

Universidade de São Paulo
Instituto de Física

*Estudo de sistemas de relevância biológica
por espalhamento de raios-X a baixos ângulos*

Leandro Ramos Souza Barbosa

Profa. Dra. Rosangela Itri (Orientadora)
Profa Dra. Márcia C. Fantini (IFUSP)
Profa Dra. Kaline Coutinho (IFUSP)
Prof. Dr. Julio César Borges (IQSC - USP)
Profa. Dra Yvonne Mascarenhas (IFSC - USP)

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Física
para a obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2008

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Barbosa, Leandro Ramos Souza

Estudo de sistemas de relevância biológica por
espalhamento de raios-X a baixos ângulos –
São Paulo - 2008

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.
Instituto de Física – Depto. de Física de Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Rosangela Itri
Área de Concentração: Física da Matéria Condensada

Unitermos: 1. Física; 2. Física da matéria condensada;
3. Biofísica molecular.

USP/IF/SBI-003/2009

*À minha família: Pai, Mãe, Bruno,
Laisa e Serena, com todo meu amor,
carinho, consideração admiração e
respeito.*

Agradecimentos

-À profa. Dra Rosangela Itri, pela amizade, orientação, dedicação, conselhos, atenção e por sempre estar presente. Sua participação foi fundamental e indispensável para a realização deste trabalho;

-Ao prof. Dr. Marcel Tabak, pelas inúmeras discussões dos resultados apresentados aqui;

-À Serena, pela atenção, carinho, amor e força. A sua presença foi de grande importância na reta final deste trabalho. Em especial, obrigado por suportar-me, neste período!;

-Aos Amigos e Professores do Laboratório de Cristalografia, em especial: Fábio Furlan, Paula Haddad, Bia, Mariana, Adnan, Nasser, Kátia, Nathaly, Karin, Evandro, Serginho, Sidnéia, Wilker, Elisa;

-À Patrícia Santiago, aluna do prof. Tabak, pela amizade, incentivo e pelas inúmeras e frutíferas discussões;

-Aos Amigos do IFUSP, em especial: Sami, Zé Antônio e Nair, Roberto, Babi, Dimaura e Gadelha, Eneida, Karina, Solange, Elisa, e aos inúmeros amigos e colegas que sempre me ajudaram ao longo desta trajetória;

-Aos Amigos de Taubaté, em especial, Molina (e família!!), Donini, Alice, Rafael e Ale, Spok, Helinho, Bizo, Macá, Belco, Fabinho, João Paulo, Leopoldo, e a todo o pessoal do posto da nove, muito obrigado pelos churrascos, pelas noitadas, mas obrigado mesmo pela amizade!!;

-Ao Tio Roberto, Tia Sônia, Laura, Luisa e família, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim;

-Ao prof. Paolo Mariani e também ao prof. Francesco Spinozzi pela hospitalidade e também pelas inúmeras discussões, sempre muito construtivas, assim como a todos do departamento *SASC*: Chiara, Stefano (e Sofia), Andrea, Grazia, Raffaele, Corina;

-À Família Mazzoni, em especial a Sante, Mara, Zio Pazzo, Zia Lella e Nonna por me acolherem como um membro da sua família, em especial nos almoços de domingo;

-Aos Amigos de Ancona: Stefano, Michelle, Sara, Fede, Giorgia, Mateo, Ale, Albi, Silvia, Fran, Dani, Vick, Nicoleta e Pablo pela hospitalidade, amizade e por toda ajuda. Um muito obrigado pela companhia e por me escutarem sempre que precisei;

-À Lia e Inês, secretarias do Departamento de Física Aplicada, pela ajuda e por estarem sempre a disposição;

-Por último, mas não menos importante, à minha família, cujo apoio incondicional foi de extrema importância para a realização desta Tese, assim como para a minha formação. Em especial um muito obrigado ao meu Pai, à minha Mãe, Bruno e Laísa. Um muito obrigado especial aos meus avós e aos meus tios, que sempre me apoiaram nos estudos;

-Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pelo uso de suas instalações;

-Ao Laboratório Nacional Elletra, Trieste, Itália, também pelo uso de suas instalações;

Ao Laboratório de Biofísica do IFUSP, pelo uso de suas instalações;

-À CAPES pelo apoio financeiro;

