

João Ricardo Araújo dos Santos

**Estudo das Variações Conformacionais do
Complexo Crotoxina e suas Subunidades
por Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo**





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP.

JOÃO RICARDO ARAÚJO DOS SANTOS

**ESTUDO DAS VARIAÇÕES CONFORMACIONAIS DO
COMPLEXO CROTOXINA E SUAS SUBUNIDADES POR
ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXO ÂNGULO.**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Departamento de Física do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista "Julio de
Mesquita Filho" - UNESP



851/99

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RAMON BELTRAN ÁBREGO

**São José do Rio Preto
1998**



A meus pais

Braga e Maria José



Agradecimentos

Ao professor Doutor José Ramon Beltran Ábrego pela orientação, confiança e estímulo.

Ao professor Doutor Johnny Rizzieri Olivieri pela valiosa colaboração nas discussões, idéias e ensinamentos sobre trabalho em conjunto.

Ao professor Doutor Elói da Silva Feitosa pelo apoio, amizade e sugestões durante a realização deste trabalho.

A todo corpo docente do Departamento de Física pelos ensinamentos transmitidos e uso de seus laboratórios.

A colega Dulcinéa Perez Brognaro pelo apoio, compreensão e ensinamentos transmitidos durante a realização de parte deste trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação pelo companherismo ao longo destes anos: Adriana, Alexandre (Mac), Alexandre Guerzoni, Alexandre Teso, André, Benatti, Bernadete, Cecília, Dulcinéia, Fábio, Fátima, Fernanda, Flávio, Giovanni, Gláucia, Jenifer, Leandra, Milton, Murilo, Norma, Ocimar, Osmar, Raquel, Renato, Sandra, Selma e Uderlei.

Meu muito obrigado mais uma vez, aos amigos André, Alexandre Teso, Fábio, Fernanda, Leandra, Murilo pela amizade, cumplicidade e ajuda.

Aos companheiros de SAXS, Giovanni, Jenifer e Weber pela amizade, compreensão e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários Ilva, Paulo Salinas, Antonio Barbosa, Aparecida Mansur, Toninha e D. Zezé pela assessoria necessária à realização deste trabalho.

Ao professor Doutor José Roberto Giglio, do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP pelo fornecimento das amostras de crotoxina e sugestões a este trabalho..

A amiga Cláudia dos Santos meu muito obrigado pela amizade, carinho, cumplicidade e compreensão durante a realização de grande parte deste trabalho.

As minhas irmãs Lana e Marla, pelo amor, compreensão, incentivo e dedicação durante todo tempo.

A FAPESP por financiar este trabalho.



RESUMO

A crotoxina é uma proteína heterodimérica isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus*. As duas subunidades do composto são a fosfolipase A₂ (básica) e a crotapotina (ácida). A subunidade ácida é capaz de intensificar a ação biológica da outra subunidade por um mecanismo ainda pouco conhecido, mas que tem, às vezes, sido chamado de efeito chaperone.

Mediante a técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo, utilizando uma fonte geradora constituída de um ânodo rotatório, estudamos o complexo crotoxina em solução em diferentes pHs. Os resultados mostraram variações conformacionais das subunidades no equilíbrio de associação do complexo de acordo com a variação do pH.

A partir curvas SAXS foram desenvolvidos modelos teóricos para a macromolécula e suas subunidades, sendo a fosfolipase A₂ um elipsóide prolato de semi-eixos $a=b=16.0 \text{ \AA}$ (semi-eixo menor) e $c=22.0 \text{ \AA}$ (semi-eixo maior) e a crotapotina um elipsóide oblato $a=b=9.0 \text{ \AA}$ (semi-eixo menor) e $c=20.0 \text{ \AA}$ (semi-eixo maior). Nos respectivos pHs, os modelos puderam ser observados com riqueza de detalhes em projeções bidimensionais. Análises das curvas de espalhamento corrigidas e das funções distribuição de distância obtidas nos diferentes pHs mostraram

coerência com resultados encontrados na literatura, o que nos dá uma sólida base de sustentação para os modelos teóricos propostos.



ABSTRACT

Crotoxin is a dimeric protein isolated from the venom of "*Crotalus durissus terrificus*". The two subunits of the complex are a phospholipase A₂ (basic) and a crotapotin (acid). The acid subunit is capable of increase the biological action of the phospholipase A₂ by a poorly understood mechanism, but it sometimes shows a "chaperone effect".

From the SAXS technique, and using a rotatory anode generator, we studied the crotoxin complex in solution at different pHs. The results showed conformational changes of the subunit in the association equilibrium of the complex with the variation of pH.

From SXAS curves theoretical models were developed for the macromolecules and its subunits, being the phospholipase A₂ a prolate ellipsoid with semi-axis of $a=b=16.0\text{ \AA}$ (minor semi-axis) and $c=22.0\text{ \AA}$ (major semi-axis) and the crotapotin an oblate ellipsoid $a=b=9.0\text{ \AA}$ (minor semi-axis) and $c=20.0\text{ \AA}$ (major semi-axis). The model could be observed in each pH. Analysis of the corrects scattering curves and of distance distribution functions obtained at different pHs showed agreement with previous results, which gave us a solid base to support the proposed models.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1- INTRODUÇÃO	01
2- A TEORIA DE SAXS	15
2.1 - Introdução	15
2.2 - Espalhamento de raio X	16
3- MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1- A técnica de saxs	21
3.1.1 - Calibração do sistema de detecção	24
3.1.2 - Levantamento do perfil comprimento e largura	26
3.2 - Obtenção e purificação da crotoxina	28
3.3 - Eletroforese	28
3.4- Preparação da amostra	29
3.5- Obtenção das curvas de espalhamento	30
3.6- Construção de modelos teóricos de macromoléculas	31
4- RESULTADOS	36
4.1- O modelo teórico para o complexo crotoxina	36
4.2 - Eletroforese	40



4.3 - Normalização das curvas experimentais	41
4.3.1 - Extrapolação à diluição infinita	43
4.3.2 - Curvas de espalhamento corrigidas	44
5- DIFICULDADES ENCONTRADAS	62
6- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	63
7 - CONCLUSÃO	65
8-BIBLIOGRAFIA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-Serpente da família Crotalidae, subfamília Crotalinae, gênero *Crotalus durissus* (Amaral, 1977). 01

Figura 2- Especificidade das fosfolipases (Stryer, 1988). 06

Figura 3 - Dímero da miotoxina II homóloga da fosfolipase A₂ do veneno da serpente *Bothrops asper*. 07

Figura 4 - Representação das fitas das classes I,II e III de fosfolipases do tipo A2 (Arni e Ward, 1996). 08

Figura 5- “hipótese chaperone” para o mecanismo de ação sinérgica entre as subunidades da crotoxina. A= crotoxina A (crotaopina) ; B= crotoxina B (fosfolipase) ; SR= receptor específico ; NR= Receptor não específico; de acordo com Chiu e Jeng (1980).

12

Figura 6 - Esquema de uma partícula fixa e um feixe de raios X incidindo segundo um vetor h_0 e um feixe espalhado h_1 . 16

Figura 7- Curva típica de espalhamento de raios X para um feixe corrigido, mostrando a região de Guinier e a região de Porod. 19

Figura 8 - Desenho esquemático do sistema de colimação Kratky: Fonte: fonte de Raios X, B1, B2 , B3 : blocos com superfície polida, D: distância da amostra ao D.S.P., D.S.P. : detector sensível à posição, bs: "beam-stop", 2θ : ângulo de espalhamento, A: amostra. 23

Figura 9 - Gráfico da linearidade do detector. 25

Figura 10 - Gráfico do perfil comprimento $\omega(t)$ 27

Figura 11- Gráfico referente ao perfil largura $H(x)$. 28

Figura 12 -Gráfico referente à projeção no plano zy do modelo linear e sua respectiva $P(r)$. 34

Figura 13- Modelos tridimensionais de monômeros nas formas paralelo, T , L e linear. 35

Figura 14 - Gráfico utilizado para determinar os valores de v do oblato e do prolato referentes à crotapotina. 37

Figura 15 - Gráfico utilizado para determinar os valores de v do oblato e do prolato referentes à fosfolipase A_2 . 38

Figura 16 - Gráfico referente ao modelo teórico da crotoxina formado por heterodímero. 39

Figura 17- Eletroforese não desnaturante apresentando marcador (M), crotoxina do veneno da *Crotalus durissus terrificus* (Ct) e miotoxina I homóloga à fosfolipase A_2 do veneno da *Bothrops moojeni*. 40

Figura 18 - Gráfico de Guinier ($\log I(h) \times h^2$) da crotoxina para o pH=5.5. 42

Figura 19 - Curvas de espalhamento da crotoxina normalizadas pelas suas respectivas concentrações. 43

Figura 20 - Curvas de espalhamento corrigidas teórica e experimental para o complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 8.5 e 5.5. 45

Figura 21 - Curvas de espalhamento corrigidas teórica e experimental para o complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 3.0 e 2.0. 46

Figura 22 - Gráfico $\ln I(h) \cdot xh$ ($\text{\AA}^{-1}$) da comparação das curvas de espalhamento teórica e experimental referente ao complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* em pH 8.5 e 5.5 . 47

Figura 23 - Gráfico $\ln I(h) \cdot xh$ ($\text{\AA}^{-1}$) da comparação das curvas de espalhamento teórica e experimental referente ao complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* em pH 3.0 e 2.0 . 48

Figura 24 - Comparação das funções de distribuição de distância teórica e experimental referente ao complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* em pH 8.5 e 5.5 . 49

Figura 25 - Comparação das funções de distribuição de distância teórica e experimental referente ao complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* em pH 3.0 e 2.0 . 50



Figura 26 - Modelo teórico da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 8.5 mostrando a projeção do plano zy, utilizando elementos finitos de raio 1 Å, através do programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980).

53

Figura 27 - Modelo teórico da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 5.5 mostrando a projeção do plano zy, utilizando elementos finitos de raio 1 Å, através do programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980).

54

Figura 28 - Modelo teórico da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 3.0 mostrando a projeção do plano zy, utilizando elementos finitos de raio 1 Å, através do programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980).

55

Figura 29 - Modelo teórico da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 2.0 mostrando a projeção do plano zy, utilizando elementos finitos de raio 1 Å, através do programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980).

56

Figura 30 - Modelo tridimensional da
crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 8.5.

58

Figura 31 - Modelo tridimensional da
crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 5.5 .

59

Figura 32 - Modelo tridimensional da
crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 3.0.

60

Figura 33 - Modelo tridimensional da
crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 2.0.

61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Tampões utilizados na preparação da solução proteica utilizando complexo crotoxina.

29

Tabela II - Resultados obtidos para os diferentes pHs referentes aos parâmetros raio de giro experimental (R_g) calculado considerando-se a função distribuição de distância $p(r)_{\text{exp}}$, raio de giro do modelo teórico (R_g^*) calculado considerando-se a função distribuição de distância $p(r)_{\text{teó}}$ e máxima dimensão do modelo teórico (D_{max}).

52

1- INTRODUÇÃO

De acordo com a classificação de alguns autores, as serpentes venenosas pertencem à Classe Reptilia, Ordem Squamata, Subordem Ophidia, podendo pertencer a cinco famílias: Elapidae, Hydrophiidae, Boignea, Viperidae (Hider *et al.*, 1991).

Nosso interesse está voltado para a a família Viperidae* (Fig.1) ou mais precisamente na subfamília Crotalinae, na qual se encontra incluída a cascavél sulamericana, *Crotalus durissus terrificus*, cuja peçonha possui enzimas como a hialuronidase, coagulase, fosfo e mono-diesterase, além da fosfolipase (Essex e Markowitz, 1930).

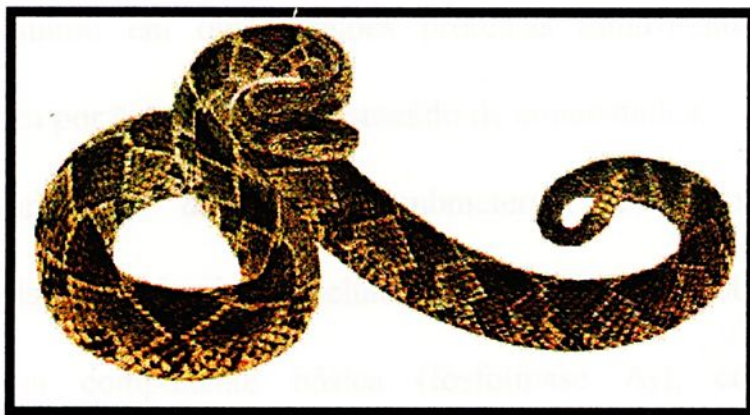


Figura 1 - Serpente da família Viperidae, subfamília Crotalinae, gênero *Crotalus durissus* (Amaral, 1977).

* O rápido reconhecimento dos representantes (gêneros, espécies e subespécies) desta Família repousa na presença de fosseta lacrimal, situada a cada lado do focinho, entre o olho e a narina. Essa fosseta, órgão térmico, só existe nesta família de serpentes, a qual possui hábitos exclusivamente noturnos.

A crotoxina é o componente mais tóxico do veneno da *Crotalus durissus terrificus* e representa cerca de 50% do veneno seco desta serpente. Isolada por Slotta e Fraenkel-Conrat (1938), a crotoxina foi, por longo tempo, considerada um protótipo de proteína homogênea (Gralén e Svedberg, 1938) e cristalizável, apresentando atividade neurotóxica e fosfolipásica. O ponto isoelétrico da proteína (pI 4,71) foi determinado pela análise do comportamento eletroforético (Li e Fraenkel-Conrat, 1942). Em 1956, Fraenkel-Conrat e Singer bloquearam os grupos-aminos livres da crotoxina com fluordinitrobenzeno e forneceram evidências de sua dissociação e não homogeneidade. A reação da crotoxina com o reagente resultou em duas frações protéicas dinitrofeniladas que se diferenciavam por solubilidade e conteúdo de aminoácidos.

Rübsamen *et al.* (1971), submeteram a crotoxina a uma cromatografia em carboximetil-celulose em meio ácido e obtiveram duas frações: uma componente básica (fosfolipase A₂), com atividade fosfolipásica e de baixa toxicidade e outra componente ácida (crotapotina), que não possui toxicidade ou atividade enzimática, mas que, na recombinação do complexo, intensificava a atividade tóxica e inibia a atividade fosfolipásica da fração básica.

Hendon e Fraenkel-Conrat (1971) também estudaram os papéis biológicos dos dois componentes da crotoxina utilizando cromatografia em



DEAE- celulose na presença de uréia 6 M e obtiveram pesos moleculares aproximados de 8.400 para a crotapotina e 13.000 para a fosfolipase A₂. A partir daí, a crotoxina foi considerada como sendo um complexo formado por forte associação de duas proteínas: a crotapotina e a fosfolipase A₂. Horst *et al.* (1972) também estudaram a atividade biológica das subunidades, determinando seus pontos isoelétricos a pI 3,7 para crotapotina e 8,6 para a fosfolipase A₂, e verificaram também a existência de uma ação sinérgica de ambas, a qual influenciava a neurotoxicidade do veneno, embora a atividade hemolítica fosse apresentada apenas pela fosfolipase A₂.

Breithaupt *et al.* (1974) submeteram a crotapotina a uma redução com β-mercaptoetanol seguida de carboxiamidometilação. Três frações foram isoladas por filtração em gel e cromatografia de troca iônica, demonstrando que a crotapotina é composta de três cadeias peptídicas ligadas por pontes dissulfeto: cadeia A, com 40 resíduos de aminoácidos (peso molecular = 4.300); cadeia B, com 34 resíduos de aminoácidos (peso molecular = 3.600) e cadeia C, com 14 resíduos de aminoácidos (peso molecular = 1.500). Eles também obtiveram outros valores de pontos isoelétricos para a crotapotina e fosfolipase A₂, sendo 3,4 e 9,7, além dos pesos moleculares de 8.900 e 15.800 respectivamente.



O complexo crotoxina possui ponto isoelétrico menor do que o da fosfolipase A_2 , possivelmente devido ao fato de os grupos carregados positivamente da fosfolipase A_2 serem neutralizados pela crotapotina por interação das subunidades. Dessa forma, há um aumento de peso molecular e uma diminuição da solubilidade (Horst *et al.* ,1972; Breithaupt *et al.*, 1974).

Vital Brazil *et al.* esclareceram dúvidas até então persistentes a respeito da farmacologia do complexo crotoxina, principalmente as que se referiam à toxicidade (Vital Brazil *et al.*, 1966a), ação neuromuscular (Vital Brazil, 1966), cardiovascular e respiratória (Vital Brazil *et al.* 1966b).

O primeiro estudo conformacional para resolver as estruturas terciária e quaternária envolvendo o complexo crotoxina e suas subunidades fosfolipase A_2 e crotapotina, sob condições fisiológicas, foi realizado por Paradies e Breithaupt (1975), utilizando várias técnicas, dentre estas a de espalhamento de raios X a baixos ângulos. Entre os dados obtidos estão as dimensões moleculares e a observação das formas elipsóide prolato para o complexo crotoxina, cilindro assimétrico para a fosfolipase e elipsóide oblato para a crotapotina; observaram também uma variação na concentração de equilíbrio entre monômeros, dímeros e tetrâmeros da fosfolipase A_2 , de acordo com o pH, dados que divergem

dos observados posteriormente por Abrego *et al.* (1993) e Mascarenhas *et al.* (1992).

