"ESTUDO ESTRUTURAL DE MEMBRANAS MODELO QUE CONTÉM PROTEÍNAS EXTRÍNSECAS"

JOSÉ OTÁVIO BIGATTO

Tese apresentada ao Instituto de Física "Gleb Wataghin" da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora:- Profa. Dra. IRIS C.L. TORRIANI

Campinas - São Paulo - Agosto de 1979

Este trabalho foi realizado no laboratório de Cristalografia do Instituto de Física "Gleb Wataghin" da Universidade Estadual de Campinas, com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (FAPESP)

Em especial, agradeço à Profa. Dra. Iris C.L. Torriani pela orientação e dedicação oferecidas durante o presente trabalho.

A G R A D E C I M E N T O S

Agradeço a todos os amigos, professores e técnicos do laboratório de cristalografia, pelo apoio e amizade oferecidos.

A todos os funcionários do Instituto de Física "Gleb Wataghin", que de alguma maneira colaboraram para a obtenção deste objetivo.

Aos operadores do computador PDP-10, do IMECC, pela atenção dispensada.

À minha família pelo apoio e incentivo, sempre oferecidos.

À minha amiga, companheira e mulher, pelo apoio, incentivo e compreensão, durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Dedico

Aos meus pais.

À memória de meu avô.

À Sonia.

Aos que virão.

RESUMO

Bicamadas lipídicas livres de proteínas, foram estudadas intensamente durante os últimos anos, devido a grande similaridade entre tais sistemas e as membranas naturais. Recentemente, com o propósito de se obter uma melhor semelhança com os sistemas naturais, incorporou-se proteínas nas bicamadas lipídicas.

Realmente, a localização e distribuição das proteínas no plano das membranas, não foram ainda completamente determinadas para um grande número de sistemas de membranas.

Proteínas extrínsecas, como o citocromo -C, parecem estar superficialmente ligadas à membrana por forças eletrostáticas e permanecem quase que completamente sobre a fase aquosa, definida pelos grupos polares dos lipídeos (11,15). Mais recentemente, foi proposto que as proteínas extrínsecas poderiam também interagir hidrofobicamente com as cadeias de hidrocarbonos dos lipídeos ou até mesmo com as proteínas intrínsecas. Além disso, a existência de alguns estudos que parecem indicar que os citocromos-C tem uma pequena penetração nas bicamadas lipídicas (18, 28), motivaram o estudo estrutural por nós realizado.

O preparo das amostras para os raios-X, para três sistemas de fosfolipídeos, foi feito segundo as técnicas usuais. Diagramas de difração de raios-X a baixo ângulo foram obtidos para multicamadas úmidas de Lecitina Dipalmítica -

(D.P.L.), Cardiolipina/D.P.L.(1:4) e Cardiolipina/D.P.L./Citocromo-C (5:20:1). As razões molares aqui especificadas, provaram ser as que produziam melhores diagramas de difração.

A análise da difração lamelar, usando-se uma das técnicas de determinação de fases, normalmente utilizada para este tipo de problema, permitiu-nos obter o perfil de densidade eletrônica das membranas modelo em estudo, com uma resolução de aproximadamente 5 Å.

Um exame dos perfis de densidade eletrônica, mostrou alguma pertubação na região superficial da membrana quando da introdução do citocromo-C. A região hidrofóbica - central parecia permanecer praticamente inalterada. Ambos estes resultados concordam com os recentemente obtidos por técnicas de N.M.R. e E.S.R. (18). O modelo proposto para o sistema DPL/Cardiolipina/Citocromo-C é confirmado por nossos experimentos.

ABSTRACT

Protein free lipid bilayers have been intensely studied during the past few years due to the striking similarities between these systems and natural membranes. In recent years, with the purpose of attaining a better simulation - with the natural systems,proteins have been incorporated into the bilayers.

It is a fact that the location and distribution of the protein in the plane of the membrane has not been completely determined for a number of membrane systems.

Extrinsec proteins, like cytochrome C,- seem to be superficially bound to the membrane by electrostatic forces and remain almost completely on the aqueous side defined by the polar groups of the lipids (11, 15). More recently it has been proposed that extrinsec proteins might also have some hidrofobic interaction with the lipid hydrocarbon chains or even with the intrinsec proteins. Furthermore, the existence of some studies seem to indicate a slight penetration of Cyt.C in the lipid bilayes (18,28), have motivated the structural work undertaken by us.

