

Dulcinéa Perez Brognaro

Estudo da Conformação da Fosfolipase A-2 da
Crotalus Durissus Terrificus em Solução por
Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS)



1910000702



Dulcinéa Perex Brognaro

**ESTUDO DA CONFORMAÇÃO DA FOSFOLIPASE A-2 DA
Crotalus durissus terrificus EM SOLUÇÃO POR
ESPALHAMENTO DE RAIO-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Física, Área de
Concentração em Biofísica Molecular,
do Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas, da Universidade
Estadual Paulista (UNESP), para a
obtenção do Grau de Mestre em Física.

Orientador:

Prof. Dr. José Ramón Beltran Ábrego



702/96

São José do Rio Preto
1995



Agradecimentos

À Dona Dulce, pelo amor e carinho com que cuidou de meus filhos para que este trabalho fosse concluído.

Ao professor José Ramón Beltrán Abrego, não só pela orientação, mas também pelo incentivo, ensinamentos e amizade;

Aos professores do Departamento de Física, que em cada etapa do trabalho, colaboraram com observações e sugestões e, em especial, por terem idealizado e realizado a implantação deste curso de pós-graduação,

Aos colegas pós-graduandos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Física, colegas de trabalho, que sempre estiveram à disposição;

A Reitoria da UNESP e a FAPESP que concederam bolsa de Estudo.

Ao Paulo,
Diorge e
Vitor

Agradecimentos

À Dona Dulce, pelo amor e carinho com que cuidou de meus filhos para que este trabalho fosse concluído;

Ao professor José Ramón Beltran Ábrego, não só pela orientação, mas também pelo incentivo, ensinamentos e amizade;

Aos professores do Departamento de Física, que em cada etapa do trabalho, colaboraram com observações e sugestões, e, em especial, por terem idealizado e realizado a implantação deste curso de pós-graduação;

Aos colegas pós-graduandos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Física, colegas de trabalho, que sempre estiveram à disposição;

À Reitoria da UNESP e a FAPESP que concederam a Bolsa de Estudo.



RESUMO

A crotoxina é um complexo de duas proteínas encontrado no veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*. Uma das proteínas do complexo crotoxina é uma fosfolipase A₂ (PLA₂), que não mostra apenas atividade catalítica para fosfolipídios de membrans celulares, mas também apresenta propriedades neurotóxica e hemolítica. A fosfolipase A₂ é uma proteína básica composta por uma única cadeia polipeptídica com 122 resíduos de aminoácidos.

O método de espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) permite que a molécula seja analisada em solução e fornece parâmetros moleculares como: raio de giro (R_g), volume de hidratação (V), área de superfície (S) e máxima dimensão da molécula (D). A obtenção destes dados somados à análise qualitativa da função distribuição de distâncias, p(r), permite a compreensão da sua conformação em solução, chegando-se a propor um modelo para esta importante macromolécula.

ABSTRACT

Crotoxin is a complex of two proteins found in the venom of the South America rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. One of the proteins of the complex is a phospholipase A₂ (PLA₂), which not only shows catalytic activity for cell membranes, but also possesses neurotoxic and hemolytic properties. The PLA₂ is a basic protein composed of a single polypeptide with 122 amino acid residues.

The technique of small angle X-ray scattering (SAXS) permits the study of macromolecules in solution, providing information such as the radius of gyration (R_g), volume of hydration (V), surface area (S) and maximum molecular dimensions (D). These parameters, together with a qualitative analysis of the distance distribution function, p(r), can be used to evaluate the conformation of the molecule in solution, permitting us to propose a molecular model for this important protein.



ÍNDICE	35
Normalização das curvas experimentais	35
Extrapolação a diluição infinita	39
Introdução	1
A macromolécula	2
Complexo crotoxina	2
Fosfolipase	6
Teoria de espalhamento de raio-X a baixo ângulo	11
Raio- X	11
Baixo ângulo	12
Soluções diluídas	13
Espalhamento de raio-X	13
Lei de Guinier	18
Lei de Porod	20
Invariante e Volume	21
Função distribuição de distância	21
A técnica de espalhamento de raio-X a baixo ângulo	23
Dispositivo experimental	23
Calibração do detector	24
Colimação do feixe de raio-X	26
Preparação das amostras	29
Obtenção das curvas de espalhamento	30
Dados experimentais	32

Tratamento dos dados experimentais	35
Normalização das curvas experimentais	35
Extrapolação à diluição infinita	39
Uso da Transformada de Fourier	42
Análise e discussão dos resultados	44
Conclusões e sugestões	50
Referências	51

Apesar da classificação dos animais da Classe Reptília, Ordem Squamata, Subordem Ophidia, que inclui as cobras, não ser comum aos pesquisadores da área, vários destes incluem as cobras venenosas como pertencentes a cinco famílias, são elas Elapidae, Hydrophiidae, Boigae, Viperidae e Crotalidae (Hider *et al.*, 1991).

Na família Crotalidae está incluída a cascavel sul-americana, *Crotalus durissus terrificus*, cujo veneno possui enzimas como: hialuronidase, coagulase, proteases, fosfo e mono-diesterase, como também fosfolipase. (Laure, 1988).

1. INTRODUÇÃO

1.1.1. Complexo Crotoxina

Os venenos de cobras são uma mistura de vários componentes diferentes, podendo ser tóxicos ou não-tóxicos, sendo os polipeptídios os principais; sabe-se que a toxicidade de um veneno é devida à combinação de todos os compostos nele presentes. Os venenos são encontrados em glândulas de veneno em diversos animais como cobras, escorpiões, aranhas, abelhas, vespas, marimbondos e muitos outros. Nosso interesse encontra-se no veneno de cobras.

Apesar da classificação dos animais da Classe Reptilia, Ordem Squamata, Subordem Ophidia, que inclui as cobras, não ser comum aos pesquisadores da área, vários destes incluem as cobras venenosas como pertencentes a cinco famílias, são elas: Elapidae, Hydrophiidae, Boignea, Viperidae e Crotalidae. (Hider *et al.*, 1991).

Na família Crotalidae está incluída a cascavel sul-americana, *Crotalus durissus terrificus*, cujo veneno possui enzimas como: hialuronidade, coagulase, proteases, fosfo e mono-diesterase, como também fosfolipase. (Laure, 1988).

¹ Substância do veneno da CROTALUS que POTENCIA a toxicidade e INIBE a atividade enzimática da Fosfolipase A

1.1.A MACROMOLÉCULA

1.1.1. Complexo Crotoxina

O complexo crotoxina representa aproximadamente 50% do peso seco do veneno da cobra cascavel, *Crotalus durissus terrificus* e foi obtido na forma cristalizada em 1938 por Slotta e Fraenkel-Conrat. É a fração proteica responsável por grande parte da ação tóxica e fosfolipásica do veneno total (Slotta e Fraenkel-Conrat, 1938). Estudos de difusão e ultracentrifugação (Gralén e Svedberg, 1938) mostraram que a crotoxina comportava-se como uma substância homogênea. Em seguida, por análise do comportamento eletroforético (Li e Fraenkel-Conrat, 1942), encontrou-se o ponto isoelétrico da proteína ($pI = 4,71$). Em 1951, a composição da crotoxina foi pesquisada (Slotta e Primosigh, 1951), encontrando-se dezoito tipos de aminoácidos em sua constituição. Alguns anos depois, o complexo foi fracionado em duas proteínas diferentes e as evidências para esta heterogeneidade foram baseadas em solubilidade, análise dos aminoácidos N- e C-terminais e composição de aminoácidos (Fraenkel-Conrat e Singer, 1956).

Rubsämen *et al.* (1971), usando cromatografia em carboximetilcelulose, separaram a crotoxina em duas frações e testaram suas atividades biológicas, assim como a recombinação do complexo (também investigado por Habermann *et al.*, 1972); obtiveram uma fração básica (fosfolipase A) que apresentou baixa toxicidade e atividade fosfolipásica e, outra fração ácida (crotapotina¹) sem atividade tóxica ou fosfolipásica, mas que, na

¹ Substância do veneno da CROTalus que POTencia a toxicidade e INibe a atividade enzimática da fosfolipase A.



recombinação do complexo, intensificava a atividade tóxica e inibia a atividade fosfolipásica da fração básica.

Os papéis biológicos dos dois componentes da crotoxina foram também estudados por Hendon e Fraenkel-Conrat (1971), que separaram as duas frações usando técnicas como alquilação e acilação dos grupos amino, cromatografia em carboximetil-celulose a pH 4,0 e DEAE-celulose em 6M de uréia, obtendo pesos moleculares aproximados de 8.400 daltons para a crotapotina e 13.000 daltons para a fosfolipase. Os pontos isoeletricos a pH 3,7 e 8,6, respectivamente, foram determinados por Horst *et al.* (1972), que também estudaram a atividade biológica das subunidades, observando que existe uma ação sinérgica de ambas influenciando a neurotoxicidade do veneno, embora a atividade hemolítica seja apresentada apenas pela fosfolipase. Outros valores de pontos isoeletricos para a crotapotina e fosfolipase de 3,4 e 9,7, respectivamente, e pesos moleculares de 8.900 e 15.800 daltons, respectivamente, foram observados por Breithaupt *et al.* (1974), que também realizou uma análise da composição de aminoácidos presentes nas subunidades.

O primeiro estudo sobre a forma (estruturas terciária e quaternária) da crotapotina, fosfolipase A e do complexo reconstituído, sob condições fisiológicas, foi realizado por Paradies e Breithaupt (1975) que, utilizando vários métodos, inclusive o espalhamento de raio-X a baixo ângulo, obtiveram as dimensões moleculares, observando as formas de prolato elipsóide para o complexo crotoxina, de cilindro assimétrico para a fosfolipase e, oblato elipsóide para a crotapotina; observaram também uma variação na concentração de equilíbrio entre monômeros, dímeros e tetrâmeros da fosfolipase A, dependendo do pH; dados que não conferem



com o observado posteriormente (Abrego *et al.*, 1993; Mascarenhas *et al.*, 1992).

Quando a neurotoxicidade das subunidades isoladas e do complexo reconstituído foi testada, percebeu-se um efeito de cooperação entre a crotapotina (subunidade ácida) e a fosfolipase A (subunidade básica) (Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971). A forma como a crotapotina atua na fosfolipase A, com relação à neurotoxicidade e atividade fosfolipásica, foi objeto de vários outros trabalhos (Hendon e Fraenkel-Conrat, 1976; Hendon e Tu, 1979; Jeng *et al.*, 1978). Com relação à atividade enzimática, quando a membrana alvo é encontrada, o complexo crotoxina se dissocia e a subunidade fosfolipásica liga-se, enquanto a crotapotina é liberada na solução (Chang e Lee, 77; Hawgood e Smith, 1977).

A conformação do complexo e suas subunidades foram examinadas por técnicas de fluorescência e dicroísmo circular, mostrando que a crotoxina e suas subunidades podem existir em vários estados reversíveis de conformação que estão relacionados ao controle do equilíbrio de associação-dissociação do complexo e que a interconversão conformacional pode ser necessária para a ação da crotoxina (Hanley, 1979). Em vista dos dados obtidos nos trabalhos sobre a cooperação crotapotina-fosfolipase, foi proposto que a crotapotina funciona como um “chaperone” para carregar a fosfolipase a um sítio específico (Jeng *et al.*, 1978; Chiu e Jeng, 1980). (Figura 1.1).



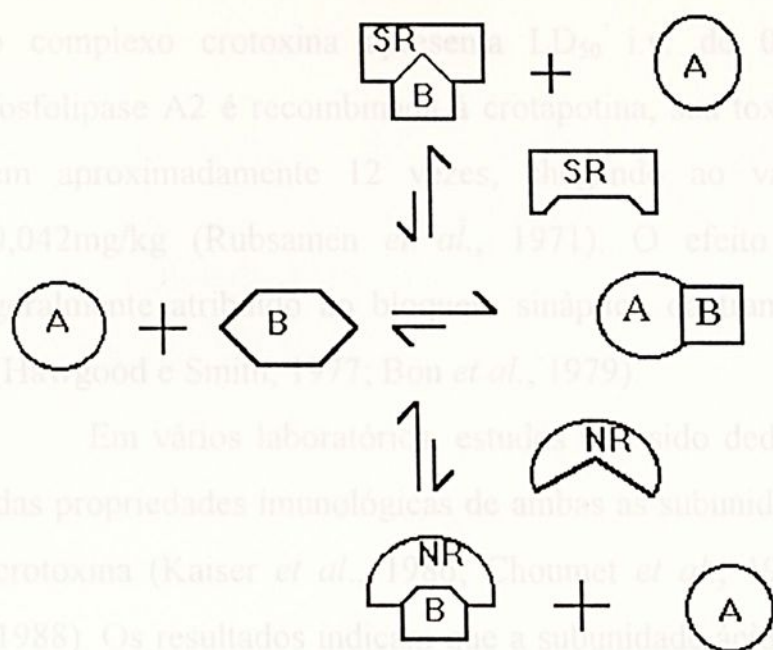


Figura 1.1. A “hipótese chaperone” para o mecanismo de ação sinérgica entre as subunidades da crotoxina. A=crotoxina A (crotapotina); B=crotoxina B (fosfolipase); SR= receptor específico; NR=Receptor não específico; de acordo com Chiu and Jeng, 1980).

