

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/02/2022.



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA CROTOXINA E SUAS SUBUNIDADES COM MEMBRANAS MODELO

CARLOS ROBERTO NATAL JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Morato Fernandez

Co-orientador: Dr. Carlos Alexandre Henrique Fernandes

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Estrutura de Macro e Micromoléculas Naturais.

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

**BOTUCATU – SP
2019**

N272e

Natal Junior, Carlos Roberto

Estudo estrutural da interação da crotoxina e suas subunidades com membranas modelo / Carlos Roberto Natal Junior. -- Botucatu, 2020
69 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientador: Roberto Morato Fernandez

1. Veneno de serpentes. 2. Fosfolipase A2. 3. Crotalus. 4.
Membranas modelo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

“Um livro é a prova de que os homens são capazes de fazer magia.”

Carl Sagan

*Aos meus pais, Carlos e Ana, pelo grande apoio e grande conhecimento que
me proporcionaram.*

Ao meu irmão e amigo de toda hora, que sempre me apoiou e me inspirou.

Agradecimentos

À Fundação de Auxílio à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou este projeto de pesquisa. Cujo o número do processo referente é 2018/05090-1.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) pela contribuição no desenvolvimento da pesquisa e da pós-graduação stricto sensu em todos os estados brasileiros.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, pelo conhecimento construído e pelo seu caráter como cientista e principalmente como ser humano.

Aos meu co-orientadores prof. Dr. Roberto Morato Fernandez e Dr. Carlos Alexandre Henrique Fernandes pelo conhecimento e pela ajuda no desenvolvimento da presente pesquisa.

Ao prof. Dr. Amando Siuti Ito do departamento de física da Universidade de São Paulo (USP- Ribeirão Preto) pelo auxílio nas medidas de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo.

Ao prof. Dr. Cristiano Luís Pinto de Oliveira do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP), pelo auxílio nas medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).

Ao meus pais, Carlos e Ana, pelo auxílio e pelo grande apoio que me forneceram durante esses anos. Muito obrigado pelos ensinamentos.

Ao meu irmão pelas risadas e pelo companheirismo. Obrigado por estar sempre presente em minhas escolhas, nas partes boas e ruins.

Aos meus colegas de laboratório, Fábio, Andréia, Cíntia (Eita), Cíntia, Tainá, Micaela, Bruna, Hamine, Alef, Ana, Ivan, Natalia, Rafael e Antoniel que sempre alegraram meus dias e me proporcionaram muito conhecimento.

ESTUDO ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA CROTOXINA E SUAS SUBUNIDADES COM MEMBRANAS MODELO

Resumo

A crotoxina (CTX) é a mais abundante toxina presente no veneno da *Crotalus durissus terrificus*, representando cerca de 60% do peso seco do veneno bruto desta serpente. A CTX possui atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante, sendo a principal responsável pelo elevado número de óbito em acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Crotalus*. Além dessas características, foram descobertas ações da crotoxina com possíveis aplicações terapêuticas, por conta de seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, imunomodulatórios e antitumorais. A CTX é um heterodímero composto por duas subunidades, uma ácida (CA) e outra básica (CB), sendo esta última uma fosfolipase A₂ com atividade pré-sináptica de bloqueio da transmissão neuromuscular que provoca paralisias motora e respiratória nos animais. Embora as estruturas cristalográficas e por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) de CTX e CB tenham sido resolvidas, pouco se sabe sobre a ação destas nas membranas celulares bem como da localização dos sítios de interação destas proteínas com as membranas alvo. Lipídios DMPC e DMPG foram utilizadas para se estudar a interação entre estas proteínas e membranas modelo. Técnicas de biofísica molecular, tais como espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo e espalhamento de raios X a baixo ângulo foram usadas para estudar o comportamento das proteínas na presença dos lipossomos. Os dados indicam ausência de interação entre CA e CTX sobre os lipídios isoteriônicos (DMPC), enquanto houve interação da CB com ambos sistemas lipídicos (DMPC e DMPG). Nas amostras de membranas modelo com carga negativa (DMPG), foi possível identificar interação envolvendo as proteínas CA e CTX com essas membranas, as quais não haviam interagido com as vesículas de DMPC, sendo que a proteína CA não provocou a lise da bicamada, enquanto a CTX desencadeou a lise dos lipídios. Além disso, os resultados sugerem que CA se dissocia de CB quando o heterodímero CTX se aproxima dos lipossomos.

Palavras chave: Veneno de serpentes; Fosfolipase A₂; *Crotalus*; Membranas modelo.

STRUCTURAL STUDY OF THE INTERACTION OF CROTOXIN AND ITS SUBUNDS WITH MODEL MEMBRANES

Abstract

Crotoxin (CTX) is the most abundant toxin present in *Crotalus durissus terrificus* venom, representing about 60% of its dry weight. CTX has neurotoxic, myotoxic and coagulant activities, being the main responsible for the high death rate in snakebite accidents caused by *Crotalus* snakes. Additionally, crotoxin actions with possible therapeutic applications were recently discovered, due to its anti-inflammatory, analgesic, immunomodulatory and antitumor effects. CTX is a heterodimer composed of two subunits, one acidic (CA) and the other basic (CB). CB is a phospholipase A₂ with presynaptic activity blocking neuromuscular transmission that causes motor and respiratory paralysis in animals. Although the crystallographic and small angle X-ray scattering (SAXS) structures of CTX and CB have been resolved, their mechanism of action on cell membranes and the exact protein interaction sites with membranes are poorly understood. Lipids DMPC and DMPG were used to study the interaction on between these proteins and model membranes. Molecular biophysics techniques, such as static and time-resolved fluorescence spectroscopy and small angle X-ray scattering, were used to study the behavior of these proteins in presence of liposomes. The data obtained indicate the absence of interaction between CA and CTX with zwitterionic lipids (DMPC), while pointed the interaction between CB with both lipid systems (DMPC and DMPG). In the negatively charged model membrane samples (DMPG), it was possible to identify the interaction of CA and CTX with these membranes, which did not interact with the DMPC vesicles. CA did not cause bilayer lysis, while CTX triggered lipid lysis. Finally, the results suggested that CA dissociates from CB when CTX heterodimer approaches the liposomes.

Key Words: Snake venom; Phospholipase A₂; *Crotalus*; Model membranes

Sumário

1. Introdução	2
1.1. Crotoxina.....	2
1.2 Membranas modelo	4
1.3 Técnicas biofísica.....	9
1.3.1 Cromatografia líquida de proteínas	9
1.3.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	10
1.3.3 Espectroscopia de Fluorescência.....	12
1.3.4 Espalhamento de raios X a Baixo Ângulo (SAXS).....	15
2. Objetivos	19
3. Materiais e Métodos	21
3.1 Purificação da crotoxina e suas subunidades	21
3.2. Membranas modelo	22
3.3. Espalhamento de Luz Dinâmico.....	23
3.4. Espectroscopia de Fluorescência.....	23
3.5. Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo	24
4. Resultados	27
4.1. Análises Cromatográficas	27
4.2. Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	28
4.3. Espectroscopia de Fluorescência Estática	29
4.4. Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo.....	34
4.5. Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS)	36
5. Discussão.....	43
6. Conclusão.....	50
Referências.....	52

Lista de Figuras

- Figura 1:** Estrutura da crotoxina (CTX), com distinção de suas subunidades (CA e CB): A) Estrutura obtida por difração de raios X; B) Estrutura obtida por SAXS; Em A, é possível identificar CB em amarelo, a cadeia alfa de CA em verde e a cadeia beta de CA em azul escuro; Em B, é possível identificar CB em amarelo, cadeia alfa de CA em azul claro, cadeia beta de CA em rosa e a cadeia gama em magenta. Os resíduos de triptofano estão destacados como *sticks* verdes (FAURE, XU, & SAUL, 2011; FERNANDES et al., 2017).....3
- Figura 2:** : Grau de organização dos lipídios nas vesículas, dependente da temperatura; A) temos a fase gel (geralmente a temperaturas por volta aos 20 °C); B) transição entre a fase gel e a cristalina; C) temos a fase cristalina (geralmente em temperaturas acima de 25°C) (A. & K., 2013).....4
- Figura 3:** Representação esquemática de um extrusor, constituído por dois filtros e uma membrana de policarbonato, com poros com diâmetros de 100 nm. *Avanti Mini Extruder* <<https://avantilipids.com/divisions/equipment-products>> 15 de setembro de 2019.....5
- Figura 4:** Estrutura química dos fosfolipídios usados nas membranas modelo e dos marcadores fluorescentes utilizados em experimentos de espectroscopia de fluorescência: A) DMPC; B) DMPG; C) NBD-PE e D) C12-NBD-PC. (Avanti Polar Lipids, inc).....6
- Figura 5:** Representação dos processos empregados para a formação de LUV (Large Unilamellar Vesicles) e SUV (Small Unilamellar Vesicles). Fonte: <http://avantilipids.com/index.php?optin=com_content&view=article&id=1384&itemid=372> 15 de setembro de 2019.....7
- Figura 6:** Representação estrutural da bicamada lipídica resultado do processo de extrusão. Fonte: <<https://slideplayer.com.br/slide/384440/>>15 de setembro de 2019.....8
- Figura 7:** A) Representação esquemática de um objeto espalhador, sobre o qual está representado duas radiações incidentes que são espalhadas a um ângulo de 2θ ; B) Esboço de 3 curvas de espalhamento (GLATTER, 1977).....16