Preparation of X-ray samples of three - phospholipid systems was done following the usual techniques.Low angle X-ray diffraction diagrams were obtained for wet multilayers of Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline (DPL), Cardiolipin/ DPL (1:4) and Cardiolipin/DPL/Cytochrome C. (5:20:1). The molar ratios here specified proved to be the ones that produced better

diffraction patterns.

Analysis of the lamellar diffraction using one of the usual phasing techniques for this kind of problem, - allowed us to obtain the electron density profile of the model membrane systems under study, with a resolution of approximately 5 Å.

A close examination of the electron density profiles showed some perturbation in the membrane surface region upon introduction of the Cytochrome C. The hydrofobic central region seemed to remain practically unaltered. Both these results agree with the outcome of recent NMR and EPR experiments(18). A model proposed for the DPL/Card/Cyt C membrane is confirmed by our experiments.

ÍNDICE

Capítulo I - Introdução e Objetivos 01

Capítulo II - Membranas Celulares 06

II.1- Composição química das membranas 06

II.2- O ácido graxo e as classes de lipídeos derivados..... 06

II.2.1 - Fosfolipídeos..... 08

II.3- Proteínas 11

II.3.1 - Classificação das proteínas encontradas nas membranas..... 14

II.3.2 - Os citocromos 16

II.3.3 - O citocromo-C 19

II.4- Formação expontânea de micelas, monocamadas e bicamadas de lipídeos..... 19

II.5- Membranas Modelo..... 21

II.5.1 - O modelo de Davson e Danielli 23

II.5.2 - O modelo das subunidades 27

II.5.3 - Modelo Mosaico Fluido 28

Capítulo III - Difração de Raios-x 32

III.1- Difração de Raios-x por membranas 32

III.2- Geometria do experimento de difração de raios-x por membranas 33

III.3- Correções das Intensidades 35
III.4- Teoria de difração de raios-x e determinação da estrutura de sistemas lamelares 36
III.4.1 - Determinação das Fases do Fator de estrutura das membranas 38
III.4.2 - Um modelo para o perfil de densidade eletrônica das membranas.. 40
III.4.3 - Método para a obtenção do perfil de densidade eletrônica das membranas 43

Capítulo IV - Parte Experimental 46
IV.1- Materiais e Métodos 46
IV.2- Preparo das dispersões..... 49
IV.3- Preparo e secagem das amostras para os experimentos de difração 55
IV.4- Obtenção dos diagramas de difração de Raios-x por membranas 57
IV.4.1 - Característica dos diagramas de difração de Raios-x por membranas. 59
IV.4.2 - Diagramas de difração de Raios-x obtidos para as diferentes amostras 60
IV.5- Análise microdensitométrica dos diagramas de difração de raios-x por membranas 60

IV.6- Análise estrutural das membranas 62

Capítulo V - Resultados e Conclusões 73

V.1- Resultados 73

V.2- Conclusões 75

Bibliografia 79

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A determinação da estrutura molecular das membranas biológicas vem, há muito tempo, sendo um desafio para os cientistas da área de biofísica. O estudo das membranas celulares, tornou-se ainda mais fascinante, quando considerado o fato de que elas tem uma importância fundamental como elementos estruturais e funcionais da célula viva.

Do ponto de vista estrutural, a membrana proporciona uma compartamentalização física e química das células, proporciona regiões para a organização de mecanismos condutores de energia, tais como fotorreceptores e atua como local para reações enzimáticas.

No que se refere aos processos funcionais, as membranas biológicas atuam como mediadoras em determinadas funções celulares tais como: síntese protéica, transporte ativo e passivo e consequentemente do metabolismo eletrolítico, regulação de volume, excitação, comunicação neural e provavelmente condução de informação, fotossíntese, metabolismo oxidativo, regulação genética, divisão e diferenciação das células, coagulação, etc. (1).

Entretanto, por se tratar de sistemas moleculares altamente organizados, dotados de propriedades dinâmicas, surgem algumas dificuldades no estudo de sua estrutura molecu-

lar, que desencorajam os experimentos com membranas naturais in vivo. Devido à complexidade estrutural das membranas naturais e ao grande número de componentes químicos nelas presente, seria muito difícil, para não dizermos impossível, correlacionar os mapas de densidade eletrônica, obtidos experimentalmente, com os componentes individuais de tais membranas. É bom lembrarmos também, que em se tratando de um sistema dinâmico, em que os processos biológicos ocorrem em intervalos que são muito menores que o tempo necessário para obtermos informação a respeito de sua estrutura, o que nós obteríamos seria uma média espacial e temporal da estrutura real.

