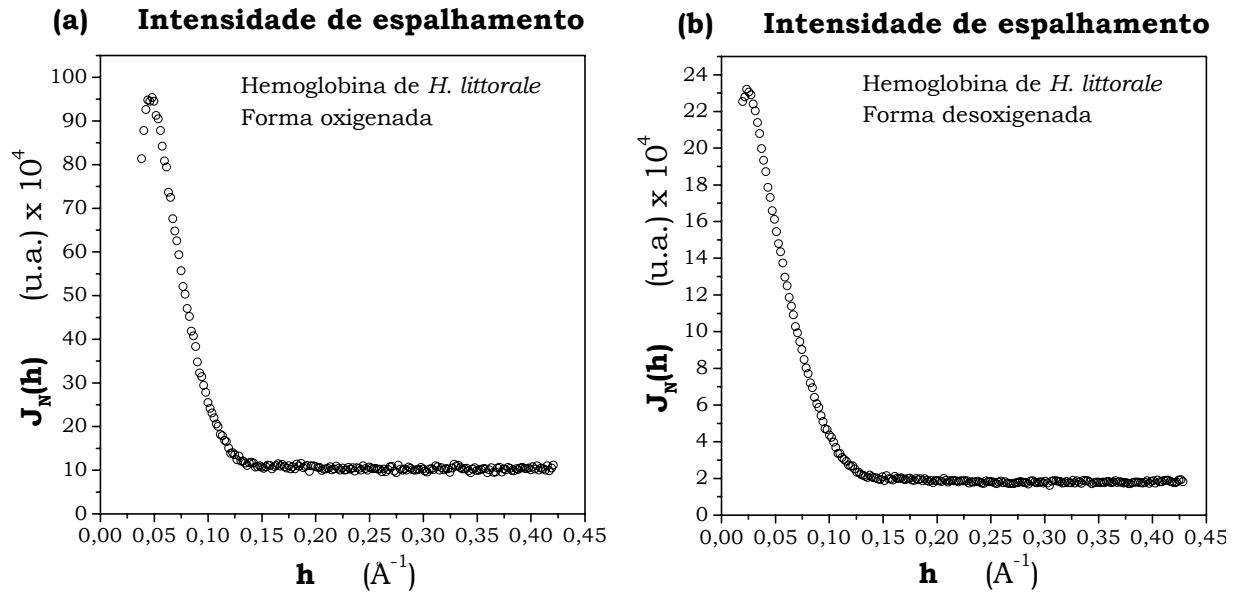
**Tabela 6.1** – Valores de raio de giro e máxima dimensão das hemoglobinas de serpentes e humana.

#### 6. 4 - Hemoglobina de *Hoplosternum littorale*

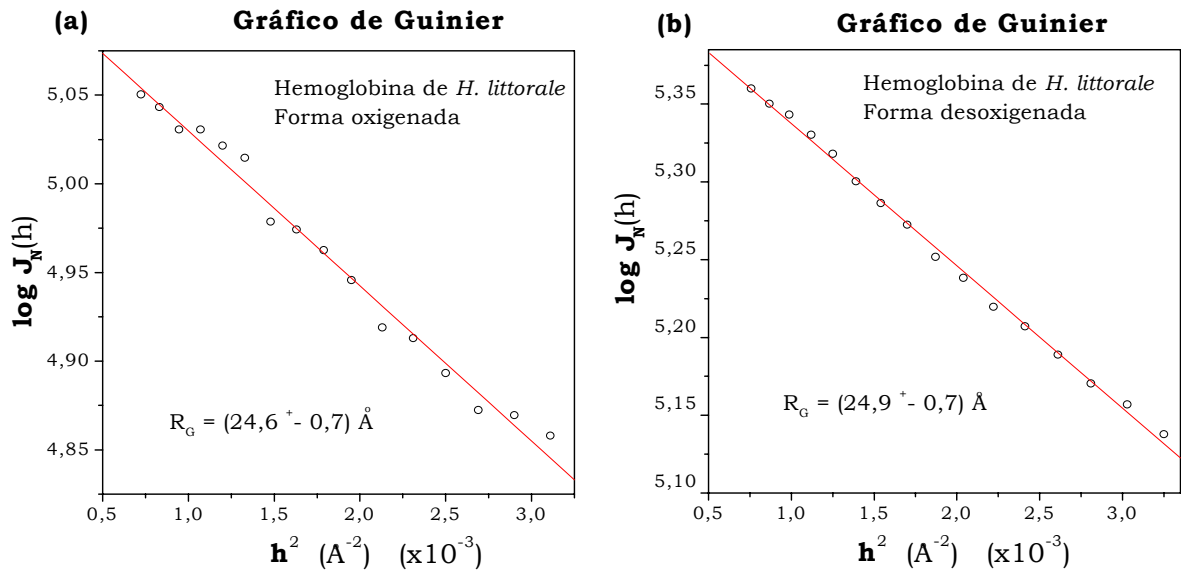
A hemoglobina de *H. littorale* em pH 9,0 foi estudada na forma oxigenada e desoxigenada, de onde, a partir das funções de distribuição de distâncias, foram propostos modelos por meio de técnicas de modelagem.

Na seqüência são apresentados os resultados obtidos nas condições citadas, em que, na figura 6.31 aparecem a curvas de intensidade nas formas oxigenada e desoxigenada. Os gráficos de Guinier são mostrados na figura 6.32, dos quais foram calculados os raios de giro.

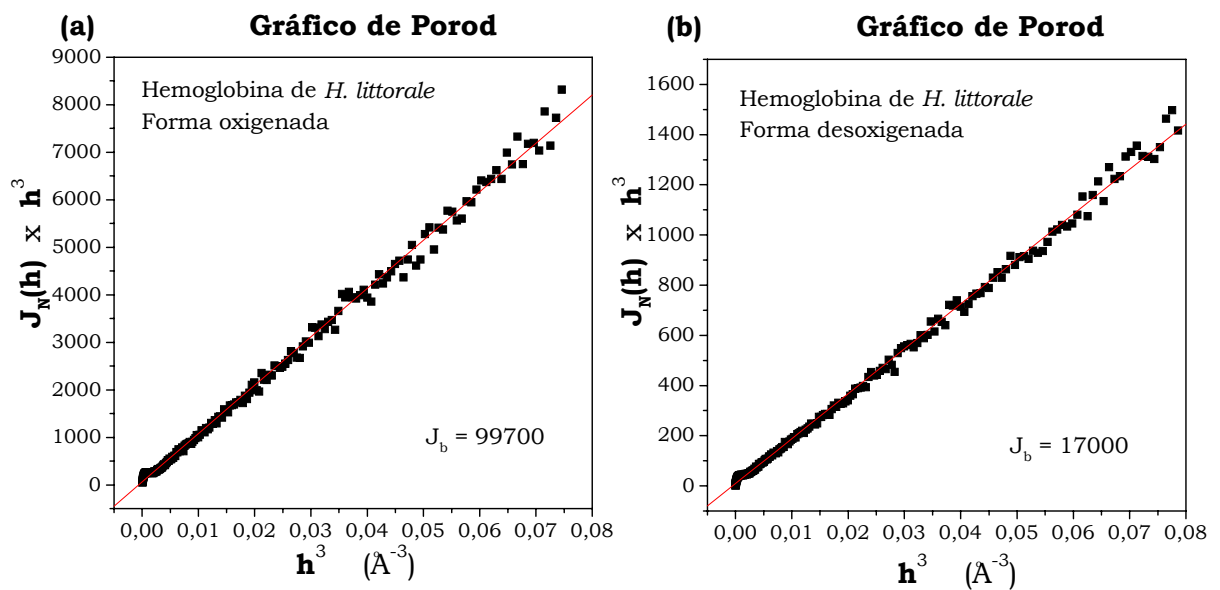
Depois de subtraída a constante de Porod (figura 6.33) foram eliminados os efeitos do perfil do feixe e calculadas as funções distribuição de distâncias (figura 6.34).



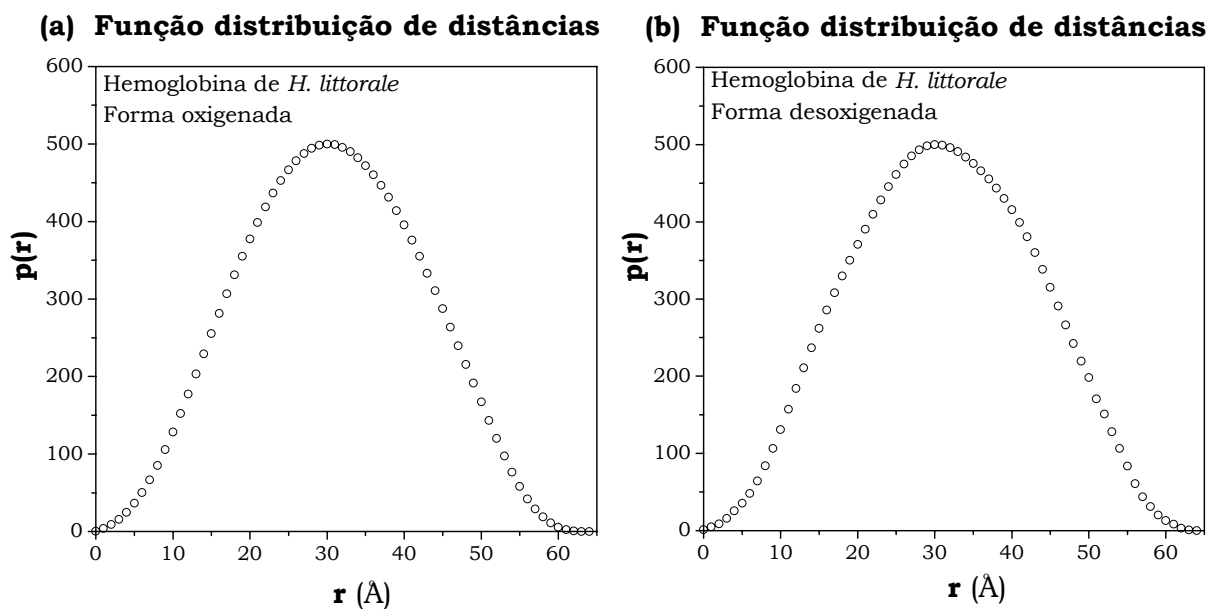
**Figura 6.31** – Curva normalizada da intensidade de espalhamento da hemoglobina de *H. littorale* nas formas: (a) oxigenada; (b) desoxigenada.



**Figura 6.32** – Gráficos de Guinier da hemoglobina de *H. littorale* nas formas: (a) oxigenada e (b) desoxigenada



**Figura 6.33** – Gráficos de Porod da hemoglobina de *H. littorale* nas formas: (a) oxigenada e (b) desoxigenada



**Figura 6.34** – Função distribuição de distâncias da hemoglobina de *H. littorale* nas formas: (a) oxigenada e (b) desoxigenada

Os raios de giro e máximas dimensões da hemoglobina de *H. littorale* nas formas oxigenada e desoxigenada são apresentados na tabela 6.2.

<i>H. Littorale</i>	Raio de giro (Å)		Máxima dimensão (Å)
	Guinier	p(r)	
<b>Oxigenada</b>	24,6±0,7	23,3±0,7	62±2
<b>Desoxigenada</b>	24,9±0,7	23,8±0,7	63±2

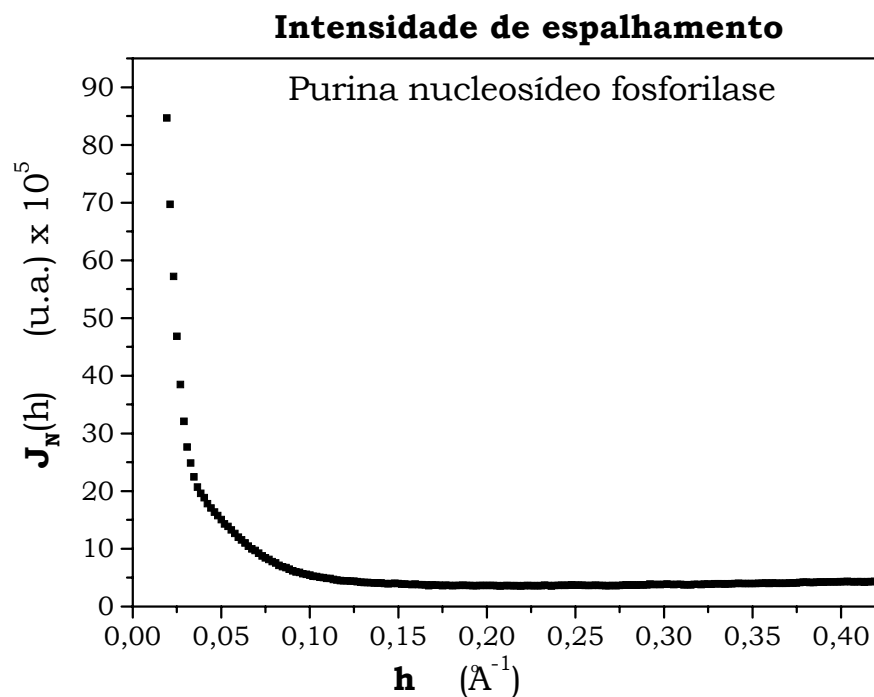
**Tabela 6.2** – Valores de raios de giro e máximas dimensões da hemoglobina de *H. littorale* obtidos por SAXS para as formas oxi e desoxi.

### 6.5 - Purina Nucleosídeo Fosforilase – PNP

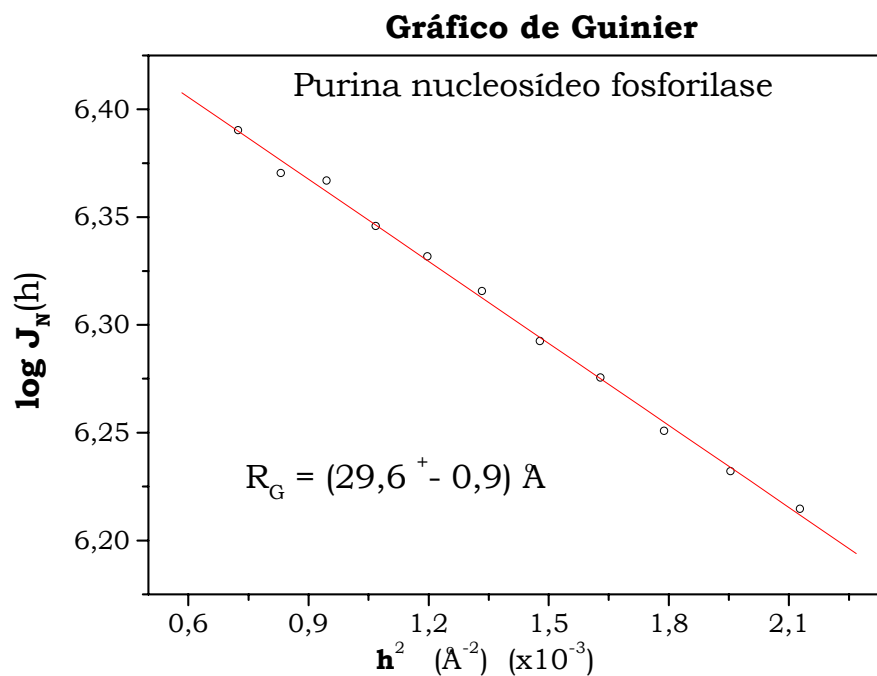
A purina nucleosídeo fosforilase foi estudada em pH fisiológico por SAXS com o intuito de se obter informações da estrutura quaternária em solução comparada com os dados da estrutura cristalográfica.

As funções distribuição de distâncias dos dados de SAXS, serão então, comparadas com as funções p(r) calculadas dos dados cristalográficos e do modelo construído por *docking* de proteína para a forma dimérica.

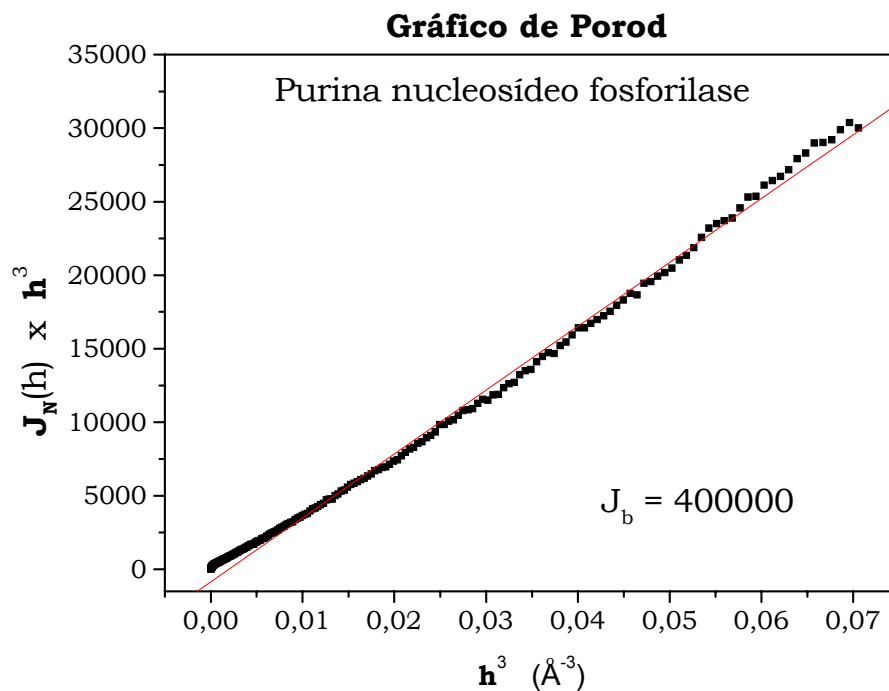
A PNP foi medida em uma única concentração (12mg/ml) de onde se obteve a curva de intensidade mostrada na figura 6.35 e a partir do gráfico de Guinier, da figura 6.36, foi calculado o raio de giro. Depois da eliminação do *background*, auxiliado pelo gráfico de Porod da figura 6.37, a curva de intensidade foi corrigida devido aos efeitos da colimação, através do programa ITP, de onde se obteve também a função p(r) ( figura 6.38).



