



Instituto de
Biociências



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS 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 Siuiti 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 indicated 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 aquosa ¹ e em vesículas extrusadas de DMPC ² (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 aquosa ¹ e em vesículas extrusadas de DMPG ² (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 neurotóxica, miotóxica e coagulante, 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 neurotóxica, miotóxica e coagulante. 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 neurotóxico e miotóxico (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.

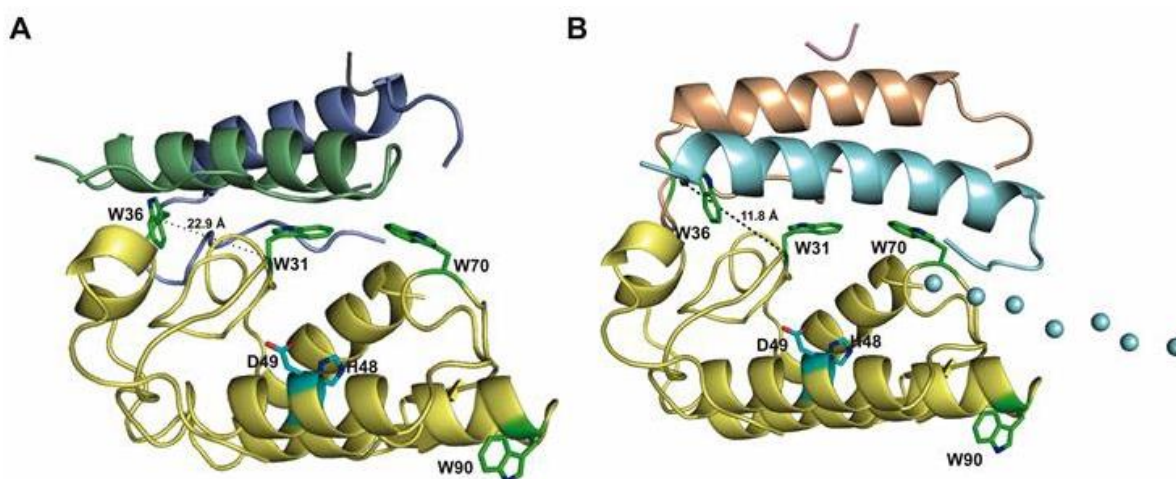


Figura 1: Estrutura da crotoxina (CTX), com distinção de suas subunidades (CA e CB): A) Estrutura obtida por difração de raios X; B) Estrutura obtida por SAXS; Em A, é possível identificar CB em amarelo, a cadeia alfa de CA em verde e a cadeia beta de CA em azul escuro; Em B, é possível identificar CB 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 Ca^{2+} (LOMEO et al., 2014), interação direta na membrana ou via receptores e ainda através da clivagem dos fosfolipídios (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).

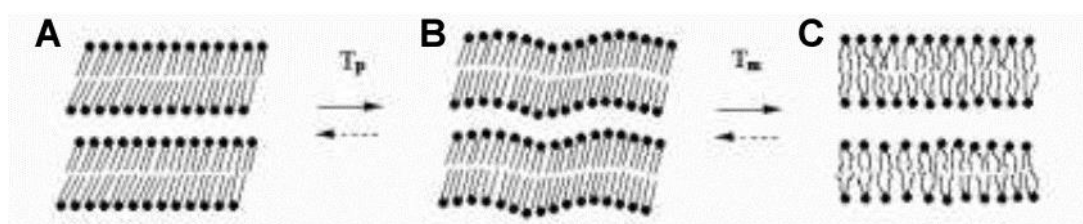


Figura 2: Grau de organização dos lipídios nas vesículas, dependente da temperatura; A) temos a fase gel (geralmente a temperaturas por volta dos 20 °C); B) transição entre a fase gel e a cristalina; C) temos a fase cristalina (geralmente em temperaturas acima de 25°C) (A. & K., 2013).

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.

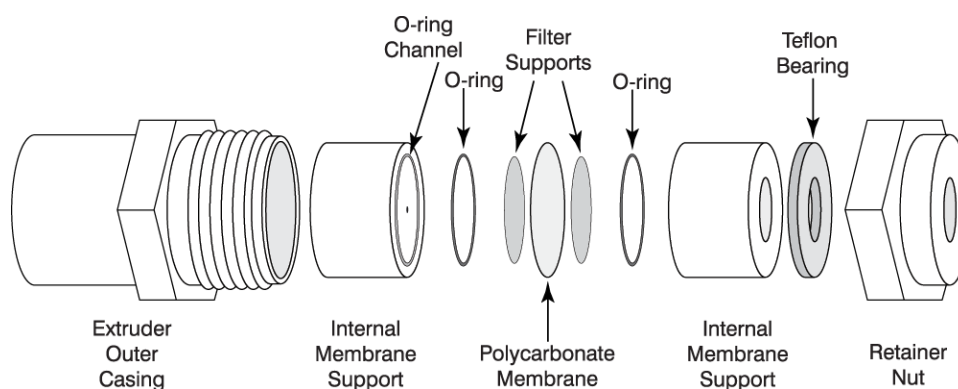


Figura 3: Representação esquemática de um extrusor, constituído por dois filtros e uma membrana de polycarbonato, com poros com diâmetros de 100 nm. *Avanti Mini Extruder* <<https://avantilipids.com/divisions/equipment-products>> 15 de setembro de 2019.

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 (soma 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 selecionados lipídios com o marcador 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.

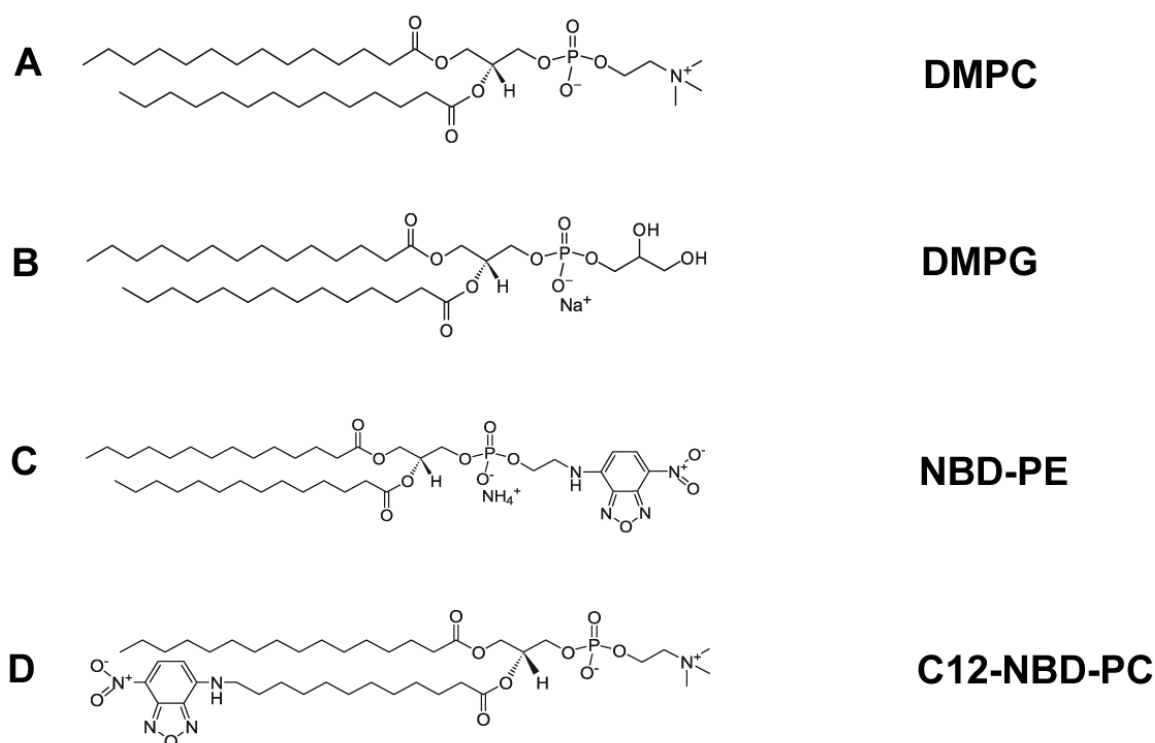


Figura 4: Estrutura química dos fosfolipídios usados nas membranas modelo e dos marcadores fluorescentes utilizados em experimentos de espectroscopia de fluorescência: A) DMPC; B) DMPG; C) NBD-PE e D) C12-NBD-PC. (Avanti Polar Lipids, inc).

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.

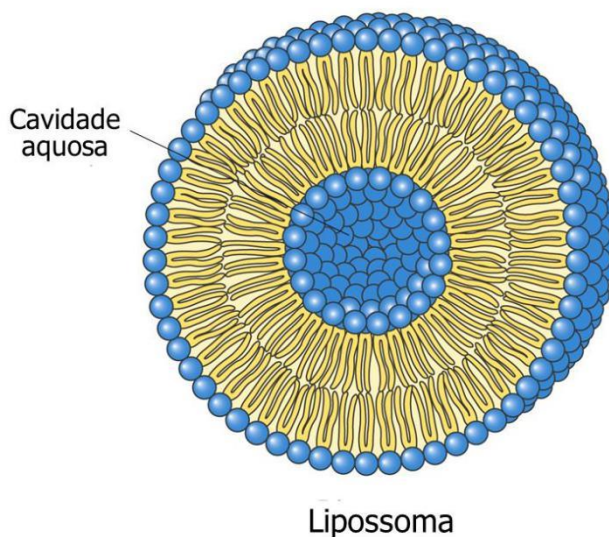


Figura 5: Representação estrutural da bicamada lipídica resultado do processo de extrusão.
Fonte: <<https://slideplayer.com.br/slide/384440/>> 15 de setembro de 2019.