Estudos da bioquímica e farmacologia do complexo crotoxina e de suas subunidades, continuaram sendo desenvolvidos. Assim como outros estudos foram realizados visando a determinação da estrutura desta macromolécula, quer por técnicas de microscopia e difração eletrônicas (Jeng e Chiu, 1983; Jeng *et al.*, 1984), quer por difração de raio-X (Achari *et al.*, 1985).

A toxicidade da crotoxina foi estudado por Vital Brazil em 1966 (Vital Brazil *et al.*, 1966; Vital Brazil, 1966; Lomba *et al.*, 1966), observando sua ação sobre a transmissão neuromuscular, seu efeito sobre os sistemas cardiovascular e respiratório, assim como sua nefrotoxicidade. Em ratos, a fosfolipase A2 crotálica apresenta LD₅₀ i.v. de 0,54mg/kg, enquanto

o complexo crotoxina apresenta LD₅₀ i.v. de 0,108mg/kg; quando a fosfolipase A2 é recombinada à crotapotina, sua toxicidade i.v. é aumentada em aproximadamente 12 vezes, chegando ao valor de LD₅₀ igual a 0,042mg/kg (Rubsamen *et al.*, 1971). O efeito letal da crotoxina é geralmente atribuído ao bloqueio sináptico da transmissão neuromuscular (Hawgood e Smith, 1977; Bon *et al.*, 1979).

Em vários laboratórios, estudos têm sido dedicados à caracterização das propriedades imunológicas de ambas as subunidades, básica e ácida, da crotoxina (Kaiser *et al.*, 1986; Choumet *et al.*, 1989; Dos Santos *et al.*, 1988). Os resultados indicam que a subunidade ácida é um imunógeno mais fraco que a subunidade básica e chegam a sugerir que a subunidade básica é uma candidata potencial à vacinação (Dos Santos *et al.*, 1988).

1.1.2. Fosfolipase

As fosfolipases (PLA) são enzimas que desempenham importante papel em diversos processos celulares incluindo o metabolismo e digestão de fosfolipídios, e em especial as PLAs de venenos, têm ação hemolítica e neurotóxica. Por fosfolipase entende-se uma classe de enzimas que hidrolisam especificamente fosfolipídios. São conhecidos quatro tipos de fosfolipases: A, B, C e D, que se distinguem pelo sítio específico de ação. A fosfolipase A2 (EC 3.1.1.4) catalisa a hidrólise de uma ligação éster, na posição 2, da molécula de fosfatídeo, com formação de lisofosfatídios e liberação de ácidos graxos livres (Condrea e Vries, 1965), sendo esta reação dependente do íon Ca²⁺. As ligações hidrolisadas pelas fosfolipases A₁, A₂, C e D (Hanahan, 1971) são mostradas na Figura 1.2.



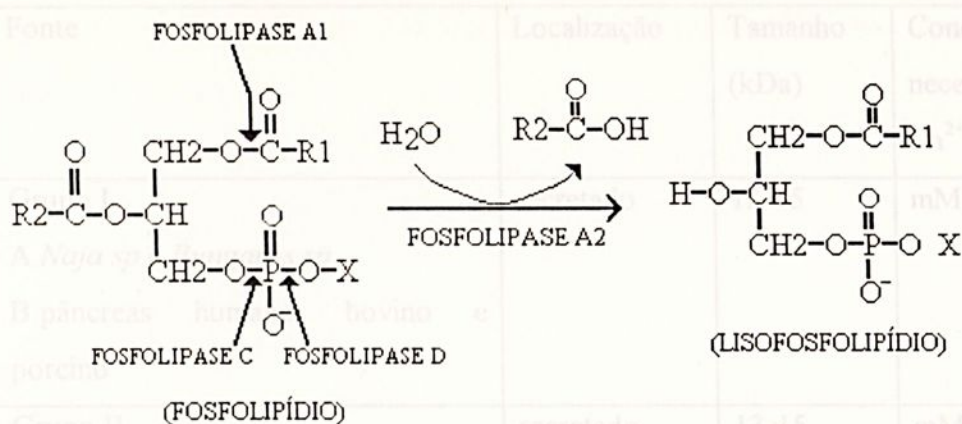


Figura 1.2. Classificação das fosfolipases de acordo com o sítio de hidrólise de 3-*sn*-fosfoglicerídios.

As PLAs têm sido encontradas em vários organismos vivos, sendo produzidas por glândulas ou mesmo intracelularmente. Muitas delas já têm suas estruturas terciárias resolvidas por cristalografia de raio-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, inclusive, utilizadas para estudos de comparação com as de venenos. Muitas, se não todas, as PLAs de venenos pertencem à classe A2 de fosfolipases (PLA2s).

Isoladas de diversas fontes, as PLA2s apresentam similaridades e divergências, que tornaram possível a sua classificação, baseada em sequência de aminoácidos, conteúdo de pontes dissulfeto, massa molecular e outras propriedades físico-químicas. A Tabela 1.1 apresenta uma recente classificação das PLA2s.

Fonte	Localização	Tamanho (kDa)	Concentração necessária de Ca^{2+}
Grupo I <i>A. Naja sp</i> e <i>Bungarus sp</i> B. pâncreas humano, bovino e porcino	secretado	13-15	mM
Grupo II A. Crotalídeos e viviperídeos; líquido sinuvial e plaquetas humanos B. <i>Bitis gabonica</i>	secretado	13-15	mM
Grupo III abelhas/lagartos	secretado	16-18	mM
Grupo IV Linhagem Raw 264.7/rim de rato; Linhagem U937 e plaquetas humanas	citossólico	85	μM
Grupo ? miocárdio canino e humano	citossólico	40	nenhum

Tabela 1.1. Grupos e subgrupos das PLA₂s. Extraída da minirevisão: Fosfolipase A₂ (Dennis, 1994).

A PLA₂ mais conhecida é a do pâncreas bovino. No suco pancreático as PLA₂s são secretadas como zimogênios e depois clivadas pela tripsina para formar a enzima ativa. A PLA₂ bovina, é constituída de uma única cadeia polipeptídica de 125 resíduos de aminoácidos, dos quais 14 são cisteínas que formam 7 pontes dissulfeto; apresenta aproximadamente 50%

de α -hélice de 10% de β -folha em sua estrutura.(Dijkstra *et al.*, 1978 e 1981) (Figura 1.3).

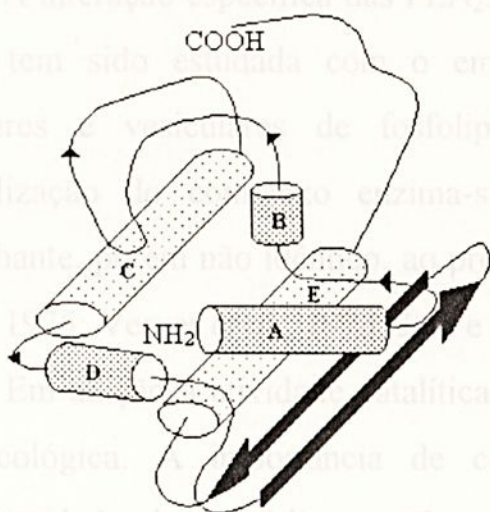


Figura 1.3. Estrutura da PLA₂ pancreática bovina de acordo com Dijkstra *et al.* (1978). As porções α -hélice estão identificadas como cilindros e as β -folha como setas em negrito. As pontes dissulfeto não estão representadas.

Como constituinte do heterodímero crotoxina, fração tóxica do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, encontra-se uma fosfolipase A₂. A sequência primária desta fosfolipase foi resolvida por Aird *et al.* (1986); é composta de uma única cadeia polipeptídica com 122 resíduos de aminoácidos, apresentando 7 pontes dissulfeto, com aproximadamente 14kDa de massa molecular, apresenta baixa toxicidade e atividade fosfolipásica.

O mecanismo de ação das PLA₂s têm sido muito investigado. Trabalho de Scott *et al.* (1990) propõe um modelo para o mecanismo catalítico para estas enzimas; o resíduo His-48, que faz parte do sítio ativo, é auxiliado pela Asp-99 e pelo “loop” de ligação do íon Ca²⁺, que é

coordenado pelos resíduos Asp-49, Gli-28, Gli30 e Gli-32 e duas moléculas de água.

A interação específica das PLA₂s com a superfície de contato lipídio-água, tem sido estudada com o emprego de substratos monoméricos, micelares e vesiculares de fosfolípidios. As etapas de formação e estabilização do complexo enzima-substrato parece seguir um padrão semelhante, porém não idêntico, ao proposto por Michaelis-Menten (Deems *et al.*, 1975; Verger *et al.*, 1973; Jain e Maliwal, 1993).

Em adição à atividade catalítica, as PLA₂ de venenos mostram ação farmacológica. A importância de certos resíduos de aminoácidos na neurotoxicidade das fosfolipases têm sido muito investigada por diversos estudos das relações entre estrutura e função destas macromoléculas (Kini e Iwanaga, 1986; Yen e Tzeng, 1991; Ortiz *et al.*, 1992). A relação entre a atividade fosfolipásica e as atividades neurotóxicas e miotóxicas das PLA₂s tem sido estudada; os dados indicam que os sítios catalítico e de ligação para neuro e miotoxidade são diferentes. Preston *et al.* (1989) produziram anticorpos que reconhecem o sítio miotóxico, mas não o sítio neurotóxico; porém, se os sítios catalítico, neurotóxico e miotóxico são distintos, nada se sabe ainda sobre a localização dos dois últimos na molécula.

Trabalhos recentes de mutagênese sítio-dirigida, que envolvem a substituição de certos resíduos de aminoácidos aparentemente relacionados com as funções desempenhadas por estas macromoléculas, poderão em breve esclarecer maiores detalhes sobre a localização dos sítios de reconhecimento catalítico (Kuipers *et al.*, 1989 e 1990; Li *et al.*, 1994).



2.A TEORIA DE ESPALHAMENTO DE RAIO-X A BAIXO ÂNGULO

Sempre que raios-X passam através da matéria, os elétrons dos átomos constituintes são induzidos a oscilar na frequência das ondas incidentes e então emitir ondas secundárias, que interferem umas nas outras; a análise da interferência entre estas ondas secundárias observada a baixos ângulos compõe o fenômeno básico do espalhamento de raio-X.

As partículas em uma amostra que são responsáveis pelo espalhamento de raio-X a baixos ângulos são pequenas regiões que têm uma densidade eletrônica diferente daquelas de suas vizinhanças. Este espalhamento é produzido pela partícula em conjunto e não depende, em qualquer instância, da estrutura interna que ela pode possuir. Em outras palavras, as condições de Bragg não são satisfeitas nas expressões que descrevem espalhamento a baixos ângulos. Em caso ideal, ambos tamanho e forma das partículas podem ser determinados pela intensidade espalhada expressa como uma função do ângulo de espalhamento.

2.1. Os raios-X

Raios-X são fótons com comprimentos de onda (λ) variando de 0,1 a 100Å. Normalmente são gerados pelo bombardeamento de um alvo com elétrons de energia de 10.000 eV ou mais. Sob colisão, estes elétrons de alta energia podem chocar-se com elétrons dos átomos alvo, levando a vacâncias



nas camadas atômicas. Quando a vacância é produzida em uma camada, rapidamente haverá o preenchimento por um elétron descendente da próxima camada. Por isso, as radiações produzidas são chamadas $K\alpha$ (quando a camada de vacância é a mais interna, K, e é preenchida por um elétron da camada seguinte, L) ou $K\beta$ (quando é preenchida por um elétron descendente da camada M). Os comprimentos de ondas destas radiações serão:

$$\lambda_{K\alpha} = \frac{hc}{E_L - E_K} \quad \text{e} \quad \lambda_{K\beta} = \frac{hc}{E_M - E_K} \quad (2.1)$$

onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz e E é a energia de um estado particular (K, L ou M). Os raios-X tipicamente usados em determinação de estruturas são $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$).