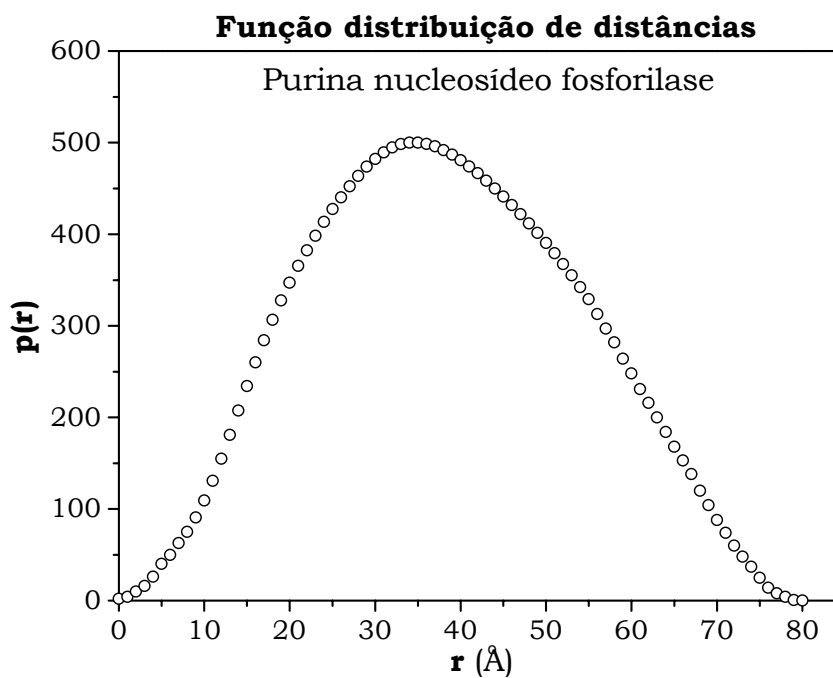
**Figura 6.35** – Curva normalizada da intensidade de espalhamento da purina nucleosídeo fosforilase.



**Figura 6.36** – Gráfico de Guinier da purina nucleosídeo fosforilase.



**Figura 6.37** – Gráfico de Porod da purina nucleosídeo fosforilase.

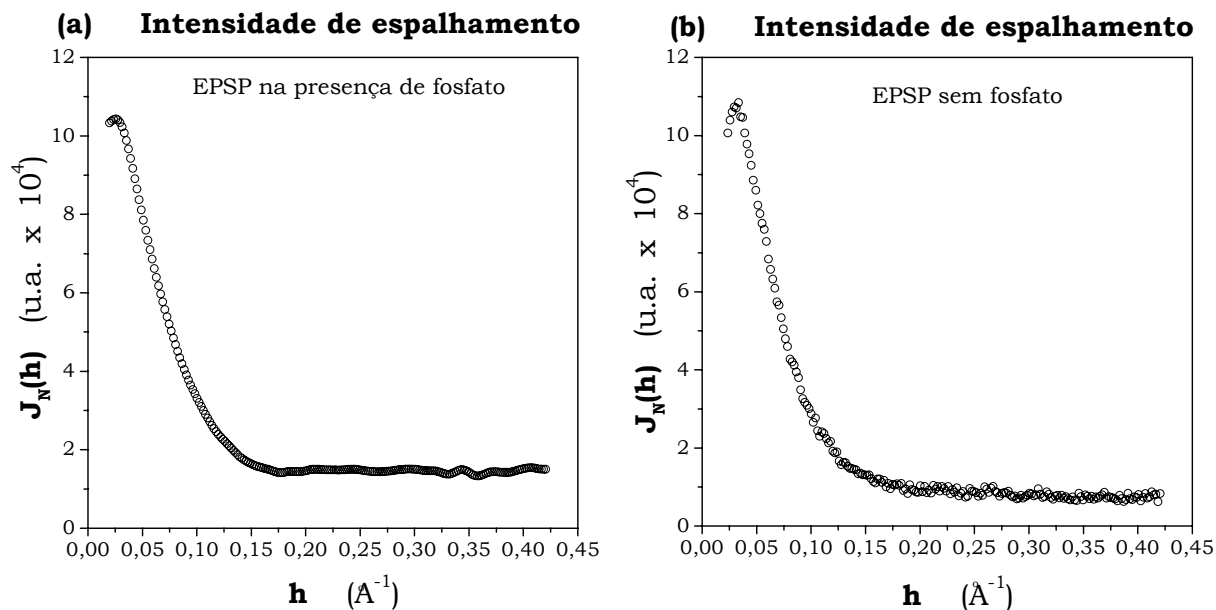


**Figura 6.38** – Função distribuição de distâncias da purina nucleosídeo fosforilase.

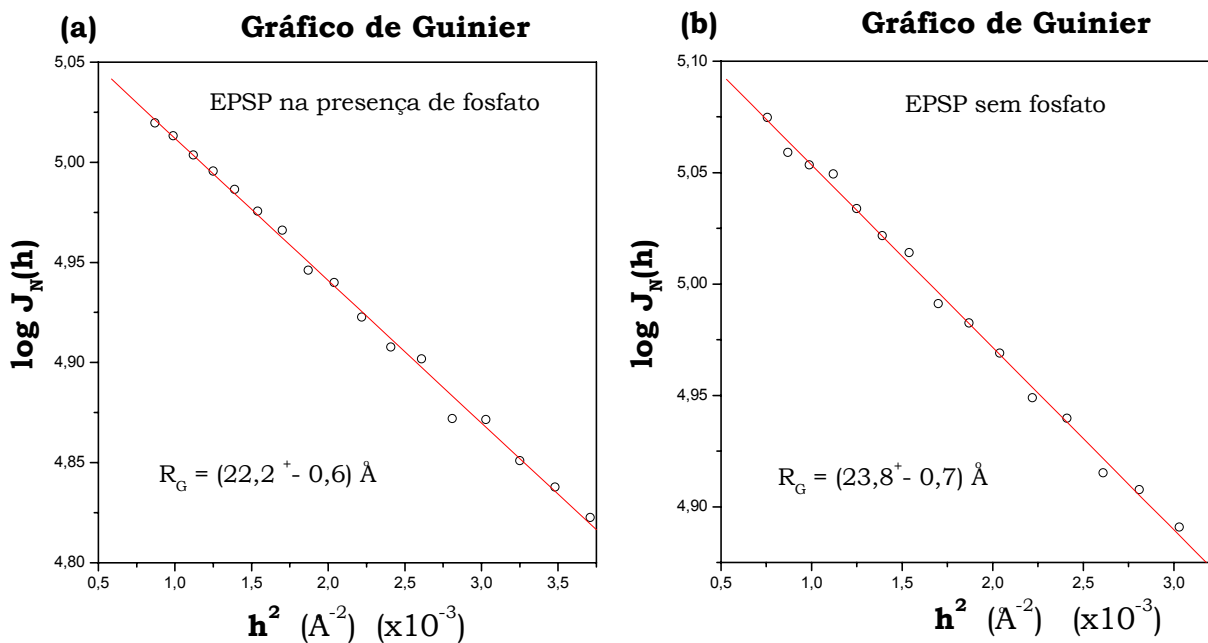
## 6.6 – EPSP Sintase

A EPSP sintase foi analisada em solução por SAXS, tanto na presença quanto na ausência de fosfato, para verificação de mudanças conformacionais, tendo em vista que, de acordo com a literatura, esta pode se apresentar numa forma mais aberta ou fechada, dependendo das condições do meio. Assim, a proteína foi medida numa única concentração de 12mg/ml e os gráficos de intensidade de espalhamento, nas condições mencionadas, podem ser encontrados na figura 6.39. Ainda, podem ser vistos os gráficos de Guinier na figura 6.40, de onde foram calculados os raios de giro. Os gráficos de Porod são mostrados na figura 6.41 dos quais foram obtidos os valores das constantes de Porod para eliminação do *background*. Depois de realizadas estas correções preliminares, através do programa ITP, foram eliminados os efeitos do sistema de colimação e calculadas as funções distribuição de distâncias, mostradas na figura 6.42.

Modelos da EPSP sintase nas formas aberta e fechada, foram construídos pelo programa MODELLER, dos quais foram calculadas as funções  $p(r)$  para depois serem comparadas às funções  $p(r)$  experimentais. Estes modelos e suas funções  $p(r)$  são mostrados na seção 6.8.4.

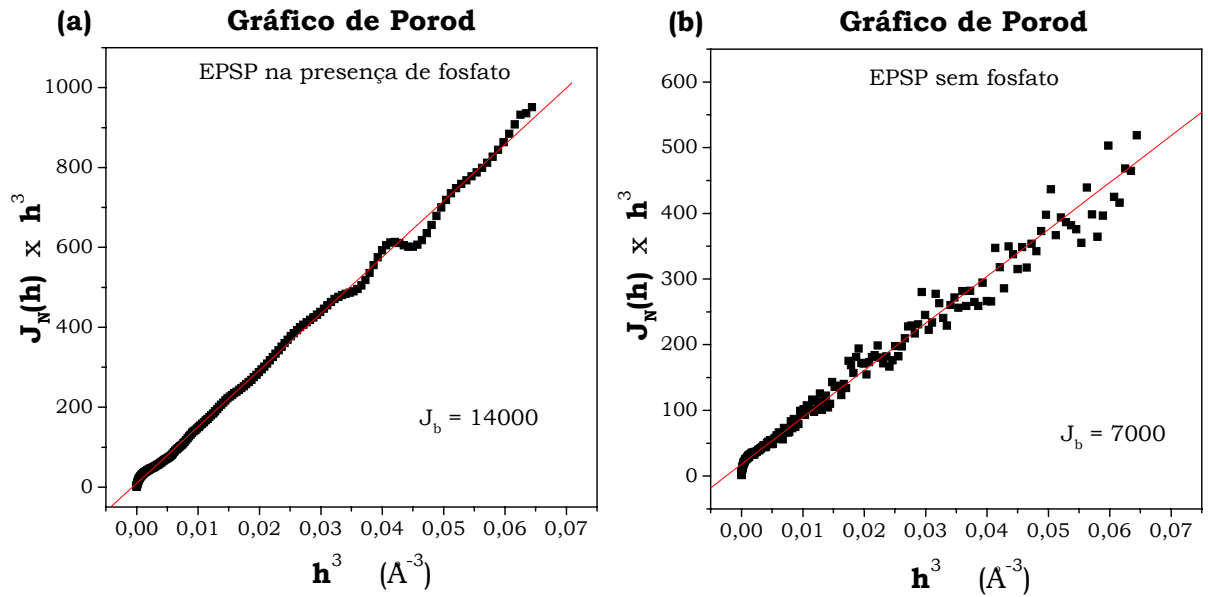


**Figura 6.39** – Curva normalizada da intensidade de espalhamento da EPSP (a) na presença e (b) na ausência de fosfato.

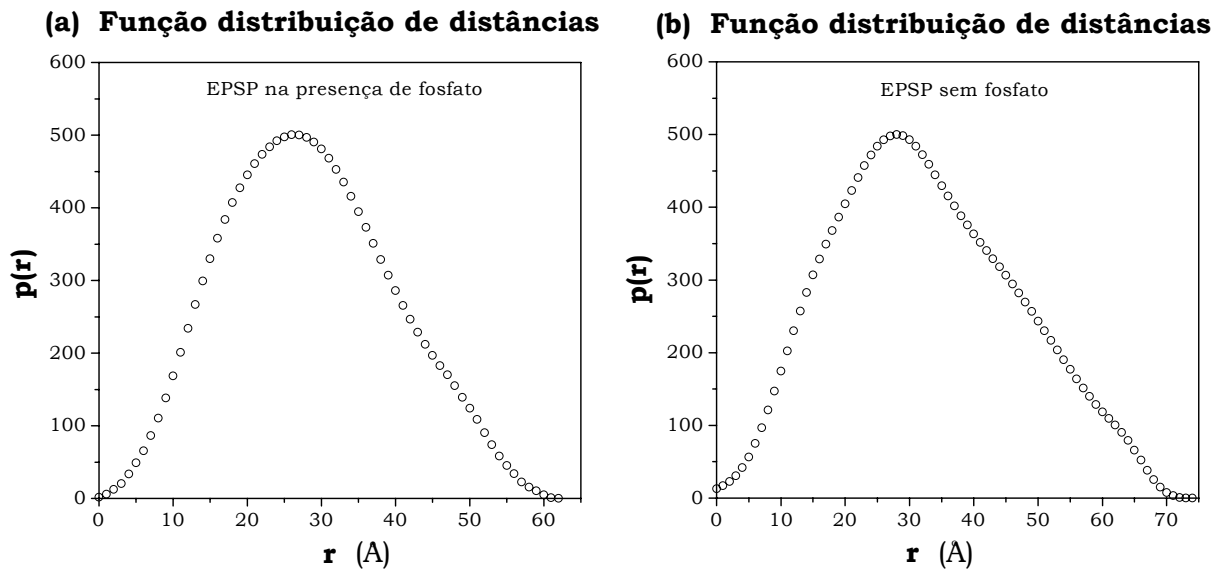


**Figura 6.40** – Gráficos de Guinier da EPSP (a) na presença de fosfato e (b) na ausência de fosfato.





**Figura 6.41** – Gráficos de Porod da EPSP (a) na presença de fosfato e (b) na ausência de fosfato.



**Figura 6.42** – Função distribuição de distâncias da EPSP (a) na presença de fosfato e (b) na ausência de fosfato.

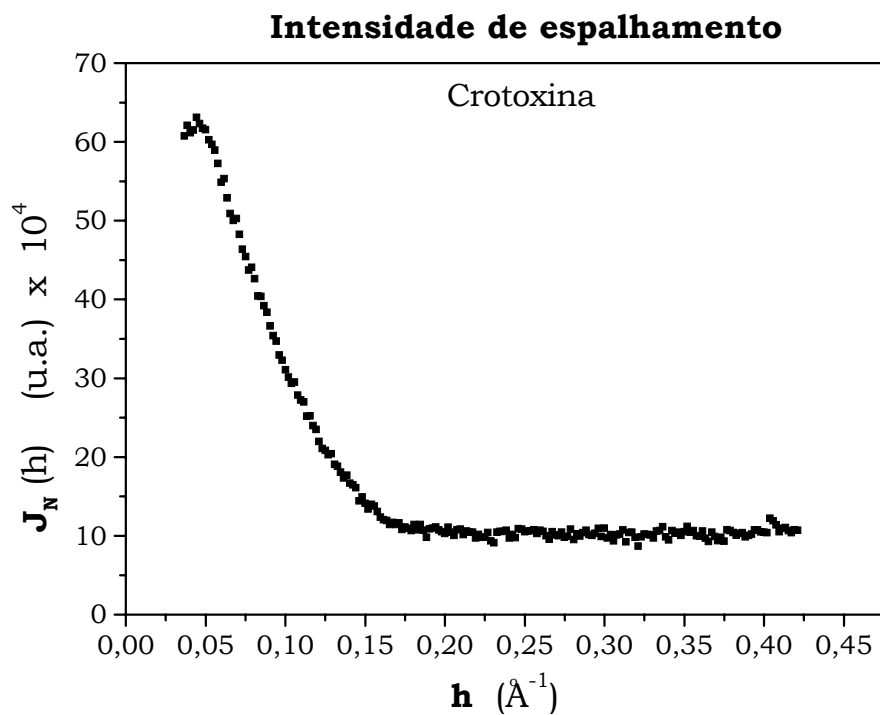
Os valores dos raios de giro e máximas dimensões calculados da EPSP em solução com e sem fosfato são mostrados na tabela 6.3.

EPSP	Raio de giro (Å)		Máxima dimensão (Å)
	Guinier	p(r)	
Com fosfato	22,2±0,6	22,0±0,6	61±2
Sem fosfato	23,8±0,7	24,8±0,7	72±2

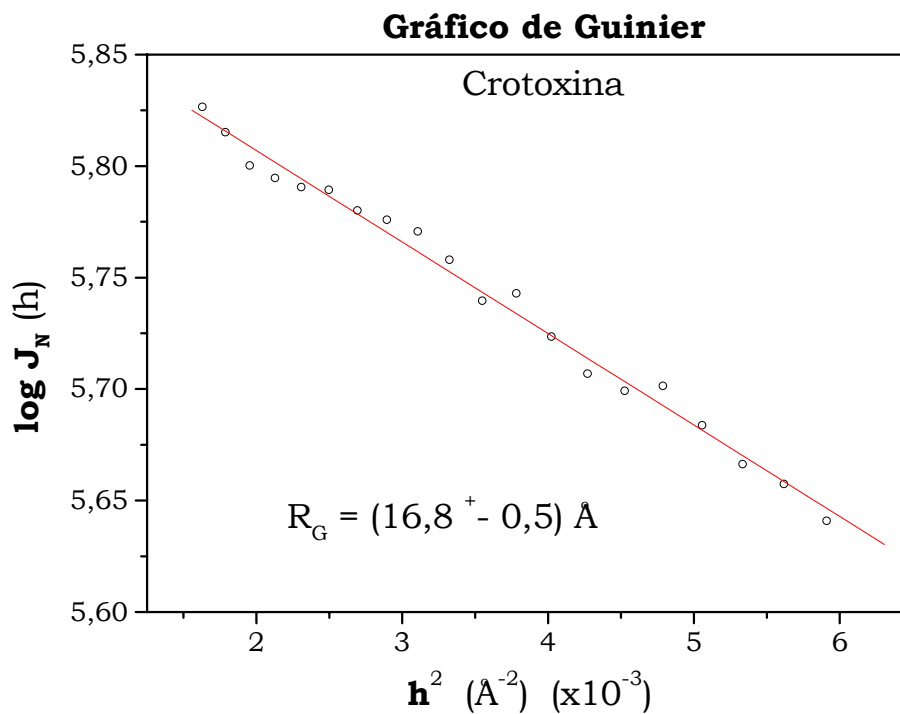
**Tabela 6.3** – Valores de raios de giro e máximas dimensões da EPSP.