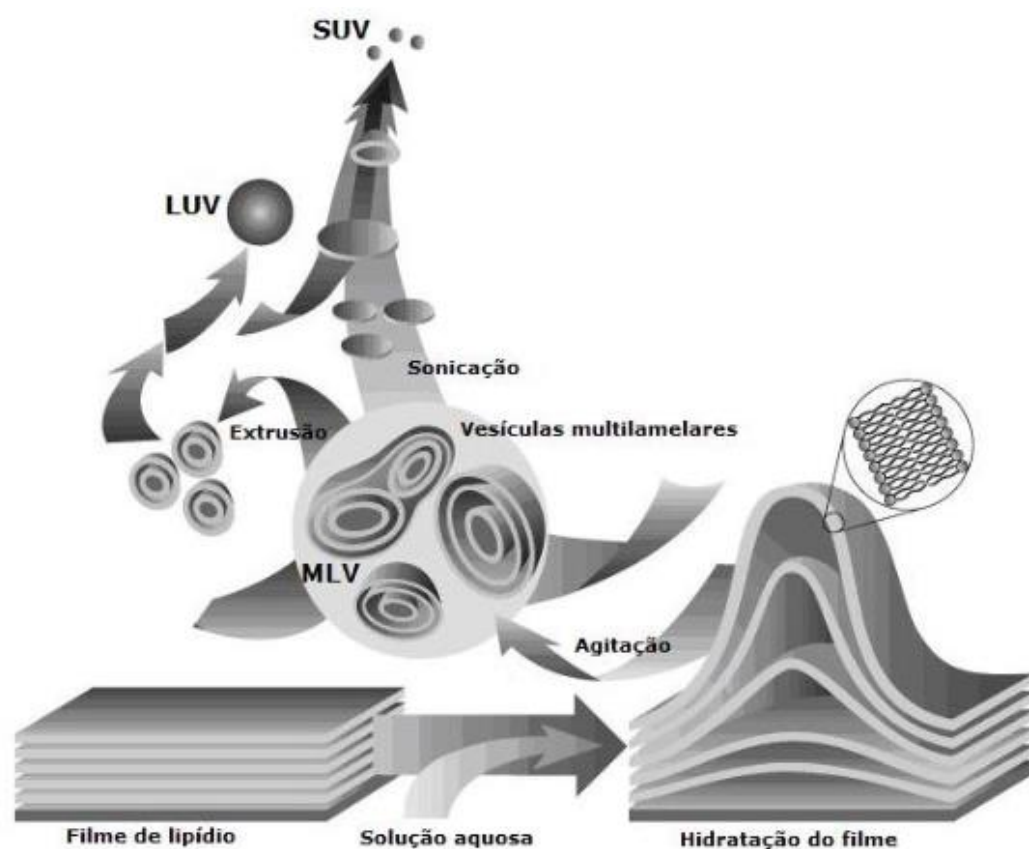


Figura 6: Representação dos processos empregados para a formação de LUV (Large Unilamellar Vesicles) e SUV (Small Unilamellar Vesicles). Fonte: <http://avantilipids.com/indes.php?optin=com_content&view=article&id=1384&itemid=372> 15 de setembro de 2019.

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, & ZUCOLOTTO, 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 apenas 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 inomogeneidade 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 (MITTELBACH & GLATTER, 1998).

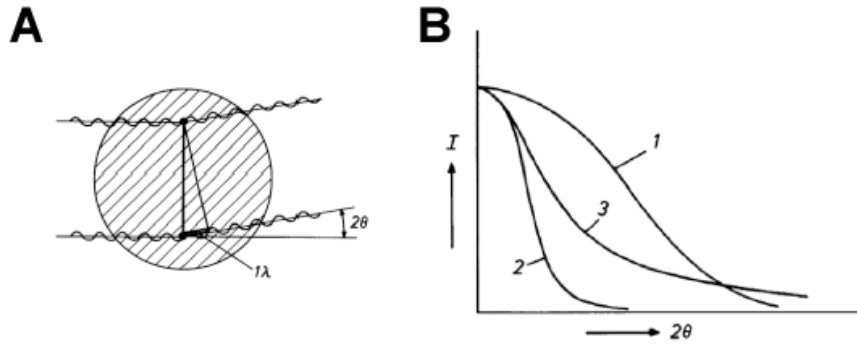


Figura 7: A) Representação esquemática de um objeto espalhador, sobre o qual está representado duas radiações incidentes que são espalhadas a um ângulo de 2θ ; B) Esboço de 3 curvas de espalhamento (GLATTER, 1977).

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 inomogeneidade podem ser

tratadas como se fossem partículas com densidade eletrônica uniforme (MITTELBACH & 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 continua, 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 dever 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.

OBJETIVOS

2. Objetivos

O presente trabalho tem como finalidade estudar a interação das proteínas CA, CB e CTX com membranas modelo DMPG e DMPC, para avaliação do comportamento destas proteínas sobre membranas modelo e compreender o seu mecanismo de ação.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1 Purificação da crotoxina e suas subunidades

A crotoxina (CTX) foi purificada a partir do veneno bruto através da técnica de cromatografia líquida de exclusão molecular, já relatadas anteriormente (HERNANDEZ-OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA, TOYAMA, NOVELLO, BERIAM, & MARANGONI, 2002). A purificação da CTX ocorreu a partir do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus*, utilizando cromatografia de exclusão molecular em um sistema HPLC (ÄKTA Purifier 10 system, GE Healthcare) e uma coluna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare). Para a realização deste procedimento, foram utilizados 15 a 20 mg de veneno bruto dissolvidos em 500 µL de Bicarbonato de Amônio (0,05 M, pH 8,0). Após a dissolução, a solução foi centrifugada a uma força de 9700 xg por um período de 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi coletado e aplicado em uma coluna cromatográfica pré-equilibrada com Bicarbonato de Amônio (1 M, pH 8,0). A eluição foi realizada a um fluxo de 0,5 mL/min e o monitoramento foi realizado por absorbância a 280 nm. As frações foram coletadas, liofilizadas e armazenadas à 4 °C.

As subunidades da CTX (CA e CB) foram isoladas a partir das amostras de CTX obtidas anteriormente, através da técnica de cromatografia líquida de fase reversa em um sistema HPLC (Shimadzu Modular HPLC Prominence) com uma coluna C18 (Sephasil Peptide 4.65m/250, Pharmacia Biotech). Para a realização deste procedimento, foram utilizados 4 mg de CTX dissolvidos em 620 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 %. Em seguida, essa solução foi aplicada em uma coluna pré-equilibrada com o solvente A (TFA à 0,1 %) e as proteínas foram eluídas através de um gradiente linear de 0-100 % de solvente B (0,1 % de TFA e 66,6 % de acetonitrila). As amostras foram coletadas, liofilizadas e armazenadas à 4 °C.

Posteriormente, as amostras foram diluídas em tampão HEPES (10 mM, pH 7.4) e dialisadas para o mesmo tampão, para eliminar qualquer vestígio das substâncias utilizados nos procedimentos cromatográficos anteriores. Para a diálise de CTX e CB, foram utilizadas membranas de diálise com poros de 9 kDa. A diálise foi realizada durante um período de 48 horas, e o tampão renovado após 24 horas. Para a CA, foi necessário a utilizar tubos Vivaspín (GE Healthcare) com poros de 3 kDa. Nesse processo, a proteína foi diluída em 20

ml em tampão HEPES (10 mM, pH 7.4) e centrifugada à 10000 xg por 15 min. Em seguida, a amostra foi ressuspenida e centrifugada por 15 min novamente, sendo este processo repetido até o volume reduzir para 500 µL. Depois, foram acrescentados 5ml do tampão HEPES (10 mM, pH 7.4) e novamente se realizou etapas de centrifugação conforme descrito acima até a redução do volume a 500 µL; quando mais 5 ml de tampão foram acrescentados e o processo repetido até se atingir finalmente um volume de cerca de 100 µL para ser utilizado nos estudos posteriores. Para se verificar a integridade estrutural da crotoxina e suas subunidades, foram realizadas medidas de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em um espectropolarímetro J-815 (Jasco Inc.). Nessas medidas, as proteínas foram dissolvidas em água com a finalidade de melhorar a qualidade de sinal obtido no equipamento de CD e a concentração proteica utilizada foi de 0,3 mg/ml.

3.2. Membranas modelo

Para analisar a interação da CTX e suas subunidades CA e CB com membranas lipídicas foram utilizadas membranas modelo unilamelares de DMPC e DMPG (1 mM), foram preparadas incorporando a sonda fluorescente de NBD-PE (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)) e a sonda fluorescente C12-NBD-PC (1-palmitoyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine), com o fluoróforo localizado na porção polar do fosfolipídio, a uma concentração de 50 µM (correspondendo a 0,5 Mol% da concentração de lipídios). As análises em diferentes meios lipídicos foram realizadas com a finalidade de analisar as diferenças causadas pela carga negativa presente nas membranas das células nervosas.

O processo para a obtenção destas membranas foi baseado em estudos anteriores (FERNANDEZ & LAMY-FREUND, 2000; FERNANDEZ, RISKE, AMARAL, ITRI, & LAMY, 2008). Os lipídeos foram comprados da *Avanti Polar Lipids*, Inc. 0,678 e 0,688 mg de, respectivamente, DMPC e DMPG foram diluídos em clorofórmio. Em seguida, foi utilizada uma concentração de 0,5% do total de lipídeo. A concentração final do lipídeo foi de 1 mM. As sondas fluorescentes foram utilizadas apenas nas amostras do experimento de espectroscopia de fluorescência estática. Em seguida, o clorofórmio foi evaporado utilizando um fluxo contínuo de nitrogênio gasoso ultrapuro, e um filme lipídico foi depositado no tubo

de ensaio. A fim de se garantir que não haja nenhum resíduo de clorofórmio, as amostras foram submetidas à vácuo por 90 min. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de tampão 10 mM HEPES pH 7,4 e o frasco foi agitado até que todo o filme formado no fundo do recipiente fosse dissolvido, produzindo assim as membranas. Depois, iniciou-se o processo de extrusão, utilizando o *Avanti Mini Extruder* (*Avanti Polar Lipids*, Inc). A amostra foi submetida a um processo de filtração, utilizando um filtro com poro de 1 μm . O procedimento consiste em passar as amostras pelo extrusor em número ímpar de vezes para que as mesmas fossem coletadas em tamanhos semelhantes (monodispersas). Finalmente, as amostras foram separadas em 5 tubos de ensaio distintos, com volumes de 400 μL ; contendo i) apenas as vesículas; ii) vesículas + 1 μM de CTX; iii) vesículas + 1 μM de CA; iv) vesículas + 1 μM de CB.