2.2. Baixo ângulo

Todo fenômeno de espalhamento de ondas eletromagnéticas é governado por uma lei de reciprocidade: quanto maior, relativamente ao comprimento de onda, forem as dimensões efetivas de um objeto irradiado, tanto menor serão os ângulos de espalhamento.

Portanto, quando raios-X passam através de um objeto constituído por macromoléculas, que são muito grandes quando comparadas ao comprimento de onda usado $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), os efeitos de espalhamento são confinados a baixos ângulos, isto é, observa-se espalhamento a baixos ângulos.



2.3. Soluções diluídas

Desde que os raios-X são espalhados por elétrons, o espalhamento a baixo ângulo será sempre observado se existirem domínios com diferentes densidades eletrônicas, ou seja, quando existir inomogeneidade na densidade eletrônica entre o solvente (tampão) e o soluto (proteína).

As primeiras observações de espalhamento a baixo ângulo consideravam uma única partícula isolada; mas se considerarmos uma solução diluída de tais partículas, desde que as partículas tenham distâncias irregulares umas das outras, a distância seria grande comparada à dimensão de uma partícula individual; as intensidades espalhadas a partir das partículas individuais são simplesmente somadas. A desordem em um sistema diluído leva a uma média de todas as orientações espaciais.

2.4. Espalhamento de raio-X

Consideremos a geometria de um experimento de espalhamento de raio-X como a apresentada na Figura 2.1. A intensidade de espalhamento de raio-X dependerá da orientação da amostra relativo aos raios incidentes e espalhados; por isso definimos uma única variável S , chamada vetor espalhamento:

$$S = \frac{s}{\lambda} - \frac{s_0}{\lambda} \quad (2.2)$$



A direção de S bissecta o ângulo entre a radiação incidente e a espalhada. As dimensões de S são o inverso do comprimento, tal que S mede o número de ciclos da radiação por cm. O comprimento de S é uma função do ângulo total de espalhamento (Figura 2.2).

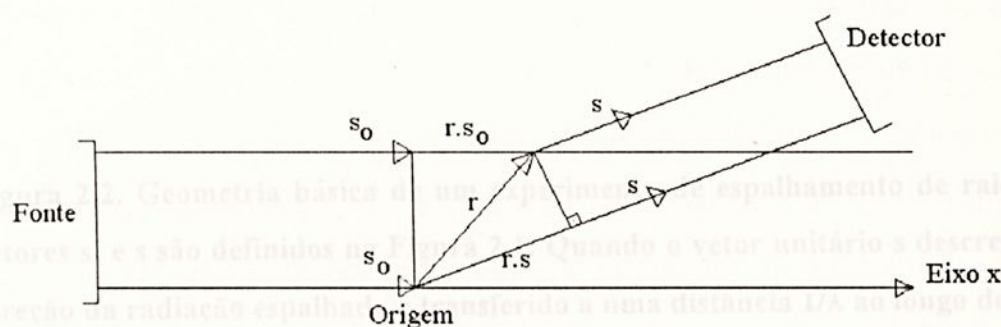


Figura 2.1. Espalhamento de raio-X por um único elétron. Uma vista ampliada próxima à origem, mostrando a diferença no caminho entre a radiação espalhada pelo elétron à posição r e a espalhada pelo elétron à origem. Os vetores s_0 e s são vetores unitários descrevendo a direção dos raios incidentes e a dos raios espalhados vistos pelo detector, respectivamente.

uma distância recíproca. Este sistema de coordenadas é chamado espaço recíproco.

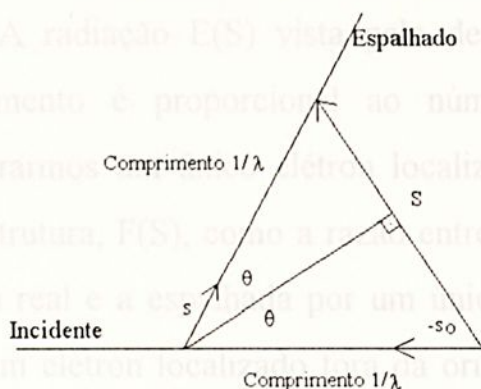


Figura 2.2. Geometria básica de um experimento de espalhamento de raio-X. Os vetores s_0 e s são definidos na Figura 2.1. Quando o vetor unitário s descrevendo a direção da radiação espalhada é transferido a uma distância $1/\lambda$ ao longo do eixo s_0 , indica diretamente a direção da extremidade do vetor espalhamento S .

$$S \cdot S = \frac{(s^2 + s_0^2 - 2s \cdot s_0)}{\lambda^2} = \frac{2(1 - \cos 2\theta)}{\lambda^2} = \frac{4\sin^2 \theta}{\lambda^2} \quad (2.3)$$

$$F(S) = \int \rho(r) \exp^{2\pi i S \cdot r} dr \quad (2.5)$$

Então o comprimento de S é

$$|S| = \frac{2|\sin \theta|}{\lambda} \quad (2.4)$$

O valor de $|S|$ pode variar de 0 a $2/\lambda$. Assim, o vetor S está descrito em um sistema finito de coordenadas no qual cada eixo tem as dimensões de

$$F(S) = \int \rho(r) \exp^{2\pi i S \cdot r} dr \quad (2.6)$$

uma distância recíproca. Este sistema de coordenadas é chamado espaço recíproco.

A radiação $E(S)$ vista pelo detector (Figura 2.1) que resulta no espalhamento é proporcional ao número de elétrons da amostra. Se considerarmos um único elétron localizado na origem, podemos definir o fator estrutura, $F(S)$, como a razão entre a radiação espalhada por qualquer amostra real e a espalhada por um único elétron na origem. Considerando agora um elétron localizado fora da origem, se a distância entre a fonte, o elétron e o detector forem grandes, os ângulos de espalhamento serão bem próximos e, a única diferença nos dois casos será a diferença no caminho que os raios-X devem percorrer da fonte à amostra ao detector; esta diferença de caminho é $(s - s_0) r$, ou seja, uma mudança de fase $S \cdot r$ ciclos.

Como os elétrons não estão localizados, necessitamos de uma densidade eletrônica $\rho(r)$ em um elemento de volume d_r , localizado a r ; o espalhamento então é proporcional a $\rho(r) d_r$. Para densidade eletrônica contínua à posição r , o fator estrutura é

$$F(S) = \rho(r) \exp^{2\pi i S \cdot r} dr \quad (2.5)$$

onde $\rho(r) dr$ é o número de elétrons no elemento de volume dr .

Uma amostra com vários elétrons como discretos sítios de espalhamento, tem um fator estrutura que é a soma de muitos termos, e pode ser substituída por uma integral:

$$F(S) = \int \rho(r) \exp^{2\pi i S r} dr \quad (2.6)$$



2.4.1. A integral está levando em conta a amostra toda. A forma matemática como ela se apresenta é equivalente a uma transformada de Fourier. Como além dos limites da amostra, $\rho(r)$ é zero, a integral pode ser estendida para o espaço total sem mudança em seu valor. Isto significa que o fator estrutura é uma transformada de Fourier do objeto, isto é, $F(S)$ é a transformada de Fourier de $\rho(r)$ e, então uma segunda integral de Fourier pode existir para relacionar estas quantidades; esta é a transformada de Fourier inversa:

$$\rho(\mathbf{r}) = \left(\frac{1}{V}\right) \int F[\mathbf{S}] \exp^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{S} \quad (2.7)$$

A integral está levando em conta todo o espaço recíproco.

Infelizmente, não é possível medir a diferença de fase ($2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}$) do fator estrutura $F(S)$. Experimentalmente o que se observa é a intensidade da radiação espalhada a um ângulo 2θ . Esta intensidade relaciona-se à amplitude do fator estrutura, $|F|$, da seguinte maneira:

$$I(S) = |F|^2 \quad (2.8)$$

Isto é, a intensidade, que é uma observação pura e pode ser real, é dada pelo quadrado da amplitude do fator estrutura.

Se a Equação 2.6 for expressa em coordenadas esféricas polares, obteremos:

$$F(S) = 4\pi \int_0^\infty \rho(r) r^2 \left[\frac{\sin 2\pi S r}{2\pi S r} \right] dr \quad (2.9)$$



2.4.1. Lei de Guinier

Pode demonstrar-se que a Equação 2.8, para partículas com todas as orientações possíveis, vem dada pela seguinte equação:

$$I(S) = \rho_e^2 V \int \gamma_o(r) \frac{\sin 2\pi S r}{2\pi S r} 4\pi r^2 dr \quad (2.10)$$

onde, ρ_e é a densidade eletrônica da partícula, V é o volume da partícula e $\gamma_o(r)$ é a função característica da partícula, definida da seguinte maneira:

$$\gamma_o(r) = \frac{V(r)}{V} \quad (2.11)$$

onde $V(r)$ é o volume de intersecção da partícula considerando todas as suas orientações possíveis (Figura 2.3).

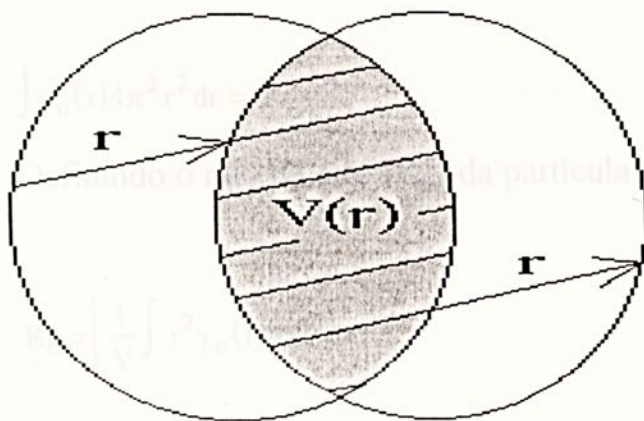


Figura 2.3. Deslocamento de uma partícula sobre si mesma, definindo $V(r)$.

Para valores pequenos do vetor espalhamento S , pode-se fazer um desenvolvimento em série.

$$\frac{\sin 2\pi S r}{2\pi S r} = 1 - \frac{4\pi^2 S^2 r^2}{6} + \frac{16\pi^4 S^4 r^4}{120} + \dots \quad (2.12)$$

Introduzindo este resultado na Equação 2.10, teremos que:

$$I(S) = \rho_c^2 V \int \gamma_o(r) \left[1 - \frac{4\pi^2 S^2 r^2}{6} + \frac{16\pi^4 S^4 r^4}{120} + \dots \right] 4\pi r^2 dr$$

$$I(S) = V \int \gamma_o(r) 4\pi r^2 dr - \frac{4\pi^2}{6} V S^2 \int 4\pi r^4 \gamma_o(r) dr + \frac{16\pi^4}{120} V S^4 \int 4\pi r^6 \gamma_o(r) dr + \dots (2.13)$$

Fazendo uso das propriedades integrais da função característica $\gamma_o(r)$, temos que:

$$\int \gamma_o(r) 4\pi r^2 dr = V \quad (2.14)$$

Definindo o raio de giro (R_g) da partícula como sendo:

$$R_g = \left[\frac{1}{V} \int r^2 \gamma_o(r) 4\pi r^2 dr \right]^{1/2} \quad (2.15)$$

e desprezando o terceiro termo da série, teremos:

$$I(S) = V^2 - \frac{4\pi^2}{6} VS^2 R_g^2 V \quad (2.16)$$

A equação acima pode também ser escrita em forma exponencial, tornando-se a seguinte expressão:

$$I(S) = \rho_c^2 V^2 \exp \left(-\frac{4\pi^2}{6} R_g^2 S^2 \right) \quad (2.17)$$

É bom lembrar que o raio de giro (R_g) é o parâmetro geométrico mais simples que pode ser obtido de um experimento de SAXS.

A Equação 2.17 é conhecida como lei de Guinier.

2.4.2. Lei de Porod

A superfície da partícula, A , pode ser deduzida a partir de outra aproximação, válida para valores grandes de S , dentro do intervalo de baixo ângulo, correspondente à região assintótica da curva de espalhamento, conhecida por lei de Porod, que vem dada pela seguinte expressão:

$$I(S) = \frac{\rho_c^2 A}{8\pi^3 S^4} \quad (2.18)$$

onde A representa a área da superfície externa da proteína.