## 6.7 - Crotoxina

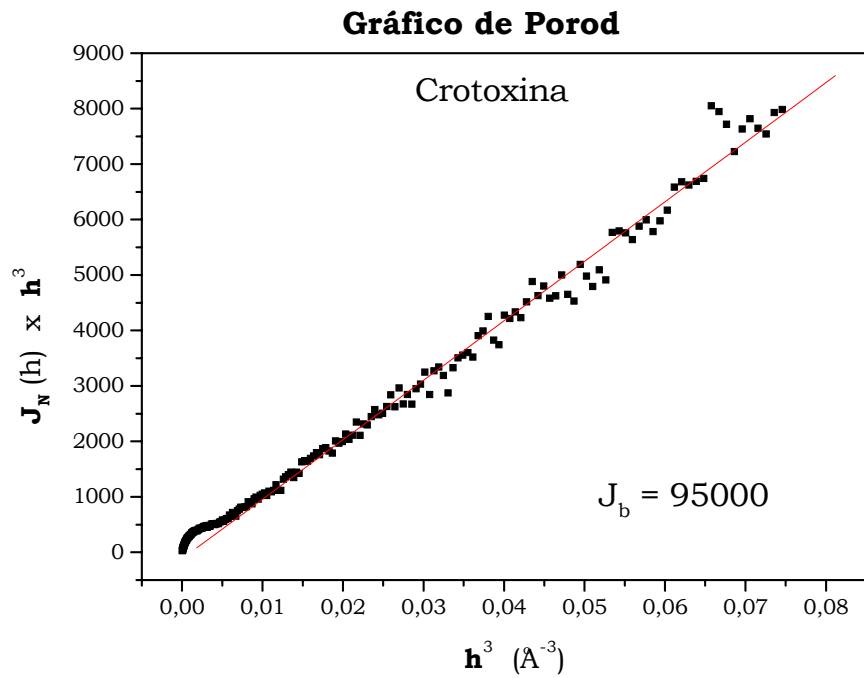
A crotoxina foi estudada por espalhamento de raios X a baixos ângulos com a finalidade de se encontrar um modelo teórico através de *docking* de proteínas utilizando para isso os programas MODELLER e GRAMM. O complexo crotoxina foi medido em pH 3,5 e em concentração 10mg/ml. A curva de intensidade é mostrada na figura 6.43, assim como o gráfico de Guinier, pela figura 6.44. Ainda, pode ser encontrado na figura 6.45, o gráfico de Porod e posteriormente, a função p(r), na figura 6.46.



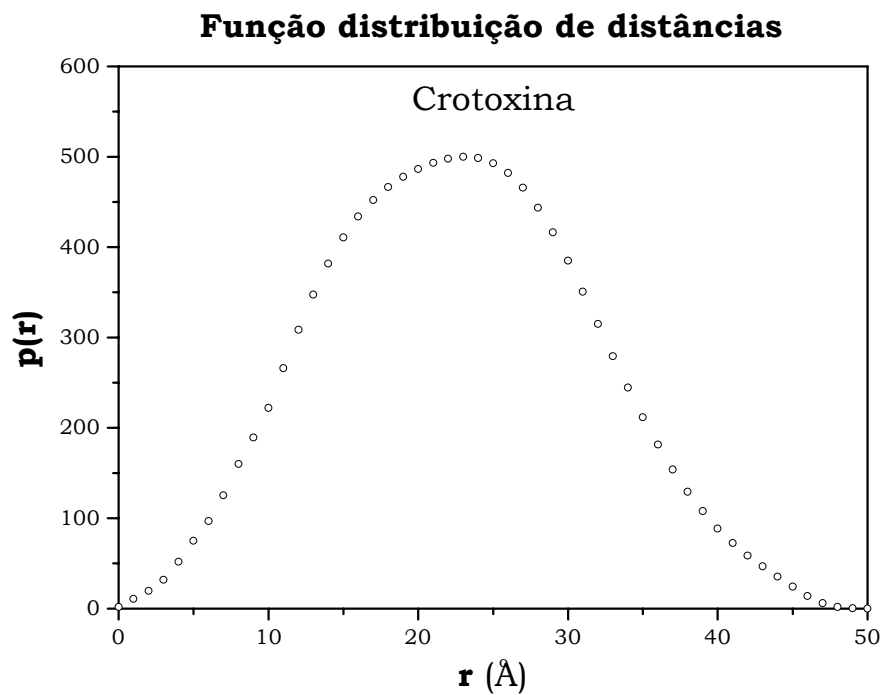
**Figura 6.43** – Curva normalizada da intensidade de espalhamento da Crotoxina.



**Figura 6.44** – Gráfico de Guinier da Crotoxina.



**Figura 6.45** – Gráfico de Porod da Crotoxina.



**Figura 6.46** – Função distribuição de distâncias da Crotoxina.

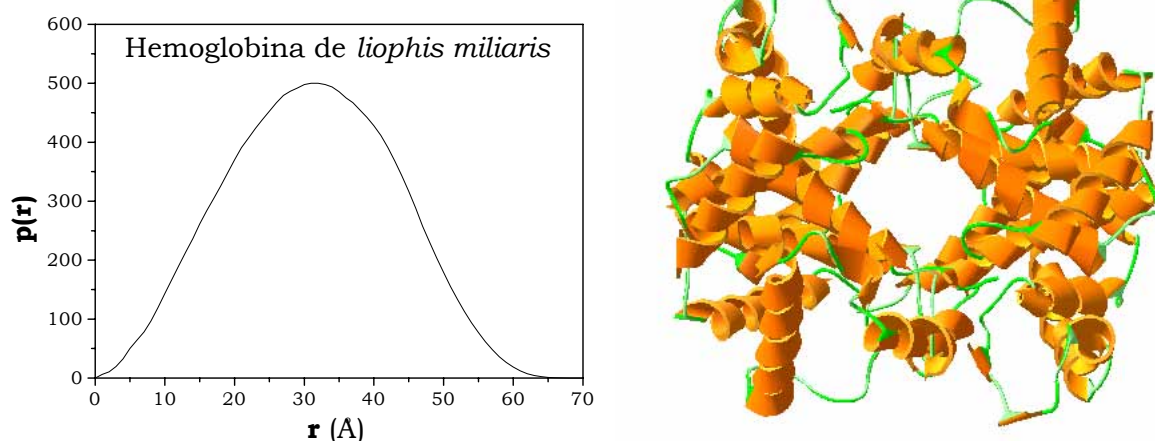
## **6.8 - Modelos teóricos**

Para a maioria das proteínas estudadas neste trabalho, foram propostos modelos construídos ou por modelagem ou por *docking* de proteínas. Na seqüência são apresentados os modelos e suas respectivas funções distribuição de distâncias para posterior comparação com os resultados encontrados das medidas de SAXS. Maiores detalhes sobre os modelos são apresentados na parte III da discussão.

### **6.8.1 - *Liophis miliaris***

O modelo da hemoglobina de *Liophis miliaris* foi construído por modelagem, conforme procedimento descrito na parte de materiais e métodos deste trabalho. Foi utilizado como referência para a construção do modelo, as coordenadas da hemoglobina humana depositada no PDB de código 1BAB. O modelo e sua função distribuição de distâncias podem ser vistos na figura 6.47.

Na tabela 6.5 estão relacionados os valores de raios de giro, máximas dimensões e coeficientes de correlação para comparação.



**Figura 6.47** – Modelo da hemoglobina de *Liophis miliaris* construído pelo programa MODELLER com sua respectiva função  $p(r)$ .

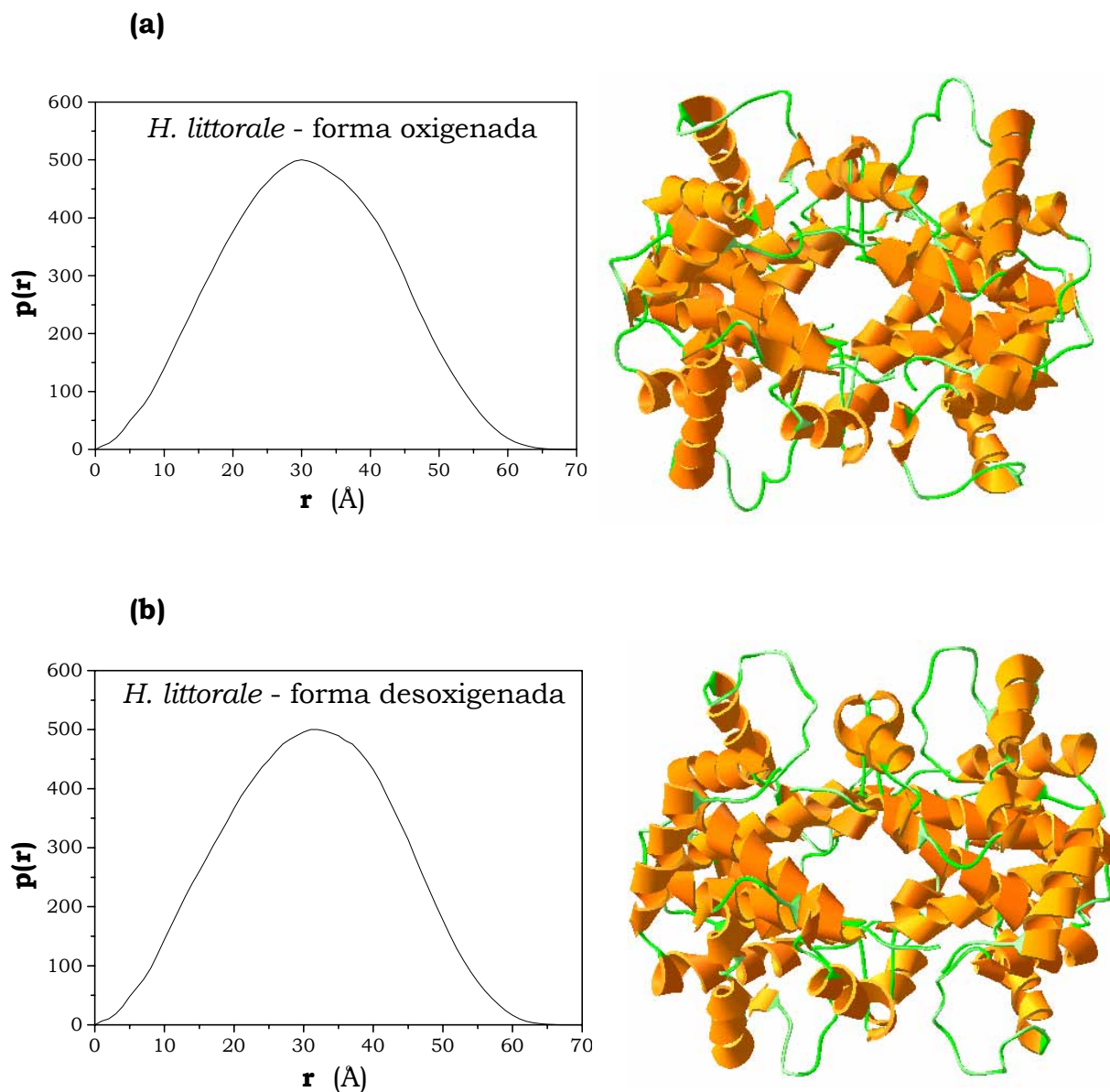
Hemoglobina de <i>Liophis</i>	Raio de giro (Å)	Máxima dimensão (Å)	Coefficiente de correlação
Experimental	24,2	63	0,9976
Modelo	23,5	63	

**Tabela 6.5** - Valores de raios de giro, máximas dimensões e coeficientes de correlação entre as funções  $p(r)$  experimental e teórica, da hemoglobina de *L. miliaris* e modelo.

### 6.8.2 - *H. littorale*

O modelo da hemoglobina de *H. littorale* foi construído por modelagem, tanto para a forma oxigenada quanto para a forma desoxigenada, pelo programa MODELLER. Nos dois casos, foi usado como referência a estrutura da hemoglobina humana de código no PDB 1HHO. As funções distribuição de distâncias dos modelos e os modelos são mostrados na figura 6.48.

Os raios de giro dos modelos das hemoglobinas nas formas oxi e desoxi e os coeficientes de correlação entre as funções  $p(r)$  experimental e teórica, são apresentados na tabela 6.6.



**Figura 6.48** – Modelos das hemoglobinas de *H. littorale* construído pelo programa MODELLER com sua respectiva função  $p(r)$  nas formas (a) oxigenada e (b) desoxigenada.

<b>Hemoglobina de <i>H. littorale</i></b>	<b>Raio de giro (Å)</b>	<b>Máxima dimensão (Å)</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>
<b>Exp. oxi</b>	<b>23,3</b>	<b>62</b>	<b>0,9992</b>
<b>Modelo oxi</b>	<b>23,4</b>	<b>65</b>	
<b>Exp. desoxi</b>	<b>23,8</b>	<b>63</b>	<b>0,9964</b>
<b>Modelo desoxi</b>	<b>23,5</b>	<b>63</b>	

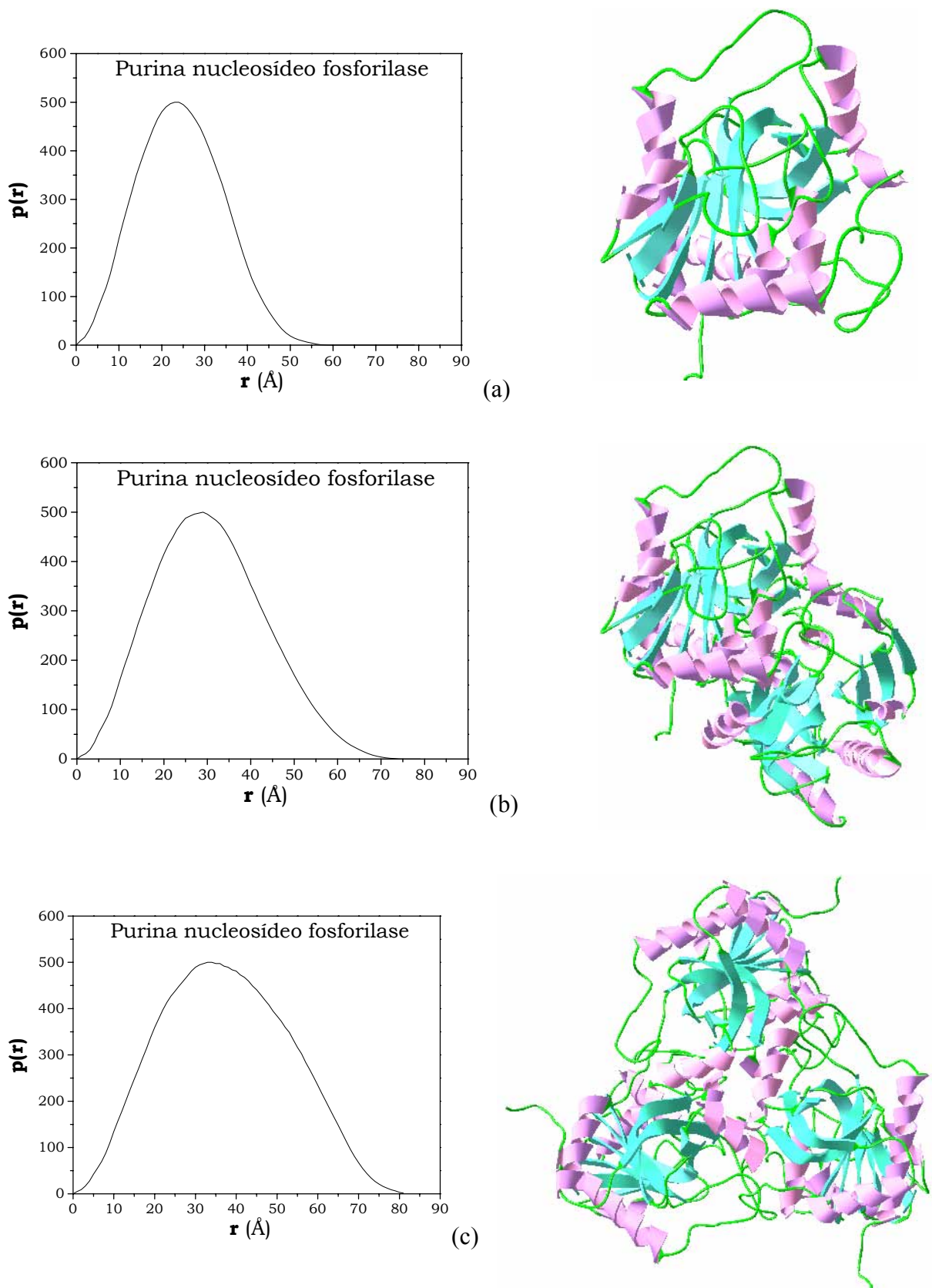
**Tabela 6.6** - Raios de giro dos modelos das hemoglobinas nas formas oxi e desoxi e os coeficientes de correlação entre as funções  $p(r)$  experimental e teórica.

### 6.8.3 - Purina nucleosídeo fosforilase

Os modelos apresentados a seguir da PNP (figura 6.49) foram construídos com base na estrutura cristalina da enzima, para comparação entre funções distribuição de distâncias buscando evidências da forma da proteína em solução e em condições mais próximas às biológicas. A forma trimérica foi obtida diretamente da estrutura do cristal da mesma PNP humana analisada neste trabalho. A forma monomérica foi obtida do trímero da mesma estrutura anterior. A partir deste monômero, a forma dimérica foi construída por *docking* através do programa GRAMM.

A estrutura da PNP humana e o modelo dimérico foram cedidos pelo prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr.



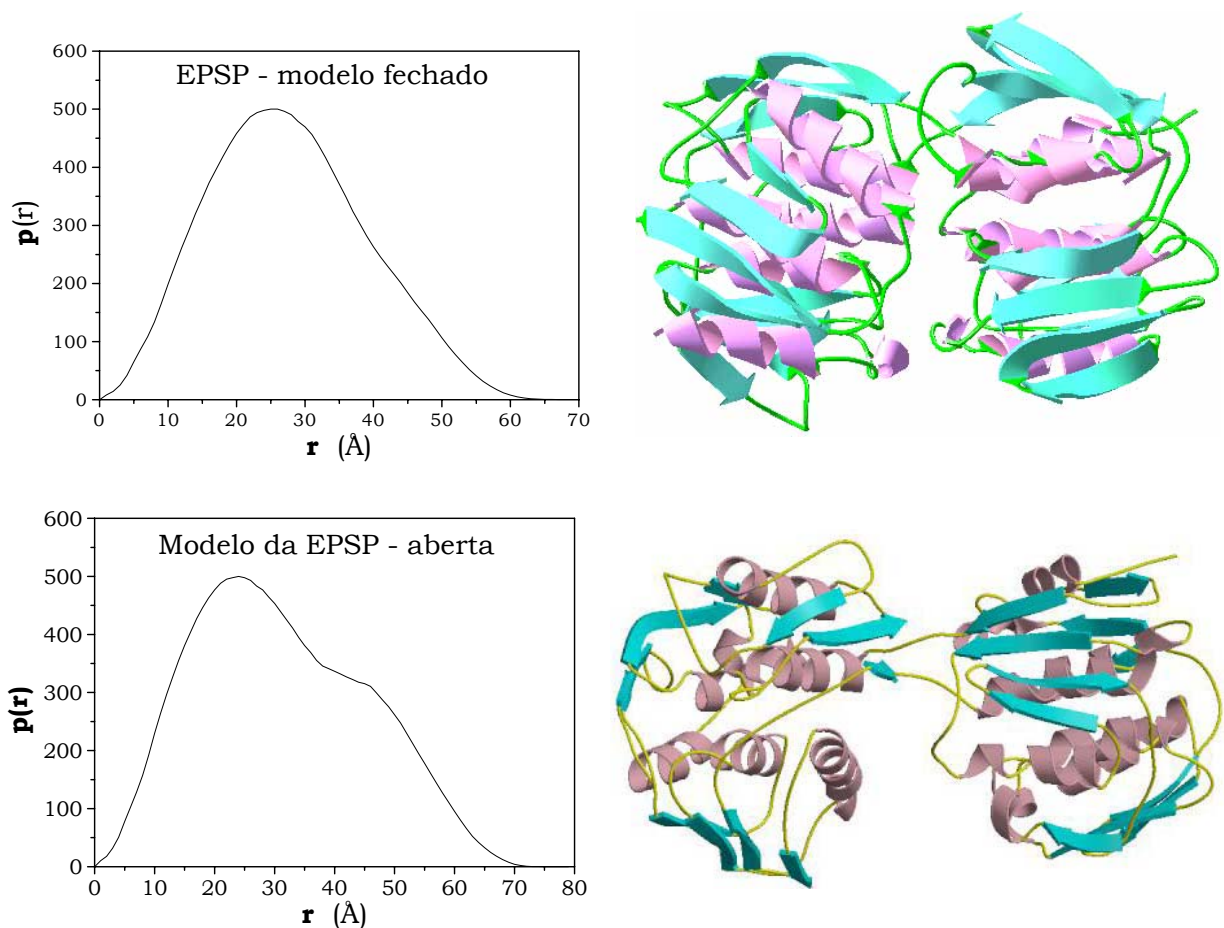


**Figura 6.49** – Modelos da purina nucleosídeo fosforilase nas formas: (a) monomérica; (b) dimérica e (c) trimérica e suas respectivas função  $p(r)$ .