3.3. Espalhamento de Luz Dinâmico

Esta técnica foi utilizada para determinar o diâmetro médio das vesículas, uma vez que a polidispersividade das amostras contendo membranas modelo é relativamente alta. Após realizar o processo de extrusão, os lipossomos foram diluídos em HEPES (10 mM, pH 7,4) e as medidas de DLS foram realizadas a uma temperatura de 25 °C. Os dados foram coletados 100 vezes. Para as amostras, são esperados valores de raio hidrodinâmico de 100 nm, uma vez que este é o diâmetro dos filtros e das membranas utilizados no processo de extrusão. As medidas foram adquiridas em um equipamento DynaPro Titan da Wyatt Technology Corporation com o software Dynamics V6.10.1.2.

3.4. Espectroscopia de Fluorescência

Experimentos de espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo foram realizados observando-se tanto os marcadores extrínsecos, incorporados na porção polar do lipossomo (NBD-PE) e com o marcador incorporado no meio da bicamada lipídica (C12-NBD-PC), quanto o fluoróforo intrínseco das proteínas estudadas (resíduos de Trp). Medidas de fluorescência estática foram obtidas usando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1

cm e excitando-se o NBD em 470 nm, usando fendas (*slits*) de excitação e emissão de 5 nm. A emissão do NBD foi coletada no intervalo de 480 nm a 650 nm. O procedimento realizado entre as temperaturas de 16 a 45 °C. A escolha dessas temperaturas está relacionada com a temperatura de transição de fase dos lipídios utilizados nesta pesquisa, onde pode ser observado o comportamento das membranas de acordo com o nível organizacional da matriz lipídica. Os dados foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro Hitachi F-7000.

Medidas de fluorescência resolvida no tempo dos resíduos de triptofano (Trp) presentes nas proteínas interagindo em vesículas de DMPC e DMPG foram realizadas. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 290 nm. Um decaimento exponencial foi observado. Para o caso do Trp, é sabido que seu decaimento pode ser ajustado por uma função tri-exponencial, dado pela equação 5. A fonte de excitação usada foi um laser de Ti:Sa (Tsunami 3950 + Millennia X Spectra Physics), produzindo um pulso (FWHM) de 5 ps, e com uma taxa de repetição de pulso de 8,0 MHz (3980 Spectra Physics pulse picker). O comprimento de onda do laser foi selecionado usando um gerador de terceiro harmônico (LBO crystal, GWN-23PL Spectra Physics) para produzir um pulso de excitação de 290 nm direcionado para um espectômetro L-format Edinburgh FL900, com um monocromador no canal de emissão. Os fótons foram detectados por uma fotomultiplicadora resfriada Hamamatsu R3809U microchannel plate, produzindo uma função de resposta instrumental de ~100 ps. Estas medidas foram realizadas no laboratório de Fotobiofísica do prof. Dr. Amando Siuiti Ito, na Universidade de São Paulo (USP-Ribeirão Preto).

3.5. Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo

Os experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo foram realizados para as amostras de vesículas puras (DMPC e DMPG), sem a presença do marcador fluorescente e em seguida foram realizadas a adição das proteínas no sistema (CA, CB e CTX), a uma concentração de 10 µM e uma concentração de lipídios de 10 mM. As vesículas e as proteínas foram preparadas na mesma solução tampão de HEPES, 10 mM, pH 7,4. As medidas foram feitas à 18 °C e 36 °C para ambos os sistemas, porém, devido a formação de bolhas de ar não foi possível se analisar as amostras de DMPC à 36 °C. As medidas foram realizadas utilizando Bruker-NANOSTARTM, localizado no laboratório de cristalografia do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP). Esta câmera é equipada com um sistema de microfoco

Genix 3D (fonte + espelhos de foco) e duas fendas *slits* para reduzir o conjunto espalhado, colimando o feixe, fornecido pela Xenocs. O detector utilizado foi um Vantec-2000. As amostras foram posicionadas em capilares de quartzo colados com aço puro. As medidas foram baseadas no espalhamento provocado pelo tampão, utilizando o mesmo sistema de capilares. Os dados foram coletados por 3600 s e a análise foi feita pelo pacote SUPERSAXS (Oliveira & Pederson, não publicado). Os dados experimentais são mostrados como intensidade $I(q)$ versus o momento de transferência sendo λ o comprimento de onda da radiação e 2θ o ângulo de espalhamento. Após o tratamento, foram normalizados para escala absoluta usando água como padrão. O raio de giro (R_g) foi calculado por transformada de Fourier indireta (IFT) usando o pacote do Gnom (SVERGUN, 1992). Com isto, foi possível a construção dos gráficos de $I(q)$ [cm^{-1}] e $R[\text{\AA}]$. As primeiras medidas realizadas foram realizadas para as vesículas de DMPC (à 18 °C) e de DMPG (à 18 e 36 °C), com a finalidade fazer um modelo para compreender o comportamento das vesículas diante às proteínas.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Análises Cromatográficas

Após a realização da cromatografia de exclusão molecular, é possível verificar o pico correspondente a CTX (Figura 8A), baseado em estudos anteriores (FERNANDES et al., 2017). Em seguida, o pico de CTX foi liofilizado e posteriormente diluído em 0,1 % de TFA e submetido a cromatografia líquida de fase reversa afim de se separar as subunidades CA e CB. Estas proteínas apresentaram picos bem definidos após a etapa de fase reversa (Figura 8B). Em seguida, foram realizadas medidas de espectroscopia de dicroísmo circular (CD), onde é possível verificar a integridade estrutural da CTX e de suas subunidades isoladas CA e CB. As medidas de CD demonstram que não houve desnaturação das proteínas durante o processo de purificação, pois os mínimos das curvas estão nos comprimentos de onda 208 e 222 nm (Figura 8C), indicando estruturas proteicas ricas em hélices α .

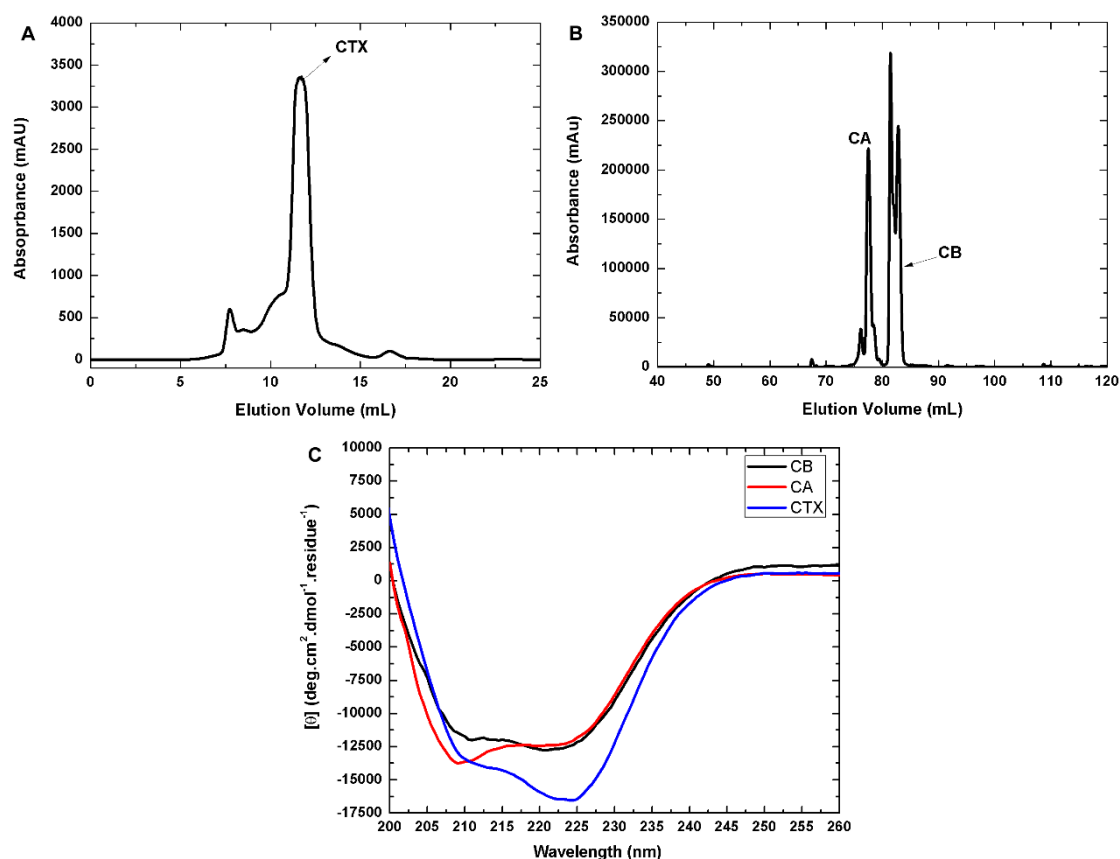


Figura 8: Purificação da crotoxina (CTX) e suas subunidades isoladas (CA e CB) a partir do veneno bruto das serpentes *Crotalus durissus terrificus*. (A) Cromatografia líquida de exclusão molecular; (B) Cromatografia líquida de fase reversa; (C) Espectros de dicroísmo circular da CTX (Azul), CA (Vermelho)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

4.2. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Ao se realizar o processo de extrusão para a produção de vesículas unilamelares, é necessário se verificar a integridade e o tamanho médio das membranas obtidas. Os resultados de espalhamento de luz dinâmico das vesículas de DMPC e DMPG são apresentados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Dados de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) das vesículas unilamelares de DMPC.