Figura 8: Purificação da crotoxina (CTX) e suas subunidades isoladas (CA e CB) a partir do veneno bruto das serpentes *Crotalus durissus terrificus*. (A) Cromatografia líquida de exclusão molecular; (B) Cromatografia líquida de fase reversa; (C) Espectros de dicroísmo circular da CTX (Azul), CA (Vermelho) e CB (Preto).....28

Figura 9: Dependência da intensidade de emissão fluorescente com a temperatura, utilizando-se os marcadores NBD-PE incorporados as membranas de DMPC (A) e DMPG (B). Foram coletados dados das vesículas com e sem a presença das proteínas CTX, CA e CB. O fluoróforo foi excitado em 470 nm e a intensidade máxima fluorescente foi obtida em 533,4 nm.....30

Figura 10: Dependência da intensidade de emissão fluorescente com a temperatura, utilizando-se o marcador C12-NBD-PC incorporados as membranas de DMPC (A) e DMPG (B). Foram coletados dados das vesículas com e sem a presença das proteínas CTX, CA e CB. O fluoróforo foi excitado em 470 nm e a intensidade máxima fluorescente foi obtida em 536,6 nm.....32

Figura 11 Curvas de espalhamento de raios X das vesículas de DMPC (à 18 °C) e de vesículas de DMPG (à 18 e 36 °C). (A) curva de espalhamento do DMPC (preto), DMPG em 18 °C (Azul) e 36 °C (vermelho). (B) Função de distribuição de distância normalizada para as amostras de DMPC (preto), DMPG em 18 °C (Azul) e 36 °C (vermelho).....37

Figura 12: Curva de espalhamento de raios X a baixo ângulo de vesículas de DMPC na presença das proteínas de CA e CTX.....38

Figura 13: Gráfico de espalhamento de raios X a baixo ângulo de vesículas de DMPC, na presença da CB; (A) Curva de espalhamento de DMPC com CB; (B) Função de distribuição de distância normalizada para vesículas de DMPC na presença de CB.....38

Figura 14: Curva experimental de SAXS de DMPG na presença de CB, medidas realizadas à 18 e 36 °C.....39

Figura 15: Gráficos de espalhamento de raios X a baixo ângulo de vesículas de DMPG na presença da CTX, realizados à 18 e 36 °C; (A) curva de espalhamento de DMPG com CTX; (B) Função de distribuição de distância normalizada para vesículas de DMPG com CTX.....40

Figura 16: Gráfico de espalhamento de raios X a baixo ângulo de vesículas de DMPG, na presença da CA; (A) Curva de espalhamento de DMPG com CA; (B) Função de distribuição de distância normalizada para vesículas de DMPG na presença de CA.....40

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Dados de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) das vesículas unilamelares de DMPC com marcador fluorescente NBD-PE.....28
- Tabela 2:** Dados de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) das vesículas unilamelares de DMPG com marcador fluorescente NBD-PE.....29
- Tabela 3** – Tempos de vida e fatores pré-exponenciais dos Trp's presentes na crotoxina e suas subunidades (1 μM), em solução aquosa¹ e em vesículas extrusadas de DMPC² (1 mM), à 25 °C.....35
- Tabela 4** – Tempos de vida e fatores pré-exponenciais dos Trp's presentes na crotoxina e suas subunidades (1 μM), em solução aquosa¹ e em vesículas extrusadas de DMPG² (1 mM), à 25 °C.....35
- Tabela 5:** Representação esquemática sobre a interpretação dos dados obtidos através das técnicas de espectroscopia de fluorescência estática (F.E.), usando o marcador fluorescente NBD-PE e C12-NBD-PC, espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo (F.R.T.) e de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....47

Lista de Abreviações

CTX: Crotoxina.

CA: Crotoxina A ou Crotapotina.

CB: Crotoxina B.

PLA₂: Fosfolipase A₂.

SAXS: Espalhamento de raios X a baixo ângulo.

SUV: *Small unillamellar vesicles*.

LUV: *Large unillamellar vesicles*.

GUV: *Giants unillamellar vesicles*.

DMPC: *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*.

DMPG: *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)*.

NBD: *nitro benzoxadiazol*.

NBD-PE: *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt)*.

C12-NBD-PC: *1-palmitoyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine*.

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*.

DLS: Espalhamento de luz dinâmico.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

Trp: Triptofano.

HPLC: *High performance liquid chromatography*.

HPLC-RF: *High performance liquid chromatography reverse phase*.

TFA: Ácido trifluoroacético.

CD: Dicroísmo circular.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Crotoxina

As serpentes da espécie *Crotalus durissus*, popularmente conhecidas como cascavéis, possuem uma ampla distribuição geográfica, de forma que cinco subespécies são catalogadas, sendo as mais conhecidas e estudadas a *Crotalus durissus terrificus* e a *Crotalus durissus collilineatus* (CARDOSO, FRANÇA, WEN, MÁLAQUE, & HADDAD Jr., 2003). Estudar essas serpentes é especialmente relevante uma vez que os acidentes crotálicos representam 7,5 % dos acidentes ofídicos no Brasil e possuem a maior taxa de mortalidade (cerca de 2,5 %) dentro desses acidentes no Brasil. O veneno crotálico apresenta atividades neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes, que causam paralisia muscular, mioglobínúria e insuficiências renal aguda e respiratória, acarretando nos sintomas que levam ao óbito das vítimas (CARDOSO et al., 2003; MELGAREJO, 2009).

A crotoxina (CTX) é a principal toxina presente no veneno da *Crotalus durissus terrificus* (até 60 % do seu peso seco) possui atividades neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes. Recentemente foram descobertas características da CTX com possíveis aplicações terapêuticas, devido aos seus efeitos imunomodulatórios, anti-inflamatórios, analgésicos e antitumorais (SAMPAIO et al., 2010). A CTX é um heterodímero formada pela associação não covalente de duas subunidades: uma ácida, não enzimática e não tóxica conhecida como Crotoxina A, Crotapotina ou CA; e outra subunidade básica e catalítica denominada Crotoxina B ou CB (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971). A CB é uma fosfolipase A₂ dependente de cálcio (Ca²⁺), com potente atividade de bloqueio na transmissão neuromuscular pré-sináptica, o que acarreta na paralisia motora e respiratória nos animais, sendo responsável pelos efeitos neurotóxicos e miotóxicos (CHANG & LEE, 1977; DÉLOT & BON, 1993; HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971). Por sua vez, a CA não apresenta atividade tóxica. Entretanto, ela potencializa as atividades farmacológicas de CB, elevando o bloqueio da atividade neuromuscular e a necrose muscular e restringindo a ligação da CB a junção neuromuscular (BON, 1982; CHOUMET et al., 1993; KOUYOUMDJIAN, HARRIS, & JOHNSON, 1986). Atualmente, já são conhecidas as estruturas cristalográficas e a resolvida por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), onde é possível verificar divergências entre as estruturas (FAURE et al., 2011; FERNANDES et al., 2017). Além disso, há também

a estrutura cristalográfica da CB, indicando que esta proteína permanece, quando isolada da CA, em forma de tetrâmero e dímero, dependendo da concentração (FERNANDES et al., 2017; MARCHI-SALVADOR et al., 2008).

A figura 1A apresenta o modelo estrutural cristalográfico da CTX, formado pela associação das isoformas CA₂-CB_b, sobre a qual está descrito os sítios de interação entre o complexo CA/CB, descrevendo a relevância de cada resíduo de triptofano na interface entre ambas subunidades (FAURE et al., 2011). A figura 1B representa a estrutura da CTX resolvida por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), que unido com os dados de espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo demonstram a importância dos resíduos de triptofano na interface CA/CB (FERNANDES et al., 2017). Em ambas as estruturas apresentadas na Figura 1 é possível notar que a maioria dos Triptofanos da proteína (CTX) estão na interface entre as subunidades CA/CB.