#### 6.8.4 – EPSP Sintase

O modelo da EPSP Sintase na forma fechada, com ligante, foi construído pelo programa MODELLER com base na estrutura depositada no PDB com o código 1G6S, assim como o modelo na forma aberta, sem ligante, foi baseado na estrutura de código 1EPS. Na figura 6.50 são mostrados os modelos e suas respectivas funções distribuição de distâncias.

Os modelos foram cedidos pelo prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr e maiores detalhes são apresentados na parte III deste capítulo.



**Figura 6.50** – Modelo da EPSP e funções  $p(r)$  nas formas (a) fechada e (b) aberta.

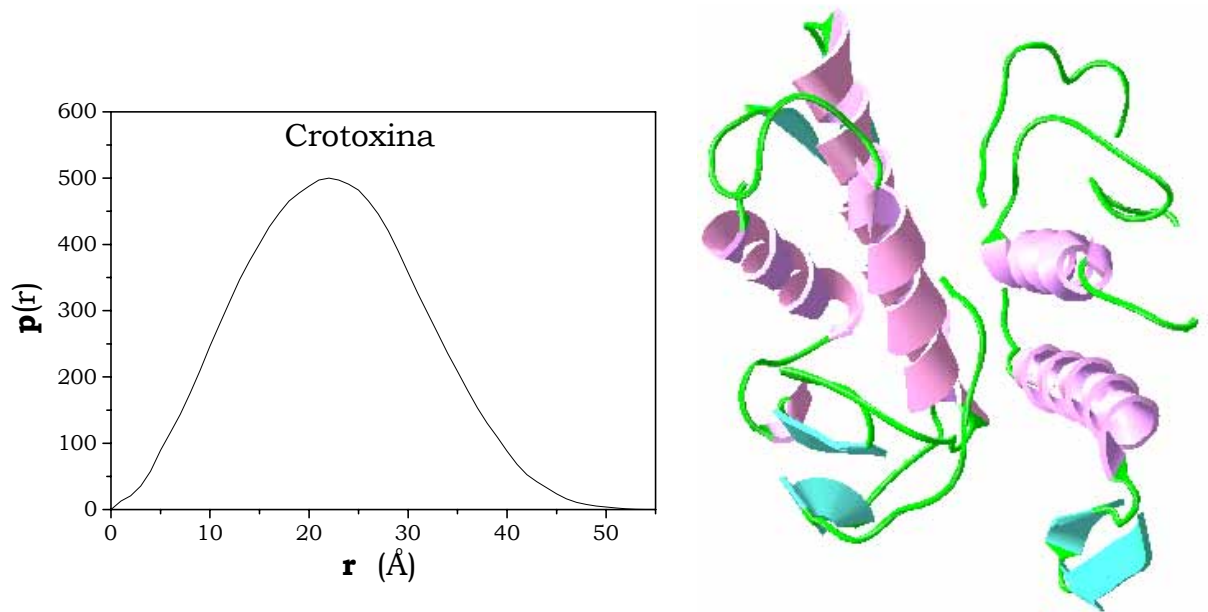
Os valores de raio de giro, máxima dimensão e coeficientes de correlação, aparecem na tabela 6.7.

<b>EPSP sintase</b>	<b>Raio de giro (Å)</b>	<b>Máxima dimensão (Å)</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>
<b>Experimental com fosfato</b>	<b>22,0</b>	<b>61</b>	<b>0,9954</b>
<b>Modelo fechado</b>	<b>21,2</b>	<b>62</b>	
<b>Experimental sem fosfato</b>	<b>24,8</b>	<b>72</b>	<b>0,9653</b>
<b>Modelo aberto</b>	<b>24,2</b>	<b>72</b>	

**Tabela 6.7** - Raios de giro experimentais e dos modelos da EPSP com e sem fosfato e os respectivos coeficientes de correlação entre as funções  $p(r)$  experimental e teórica.

### 6.8.5 – Crotoxina

Modelos de Crotoxina foram gerados por *docking* de proteínas e dos vários obtidos foi selecionado apenas um, ou seja, o de maior correlação com os dados experimentais. Estes dados foram obtidos da proteína em solução em pH 3,5 por Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos. Na figura 6.51 é apresentado o modelo selecionado e função  $p(r)$  calculada pelo programa MULTIBODY.



**Figura 6.51** – Modelo da crotoxina e sua respectiva função  $p(r)$ .

# 7 - Discussão

---

## 7.1 - Introdução

O espalhamento de raios X a baixos ângulos foi utilizado neste trabalho para estudar proteínas em solução visando obter informações referentes às estruturas terciária e quaternária e verificar a ocorrência de mudanças na conformação das proteínas induzidas pelo meio. De posse de outros dados, foi possível, propor modelos teóricos para a maioria das proteínas estudadas através de programas computacionais apropriados.

O emprego de técnicas de modelagem já vem sendo largamente usado no estudo estrutural de proteínas, principalmente associado à cristalografia. Neste trabalho, a modelagem foi utilizada junto à técnica de SAXS de onde se pôde selecionar modelos através da comparação entre funções distribuição de distâncias e pelo cálculo dos coeficientes de correlação entre elas.

A discussão dos resultados será dividida em três partes: numa primeira, será discutido o método de aplicação da técnica de SAXS em situações de escassez de material para análise; posteriormente, serão discutidos os resultados comparando-os com dados da literatura sobre as proteínas em questão; por último, a discussão enfocará os modelos e os métodos empregados para obtê-los.

## Parte I

### 7.2 - Estudo por SAXS sem o uso de extrapolação à concentração zero

A teoria de SAXS foi desenvolvida para sistemas compostos de uma única partícula sob a incidência de radiação monocromática. Estas condições não podem ser alcançadas em laboratório e várias dificuldades surgem durante a coleta e a análise dos dados. Na prática, é empregada uma solução monodispersa de proteína e interferências interpartículas ocorrem devido aos efeitos de concentração. Tradicionalmente, para eliminar tais efeitos, uma série de medidas, em várias concentrações diferentes, é realizada e a partir destas é feito uma extrapolação das curvas de intensidades. A intensidade resultante da extrapolação para concentração zero é considerada como se originada do espalhamento de uma amostra com diluição infinita e, portanto, livre dos efeitos de concentração.

Pelo método descrito, são necessárias grandes quantidades de material numa análise de SAXS o que pode inviabilizar a aplicação da técnica. Necessita-se, na maioria das vezes, uma quantidade mínima de 20mg de proteína, valor que pode ser aumentado várias vezes dependendo da necessidade de repetições das medidas. As concentrações devem estar entre 3mg/ml e 30mg/ml, pois, abaixo deste mínimo, grandes erros estatísticos são produzidos. Ainda, a função  $p(r)$  fica fortemente afetada pelos efeitos de concentração e uma boa indicação de que estes possam ser desprezados é a não ocorrência de oscilações ou valores negativos na região próxima à máxima dimensão da partícula (Reščič *et al*, 2001).

Um método alternativo para as situações de escassez de material é proposto neste trabalho, em que são efetuadas medidas em uma única concentração sem extrapolação à concentração zero. A proposta é de se medir numa concentração mais baixa possível para que se tenha uma menor interferência interpartículas, compensando a baixa estatística produzida nestes casos pelo aumento do tempo de exposição da amostra aos raios X.

É importante ter em mente a objetividade do estudo em questão, tendo muito bem definido quais informações se desejam obter dos dados de SAXS. Nos casos em que se queira apenas constatar mudanças bruscas de comportamento das proteínas, induzidas, ou por adição de ligantes ou pela alteração das características do meio fazendo com que grandes modificações ocorram, tanto em nível de estrutura terciária quanto quaternária, um simples cálculo dos raios de giro associado a outras informações conhecidas da literatura seriam suficientes e, conseqüentemente, os efeitos de concentração nestes casos são muito menos relevantes. Mesmo assim, é importante lembrar que SAXS é uma técnica de baixa resolução e detalhes em nível atômico são impossíveis de ser obtidos.

Neste trabalho foram feitos inúmeros testes com hemoglobina de serpentes ficando constatado que concentrações de proteínas em torno de 10mg/ml a 12mg/ml produzem resultados muito semelhantes àqueles obtidos pelo método de extrapolação à concentração zero, observando-se apenas pequenas diferenças na forma das funções  $p(r)$ .

Para que se possa comparar os dois métodos, foram analisadas hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus* e *Liophis* nas condições já mencionadas de onde foram verificadas apenas pequenas diferenças nos raios de giro, tanto pela região de Guinier quanto pela  $p(r)$  e máximas dimensões das partículas idênticas (ver tabela 6.1).

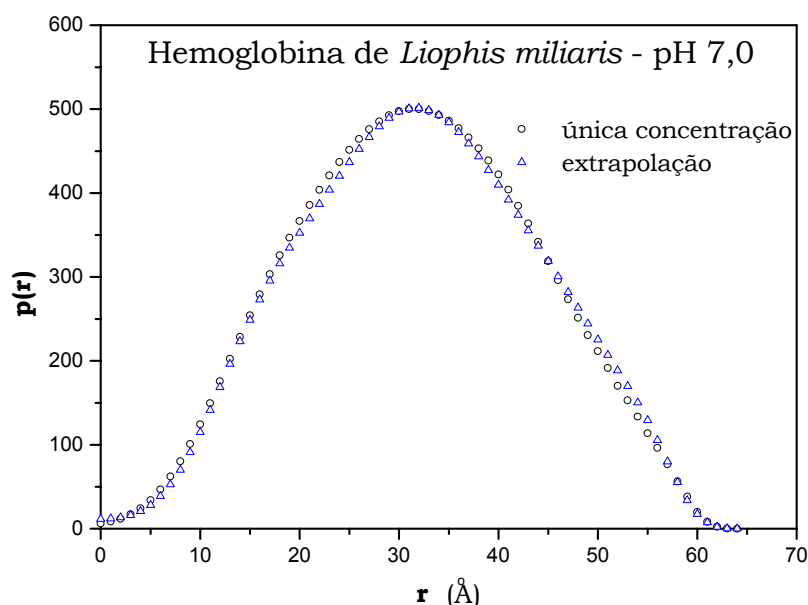
Para a hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* em pH 7,0, em uma única concentração, foi calculado um raio de giro de Guinier de 24,4Å, muito próximo do valor encontrado para o mesmo pH da curva extrapolada, de 24,6Å. Em cálculos mais precisos, ou seja, nos raios de giro determinados pela  $p(r)$ , os valores foram de 23,6Å e 23,7Å, obtidos de uma única concentração e por extrapolação, respectivamente. Para a mesma hemoglobina em pH 8,0, os valores de raio de giro de Guinier, em uma única concentração e por extrapolação, foram, respectivamente, 24,8Å e 24,5Å; e 23,8Å pela  $p(r)$  nos dois métodos. Estes dados mostram que ambos os métodos produzem resultados compatíveis, pois os valores dos raios de giro diferem dentro dos erros experimentais. Na figura 7.1 são apresentadas as funções distribuição de distâncias determinadas pelos dois métodos.

Os valores dos raios de giro da hemoglobina de *Liophis* em pH 7,0, também podem ser encontrados na tabela 6.1. O raio de giro de Guinier calculado de uma única concentração é de 24,8Å, que concorda com o valor obtido por extrapolação de 24,3Å. Já, os valores determinados pela  $p(r)$ , foram, 24,1Å, com uma única concentração, e 24,2Å, por extrapolação, também com máximas dimensões iguais a 63 Å em ambos os casos.

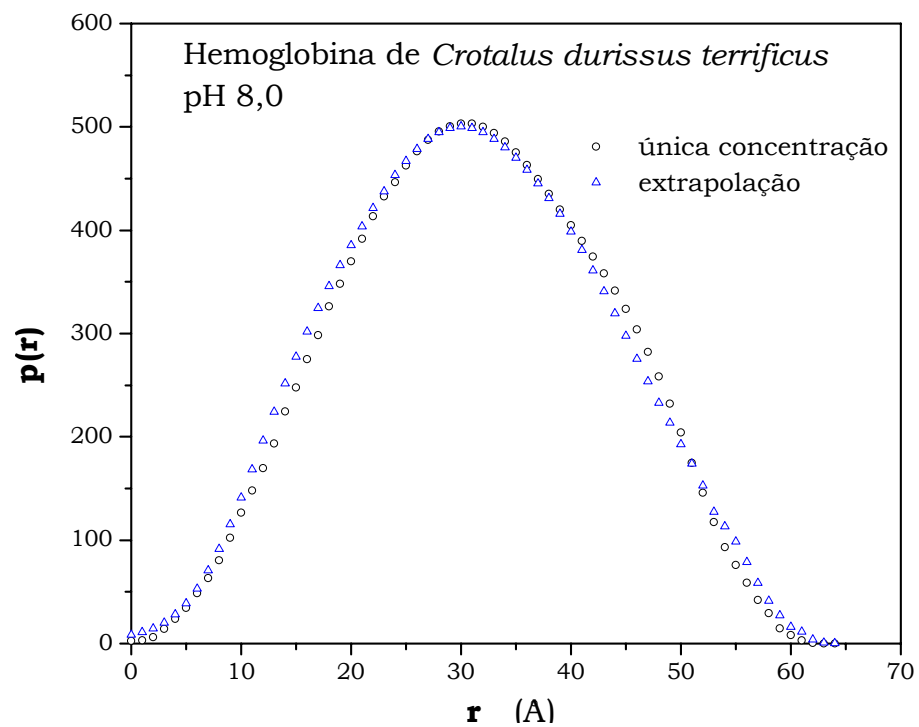
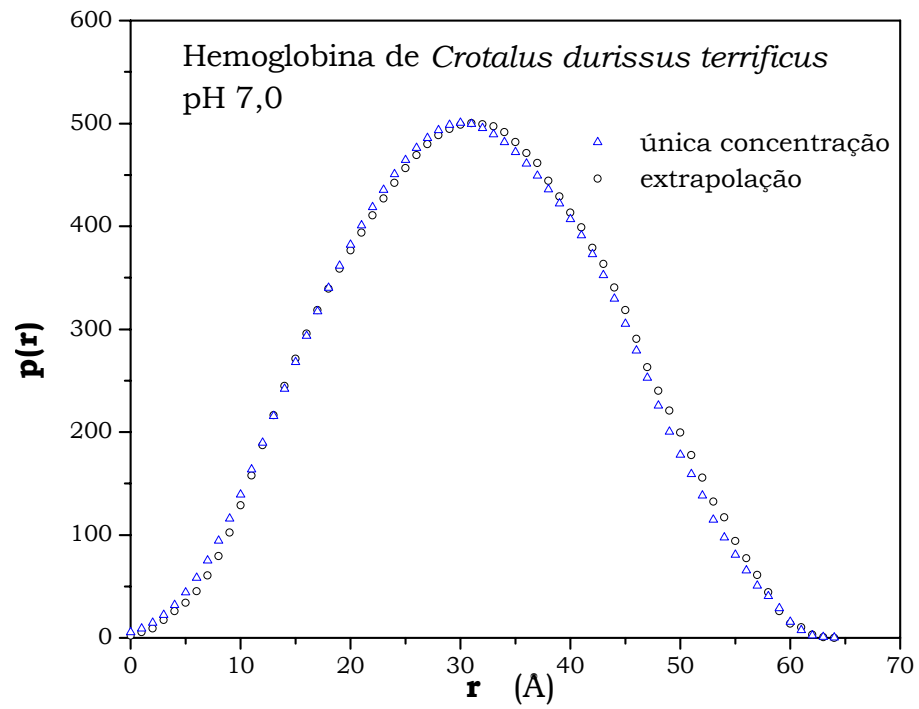


Na figura 7.1 as funções  $p(r)$  da hemoglobina de *Liophis* obtidas pelos diferentes métodos são comparadas, assim como, na figura 7.2, a comparação é feita entre as hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus*. Desta comparação, pode ser notada mínima diferença entre as curvas. Ainda, nenhuma oscilação na região de maiores distâncias é observada, mostrando que os efeitos de concentração podem ser desprezados.

Deve ficar entendido que a discussão aqui não se trata da substituição do método tradicional de estudos de proteínas por SAXS, mas de um método alternativo que produz resultados satisfatórios nas ocasiões de escassez de material para análise e que pode, também, ser utilizado para análise estrutural preliminar de um grande número de proteínas como aquelas identificadas em projetos genomas.



**Figura 7.1** – Funções  $p(r)$  da hemoglobina de *Liophis* em pH 7,0 obtidas pelos métodos de única concentração e por extrapolação.