Entretanto, mesmo que tais problemas fossem solucionados, restaria ainda um problema crucial, que seria o de correlacionar a estrutura e organização molecular das membranas com suas funções, dado que é bem conhecida a dependência existente entre o posicionamento e a função de certos sistemas nas membranas naturais.

Para se tentar contornar tais problemas, começou-se a estudar as membranas artificiais obtidas de acordo com os modelos estruturais propostos para as membranas biológicas - (1-7). Esses modelos que são bastante simples, se comparados com as membranas naturais, tentavam de alguma maneira simular as suas propriedades e funções. Assim, estudando-se sistemas - mais simples, é possível ter-se uma idéia, aproximada, de aspectos estruturais e de interação entre os componentes de uma membrana natural.

O passo inicial no estudo de membranas, foi dado por Nägeli em 1855, que sugeriu pela primeira vez a presença

de membranas celulares. Mais tarde, por volta de 1900, E. Overton sugeriu uma composição lipídica para as membranas. Contudo, a a primeira tentativa de se encontrar um modelo para as membranas biológicas foi feita por Gorter e Grendel em 1925, através do experimento em que eles extraíram lipídeos de uma quantidade conhecida de eritrócitos e chegaram a conclusão de que esses lipídeos formavam, em solução aquosa, uma monocamada que tinha uma área aproximadamente igual a duas vezes a área dos eritrócitos, concluindo finalmente que, nos eritrócitos, os lipídeos se organizam em bicamadas.

Em 1935 um passo importante foi dado por Davson e Danielli ao postularem que as membranas biológicas tinham como estrutura básica uma bicamada lipídica. Esses foram sem dúvida os marcos na história do estudo das membranas.

Mais recentemente, muitos trabalhos foram feitos com membranas modelo, utilizando-se diferentes técnicas, tais como: difração de raios-X (2,8-17), ressonância magnética (9,18, 19) microscopia eletrônica (14, 20), difração de neutrons (21) e espectroscopia de absorção (9). A maior parte desses trabalhos, toma como estrutura básica para as membranas, aquela proposta por Davson e Danielli ou das bicamadas lipídicas.

Dentre os referidos trabalhos, nós podemos destacar alguns que são de maior interesse, como é o caso dos trabalhos de J.K. Blasie (8,9,12,13,21) e seus colaboradores em que estudaram, principalmente por difração de raios-X, membranas lipídicas com inclusão de outros compostos. Y.K. Levine (2, 17) e outros fizeram estudos muito importantes relativos à estrutura das bica

madas lipídicas, usando também difração de raios-X.

Em se tratando de sistemas mais complexos, onde nós temos uma composição lipídeos-proteínas, o número de trabalhos realizados é bem menor.

Em particular, os trabalhos realizados por Allen E.Blaurock (11) e L.R.Brown e K. Wüthrich (18) com bicamadas de lipídeos-Citocromos-C, usando técnicas de difração de raios-X e ressonância magnética respectivamente, resultaram de muito interesse, por se tratar de um sistema análogo ao estudado por nós neste trabalho de tese.

Os estudos realizados com sistemas modelo, apesar de tratar com sistemas que estão bastante aquém das complexas membranas biológicas, representam uma grande contribuição à elucidação das funções celulares localizadas na membrana citoplasmática. É bem conhecida a importante informação sobre a interação do colesterol com as membranas naturais, obtida através do estudo de sistemas modelo (17).

Estes fatos indicam que este é o caminho a ser seguido, para que venhamos a conhecer corretamente a estrutura e função das membranas biológicas.

O nosso objetivo, ao começar este trabalho, foi o de estudar a estrutura molecular de bicamadas lipídicas com proteínas incorporadas.

Em particular, nos interessamos pelo sistema lipídeos-Citocromos-C, por ser o citocromo-C uma proteína extrínseca, componente da cadeia respiratória na membrana interna da mitocôn-

dria, na qual a sua precisa localização está correlacionada com a sua função no referido processo de respiração. Consequente - mente, a determinação da estrutura molecular de bicamadas lipídicas com citocromos-C incorporados, representa uma contribuição importante para o esclarecimento de tais processos.

O presente trabalho é descrito em cinco capítulos, sendo que o primeiro é o que agora encerramos.

No capítulo II, nós apresentamos um estudo dos componentes moleculares das membranas modelo, bem como alguns dos principais modelos existentes para a estrutura das mesmas.