A ação pós-sináptica da crotoxina em membranas ricas em receptores de acetilcolina foi demonstrada por Bon *et al.* (1979), não estando, ainda, esclarecido se a crotoxina atua na junção neuromuscular do animal através de um bloqueio da liberação de acetilcolina ou por um efeito sobre a resposta pós-sináptica. Nesse trabalho, os autores sugerem que ambos os efeitos possam ocorrer, contribuindo para a toxicidade da crotoxina em diferentes graus.

Embora seja necessário uma dose maior de proteína, a ação farmacológica da crotoxina ocorre principalmente devido à sua componente básica, a fosfolipase A₂, que reproduz basicamente todos os efeitos farmacodinâmicos do complexo (Rübsamen *et al.*, 1971). Por fosfolipase entende-se uma classe de enzimas que hidrolisam especificamente fosfolipídios. As fosfolipases estão presentes em diversos processos celulares, incluindo o metabolismo e a digestão de fosfolipídios e, em especial, as PLAs de peçonhas têm ação hemolítica e neurotóxica. São conhecidos quatro tipos de fosfolipases que se distiguem pelo sítio específico de ação, fosfolipases A₁, A₂, C e D (Hanahan, 1971), cujas ligações hidrolisadas são mostrados na Fig.2.



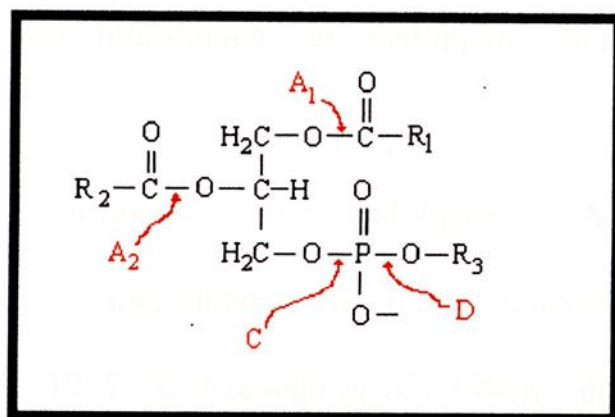


Figura 2 - Especificidade das fosfolipases (Stryer, 1988).

Muitas das fosfolipases existentes tiveram suas estruturas terciárias resolvidas por cristalografia de raios X, e seus dados encontram-se disponíveis no “Protein Data Bank”, incluindo-se, aqui, as PLAs de pâncreas de mamíferos (Dijkstra *et al.*, 1981 e 1983), que são as mais conhecidas e utilizadas em estudos comparativos com as fosfolipases presentes em venenos.

Diccionini *et al.*, (1990) estudaram duas isoformas de fosfolipase A₂ do pâncreas de porco, e sugeriram que a região do N-terminal liga-se à heparina como consequência da presença de alguns resíduos carregados positivamente. Os resíduos do N-terminal desempenham uma importante função nas fosfolipases A₂, visto que contribuem para formação do canal hidrofóbico (Dijkstra *et al.*, 1981), o qual tem a função de facilitar a

entrada da cadeia hidrofóbica do fosfolípídeo no sítio catalítico (Dennis,1994).

Algumas estruturas de fosfolipases A_2 determinadas cristalograficamente apresentam-se na forma dimérica (Brunie *et al.*, 1985; Arni *et al.*, 1995; de Azevedo *et al.*, 1997a ; de Azevedo *et al.*, 1997b). Na (Fig.3) vemos um dímero da miotoxina II homóloga da fosfolipase A_2 do veneno de *Bothrops asper*, em que as regiões da asa- β e do N-terminal seriam as responsáveis pelo contato entre as subunidades. Desta forma, os resíduos do sítio catalítico ficariam expostos ao solvente (Arni *et al.*, 1995).

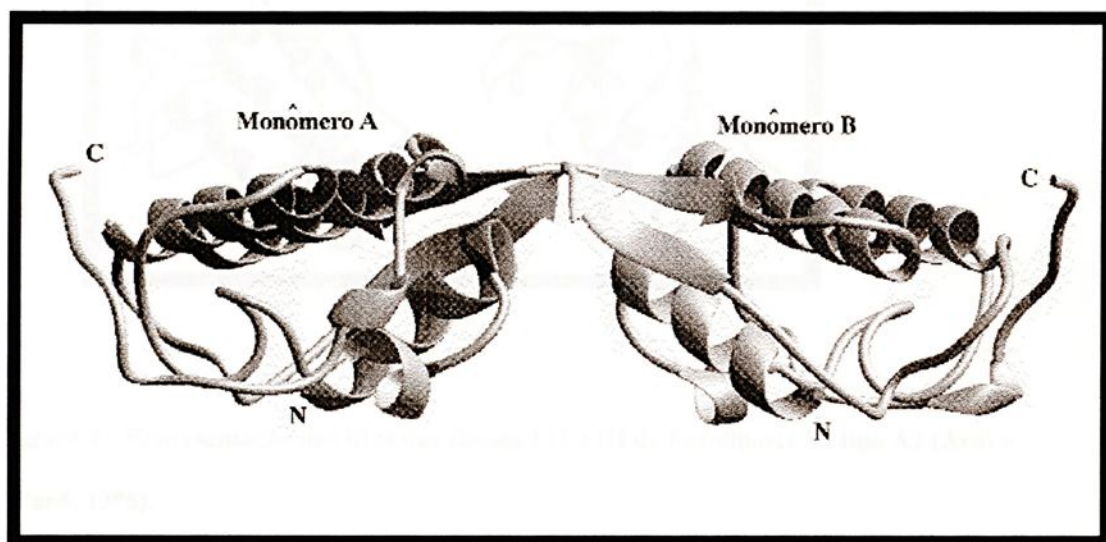


Figura 3 - Dímero da miotoxina II homóloga da fosfolipase A_2 do veneno da serpente *Bothrops asper*.

A grande maioria, se não todas as PLAs de veneno são do tipo A_2 de fosfolipases (PLA₂s). As fosfolipases A_2 foram subdivididas nas classes I, II e III (Fig.4) tomando-se como base sua sequência de aminoácidos e as ligações dissulfeto (Renetseder et al., 1985).

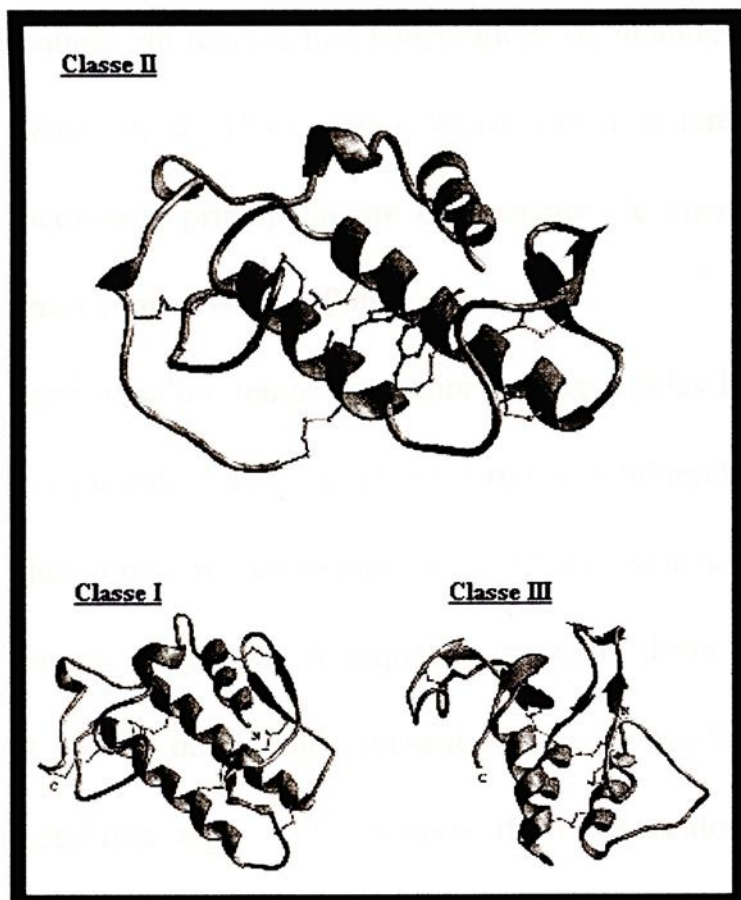


Figura 4 - Representação das fitas das classes I,II e III de fosfolipases do tipo A₂ (Arni e Ward, 1996).

A classe I de enzimas foi isolada a partir do veneno de serpentes das famílias *Elapidae* e *Hydrophidae* e em tecido do pâncreas de mamíferos, enquanto a classe II está presente em serpentes venenosas das famílias *Crotalidae* e *Viperidae*. Recentemente, esta classe de proteínas tem se apresentado em tecidos não pancreáticos de mamíferos. (Johansen et al., 1992; Kudo et al., 1993; Arni e Ward, 1996). A terceira classe de enzimas é encontrada principalmente em venenos de lagartos e abelhas (*Apis mellifera*) (Arni e Ward, 1996).

Em nosso trabalho, temos um maior interesse pelas fosfolipases A₂ classe II, visto que esta é a classe à qual pertence a subunidade tóxica que compõe o heterodímero crotoxina presente no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. A sequência primária desta fosfolipase foi resolvida por Aird et al., (1986) apresentando-se composta de uma única cadeia polipeptídica com 122 resíduos de aminoácidos e 7 pontes dissulfeto, com, aproximadamente, 14 KDa de massa molecular, além de baixa toxicidade e atividade fosfolipásica.

Já a ação da crotapotina, de proteger a fosfolipase A₂ da inativação por ligação a sítios de baixa afinidade, liberando-a para ligação a receptores de alta afinidade, pode ser interpretada como um fenômeno farmacocinético.



Vários estudos farmacológicos foram feitos na tentativa de investigar as interações ocorridas na formação do complexo e a capacidade de ligação a membranas, tanto por parte do complexo como de suas subunidades separadas (Jeng e Frankel-Conrat, 1976; Jeng *et al.*, 1978).

Bon *et al.*, (1979) demonstraram que a crotapotina não se liga a membranas ricas em receptores quando incubada sozinha, enquanto que a fosfolipase A₂ liga-se tanto sozinha quanto aplicada com a crotapotina. Além disso, verificaram que a crotapotina, associada à fosfolipase A₂, evita que esta se ligue a sítios não-específicos de baixa afinidade, mas não a sítios de alta afinidade presentes na membrana rica em receptores.

Análises dos resultados obtidos até então sobre as interações fosfolipase-crotapotina levaram à proposição de que a crotapotina funciona como um “transportador” da fosfolipase A₂ para sítos específicos presentes na membrana; a esse modelo deu-se o nome de efeito “chaperone” (Fig. 5) (Jeng *et al.*, 1978; Bon *et al.*, 1979; Chiu e Jeng, 1980). De acordo com esse modelo, a crotoxina “in vivo” existiria como um complexo e ocorreria uma potencialização da toxicidade da fosfolipase A₂ pela crotapotina. Esse processo daria-se da seguinte forma: as subunidades que compõem o complexo crotoxina sofreriam modificações conformacionais para facilitar a interação e a ligação



específica entre a fosfolipase A_2 e o sítio de ligação receptor; enquanto isso, a crotapotina é dissociada do complexo. Caso o complexo se ligue a um sítio não específico, a afinidade entre as duas subunidades que formam o complexo crotoxina pode ser maior do que entre a fosfolipase A_2 e o sítio de ligação. Dessa forma, a crotapotina agiria como uma “molécula guia” da fosfolipase A_2 , levando esta a sítios específicos na membrana pré ou pós-sináptica, aumentando a especificidade da ação e, conseqüentemente, potencializando a sua toxicidade. Após cumprir sua “função”, a crotapotina é então liberada e o complexo desfeito.

Análises seqüenciais dos aminoácidos apresentados por Aird et al., 1985, mostraram haver homologia entre a crotapotina e as três regiões distintas da fosfolipase A_2 , sugerindo uma evolução a partir de clivagens pós-translacionais da cadeia polipeptídica da fosfolipase A_2 . Foi detectada também homologia entre os cDNAs das duas proteínas (Bouchier et al., 1988, 1991).



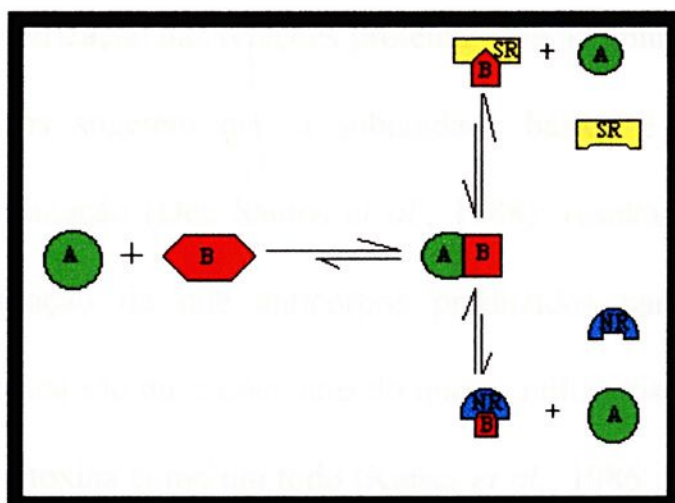


Figura 5- "hipótese chaperone" para o mecanismo de ação sinérgica entre as subunidades da crotoxina. A= crotoxina A (crotapotina) ; B= crotoxina B (fosfolipase) ; SR= receptor específico ; NR= Receptor não específico; de acordo com Chiu e Jeng (1980).

Este modelo foi testado por Hendon & Tu, (1979) ligando as subunidades do complexo crotoxina covalentemente entre si pela reação com dimetil-suberimidato e formação de di-imidoésteres. Os resultados mostraram que a crotoxina modificada realmente perdia sua neurotoxicidade, não alterando porém, a atividade enzimática da fosfolipase A₂. A perda da neurotoxicidade da crotoxina modificada ocorreria devido à não ligação desta a sítios específicos (Chang *et al.*, 1977).

Muitos estudos continuaram sendo feitos no mundo inteiro buscando obter maiores informações sobre o complexo crotoxina e suas subunidades fosfolipase A₂ e crotapotina, tanto a nível conformacional

como na caracterização das relações proteína-sistema imunológico. Alguns destes trabalhos sugerem que a subunidade básica é uma candidata potencial à vacinação (Dos Santos *et al.*, 1988); resultados consistentes com a observação de que anticorpos produzidos para neutralizar a subunidade básica são mais eficientes do que os utilizados para neutralizar o complexo crotoxina como um todo (Kaiser *et al.*, 1986 ; Choumet *et al.*, 1989).

Todos estes trabalhos encontram uma barreira muito grande, a questão das isoformas e, a menos que esteja indicado, basicamente, todos os trabalhos usam a crotoxina como uma mistura de isoformas. A subunidade básica (fosfolipase A₂) e a subunidade ácida (crotapotina), possuem várias isoformas na natureza, o que já seria fato suficiente para explicar a existência de várias isoformas de crotoxina. Essa situação tornou-se ainda mais complicada quando Faure e Bon (1987) mostraram que um mesmo indivíduo de *Crotalus durissus terrificus* poderia apresentar aproximadamente 15 tipos de isoformas para o complexo crotoxina e vários isogenes para codificá-las.

As variações observadas levaram à descrição de duas classes de crotoxina: a primeira classe consiste de um complexo com atividade principalmente tóxica e com uma menor atividade enzimática enquanto que na segunda classe ocorre justamente o inverso.



Observações sobre o processo de recombinação de isoformas, das subunidades ácida (crotopotina) e básica (fosfolipase A_2), mostraram a ocorrência de variações na toxicidade e na atividade enzimática dos complexos formados apenas quando feita a substituição da fosfolipase A_2 (Faure et Bon, 1988). Mais tarde, estes dados foram confirmados (Faure *et al.*, 1993) em um experimento no qual foram recombinaados 4 isoformas de crotopotina e 4 isoformas de fosfolipase A_2 , totalizando 16 isoformas para o complexo crotoxina, as quais puderam ser subdivididas nas duas classes farmacologicamente distintas, citadas anteriormente. Neste trabalho mostrou-se que a classe 1 (mais tóxica) apresentou uma menor constante de dissociação entre as subunidades ácida (crotopotina) e a subunidade básica (fosfolipase A_2), enquanto o inverso ocorreu para a classe 2 (menos tóxica). Estes resultados sugerem que alguns dos aminoácidos, os quais diferem entre as isoformas de fosfolipase A_2 das duas classes, possam estar localizados na zona de interação das subunidades crotopotina e fosfolipase A_2 , sendo responsáveis por essas variações nas atividades tóxico-enzimáticas do complexo crotoxina. (Faure *et al.*, 1993).

Neste trabalho analisaremos o complexo crotoxina em diferentes pHs, visando observar possíveis variações conformacionais, utilizando a técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo.

2- A TEORIA DE SAXS

2.1 - Introdução

Nas últimas décadas, muitos pesquisadores têm dado grande importância ao estudo de variações conformacionais de macromoléculas de interesse biológico em solução sob diferentes condições físico-químicas, tais como variações de pH, concentração e temperatura.