2.4.3. Invariante (Q) da partícula e Volume

O volume da molécula (V), pode ser deduzido a partir das propriedades integrais da $I(S)$. Assim, se $I(0)$ for obtido através da lei de Guinier, o volume será obtido por:

$$V = \frac{I(0)}{4\pi \int_0^{\infty} I(S) S^2 dS} \quad (2.19)$$

onde a integral da equação é chamada de invariante (Q), ou seja,

$$Q = 4\pi \int_0^{\infty} I(S) S^2 dS \quad (2.20)$$

2.4.4. Função distribuição de distância $P(r)$

Todos esses parâmetros estruturais e ainda a máxima dimensão (D) da proteína, podem ser obtidos a partir do cálculo da função distribuição de distância, $P(r)$, definida por:

$$P(r) = 8\pi r \int_0^{\infty} S I(S) \sin(2\pi S r) dS \quad (2.21)$$



Esta função tem a mais completa informação estrutural da partícula, quer dizer, a forma que a proteína apresenta em solução, bem como a previsão da formação de dímeros ou agregados.

As referências da teoria de SAXS são: Guinier e Fournet (1955), Moore (1980), Cantor e Schimmel (1980) e Kratky (1983).

3.1. Dispositivo experimental

Os raios-X são produzidos por uma fonte geradora e atravessam um tubo com ânodo de cobre ($\lambda=1.54\text{\AA}$) de foco largo; na saída do tubo, um filtro de níquel elimina grande parte da radiação K β . O alinhamento do feixe de raio-X é feito pelo sistema de colimação de Kratky. A amostra, solução de proteína (proteína + solvente), colocada em capilar de vidro Lyndemann de 1mm de diâmetro interno aproximadamente, fica dentro do porta amostra a uma distância fixa do detector. A detecção dos raios-X é feita por um detector sensível à posição, que funciona como uma caixa fechada, onde um filamento recebe a ionização em posições determinadas, devido à incidência de fótons em um gás (Xe-CH₄) contido no detector. Um "beam stop" é colocado como anteparo ao feixe que incide a ângulo zero no detector, para evitar possíveis danos neste aparelho. Acoplado ao detector, encontra-se um conjunto eletrônico que amplifica, analisa, discrimina, soma e converte (tempo-amplitude) as ondas recebidas, encaminhando-as a um microcomputador, que os armazena e está em rede com a estação de trabalho do laboratório.



3. A TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE RAIO-X A BAIXO ÂNGULO.

O espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS), baseia-se na detecção de raios-X espalhados por uma amostra em solução.

3.1. Dispositivo experimental

Os raios-X são produzidos por uma fonte geradora e atravessam um tubo com ânodo de cobre ($\lambda=1,54\text{\AA}$) de foco largo; na saída do tubo, um filtro de níquel elimina grande parte da radiação $K\beta$. O alinhamento do feixe de raio-X é feito pelo sistema de colimação de Kratky. A amostra, solução de proteína (proteína + solvente), colocada em capilar de vidro Lyndemann de 1mm de diâmetro interno aproximadamente, fica dentro do porta amostra a uma distância fixa do detector. A detecção dos raios-X é feita por um detector sensível à posição, que funciona como uma caixa fechada, onde um filamento recebe a ionização em posições determinadas, devido à incidência de fótons em um gás (Xe-CH_4) contido no detector. Um “beam stop” é colocado como anteparo ao feixe que incide a ângulo zero no detector, para evitar possíveis danos neste aparelho. Acoplado ao detector, encontra-se um conjunto eletrônico que amplia, analisa, discrimina, soma e converte (tempo-amplitude) as ondas recebidas, encaminhando-as a um microcomputador, que os armazena e está em rede com a estação de trabalho do laboratório

computacional. De um modo bastante simples, podemos representar os experimentos de SAXS, como na Figura 3.1.

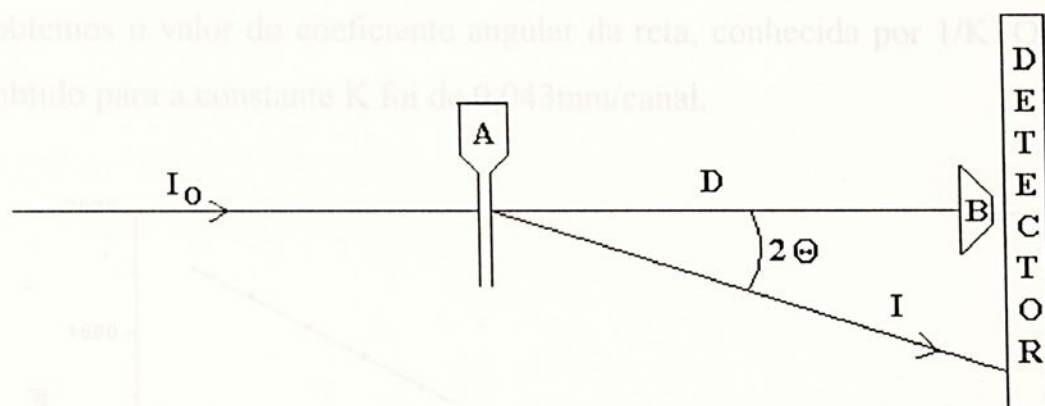


Figura 3.1. Esquema básico dos experimentos de SAXS. I_0 =feixe incidente, I =feixe espalhado, A=capilar com amostra, D=distância da amostra ao detector, 2Θ =ângulo de espalhamento, B="beam stop".

3.2. Calibração do detector

Para a correta interpretação dos dados obtidos torna-se necessária a calibração do detector, que consiste em medidas para a determinação da sua linearidade e sensibilidade. Este encontra-se montado em uma mesa que possibilita seu movimento vertical, horizontal e o movimento de distanciamento, em relação ao feixe incidente.

As condições experimentais para a calibração do detector são especiais, devido ao fato da calibração ser feita sem o "beam stop" usa-se

baixa potência na fonte geradora (20kV e 10mA) e filtros de níquel de 72 μ m de espessura na saída do tubo de raio X.

Para obtermos a linearidade do detector é preciso levantar dados da posição do detector em função do número do canal (Fig. 3.2). Do gráfico, obtemos o valor do coeficiente angular da reta, conhecida por 1/K. O valor obtido para a constante K foi de 0,043mm/canal.

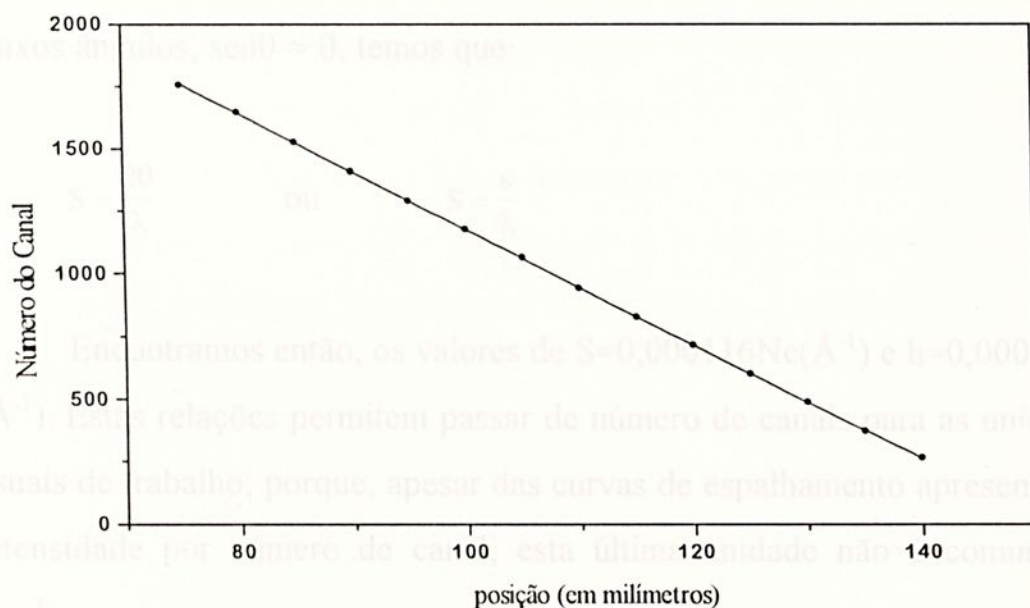


Figura 3.2. Gráfico da linearidade do detector.

Para relacionarmos o valor da constante K ao ângulo de espalhamento (ϵ ou 2θ), usamos a seguinte expressão:

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



onde N_c é o número de canais e D é a distância da amostra ao detector, que deve ser grande quando comparada ao tamanho da amostra para que seja válida a condição de baixo ângulo (utilizamos uma distância de 242mm). Obtemos o valor para ε de $0,000179N_c$ (radianos) que, transformado para graus será de $0,0103N_c$.

Definindo S e h como vetores espalhamento que se relacionam de forma que $h=2\pi S$, sendo $S=2\sin\theta/\lambda$ (Equação 2.4) e considerando que, para baixos ângulos, $\sin\theta \approx \theta$, temos que:

$$S = \frac{2\theta}{\lambda} \quad \text{ou} \quad S = \frac{\varepsilon}{\lambda} \quad (3.2)$$

Encontramos então, os valores de $S=0,000116N_c(\text{\AA}^{-1})$ e $h=0,00073N_c(\text{\AA}^{-1})$. Estas relações permitem passar de número de canais para as unidades usuais de trabalho; porque, apesar das curvas de espalhamento apresentarem intensidade por número de canal, esta última unidade não é comumente usada.

Para obtermos a sensibilidade do detector é necessário o deslocamento do mesmo, à velocidade constante, segundo o eixo x , diante de um feixe de emissão constante de fótons, espalhado por uma amostra de ferro (Fe^{56}).

3.3. Colimação do feixe de raio-X

Para a colimação do feixe de raio-X, usa-se o sistema de colimação linear, devido ao fato das amostras biológicas, fosfolipase em nosso caso,



espalharem pouco, necessitando-se então, de intensidade suficiente para obtermos um número maior de contagem, o que diminui o percentual de erro, permitindo obter os parâmetros estruturais com maior precisão. A colimação da câmara de Kratky, constituída por dois blocos que colimam o feixe e um terceiro bloco que elimina o espalhamento parasita produzido pelos dois primeiros, possibilita obter-se facilmente as condições de feixe linear infinito.

O que define as condições de trabalho do sistema de colimação é o levantamento dos perfis vertical e horizontal, que serão ferramentas fundamentais no tratamento e análise das curvas de espalhamento.

O perfil vertical é feito deslocando-se passo a passo o detector ao longo da altura do feixe. Para calcular o passo (t_h) no perfil vertical, usa-se a seguinte expressão:

$$t_h = \frac{2\pi\Delta y}{\lambda D} \quad (3.3)$$

O perfil horizontal é obtido afastando-se o anteparo do feixe direto onde Δy é o deslocamento em mm, D é a distância da amostra ao detector, λ é o comprimento de onda. Nós obtivemos o valor $t_h = 0,034 \text{ (\AA}^{-1}\text{)}$. A partir da intensidade a $h=0$ e do valor de Δt_h , podemos traçar apenas a metade do perfil vertical, que é a forma possível para a entrada de dados no programa computacional (ITP) utilizado (Fig. 3.3).



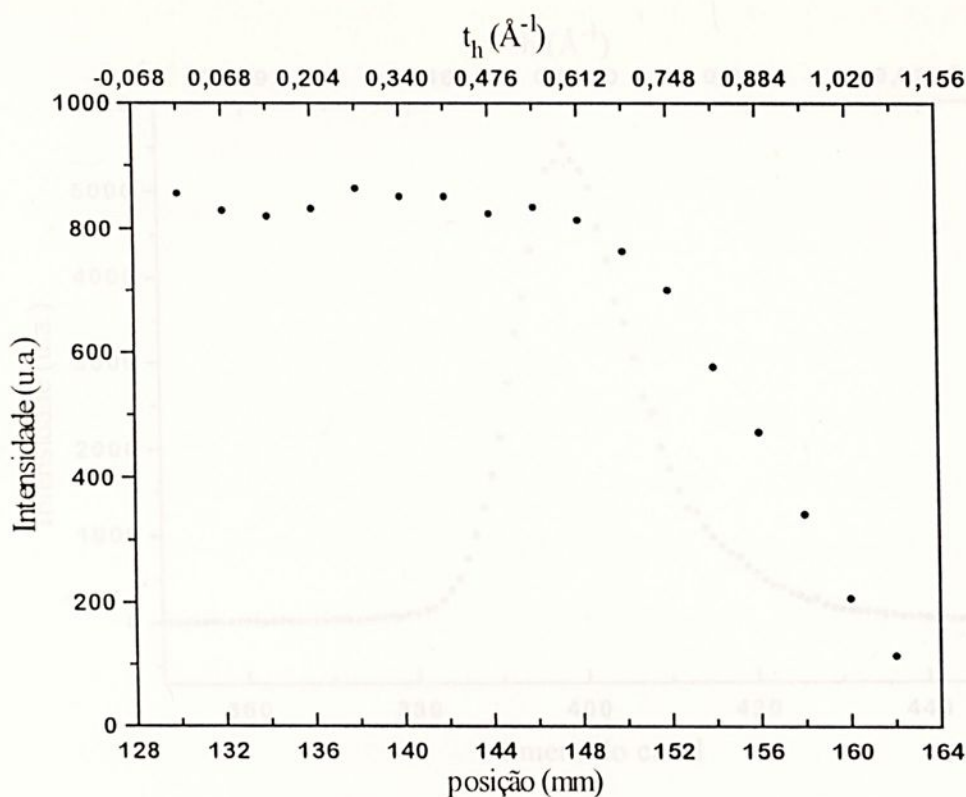


Figura 3.4: Curva do perfil horizontal. ($h = 4\pi \sin \theta / \lambda$).