DMPC				
Item	Diam(nm)	Pd(nm)	MW-R(kDa)	%Mass
Peak 1	74,8	68,3	81533,6	100

Tabela 2: Dados de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) das vesículas unilamelares de DMPG.

DMPG				
Item	Diam(nm)	Pd(nm)	MW-R(kDa)	%Mass
Peak 1	91,2	27,5	25632,1	100

Desse modo é possível verificar que ambos os sistemas estão estáveis em valores de diâmetros inferiores ou próximos à 100 nm, o que é esperado devido ao sistema de filtros e membranas utilizados no processo de extrusão apresentarem esse diâmetro. Desse modo, as bicamadas lipídicas produzidas pelo método de extrusão são ideais para a realização dos experimentos propostos neste trabalho.

Um fato muito importante de se observar é o diâmetro médio das vesículas, uma vez que os lipídios de DMPG possuem carga negativa, eles se repelem, desse modo, possuem o diâmetro um pouco maior quando comparado com os lipossomos de DMPC.

4.3. Espectroscopia de Fluorescência Estática

Os sistemas lipídicos utilizados nestes experimentos foram incorporados com dois marcadores fluorescente distintos, sendo o NBD-PE e o C12-NBD-PC, totalizando quatro sistemas lipídicos: DMPC + NBD-PE; DMPG + NBD-PE; DMPC + C12-NBD-PC; DMPG + C12-NBD-PC. As proteínas CTX, CA e CB foram introduzidas aos sistemas lipídicos descritos. O grupo controle utilizado nesses experimentos continha apenas a bicamada lipídica com os marcadores fluorescentes, sem a presença das proteínas.

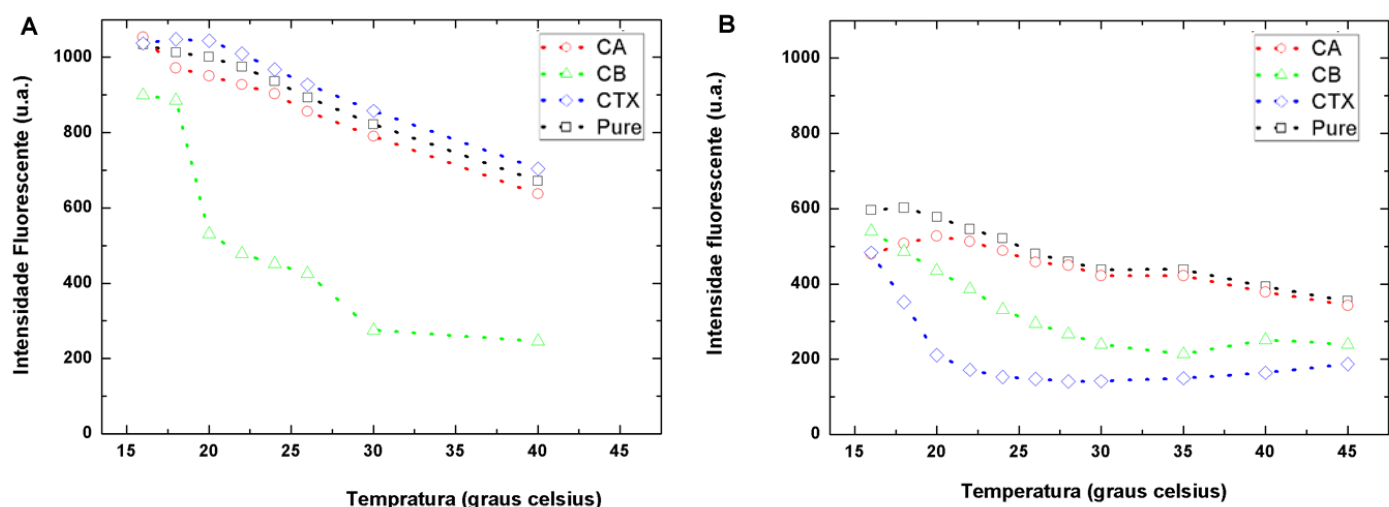


Figura 9: Dependência da intensidade de emissão fluorescente com a temperatura, utilizando-se o marcador NBD-PE incorporados as membranas de DMPC (A) e DMPG (B). Foram coletados dados das vesículas com e sem a presença das proteínas CTX, CA e CB. O fluoróforo foi excitado em 470 nm e a intensidade máxima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

Tratando-se das medidas realizadas com as vesículas de DMPC, com o marcador na porção polar do fosfolipídio (NBD-PE) (Figura 9A), é possível se verificar um decaimento da intensidade máxima fluorescente com o aumento de temperatura na amostra contendo apenas vesículas. Este fenômeno é devido ao aumento da mobilidade dos lipídios na membrana, o que influencia na área útil ocupada por lipídios, permitindo uma maior disponibilidade de moléculas de água próxima à sonda fluorescente. Desse modo, há o aumento da taxa de decaimento não-radiativo (k_{nr}) e, conseqüentemente, a redução do rendimento quântico do fenômeno fluorescente, como demonstrado pela equação 4.

Resultados semelhantes foram obtidos quando averiguamos CA nas amostras de DMPC com o marcador NBD-PE (Figura 9A). Aqui se observou também uma redução da intensidade fluorescente máxima com o aumento da temperatura, havendo um aumento na taxa de decaimento não-radiativo causado pela entrada de moléculas polares de água. Outro resultado que se destaca é a semelhança entre as curvas da amostra pura com a curva de CA, demonstrando que não houve interação desta proteína com as membranas de DMPC (Figura 10A).

Ao realizar o experimento de DMPC com o marcador NBD-PE na presença CTX (Figura 9A), é notável que sua curva de intensidade fluorescente se assemelhe as curvas de CA e da amostra pura, uma vez que ela contém uma fosfolipase A₂ (CB). Nas amostras

contendo CTX, é possível se observar apenas a redução da intensidade fluorescente devido ao aumento da quantidade de moléculas de água no meio apolar da bicamada lipídica, e não devido à quebra da cadeia carbônica *sn*-2 dos fosfolipídios. Ainda que interessante, esse resultado já era esperado, uma vez que pesquisas anteriores realizadas com fosfolipídios PC e CTX (RADVANYI, SALIOU, LEMBEZAT, & BON, 1989) demonstraram a ausência de interação entre esta proteína e as membranas PC.

Nas amostras de CB com lipídios de DMPC com o marcador NBD-PE (Figura 9A), foi possível verificar a interação desta proteína com as membranas lipídicas. Observamos uma forte redução da intensidade fluorescente causada pela lise dos fosfolipídios na cadeia *sn*-2. Esta redução abrupta do sinal ocorre devido a inserção do fluoróforo em meio aquoso, o que aumenta o número de decaimentos não radiativos, demonstrado pela equação 4. Assim é possível verificar a diferença entre a lise e apenas o aumento da quantidade de moléculas de água no meio da bicamada lipídica, sendo que na lise o decaimento da intensidade fluorescente máxima é mais acentuado do que no outro caso.

Nos experimentos realizados com vesículas de DMPG, na presença do marcador fluorescente localizado na porção polar do fosfolipídio (NBD-PE) (Figura 9B), foi possível notar diferenças com relação aos dados com DMPC. Cabe-se ressaltar que esses dados foram obtidos excitando a mesma sonda fluorescente extrínseca, portanto foi utilizado o mesmo comprimento de onda e intensidade fluorescente máxima. Comparando-se a intensidade máxima fluorescente das amostras contendo apenas as vesículas DMPG e DMPC, observa-se que a intensidade máxima fluorescente das amostras de vesículas de DMPG representa quase a metade do valor da intensidade fluorescente da amostra de DMPC. Este fenômeno é devido a carga negativa presente no DMPG já que esta carga provoca a repulsão entre os fosfolipídios constituintes da bicamada, de forma a aumentar a área útil ocupada por lipídio. Consequentemente, isto permite uma maior permissividade de moléculas de água no interior da membrana, e como demonstrado pela equação 4, haverá uma redução do decaimento radiativo (fluorescente). De modo semelhante às vesículas de DMPC, o aumento da temperatura resulta em aumento da área ocupada por lipídio, tendo como consequência um aumento na quantidade de moléculas de água no meio da membrana e a redução da intensidade máxima fluorescente, como apresentado na equação 4.

No sistema de DMPG-NBD-PE na presença da proteína CA (Figura 9B), é possível verificar uma redução na intensidade máxima fluorescente entre as temperaturas de 15 a 20

°C. Ao observarmos o comportamento da curva, é possível verificar que nas temperaturas acima de 20 °C, a curva se aproxima do comportamento da curva da amostra pura, indicando que não houve interação entre as proteínas e a vesícula de DMPG. O decaimento da intensidade fluorescente máxima está relacionado com a diminuição do número de decaimentos fluorescentes, descrito pela equação 4.

Ao adicionarmos a CTX no sistema lipídico contendo vesículas de DMPG-NBD-PE (Figura 9B), é possível identificar uma queda acentuada da intensidade máxima coletada em 533,4 nm. Esta observação é provavelmente devido a lise dos fosfolipídios na cadeia *sn*-2, na qual, como resultado da desestabilização da membrana, a sonda fluorescente é lançada em meio aquoso, e conseqüentemente, se reduz a quantidade de decaimentos fluorescentes.