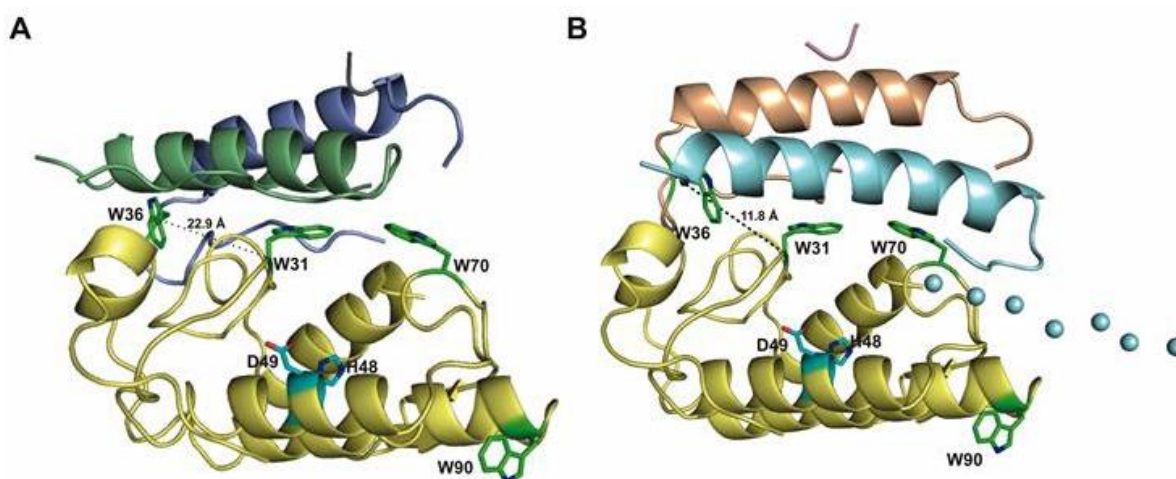


Figura 1: Estrutura da crotoxina (CTX), com distinção de suas subunidades (CA e CB): A) Estrutura obtida por difração de raios X; B) Estrutura obtida por SAXS; Em A, é possível identificar CB em amarelo, a cadeia alfa de CA em verde e a cadeia beta de CA em azul escuro; Em B, é possível identificar CB em amarelo, cadeia alfa de CA em azul claro, cadeia beta de CA em rosa e a cadeia gama em magenta. Os resíduos de triptofano estão destacados como *sticks* verdes (FAURE et al., 2011; FERNANDES et al., 2017).

Estudos apontam que a crotoxina possui diversas formas de atuações sobre a membrana pré-sináptica, como a internalização por endocitose independente de Ca²⁺ (LOMEO et al., 2014), interação direta na membrana ou via receptores e ainda através da clivagem dos fosfolípidios (CHANG & LEE, 1977; FAURE et al., 2003). Entretanto, pouco se sabe sobre os sítios de inibição e interação da crotoxina responsáveis pela atividade neurotóxica da CB.

1.2 Membranas modelo

Membranas modelo, também conhecidas como bicamadas lipídicas, vesículas ou lipossomos, são sistemas controlados de fosfolipídios que mimetizam as membranas biológicas, onde pode-se excluir algumas variáveis e determinar a existência e o nível da interação entre uma molécula e as membranas modelo. Uma divergência importante entre as membranas celulares e as membranas modelo é a ausência de algumas substâncias, como proteínas, glicoproteínas e colesterol, entre outras moléculas. Desse modo, é possível verificar apenas a interação entre a molécula estudada e as membranas, desconsiderando assim, possíveis reações que não contribuem para a ação da molécula (LEWIS & MCELHANEY, 2011). É possível acrescentar variáveis nos sistemas lipídicos visando estudar o comportamento dos lipossomos na presença destas moléculas. O sistema que contenha apenas lipídios é favorável para as interações mais “simples”, em que a molécula a ser estudada age apenas sobre os fosfolipídios. Além disso, outro ponto que diferencia o sistema de membranas modelo das membranas biológicas é a presença da temperatura de transição de fase (T_m), representado pela figura 2, que reflete o estado organizacional dos lipídios na bicamada. Esta é caracterizada pela separação entre uma fase extremamente organizada, denominada fase gel, e uma fase desorganizada, denominada fase líquido-cristalina, a qual se aproxima da fluidez de uma membrana celular (LEWIS & MCELHANEY, 2011; PABST et al., 2003).

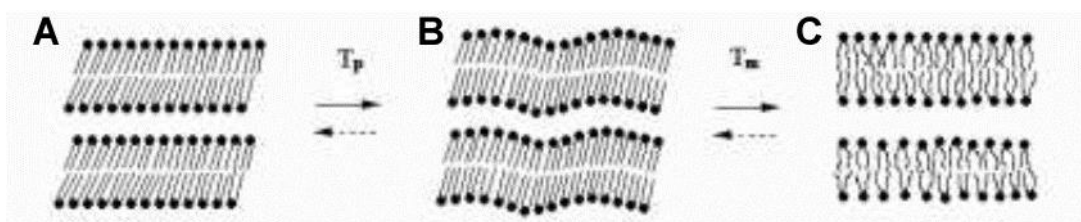


Figura 2: Grau de organização dos lipídios nas vesículas, dependente da temperatura; A) temos a fase gel (geralmente a temperaturas por volta dos 20 °C); B) transição entre a fase gel e a cristalina; C) temos a fase cristalina (geralmente em temperaturas acima de 25°C) (A. & K., 2013).

Além dessas características específicas pertencentes às membranas modelo, há também uma variação do diâmetro das vesículas, resultado do método de formação desses sistemas. Essa variação é compreendida no intervalo de nanômetros (nm) a micrometros (μm) e resulta na classificação das vesículas em *Small Unilamellar Vesicles* (SUV), *Large*

Unillamellar Vesicles (LUV) e as *Giants Unillamellar Vesicles* (GUV). Com a finalidade de se estudar interações com proteínas, a membrana mais utilizada, por suas vantagens, relacionadas com o tamanho, concentração de lipídios e custos de produção, é a LUV (ELLENA, LACKOWICZ, MONGOMERY, & CAFISO, 2011). Para este estudo, as bicamadas lipídicas foram produzidas a partir do processo de extrusão. Este processo consiste na formação de um filme lipídico que é dissolvido em uma solução tampão aquosa; em seguida, esta amostra é passada em uma série de filtros e membranas, o que reduzirá o tamanho das vesículas para o tamanho de 100 nm (FERNANDEZ & LAMY-FREUND, 2000). É possível entender o processo de extrusão através da figura 3, onde temos o posicionamento dos filtros e membranas que serão responsáveis pela formação das membranas modelo.

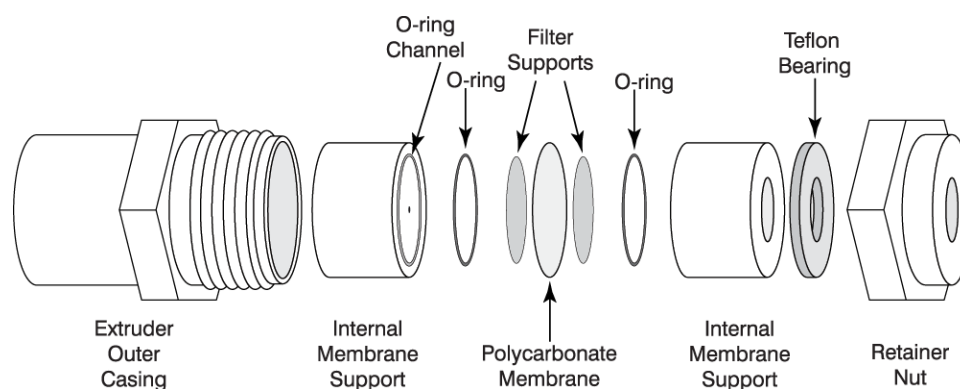


Figura 3: Representação esquemática de um extrusor, constituído por dois filtros e uma membrana de policarbonato, com poros com diâmetros de 100 nm. *Avanti Mini Extruder* <<https://avantilipids.com/divisions/equipment-products>> 15 de setembro de 2019.