As macromoléculas mais estudadas têm sido, sem dúvida, as proteínas, podendo se estudar estes sistemas de duas formas: a primeira seria cristalizando o sistema e a segunda com a macromolécula em solução, ou seja, o mais próximo possível de seu estado natural.

A técnica de SAXS nos dá essa condição, o que nos permite obter informações como raio de giro, volume hidratado, área da superfície e máxima dimensão das macromoléculas, sendo que uma análise completa da função distribuição de distâncias $p(r)$ nos permite estabelecer modelos para as proteínas em solução, estudadas nas diferentes condições físico-químicas.



2.2 - Espalhamento de raio X

A intensidade de espalhamento de um objeto qualquer é definida em termos de um vetor do espaço recíproco do objeto espalhador cujo modulo é :

$$h = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad (2.1)$$

Na figura 6 vemos o esquema de uma partícula fixa e um feixe de raios X incidindo segundo a direção do vetor espalhamento $\mathbf{h}_0$.

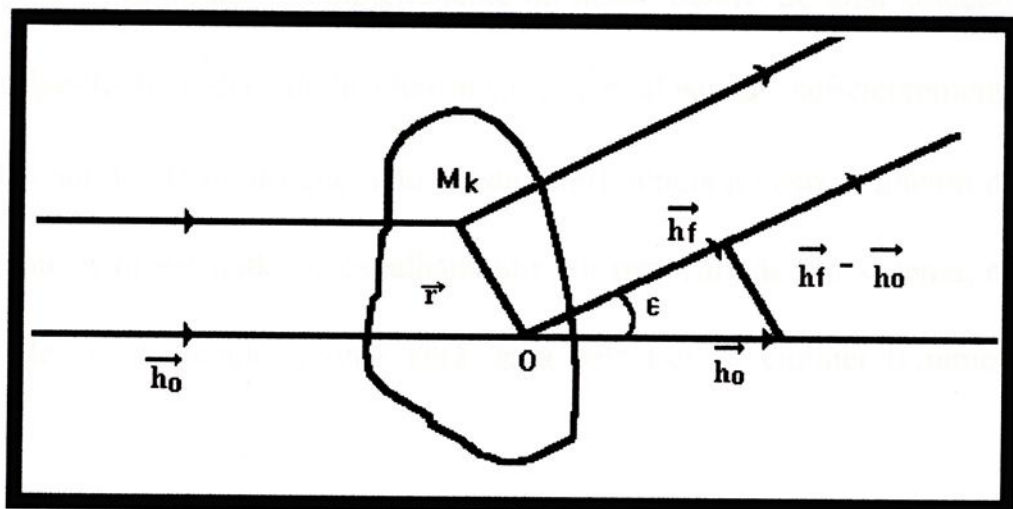


Figura 6 - Esquema de uma partícula fixa e um feixe de raios X incidindo segundo um vetor $\mathbf{h}_0$ e um feixe espalhado $\mathbf{h}_1$.

Sendo:

$\varepsilon = 2\theta$ o ângulo de espalhamento entre os feixes incidente e espalhado.

λ = o comprimento de onda da radiação utilizada.

M_k = representa o elemento diferencial de volume da partícula localizado pelo vetor posição $\vec{r}$.

Consideremos um conjunto de partículas idênticas, de densidade eletrônica ρ , orientadas completamente ao acaso dentro de uma solução, cujo solvente tem densidade eletrônica ρ_0 , e afastadas suficientemente uma das outras, de modo que não exista interferência no espalhamento de cada uma. A intensidade de espalhamento por partícula de um sistema, na região de "h" tendendo a zero, será dada pela Lei de Guinier (Guinier, 1963):

$$I(h) = (\rho - \rho_0)^2 V^2 \exp\left(-\frac{1}{3} Rg^2 h^2\right) \quad (2.2)$$

onde V é o volume da partícula e Rg o raio de giro da partícula com relação ao seu centro de gravidade, definido por:

$$Rg^2 = \int \frac{r^2 dv}{V} \quad (2.3)$$

Sendo a curva de $\log I(h)$ versus h^2 uma reta, na região onde a aproximação de Guinier é válida, a inclinação α é dada por :

$$\alpha = -\frac{1}{3} R_g^2 \log e \quad (2.4)$$

$$R_g = 2,628 \sqrt{-\alpha} \text{ (\AA)} \quad (2.5)$$

quando a radiação $K_{\alpha} \text{ Cu} = 1.54 \text{ \AA}^{-1}$ é usada.

A superfície (S) da partícula pode ser deduzida a partir de outra aproximação, válida para valores grandes de h dentro do intervalo de baixo ângulo correspondente à região assintótica da curva de espalhamento. Esta aproximação é conhecida por Lei de Porod e é dada pela seguinte equação:

$$I(h) = 2\pi \frac{(\rho - \rho^0)^2}{h^4} S \quad (2.6)$$

Esta lei é válida para partículas esferoidais de tamanhos e formas dissimilares para qualquer concentração de solução, desde que a interface solvente-partícula e que as densidades eletrônicas da partícula e do solvente sejam bem definidas. Uma curva típica de espalhamento de raios X para um feixe corrigido pode ser visualizada na (Fig.7).

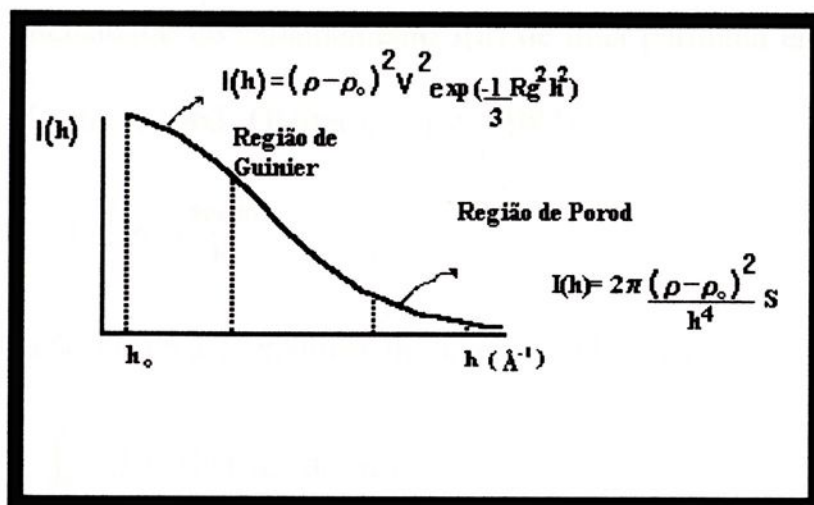


Figura 7- Curva típica de espalhamento de raios X para um feixe corrigido, mostrando a região de Guinier e a região de Porod.

A curva de $I(h) \cdot h^4$ versus h^4 tende a um valor constante na região de Porod, o que conduz ao valor da superfície da partícula.

O volume (V) da partícula pode ser deduzido a partir das propriedades integrais de $I(h)$.

Assim, se $I(0)$ for obtido através da lei de Guinier, o volume será dado por:

$$V = \frac{I(0)}{Q} \quad (2.7)$$

onde:

$$Q = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty h^2 I(h) dh \quad (2.8)$$

que é conhecida na teoria de SAXS como invariante.

A intensidade de espalhamento $I(h)$ de uma partícula em solução é dada por (Guinier, 1963; Glatter e Kratky 1982):

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} P(r) \frac{\sin hr}{hr} \cdot dr \quad (2.9)$$

Onde a função $P(r)$ é a Transformada Inversa de Fourier.

$$P(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(h) \cdot (hr) \sin hr \cdot dh \quad (2.10)$$

A função $P(r)$, denominada função distribuição de distância, representa o número de pares de elétrons separados pela distância r dentro da partícula, e dela obtém-se todas as informações sobre a forma da macromolécula.

Esta função tem a mais completa informação estrutural da partícula, capaz de fornecer a máxima dimensão desta, bem como prever a formação de dímeros ou agregados das macromoléculas em solução, mostrando, principalmente, a forma da partícula em solução nas diferentes condições físico-químicas.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- A técnica de saxs

O equipamento de espalhamento de raios X constitui-se de um ânodo rotatório de alta brilhância “RIGAKU DENKY”, que permite obter um comprimento de onda ($\lambda_{K\alpha} = 1,54 \text{ \AA}$). Esta fonte possui uma vantagem sobre as fontes convencionais que utilizam uma potência aproximada de 2KV, enquanto o ânodo rotatório utiliza uma potência de 18KV, o que reduz consideravelmente o tempo de exposição da amostra aos raios X, mantendo a boa qualidade das curvas de espalhamento coletadas. Para eliminar aproximadamente 95% da radiação $K\beta$, utiliza-se um filtro de Ni de $20\mu\text{m}$ de espessura, colocado à saída da janela do ânodo.

O alinhamento do feixe de raios X é feito com um sistema de colimação por blocos (Câmara de Kratky) (Fig.8). A amostra é colocada num capilar de vidro Lyndemann de 1 mm de diâmetro interno e este encaixado num porta-amostras com sistema de vácuo para diminuir o espalhamento e a absorção do raios X pelas moléculas do ar .

A intensidade de espalhamento é registrada através de um detector sensível à posição, por um período aproximado de 2 horas. O detector é constituído por um filamento de quartzo, revestido de carbono, envolvido em um gás (Xe-CH_4), sob uma pressão de 75 PSI (Barbosa *et al.*, 1994). O fóton espalhado pela amostra ioniza o gás que descarrega no filamento e



o sinal gerado é enviado para cada um dos lados do detector, chegando em tempos diferentes. O detector está acoplado a um conjunto eletrônico composto de pré-amplificadores, amplificadores, analisador, discriminador, somador de ondas e um microprocessador para armazenamento dos dados, ligados a um sistema computacional para o qual são transferidos os dados coletados para posterior análise.

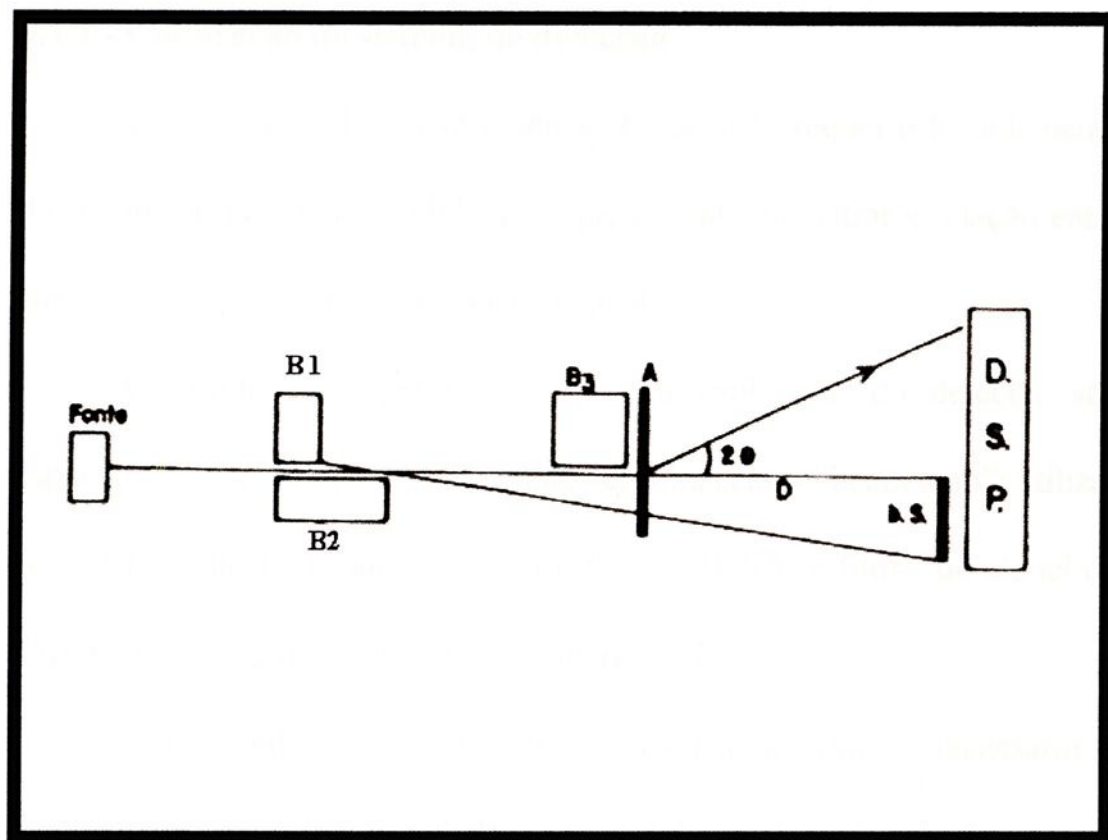


Figura 8 - Desenho esquemático do sistema de colimação Kratky:

Fonte: fonte de Raios X

B1, B2 , B3 : blocos com superfície polida

D: distância da amostra ao D.S.P.

D.S.P. : detector sensível à posição

bs: "beam- stop"

2θ : ângulo de espalhamento

A: amostra

3.1.1 - Calibração do sistema de detecção

O uso correto do detector sensível à posição requer o levantamento de sua linearidade e sensibilidade, o que permite encontrar a relação entre ângulo de espalhamento e número de canal.

As condições experimentais para a calibração do detector são especiais devido ao fato da calibração ser feita sem o “beam stop”; utiliza-se baixa potência na fonte geradora (20KV e 10mA) e filtros de níquel de $72\mu\text{m}$ de espessura na saída do tubo de raios X.

Para a calibração do detector sensível à posição, é necessário o conhecimento de sua linearidade e sensibilidade, além da relação entre o ângulo de espalhamento e o número de canal. Para obtermos a linearidade do detector, é preciso levantar dados do número do canal em função da posição do detector (Fig.9).



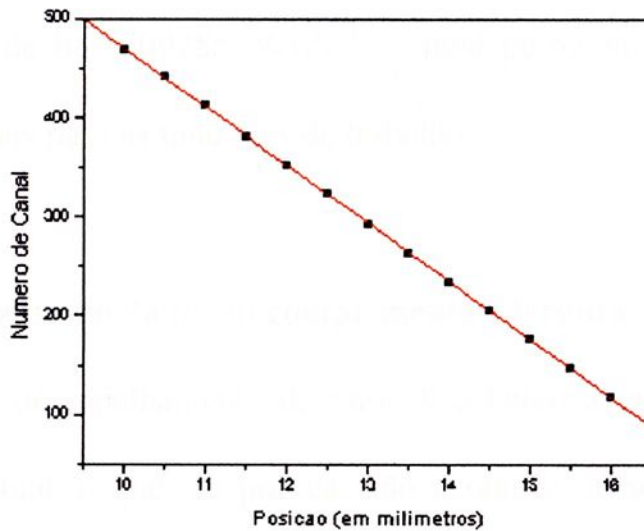


Figura 9 - Gráfico da linearidade do detector.

Deste gráfico, obtemos o valor do coeficiente angular da reta, conhecida por $1/K$. Da Fig.9, obtemos $K = 0,17 \text{ mm/canal}$. Para relacionarmos o valor de K ao ângulo de espalhamento (ε ou 2θ), usamos a seguinte expressão:

$$\varepsilon = \frac{KNc}{D} \quad (3.1)$$

Nc = número de canais.

D = distância da amostra ao detector; em nosso caso, 242mm.

Obtivemos o valor para ε de $0,0007Nc$ (radianos) que, transformado para graus, será de $0,040 Nc$.

Considerando que, para baixos ângulos, $\sin \theta \approx \theta$, encontramos então o valor de $h = 0,00285 \text{ Nc}(\text{\AA}^{-1})$, o qual permitem a passagem de número de canais para as unidades de trabalho.

3.1.2 - Levantamento do perfil comprimento e largura

A teoria de espalhamento de raios X a baixo ângulo esta baseada num feixe pontual, o que, na prática, não acontece devido às condições experimentais. Tendo o feixe de raios X um certo comprimento e largura, torna-se necessário uma correção dos efeitos geométricos possibilitando a passagem da curva de espalhamento experimental $J_n(h)$ para a curva corrigida $I(h)$.

Na prática, para fazer as correções acima citadas, precisamos do levantamento do perfil comprimento $\omega(t)$ e do perfil largura $H(x)$, os quais são obtidos nas mesmas condições experimentais utilizadas para a calibração do detector sensível à posição.

O levantamento do perfil comprimento $\omega(t)$ (Fig.10) é feito colocando-se o detector em forma horizontal de maneira tal que podemos obter o perfil comprimento completo. Para calcular o passo do perfil comprimento, utilizamos a seguinte expressão:

$$t_h = \frac{2\pi\Delta y}{\lambda D} \quad (3.2)$$



sendo:

Δy = o deslocamento em mm

D = a distância da amostra ao detetor

λ = o comprimento de onda

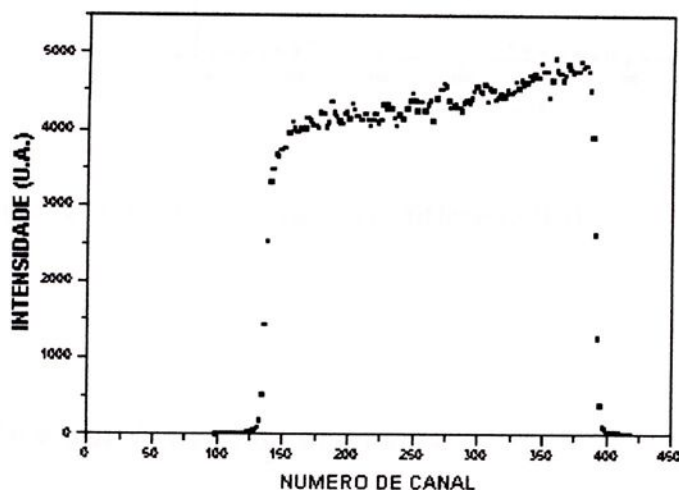


Figura 10 - Gráfico do perfil comprimento $\omega(t)$.