A geometria da difração de raios-X por membranas e a teoria utilizada para a obtenção dos perfis de densidade eletrônica das mesmas, estão detalhadas no capítulo III, e os resultados obtidos, utilizando-se tal teoria, apresenta-se no capítulo IV.

Finalmente, no capítulo V, os perfis de densidade eletrônica obtidos são comparados e as conclusões finais são apresentadas.

CAPÍTULO II

MEMBRANAS CELULARES

II.1 - Composição química das membranas.

As membranas, em sua maioria, são compostas de lipídeos e proteínas. Elas contém, predominantemente, lipídeos polares de diferentes tipos, sendo que, realmente quase todos os lipídeos polares das células estão presentes em suas membranas. A proporção de cada tipo de lipídeos nas membranas é característica de cada tipo de membrana, do tipo de célula e da espécie a que pertence a célula.

Uma grande variedade de proteínas são encontradas nas membranas, podendo estas desempenhar papéis funcionais ou somente estruturais. Podem ainda serem globulares ou fibrosas, e nas membranas ainda classificam-se como intrínsecas ou extrínsecas.

II.2 - O ácido graxo e as classes de lipídeos derivados.

Os ácidos graxos (22), ocorrem em seu estado livre, somente em pequenas quantidades em algumas células, mas por outro lado eles formam a base de muitas classes de lipídeos, dentre os quais estão as graxas neutras, os fosfolipídeos (ou fosfoglicerídeos), os glicolipídeos, os esters, o colesterol e algumas ceras. São conhecidos, mais de sétenta ácidos -

graxos, que possuem como característica uma longa cadeia de hidrocarbonos e um grupo carboxila como terminal. Os ácidos graxos diferem-se primariamente no comprimento de suas cadeias, - que podem ser saturadas ou insaturadas, e no número e posição das ligações insaturadas.

Algumas generalizações podem ser feitas sobre os ácidos graxos presentes nos lipídeos das grandes plantas e animais. A maioria deles tem um número par de átomos de carbono, com cadeias de hidrocarbonos que variam entre 14 e 22 átomos de carbono, sendo que as com 16 e 18 são as mais abundantes.

Os lipídeos (22, 23) são substâncias orgânicas encontradas nas células, são insolúveis em água, mas podem ser extraídos das células por substâncias apolares, tais como clorofórmio, éter e benzeno. Os lipídeos atuam principalmente como: a) componentes estruturais das membranas biológicas; b) depósitos intracelulares de combustível metabólico; c) uma forma de transporte de combustível metabólico e d) componentes protetores das paredes celulares de muitas bactérias, das folhas - das grandes plantas e da pele dos vertebrados.

Existem muitas classes e subclasses de lipídeos, muitas das quais ocorrem em diferentes espécies moleculares, dependendo da estrutura dos componentes de seu ácido graxo. Dentre as classes de lipídeos derivadas dos ácidos graxos, nos interessaremos particularmente na classe dos fosfolipídeos, pelo fato deles ocorrerem quase que exclusivamente nas membranas celulares.

II.2.1 - Fosfolipídeos

Os fosfolipídeos (22,23) ocorrem quase que unicamente nas membranas celulares, somente uma pequena quantidade deles aparece em depósitos graxos. Eles são sintetizados a partir do glicerol, quando um dos seus grupos hidroxila primário, é esterificado pelo ácido fosfórico e os outros dois restantes são também esterificados por dois ácidos graxos, obtendo-se assim o ácido fosfatídico, que é o mais simples dos fosfolipídeos. Ainda para se obter um fosfolipídeo em geral, o grupo hidroxila do ácido fosfórico é esterificado por um álcool, para se formar um fosfodiester. (Fig.II.1)