Além das diferenças já vistas anteriormente entre as membranas biológicas e as membranas modelo, há também diferenças entre a variedade de estruturas químicas dos fosfolipídios. Ou seja, em membranas modelo temos um ou poucos tipos de fosfolipídios que a constituem, enquanto em uma membrana celular tem-se inúmeros tipos de fosfolipídios (Y. XU, SETO, TANG, & FIRESTONS, 2000). Desse modo, há a necessidade de analisar as características de cada molécula a ser estudada para determinar a matriz lipídica correta para cada sistema. Sendo assim, foi determinado a utilização de dois tipos de lipídios neste estudo sendo possível verificar a interação das proteínas em vesículas de vesículas de *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine* (DMPC) e de *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-*

phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) (DMPG), a escolha destes lipídios foram relacionadas as características e os efeitos da crotoxina, sobre a qual atua em membranas pré-sinápticas, ou seja, que possui cargas. Outra característica desse sistema já relatado em estudos anteriores (BON, 1982) é a necrose muscular provocada pela CB, desse modo foi utilizado lipídios isoteriônicos. Os fosfolipídios foram selecionados por serem isoteriônicos (somatória das cargas nos fosfolipídios é igual a zero) e com carga negativa em sua superfície, respectivamente. Para aprofundar mais os estudos realizados, foram utilizados também marcados (sondas) fluorescentes embebidas na bicamada lipídica, o que possibilita uma análise mais acurada da região de interação com a toxina, mediante as técnicas de espectroscopia de fluorescência. Neste sentido foram selecionado lipídios com o marcados na porção polar do fosfolipídio *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt) (NBD-PE)* e posicionadas no interior da bicamada lipídica no décimo segundo carbono do fosfolipídio *1-palmitoyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine (C12-NBD-PC)* (BONG, JANSHOFF, STEINEM, & GHADIRI, 2000; FERNANDEZ, VIEIRA, NAKAIE, ITO, & LAMY, 2005). As estruturas químicas desses lipídios estão representadas na figura 4.

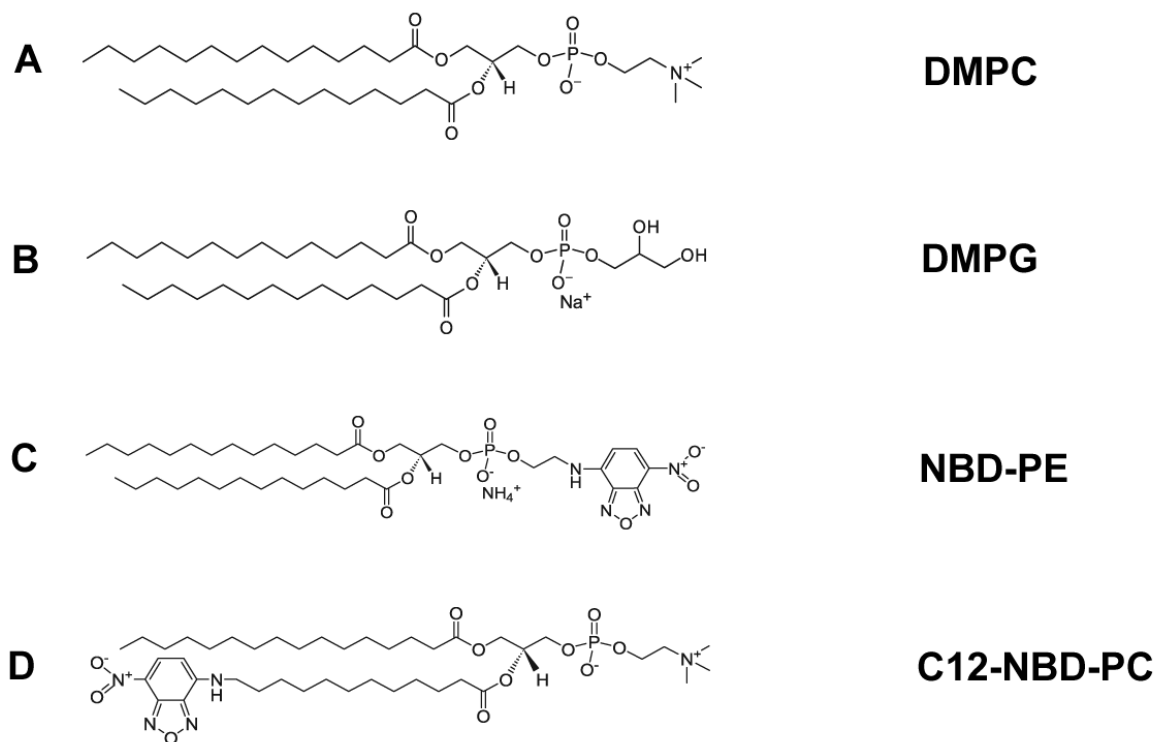


Figura 4: Estrutura química dos fosfolipídios usados nas membranas modelo e dos marcadores fluorescentes utilizados em experimentos de espectroscopia de fluorescência: A) DMPC; B) DMPG; C) NBD-PE e D) C12-NBD-PC. (Avanti Polar Lipids, inc).

O processo utilizado na formação de bicamadas unilamelares é denominado de extrusão, que será descrito com maiores detalhes adiante. A extrusão, basicamente, é a passagem de vesículas multi-lamelares por uma série de filtros e membranas, o que as tornam unilamelares, assumindo uma configuração semelhante à apresentada na figura 5. Neste estudo, foram utilizadas membranas modelo constituídas de DMPC + NBD-PE, DMPC + C12-NBD-PC, DMPG + NBD-PE e DMPG + C12-NBD-PC.

O processo de extrusão consiste na diluição dos fosfolipídios descritos acima em um meio apolar, que possui ponto baixo ponto de ebulição e que preferencialmente sua evaporação ocorra de forma rápida. Para este processo, a substância mais utilizada é o clorofórmio. Após esta diluição, todo o solvente apolar é evaporado e um filme lipídico é formado no fundo do recipiente. Em seguida, esse filme é diluído em um tampão polar, formando as vesículas multilamelares em suspensão. Para que haja a formação das vesículas unilamelares, é necessário passar a amostra por uma série de filtros e membranas com diâmetro de poros pré-determinados (100 nm). Este processo é descrito na figura 6. Após o processo de extrusão, é formada uma bicamada lipídica como a apresentada na figura 6. Contudo, o processo de extrusão apresenta uma polidispersividade alta com relação a amostras monodispersas, considerando vesículas constituídas de uma única molécula.

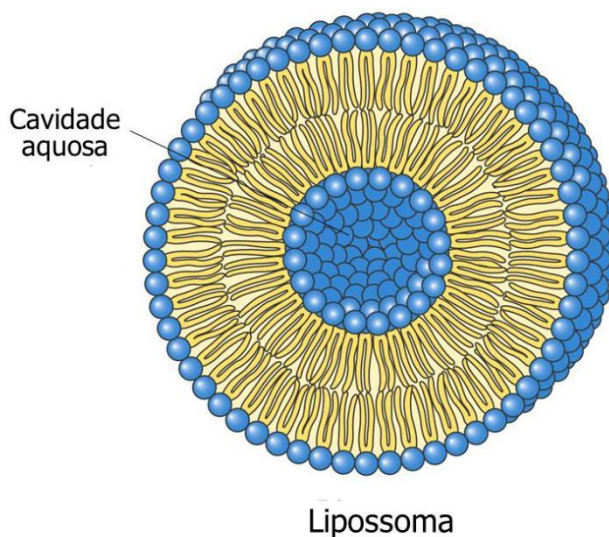


Figura 5: Representação estrutural da bicamada lipídica resultado do processo de extrusão. Fonte: <<https://slideplayer.com.br/slide/384440/>>15 de setembro de 2019.