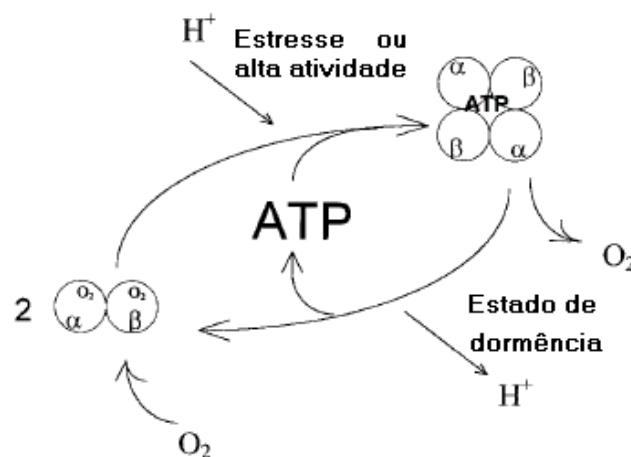


**Figura 7.2** – Funções  $p(r)$  da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* em pH 7,0 e pH 8,0 obtidas pelos métodos de única concentração e por extrapolação.

## Parte II

### 7.3 - Hemoglobinas de serpentes

De acordo com a literatura (Matsuura *et al*, 1987; Matsuura *et al*, 1989; Focesi *et al*, 1987), foi proposto um mecanismo de associação dímero-tetrâmero para a hemoglobina de *Liophis miliaris* ao qual os autores atribuem a uma adaptação desses animais no processo evolutivo. Foi sugerido que a hemoglobina da serpente, em estado de dormência quando o pH do sangue é aumentado, adotaria a forma dimérica que atuaria como transportadora e armazenadora de  $O_2$ , como ocorre com a mioglobina. Já, em situações de estresse ou alta atividade, há uma diminuição do pH promovendo a tetramerização induzida pelo ATP, resultando na liberação de oxigênio. A figura 7.3 mostra o modelo sugerido para o transporte de  $O_2$  pela hemoglobina de serpente, *in vivo* (Bonafe *et al*, 1999).

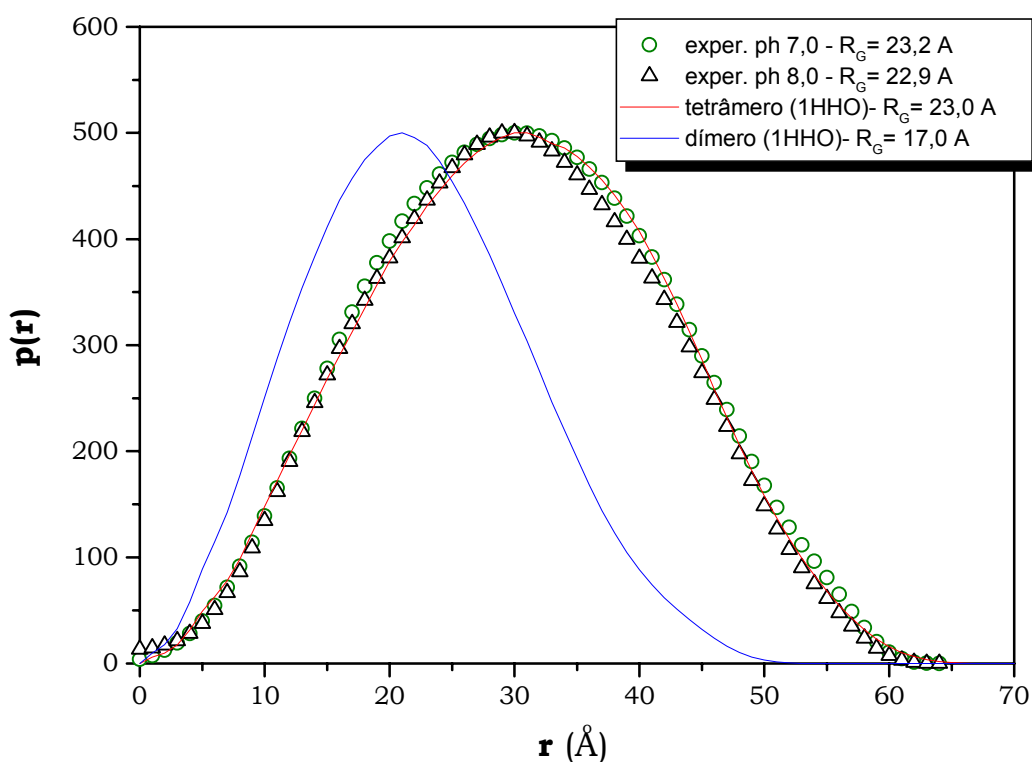


**Figura 7.3** - Modelo sugerido para o transporte de  $O_2$  pela hemoglobina de serpente, *in vivo*.

Hemoglobinas de várias espécies de serpentes, como *Crotalus durissus terrificus*, *Boa constrictor constrictor* e *Liophis miliaris*, foram estudadas neste trabalho com a finalidade de se buscar evidências da existência desses mecanismos de associação.

A hemoglobina humana foi usada como referência durante as comparações de resultados, por isso, apesar de bem conhecida, ela foi analisada em solução por SAXS nos valores de pH 7,0 e 8,0, de onde foram calculados os raios de giros e as funções distribuição de distâncias  $p(r)$ . Os resultados foram comparados posteriormente aos mesmos parâmetros determinados das coordenadas atômicas da hemoglobina humana nas formas dimérica e tetramérica depositadas no PDB sob código 1HHO. Os raios de giro calculados pela função  $p(r)$  da hemoglobina humana em pH 7,0 e 8,0, são 23,2 Å e 22,9 Å. Esses resultados são compatíveis com o valor determinado pela função  $p(r)$ , calculada pelo programa computacional MULTIBODY, dos dados cristalográficos na forma tetramérica, de 23,0 Å, sendo que para a forma dimérica o valor do raio de giro é de 17,0 Å. Ainda, as máximas dimensões das partículas dos dados experimentais tiveram um mesmo valor de 63 Å, idênticos ao valor da hemoglobina humana tetramérica do cristal; o valor para o dímero é de 51 Å. Também se observa uma similaridade muito grande nas formas das curvas, conforme se nota na figura 7.4, onde as funções  $p(r)$  experimentais e as obtidas dos dados do PDB foram sobrepostas para facilitar a comparação. Como esperado, os

resultados sugerem que as hemoglobinas no pH 7,0 e 8,0, assumem a forma tetramérica.



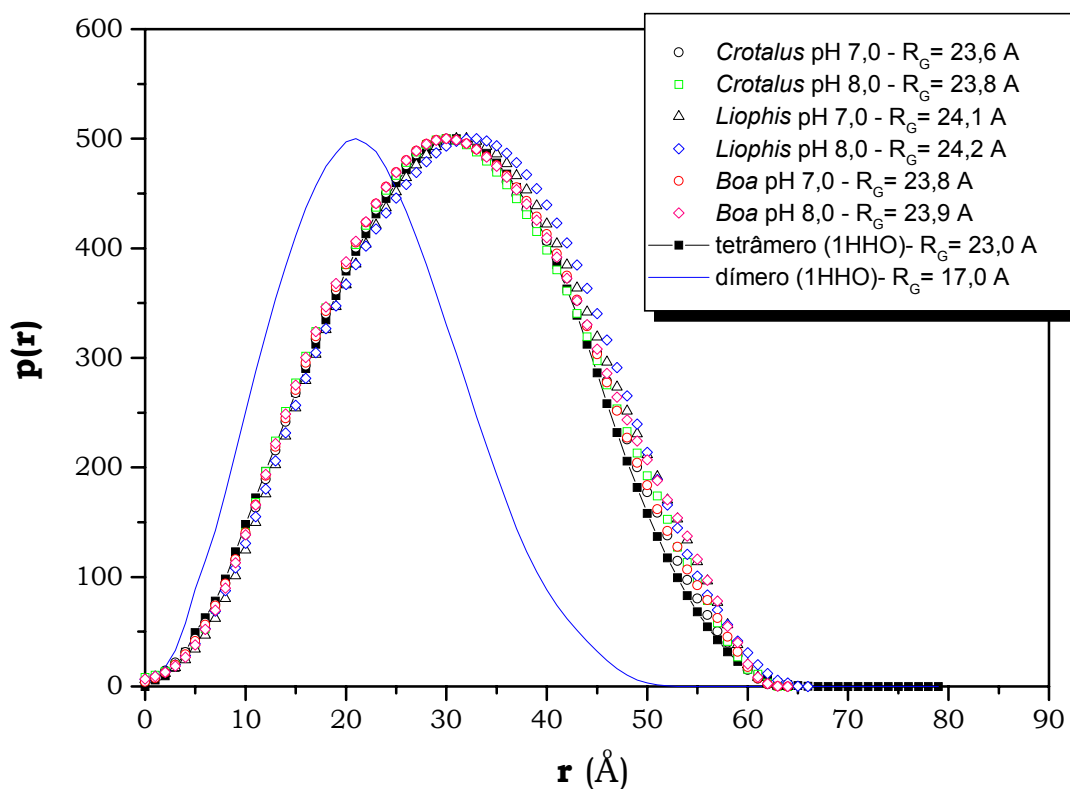
**Figura 7.4** – Funções distribuição de distâncias das hemoglobinas humanas experimentais nos valores de pH 7,0 e 8,0, e obtidas dos dados cristalográficos (código PDB 1HHO), indicando os respectivos valores de raios de giro.

Este processo foi repetido para as hemoglobinas de serpentes, de onde também se desejou determinar o tipo de estrutura adotada pelas proteínas em solução nos valores de pH 7,0 e 8,0.

Os valores dos raios de giro da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* em pH 7,0 e pH 8,0 são 23,6 Å e 23,8 Å, respectivamente, e as máximas dimensões são de 63 Å nas duas condições. Para a hemoglobina de

*Liophis miliaris*, os raios de giro são 24,1 Å e 24,2 Å, nos valores de pH 7,0 e 8,0, respectivamente, observando-se um pequeno aumento na máxima dimensão, de 63 Å para 65 Å, quando o pH muda de 7,0 para 8,0. A hemoglobina de *Boa constrictor constrictor* com raio de giro 23,8 Å em pH 7,0 e 23,9 Å em pH 8,0, mantém invariável a máxima dimensão de 63 Å (ver tabela 6.1). Estes valores de raios de giro estão muito próximos daqueles obtidos da hemoglobina humana de 23,2 Å e 22,9 Å nos valores de pH 7,0 e 8,0, respectivamente, que também concordam com o valor de raio de giro de 23,0 Å calculado das coordenadas depositadas no PDB da hemoglobina humana na forma tetramérica. As máximas dimensões, em todas as situações, têm valores ao redor de 63 Å.

Em todas as situações os valores de raio de giro e máxima dimensão ficaram muito próximos dos valores calculados para os mesmos parâmetros da hemoglobina humana tetramérica. As funções  $p(r)$  das várias hemoglobinas de serpentes, mostradas na figura 7.5, também não apresentam diferenças consideráveis e são todas semelhantes à  $p(r)$  da hemoglobina humana tetramérica obtida pelos dados cristalográficos. Isto sugere que as hemoglobinas de serpentes assumem a forma de tetrâmero independentemente da condição de medida, não sendo verificado o mecanismo de transição dímero-tetrâmero observado por Matsuura (Matsuura *et al*, 1987) para a hemoglobina de *Liophis miliaris*.



**Figura 7.5** – Comparação entre as funções  $p(r)$  das hemoglobinas de serpentes com a função  $p(r)$  calculada dos dados do PDB código 1HHO da hemoglobina humana nas formas dimérica e tetramérica.

#### 7.4 - Purina nucleosídeo fosforilase

A PNP é uma enzima presente num dos caminhos intermediários das rotas de recuperação de bases purinas para a síntese de nucleotídeos. A deficiência desta enzima causa sérios problemas de ordem imunológica afetando a proliferação dos linfócitos T (raramente afeta os linfócitos B).

Há um grande interesse na determinação de inibidores específicos de PNP para aplicações clínicas como no tratamento de doenças autoimunes, artrites, leucemias, e ainda como agentes imunossupressores, em caso de rejeição nos transplantes de órgãos.

As estruturas tridimensionais da PNP de várias fontes foram resolvidas e depositadas, incluindo a PNP de eritrócitos humano (código PDB 1ULA e 1ULB) que se apresenta no estado cristalino como um trímero, muito embora, uma forma dimérica já tenha sido proposta anteriormente para a enzima humana (Lewis e Lowy, 1979). Há, entretanto, necessidade de se compreender o comportamento da enzima em solução, seja na busca de evidências da existência de uma mistura de equilíbrio de diferentes subunidades, ou, na confirmação de que a mesma estrutura quaternária em solução é conservada no estado cristalino, uma vez que, nas condições de cristalização, o pH baixo pode gerar diferenças na configuração espacial dos subdomínios da macromolécula quando comparado com a estrutura em pH fisiológico. Assim, conhecer com precisão as características da enzima em solução é de extrema importância para o desenvolvimento de inibidores.

Neste trabalho, a PNP humana foi estudada em solução e no pH fisiológico por espalhamento de raios X a baixos ângulos para se obter informações sobre a estrutura quaternária, comparando-a com a estrutura cristalina. A estrutura da PNP<sup>1</sup> foi resolvida a 2,3Å de resolução cujas

---

<sup>1</sup> A estrutura da PNP humana foi novamente resolvida a mais alta resolução de 2,3Å pelo grupo do prof. Walter Filgueira de Azevedo Jr, colaborador deste trabalho, e depositada no PDB com o código 1M73.

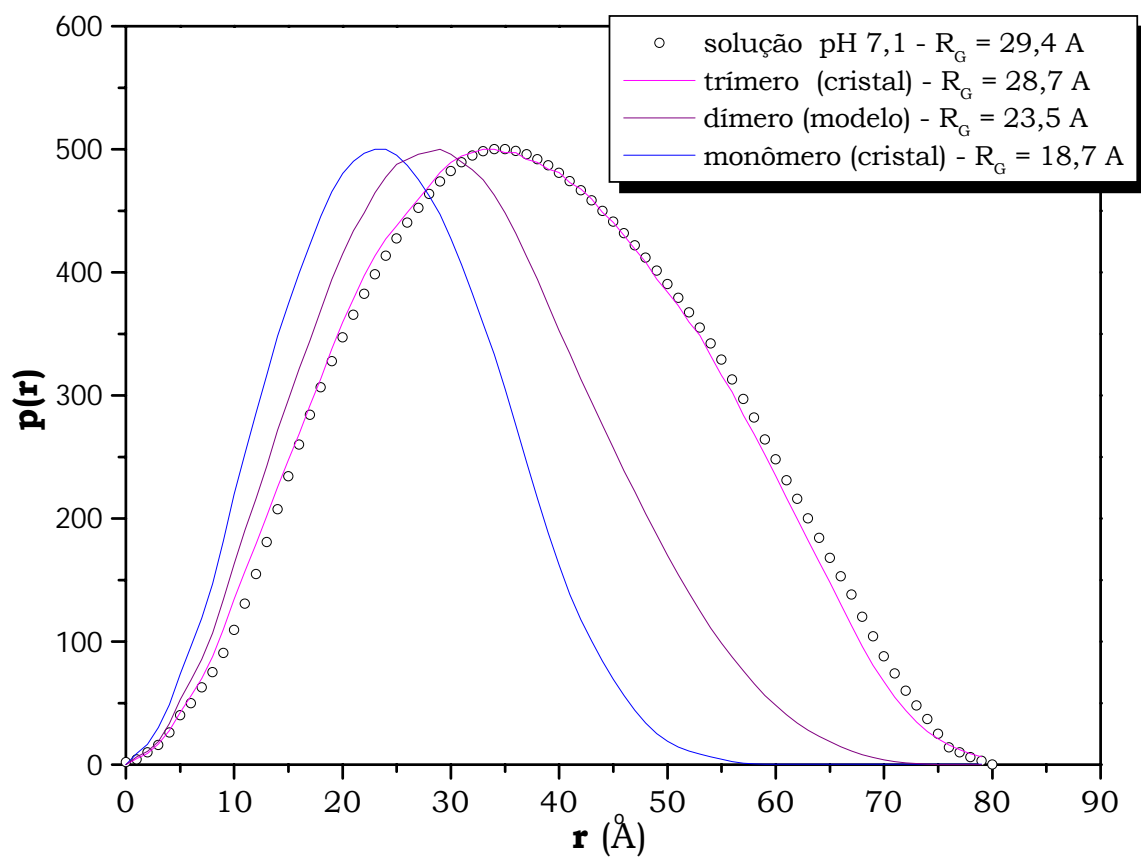


coordenadas atômicas, depositadas no PDB com o código 1M73, foram usadas nas comparações.

A estrutura cristalina da enzima apresenta forma trimérica e um modelo da forma dimérica foi construído por *docking* através do programa GRAMM; maiores detalhes do modelo serão mostrados na parte III deste capítulo. O monômero foi gerado de uma das unidades do trímero. De posse das coordenadas tridimensionais do cristal (monômero e trímero) e do modelo (dímero), foram calculadas as funções  $p(r)$ , através do programa MULTIBODY, das quais também foram determinados os raios de giro e máximas dimensões.

A análise por SAXS da PNP em solução no pH 7,1 determinou um raio de giro de Guinier de 29,6 Å e pela  $p(r)$  de 29,4 Å, indicando compatibilidade dos resultados, e a máxima dimensão observada é de 80 Å. Estes resultados concordam com os valores calculados dos dados cristalográficos do trímero que apresentou um valor 28,7 Å para o raio de giro e 81 Å para a máxima dimensão, muito diferentes daqueles calculados do monômero e dímero que foram, respectivamente, 18,7 Å e 23,5 Å, para os raios de giro, e 55 Å e 72 Å, para as máximas dimensões (ver tabela 7.1). Ainda, a comparação entre a função  $p(r)$  experimental da PNP em solução com as funções  $p(r)$  dos dados cristalográficos, mostra um maior coeficiente de correlação para a forma trimérica do que para as outras formas, indicando que a estrutura quaternária do cristal é preservada em solução (ver figura 7.6).

Outra observação importante, é em relação ao gráfico de Guinier. Este gráfico, com uma única região linear, indica uniformidade de tamanhos das partículas na solução. O gráfico da figura 6.36, apresenta uma única fase, indicando ausência de mistura de partículas com tamanhos distintos.



**Figura 7.6** – Comparação entre a função  $p(r)$  experimental com as funções  $p(r)$  obtidas dos dados cristalográficos e modelo.

### **7.5 - 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (EPSP Sintase)**

5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase), enzima presente na sexta reação da via metabólica do ácido chiquímico, por ser essencial para a síntese de aminoácidos aromáticos de vegetais e microrganismos e ausentes nos mamíferos, tem sido objeto de grande interesse devido ao potencial que apresenta para o desenvolvimento de fármacos de ação antimicrobiana. Dessa forma, a descoberta de inibidores eficientes dessa enzima pode ser de grande ajuda no tratamento de doenças, principalmente da tuberculose, que atualmente vem despertando grande preocupação mundial com o crescente aumento de casos de pacientes com multi-resistência às drogas (isoniazida e rifampicina).