O levantamento do perfil largura $H(x)$ é obtido afastando-se o anteparo do feixe direto de raios X (Fig.11).

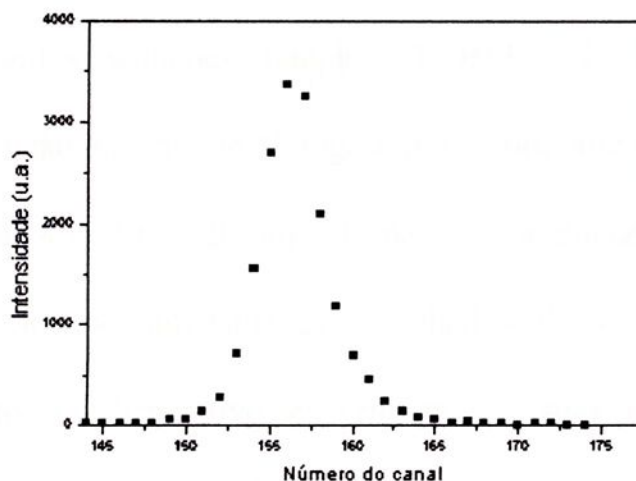


Figura 11- Gráfico referente ao perfil largura $H(x)$.

3.2- Obtenção e purificação da crotoxina

A obtenção e purificação das amostras utilizadas em nossos experimentos foram feitas em colaboração com o Prof. Dr. José Roberto Giglio, do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. A crotoxina do veneno da *Crotalus durissus terrificus* foi purificada de acordo com o procedimento de Gabilan (1984).

3.3 - Eletroforese

Visando uma maior segurança quanto à pureza, a amostra foi analisada por eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida 17 %, tampão Tris-glicina pH 8,5 (Laemmli, 1970).

3.4- Preparação da amostra

A crotoxina extraída do veneno da *Crotalus durissus terrificus* foi adicionada a diferentes soluções tampão, TABELA I. Preparou-se inicialmente uma solução estoque de 50 mg/ml posteriormente diluída para as concentrações de 40, 30 e 20 mg/ml, para cada concentração. O processo de obtenção das intensidades espalhadas foi o mesmo. O solvente foi exposto ao dispositivo experimental e suas intensidades espalhadas foram registradas, tornando-se possível eliminar a contribuição do solvente no tratamento das curvas experimentais.

Tabela I - Tampões utilizados na preparação da solução protéica utilizando complexo crotoxina.

TAMPÃO	pH	CONCENTRAÇÃO
Tris (Deutscher, 1990)	8.5	50mM
Citrato (Colowick e Kaplan,1955)	5.5	50mM
Citrato (Colowick e Kaplan,1955)	3.0	50mM
HCL/KCl (Colowick e Kaplan,1955)	2.0	50mM

3.5 - Obtenção das curvas de espalhamento

Este item descreve de forma resumida os passos utilizados na obtenção das curvas de espalhamento de raios X.

- 1- Ajusta-se o aparelho para uma voltagem de 50 KV e uma corrente de 100mA (Potência de 5000 W).
- 2- Mede-se a intensidade do feixe direto (apenas com uma amostra padrão de Lupolen, adquirida junto à Anton Paar K. G., Áustria) por 100s.
- 3- Mede-se a intensidade apenas do capilar de vidro Lyndemann com aproximadamente 1 mm de diâmetro interno por 3600 s.
- 4- Mede-se a intensidade do capilar contendo apenas solvente por 3600s.
- 5- Mede-se a intensidade do capilar contendo solução (solvente + proteína) por 3600 s.

Estas etapas devem ser repetidas para as diferentes concentrações, com os tempos de medições constantes; as quantidades de solvente adicionadas para obtenção das concentrações desejadas foram calculadas utilizando-se simples diluição.

A cada nova diluição deve-se homogeneizar a solução a fim de evitar precipitação da proteína no fundo do capilar.

Para cada pH foram realizadas três séries de medidas buscando reduzir ao máximo os erros experimentais. Os dados coletados foram



arquivados no sistema computacional para posterior obtenção das curvas de espalhamento extrapoladas à concentração zero.

3.6- Construção de modelos teóricos de macromoléculas

Para a interpretação dos resultados de espalhamento de raios X a baixo ângulo, é necessário fazer uma comparação das curvas de espalhamento experimental $I(h)$ e das funções distribuição de distância $p(r)$ experimentais com as obtidas por modelos teóricos.

Esta é, uma das mais importantes etapas de nosso trabalho, que é justamente a adequação de um modelo teórico à forma da molécula apresentada em solução. Para a realização desta etapa empenhamo-nos em conhecer a fundo o algoritmo físico matemático que consiste em calcular a transformada de Fourier do espaço real para o recíproco entendendo assim os passos executados pelo programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980) que calcula a função distribuição de distância, $p(r)$, e a função espalhamento, $I(h)$, de modelos, usando a teoria de elementos finitos, para construção de um modelo usando esferas de 1 Å de raio como subunidades. Para efetuar estes cálculos foram utilizadas as equações abaixo.

O fator de espalhamento correspondente à i -ésima esfera é dado pela seguinte equação:



$$\Phi_i(h) = \frac{3[\text{sen}(hR_i) + (hR_i)\cos(hR_i)]}{(hR_i)^3} \quad (3.3)$$

onde R_i é o raio da i -ésima esfera.

A curva de espalhamento de um modelo é dada por:

$$I(h) = \sum_{i=1}^n v_i^2 \rho_i^2 \phi_i^2(h) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n \rho_i \rho_k v_i v_k \phi_i(h) \phi_k(h) \frac{\text{sen}(h \cdot d_{ik})}{h \cdot d_{ik}} \quad (3.4)$$

onde d_{ik} é a distância entre os centros da i -ésima com a k -ésima esferas, v_i , ρ_i e ϕ_i são, respectivamente, o volume, a densidade e o fator de forma da i -ésima esfera, descrito pela equação acima.

A função distribuição de distância, $p(r)$, pode ser escrita na mesma forma que a equação $I(h)$ acima, ou seja:

$$p(r) = \sum_{i=1}^n \rho_i^2 p_0(r, R_i) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n \rho_i \rho_k \bar{p}(r, d_{ik}, R_i, R_k) \quad (3.5)$$

onde $p_0(r, R_i)$ é a função distribuição de distância de uma esfera de raio R_i e densidade eletrônica igual à unidade. O termo cruzado $\bar{p}(r, d_{ik}, R_i, R_k)$ é

a função distribuição de distância entre a esfera i e a esfera k (Brognaro, 1995).

Buscando um melhor conhecimento do programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980) um dos nossos primeiros passos foi a reprodução de alguns modelos teóricos propostos por Glatter e Kratky (1982). Estes modelos estão baseados na construção de um dímero usando elipsóides prolatos com variações em relação às áreas de acoplamento de uma unidade à outra e aos ângulos de inclinação resultantes destes acoplamentos; na (Fig. 12) encontramos uma destas formas teóricas e sua respectiva $p(r)$.

Após a análise dos modelos gerados com programa MULTIBODY (Glatter, 1980) e das suas respectivas coordenadas, melhoramos a visualização dos mesmos utilizando o programa computacional RasMol v2.5 (Sayle, 1994) (Fig. 13).



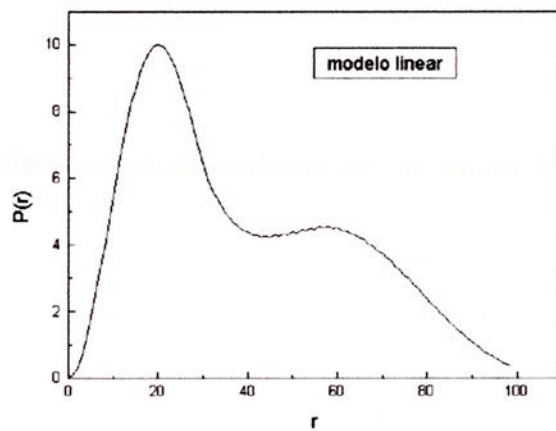
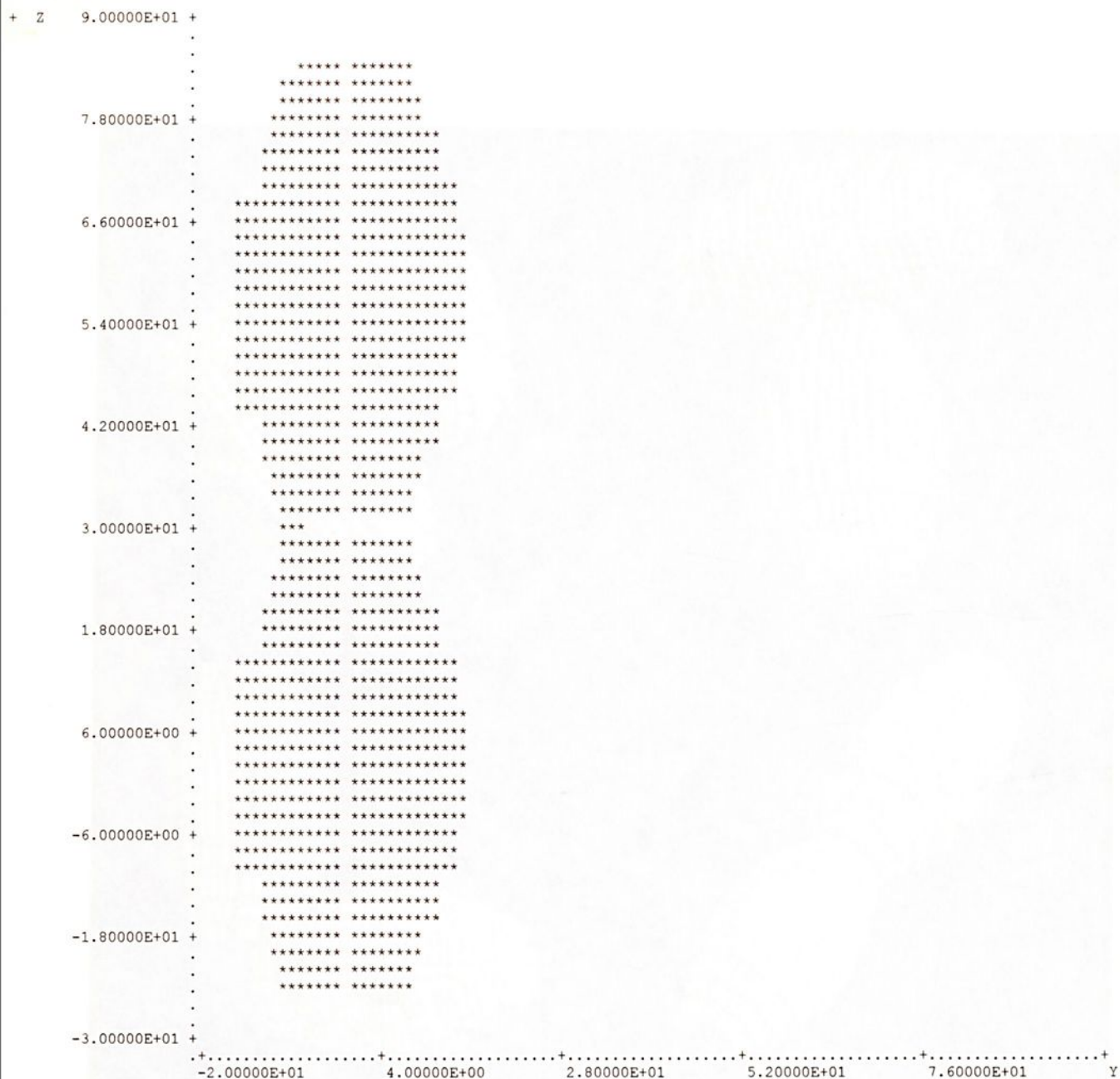


Figura 12 -Gráfico referente à projeção no plano zy do modelo linear e sua respectiva $P(r)$.

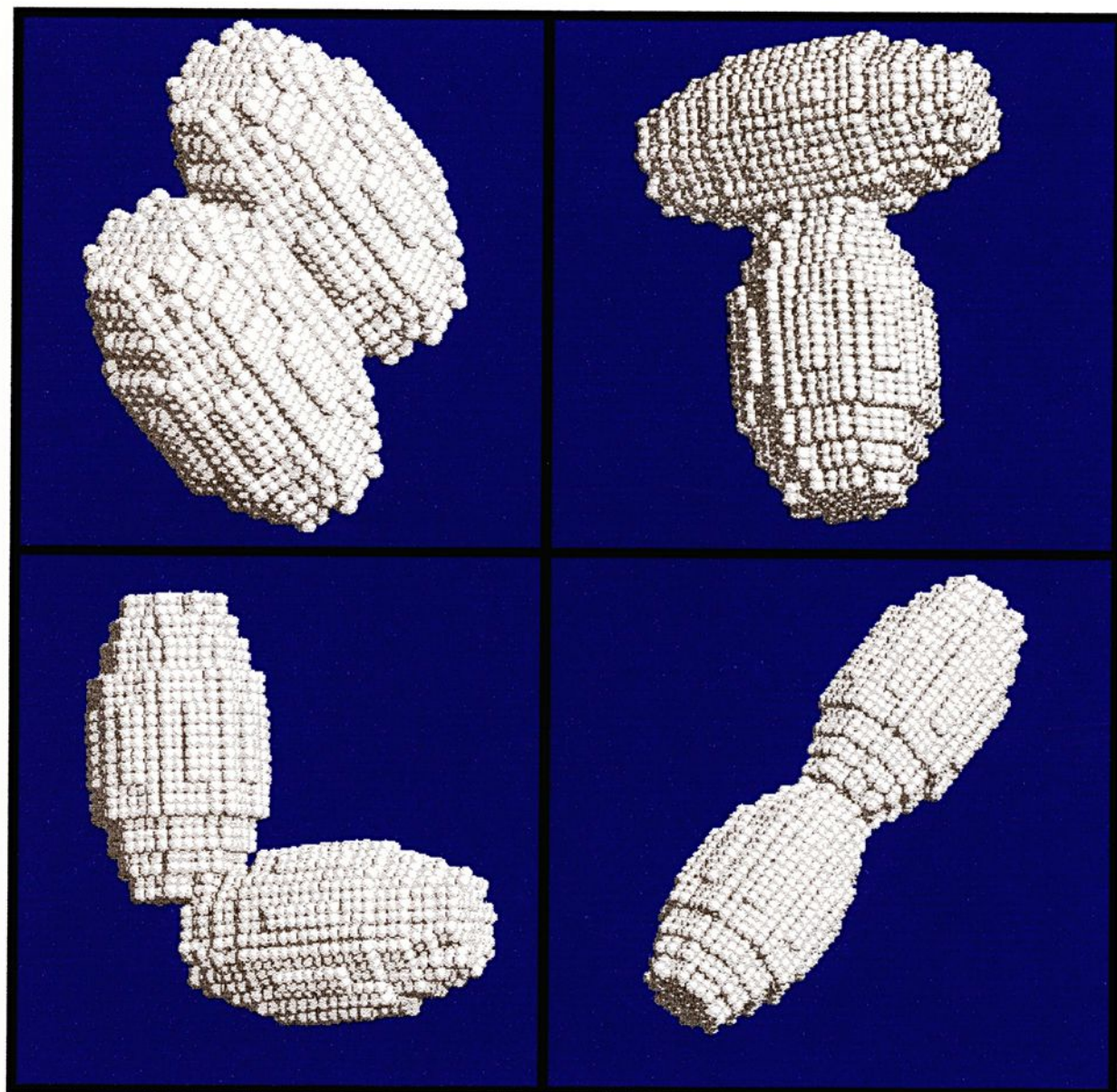


Figura 13- Modelos tridimensionais de monômeros nas formas paralelo, T , L e linear.

4 -RESULTADOS

4.1- O modelo teórico para o complexo crotoxina.

No complexo crotoxina, a fosfolipase A₂ é representada por um prolato e crotapotina por um oblato.

Uma forma de se calcular o volume esperado da fosfolipase e da crotapotina é a partir do peso molecular da proteína em questão, onde :

$$V = \frac{M}{D} \quad (4.1)$$

$$V = \frac{P.M. \times (u.m.a)}{D} \quad (4.2)$$

$$V = \frac{P.M. \times 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ Kg}}{10^3} \quad (4.3)$$

$$V = P.M. \times 1,66 \cdot 10^{-30} \text{ Kg/m}^3 \quad (4.4)$$

$$V = P.M. \times 1,66 [\text{\AA}]^3 \quad (4.5)$$

O volume calculado para a fosfolipase A₂ foi de 26228 Å³, enquanto o da crotapotina foi 14774 Å³.