Os experimentos com CB e DMPG na presença do marcador fluorescente NBD-PE (Figura 9B) mostraram a lise da membrana graças a redução acentuada da intensidade máxima fluorescente. Como observado anteriormente, com a lise da vesícula, os fosfolipídios são lançados no solvente, o que aumenta o número de decaimentos não-radiativos, sendo representado pela equação 4. O número de decaimento não-radiativo é inversamente proporcional ao número de decaimentos fluorescentes.

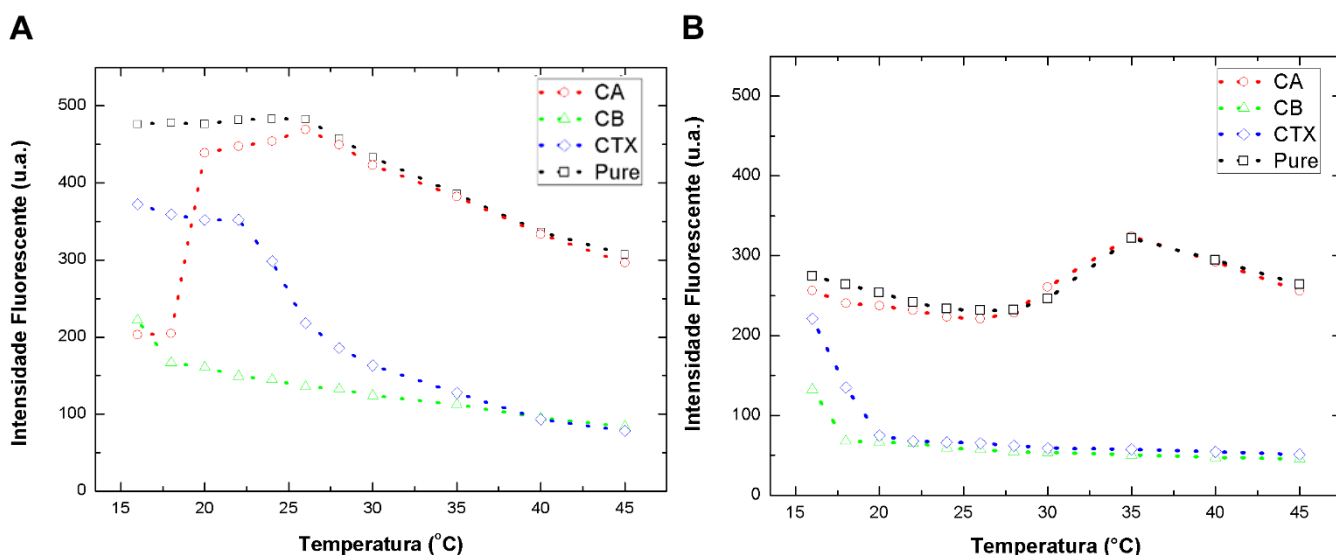


Figura 10: Dependência da intensidade de emissão fluorescente com a temperatura, utilizando-se o marcador C12-NBD-PC incorporados as membranas de DMPC (A) e DMPG (B). Foram coletados dados das vesículas com e sem a presença das proteínas CTX, CA e CB. O fluoróforo foi excitado em 470 nm e a intensidade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

Em relação ao marcador fluorescente C12-NBD-PC, nas vesículas de DMPC (Figura 10A) é possível observar o decaimento da intensidade máxima fluorescente com o aumento de temperatura na amostra contendo os lipídios. Este fenômeno é decorrente do aumento da mobilidade dos lipídios na membrana, o que influencia na área útil ocupada por lipídio. Isto provoca um aumento no decaimento não-radiativo (κ_{nr}), o que consequentemente reduz o rendimento quântico, como mostrado na equação 4. Ao se observar o comportamento da intensidade máxima fluorescente na amostra de DMPC-C12-NBD-PC na presença de CA (Figura 10A), é possível verificar em temperaturas entre 18 e 25 °C, uma redução da intensidade fluorescente, o que pode estar relacionado a uma possível interação da CA com o lipossomo. Mas, quando estudado o comportamento da amostra em temperaturas acima de 25 °C, é possível se verificar que o comportamento da curva se assemelha ao da amostra padrão, indicando que a estrutura do lipossomo constituído de DMPC está íntegra.

Após realizar o experimento com as vesículas de DMPC-C12-NBD-PC na presença de CTX (Figura 10A), é possível notar que há uma redução acentuada da intensidade máxima fluorescente, indicando que houve alterações estruturais do lipossomo, possivelmente causada pela quebra dos lipídios. Desse modo, como a CTX é uma fosfolipase A₂ (PLA₂), a quebra dos lipídios ocorreu pela cadeia *sn*-2. Com a quebra do lipídio ocorre a desestabilização da membrana, o que ejeta a sonda fluorescente em meio aquoso e consequentemente há uma redução da intensidade fluorescente (Γ). O mesmo resultado foi obtido nas amostras de DMPC-C12-NBD-PC na presença da proteína CB (Figura 10A). Do mesmo modo que CTX, nas amostras com CB observou-se uma redução acentuada da intensidade máxima fluorescente, decorrente da lise dos fosfolipídios, o que aumenta o número de decaimento não-radiativo (κ_{nr}), representado pela equação 5. Assim é possível verificar a diferença entre a lise e apenas o aumento da quantidade de moléculas de água no meio da bicamada lipídica, sendo que na lise o decaimento da intensidade fluorescente máxima é mais acentuado do que no outro caso.

Nos experimentos realizados com os lipossomos de DMPG, na presença do marcador fluorescente posicionado no interior da membrana lipídica, na região apolar (C12-NBD-PC) (Figura 10B), é possível destacar algumas diferenças com as amostras de DMPC, considerando que estamos excitando a mesma sonda fluorescente. É possível observar que a intensidade máxima fluorescente das amostras de DMPG representa cerca da metade da intensidade observadas com DMPC, este fenômeno está relacionado a carga negativa presente

no DMPG. Sendo causado pelo aumento de área útil ocupado por lipídio. O que aumenta a permissividade da membrana a moléculas de água no interior da membrana, e como consequência, como demonstrando pela equação 4, haverá uma redução da intensidade fluorescente máxima.

Nas amostras de CA com a vesícula de DMPG-C12-NBD-PC (Figura 10B), é possível verificar que a curva da intensidade máxima fluorescente se assemelha em diversos pontos a amostra pura, indicando que não houve interação entre as proteínas e os lipossomos. Portanto, a redução na intensidade máxima fluorescente é devida ao aumento da temperatura, e consequentemente, da permissividade da bicamada lipídica.

Quando observado o gráfico correspondente a adição da proteína CTX no sistema de DMPG-C12-NBD-PC (Figura 10B), é verificado um decaimento acentuado desde a temperatura de 15 °C. Isto é causado pela desestabilização estrutural do lipossomo, inserindo o marcador fluorescente em meio aquoso, aumentando assim o número de decaimento não-radiativos. Por fim, ao se verificar o comportamento das amostras de DMPG-C12-NBD-PC na presença da proteína CB (Figura 10B), nota-se uma redução acentuada a partir da temperatura de 15 °C, o que está relacionado com a lise das vesículas, que por sua vez, insere a sonda fluorescente em meio aquoso, reduzindo assim o número de decaimentos fluorescentes.

4.4. Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo

Este experimento foi realizado excitando um dos fluoróforos intrínsecos presente nas proteínas, o resíduo de triptofano. Após a realização dos experimentos, foi ajustado sobre as curvas de decaimento fluorescente obtidas uma função tri-exponencial, descrita pela equação 5, na qual é possível determinar os coeficientes pré-exponenciais e os tempos de vida da intensidade fluorescente (curto, médio e longo). Após definido esses valores, é possível o cálculo do tempo médio de vida, que indicam a natureza do meio no qual os Trp estão inseridos. Desse modo, os valores citados acima foram organizados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Tempos de vida e fatores pré-exponenciais dos resíduos de Trp presentes na crotoxina e suas subunidades (1 mM), em solução aquosa¹ e em vesículas extrusadas de DMPC² (1 mM), à 25 °C.

		τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	α_1	α_2	α_3	τ_{av} (ns)
CA	H ₂ O ¹	4,32±0,03	1,68±0,03	0,35±0,01	0,187	0,431	0,382	2,85
	DMPC ²	8,63±0,08	1,60±0,01	0,12±0,01	0,016	0,223	0,761	3,03
CB	H ₂ O ¹	4,96±0,03	1,65±0,02	0,24±0,01	0,187	0,309	0,504	3,51
	DMPC ²	9,20±0,07	2,01±0,02	0,38±0,01	0,035	0,261	0,704	3,70
CTX	H ₂ O ¹	4,06±0,04	1,22±0,02	0,16±0,03	0,060	0,215	0,725	2,13
	DMPC ²	9,28±0,09	1,44±0,01	0,10±0,01	0,012	0,156	0,832	3,26

¹ Os valores das proteínas em solução aquosa foram obtidos para uma concentração de 40 μ M diluídas em 20 mM Tris HCl pH 8,0 (ver dados do trabalho anterior) (FERNANDES et al., 2017).

² As vesículas foram preparadas em 10 mM Hepes pH 7,4.

Tabela 4 – Tempos de vida e fatores pré-exponenciais dos resíduos de Trp presentes na crotoxina e suas subunidades (1 μ M), em solução aquosa¹ e em vesículas extrusadas de DMPG² (1 mM), à 25 °C.

		τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	α_1	α_2	α_3	τ_{av} (ns)
CA	H ₂ O ¹	4,32±0,03	1,68±0,03	0,35±0,01	0,187	0,431	0,382	2,85
	DMPG ²	7,73±0,16	1,79±0,03	0,41±0,01	0,043	0,303	0,654	3,19
CB	H ₂ O ¹	4,96±0,03	1,65±0,02	0,19±0,01	0,187	0,309	0,504	3,51
	DMPG ²	5,55±0,06	2,00±0,04	0,42±0,02	0,114	0,292	0,593	3,26
CTX	H ₂ O ¹	4,06±0,04	1,22±0,02	0,16±0,03	0,060	0,215	0,725	2,13
	DMPG ²	5,70±0,06	1,86±0,03	0,29±0,01	0,129	0,340	0,531	3,56

¹ Os valores das proteínas em solução aquosa foram obtidos para uma concentração de 40 μ M diluídas em 20 mM Tris HCl pH 8,0 (ver dados do trabalho anterior) (FERNANDES et al., 2017).

² As vesículas foram preparadas em 10 mM Hepes pH 7,4.

A tabela 3, contendo o sistema lipídico de DMPC, apresenta os valores dos tempos de vida dos resíduos de Trp e fatores pré-exponenciais das amostras das proteínas CA, CB e CTX em um meio aquoso e em na presença das vesículas. Através do tempo médio de vida (τ_{av}), é possível identificar a inserção do Trp das proteínas na bicamada lipídica em todos os cenários. A presença de três tempos de vida é atribuída a diferentes rotâmeros do anel indol do Trp em torno da ligação C α -C β da cadeia lateral do anel da alanila. O tempo de vida longo (τ_1) é maior para todas as proteínas na presença das vesículas quando comparado com elas sozinhas, em solução. Esta diferença no τ_1 é ainda maior para CB e CTX. Isso deve decorrer da inserção dos resíduos de Trp destas proteínas na região hidrofóbica da bicamada lipídica. Para os tempos de vida intermediários (τ_2) e curtos (τ_3) também observamos um aumento destes nas amostras de CA, CB e CTX na presença das vesículas, indicando que todos os

rotâmeros dos resíduos de Trp reduziram o seu movimento devido a alterações no orbital do estado excitado em decorrência da presença da matriz lipídica.

Já na tabela 4 são apresentados os tempos de vida dos resíduos de Trp e fatores pré-exponenciais das proteínas estudadas na presença de vesículas de DMPG. A variação dos tempos de vida é semelhante aos experimentos com DMPC, já que os três tempos de vida da emissão fluorescente dos resíduos de Trp também aumentam quando comparados com seus respectivos valores em solução aquosa. A população dos rotâmeros associados aos tempos de vida intermediário (τ_2) e curto (τ_3) aumenta com a inserção das proteínas no DMPG. A população de rotâmeros trans, g- e g+, estão associados a participação das proteínas no meio lipídico. Neste caso, a participação do rotâmero trans e g+ com a dispersão de DMPG é mais favorável supostamente pela presença da carga negativa na superfície da vesícula.

4.5. Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS)

As medidas foram coletadas a 18 °C (fase gel) e a 36 °C (fase cristalina) para os sistemas lipídicos de DMPC e DMPG, contudo, devido a formação de bolhas de ar não foi possível analisar as amostras de DMPC à 36 °C. Estas medidas visam compreender e gerar mais dados sobre a interação das proteínas (CA, CB e CTX) com as vesículas e DMPC e DMPG. Após realizar o experimento, com os dados coletados, é possível se construir a curva experimental e através dela se obter a função de distribuição de distância normalizada.

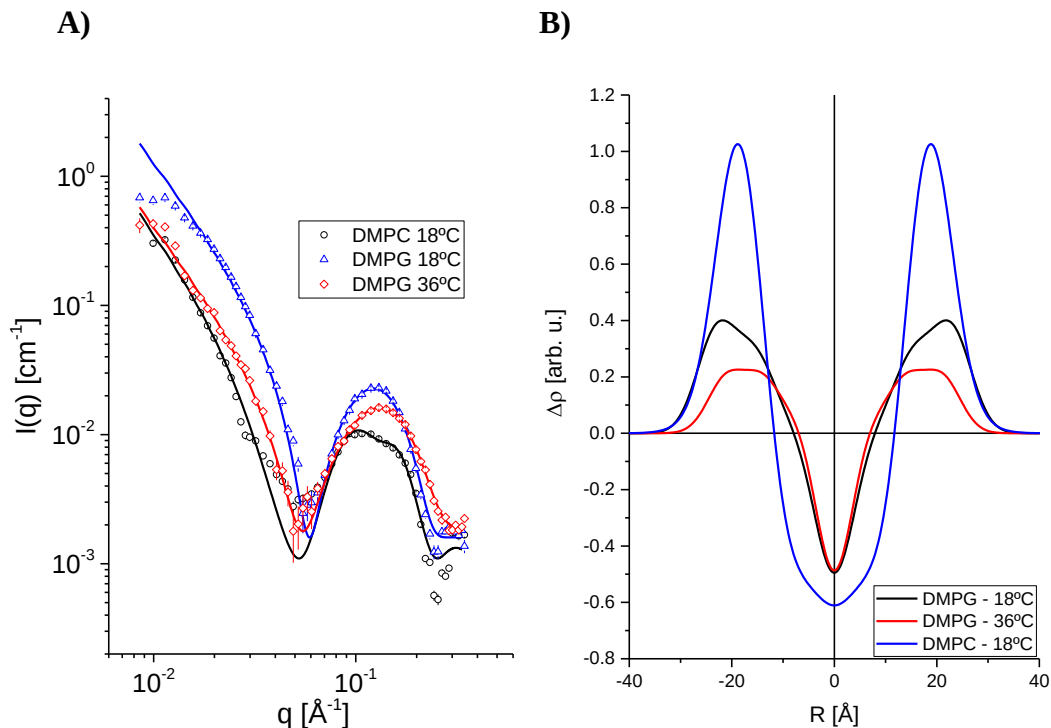


Figura 11: Curvas de espalhamento de raios X das vesículas de DMPC (à 18 °C) e de vesículas de DMPG (à 18 e 36 °C). (A) curva de espalhamento do DMPC (preto), DMPG em 18 °C (Azul) e 36 °C (vermelho). (B) Função de distribuição de distância normalizada para as amostras de DMPC (preto), DMPG em 18 °C (Azul)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

Na Figura 11, é possível se verificar o perfil das curvas de espalhamento e da função de distribuição de distâncias normalizada para as vesículas de DMPC a 18 °C e DMPG a 18 °C e 36 °C. Essas curvas foram utilizadas para a construção de um modelo matemático sobre o qual será possível verificar a ação das proteínas sobre os lipídios. Será realizado um ajuste sobre a forma da proteína, chamado de fator globular, representando a simples adição da proteína ao sistema. Caso após a adição deste fator globular (proteína) não for possível realizar-se o ajuste da curva apenas pelo fator de forma globular, significa que houve alteração na estrutura da bicamada lipídica (lise). De modo contrário, não é possível identificar a lise dos lipossomos devido a adição das proteínas.

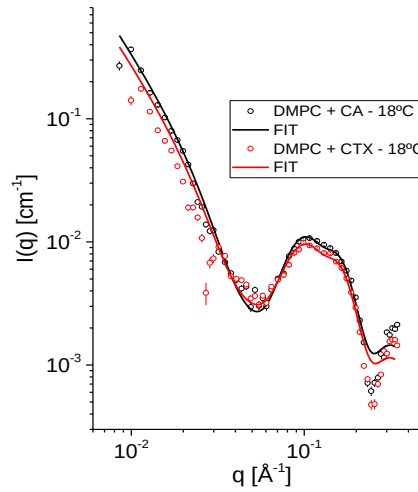


Figura 12: Curva de espalhamento de raios X a baixo ângulo de vesículas de DMPC na presença das proteínas de CA e CTX.

Na Figura 12, é possível se verificar a similaridade entre os sistemas de DMPC puro e com as proteínas CA e CTX. Os dados foram perfeitamente modelados mantendo como base os dados de DMPC pura, adicionando apenas um fator globular para descrever a presença da proteína. Neste sistema, para um melhor ajuste, foi adicionado um fator de multilamelas, o qual indica que as vesículas estão formando multilamelas. Como a simples adição do fator de forma globular na curva de SAXS de DMPC+CA/CTX resultou em uma curva ajustada a de DMPC isolado, conclui-se que não houveram interações das proteínas (CA e CTX) com estas membranas.

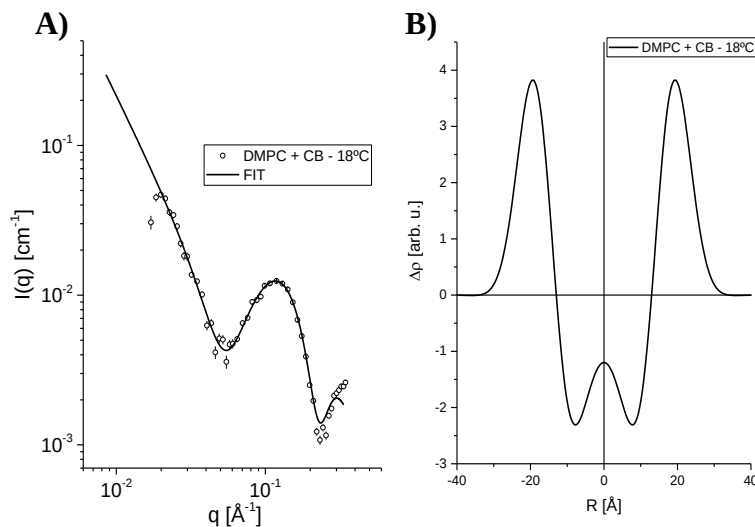


Figura 13: Gráfico de espalhamento de raios X a baixo ângulo de vesículas de DMPC, na presença da CB; (A) Curva de espalhamento de DMPC com CB; (B) Função de distribuição de distância normalizada para vesículas de DMPC na presença de CB.