*A todos vocês, meus mais
sinceros agradecimentos!!!*

ÍNDICE

<i>Lista de Abreviações</i>	8
<u>RESUMO</u>	9
<u>ABSTRACT</u>	11
<u>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</u>	13
1.1 Aspectos gerais.....	13
1.2 Fármacos Fenotiazínicos	13
1.3 Proteínas em solução.....	18
1.4 Objetivos e Estrutura da Tese	24
1.4.1 - Fármacos Fenotiazínicos	24
1.4.2 - Proteínas Aquo-Solúveis	24
1.4.3 - Estrutura da Tese	24
<u>CAPÍTULO 2 - ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS...</u>	26
2.1 – Aspectos Gerais.....	26
2.2 – Curvas de SAXS para Sistemas Micelares.....	29
2.2.1 – Cálculo do fator de forma $P(q)$ de agregados micelares em solução	29
2.2.2 – Cálculo da função de interferência $S(q)$ entre micelas em solução	33
2.3 Curvas de SAXS para Proteínas em solução.....	36
2.3.1 – Aspectos Gerais	36
2.3.2 – Cálculo do fator de forma $P(q)$ de proteínas através da estrutura cristalográfica.....	38
2.3.3 - Fator de forma de proteínas parcialmente e totalmente desenoveladas	39
2.3.4 - Cálculo da função de interferência entre proteínas em solução	41
2.4 - Efeito da Função de Interferência $S(q)$ na curva de SAXS	44
2.5 - Modelo de Ajuste Global.....	46

<u>CAPÍTULO 3 - ESTUDO DE FÁRMACOS FENOTIAZÍNICOS.....</u>	<u>47</u>
3.1.1 - <i>Introdução ao estudo da interação de fármacos fenotiazínicos com sistemas biomiméticos</i>	50
3.1.2 – <i>Materiais e Métodos</i>	51
3.1.3 - <i>Resultados</i>	51
3.1.4 - <i>Discussão</i>	61
3.1.4.1 – <i>Estudo comparativo da adição de fenotiazínicos e porfirinas em sistemas micelares</i>	68
3.1.5 - <i>Conclusões sobre as interações de fármacos fenotiazínicos com sistemas biomiméticos</i>	73
3.2 – <i>Auto-associação de fármacos fenotiazínicos</i>	75
3.2.1 - <i>Introdução ao estudo da auto-associação de fármacos fenotiazínicos</i>	75
3.2.2 – <i>Materiais e Métodos</i>	76
3.2.3 - <i>Resultados e Discussão</i>	76
3.2.4 – <i>Conclusões Parciais</i>	93
<u>CAPÍTULO 4 – ESTUDO DE PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO E PH NA ESTRUTURA DA BSA</u>	<u>95</u>
4.1 – <i>Introdução</i>	95
4.2 - <i>Materiais e Métodos</i>	98
4.3 - <i>Resultados e Discussão</i>	98
4.3.1 – <i>Análise dos sistemas de pH 4.0 a 9.0</i>	102
4.3.2– <i>Análise dos sistemas a pH 2.0</i>	119
4.4 – <i>Conclusões Parciais</i>	124
<u>5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</u>	<u>126</u>
5.1 - <i>Projetos já iniciados</i>	126
5.2 – <i>Projetos Futuros</i>	127
<u>6. REFERÊNCIAS.....</u>	<u>128</u>
<u>7. ANEXOS – ARTIGOS PUBLICADOS.....</u>	<u>135</u>

Lista de Abreviações

CPZ – Clorpromazina

TFP – Trifluoperazina

LPC – L- α -LisoFosfatidilcolina

HPS – 3-(N-Hexadecil-N, N-dimetilamonio-N) propano sulfonato

CTAC – CetiltrimetilAmonio Bromato

TPPS₄⁻² - meso-tetrakis (4-sulfonatofenil)

TPMyP – meso-tetrakis (4-N- Metilpiridil)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