De posse do volume calculado das proteínas, e utilizando a equação 4.6 (Craievich e Dujovny, 1973), substituímos seus valores nos gráficos das Fig.14 e 15, os quais possuem dois pontos de intersecção que nos permitem obter os valores de v do oblato e v do prolato.

$$V = \frac{4}{3} \pi v R g^3 \left(\frac{2 + v^2}{5} \right)^{\frac{-3}{2}} \quad (4.6)$$

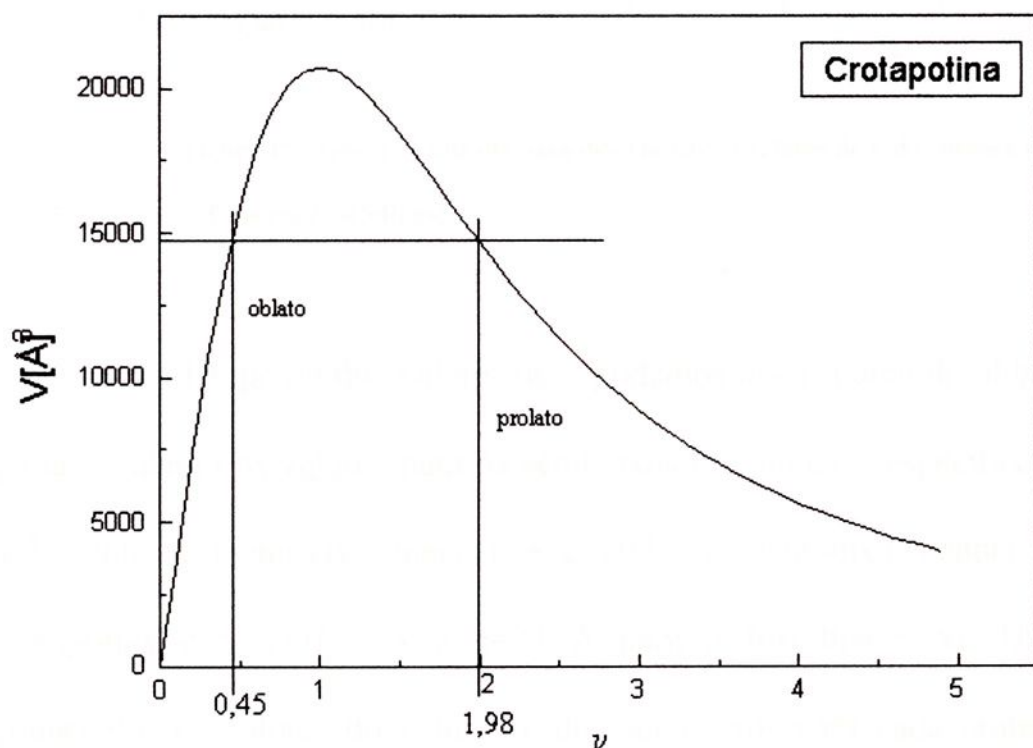


Figura 14 - Gráfico utilizado para determinar os valores de v do oblato e do prolato referentes à crotapotina.

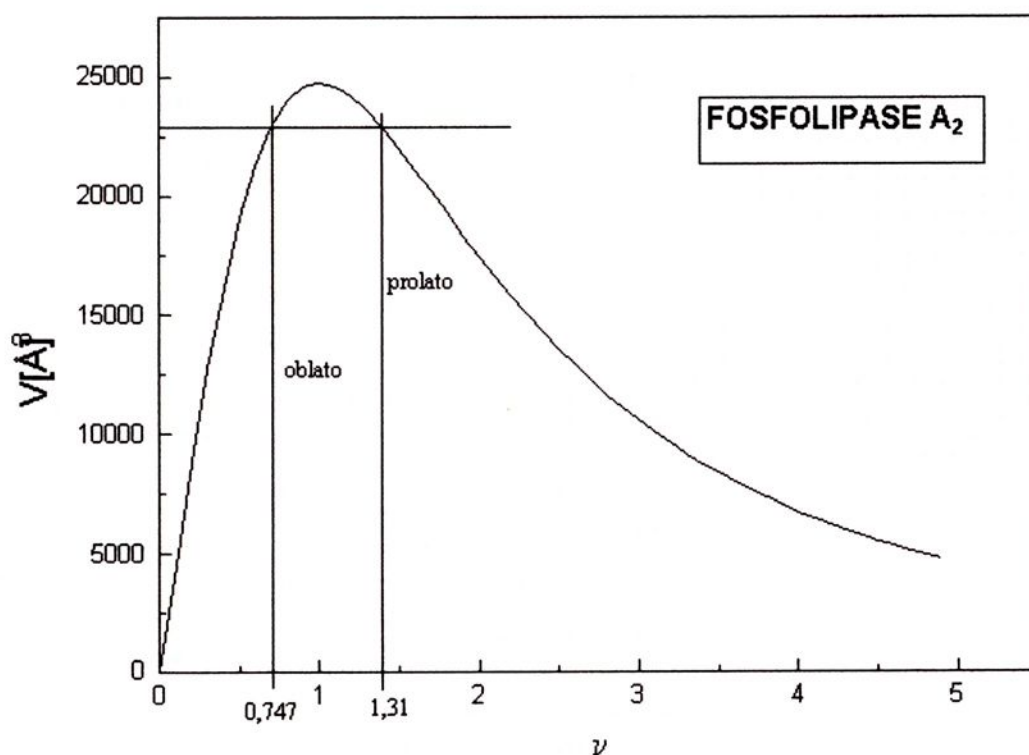


Figura 15 - Gráfico utilizado para determinar os valores de ν do oblato e do prolato referentes à fosfolipase A_2 .

De posse dos valores de ν podemos obter a área do oblato e do prolato, além dos valores para os semi-eixos que no caso específico, foram $a=b= 9.0 \text{ \AA}$ (semi-eixo menor) e $c=20.0 \text{ \AA}$ (semi-eixo maior) para a crotapotina e $a=b=16.0 \text{ \AA}$ e $c=22 \text{ \AA}$ para a fosfolipase A_2 . Uma vez conhecidos os valores do volume e dos semi-eixos para cada proteína, foi possível construir o modelo cuja projeção é mostrada na Fig.16.

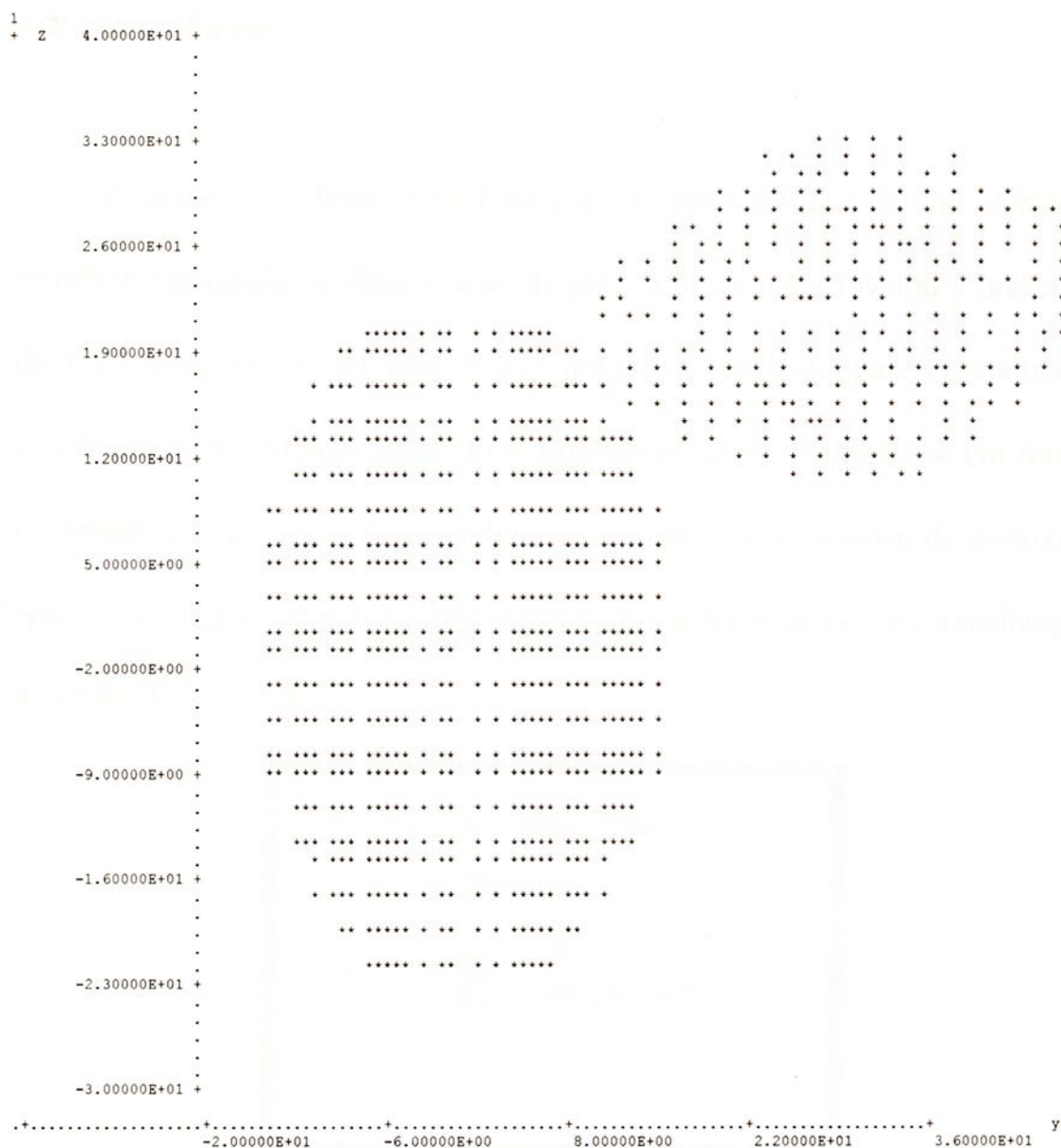


Figura 16 - Gráfico referente ao modelo teórico da crotoxina formado por heterodímero.

4.2 - Eletroforese

A análise da eletroforese feita para a crotoxina da *Crotalus durissus terrificus* buscando verificar o grau de pureza da amostra revelou a presença de três bandas, sendo que uma delas é um dímero de fosfolipase A₂ enquanto as outras são a fosfolipase, em forma monomérica e a crotapotina em forma monomérica (Fig. 17). Estes resultados mostram que a amostra de crotoxina apresenta um grau de pureza dentro dos padrões necessários para a realização dos trabalhos em SAXS.

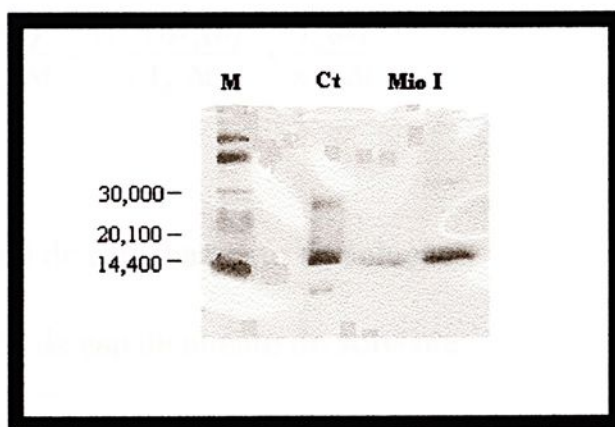


Figura 17 - Eletroforese não desnaturante apresentando marcador (M), crotoxina do veneno da *Crotalus durissus terrificus* (Ct) e miotoxina I homóloga à fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops moojeni*.

4.3 - Normalização das curvas experimentais

Os resultados coletados são transferidos para o sistema computacional na forma de I (intensidade) versus N_c (número de canais). O vetor espalhamento h (expresso em $\text{\AA}^{-1}$) é mais usual que o número de canais e se relaciona a este por dados de calibração do aparelho de raios X.

Essa conversão, assim como a eliminação da contribuição do capilar e do solvente, são feitas por um programa computacional (Olivieri, 1992) que utiliza a seguinte expressão (Ábrego, 1987):

$$J_n(h) = \frac{J_p(h)}{x \cdot J_d \cdot \Delta t} - \frac{(1-\omega)J_s(h)}{x \cdot J_d \cdot \Delta t} - \frac{J_c(\omega)}{x \cdot J_d \cdot \Delta t} \quad (4.7)$$

Onde:

$J_p(h)$ = Intensidade de espalhamento da solução

$J_s(h)$ = Intensidade de espalhamento do solvente

$J_c(h)$ = Intensidade de espalhamento do capilar

x = Espessura da amostra

J_d = Intensidade do feixe direto

Δt = Tempo de exposição

ω = Fração do volume total ocupado pelo soluto



O fator de correção (ω) é calculado pela razão entre o volume da amostra e o volume do solvente.

Após o tratamento de dados, obtém-se curvas de espalhamento normalizadas, livres da contribuição do solvente e do capilar, feitas as correções do feixe, faz-se um gráfico de Guinier ($\log I(h) \times h^2$) (Fig. 18) para os valores de $h < 1/R_g$ estimado, o resultado é uma reta, cuja inclinação α é usada para obter o valor do raio de giro (R_g).

$$R_G = 2,628 \sqrt{-\alpha} \text{ [Å]} \quad (4.8)$$

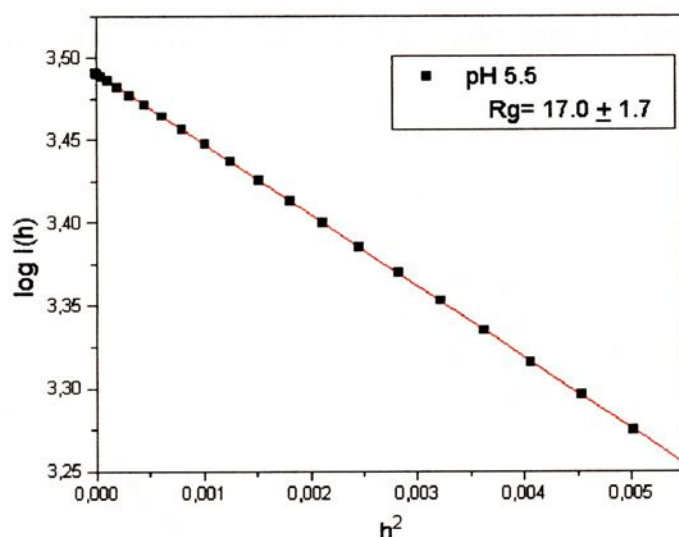


Figura 18 - Gráfico de Guinier ($\log I(h) \times h^2$) da crotoxina para o pH=5.5.

4.3.1 - Extrapolação à diluição infinita

Buscando eliminar os efeitos de interferência interpartículas, realizamos medidas de espalhamento com amostras de concentrações decrescentes, possibilitando, assim, a extrapolação à concentração zero (ou diluição infinita). Isto se faz necessário para atender à teoria de espalhamento, que está baseada na não-interferência entre o espalhamento produzido pelas partículas.

Para isso, fizemos a normalização de cada curva de espalhamento pela sua respectiva concentração (Fig. 19) e, depois, usando o método dos mínimos quadrados, obtivemos o valor extrapolado para a concentração zero.

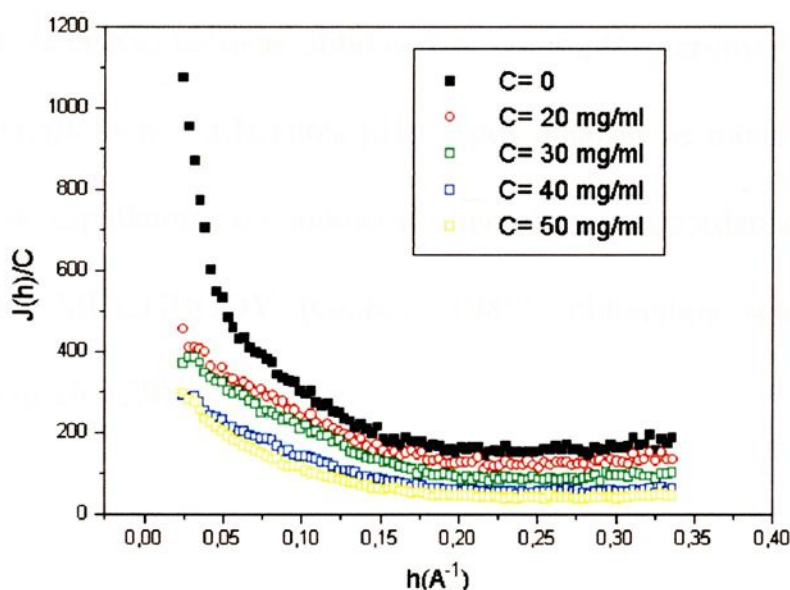


Figura 19 - Curvas de espalhamento da crotoxina em pH 2.0 normalizadas pelas suas respectivas concentrações.