Um potente inibidor de EPSP sintase é o glifosato, usado no controle de ervas daninhas que, recentemente, tem-se mostrado eficiente também em inibir o desenvolvimento de alguns parasitas (Roberts *et al*, 1998). Estudos mostram que a perda de atividade da enzima está diretamente relacionada com sua conformação, passando de um estado mais aberto a um estado mais fechado, na ausência e presença, respectivamente, do inibidor (Shuttleworth *et al*, 1999; Schönbrunn *et al*, 2001).

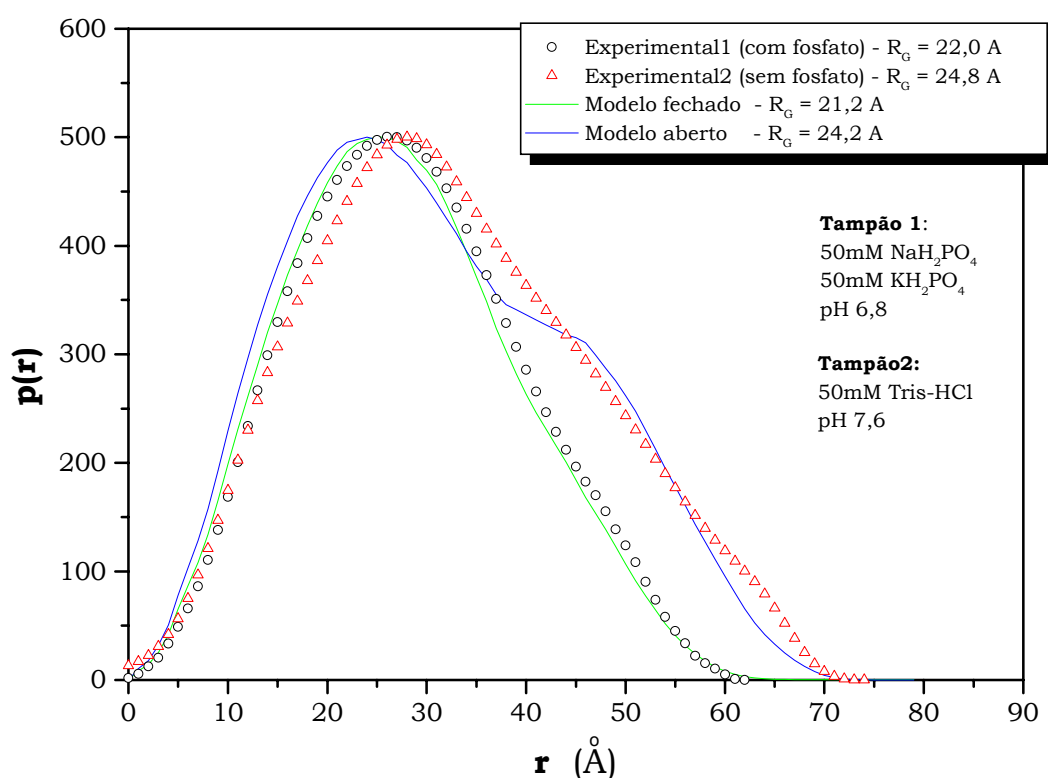
Neste trabalho, foi investigada EPSP Sintase em solução e em pH próximo ao fisiológico na presença e ausência de fosfato, onde se buscou verificar a existência da transição do estado aberto para o estado fechado da enzima.

Através da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos, foram determinados os valores de raio de giro e máxima dimensão da EPSP sintase de *Mycobacterium tuberculosis* e calculadas as funções distribuição de distâncias. Na presença do fosfato o raio de giro calculado da região de Guinier foi 22,2 Å, valor menor daquele calculado da enzima sem o fosfato, de 23,8 Å. Valores mais precisos, obtidos das funções  $p(r)$ , também mostraram essa diferença, sendo 22,0 Å na presença de fosfato e 24,8 Å, na ausência. Ainda, da análise das funções  $p(r)$  nas duas condições, observa-se que a máxima dimensão também é alterada, passando de 72Å para 61Å, com adição de fosfato. Esses dados são apresentados nas tabela 6.3.

Paralelo a análise por SAXS foram construídos modelos da EPSP presente na bactéria da tuberculose, dos quais foram calculadas as funções  $p(r)$  nos dois estados, aberto e fechado. O valor do raio de giro do modelo fechado, de 21,2Å, é compatível com o raio de giro da enzima com o fosfato, de 22,0Å. Da mesma forma, o raio de giro do modelo aberto, de 24,2Å, é também, comparável ao raio de giro da EPSP sem fosfato, de 24,8Å. Essa identidade também se conserva nas máximas dimensões, que para o estado fechado foi de 62Å e para o estado aberto, 72Å. Ainda, foi observado uma alta correlação entre a  $p(r)$  do modelo fechado com a  $p(r)$  experimental da enzima com fosfato, conforme tabela 6.6. Por outro lado, apesar da grande similaridade dos valores de raio de giro e máxima dimensão, do modelo aberto e da EPSP sem fosfato, as funções  $p(r)$  não demonstraram um bom ajuste, indicando que o modelo deve ser revisado.

Para facilitar a comparação entre as funções  $p(r)$  dos modelos e experimentais nas duas condições, foi construído um gráfico onde estas funções foram sobrepostas, mostradas na figura 7.7.

Esses resultados sugerem que a simples presença do fosfato é suficiente para induzir a transição de um estado aberto para um estado fechado, discordando dos relatos da literatura de onde se justifica a necessidade da presença de S3P junto com glifosato, ou apenas do S3P, para que ocorra essa transição (Shuttleworth *et al*, 1999; Schönbrunn *et al*, 2001).



**Figura 7.7** – Comparação entre as funções  $p(r)$  da EPSP, com e sem fosfato, com a função  $p(r)$  calculada dos dados dos modelos fechado e aberto.

### Parte III

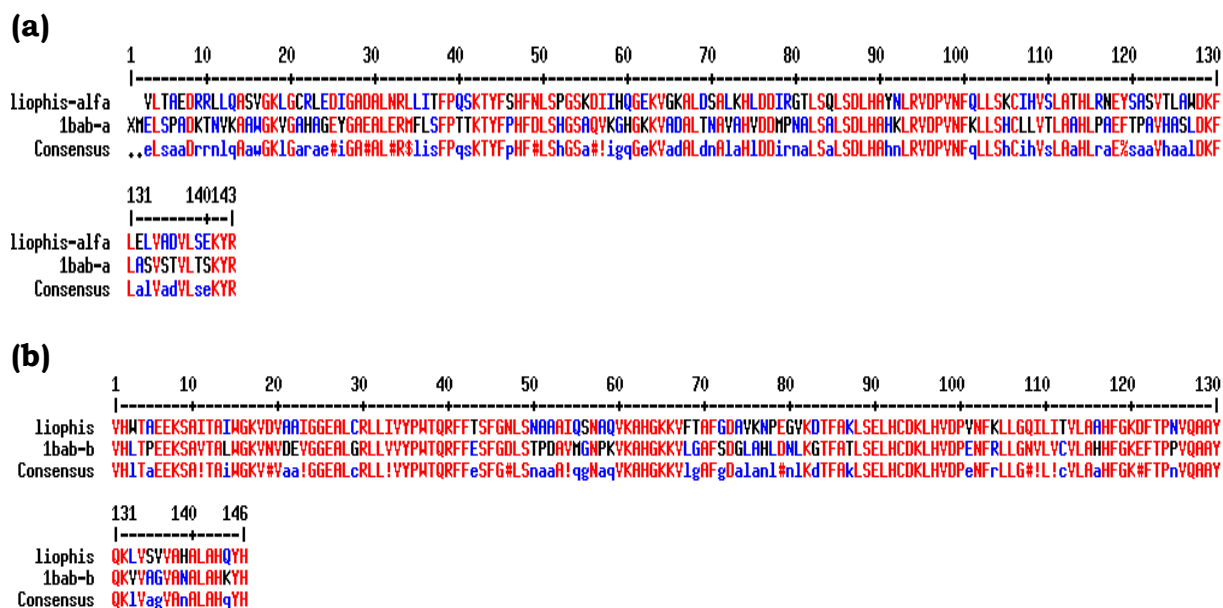
## 7.6 - Modelos de Hemoglobinas

### 7.6.1 - *Liophis miliaris*

A hemoglobina de *Liophis miliaris* foi estudada por espalhamento de raios X a baixos ângulos de onde foram tiradas informações sobre a estrutura quaternária da proteína. Esses dados foram aproveitados para a construção de um modelo triaxial baseado na seqüência primária da proteína utilizando o programa MODELLER, uma vez que as coordenadas da estrutura cristalográfica da hemoglobina de *Liophis miliaris* não foi depositada até o presente momento.

A partir da seqüência primária das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina, foi feita uma busca, através do programa BLAST, de outras seqüências de proteínas, as quais foram posteriormente alinhadas pelo uso do programa MultAlin. O alinhamento é mostrado na figura 7.8, onde a cor vermelha representa os resíduos idênticos entre si.

Na figura 7.8 pode ser observado que há uma grande identidade entre as seqüências, indicando que a estrutura escolhida, 1BAB, tem grande possibilidade de servir como um bom *template*, tanto para a cadeia  $\alpha$ , quanto para a cadeia  $\beta$  durante a montagem do modelo.



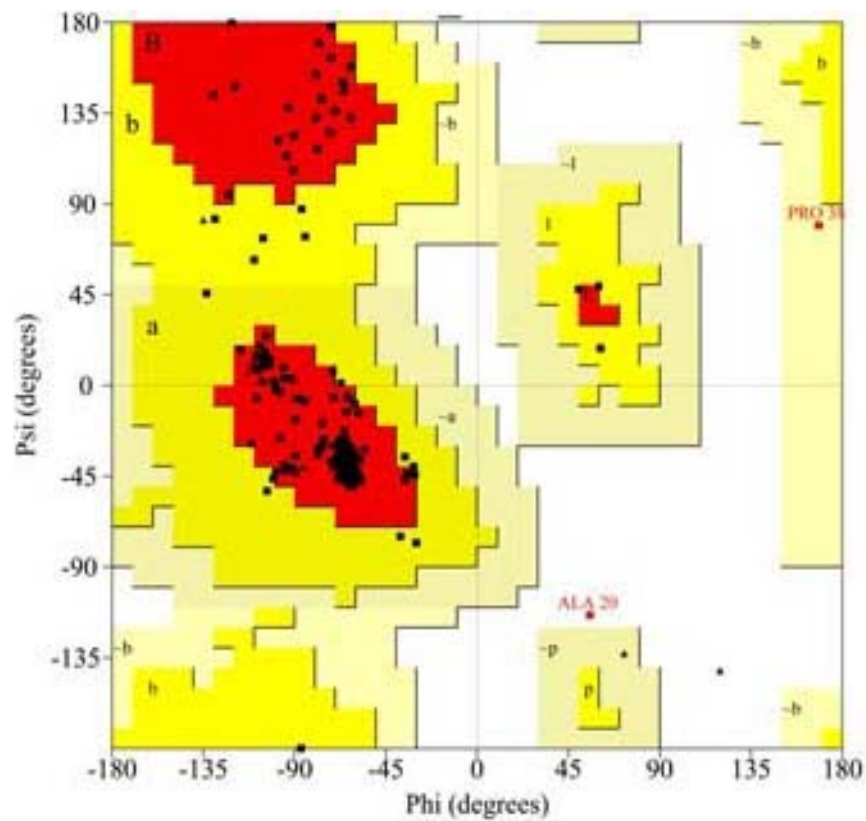
**Figura 7.8** – Alinhamento da seqüência primária da hemoglobina de *Liophis miliaris* com as seqüências das hemoglobinas humanas de códigos PDB 1BAB. (a) cadeia  $\alpha$  (48,6% de identidade) e (b) cadeia  $\beta$  (67,8% de identidade).

Depois de pronto o alinhamento, foram gerados mil modelos, através do programa MODELLER, para cada cadeia separadamente, dos quais foram pré-selecionados dez, utilizando os critérios do próprio programa. Assim, a partir dos melhores modelos das duas subunidades foi montado o tetrâmero, através do SWISS-PDB-VIEWER, usando como *template* a própria estrutura 1BAB usada anteriormente como *template* das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . A qualidade do modelo foi analisada pelo diagrama de Ramachandran, obtido pelo PROCHECK, mostrado na figura 7.9, o qual apresentou 99,6% dos resíduos nas regiões permitidas, e 0,4% dos resíduos nas regiões não permitidas, mostrando que o modelo está dentro dos padrões aceitáveis.

A função distribuição de distâncias do modelo foi, então, calculada pelo programa MULTIBODY e comparada com a função  $p(r)$  experimental. O

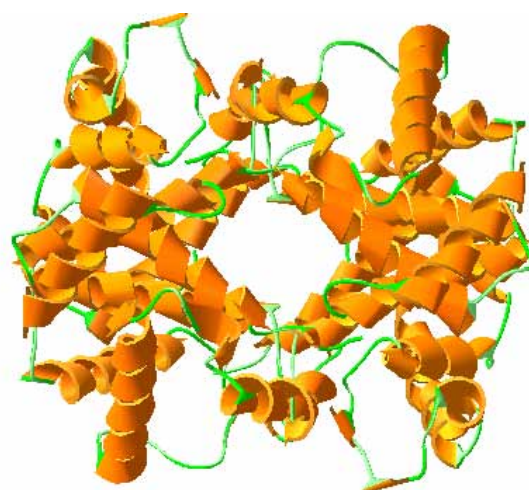
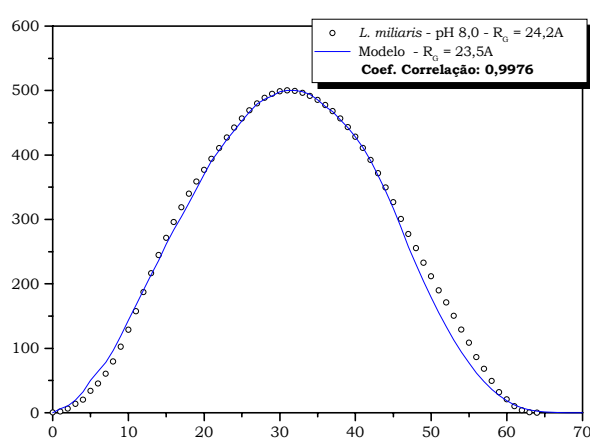
coeficiente de correlação de 0,9976 (tabela 6.4) mostra que houve um bom ajuste entre  $p(r)$  do modelo e  $p(r)$  experimental.

Para ilustrar esses resultados, a figura 6.47 será reapresentada na figura 7.10, desta vez comparando as funções  $p(r)$  do modelo e experimental.



**Figura 7.9** – Diagrama de Ramachandran obtido do modelo da *Liophis miliaris*.



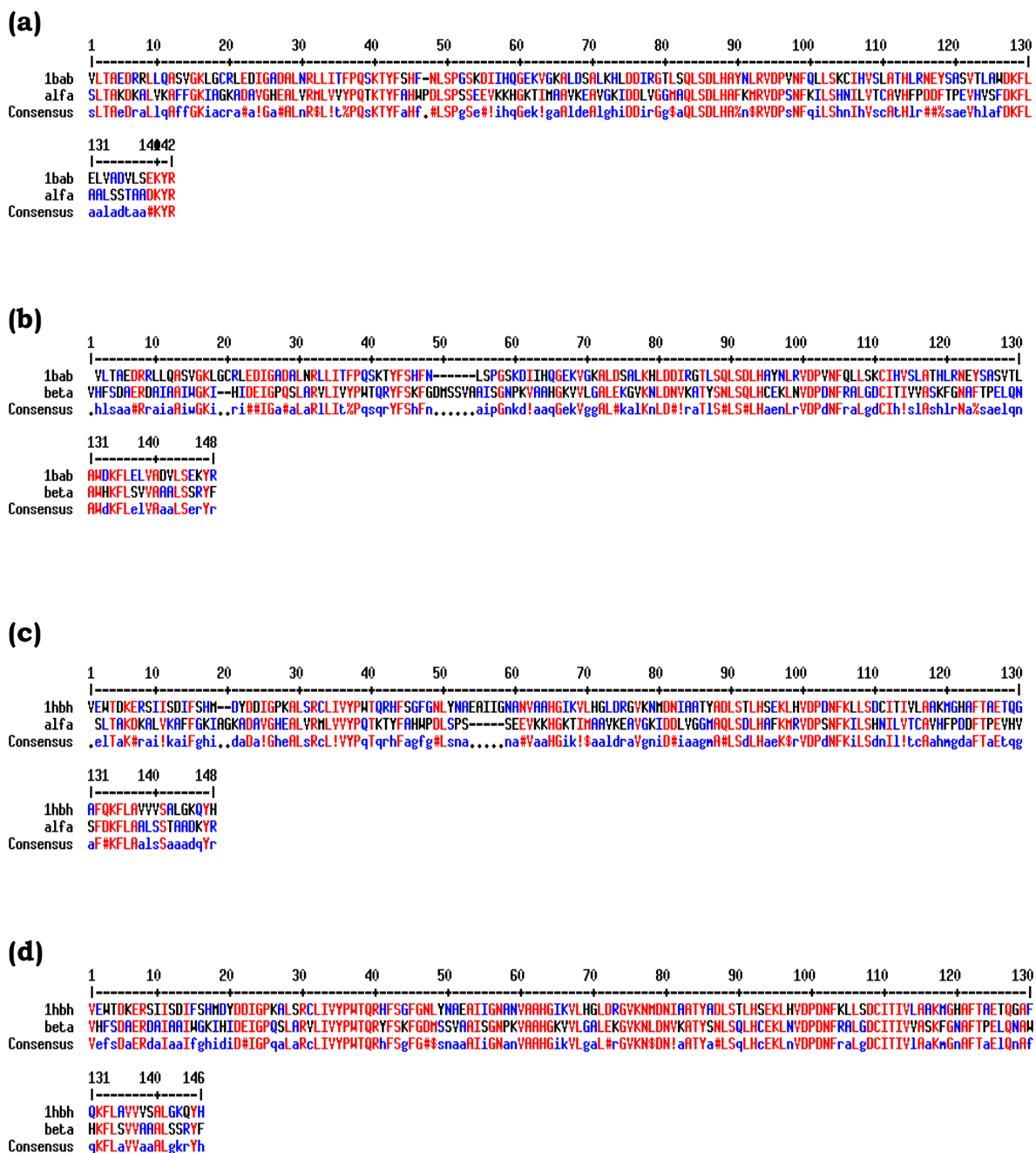


**Figura 7.10** – Modelo da hemoglobina de *Liophis miliaris* construído pelo programa MODELLER com sua respectiva função  $p(r)$ .