Figura 3.3. Gráfico da metade do perfil vertical.

O perfil horizontal é obtido afastando-se o anteparo do feixe direto (incidente) de raio-X. O gráfico do perfil horizontal (Fig. 3.4) mostra o pico máximo, contido no canal número 400, que corresponde à posição zero do feixe incidente.

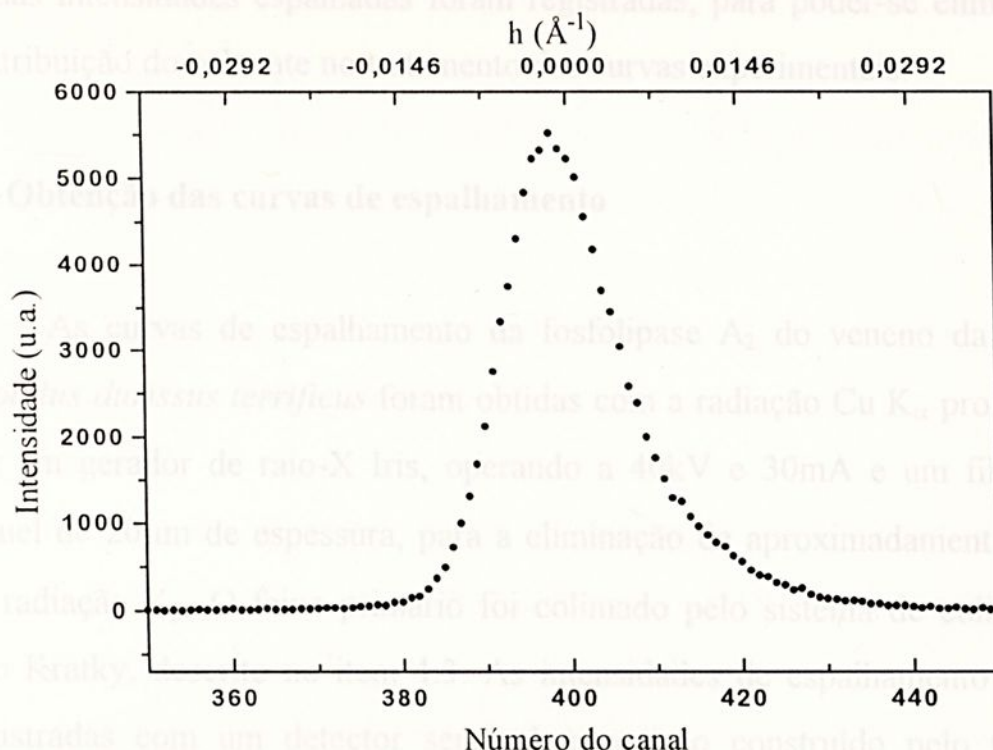


Figura 3.4. Curva do perfil horizontal. ($h=4\pi\sin\theta/\lambda$).

3.4. Preparação da amostra

A fosfolipase A₂ do veneno da cobra *Crotalus durissus terrificus* foi purificado de acordo com o procedimento de Gabilan(1984). Um estoque da solução da amostra liofilizada foi preparado em ácido fórmico 0,2M ajustado para pH 1,5 a uma concentração de 50 mg/ml. Esta solução foi posteriormente diluída para obter a proteína em concentrações de 35 e 20 mg/ml e, a cada concentração, o processo para a obtenção das intensidades espalhadas foi o mesmo. O solvente foi exposto ao dispositivo experimental amostra (50µl de solvente + 2,5mg de proteína), concentração 50mg/ml, por

e suas intensidades espalhadas foram registradas, para poder-se eliminar a contribuição do solvente no tratamento das curvas experimentais.

3.5 Obtenção das curvas de espalhamento

As curvas de espalhamento da fosfolipase A₂ do veneno da cobra *Crotalus durissus terrificus* foram obtidas com a radiação Cu K_α produzida por um gerador de raio-X Iris, operando a 40kV e 30mA e um filtro de níquel de 20μm de espessura, para a eliminação de aproximadamente 95% da radiação K_β. O feixe primário foi colimado pelo sistema de colimação tipo Kratky, descrito no item 4.3. As intensidades de espalhamento foram registradas com um detector sensível à posição construído pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF)(Barbosa, 1994), localizado a 242mm da amostra.

Para a obtenção dos dados de espalhamento por raio-X , seguiu-se o seguinte roteiro, resumidamente:

- 1°. Ajustou-se o aparelho para uma voltagem de 40kV e uma corrente de 30mA (Potência de 1.200W).
- 2°. Mediu-se a intensidade do feixe direto (apenas com uma amostra padrão de lupolen) por 100s.
- 3°. Mediu-se a intensidade do lupolen e do capilar contendo apenas solvente, por 100s. Após esse tempo, retirou-se o lupolen e mediu-se a intensidade do solvente por 18.000s.
- 4°. Mediu-se a intensidade do lupolen e do capilar contendo a solução da amostra (50μl de solvente + 2,5mg de proteína), concentração 50mg/ml, por



100s. Após esse tempo, retirou-se o lupolen e mediu-se a intensidade desta solução por 18.000s.

5º. Adicionou-se solvente na amostra para diluí-la à concentração de 35mg/ml e mediu-se por mais 18.000s. Esta etapa foi repetida para a concentração de 20mg/ml para análise; os tempos de medições foram constantes; as quantidades de solvente adicionadas para obter-se as concentrações desejadas foram obtidas por cálculo simples de diluição ($M_1V_1=M_2V_2$).

Obs₁: As soluções são colocadas em um capilar de vidro Lyndemann com aproximadamente 1.0mm de diâmetro interno para coleta das intensidades de espalhamento.

Obs₂: A cada adição de solvente, deve-se centrifugar o capilar com muito cuidado para não haver precipitação, para possibilitar uma boa mistura do solvente e soluto.

Obs₃: A cada conjunto de dados é necessário o seu arquivamento no sistema computacional conectado ao detector.

na forma como são obtidas primariamente, isto é, as intensidades em contagens versus o número de canal. A relação entre o número de canal e o vetor de espalhamento h é dado pelas condições de calibração do aparelho de raio-X.



4. DADOS EXPERIMENTAIS

Na Tab. 4.1 apresentamos as intensidades espalhadas pelo lupolen a um ângulo fixo (0.7°) que é proporcional à intensidade do feixe direto, assim como o tempo de exposição das amostras sem o lupolen.

	ác. fórmico	50 mg/ml	35 mg/ml	20 mg/ml
Jd	239,4	204,4	202,7	233,3
Δt (s)	18.000	18.000	18.000	18.000

Tabela 4.1. Dados da intensidade do feixe direto (J_d), do tempo de exposição (Δt) das amostras.

As curvas de espalhamento apresentadas a seguir correspondem às curvas do solvente e das soluções com amostra nas diferentes concentrações na forma como são obtidas primariamente, isto é, as intensidades em contagens versus o número de canal. A relação entre o número de canal e o vetor de espalhamento h é dado pelas condições de calibração do aparelho de raio-X.

Figura 4.2. Curva de espalhamento da fosfolipase A₂ da C. d. l. a pH 1,5 concentração 50mg/ml sem correções, como fornecidas pelo dispositivo experimental.

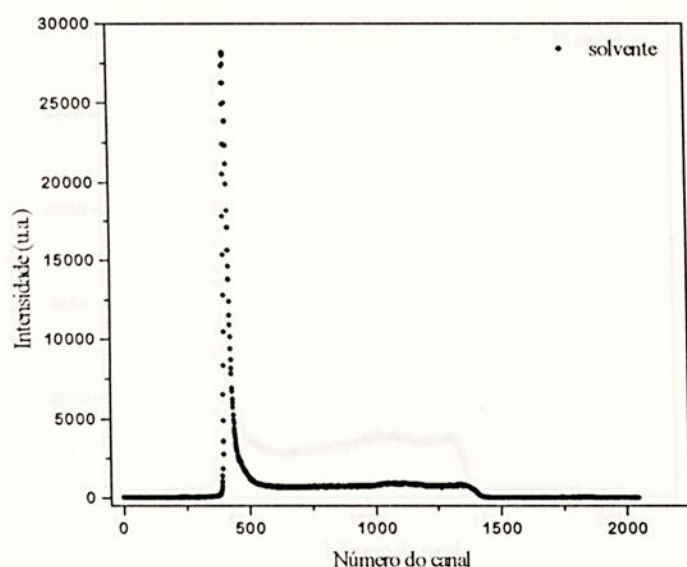


Figura 4.1. Curva de espalhamento do ácido fórmico 0,2M pH 1,5 a 25°C. concentração 35mg/ml sem correções, como fornecidas pelo dispositivo experimental.

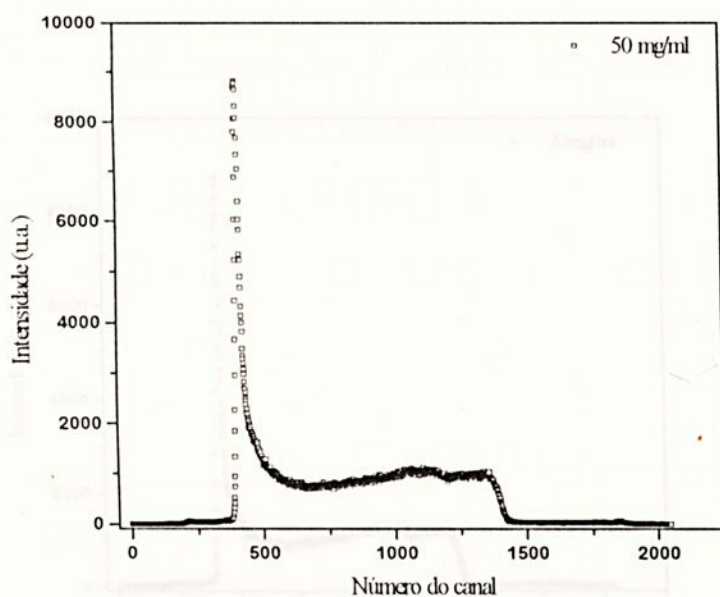


Figura 4.2. Curva de espalhamento da fosfolipase A₂ da *C. d. t.* a pH 1,5 concentração 50mg/ml sem correções, como fornecidas pelo dispositivo experimental.

5. TRATAMENTO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

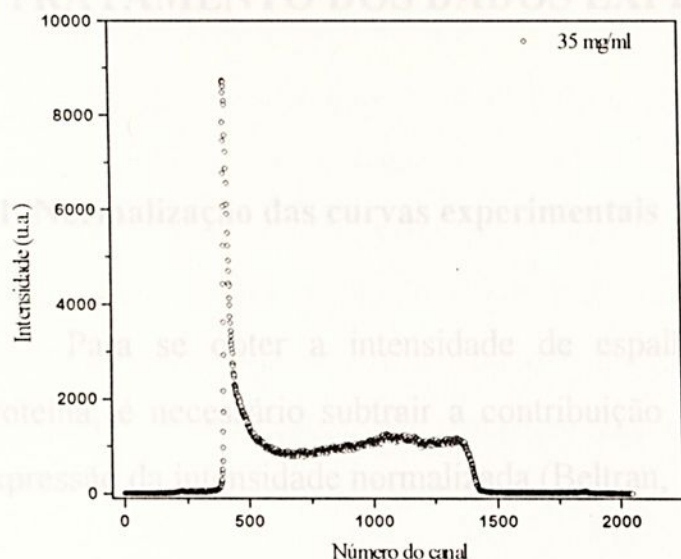


Figura 4.3. Curva de espalhamento da fosfolipase A₂ da *C. d. t.* a pH 1,5 concentração 35mg/ml sem correções, como fornecidas pelo dispositivo experimental.