4.3.2 - Curvas de espalhamento corrigidas

Devido ao fato do aparelho utilizado fornecer um feixe linear horizontal com altura e largura de aproximadamente 22mm e 1mm, respectivamente, há necessidade de que se faça um tratamento dos dados utilizando-se o método de Transformada Indireta de Fourier através do programa computacional ITP (Müller e Glatter, 1982), corrigindo assim alterações causadas pela altura e largura do feixe.

De posse das curvas corrigidas, temos, agora, as curvas de espalhamento para um feixe pontual ($I(h) \cdot xh$) (Figs. 20 e 21), melhor visualizadas como $\ln I(h) \cdot xh$ (Figs. 22 e 23), além da função distribuição de distância $p(r)$ experimental (Figs. 24 e 25). Todas as curvas são comparadas às respectivas curvas teóricas obtidas para o complexo crotoxina da *Crotalus durissus terrificus* nos diferentes pHs. Após analisar os modelos propostos, as curvas de espalhamento e inúmeras alterações nas coordenadas, utilizando o programa MULTIBODY (Glatter, 1980), obtivemos seus respectivos modelos (Fig. 26 a 29).



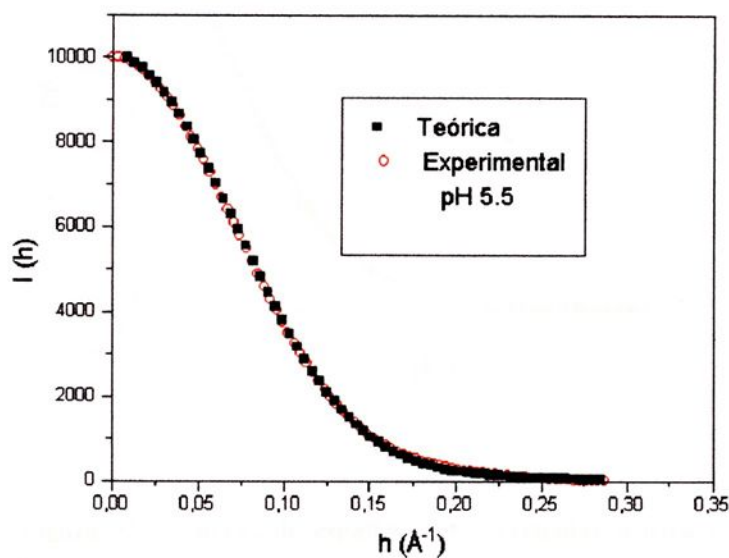
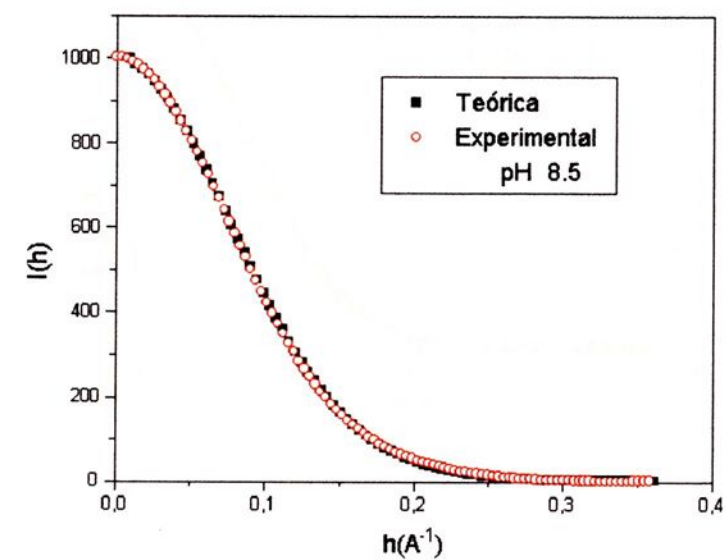


Figura 20 - Curvas de espalhamento corrigidas teórica e experimental para o complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 8.5 e 5.5.

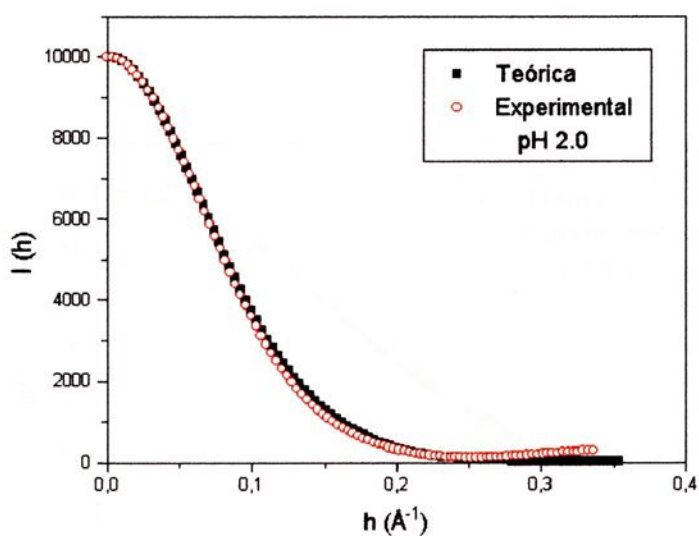
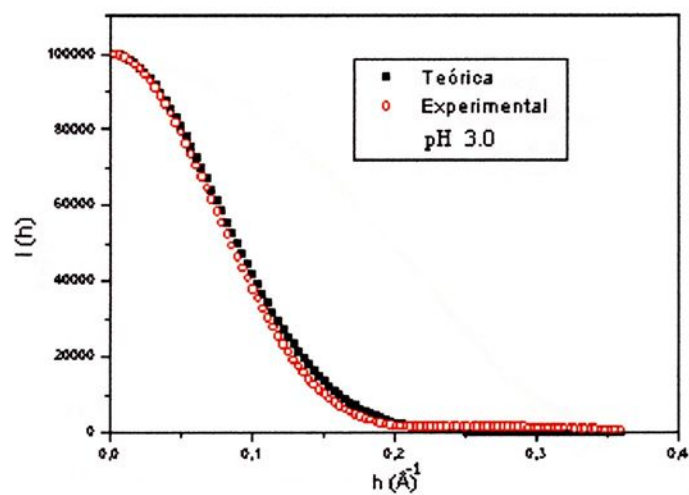


Figura 21 - Curvas de espalhamento corrigidas teórica e experimental para o complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 3.0 e 2.0.

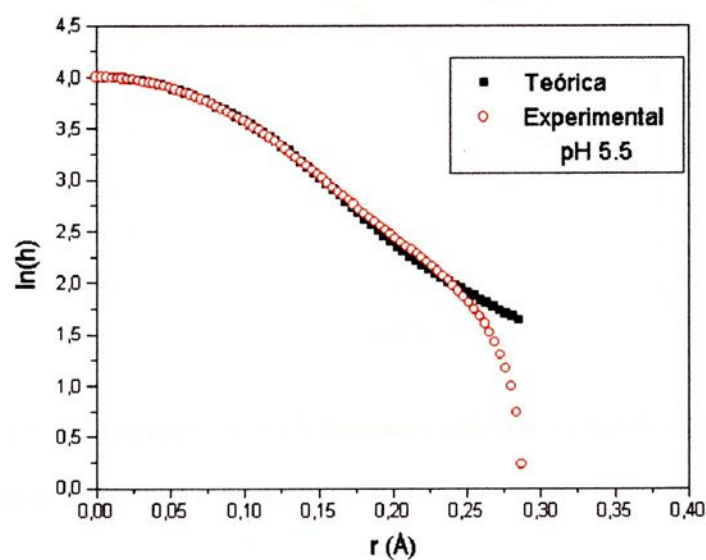
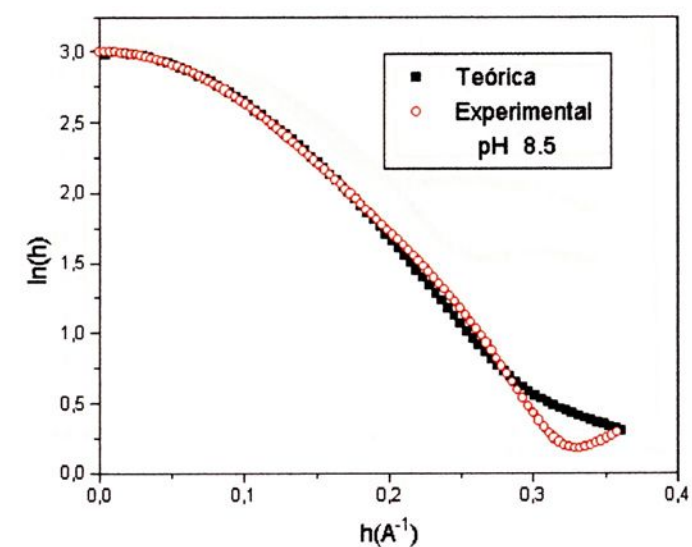


Figura 22 - Gráfico $\ln(h) \cdot h$ ($\text{\AA}^{-1}$) da comparação das curvas de espalhamento teórica e experimental referente ao complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* em pH 8.5 e 5.5 .

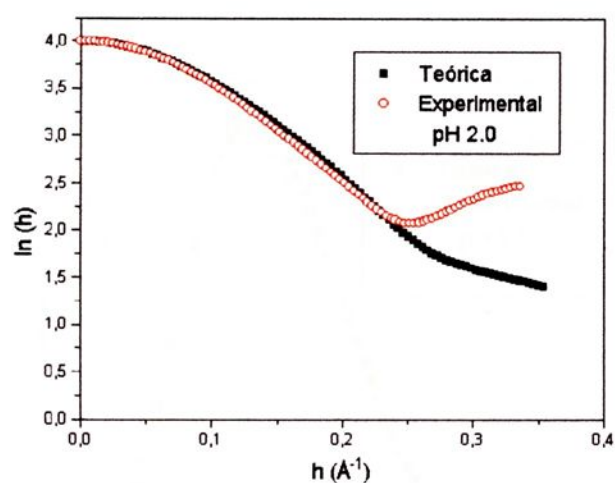
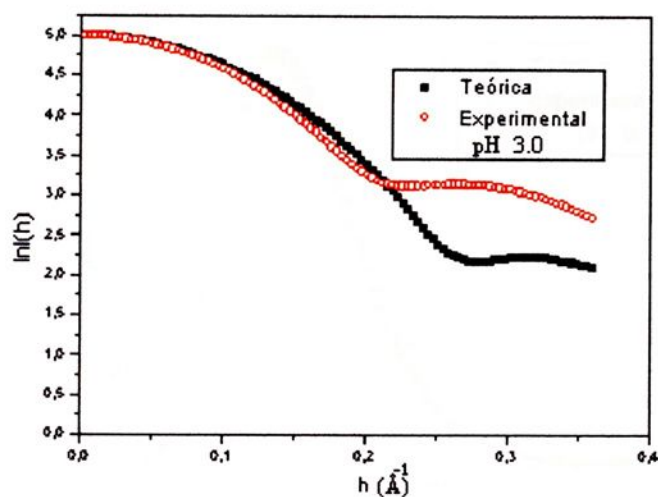


Figura 23 - Gráfico $\ln I(h) \times h$ ($\text{\AA}^{-1}$) da comparação das curvas de espalhamento teórica e experimental referente ao complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* em pH 3.0 e 2.0 .

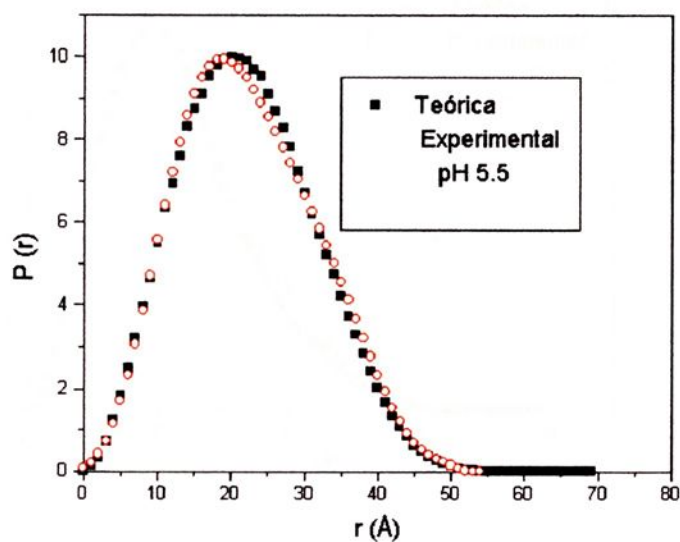
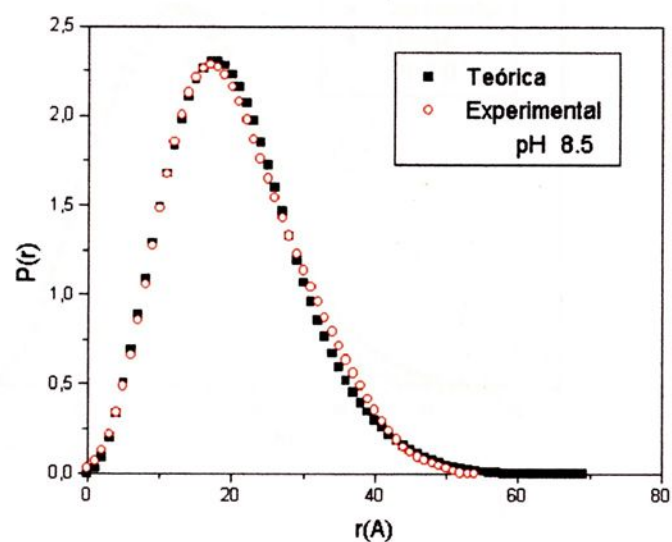


Figura 24 - Comparação das funções de distribuição de distância teórica e experimental referente ao complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* em pH 8.5 e 5.5.

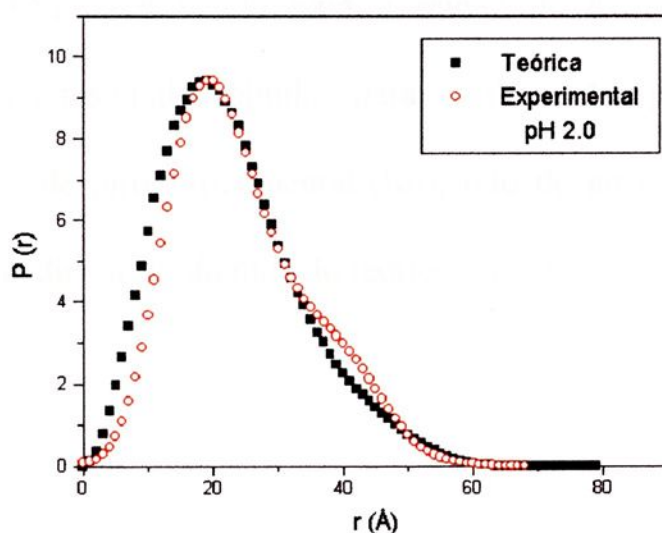
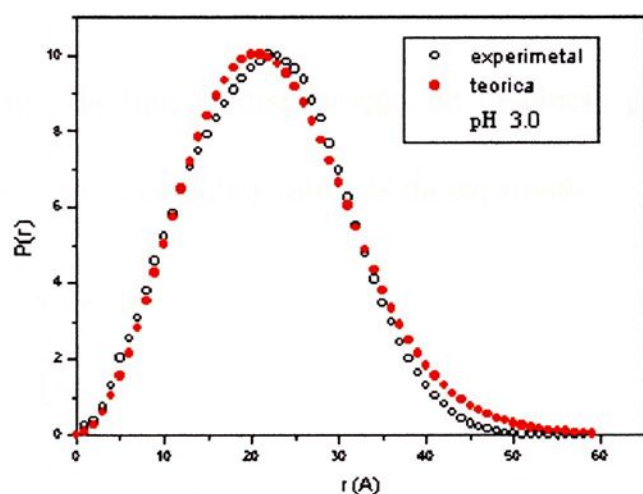


Figura 25 - Comparação das funções de distribuição de distância teórica e experimental referente ao complexo crotoxina da *Crotalus d. terrificus* em pH 3.0 e 2.0 .



A partir da função distribuição de distância $p(r)$, podemos obter o valor do raio de giro, calculado através da expressão:

$$Rg^2 = \frac{\int_0^{\infty} p(r)r^2 dr}{2 \int_0^{\infty} p(r) dr} \quad (4.9)$$

O resultado obtido desta forma é mais confiável pois leva em consideração toda a curva de intensidade espalhada, enquanto que o utilizado na equação (4.8) só é válido para a região de $h \rightarrow 0$. Na Tabela II, apresentamos os resultados obtidos para os diferentes pHs referentes aos parâmetros raio de giro experimental (Rg), raio de giro do modelo teórico (Rg^*) e máxima dimensão do modelo teórico ($D_{\max}$).