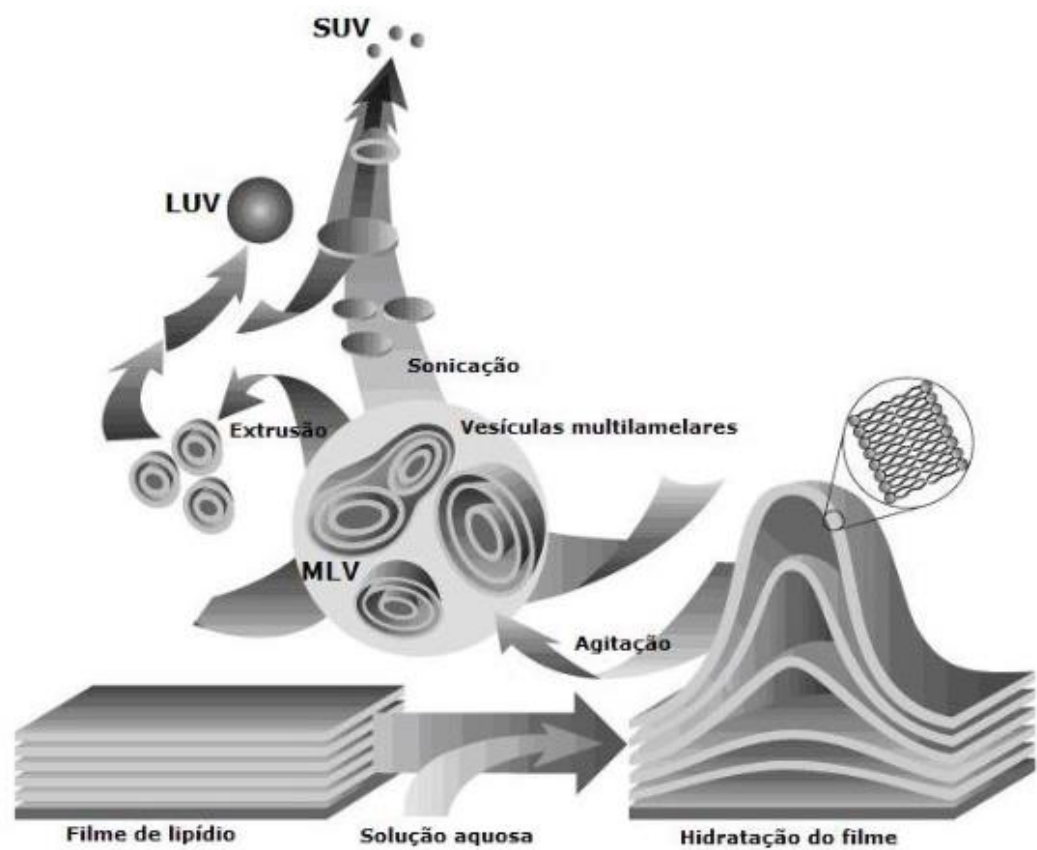


Figura 6: Representação dos processos empregados para a formação de LUV (Large Unilamellar Vesicles) e SUV (Small Unilamellar Vesicles). Fonte: <http://avantilipids.com/indes.php?optin=com_content&view=article&id=1384&itemid=372> 15 de setembro de 2019.

1.3 Técnicas biofísica

1.3.1 Cromatografia líquida de proteínas

Esta técnica é utilizada para a separação de biomoléculas através de suas características químicas e físicas. Existem cinco técnicas mais aplicadas às proteínas, que são as técnicas de exclusão molecular (gel filtração), fase reversa, afinidade, troca iônica e hidrofobicidade. No caso deste trabalho, as duas primeiras foram utilizadas e serão abordadas aqui. A técnica de cromatografia por exclusão molecular (gel filtração) consiste na separação das moléculas de acordo com o tamanho, na qual a interação entre o analito e a matriz da coluna não interferem na separação das moléculas, separando-as apenas com relação ao seu tamanho. A separação por tamanho molecular ocorre devido a presença de poros presentes na matriz da coluna cromatográfica, onde cada coluna possui suas especificações, as moléculas menores interagem com os poros, o que reduz a velocidades, enquanto as moléculas maiores passam sem que haja interação com a matriz da coluna. No final do processo as moléculas são separadas das maiores para as menores. Diversos estudos anteriores já utilizaram está técnica para o isolamento de proteínas de venenos de serpente (SILVA, AANDERSON, & GUILHERME, 2014).

A cromatografia de fase reversa, por sua vez, separa as moléculas de acordo com a afinidade entre a matriz hidrofóbica presente na coluna e as proteínas da amostra. A separação das proteínas ocorre com a diminuição da polaridade do solvente, que ocorre através de um gradiente de 0% a 100% de um solvendo que possui 0,1% de TFA e 66,6% de acetonitrila. As moléculas que possuem uma menor afinidade pela coluna sairão antes que as moléculas que possuem uma maior afinidade pela coluna. Esta técnica já foi descrita anteriormente na separação de proteínas a partir de veneno bruto de serpentes e também para a separação da crotoxina (DOS-SANTOS, 2014).

1.3.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), também conhecido como espectroscopia de fótons correlacionados, é um método eficiente para determinar o tamanho, a distribuição de tamanhos (polidispersidade) e a forma das partículas em suspensão através do movimento Browniano e deslocamento Doppler induzido por um feixe de laser (G. & HALLETT, 1995; LIU, CAI, ZHANG, & XU, 2015; C. XU, CAI, ZHANG, & LIU, 2015). Quando uma amostra com partículas em suspensão possui movimento Browniano e sobre ela é incidido um feixe de laser monocromático, o comprimento de onda da radiação luminosa incidente é alterada após colidir com as partículas em movimento, produzindo o deslocamento Doppler, que corresponde a uma pequena alteração da frequência da luz espalhada comparada com a luz incidente (CUMMINS, KNABLE, & YEH, 1964; WANG, SHEN, WANG, YU, & XU, 2010; WEBER & SCHWEIGER, 1998). Essas mudanças fornecem informações a respeito do tamanho, distribuição de tamanhos, forma e estrutura das partículas em solução. Assim, em se tratando de proteínas, pode-se verificar até o seu estado oligomérico. A luz espalhada por pequenas partículas varia rapidamente com pequenas alterações no deslocamento Doppler, enquanto que partículas maiores, que se propagam mais vagarosamente, exibem uma grande alteração do deslocamento Doppler. Geralmente, devido ao deslocamento Doppler ser extremamente pequeno, as energias dos fótons incidentes e espalhados são quase idênticas, já que a relação entre energia e comprimento de onda é dada pela equação de Planck, em que o comprimento de onda é inversamente proporcional a energia do fóton. Isso resulta em um espalhamento quase estático, uma vez que a alteração da energia é mínima. Como resultado, a técnica de DLS é comumente referida como “técnica de espalhamento de luz quase elástico” (G. & HALLETT, 1995).

A descrição do movimento da partícula e da distribuição de tamanhos das partículas em um meio pode ser obtida usando uma função de autocorrelação e pelo coeficiente de difusão da partícula, a qual permite analisar as flutuações dependentes de tempo na intensidade da luz espalhada. A taxa de decaimento exponencial da correlação do sinal (G), é dependente da difusão da partícula a ser analisada, representada pela equação 1 (CAROLINE, 1984).

$$G = \int_0^{\infty} I(t) I(t + \tau) dt = B + A e^{-2q^2 D \tau} \quad (1)$$

Em que B é a medida realizada apenas com o meio em que a partícula está diluída (tampão), A é a amplitude da onda eletromagnética e D é o coeficiente de difusão translacional. O vetor de espalhamento (q) é determinado pela seguinte equação 2:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2)$$

Em que n é o índice refrativo do solvente, λ_0 é o comprimento de onda do laser no vácuo, e θ é o ângulo de espalhamento, normalmente 90 graus. A velocidade do Browniano é calculada, através do deslocamento do comprimento de ondas causado pelo efeito Doppler, e nos fornece o coeficiente de difusão translacional D , determinado pela equação 3. O coeficiente de difusão pode ser convertido em um diâmetro hidrodinâmico (D_H) usando a equação de Stokes-Einstein, descrita pela equação 3, onde κ_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e η é a viscosidade:

$$D_H = \frac{\kappa_B T}{3\pi\eta D} \quad (3)$$

A técnica de DLS possui numerosas vantagens para avaliar o tamanho das partículas e tem sido extensamente usado para determinar o raio hidrodinâmico de várias partículas. O tempo de exposição ao feixe de luz é pequeno e automatizado. Pequenas partículas como pontos quânticos (MA, DING, & XIONG, 2015; TARASOV et al., 2013), grafeno (CHUA et al., 2015; NOGUEIRA, NAKABAYASHI, & ZUCOLOTTI, 2015), nanotubos de carbono e fulerenos (DATTANI et al., 2015; WEI et al., 2015), as quais espalham fracamente a luz e possuem um rápido movimento em uma suspensão líquida concentrada, tem sido estudado através da técnica de DLS. Desde o ano de 2010, e devido ao crescente interesse em nanociências e nanotecnologia, DLS não estão apenas sendo usadas na área acadêmica, mas também em laboratórios de várias indústrias, o que inclui aqueles que trabalham com terras

raras, revestimentos, materiais, ciências de alimentos, produtos farmacêuticos, pós fluorescentes e proteínas (CHEN & ELIMELECH, 2006).

Biologicamente, os estudos realizados através da técnica de DLS, quando realizado com proteínas, fornece informações com respeito a oligomerização destas, bem como a polidispersividade, estimar a massa da amostra e determinar o raio hidrodinâmico da amostra (FERNANDES et al., 2017). Além de conseguir determinar a oligomerização das proteínas em um estudo que compara concentração, variação de pH ou temperatura. Outra aplicabilidade desta técnica está em analisar os tamanhos e a integridade das membranas modelo após o processo de extrusão.