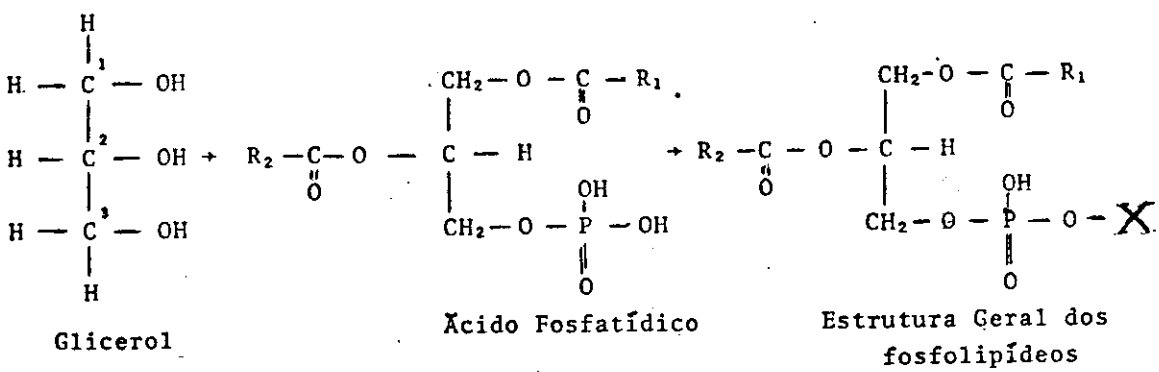


Fig. II.1 - Esquematização da estrutura geral dos fosfolipídeos

Portanto os fosfolipídeos são finalmente sintetizados a partir do ácido fosfatídico, variando para cada um deles o tamanho das cadeias de carbonos (R_1, R_2) e a esterificação que ocorre no grupo hidroxila por um álcool (X).

Todos os fosfolipídeos possuem uma cabeça polar e duas cadeias de hidrocarbonos que são apolares, por esta razão eles são chamados de lipídeos anfipáticos ou polares.

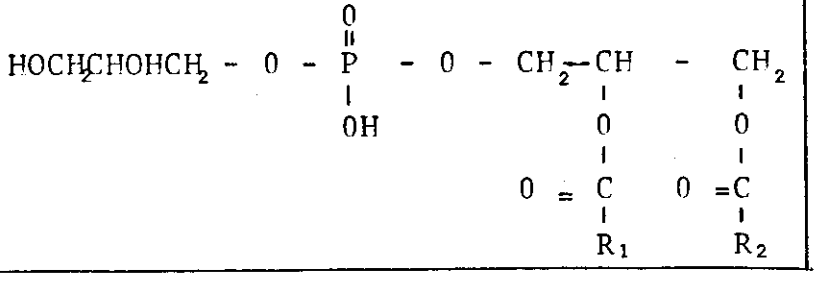
Os fosfolipídeos, diferem-se primariamente no tamanho da cadeia de carbonos, forma, polaridade e na carga dos grupos-x das cabeças polares. Cada tipo de fosfolipídeo pode existir em diferentes espécies moleculares, dependendo dos dois ácidos graxos das cadeias R_1 e R_2 . Normalmente existe um ácido graxo saturado e um insaturado, sendo que o insaturado encontra-se na posição 2 do glicerol.

Os fosfolipídeos mais abundantes nas grandes plantas e animais são, o fosfatidil etanolamina e o fosfatidil colina, que contém como grupos-x, respectivamente, os amino álcoois etanolamina e colina. Esses dois fosfolipídeos estão metabolicamente relacionados e formam a maior parte da composição lipídica das membranas celulares animais. Temos ainda dentre os lipídeos, o fosfatidil inositol, o fosfatidil serina e o fosfatidil glicerol.

Estreitamente relacionado com o fosfatidil glicerol, existe um fosfolipídeo mais complexo, que é a cardiolipina, a qual consiste de uma molécula de fosfatidil glicerol, na qual o grupo 3-hidroxila de um segundo glicerol é esterificado pelo grupo fosfato de uma molécula de ácido fosfatídico.

A cardiolipina, assim como o fosfatidil glicerol, são abundantes nas membranas celulares das bactérias e também o são nas membranas da mitocôndria e dos cloroplastos. Na tabela II.1 nós podemos observar os álcoois que entram nos grupos -x dos principais fosfolipídeos.

Tabela II.1 - Os álcoois que entram no grupo-x dos principais fosfolipídeos. (Ref. (22))

Fosfolipídeos	Álcool (x)
Fosfatidil etanolamina	$HOCH_2CH_2NH_2$
Fosfatidil colina	$HOCH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$
Fosfatidil glicerol	$HOCH_2CHOHCH_2OH$
Cardiolipina	

Os fosfolipídeos são os mais polares dos lipídeos, todos eles tem uma carga negativa no grupo fosfato, a um pH = 7.0.