Tabela II - Resultados obtidos para os diferentes pHs referentes aos parâmetros Raio de giro experimental (Rg) calculado considerando-se a função distribuição de distância $p(r)_{exp}$, Raio de giro do modelo teórico (Rg*) calculado considerando-se a função distribuição de distância $p(r)_{teó}$ e máxima dimensão do modelo teórico (D_{max}).

pH	8.5	5.5	3.0	2.0
Rg (Å)	16.0 ± 1,6	17.0 ± 1,7	17.5 ± 1,75	19.0 ± 1,9
Rg* (Å)	15.9	17.0	16.5	18.0
D _{max} (Å)	62.0	64.0	70.0	74.0

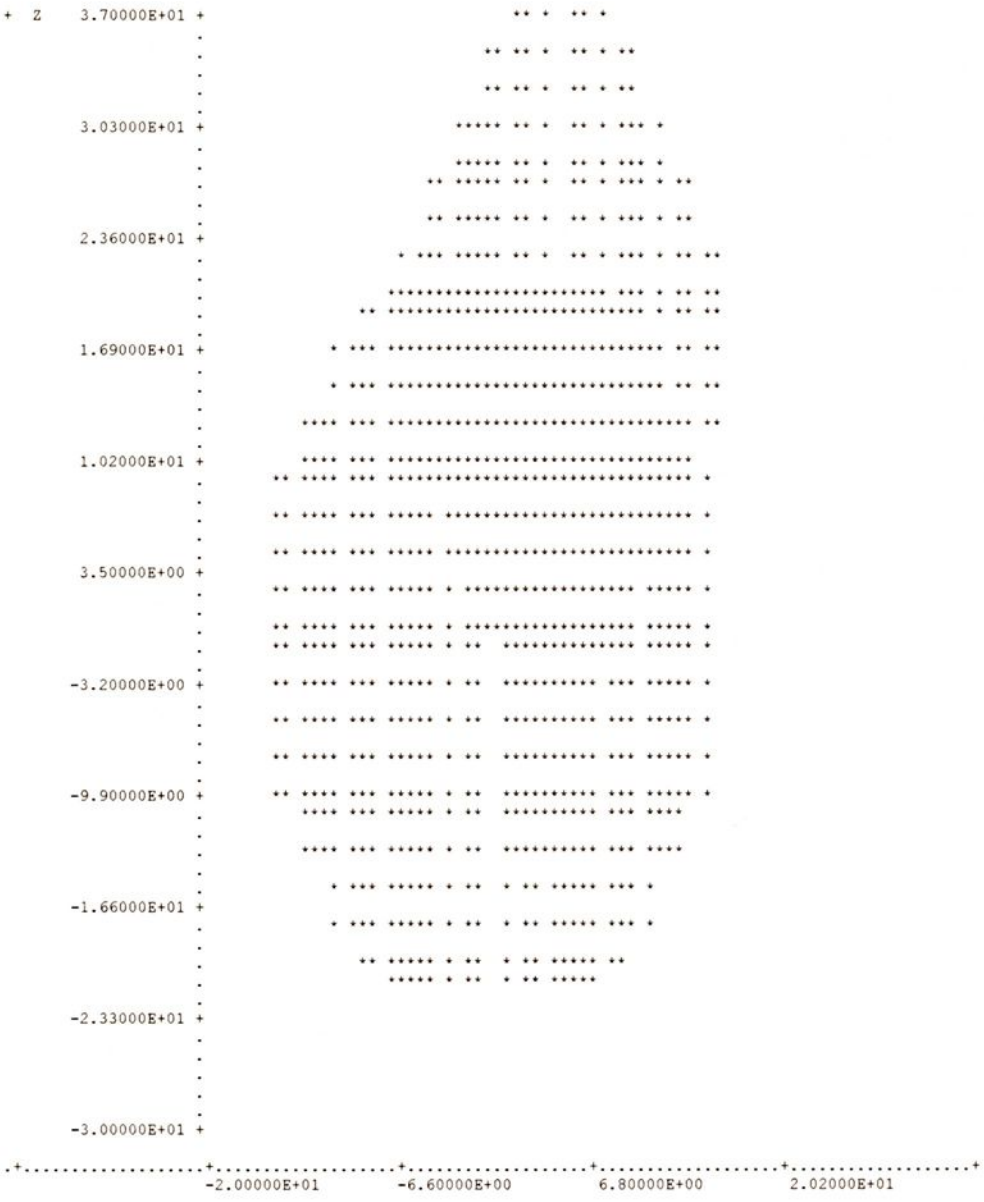


Figura 26 - Modelo teórico da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 8.5 mostrando a projeção do plano zy, utilizando elementos finitos de raio 1 Å, através do programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980).

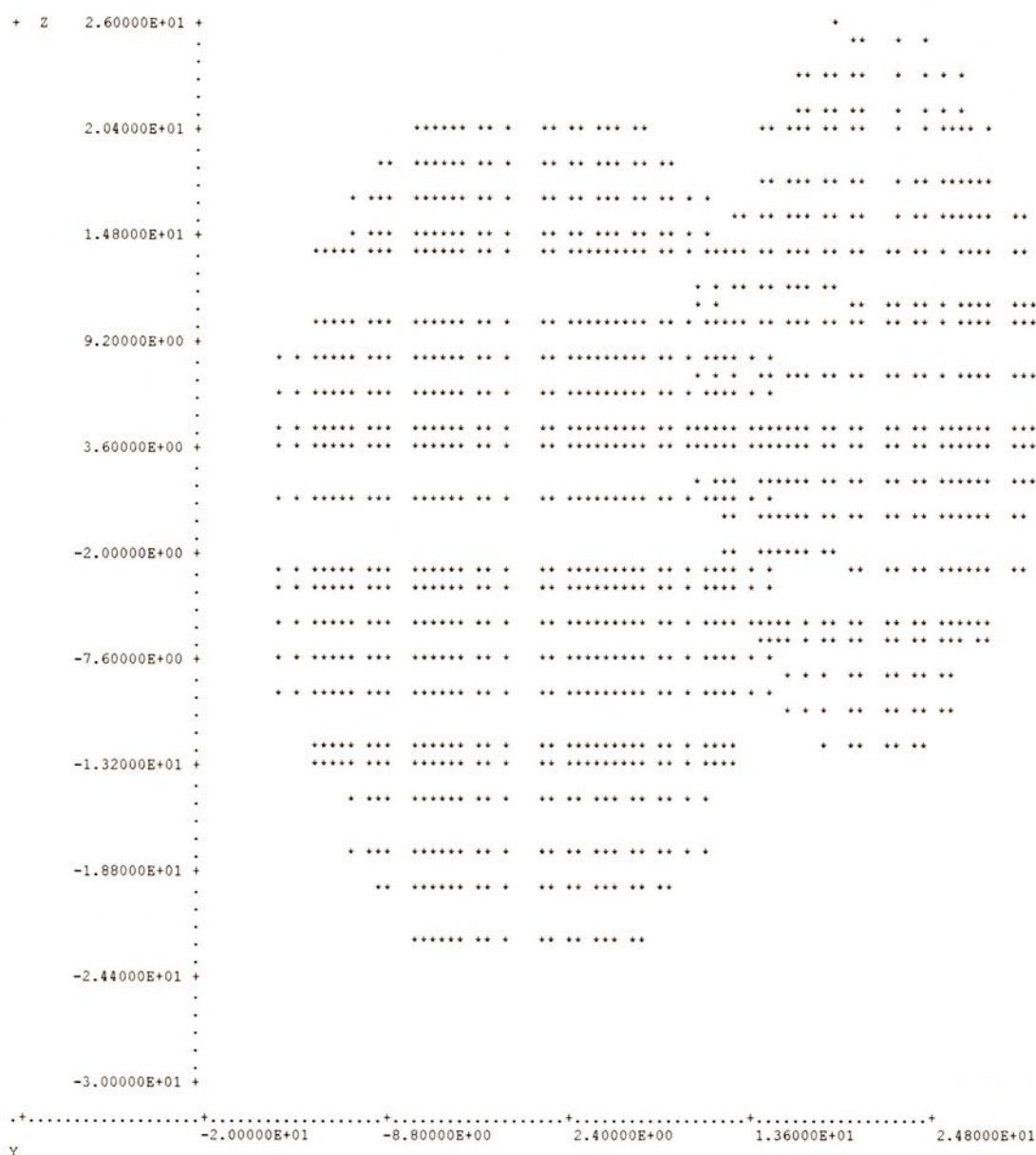


Figura 27 - Modelo teórico da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 5.5 mostrando a projeção do plano zy, utilizando elementos finitos de raio 1 Å, através do programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980).

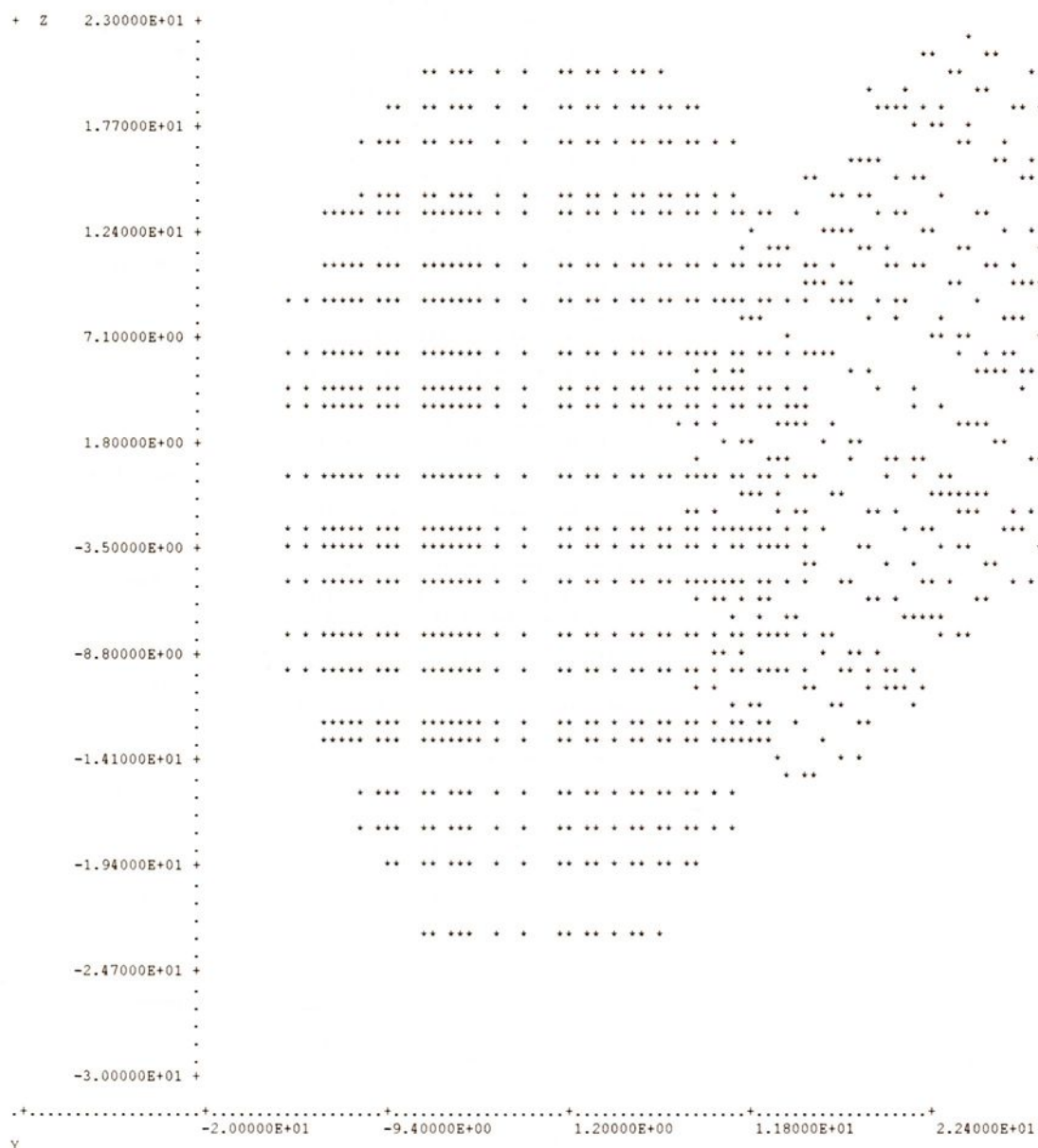


Figura 28 - Modelo teórico da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 3.0 mostrando a projeção do plano zy, utilizando elementos finitos de raio 1 Å, através do programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980)

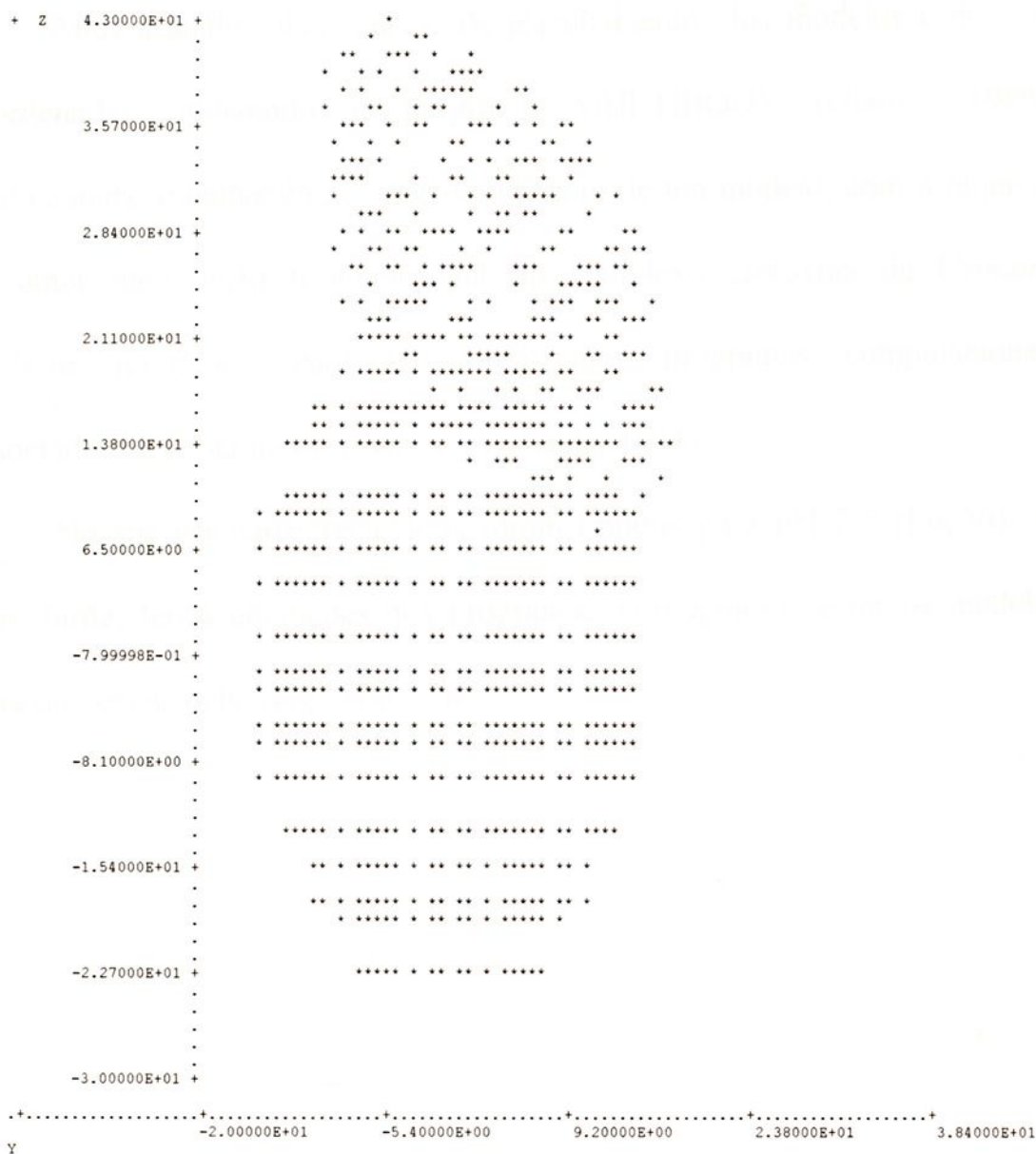


Figura 29 - Modelo teórico da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 2.0 mostrando a projeção do plano zy, utilizando elementos finitos de raio 1 Å, através do programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980).

Após a análise das curvas de espalhamento, dos modelos e de suas coordenadas, utilizando o programa MULTIBODY (Glatter, 1980), continuamos trabalhando no desenvolvimento de um modelo, com o objetivo de obter uma visão tridimensional do complexo crotoxina da *Crotalus durissus terrificus*. Para isso, utilizamos programas computacionais associados ao programa RasMol v2.5 (Sayle, 1994).

Nossos primeiros resultados foram obtidos para pH 8.5 (Fig.30) e, mais tarde, feitas alterações nos programas, conseguimos gerar os modelos para os demais pHs (Fig. 31 a 33).





Figura 30 - Modelo tridimensional da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 8.5.



Figura 31 - Modelo tridimensional da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 5.5.



Figura 32 - Modelo tridimensional da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 3.0.