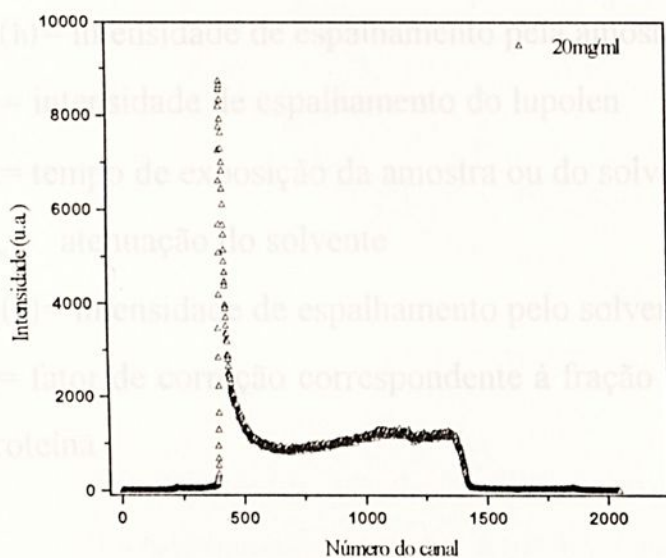


Figura 4.4. Curva de espalhamento da fosfolipase A₂ da *C. d. t.* a pH 1,5 concentração 20mg/ml sem correções, como fornecidas pelo dispositivo experimental.

5. TRATAMENTO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

5.1. Normalização das curvas experimentais

Para se obter a intensidade de espalhamento devido somente à proteína, é necessário subtrair a contribuição do capilar e do solvente. A expressão da intensidade normalizada (Beltran, 1987) é dada por :

$$J_n(h) = \frac{A_a J_a(h)}{\text{Ln} A_a J_d \Delta t} - (1 - \omega) \frac{A_s J_s(h)}{\text{Ln} A_s J_d \Delta t} \quad (5.1)$$

onde:

A_a = atenuação da amostra (proteína + solvente)

$J_a(h)$ = intensidade de espalhamento pela amostra

J_d = intensidade de espalhamento do lupolen

Δt = tempo de exposição da amostra ou do solvente

A_s = atenuação do solvente

$J_s(h)$ = intensidade de espalhamento pelo solvente

ω = fator de correção correspondente à fração do volume total ocupado pela proteína

A atenuação é definida como a razão entre a intensidade do feixe incidente pela intensidade do feixe transmitido. No caso, o feixe incidente é a intensidade espalhada pelo lupolen a um valor de ângulo fixo conveniente,

e o feixe transmitido é a intensidade espalhada pelo lupolen mais a amostra (ou o solvente), no mesmo ângulo.

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

Para realizarmos esta operação utilizamos um programa de computação. Como resultado deste tratamento dos dados, obtém-se as curvas de espalhamento normalizadas e livres da contribuição do solvente para cada concentração, que são apresentadas na Fig. 5.1.

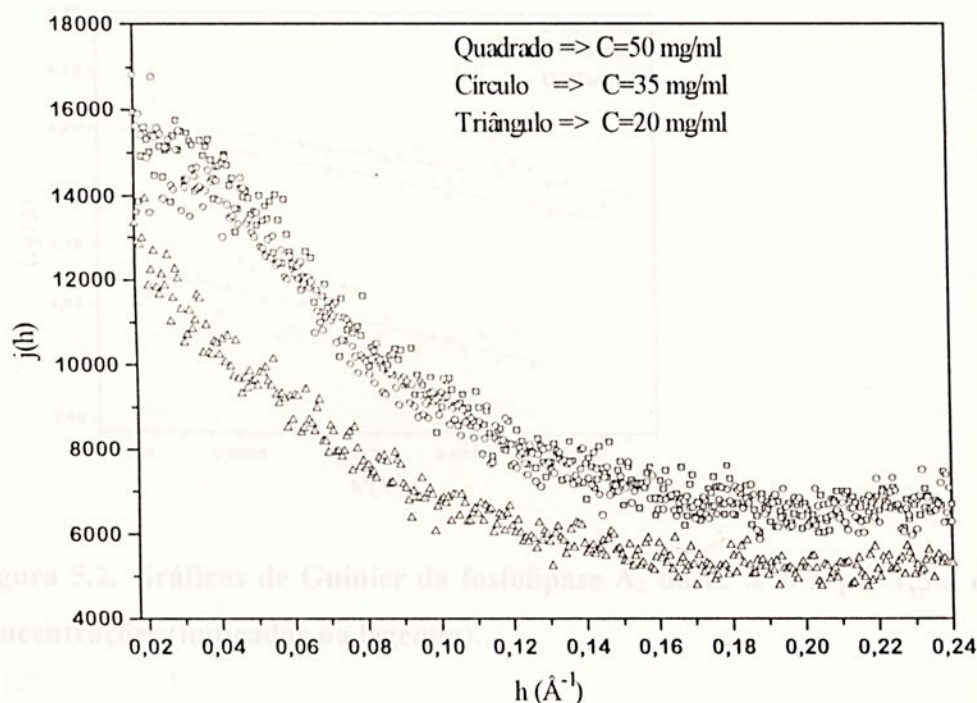


Figura 5.1. Curvas de espalhamento normalizadas e livres de espalhamento parasita da fosfolipase A_2 da *C. d. t.* a pH 1,5 a diferentes concentrações (indicadas na legenda).

Para a obtenção do parâmetro raio de giro, R_g , necessitamos dos gráficos de Guinier ($\log J \times h^2$) para os valores de $h < 1/R_g$ estimado. O resultado é uma reta, cuja inclinação α é usada na expressão :

$$\alpha = \frac{1}{3} R_g^2 \log e, \quad (5.2)$$

de onde se obtém o valor do R_g . Os gráficos de Guinier são apresentados na Fig. 5.2, para as várias concentrações analisadas.

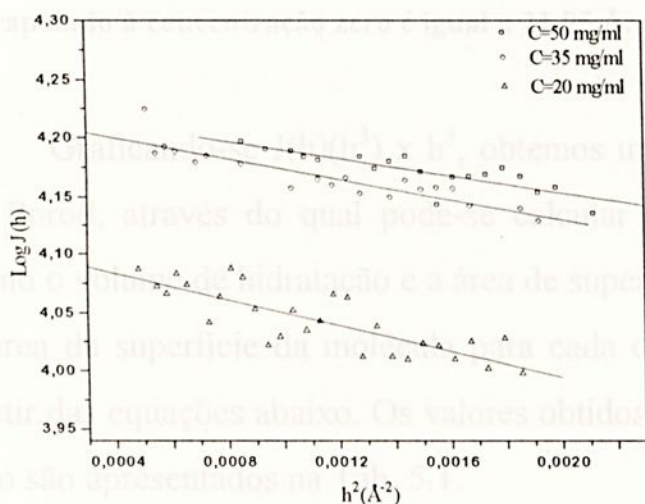


Figura 5.2. Gráficos de Guinier da fosfolipase A_2 da *C. d. t.* a pH 1,5 a diferentes concentrações (indicadas na legenda).

Os valores do raio de giro obtidos de acordo com a expressão acima são apresentados na Fig. 5.3, como um gráfico do raio de giro versus a concentração.

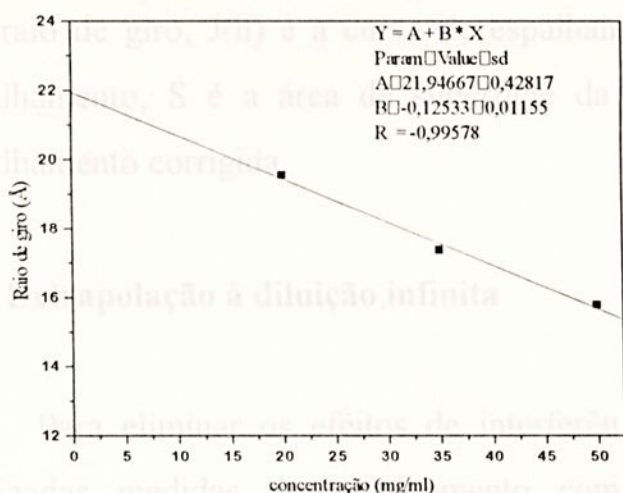


Figura 5.3. Gráfico do raio de giro versus a concentração. O valor do raio de giro extrapolado à concentração zero é igual a 21,95 Å.

Gravando-se $J(h)(h^3) \times h^3$, obtemos um gráfico chamado de gráfico de Porod, através do qual pode-se calcular outros parâmetros estruturais como o volume de hidratação e a área de superfície da molécula. O volume e a área da superfície da molécula para cada concentração são calculados a partir das equações abaixo. Os valores obtidos para o volume, área e raio de giro são apresentados na Tab. 5.1.

$$V = \frac{4\pi^2}{\sqrt{3}\pi} \frac{J(0)R}{\int_0^\infty J(h)h dh} \quad (5.3)$$

$$S = \frac{V^2 \lim_{h \rightarrow \infty} [I(h)h^4]}{2\pi I(0)} \quad (5.4)$$

onde V é o volume da partícula, $J(0)$ é a intensidade para valores de $h=0$, R é o raio de giro, $J(h)$ é a curva de espalhamento, h é o módulo do vetor espalhamento, S é a área de superfície da molécula, $I(h)$ é a curva de espalhamento corrigida.

5.2. Extrapolação à diluição infinita

Para eliminar os efeitos de interferência interpartículas, devem ser realizadas medidas de espalhamento com amostras de concentrações decrescentes, possibilitando assim, a extrapolação à concentração zero (ou diluição infinita). Isto se faz necessário porque toda a teoria de espalhamento baseia-se na não interferência entre o espalhamento produzido por cada partícula.

Para isso, utilizamos um programa de computação que normaliza cada curva de espalhamento pela sua respectiva concentração e depois calcula para cada ponto angular o valor extrapolado para a concentração zero, usando o método de mínimos quadrados. Os resultados desta extrapolação podem ser vistos nas Fig. 5.4.



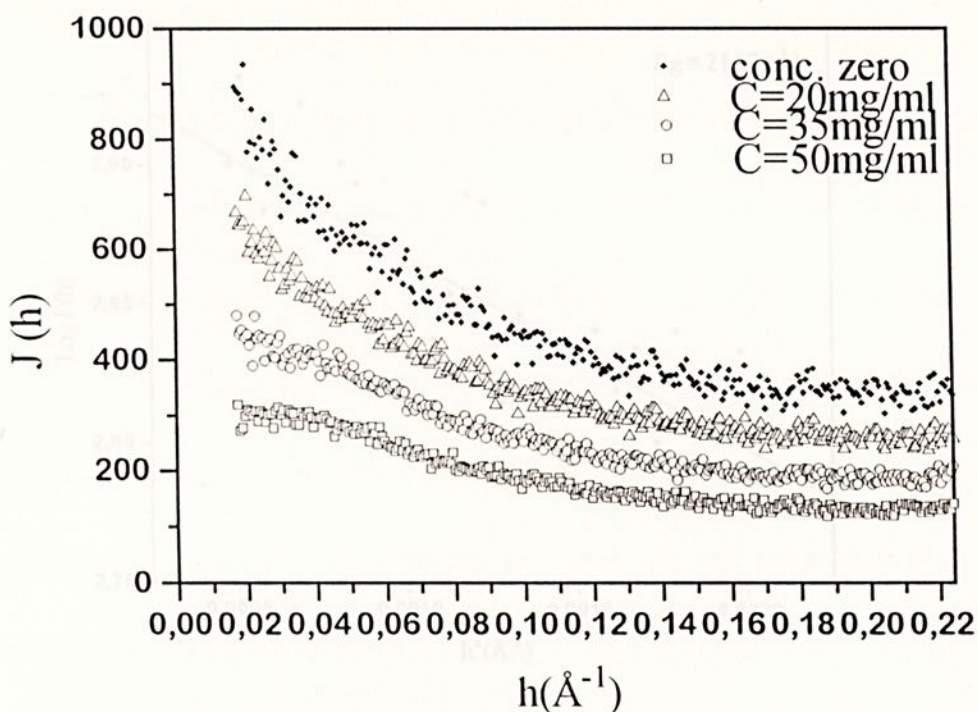


Figura 5.4. Curvas de espalhamento da *C. d. t.* a pH 1,5 em diferentes concentrações e extrapolada à concentração zero normalizadas.

O gráfico de Guinier para a extrapolação à concentração zero pode ser observado na Fig. de 5.5. Os resultados do cálculo de raio de giro, do volume e área da partícula estão indicados na Tab. 5.1 juntamente com os mesmos parâmetros obtidos para as várias concentrações.

Tabela 5.1. Valores de volume, área de superfície e raio de giro da fosfolipase A₂ de *C. d. t.* a pH 1,5 para as diferentes concentrações e para a extrapolação à concentração zero.