BSA – Albumina de Soro Bovino

HSA – Albumina de Soro Humano

SAXS – Espalhamento de Raios-X a baixos Ângulos

SANS – Espalhamento de Nêutrons a baixos Ângulos

AM1 – *Austin Model 1*

PM3 - Parameterized Model number 3

DFT – *Density Functional Theory*

MSA – *Mean Spherical Approximation*

RPA – *Random Phase Approximation*

Resumo

Neste trabalho, utilizamos a técnica de espalhamento de raios-X a baixos Ângulos (SAXS) para estudar a influência de dois derivados fenotiazínicos na estrutura de sistemas micelares, assim como suas propriedades de auto-associação, além de investigar a influência da variação de pH e de concentração nas interações entre proteínas em solução. Para tanto, utilizamos dois fármacos fenotiazínicos, (Trifluoperazina, TFP e a Clorpromazina, CPZ), em presença de L- α -fosfatidilcolina (LPC), um surfactante zwitteriônico (30 mM), a pH 4.0 e 7.0. Os resultados de SAXS indicam que a micela de LPC, em ausência de fenotiazina, pode ser representada por uma micela com forma elipsoidal (com razão axial 1.6 ± 0.1). No entanto, em presença de TFP e de CPZ a forma da micela se altera, passando para um cilindro (com razão axial 2.5 ± 0.1). Este efeito é acompanhado por uma diminuição do raio parafínico da micela ($22.5 \pm 0.3 \text{ \AA}$), em ausência de fármaco, para 20.0 ± 0.5 em presença de 10 mM de fármaco. Em paralelo, realizamos medidas de EPR (Ressonância Paramagnética eletrônica) destes sistemas. Combinando os resultados de SAXS e de EPR, propusemos um sítio para a localização destes compostos nas micelas de LPC, que seria na interface polar/apolar da mesma. Em um segundo momento, utilizamos as técnicas de SAXS e de EPR para investigar as características estruturais dos agregados formados por TFP e CPZ (a 20 e 60 mM, a pH 4.0 e 7.0). As curvas de SAXS são compatíveis com o espalhamento de agregados pequenos com diferentes geometrias: elipsoidal, cilíndrico e tipo-paralelepípedo. Devido à resolução da técnica, dentro do intervalo de vetores de espalhamento utilizada (até cerca de 0.3 \AA^{-1}), não é possível determinar, de forma absoluta, a correta geometria dos agregados, ou seja, todas as geometrias citadas acima ajustam de forma satisfatória as curvas de SAXS. As análises dessas curvas também não excluem a possibilidade de que estes fármacos mantenham-se como nanocristais em solução (compostos por cerca de 10 celas unitárias, empilhadas na direção-z), seguindo sua estrutura cristalográfica. Medidas de EPR indicam que os auto-agregados a pH 4.0 possuem características semelhantes às micelas, mas a pH 6.5 este efeito não foi evidenciado, uma vez que ocorre uma forte interação entre a sonda e os agregados. Este fato indica que os agregados, a pH 6.5, têm um maior empacotamento, em comparação aos sistemas a pH 4.0. Por fim, utilizamos a Albumina de Soro Bovina (BSA, a 10 – 50 mg/ml), em diferentes pHs (2.0 – 9.0), para investigar os efeitos de concentração e de pH nos potenciais de interação das macromoléculas em solução. O fator de forma da proteína foi obtido através da estrutura cristalográfica da HSA (*Human Serum Albumine*, proteína humana

homóloga a BSA), enquanto que as interações proteína-proteína foram calculadas através da relação de fechamento RPA (*Random Phase Approximation*). Nossos dados indicam que a BSA mantém sua estrutura terciária inalterada de pH 4.0 a 9.0, independente de sua concentração. No entanto, a pH 2.0 a proteína sofre um processo de desenovelamento, indicado pelo aumento da dimensão máxima da mesma. Nossos dados dão suporte para concluir que as interações entre as proteínas, a 10 mg/ml, são praticamente desprezíveis, exceto para os sistemas compostos a pH 2.0 (onde a proteína está desenovelada) e a pH 4.0 (onde evidenciamos a presença de interferência atrativa entre as proteínas). Entretanto, a medida em que aumentamos a concentração proteica, uma função de interferência do tipo repulsiva aparece na curvas de SAXS (para os sistemas de pH 4.0 a 9.0). Além disso, no sistema composto por BSA, pH 5.4 e 50 mg/ml, evidenciamos a existência de monômeros e dímeros em solução, provavelmente devido a proximidade do ponto isoelétrico da proteína (entre 4.8 – 5.6). Este efeito não foi evidenciado para os outros pHs, nesta mesma concentração. A pH 2.0 (25 e 50 mg/ml) evidenciamos uma compactação da proteína, sendo que sua forma é diferente da forma nativa da BSA. Nestas condições, é possível que a proteína tenha alcançado um estado *molten globule*, como evidenciado em outros trabalhos. Acreditamos que os efeitos de volume excluído são de grande importância para a estabilidade da proteína *in vivo*.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