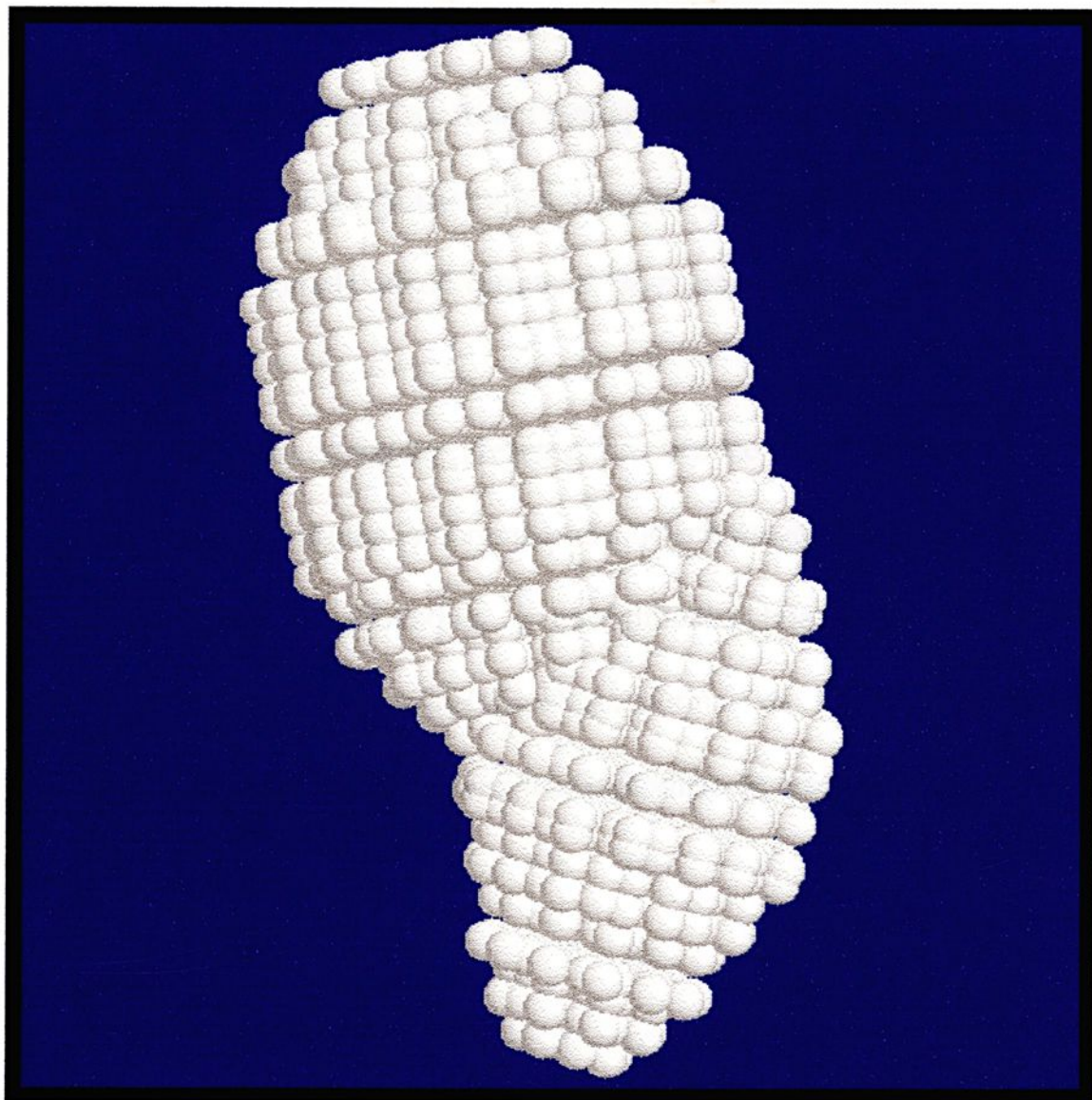


Figura 33 - Modelo tridimensional da crotoxina da *Crotalus d. terrificus* a pH 2.0.

5-DIFICULDADES ENCONTRADAS

Ao longo deste trabalho, foram muitas as dificuldades encontradas com relação à macromolécula crotoxina, cuja literatura específica não é tão vasta. Além da própria complexidade estrutural da proteína dificulta sua resolução cristalográfica.

O complexo crotoxina presente no veneno da *Crotalus durissus terrificus* apresenta muitas isoformas podendo um único indivíduo apresentar até 15 isoformas de crotoxina, o que dificulta boa parte dos estudos desenvolvidos com esta proteína. Desta forma, os trabalhos realizados utilizando-se a crotoxina não separam as isoformas da macromolécula.



6- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Apesar de ter sido isolada, em 1938, por Slotta e Fraenkel-Conrat, e ser uma estrutura cristalizável, a crotoxina do veneno da *Crotalus durissus terrificus* permanece, até hoje, sem resolução estrutural, devido aos inúmeros fatores de complexidade que envolvem o sistema.

Desta forma, as regiões de ligação que envolvem a subunidade ácida (crotapotina) e a subunidade básica (fosfolipase A_2) para a formação do complexo crotoxina permanecem para os pesquisadores de neurotoxinas um enigma, fato que mistifica ainda mais esta proteína.

Com base em nossos modelos tridimensionais obtidos a partir das curvas de SAXS utilizando o programa RasMol v2.5 (Sayle, 1994) para os diferentes pHs, e tendo conhecimento dos pontos isoeletrônicos da fosfolipase A_2 , da crotapotina e do complexo crotoxina, podemos sugerir fatores que favoreçam esta interação.

Para o pH 8.5 verificamos uma forte interação entre as subunidades que compõem o complexo crotoxina, estando a subunidade básica (fosfolipase A_2) carregada positivamente, enquanto a subunidade ácida (crotapotina) encontra-se carregada negativamente. Este fato favorece, e muito, as interações eletrostáticas, ocorrendo uma maior compactação do complexo crotoxina (Fig.30). Como era esperado, as subunidades tendem a dissociar-se, levando à desestabilização do complexo, conforme o pH torna-se cada vez mais ácido.

Em pH 5.5 (Fig. 31) verificamos as subunidades mais afastadas uma da outra, se relacionarmos este modelo com o proposto para o pH 8.5. No pH=3.0 ambas subunidades encontram-se carregadas positivamente, com a crotapotina levemente carregada com cargas positivas. Este fato dificulta as interações eletrostáticas e favorece o distanciamento entre as subunidades, como podemos verificar na (Fig.32).

A simples análise dos pontos isoelétricos e das interações eletrostáticas poderiam ser suficientes para explicar parte das interações que envolvem a estabilidade do complexo crotoxina. Isto porém torna-se complicado quando observamos tanto a função distribuição de distância $p(r)$ (Fig. 33) como o modelo proposto para o pH 2.0 e observamos que a molécula não se encontra totalmente dissociada, restando, ainda, uma região de ligação entre as subunidades a qual, guardadas as limitações da técnica de SAXS, não nos permite especular qual seja.

Acreditamos, contudo, que, com os constantes avanços na área da biologia estrutural, a qual tem nos permitido entender a estrutura e mecanismos de ação de várias toxinas, dentro em breve tenhamos respostas para mais esta questão que envolve o complexo crotoxina.

7-CONCLUSÕES

Este trabalho concluído até aqui mostrou, uma vez mais, que a técnica e a teoria de raios X a baixo ângulo (SAXS) é apropriada para o estudo de variações conformacionais de macromoléculas em solução, visando a obtenção de parâmetros estruturais como o raio de giro (R_g) e a máxima dimensão ($D_{\text{máx}}$).

Outro aspecto interessante é o intervalo de linearidade observado no gráfico de Guinier (Fig. 18) que nos garante que trabalhamos com um sistema monodisperso de macromoléculas em solução, condição básica na teoria de SAXS, para este tipo de estudo.

Os valores de raio de giro experimentais mostrados na TABELA II nos permitiram concluir que o complexo crotoxina apresenta variações de tamanho nos diferentes pHs estudados, apresentando um valor máximo de aproximadamente 19 Å em pH 2.0, um pH extremamente ácido, no qual a crotoxina tende a dissociar-se, fato que está de acordo com a literatura. Entretanto, para o pH 8.5, um pH básico, a proteína apresenta um empacotamento, comportamento que é esperado devido a fortes interações eletrostáticas.

Da mesma forma, os valores dos raios de giro (R_g) dos modelos teóricos apresentados na TABELA II nos permitiram observar um bom

acordo entre o tamanho da crotoxina apresentada em solução e os modelos propostos para os diferentes pHs.

A comparação do espaço recíproco, ou seja, das curvas de espalhamento experimentais e teóricas (Figs. 20 a 23) nos diferentes pHs, mostrou novamente que os modelos propostos são coerentes com a forma do complexo apresentada em solução.

A conclusão mais importante deste trabalho é dada pela análise bem detalhada das funções de distribuição de distância $p(r)$ experimentais e teóricas (comparação do espaço real) (Fig. 24 e 25), em que observou-se uma sobreposição quase perfeita destas funções, fato que nos levou a concluir que a crotoxina apresenta-se em solução na forma de um heterodímero formado pela fosfolipase A_2 elipsóide prolato e pela crotapotina elipsóide oblato.

A análise dos dados experimentais já seria suficiente para concluirmos que as subunidades que formam o complexo crotoxina se dissociam à medida que o pH torna-se mais ácido. Este comportamento fica mais evidente quando observamos as figuras 30 a 33.

8-BIBLIOGRAFIA

- ÁBREGO, J. R. B. (1987). Tese de Doutorado. Instituto de Física e Química de São Carlos/ USP.
- ÁBREGO, J. R. B.; CRAIEVICH, A. F.; MASCARENHAS, Y. P. e LAURE, C. J. (1993). *Biophys. J.* 64, 560-564.
- AIRD, S. D., KAISER, I. I., LEWIS, R. V., e KRUGGEL, W. G. (1985). *Biochemistry* 24, 7054-7058.
- AIRD, S. D., KAISER, I. I., LEWIS, R. V. e KRUGGEL, W. G. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 296-300.
- AMARAL, A. (1977). *Serpentes do Brasil: iconografia colorida*, São Paulo, Ed. Melhoramentos, Ed. USP; Brasília, INL, pp 230-232.
- ARNI, R. K., WARD, R. J., GUTIÉRREZ, J. M. e TULINSKY, A. (1995). *Acta Cryst.*, D51, 311-317.
- ARNI, R. K. e WARD, R. J., (1996). *Toxicon*, 34, pp. 827-841.
- BARBOSA, A. F. (1994). Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) - Notas de Física - 068/94, 23 p.
- BON, C., CHANGEUX, J. P., JENG, T. W. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1979). *Eur. J. Biochem.* 99, 471-481.
- BOUCHIER, C., DUCANCEL, F., GUIGNERY-FRELAT, G., BON, C., BOULAIN, J.C., e MÉNEZ, A. (1988). *Nucleic Acids Res.* 16, 9050.



- BOUCHIER, C., BOULAIN, J. C. BON, C., e MÉNEZ, A. (1991).
Biochim. Biophys. Acta 1088, 401-408.
- BREITHAUPT, H., RÜBSAMEN, K. e HABERMANN, E. (1974).
Eur. J. Biochem. 49, 333-345.
- BROGNARO, D. P., (1995) Dissertação de Mestrado IBILCE/UNESP.
- BRUNIE, S., BROLIN, J, GERWITH, D. e SIGLER, P. B. (1985).
J. Biol. Chem., 260, 9742-9749.
- CHANG, C. C. e LEE, J. D. (1977). *Naunyn-schmie. Arch. Pharmacol.*
296,159.
- CHIU, W. e JENG, T. W. (1980) In "*Electron Microscopy at Molecular Dimension*" (Eds. Baumeister, W. and Vogell, W.).
Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. 137-142.
- CHOUMET, V.; JIANG, M. S.; RADVANYI, F.; OWNBY, C. e BON, C. (1989). *FEBS Lett.* 244, 167-173.
- COLOWICK, S. P. e KAPLAN, N.O. (1955). *Methods in Enzymology*
,vol. I, Academic Press. New York.
- CRAIEVICH A. e DUJOVNY E. P. (1973), *J. M. Sci.*, 8, 1165-1170.
- de AZEVEDO Jr., W. F., WARD, R. J., LOMBARDI, F. R., GIGLIO J. R., SOARES A. M., FONTES, M. R. M. e ARNI, R. K. (1997a).
Protein and Peptide Letters, 4,329-334.



- de AZEVEDO Jr., W. F., WARD, R. J., CANDURI, F., SOARES A. M., GIGLIO J. R. e ARNI, R. K. (1997b). *Toxicon* (in Press).
- DENNIS, E. A. (1994). *J. Biol. Chem.*, 269, 13057-13060.
- DEUTSCHER P. M. (1990), *Methods in Enzymology*, V. 182 (Guide to protein purification) Ed. Academic Press Inc., San Diego, California.
- DICCIANNI, M. B., McLEAN, L. R., STUART, W. D., MISTRY, M. J., GIL, C. M. e HARMONY, J. A. K. (1990). *Biochim. Biophys. Acta*, 1082, 85-93.
- DIJKSTRA, B. W.; KALK, K. H. ; HOL, W. G. J. e DRENT, J. (1981). *J. Mol. Biol.* 147, 97-123.
- DIJKSTRA, B. W.; RENETSEDER, R.; KALK, K. H.; HOL, W. G. J. e DRENT, J. (1983). *J. Mol. Biol.* 168, 163-179.
- DOS SANTOS, M. C.; DINIZ, C. R.; WHITAKER PACHECO, M. A. e DIAS DA SILVA, W. (1988). *Toxicon* 26, 207-213.
- ESSEX, H. F. e MARKOWITZ, J. (1930). *Amer. J. Physiol.* 92, 317-335.
- FAURE, G. e BON, C. (1987). *Toxicon* 25, 229-234.
- FAURE, G. e BON, C. (1988). *Biochemistry* 27, 730-738.



- FAURE, G.; HARVEY, A. L.; THOMSON, E.; SALIOU, B.; RADVANYI, F. e BON, C. (1993). *Eur. J. Biochem.* 214, 491-496.
- FRAENKEL-CONRAT, H. e SINGER, B. (1956). *Arch. Biochem. Biophys.* 60, 64-73.
- GABILAN, N. H. (1984). Tese de Mestrado. Departamento de Bioquímica/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.
- GLATTER, O. (1980). *Acta. Phys. Austr.* 52, 243-256.
- GLATTER, O. e KRATKY, O. (1982). *Small Angle X ray Scattering*, 5, pp 167-179, Academic Press Inc. Ltd. , Londres .
- GRALÉN, N. e SVEDBERG, T. (1938). *Biochem. J.*, 32, 1375
- GUINIER, A. (1963). *X ray diffraction in cristals, imperfect cristals and amorphus bodies*. San Francisco, Freeman, 1963.
- HANAHAN, D. J. (1971). *The Enzymes* - Ed. Boyer. Vol. V - 3ª Ed.
- HENDON, R. A. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 1560-1563.
- HENDON, R. e TU, A.T. (1979). *Biochim. Biophys. Acta.* 578, 253-257.
- HIDER, R. C., KARLSSON, E. e NAMIRANIAN, S. (1991). In *"Snakes Toxins"*, Harvey, A. L., Ed. Pergamon Press, Inc. New York, pp. 1-34.



- HORST, J., HENDON, R. A. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1972).
Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 1042-1047.
- JENG, T. W. & FRAENKEL-CONRAT, H. L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 70: 1324.
- JENG, T. W.; HENDON, R. A. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1978).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 600-604.
- JOHANSEN, B., KRAMER, R. M., HEISSON, C., McGRAY, P. e
PEPINSKY, R. B. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187,
1, 544-551.
- KAISER, I. I., MIDDLEBROOK, J. L.; CRUMRINE, M. H. e
STEVENSON, W. W. (1986). *Toxicon* 24, 669-678.
- KUDO, I., MURAKAMI, M., HARA, S. e INOUE, K. (1993).
Biochem. Biophys. Acta 117, 217-231.
- LAEMMLI, U. K. (1970). *Nature*, **227**, 680-685.
- LI, C. H. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1942). *J. Amer. Chem. Soc.*
64, 1586-1588.
- MASCARENHAS, Y. P.; STOUTEN, P. F. W.; BELTRAN, J. R.;
LAURE, C. J. e VRIEND, G. (1992). *Eur. Biophys. J.* 21, 199-205.
- MÜLLER, K. e GLATTER, O. (1982). *Makromol. Chem.* 183, 465-
479.
- OLIVIERI, J. R. , (1992)- Tese de Doutorado - IFQSC- USP



PARADIES, H. H. e BREITHAUPT, H. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 66, 496-504.

RENETSEDER, R., BRUNIE, S., DIJKSTRA, B. W., DRENTH, J. e SIGLER, P. B. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 11627-11636.

RÜBSAMEN, K., BREITHAUPT, H. e HABERMANN, E. (1971). *NaunynSchmie. Arch. Pharmak.* 270, 274-288.

SAYLE, R. (1994). Biomolecular Struture, Glaxo Research and Development, Greenford, Middlesex, UK.

SLOTTA, C. H. e FRAENKEL-CONRAT, H. L. (1938-39). *Memórias do Inst. Butantan* XII, 1-9.

STRAYER, L. (1988), *Biochemistry*, 3 ed., W. H. Freemann and Company- New York, 23, p 552 .

VITAL-BRAZIL, O. (1966). *Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac.* 33(3), 981-992.

VITAL-BRAZIL, O. ; FRANCESCHI, J. P. e WAISBICH, E. (1966a). *Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac.* 33(3), 993-1000.

VITAL BRAZIL, O.; FRANCESCHI, J. P. e WAISBICH, E. (1966b). *Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac.* 33(3), 973-980.