5.3. Uso da Transformada de Fourier

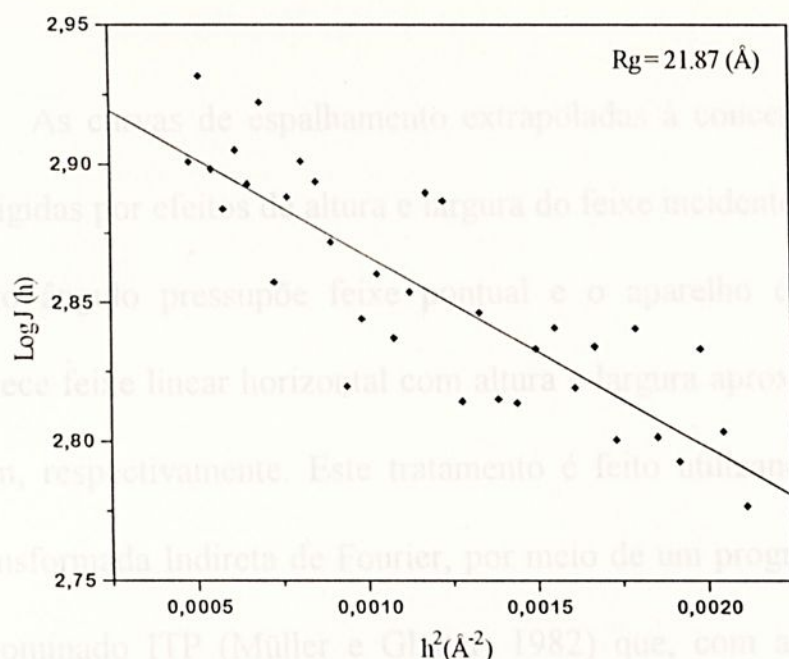


Figura 5.5. Gráfico de Guinier da fosfolipase da *C. d. t.* a pH 1,5, extrapolada à concentração zero.

	50mg/ml	35mg/ml	20mg/ml	conc.=zero
Rg (Å)	15.78	17.36	19.54	21.87
V (Å ³)	58.635	59.626	78.600	80.273
A (Å ²)	9.628	9.660	13.282	16.759

Tabela 5.1. Valores de volume, área de superfície e raio de giro da fosfolipase A₂ de *C. d. t.* a pH 1,5 para as diferentes concentrações e para a extrapolação à concentração zero.

5.3. Uso da Transformada de Fourier

As curvas de espalhamento extrapoladas à concentração zero foram corrigidas por efeitos de altura e largura do feixe incidente, já que a teoria de baixo ângulo pressupõe feixe pontual e o aparelho de raio-X utilizado fornece feixe linear horizontal com altura e largura aproximadas de 22mm e 1mm, respectivamente. Este tratamento é feito utilizando-se o método de Transformada Indireta de Fourier, por meio de um programa computacional denominado ITP (Müller e Glatter, 1982) que, com as curvas corrigidas $[I(h)]$ (Fig. 5.6) para feixe pontual, calcula a função distribuição de distância, $p(r)$, experimental apresentada na Fig. 5.7 e fornece o raio de giro, no caso igual a 23,69 Å, que é calculado através da seguinte expressão:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^\infty p(r)r^2 dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr} \quad (5.5)$$

Esta forma de calcular o raio de giro leva em consideração toda a curva de de intensidade de espalhamento, porisso seu resultado é mais preciso que o



calculado pelo método de Guinier (equações 2.17 e 5.2), o qual só é válido para a região de $S(\text{ou } h) \rightarrow 0$.

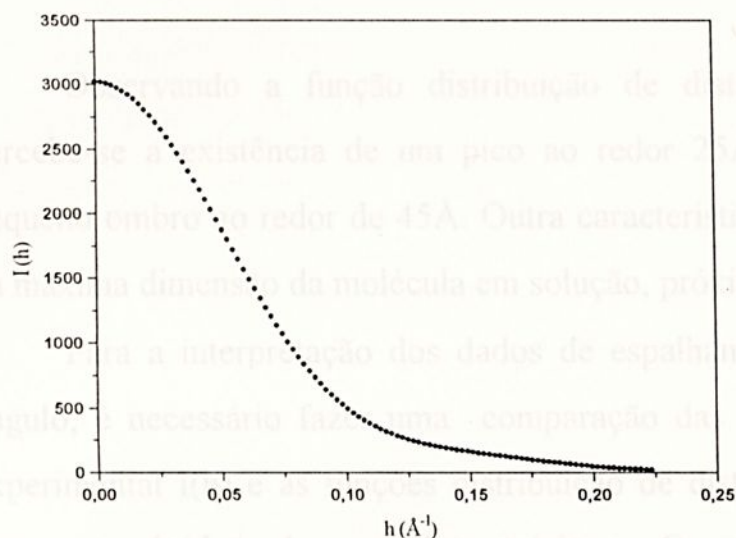


Figura 5.6. Curva de espalhamento corrigida da PLA₂ da *C.d.t.* em pH 1,5.

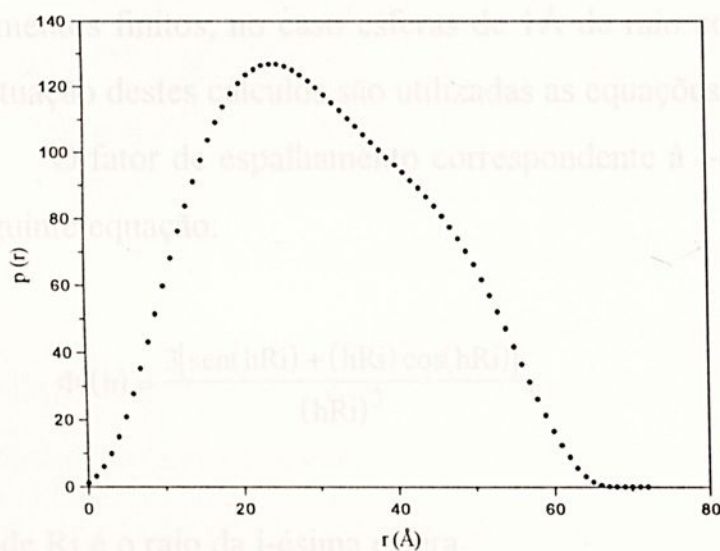


Figura 5.7. Gráfico da função distribuição de distância, $p(r)$, da fosfolipase A₂ da cobra *C. d.t.*, pH 1,5.

6. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

$$I(h) = \sum_{i=1}^N v_i^2 \rho_i^2 \phi_i(h) + 2 \sum_{i=1}^N \sum_{k=i+1}^N v_i v_k \rho_i \rho_k \phi_{ik}(h) \frac{\sin(h d_{ik})}{h d_{ik}} \quad (6.2)$$

Observando a função distribuição de distância - $p(r)$, Fig. 5.7, percebe-se a existência de um pico ao redor 25Å e a formação de um pequeno ombro ao redor de 45Å. Outra característica que se nota é o valor da máxima dimensão da molécula em solução, próximo a 65Å.

Para a interpretação dos dados de espalhamento de raio-X a baixo ângulo, é necessário fazer uma comparação das curvas de espalhamento experimental $I(h)$ e as funções distribuição de distância $p(r)$ experimentais com as obtidas de modelos teóricos. O programa computacional MULTIBODY (Glatter, 1980) calcula a função distribuição de distâncias, $p(r)$, e a função espalhamento, $I(h)$, de modelos, usando a teoria de elementos finitos, no caso esferas de 1Å de raio como subunidades. Para a efetuação destes cálculos são utilizadas as equações abaixo.

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

$$\Phi_i(h) = \frac{3[\sin(hR_i) + (hR_i) \cos(hR_i)]}{(hR_i)^3}, \quad (6.1)$$

onde R_i é o raio da i -ésima esfera.

A curva de espalhamento do modelo é dada por:



$$I(h) = \sum_{i=1}^n v_i^2 \rho_i^2 \phi_i^2(h) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n \rho_i \rho_k v_i v_k \phi_i(h) \phi_k(h) \frac{\sin(h \cdot d_{ik})}{h \cdot d_{ik}}, \quad (6.2)$$

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 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:

$$p(r) = \sum_{i=1}^n \rho_i^2 p_o(r, R_i) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n \rho_i \rho_k \bar{p}(r, d_{ik}, R_i, R_k), \quad (6.3)$$

onde $p_o(r, R_i)$ 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 .

Esse modelo é construído a partir de subunidades de tamanho próximo ao encontrado para a fosfolipase através de dados cristalográficos; ele consiste de dois elipsóides prolatos de semi-eixos $a=b=15\text{\AA}$ e $c=29\text{\AA}$.

As Figs. 6.1 e 6.2 apresentam, respectivamente, a curva de espalhamento, $I(h)$, e a função distribuição de distâncias, $p(r)$, do modelo comparadas às experimentais.

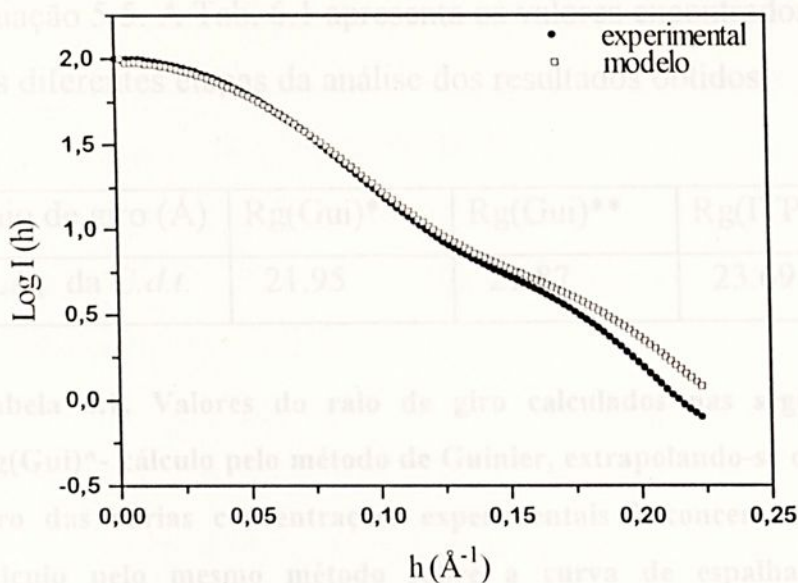


Figura 6.1. Gráfico da comparação das curvas de espalhamento do modelo e experimental da PLA₂ da *C.d.t.* em pH 1,5.

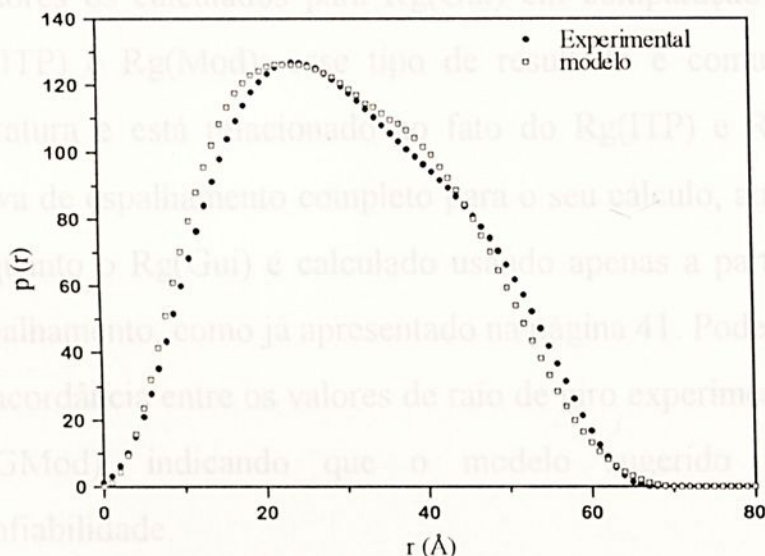


Figura 6.2. Gráfico da comparação da função de distribuição de distâncias do modelo e experimental da PLA₂ da *C.d.t.* em pH 1,5.

O programa calcula também o raio de giro do modelo, a partir da equação 5.5. A Tab. 6.1 apresenta os valores encontrados para o raio de giro nas diferentes etapas da análise dos resultados obtidos.