### 7.6.2 - *Hoplosternum littorale*

A hemoglobina de *H. littorale* nas formas oxigenada e desoxigenada foi avaliada por SAXS com o objetivo de se construir modelos, pois não há, até então, estrutura resolvida dessa proteína. Os modelos foram construídos seguindo o mesmo processo utilizado para a construção do modelo da hemoglobina de *Liophis miliaris*, descrito anteriormente.

Baseado na seqüência primária da proteína, foi efetuada uma busca de outras seqüências homólogas através do programa BLAST, para cada uma das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina, e, posteriormente, foi feito o alinhamento pelo programa MultAlin, mostrado na figura 7.11.



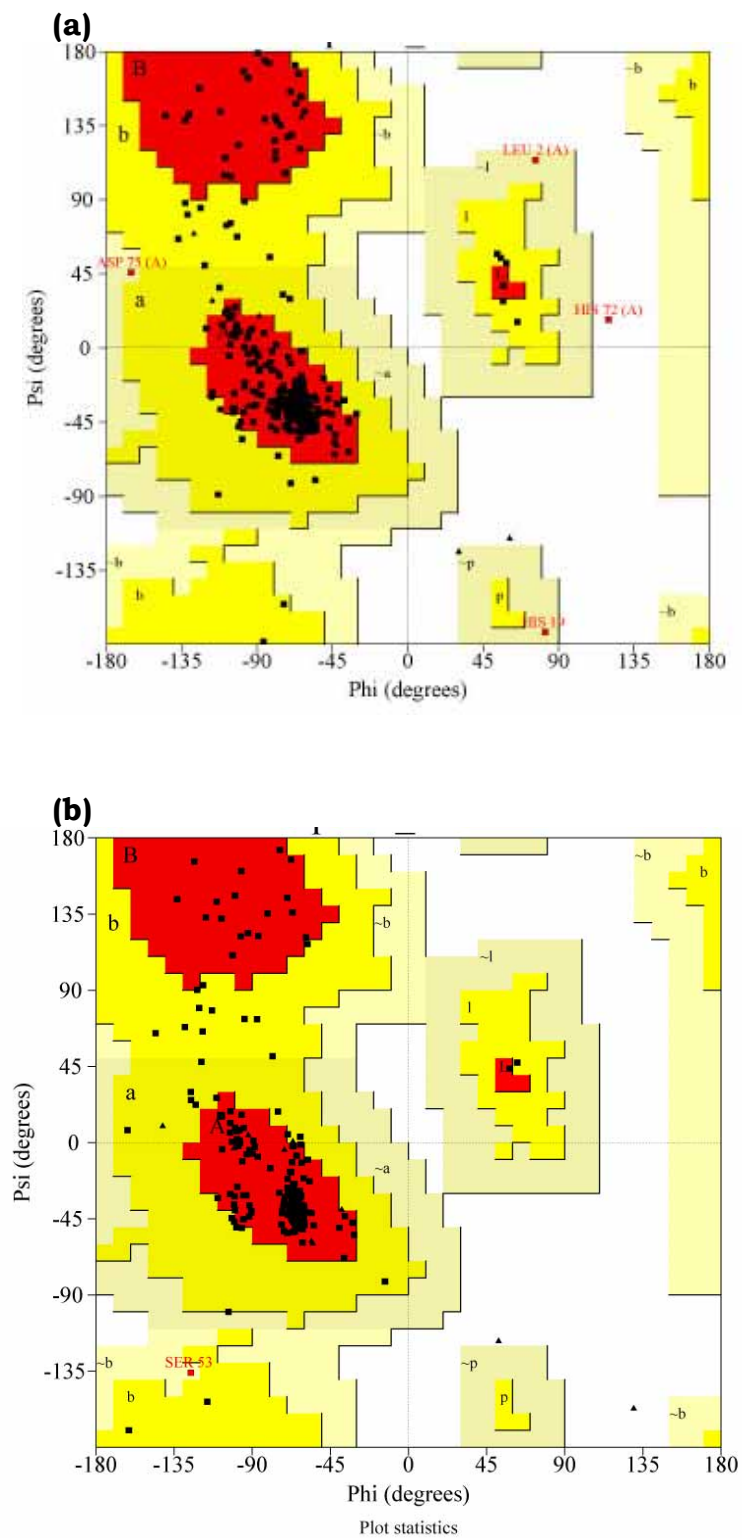
**Figura 7.11** – Alinhamento da seqüência primária da hemoglobina de *H. littorale* com as seqüências das hemoglobinas humanas de códigos PDB 1BAB e 1HBH. (a) cadeia  $\alpha$  com 1BAB (oxi) (identidade 40,1%); (b) cadeia  $\beta$  com 1BAB (oxi) (identidade 34,2%); (c) cadeia  $\alpha$  com 1HBH (desoxi) (identidade 32,4%) e (d) cadeia  $\beta$  com 1HBH (desoxi) (identidade 56,8%).

Pela observação dos resíduos em vermelho, percebe-se que há grande identidade entre as seqüências escolhidas, indicando que as estruturas 1BAB e 1HBH servem como bons *templates* para os modelos da hemoglobina de *H. littorale* nas formas oxi e desoxi, respectivamente.

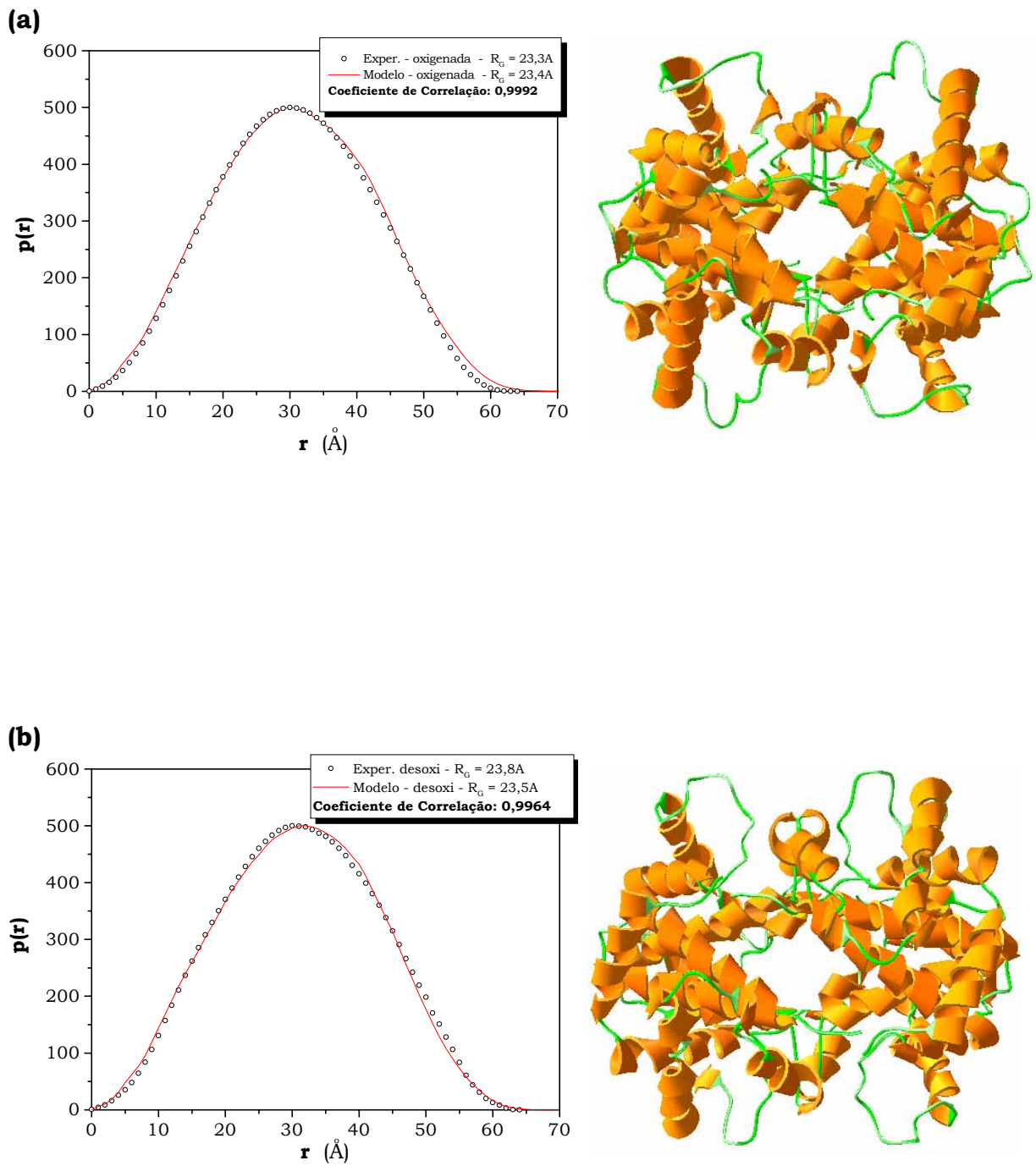
Depois de feito o alinhamento, foram construídos mil modelos para cada cadeia da hemoglobina separadamente, através do programa MODELLER, e montados os tetrâmeros sobre os *templates*, 1BAB e 1HBH, respectivamente, para a forma oxi e desoxi. Um diagrama de Ramachandran (figura 7.12) foi, então, construído para se verificar a qualidade dos modelos.

Os diagramas de Ramachandran revelaram para a forma oxigenada da hemoglobina 0,2% de resíduos nas regiões não permitidas e para a forma desoxigenada, nenhum resíduo nestas regiões, mostrando a boa qualidade desses modelos (ver figura 6.48).

Através do programa MULTIBODY, foram calculadas as funções distribuição de distâncias dos modelos das quais foram também determinados os raios de giro e máximas dimensões. A comparação entre estes parâmetros mostra que há uma grande similaridade com os valores obtidos experimentalmente, conforme é mostrado na tabela 6.5. Ainda, a sobreposição entre as funções  $p(r)$  dos modelos e experimentais, indicam que há um bom ajuste entre as curvas, reforçado pelos coeficientes de correlação, que são, 0,9992 e 0,9964, para as formas oxi e desoxi, respectivamente. Na figura 7.13 são mostradas essas comparações entre  $p(r)$  e apresentados os modelos.



**Figura 7.12** – Diagrama de Ramachandran obtido do modelo da hemoglobina de *H. littorale* nas formas (a) oxi e (b) desoxi.



**Figura 7.13** – Comparação entre as funções  $p(r)$  experimentais e dos modelos das hemoglobinas de *H. littorale* construído pelo programa MODELLER nas formas (a) oxigenada e (b) desoxigenada.

### 7.6.3 – EPSP Sintase

A EPSP sintase de *Mycobacterium tuberculosis* foi estudada por espalhamento de raios X a baixos ângulos devido a sua importância e potencial no desenvolvimento de fármacos voltados ao tratamento de doenças causadas por microrganismos, em particular, o próprio *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose.

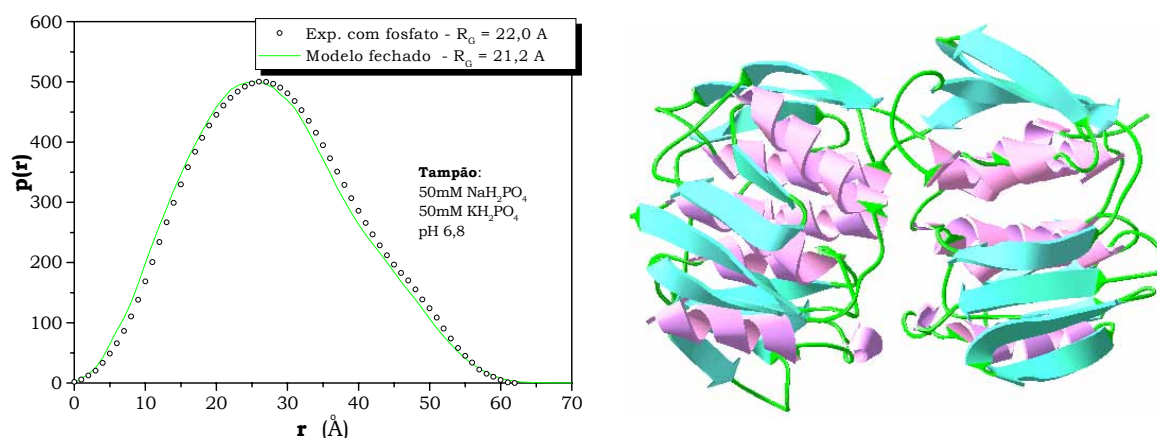
A técnica de SAXS foi utilizada para verificar ocorrência de mudança conformacional induzida pela variação das condições do meio que envolve a enzima. Conforme mostrado anteriormente neste trabalho, uma considerável mudança foi observada com a adição de fosfato ao tampão, causando diminuição da máxima dimensão e do raio de giro. Na tentativa de se buscar uma explicação para este comportamento foram gerados modelos teóricos, baseados em técnicas de modelagem pelo programa computacional MODELLER, a partir da estrutura conhecida da EPSP de *E. coli*.

Os modelos foram, então, baseados nas estruturas de EPSP de *E. coli*, códigos PDB: 1EPS, para o estado aberto (sem ligante) e 1G6S, para o estado fechado (ligada com S3P e glifosato). É importante ressaltar que somente os carbonos  $\alpha$  da 1EPS foram depositados no PDB. Assim, a partir das seqüências primárias das enzimas de *M. tuberculosis* e *E. coli*, foi feito o alinhamento entre essas seqüências e pelo programa MODELLER, foram construídos os modelos.

De acordo com os autores, o modelo fechado apresentou 96% dos resíduos nas regiões permitidas do diagrama de Ramachandran, já o modelo

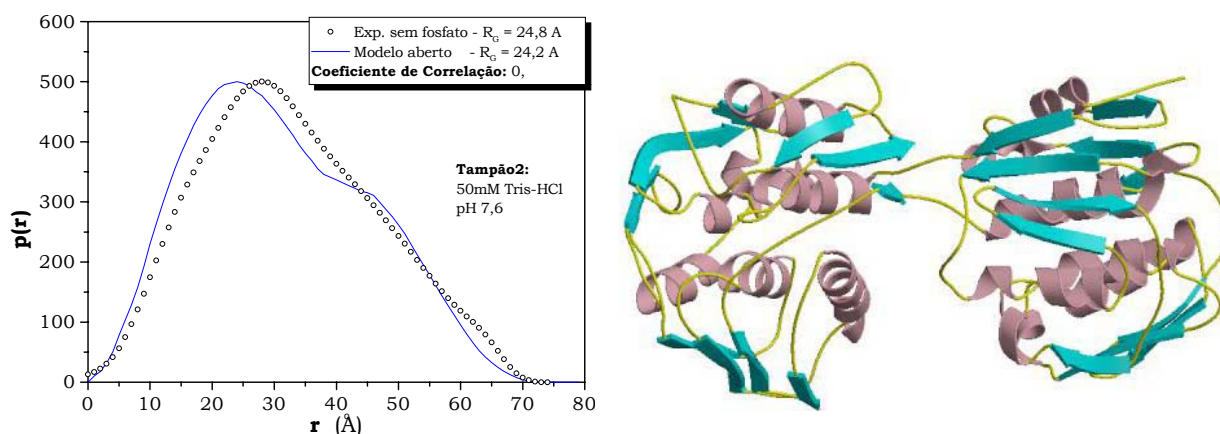
aberto, apresentou apenas 91% dos resíduos nestas regiões e os 9% restantes nas regiões não permitidas<sup>1</sup>. Neste último caso, a grande quantidade de resíduos nas regiões não permitidas é ocasionada pelo *template* usado (1EPS) ter apenas os carbonos  $\alpha$  depositados.

De posse das coordenadas atômicas dos modelos, foram geradas as funções distribuições de distâncias pelo programa MULTIBODY, das quais foram determinados os raios de giro e máximas dimensões. As funções  $p(r)$  experimentais e teóricas – obtidas dos modelos – foram comparadas por sobreposição e calculados os coeficientes de correlação, conforme mostrado na figura 7.14, para o estado fechado e figura 7.15, para o estado aberto, onde também aparecem os modelos gerados.



**Figura 7.14** – Comparação entre as funções  $p(r)$  da EPSP, com e sem fosfato, com a função  $p(r)$  calculada dos dados dos modelos fechado e aberto.

<sup>1</sup> Ver seção 6.8.4 pág. 104.



**Figura 7.15** – Comparação entre as funções  $p(r)$  da EPSP, com e sem fosfato, com a função  $p(r)$  calculada dos dados dos modelos fechado e aberto.

Este último gráfico mostra que, apesar dos valores de raios de giro e máximas dimensões, obtidos experimentalmente e pelo modelo, serem compatíveis, o modelo deve ser melhor ajustado. Este ajuste poderia ser feito trabalhando-se com os ângulos de abertura entre os dois domínios vistos na estrutura da enzima. Outra possibilidade seria rastrear dentro de vários modelos gerados pelo programa MODELLER e buscar um que tenha uma melhor correlação. Para isso, dever-se-ia utilizar um programa de interface entre os outros programas utilizados para a geração das funções  $p(r)$  e cálculo dos coeficientes de correlação, não disponíveis no momento.



#### 7.6.4 – PNP Humana

A purina-nucleosideo-fosforilase foi analisada em solução por SAXS para obtenção de informações de sua estrutura quaternária, pois, apesar de ter estrutura conhecida, é importante saber se esta estrutura é mantida em solução, principalmente para desenho de inibidores.

A busca de evidências quanto à estrutura quaternária da enzima foi feita através da comparação entre as funções  $p(r)$  experimentais e as funções  $p(r)$  de modelos. A estrutura cristalina mostra que a PNP é um trímero, apesar de se encontrar na literatura relatos de dímero. Assim, para reforçar os resultados encontrados neste trabalho, mesmo após a verificação de alta correlação entre as funções  $p(r)$  da enzima em solução e cristalizada, que sugerem a forma de trímero, foram construídos modelos simulando a forma dimérica através do programa GRAMM.

No programa GRAMM foi utilizado com entrada as coordenadas de uma das unidades do trímero obtido do cristal. Conseqüentemente, o dímero foi montado a partir do monômero, em que, através de uma exaustiva busca entre posições relativas dos monômeros, foram escolhidos pelo programa os cem primeiros dímeros de menor energia. Assim, dos cem modelos gerados na saída do programa, foi selecionado o de melhor correlação com os dados experimentais.