1.3.3 Espectroscopia de Fluorescência

Durante os último 20 anos houve um notável crescimento no uso de espectroscopia de fluorescência em ciências biológicas (ELLENA et al., 2011; FERNANDES et al., 2017). As formas mais utilizadas como ferramentas em bioquímica e biofísica são espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo. Ao longo do tempo, a empregabilidade dessas técnicas foi ampliada em diversas áreas, com aplicações na biotecnologia, na citometria de fluxo, em diagnósticos médicos, no sequenciamento de DNA, na área forense e em análises genéticas já que estas técnicas possuem alta sensibilidade de detecção e a manipulação das amostras ocorre de maneira prática e fácil (LAKOWICZ, 2006).

O fenômeno da fluorescência é muitas vezes confundido com o fenômeno da fosforescência já que ambos consistem em uma emissão luminescente que ocorrem devido a estados eletricamente excitados. Na emissão fluorescente, que ocorre na ordem de tempo de 10×10^{-9} s, no estado de excitação singlete, o elétron excitado permanece pareado (com spin oposto) ao elétron que permaneceu no estado fundamental (*ground-state*). Isto permite que o elétron retorne ao estado fundamental rapidamente pela emissão de um fóton, pois ambos os elétrons estão com o spin opostos. (LAKOWICZ, 2006; LÚCIO, VEQUI-SUPLICY, FERNANDEZ, & LAMY, 2010). Já a emissão fosforescente é a emissão de fótons de luz na forma de tripleto, que consiste na excitação de elétrons como mesmo sentido de spin, ou seja, o elétron excitado possui o mesmo spin do elétron no estado fundamental. Desse modo, o retorno ao estado fundamental não é permitido e o decaimento é muito mais lento (10^0 s).

Geralmente, as substâncias nas quais ocorrem o fenômeno de fosforescência são conhecidas como “*glow-in-the-dark*” (brilham no escuro) (LAKOWICZ, 2006).

O fenômeno de emissão fluorescente geralmente ocorre em moléculas aromáticas que são conhecidas como fluoróforos. No caso de proteínas, essas moléculas podem provir de duas origens, sendo intrínsecas ou extrínsecas. Os fluoróforos intrínsecos, ou naturais, são aqueles que estão naturalmente presentes nas proteínas, como os resíduos de triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e a fenilalanina (Phe). Sendo o mais utilizado, nas medidas de espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo, o Trp, pois este possui o maior rendimento quântico (Q), como demonstrado na equação 4. Já os fluoróforos extrínsecos são marcadores a serem adicionados nas amostras afim de interagirem com as proteínas (GUILBAULT, 1990).

O fenômeno de fluorescência pode ser estudado de duas maneiras, que consistem na avaliação da intensidade luminescente com relação ao comprimento de onda dos fótons excitados e emitidos e na determinação do tempo em que o elétron permanece no estado excitado. O tempo que um elétron demorar para transitar entre os níveis energéticos na eletrosfera estão na ordem de 10^{-15} s, e o tempo em que este permanece no estado excitado é de 10^{-9} s (ns). Desse modo, qualquer alteração deste valor está relacionado a perturbações causadas no orbital do estado excitado devido ao meio ou a interação com a molécula fluorescente (LAKOWICZ, 2006).

Após esta breve introdução sobre a emissão fluorescente é possível falar sobre as técnicas de espectroscopia fluorescente utilizadas neste trabalho, que foram a espectroscopia de fluorescência estática e a espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo. A espectroscopia de fluorescência estática consiste na excitação de um marcador fluorescente. Ao incidir fótons de determinado comprimento de onda, ocorre a absorção destes e a excitação dos elétrons no estado singlete. Ao retornarem ao estado fundamental, é emitido um fóton com maior comprimento de onda, conseqüentemente com menor energia do que o do fóton incidente. Nesta técnica, é detectada a quantidade (intensidade) dos fótons produzidos pelo decaimento dos elétrons excitados ao estado fundamental (LAKOWICZ, 2006). O rendimento quântico fluorescente representa a razão entre a taxa de decaimento fluorescente e a taxa de decaimento total (ou seja, o somatório entre a taxa de decaimento fluorescente e o decaimento não-fluorescente), sendo representado pela equação 4 (GUILBAULT, 1990).

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + \kappa_{nr}} \quad (4)$$

Em que Q é o rendimento quântico fluorescente, Γ é a taxa de decaimento fluorescente e κ_{nr} é a taxa de decaimento não-radiativo (decaimento não fluorescente).

A espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo é uma técnica utilizada para detectar a intensidade de decaimento fluorescente ou a anisotropia da amostra. Nesta técnica, a amostra é exposta à pulsos curtos de luz, os quais são tão curtos quanto o tempo de decaimento das amostras. Essa intensidade é detectada e armazenada com uma velocidade de detecção, o que permite construir uma relação entre intensidade, ou anisotropia, em uma escala de tempo. No caso dos resíduos de Trp presente nas proteínas, a curva da intensidade fluorescente pelo tempo de decaimento é ajustada em uma função tri-exponencial, representada na equação 5 (BIRCH & IMHOF, 2006).

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (5)$$

Em que α_i são fatores pré-exponenciais, e é o número de Euler, I é a intensidade e τ é o tempo de decaimento.

Com o ajuste para o decaimento radiativo do Trp presente nas proteínas, é possível calcular o tempo de decaimento médio, onde são considerado os valores dos três tempos da equação 5. O cálculo do tempo médio é realizado pela equação 6. A partir da análise das equações 5 e 6 é possível determinar o meio ao qual o Trp está inserido, se em meio lipídico ou meio aquoso, por exemplo.

$$\tau_{av} = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (6)$$

α_i são fatores pré-exponenciais, e τ_i são os tempos de decaimentos, obtidos na equação 5. A alterações dos valores de dos tempos de decaimento e dos fatores pré-exponenciais indicam alterações no orbital atômico excitado.

1.3.4 Espalhamento de raios X a Baixo Ângulo (SAXS)

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) é utilizada em estudos estruturais de moléculas em suspensão. Os processos de espalhamentos de radiações são caracterizados pela lei da reciprocidade, sobre a qual se estabelece a relação inversa entre o tamanho do objeto irradiado e o ângulo de espalhamento. As dimensões das moléculas (geralmente representadas entre algumas dezenas e alguns milhares de Å) são consideráveis quando comparados com o comprimento de onda feixe de raios X, fazendo com que o alcance angular da radiação espalhada seja consideravelmente pequeno. Considerando que a radiação é espalhada principalmente pelos elétrons, podemos resumir o evento da seguinte forma: o espalhamento de raios X a baixo ângulo é observado apenas quando existe inhomogeneidade da densidade eletrônica das moléculas existentes nas amostras. Estamos limitados apenas ao espalhamento coerentes, desde que o espalhamento incoerente seja insignificante a baixos ângulos (GLATTER, 1977).

O processo de espalhamento de raios X a baixo ângulo pode ser visualizado da seguinte forma: o elétron ressoa com a mesma frequência do fóton incidente, emitindo um fóton secundário e coerente, causando interferências entre si (GLATTER, 1977; ORTHABER, BERGMANN, & GLATTER, 2000).

Observamos dois fótons que são desviados em dois pontos distintos de nossa molécula em um ângulo de 2θ , consideramos que estas ficaram com uma defasagem de 1 comprimento de onda (λ). Ao considerarmos os espalhamentos promovidos por todo o volume de nossa molécula com ondas em todas as possíveis fases, nos dará um resultado nulo no ângulo de espalhamento de 2θ , devido as interferências destrutivas. Em um outro cenário, se considerarmos ângulos de espalhamentos menores, a diferença de fase das ondas será menor e estas começarão a se sobrepor (interferência construtiva). O maior espalhamento será no ângulo 0° , em que todas as ondas estão em fase (MITTELBAACH & GLATTER, 1998).

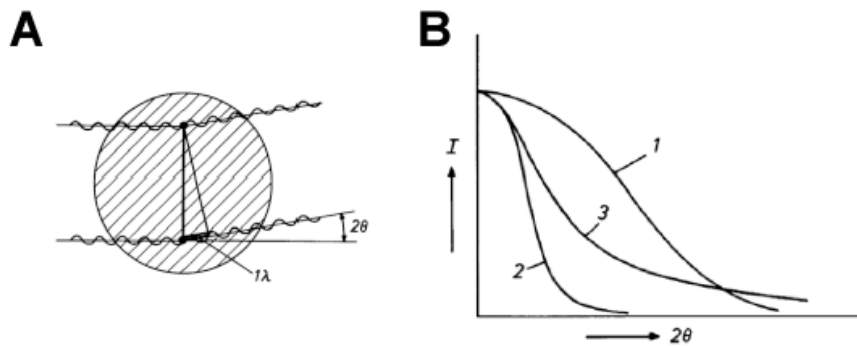


Figura 7: A) Representação esquemática de um objeto espalhador, sobre o qual está representado duas radiações incidentes que são espalhadas a um ângulo de 2θ ; B) Esboço de 3 curvas de espalhamento (GLATTER, 1977).