Raio de giro (Å)	Rg(Gui)*	Rg(Gui)**	Rg(ITP)	Rg(Mod)
PLA ₂ da C.d.t.	21.95	21.87	23.69	23.14

Tabela 6.1. Valores do raio de giro calculados nas seguintes circunstâncias:
Rg(Gui)*- cálculo pelo método de Guinier, extrapolando-se os valores para raio de giro das várias concentrações experimentais à concentração zero; **Rg(Gui)****- cálculo pelo mesmo método sobre a curva de espalhamento extrapolada à concentração zero; **Rg(ITP)**- cálculo considerando-se a função distribuição de distâncias experimental; e, **Rg(Mod)**- cálculo considerando-se a função distribuição de distâncias do modelo.

Na tabela acima, observa-se valores diferentes de raio de giro, sendo menores os calculados para Rg(Gui) em comparação aos calculados para Rg(ITP) e Rg(Mod); esse tipo de resultado é comumente observado na literatura e está relacionado ao fato do Rg(ITP) e Rg(Mod) utilizarem a curva de espalhamento completo para o seu cálculo, através da equação 5.5, enquanto o Rg(Gui) é calculado usando apenas a parte inicial da curva de espalhamento, como já apresentado na página 41. Pode-se também observar a concordância entre os valores de raio de giro experimental (RgITP) e teórico (RGMod), indicando que o modelo sugerido apresenta uma boa confiabilidade.

Analisando qualitativamente as curvas de espalhamento experimental e do modelo, Fig. 6.1, observa-se uma sobreposição em uma região angular



extensa e um pequeno afastamento para valores maiores de h , devido ao fato da curva de espalhamento experimental conter um erro estatístico maior nessa região. O gráfico apresenta $\text{Log } I(h) \times h$, apenas por conveniência.

A função distribuição de distância, $p(r)$, possui as informações sobre a forma e o tamanho do objeto espalhador, constituindo-se numa ferramenta imprescindível para as análises e conclusões finais do trabalho de espalhamento de raio-X a baixo ângulo.

Uma primeira observação a ser feita na função distribuição de distâncias, Fig. 5.7, é o ombro que aparece na curva experimental na região de $40 < r < 45 \text{ \AA}$, que está relacionado às distâncias entre os centros espalhadores de duas subunidades distintas, ou seja, entre um monômero e outro, o que nos levou à construção do modelo como um dímero. Quanto ao pico que aparece na curva experimental em $r \sim 25 \text{ \AA}$, este está relacionado às distâncias entre os centros espalhadores dentro de cada subunidade (ou monômero), esse fato foi considerado para a construção de um modelo que apresentasse essa característica, o que resultou na presença do pico em $r \sim 25 \text{ \AA}$ também na curva teórica (Fig. 6.2).

A aparente dimerização da molécula em solução, que teoricamente não deveria ocorrer nas condições experimentais de realização do trabalho (pH 1,5), pode ser devida às altas concentrações das soluções (50, 35 e 20mg/ml) necessárias ao espalhamento de raio-X a baixo ângulo. A não abertura da cadeia principal (desnaturação) neste pH pode ser devida à presença na macromolécula de sete pontes dissulfeto que estabilizam a sua conformação.

O modelo foi construído levando-se em conta a aparente dimerização da macromolécula nas condições de pH, concentração e temperatura em que



o experimento foi realizado e está apresentado na Fig. 6.3, que mostra o modelo do dímero idealizado e utilizado como base das informações fornecidas aos cálculos da curva de espalhamento e função distribuição de distância do modelo. Como já mencionado, o modelo é composto de dois prolatos elipsóides de semi-eixos $a=b=15\text{\AA}$ e $c=29\text{\AA}$, havendo uma inclinação aproximada de 67° entre os dois monômeros, inclinação esta obtida após muitas tentativas.

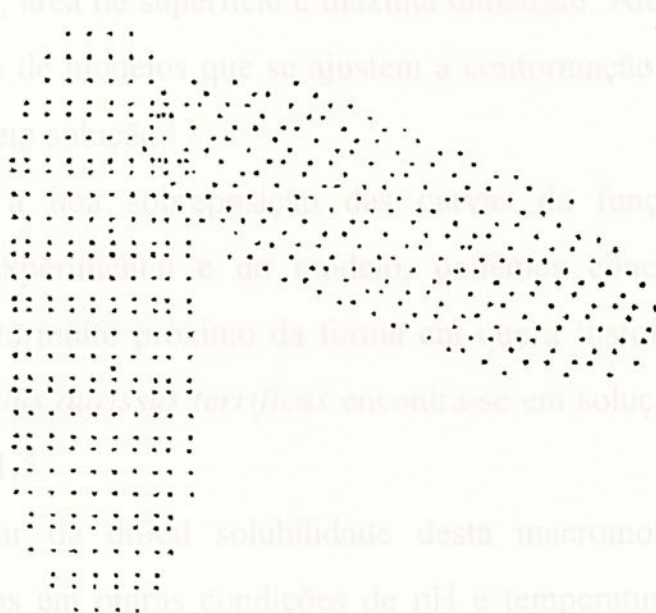


Figura 6.3. Fotografia obtida pelo equipamento System Stratagene Eagle Eye II, da projeção no plano xy do modelo da PLA₂ elaborado pelo programa Multibody, através das coordenadas de pequenas esferas.

7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

702/96
O trabalho concluído mostrou que a técnica de espalhamento de raio-X a baixo ângulo para analisar macromolécula em solução apresenta bons resultados na obtenção dos parâmetros moleculares estruturais, como raio de giro, volume, área de superfície e máxima dimensão. Além disso, possibilita a proposição de modelos que se ajustem à conformação na qual a molécula se encontra em solução.

Com a boa sobreposição das curvas da função distribuição de distâncias experimental e do modelo, podemos concluir que o modelo proposto está muito próximo da forma em que a fosfolipase do veneno da cobra *Crotalus durissus terrificus* encontra-se em solução de ácido fórmico 0,2M a pH 1,5.

Apesar da difícil solubilidade desta macromolécula, nota-se que experimentos em outras condições de pH e temperatura poderiam mostrar variações na sua conformação tridimensional.



8. REFERÊNCIAS

- ABREGO, J. R. B., CRAIEVICH, A. F., MASCARENHAS, Y. P. e LAURE, C. J. (1993). *Biophys. J.* **64**, 560-564.
- ACHARI, A.; RADVANYI, F. R.; SCOTT, D.; BON, C. e SIGLER, P. B. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 9385.
- AIRD, S. D., KAISER, I. I., LEWIS, R. V. e KRUGGEL, W. G. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* **249**, 296-300.
- BARBOSA, A. F. (1994). Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas(CBPF) - Notas de Física - **068/94**, 23p.
- BELTRAN, J. R. (1987). Tese de Doutorado. Instituto de Física e Química de São Carlos/ USP.
- BON, C., CHANGEUX, J. P., JENG, T. W. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1979). *Eur. J. Biochem.* **99**, 471-481.
- BREITHAUPT, H., RÜBSAMEN, K. e HABERMANN, E. (1974). *Eur. J. Biochem.* **49**, 333-345.
- CANTOR, C. R. e SCHIMMEL, P. R. (1980). W. H. Freeman and Company, New York.
- CHANG, C. C. e LEE, J. D. (1977). *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* **296**, 159-168.
- 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.
- CONDREA, E. e VRIES, A. (1965). *Toxicon* **2**, 261-273.
- DEEMS, R. A.; EATON, B. R. e DENNIS, E. A. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 9013-9020.



- DENNIS, E. A. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 13057-13060.
- DIJKSTRA, B. W.; DRENT, J.; KALK, K. H. e VANDERMAELEN, P. J. (1978). *J. Mol. Biol.* **124**, 53-60.
- 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.
- FRAENKEL-CONRAT, H. e SINGER, B. (1956). *Arch. Biochem. Biophys.* **60**, 64-73.
- GABILAN, N. H. (1984). Tese de Mestrado. Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da USP-Ribeirão Preto.
- GLATTER, O. (1980). *Acta. Phys. Austr.* **52**, 243-256.
- GRALÉN and SVEDBERG (1938). *Biochem. J.* **32**, 1375.
- GUINIER, A. e FOURNET, G. (1955). John Wiley & Sons, Inc., New York.
- HABERMANN, E.; WALSCH, P. e BREITHAUPT, H. (1972).. *Naunyn-Schimie. Arch. Pharmacol.* **273**, 313-330.
- HANAHAN, D. J. (1971). *The Enzymes* - Ed. Boyer. Vol. V. Third Ed.
- HANLEY, M. R. (1979). *Biochemistry* **18**, 1681-1688.
- HAWGOOD, B. J. e SMITH, J. W. (1977). *Br. J. Pharmac.* **61**, 597-606.
- HENDON, R. A. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1560-1563.
- HENDON, R. A. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1976). *Toxicon* **14**, 283-289.
- HENDON, R. A. 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., editor. 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.
- JAIN, M. K. e MALIWAL, B. P. (1993). *Biochemistry* **32**, 11838-11846.
- JENG, T. W. e CHIU, W. (1983). *J. Mol. Biol.* **164**, 329-346.



JENG, T.-W.; HENDON, R. A. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 600-604.

JENG, T.W.; CHIU, W.; ZEMLIN, F. e ZEITLER, E. (1984). *J. Mol. Biol.* **175**, 93.

KAISER, I. I., MIDDLEBROOK, J. L., CRUMRINE, M. H. e STEVENSON, W. W. (1986). *Toxicon* **24**, 669-678.

KINI, R. M. e IWANAGA, S. (1986). *Toxicon* **24**, 527-541.

KRATKY, O. (1983) *Nova Acta Leopoldina NF* **55**, Nr. 256.

KUIPERS, O. P.; DIJKMAN, R.; PALS, C. E. G. M.; VERHEIJ. H. M. e de HAAS, G. H. (1989). *Prot. Eng.* **2**, 467-471.

KUIPERS, O. P.; FRANKEN, P. A.; HENDRIKS, R.; VERHEIJ. H. M. e de HAAS, G. H. (1990). *Prot. Eng.* **4**, 199-204.

KUIPERS, O. P.; KERVER, J.; van MEERSBERGEN, J.; VIS, R.; DIJKMAN, R.; VERHEIJ. H. M. e de HAAS, G. H. (1990). *Prot. Eng.* **3**, 599-603.

KUIPERS, O. P.; THUNNISSEN, M. M. G. M.; de GEUS, P.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; VERHEIJ. H. M. e de HAAS, G. H. (1989). *Science* **244**, 82-85.

LAURE, C. J. (1988). *Anais do XII Simp. Anual da ACIESP sobre Toxinas Proteicas I*, 1-8b.

LI, C.H. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1942). *Revista τ* **64**, 1586-1588.

LI, Y.; YU, B.-Z.; ZHU, H.; JAIN, M. K. e TSAI, M.-D. (1994). *Biochemistry* **33**, 14714-14722.

LOMBA, M. G.; KIEFFER, J.; WAISBICH, E. e VITAL-BRAZIL, O. (1966). *Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac.* **33(3)**, 921-928.

5 - MASCARENHAS, Y. P., STOUTEN, P. F. W., BELTRAN, J. R., LAURE, C. J. e VRIEND, G. (1992). *Eur. Biophys. J.* **21**, 199-205.

MOORE, P. B. (1980). *J. Appl. Cryst.* **13**, 168-175.

MÜLLER, K. e GLATTER, O. (1982). *Makromol. Chem.* **183**, 465-479.

ORTIZ, A. R., PISABARRO, M. T., GALLEG0, J. e GAGO, F. (1992). *Biochemistry*, **31**, 2887-2896.

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



- PRESTON, S. A.; NICHOLSON, L. V. B. e HARRIS, J. B. (1989). Br. J. Pharmacol. **96**, 25p.
- RÜBSAMEN, K., BREITHAUPT, H. e HABERMANN, E. (1971). Naunyn-Schmie. Arch. Pharmak. **270**, 274-288.
- SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H. e SIGLER, P. B. (1990). Science **250**, 1541-1546.
- SLOTTA, C. H. e FRAENKEL-CONRAT, H. L. (1938-39). Memórias do Inst. Butantan **XII**, 1-9.
- SLOTTA, K. e PRIMOSIGH, J. (1951). Mem. Inst. Butantan **23**, 51-62.
- VERGER, R.; MIERAS, M. C. E. e de HAAS, G. H. (1973). J. Biol. Chem. **248**, 4023-4034.
- VITAL-BRAZIL, O. (1966). Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac. **33**(3), 981-992.
- VITAL-BRAZIL, O.; FARINA, R.; YOSHIDA, L. e de OLIVEIRA, V. A. (1966). Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac. **33**(3), 993-1000.
- VITAL-BRAZIL, O.; FRANCESCHI, J. P. e WAISBICH, E. (1966). Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac. **33**(3), 973-980.
- YEN, C. H. e TZENG, M. C. (1991). Biochemistry **30**, 11473-11477.