A Figura 13 apresentam a curva de SAXS das vesículas de CB na presença de DMPC. Neste caso, a adição de um fator de forma globular na curva de SAXS de CB-DMPC não resultou em um ajuste sobre a curva de DMPC isolado, indicando que houve a lise da cadeia sn-2 dos fosfolipídios, comprometendo a estrutura das vesículas.

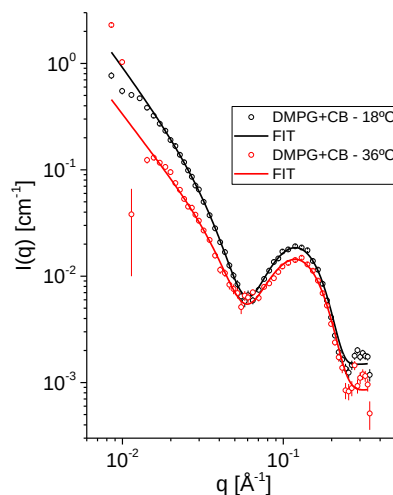


Figura 14: Curva experimental de SAXS de DMPG na presença de CB, medidas realizadas à 18 e 36 °C.

A Figura 14 apresenta a curva de SAXS do sistema de DMPG com a proteína CB. Neste caso, o ajuste é feito ao adicionar um fator de forma globular na curva de SAXS CB-DMPG, a qual se ajustou sobre a curva de SAXS de DMPG. O que indica que não houve interação da proteína com as membranas.

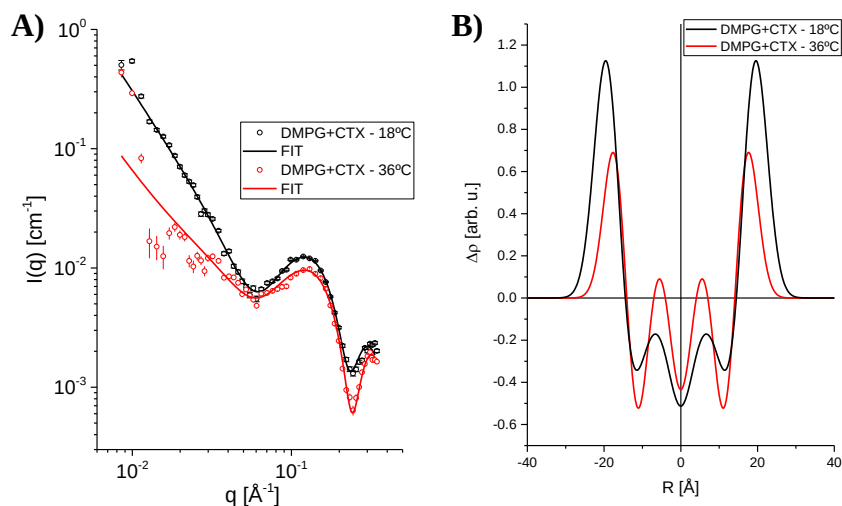


Figura 15: Gráficos de espalhamento de raios X a baixo ângulo de vesículas de DMPG na presença da CTX, realizados à 18 e 36 °C; (A) curva de espalhamento de DMPG com CTX; (B) Função de distribuição de distância normalizada para vesículas de DMPG com CTX.

Na Figura 15 temos as curvas de espalhamento e a de função de distribuição de distância normalizada no sistema de DMPG com a proteína CTX. Neste caso, ao adicionar um fator de forma globular, na curva de SAXS DMPG-CTX, não é possível o justar com a curva de SAXS da vesícula de DMPG, indicando que houve mudanças estruturais causadas pela CTX sobre os lipídios.

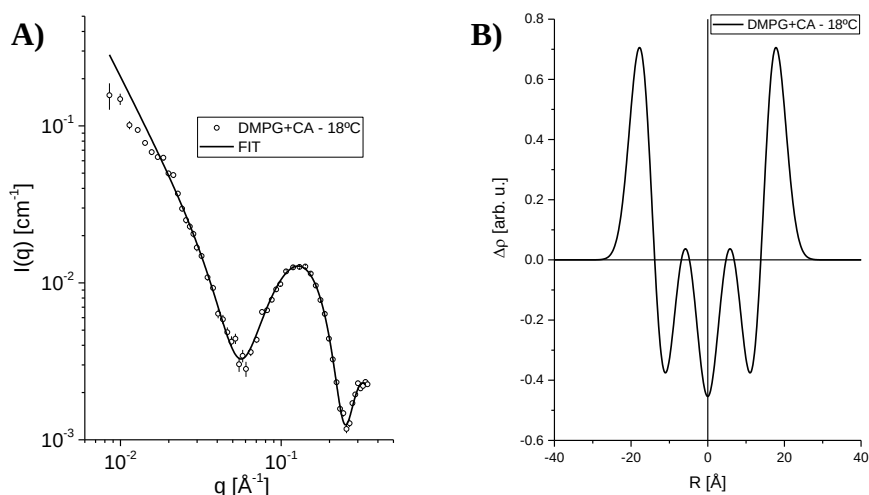


Figura 16: Gráfico de espalhamento de raios X a baixo ângulo de vesículas de DMPG, na presença da CA; (A) Curva de espalhamento de DMPG com CA; (B) Função de distribuição de distância normalizada para vesículas de DMPG na presença de CA.

Na Figura 16 temos representado o sistema de DMPC com a proteína CA. De modo semelhante ao caso anterior, não é possível ajustar um modelo simplesmente acrescentando um fator de forma globular, indicando que houve mudança estrutural das vesículas.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Ao realizamos o processo de purificação da crotoxina e suas subunidades CA e CB, este processo pode ser verificado pelos cromatogramas exibidos anteriormente (Figura 9A e B), onde temos picos bem característicos e definidos. Quando olhamos principalmente para a purificação da CTX é possível verificar que está possui maior absorbância a 280 nm do que outras proteínas presentes no veneno devido a sua alta concentração, cerca de 60% do peso do veneno bruto. Com a finalidade de verificar a integridade da estrutura secundária foi utilizado a técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (CD), que demonstrou, nas amostras de CA, CB e CTX, estruturas ricas em hélices α , é possível identificarmos estas estruturas no espectro de dicroísmo devido aos mínimos estarem entre 208 nm e 222 nm (Figura 8C). Estruturas resolvidas por cristalografia e por espalhamento de raios X a baixo ângulo revelam (FAURE et al., 2011; FERNANDES et al., 2017), em todas as proteínas aqui estudadas, estrutura secundária rica em hélices α (Figura 1). Além disso, é possível comparar os resultados obtidos dos cromatogramas com estudos que utilizaram a separação da CTX e de suas subunidades CA e CB (FERNANDES et al., 2017). Com estas medidas também é possível verificar que os processos utilizados na purificação destas não modificam suas estruturas secundárias. Após a realização desses processos é possível determinar que as proteínas estão íntegras e na concentração necessária para que os experimentos de interação com membranas sejam realizados.

O próximo passo consiste em verificar a integridade das membranas modelo utilizadas nesse estudo, após o processo de extrusão. Considerando que trabalhamos com basicamente dois sistemas lipídicos, em um deles tivemos a presença dos lipídios de DMPC com os marcadores fluorescente NBD-PE e C12-NBD-PC, e em outro, a presença dos lipídios DMPG com os marcadores NBD-PE e C12-NBD-PC, que ao longo do texto foram referidos apenas como sistemas de DMPC ou de DMPG. Após a realização das medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) obtivemos o parâmetro de diâmetro das vesículas de nossas amostras, como demonstrado nas tabelas 1 e 2, onde temos uma grande porcentagem de massa (cerca de 100% em ambas as amostras). A determinação do diâmetro médio das amostras de DMPC foi de 75 nm e de DMPG e de 91 nm. Dessa forma, é possível verificar que o diâmetro médio está dentro de esperado, uma vez que este valor deveria ser inferior a 100 nm, sendo este valor referente aos poros dos conjuntos filtro e membrana usados no processo de extrusão.

Observamos também que o diâmetro das vesículas de DMPC é menor do que as de DMPG, isso se deve a repulsão causada pelas cargas negativas contidas nos lipídios de DMPG. Experimentos anteriores demonstram a eficácia do processo de formação de LUV para o estudo de interação com proteínas (FERNANDEZ et al., 2008, 2005). Após analisar os fatores relativos as membranas modelo é possível determinar que as vesículas estão estáveis e ideias para realizar experimentos de interação com as proteínas CA, CB e CTX. Os primeiros experimentos de interação foram realizados utilizando as técnicas de espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo.

Após verificar as integridades estruturais das proteínas e dos lipossomos foram realizadas medidas de espectroscopia de fluorescência, onde é possível verificar a lise dos fosfolipídios. Iremos discutir os sistemas de DMPC com NBD-PE, no qual não é observado a interação das proteínas CTX e CA (Figura 9A). Como mencionado, houve estudos que relataram a não interação da CTX com membranas que não possuíam cargas, como o DMPC, levando a conclusão de que a interação ocorria apenas na presença de cargas. Contudo, não houve experimentos semelhantes que foram realizados apenas com a subunidade CA do heterodímero. Sobre o qual podemos observar a ausência de interação, do mesmo modo que a CTX. Ao observamos os resultados com CB é possível verificar a lise destes lipídios (DMPC).

Ao estudarmos os dados dos sistemas de DMPG (Figura 9B) é possível verificar que houve a lise das membranas, causada pela CTX e pela CB. Sendo possível identificar uma interação mais acentuada da CTX do que a lise desencadeada pela CB. Outro fato muito relevante é a identificação de uma possível interação da CA com as membranas, detectada apenas a baixas temperaturas. Esta interação da CA com a membrana não acarreta a lise desta. Mas um fato interessante é a presença desta possível interação, uma vez que isso nunca foi relatado pela ciência. Até os dias atuais acredita-se que está proteína serve apenas como um guia para a CB, levando-a direto para o sistema nervoso central, logo em seguida está se dissocia-se e permanece em suspensão no meio.