Qualitativamente, na curva de espalhamento é possível observar um decaimento muito mais suave do que o esperado. Vamos aplicar uma situação de acordo com a curva de experimental, quando as dimensões do objeto estudado se assemelham ao comprimento de onda da radiação. Neste sistema, a diferença de 1 comprimento de onda estará presente em menores valores de 2θ (Figura 7A), caracterizando uma curva de espalhamento com decaimento mais acentuado (Figura 7B, curva 2). Quando temos o cenário em que o comprimento de onda é muito menor do que o objeto observado irá ocorrer o espalhamento de raios X a baixo ângulo, representado nas curvas 1 e 3 da Figura 7B (GLATTER, 1977).

Desse modo, é possível calcular a curva de espalhamento esperada por qualquer forma de partícula. Em partículas anisotrópicas, deve-se calcular o espalhamento em todas as orientações e o resultado da curva de espalhamento é a média do espalhamento em todas as orientações. Uma técnica usada para calcular a curva de espalhamento envolve a função de distribuição de distância dos elétrons $p(r)$, a qual é obtida levando em consideração a forma da molécula. A curva de espalhamento $I(h)$ é calculada a partir da transformada inversa de Fourier, descrita pela equação 7 (GLATTER, 1977; ORTHABER et al., 2000).

$$I(h) = 4\pi \int_0^\infty p(r) \frac{\sin hr}{hr} dr, \quad h = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (7)$$

Entende-se que a curva de espalhamento permanecerá inalterada se os elétrons se deslocarem dentro de uma partícula em distâncias pequenas quando comparadas com o tamanho da partícula. Dessa forma, partículas com pequenas inhomogeneidade podem ser

tratadas como se fossem partículas com densidade eletrônica uniforme (MITTELBAACH & GLATTER, 1998; ORTHABER et al., 2000).

Até o presente momento, assumimos que as moléculas estão no vácuo, sobre o qual a amplitude de espalhamento é proporcional a densidade eletrônica ρ . Para partículas em solução, apenas a diferença de densidades eletrônicas $\rho_2 - \rho_1$ (sendo ρ_2 a densidade eletrônica do soluto e ρ_1 a densidade eletrônica do solvente) é efetiva. Se ambas as densidades eletrônicas forem iguais, o feixe não está “vendo” a molécula, desde que a solução seja uma densidade eletrônica homogênea e contínua, e as ondas espalhadas em todas as direções serão extintas. O termo “densidade eletrônica” é frequentemente usado para a diferença de densidade eletrônica entre o solvente e o soluto, ou seja, o “contraste” (ORTHABER et al., 2000).

Estamos estudando o espalhamento de raios X a baixo ângulo apenas por uma partícula isolada na teoria apresentada acima, conhecida como partícula espalhadora, postulada em estudos anteriores (GUINIER, 1938). Considerando uma amostra contendo partículas monodispersas, ou seja, que possuem aproximadamente o mesmo tamanho, as intensidades da curva de espalhamento das partículas individuais simplesmente se acrescentam. A problemática relacionado com as análises de resultados a baixo ângulos se relaciona com a dedução dos tamanhos, formas, massa e possivelmente até a distribuição da densidade eletrônica da curva de espalhamento. Para a resolução deste desafio é necessário encontrar uma partícula modelo, que possua um equivalente de espalhamento com as partículas em solução, por exemplo, do qual a curva de espalhamento se ajusta com o erro experimental e com a curva experimental. Quanto mais preciso for este ajuste melhor será a análise do problema. Para encontrar um modelo equivalente ao espalhamento, gerando uma solução completa, frequentemente se requer muitos ciclos de aproximação, e muitas vezes é uma mera questão de tentativa e erro (GLATTER, 1977; GUINIER, 1938; ORTHABER et al., 2000).

Como foi descrito anteriormente e falando mais especificamente do que é apresentado neste trabalho, quanto maior for o diâmetro da proteína e da vesícula a ser estudada menor deve ser o comprimento de onda da radiação, para que haja o espalhamento detectável. Contudo, quando consideramos principalmente lipossomos, que possuem diâmetros médios maiores do que uma proteína, é exigido uma análise mais criteriosa dos resultados, pois estamos trabalhando próximo aos limites de resolução da técnica.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

As técnicas utilizadas neste trabalho forneceram dados suficientes para determinar as interações/lise entre as proteínas e as membranas, além de suportar uma hipótese sobre o mecanismo de ação do heterodímero de CTX sobre as membranas celulares. Essa hipótese descreve a CA como uma carreadora da CB, a qual é direcionada para a junção neuromuscular, em seguida ocorre a dissociação do heterodímero, onde a CA permanece fracamente ligada a membrana celular ou em solução, enquanto CB desempenha a função de fosfolipase lisando os lipídios na cadeia *sn-2*. Além disso, os dados demonstram que há uma possível interação (CA com DMPG), mesmo que fraca ou transiente, a qual não havia sido observada anteriormente. Com os dados apresentados é possível verificar a interação da CB e CTX sobre as vesículas de DMPG, o que não havia sido relatado anteriormente. Acreditamos que o cenário que seja mais compatível com os resultados aqui relatados, é a interação e a dissociação do heterodímero de CTX na presença de cargas, sobre a condição de a proteína CA se ligar fracamente ao lipossomo e a proteína CB, após a dissociação de CA, desempenhar o papel de fosfolipase A₂.

Com isso, os experimentos aqui realizados geraram resultados que contribuem para a compreensão do mecanismo de ação da proteína, bem como para novas pesquisas envolvendo as técnicas ou as proteínas aqui estudadas. Demonstrando a importância da utilização de sistemas miméticos para complementação de estudos já realizados, implicando em vantagens para a utilização destes sistemas.

REFERÊNCIAS

Referências

- A., E., & K., P. (2013). Differential Scanning Calorimetry Studies of Phospholipid Membranes: The Interdigitated Gel Phase. In *Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*. <https://doi.org/10.5772/51882>
- BIRCH, D. J. S., & IMHOF, R. E. (2006). Time-Domain Fluorescence Spectroscopy Using Time-Correlated Single-Photon Counting. In *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. https://doi.org/10.1007/0-306-47057-8_1
- BON, C. (1982). Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon*. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90173-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90173-8)
- BONG, D. T., JANSHOFF, A., STEINEM, C., & GHADIRI, M. R. (2000). Membrane partitioning of the cleavage peptide in flock house virus. *Biophysical Journal*, 78(2), 839–845. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76641-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76641-0)
- CARDOSO, J. L. C., FRANÇA, F. O. S., WEN, F. H., MÁLAQUE, C. M. S., & HADDAD Jr., V. (2003). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000600009>
- CAROLINE, D. (1984). Measurement of Suspended Particles by Quasi-elastic Light Scattering. *Optica Acta: International Journal of Optics*. <https://doi.org/10.1080/713821500>
- CHANG, C. C., & LEE, J. D. (1977). Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like β -bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/BF00508469>
- CHEN, K. L., & ELIMELECH, M. (2006). Aggregation and deposition kinetics of fullerene (C60) nanoparticles. *Langmuir*. <https://doi.org/10.1021/la062072v>
- CHOUMET, V., SALIOU, B., FIDELER, L., CHEN, Y. -C, GUBENSEK, F., BON, C., & DELOT, E. (1993). Snake-venom phospholipase A2 neurotoxins: Potentiation of a single-chain neurotoxin by the chaperon subunit of a two-component neurotoxin. *European Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb19869.x>