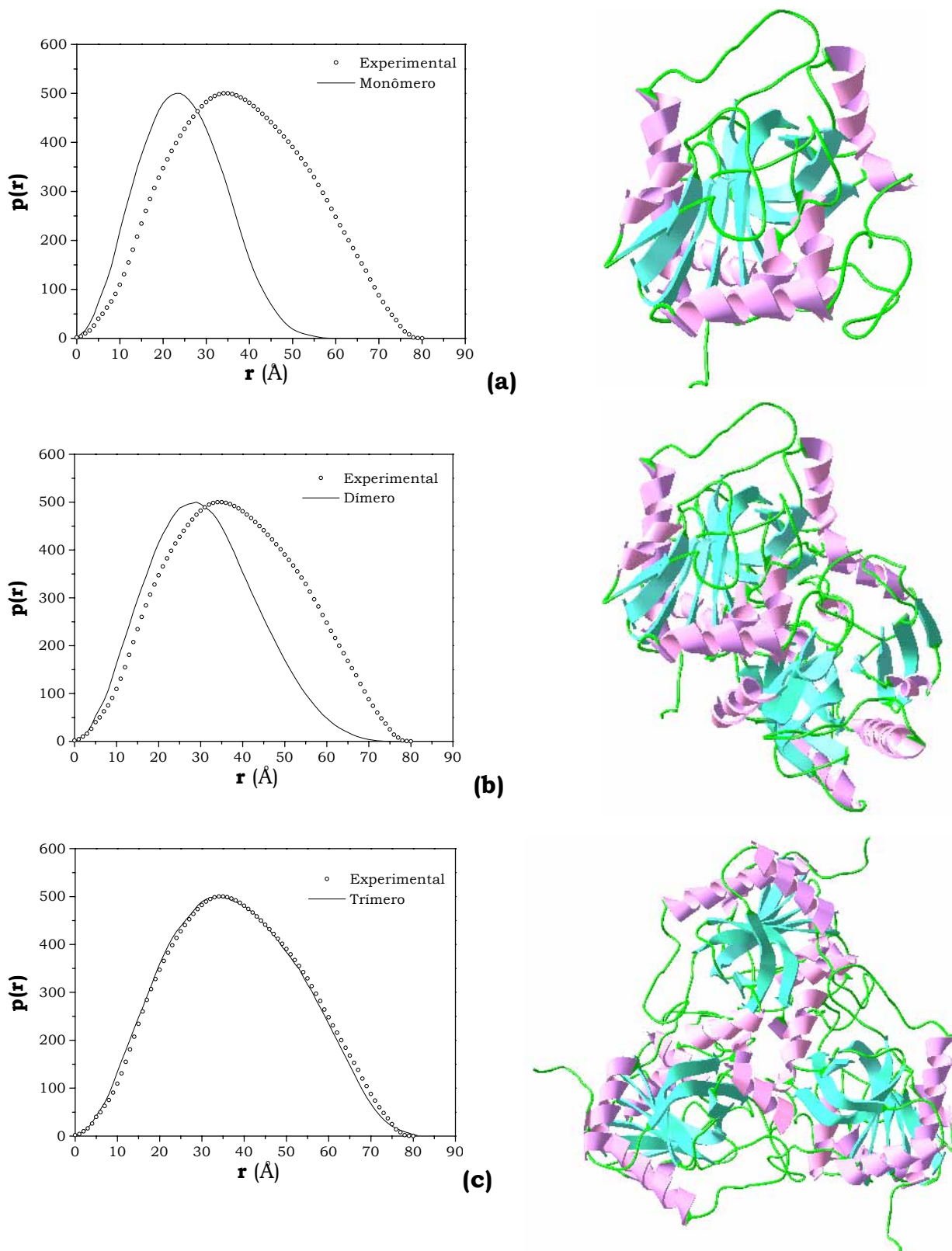
O cálculo do coeficiente de correlação mostrou que dentre os vários modelos, o melhor foi aquele cujo coeficiente é 0,8708, conforme tabela 7.1. Isto sugere que, de várias possibilidades de dímeros da PNP, nenhum

apresentou a grande correspondência obtida pela forma trimérica do cristal com os dados experimentais. Isto também é notado quando se observa os valores de raios de giro e máximas dimensões, reforçando que a forma da enzima em solução é mantida no cristal. Valor muito mais baixo do coeficiente de correlação do monômero foi encontrado (0,5910 de acordo com a tabela 7.1), o que também indica muito pouca possibilidade da enzima apresentar-se nessa forma.

A figura 7.16 apresenta o modelo para o dímero de melhor correspondência com os dados experimentais, assim como, a sobreposição das funções  $p(r)$  experimentais e teóricas e também, os demais modelos, para o monômero e trímero.

<b>PNP</b>	<b>Raio de giro (Å)</b>	<b>Máxima dimensão (Å)</b>	<b>Coeficiente de correlação</b>
Experimental (solução)	29,4	80	
Monômero (cristalografia)	18,7	55	0,5910
Dímero ( <i>docking</i> )	23,5	72	0,8708
Trímero (cristalografia)	28,7	81	0,9950

**Tabela 7.1** – Apresentação dos valores de raios de giro, máximas dimensões e coeficientes de correlação calculados para a PNP humana dos dados experimentais e dos modelos.



**Figura 7.16** – Modelos da purina nucleosídeo fosforilase nas formas: (a) mono; (b) di e (c) trimérica e suas respectivas função  $p(r)$ .

### 7.6.5 – Crotoxina

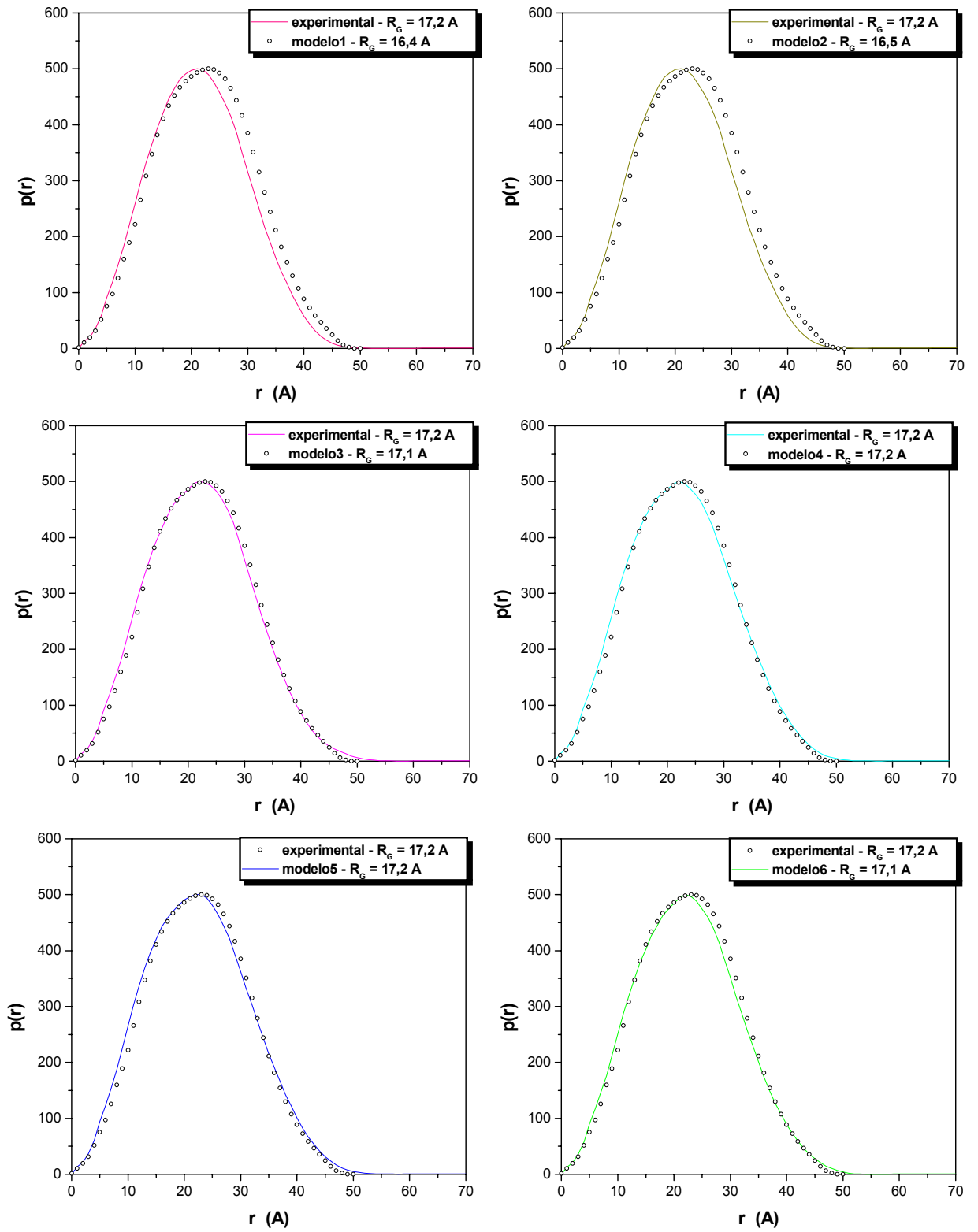
O modelo do complexo crotoxina foi obtido pelos programas MODELLER e GRAMM. Através de buscas entre posições relativas da fosfolipase A e crotapotina, foram gerados cem modelos dos quais dez foram pré-selecionados pelos critérios de minimização de energia do próprio programa.

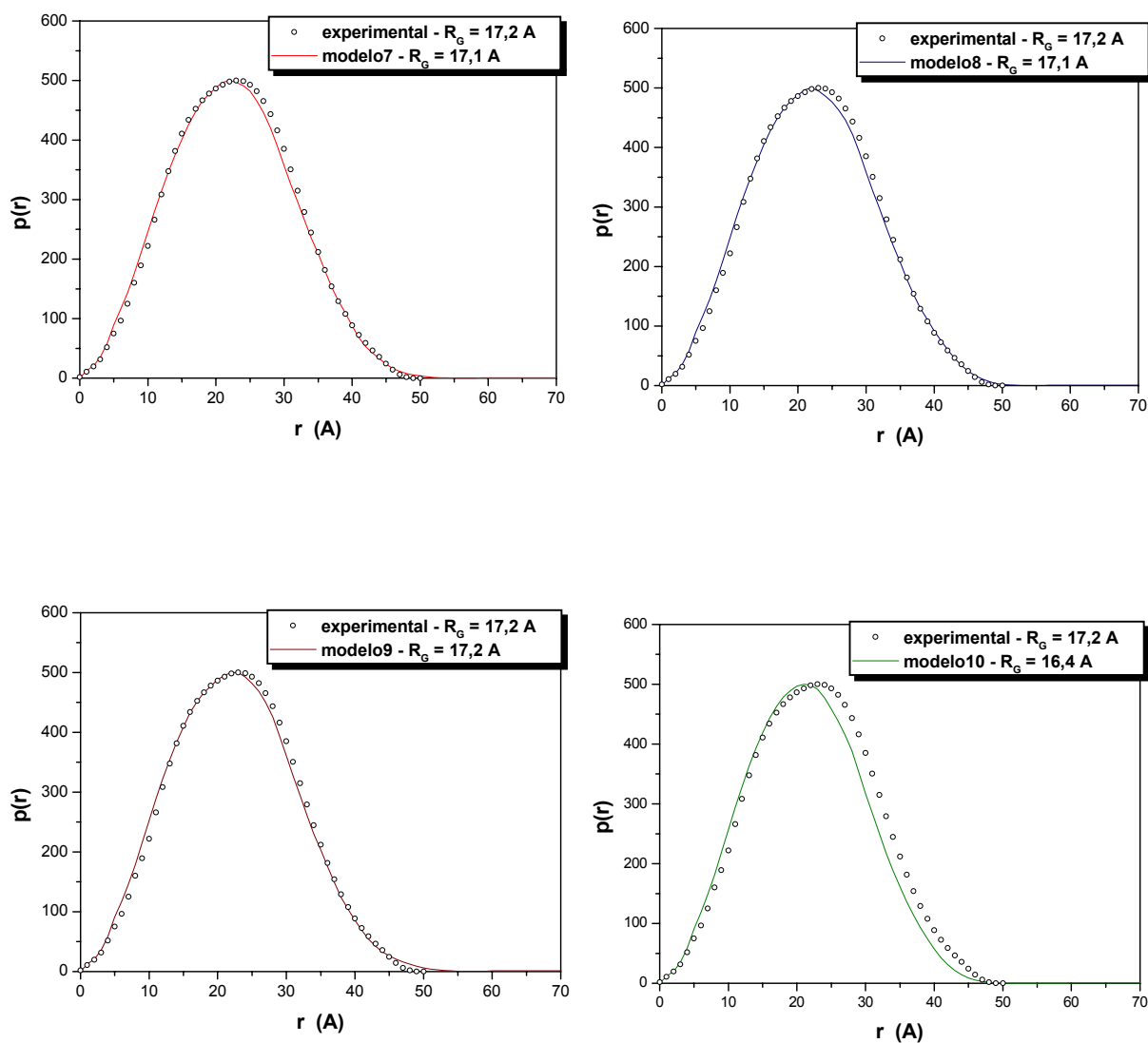
As funções  $p(r)$  desses modelos foram calculadas pelo programa MULTIBODY e comparadas com a função  $p(r)$  experimental. Pelo cálculo do coeficiente de correlação, foi então selecionado o modelo que apresentou valor mais próximo da unidade. Este modelo é mostrado na figura 6.51.

Na figura 7.17 são mostradas as funções distribuição de distâncias dos dez melhores modelos sobrepostas com a  $p(r)$  experimental. Para facilitar a análise, a tabela 7.2, reúne os coeficientes de correlação dos dez modelos.

Modelos da Crotoxina	Coefficiente de Correlação
01	0,9819
02	0,9815
03	0,9975
04	0,9967
05	0,9958
06	0,9964
07	0,9978
08	0,9975
09	0,9976
10	0,9831

**Tabela 7.2** – Valores dos coeficientes de correlação calculados entre as funções  $p(r)$  dos modelos da crotoxina e dos dados experimentais.





**Figura 7.17** – Funções distribuição de distâncias dos modelos dez melhores modelos da crotoxina sobrepostos com a função  $p(r)$  experimental da mesma proteína.

A comparação feita entre as funções  $p(r)$  indica que o modelo 07 é o que mais se aproxima da unidade. Por este motivo, este foi selecionado, mas, observando a tabela 7.2, nota-se que outros modelos também tiveram coeficientes de correlação muito próximos da unidade.

Estes resultados mostram-se compatíveis com os obtidos por Mascarenhas *et al* (1992).

# 8 - Conclusões

---

## 8.1 - Conclusões

O presente trabalho apresentou abordagens diversificadas voltadas à aplicação da técnica de SAXS, em que se procurou propor soluções de problemas comuns à técnica, como a questão da quantidade de material utilizada nas medidas e, principalmente, buscou-se a integração de SAXS com outros métodos de análise, como no caso da associação do espalhamento de raios X a baixos ângulos com algumas técnicas de modelagem e *docking* de proteínas. Paralelo a estas questões, foram também obtidas informações importantes à compreensão do comportamento de diversas proteínas em solução.

O estudo das proteínas em solução resultou informações importantes quanto as suas estruturas terciárias ou quaternárias o que vem ajudar a compreender o comportamento dessas macromoléculas quando se variam as condições do meio que as envolvem.

Em relação às hemoglobinas de serpentes, mostrou-se que, em solução nas condições propostas de pH, apenas poucas mudanças ocorrem na conformação dessas proteínas e o mecanismo de transição dímero-tetrâmero, proposto na literatura, não é observado.

No estudo da PNP humana, ficou confirmada a forma trimérica da enzima em solução, em condições próximas as condições biológicas, a qual também é observada na estrutura cristalina. Ainda, através da simulação da forma dimérica, pela utilização de *docking* de proteínas, e comparação com os resultados obtidos por SAXS, ficou praticamente descartada a possibilidade da PNP humana se apresentar nessa forma; o mesmo ocorrendo com a forma monomérica. Estes resultados são importantes devido à colaboração que podem dar para o desenho de inibidores dessa enzima, principal motivação desses estudos.

A EPSP sintase de *M. tuberculosis*, enzima alvo para o desenho de inibidores e de grande importância ao desenvolvimento de fármacos de ação antimicrobiana, foi avaliada por SAXS em solução em condições próximas as biológicas mostrando-se sensível às variações das condições do meio. Neste caso, foi mostrado que a presença do fosfato no tampão é suficiente para provocar mudanças na estrutura terciária da enzima, fazendo com que passe de um estado mais aberto, na ausência do fosfato, a um estado mais fechado, com a adição dessa substância. Esses resultados também deixam em aberto a discussão da real necessidade da presença do glifosato ou da combinação de S3P-glifosato, para induzir esse mecanismo de fechamento da estrutura, conforme encontrado na literatura.

A integração de SAXS com técnicas de modelagem, até então associadas à cristalografia e NMR, pode servir como uma importante ferramenta para auxiliar nos estudos de estruturas de proteínas, tanto em



nível de estrutura terciária, quanto na formação de complexos. Ainda, em situações em que se tenha dificuldade em cristalizar determinadas proteínas ou complexos de proteínas, a partir das seqüências primárias conhecidas, é possível selecionar modelos gerados por essas técnicas de modelagem, através da técnica de SAXS.

Quanto à questão da extrapolação, foi mostrado que, medidas feitas em várias concentrações para posterior extrapolação à concentração zero e aquelas em uma única concentração, mas com o tempo de exposição aumentado, leva a resultados equivalentes. Este método pode contribuir para análise estrutural preliminar de várias proteínas como as identificadas em projetos genomas.

## **8.2 - Sugestões para trabalhos futuros**

Baseado na experiência adquirida na execução deste trabalho, são sugeridos a seguir temas para outros estudos que possam colaborar com as pesquisas na área da biofísica, como:

- Outros testes de medidas por SAXS, sem uso de extrapolação, com proteínas conhecidas da literatura, buscando mais comprovações experimentais, principalmente em relação aos limites de concentração e tempo de exposição aos raios X que levem a resultados semelhantes aos obtidos pelo método tradicional de análise;
- Desenvolvimento de um programa computacional que faça automaticamente a integração de outros programas para obtenção e

seleção dos modelos de maior correlação com os resultados experimentais obtidos por SAXS, o que atualmente é feito de forma manual e que consome muitas horas de trabalho;

- Integração de SAXS com outras técnicas de modelagem;
- Utilização da técnica de SAXS para otimização de condições de cristalização (soluções monodispersas).