Os experimentos realizados com o marcador fluorescente no interior da bicamada lipídica (C12-NBD-PC), com o fosfolipídio de DMPC (Figura 10A), demonstraram ausência de interação com a proteína CA, mesmo que houve uma redução da intensidade máxima fluorescente entre as temperaturas de 15 a 20 °C, não é devido a lise dos lipídios. Esta redução da intensidade máxima fluorescente pode ser devido a uma ligação transitória entre a proteína

CA e os lipossomos. Ao observarmos o comportamento da curva de intensidade fluorescente com a adição da CB, é possível verificar uma redução acentuada do sinal, causada pela lise dos lipídios. Pelos dados com relação a interação da proteína CTX, é possível identificar uma redução acentuada no sinal fluorescente decorrente da quebra da cadeia carbônica *sn-2*. Neste caso, não era esperado que houvesse interação entre a CTX e as vesículas de DMCP, contudo acredita-se que esta possa ser provocada pela perturbação causada pelo marcador fluorescente.

Observando as medidas de espectroscopia de fluorescência estática realizadas com o marcador fluorescente na porção apolar da bicamada lipídica (C12-NBD-PC), com os fosfolipídios de DMPG (Figura 10B), podemos analisar o perfil das curvas referentes a amostras de DMPG pura e na presença das proteínas CA, CB e CTX. No caso em que há a adição da CA, é possível verificar que não houve interação desta com as membranas. Quando analisamos o gráfico referente a CB, é possível identificar uma redução acentuada na intensidade de emissão fluorescente máxima, decorrente da lise dos lipídios. O mesmo cenário é observado nas amostras que foram adicionadas as proteínas CTX, sendo que houve um aumento do número de decaimento não-radiativo, devido a inserção dos marcadores em meio aquoso.

Para complementar os dados obtidos através da técnica de espectroscopia de fluorescência estática foram realizados experimentos envolvendo a técnica de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, a qual determina o tempo de decaimento de um marcador fluorescente, nesse caso, o triptofano presente nas proteínas. Na tabela 3 é possível observar os valores referentes as proteínas e a vesícula de DMPC, sobre o qual é possível observar, que em todas as proteínas houve a redução da movimentação dos rotâmeros, devido a inserção dos triptofanos na bicamada lipídica. O aumento dos tempos de vidas está ligada a alterações que ocorreram no orbital atômico do estado excitado, geralmente estando ligado ao meio ao qual os Trp's estão inseridos, alterando o tempo em que o elétron permanece no estado excitado. Essa alteração é causada pela redução da mobilidade dos rotâmeros dos triptofanos. Nas amostras de DMPC, temos uma elevação dos tempos de vida, relacionada com a inserção dos Trp's em meio apolar. Neste experimento, não é possível determinar a lise das vesículas, mas sim a polaridade do meio sobre o qual os triptofanos estão inseridos (LAKOWICZ, 2006). Em DMPC, foi possível determinar a inserção dos Trp's das proteínas CA, CB e CTX em meio apolar. Esta mesma observação pode ser feita para as vesículas de

DMPG, tabela 4, onde a restrição da movimentação do rotâmeros é ainda maior, indicando que houve a inserção do triptofano das proteínas na bicamada lipídica. Os resultados descritos por esta técnica demonstram a interação entre o Trp da CA inserido na bicamada lipídica, que não são relatadas pela literatura, mas que possivelmente existem. Esta ligação entre a CA e as membranas de DMPC e DMPG possivelmente é uma ligação fraca ou transiente. Além disso, a CTX ao se aproximar da bicamada lipídica dissocia-se. Esta hipótese está vinculada as estruturas cristalográfica e resolvida por SAXS apresentadas em estudos anteriores (FAURE et al., 2011; FERNANDES et al., 2017), nas quais apresentam os Trp's na interface CA/CB. No decorrer desta pesquisa a presença das vesículas, de acordo com os dados apresentados, os Trp's se apresentam inseridos em meio apolar, ou seja, no interior da bicamada lipídica. O que reforça a hipótese de que há a dissociação da CTX, em CA e CB, quando está se aproxima da junção neuromuscular.

Os experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), realizado para os dois sistemas (DMPC e DMPG) trouxeram resultados dentro do esperado para o sistema de membranas de DMPC, já as membranas de DMPG trouxeram uma contradição com outros experimentos realizados neste trabalho, envolvendo a proteína CB. Nas vesículas de DMPC, houve apenas a interação, lise, pela proteína CB. Enquanto, para a CA e CTX não foram identificadas interações. Em se tratando dos sistemas de DMPG, é possível ver interação nos casos de CA e CTX, semelhantes ao cenário descrito pelos experimentos de espectroscopia de fluorescência. Contudo, não foi observado a interação da CB com as membranas de DMPG. A ausência de interação entre a CB e as vesículas de DMPG contraria os resultados obtidos através das técnicas de espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo. Contudo, estudos anteriores demonstraram que a CB em solução possui a tendência de oligomerização, sendo essa dependente da concentração (MARCHI-SALVADOR et al., 2008). Em se tratando os experimentos de SAXS realizados, foi utilizado uma concentração 10 vezes mais concentrada das proteínas CA, CB e CTX, quando comparada com as técnicas de espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo. Provavelmente, essa maior concentração faz com que a CB oligomerize, o que reduz sua atividade catalítica. Para perspectivas futuras, propomos experimentos de calorimetria por titulação isotérmica (ITC), o qual irá detectar variações conformacionais, para determinar a concentração sobre a qual a CB forme tetrâmeros, além de determinar a atividade fosfolipídica desta proteína na condição natural (monômero) e em condições de oligomerização (dímero e tetrâmero).

Durante o desenvolvimento desta pesquisa foram realizados experimentos de calorimetria por titulação isotérmica (ITC), que possivelmente determinaria se há uma ligação entre a CA e as membranas modelo, verificando se há diferenças entre a afinidade devido a presença de membranas isoteriônicas ou carregadas. Além de averiguar afinidade e a lise das membranas com as proteínas aqui estudadas. Porém, não foi possível obter dados processáveis, possivelmente devido à complexidade do sistema. Assim, esta técnica não foi incluída nesta dissertação, por ser inconclusiva.

Um quadro geral sobre a interação/lise provocada por cada proteína (CA, CB e CTX), na presença das membranas modelo constituída de DMPC (isoteriônica) ou DMPG (com carga), está representado na tabela 5. Esse quadro leva em consideração as técnicas biofísicas utilizadas neste estudo (espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo e espalhamento de raios X a baixo ângulo).

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).

	DMPC			DMPG		
	CA	CB	CTX	CA	CB	CTX
F.E. (NBD-PE)	Não houve lise	Houve lise	Não houve lise	Não houve lise	Houve lise	Houve lise
F.E. (C12-NBD-PC)	Não houve lise	Houve lise	Houve lise	Não houve lise	Houve lise	Houve lise
F.R.T.	Houve interação	Houve interação	Houve interação	Houve interação	Houve interação	Houve interação
SAXS	Não houve lise	Houve lise	Não houve lise	Não houve lise	Não houve lise	Houve lise

Os dados demonstram uma possível interação fraca ou transiente entre a CA e as membranas carregadas (DMPG), estando relacionada com o aumento da atividade farmacológica da CB. Desse modo, impedindo a lise das membranas de DMPC pela CTX, contudo há uma interação do heterodímero com essas membranas, destacando os Trp's inseridos na bicamada lipídica. Estudos realizados anteriormente demonstraram a ausência de lise entre as vesículas isoteriônicas, provocadas pela CTX (RADVANYI et al., 1989), demonstrando que a interação é dependente de carga. As estruturas resolvidas em estudos anteriores (FAURE et al., 2011; FERNANDES et al., 2017) trazem a informação de que 3 dos 4 triptofanos na interface CA/CB e apenas 1 exposto ao solvente. Os estudos realizados nesta

pesquisa, com a técnica de fluorescência resolvida no tempo indicam a inserção desses Trp's na bicamada lipídica relacionando com a dissociação do heterodímero de CTX ao se aproximar do lipossomo. Contudo, não é possível afirmar que a CA permanece ligada a membrana após a dissociação da CTX. A hipótese de que há a dissociação do heterodímero de CTX já foi proposta anteriormente por outros pesquisadores (DÉLOT & BON, 1993), os dados apresentados aqui complementam esse cenário e reforçam a hipótese através de novas técnicas biofísicas. O cenário mais provável descrito pelos dados aqui apresentados é que ao se aproximar da membrana modelo, o heterodímero de CTX se dissocia, devido a presença de cargas nas membranas modelo (DMPG), em seguida CA se liga fracamente ao lipossomo e CB desempenha sua função de fosfolipase A₂. Mas para que haja essa dissociação do heterodímero, é necessário a presença de cargas negativas nas membranas. Já foi relatado a necessidade de cargas para que houvesse a lise dos lipídios provocada pela CTX em estudos anteriores (RADVANYI et al., 1989).

A hipótese proposta a partir dos dados apresentados por esse estudo relaciona a função da CA como uma carreadora, levando a CB diretamente para o seu alvo, a junção neuromuscular, onde as suas subunidades se dissociam devido à presença de cargas no lipossomo, sendo incerto se há ou não uma interação fraca ou transiente entre a CA e as membranas lipídica. Após o heterodímero de CTX se aproximar da junção neuromuscular, este se dissocia devido ao estímulo da carga presente nessa região. Em seguida, CA permanece ligada fracamente ou de modo transiente na membrana enquanto CB desempenha sua função de fosfolipase, lisando as membranas celulares na cadeia carbônica *sn*-2. Não é possível afirmar com exatidão a maneira que CB interage com a membrana celular, mas sabe-se que os triptofanos possuem um importante papel, pois encontram-se inseridos na bicamada lipídica.

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>
- LÚCIOO, 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)