- CHUA, C. K., SOFER, Z., ŠIMEK, P., JANKOVSKY, O., KLIMOVA, K., BAKARDJIEVA, S., ... PUMERA, M. (2015). Synthesis of strongly fluorescent graphene quantum dots by cage-opening buckminsterfullerene. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/nn505639q>
- CUMMINS, H. Z., KNABLE, N., & YEH, Y. (1964). Observation of diffusion broadening of rayleigh scattered light. *Physical Review Letters*. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.12.150>
- DATTANI, R., GIBSON, K. F., FEW, S., BORG, A. J., DIMAGGIO, P. A., NELSON, J., ... Cabral, J. T. (2015). Fullerene oxidation and clustering in solution induced by light. *Journal of Colloid and Interface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.01.005>
- DÉLOT, E., & BON, C. (1993). Model for the Interaction of Crotoxin, a Phospholipase A2 Neurotoxin, with Presynaptic Membranes. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi00091a022>
- DOS-SANTOS, M. C. (2014). CROTOXINA E CROTOXINA-SIMILE ISOLADAS DE VENENOS DE SUBESPÉCIES DE *Crotalus durissus* E SUAS MÚLTIPLAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS 1. *Scientia Amazonia*.
- ELLENA, J. F., LACKOWICZ, P., MONGOMERY, H., & CAFISO, D. S. (2011). Membrane thickness varies around the circumference of the transmembrane protein BtuB. *Biophysical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.01.055>
- FAURE, G., ČOPIC, A., LE PORRIER, S., GUBENSEK, F., BON, C., & KRIZAJ, I. (2003). Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo* electric organ: Binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. *Toxicon*. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00394-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00394-X)
- FAURE, G., XU, H., & SAUL, F. A. (2011). Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. *Journal of Molecular Biology*, 412(2), 176–191. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.027>
- FERNANDES, C. A. H., PAZIN, W. M., DREYER, T. R., BICEV, R. N., CAVALCANTE, W. L. G., FORTES-DIAS, C. L., ... FONTES, M. R. M. (2017). Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. *Scientific Reports*, 7(November 2016), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep43885>

- FERNANDEZ, R. M., & LAMY-FREUND, M. T. (2000). Correlation between the effects of a cationic peptide on the hydration and fluidity of anionic lipid bilayers: A comparative study with sodium ions and cholesterol. *Biophysical Chemistry*, 87(2–3), 87–102. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(00\)00169-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(00)00169-1)
- FERNANDEZ, R. M., RISKE, K. A., AMARAL, L. Q., ITRI, R., & LAMY, M. T. (2008). Influence of salt on the structure of DMPG studied by SAXS and optical microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(4), 907–916. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.12.005>
- FERNANDEZ, R. M., VIEIRA, R. F. F., NAKAIE, C. R., ITO, A. S., & LAMY, M. T. (2005). Peptide-lipid interaction monitored by spin labeled biologically active melanocortin peptides. *Peptides*, 26(10), 1825–1834. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.12.030>
- G., D. D., & HALLETT, F. R. (1995). Dynamic light scattering: applications to food systems. *Food Research International*. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)00053-B](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)00053-B)
- GLATTER, O. (1977). A new method for the evaluation of small-angle scattering data. *Journal of Applied Crystallography*. <https://doi.org/10.1107/s0021889877013879>
- GUILBAULT, G. G. (1990). Practical Fluorescence. Modern Monographs in Analytical Chemistry. *CRC Press*.
- GUINIER, A. (1938). Structure of age-hardened aluminium-copper alloys [2]. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/142569b0>
- HENDON, R. A., & FRAENKEL-CONRAT, H. (1971). Biological Roles of the Two Components of Crotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.7.1560>
- HERNANDEZ-OLIVEIRA, S., TOYAMA, M. H., TOYAMA, D. O., MARANGONI, S., HYSLOP, S., & RODRIGUES-SIMIONI, L. (2005). Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom. *Protein Journal*. <https://doi.org/10.1007/s10930-005-6718-z>

- KOUYOUMDJIAN, J. A., HARRIS, J. B., & JOHNSON, M. A. (1986). Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. *Toxicon*. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90178-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90178-9)
- LAKOWICZ, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- LEWIS, R., & MCELHANEY, R. (2011). The Mesomorphic Phase Behavior of Lipid Bilayers. In *The Structure of Biological Membranes, Third Edition*. <https://doi.org/10.1201/b11018-5>
- LIU, L., CAI, X., ZHANG, J., & XU, C. (2015). Particle-size measurements in a micro-channel with image dynamic light scattering method. In *Procedia Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.01.211>
- LOMEO, R. D. S., GONÇALVES, A. P. D. F., SILVA, C. N. Da, DE PAULA, A. T., COSTA SANTOS, D. O., FORTES-DIAS, C. L., ... DE LIMA, M. E. (2014). Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. *Toxicon*, 85, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.008>
- LÚCIO, A. D., VEQUI-SUPLICY, C. C., FERNANDEZ, R. M., & LAMY, M. T. (2010). Laurdan spectrum decomposition as a tool for the analysis of surface bilayer structure and polarity: A study with DMPG, peptides and cholesterol. *Journal of Fluorescence*, 20(2), 473–482. <https://doi.org/10.1007/s10895-009-0569-5>
- MA, Y. Y., DING, H., & XIONG, H. M. (2015). Folic acid functionalized ZnO quantum dots for targeted cancer cell imaging. *Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/30/305702>
- MARCHI-SALVADOR, D. P., CORRÊA, L. C., MAGRO, A. J., OLIVEIRA, C. Z., SOARES, A. M., & FONTES, M. R. M. (2008). Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: Crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. <https://doi.org/10.1002/prot.21980>
- MELGAREJO, A. R. (2009). Serpentes peçonhentas do Brasil. In *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*.

- MITTELBACH, R., & GLATTER, O. (1998). Direct Structure Analysis of Small-Angle Scattering Data from Polydisperse Colloidal Particles. *Journal of Applied Crystallography*. <https://doi.org/10.1107/S0021889898002209>
- NOGUEIRA, P. F. M., NAKABAYASHI, D., & ZUCOLOTTO, V. (2015). The effects of graphene oxide on green algae *Raphidocelis subcapitata*. *Aquatic Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.001>
- OLIVEIRA, D. G., TOYAMA, M. H., NOVELLO, J. C., BERIAM, L. O. S., & MARANGONI, S. (2002). Structural and functional characterization of basic PLA 2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Journal of Protein Chemistry*. <https://doi.org/10.1023/A:1015320616206>
- ORTHABER, D., BERGMANN, A., & GLATTER, O. (2000). SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard. *Journal of Applied Crystallography*. <https://doi.org/10.1107/S0021889899015216>
- PABST, G., KOSCHUCH, R., POZO-NAVAS, B., RAPPOLT, M., LOHNER, K., & LAGGNER, P. (2003). Structural analysis of weakly ordered membrane stacks. *Journal of Applied Crystallography*. <https://doi.org/10.1107/s0021889803017527>
- RADVANYI, F., SALIOU, B., LEMBEZAT, M. -P, & BON, C. (1989). Binding of Crotoxin, a Presynaptic Phospholipase A₂Neurotoxin, to Negatively Charged Phospholipid Vesicles. *Journal of Neurochemistry*, 53(4), 1252–1260. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb07422.x>
- SAMPAIO, S. C., HYSLOP, S., FONTES, M. R. M., PRADO-FRANCESCHI, J., ZAMBELLI, V. O., MAGRO, A. J., ... CURY, Y. (2010). Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. *Toxicon*, 55(6), 1045–1060. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.011>
- SILVA, C. A., AANDERSON, S. J., & GUILHERME, L. R. G. (2014). Uso da cromatografia de exclusão por tamanho na caracterização de substâncias húmicas de Latossolo Vermelho-Escuro sob efeito da calagem. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832000000300003>
- SVERGUN, I. (1992). Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography*. <https://doi.org/10.1107/S0021889892001663>

- TARASOV, K., HOUSSEIN, D., DESTARAC, M., MARCOTTE, N., GÉRARDIN, C., & TICHIT, D. (2013). Stable aqueous colloids of ZnS quantum dots prepared using double hydrophilic block copolymers. *New Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/c2nj40738h>
- WANG, H., SHEN, J., WANG, B., YU, B., & XU, Y. (2010). Laser diode feedback interferometry in flowing Brownian motion system: A novel theory. *Applied Physics B: Lasers and Optics*. <https://doi.org/10.1007/s00340-010-4041-7>
- WEBER, R., & SCHWEIGER, G. (1998). Photon correlation spectroscopy on flowing polydisperse fluid-particle systems: theory. *Applied Optics*. <https://doi.org/10.1364/ao.37.004039>
- WEI, Y., LING, X., ZOU, L., LAI, D., LU, H., & XU, Y. (2015). A facile approach toward preparation of sulfonated multi-walled carbon nanotubes and their dispersibility in various solvents. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.07.005>
- XU, C., CAI, X., ZHANG, J., & LIU, L. (2015). Fast nanoparticle sizing by image dynamic light scattering. *Particuology*. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2014.04.014>
- XU, Y., SETO, T., TANG, P., & FIRESTONS, L. (2000). NMR study of volatile anesthetic binding to nicotinic acetylcholine receptors. *Biophysical Journal*, 78(2), 746–751. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76632-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76632-X)