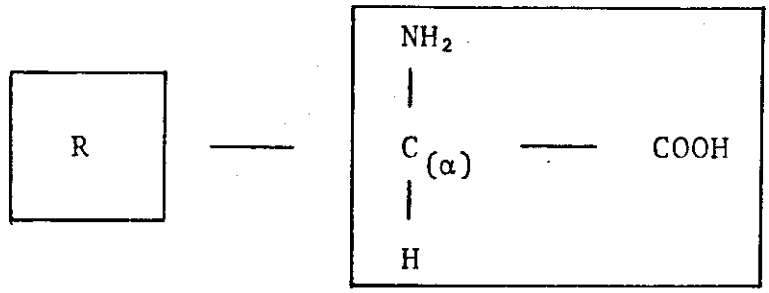
Os grupos-x do fosfatidil inositol, fosfatidil glicerol e cardiolipina, não tem carga elétrica, portanto estes fosfolipídeos tem uma carga resultante que é negativa, devida ao grupo fosfato.Os grupos-x do fosfatidil etanolamina e do fosfatidil colina, tem uma carga elétrica positiva a um pH = 7.0, portanto estes fosfolipídeos são chamados dipolares zwitteriônicos a um pH= 7.0, já que os mesmos não tem carga elétrica resultante.

Essas variações no tamanho das cadeias de carbonos, forma, polaridade e carga da cabeça polar dos fosfolipídeos, tem uma grande influência na estrutura de micelas, monocamadas e bicamadas de lipídeos, bem como em lipoproteínas naturais e sistemas de membranas.

II.3 Proteínas

O último estágio da informação genética é a transmissão da mesma, levada pelo RNA, para a formação das proteínas, as quais servem como efeitos finais ou instrumentos para a expressão da mensagem genética.

As proteínas (22, 23) são moléculas bastante grandes, constituídas por aminoácidos, os quais são covalentemente ligados em longas cadeias chamadas polipeptídicas. Existem vinte aminoácidos diferentes que são encontrados nas proteínas. Todos eles tem em comum um grupo amino e um grupo - carboxila ligados ao carbono-α e diferenciam-se em suas cadeias, normalmente chamadas de grupo R, como esquematizado na Fig. II.2. Os grupos R, dos vários aminoácidos, diferem em tamanho, forma e polaridade. Alguns são altamente polares e tem carga elétrica ao pH da célula.



Distinta para cada aminoácido

Comum a todos aminoácidos

Fig. II.2 - Estrurura geral dos aminoácidos

Dois aminoácidos podem estar covalentemente ligados por uma ligação peptídica, a qual liga o grupo amino- α de um ao grupo carboxila -α do outro. Como no caso das proteínas, existem muitas dessas ligações, teremos então uma cadeia polipeptídica. Como pode-se notar, com vinte aminoácidos diferentes, é possível se construir muitas cadeias polipeptídicas diferentes, variando o número de aminoácidos e a sua sequência.

A maior parte das cadeias polipeptídicas das proteínas, contém entre 100 e 300 aminoácidos, correspondendo a pesos moleculares entre 12.000 e 36.000. Existem proteínas que tem mais de uma cadeia polipeptídica, como é o caso da hemoglobina, que tem quatro cadeias, cada uma tendo 150 resíduos de aminoácidos.

Uma outra maneira pela qual as proteínas se distinguem é a seguinte: proteínas presentes em cada espécie - de organismo são características daquela espécie e podem ser - quimicamente distintas das proteínas homólogas de outras espé - cies. Proteínas homólogas são aquelas que tem funções idênticas em organismos distintos. Como por exemplo, o citocromo-c está presente e cataliza a mesma reação de óxido-redução nas células dos vertebrados, insetos, bactérias etc. Entretanto, apesar dos citocromos-c de todos esses organismos serem quimicamente muito similares, eles podem ser diferenciados, uns dos outros, em suas sequências de aminoácidos.

As proteínas, se dividem em duas classes principais, fibrosas e globulares, dependendo de sua estrutura tridimensional. As proteínas fibrosas são insolúveis em água e atuam principalmente como elementos estruturais; elas são os componentes principais de estruturas fixas, tais como: cabelos, - unhas, pele e tendões. Todas as proteínas fibrosas tem suas cadeias polipeptídicas enroladas ou dobradas de maneira regular , ao longo de uma direção.

As proteínas globulares, por sua vez, tem uma forma aproximadamente esférica, normalmente são solúveis em á - gua e elas realmente se difundem na membrana; elas tem um papel dinâmico ao invés de estrutural. Praticamente todas as enzimas são proteínas globulares. Nas proteínas globulares, as longas cadeias polipeptídicas, são bastante redobradas, de tal maneira a produzir uma conformação esférica ou globular.

Entretanto, através de recentes experimentos sobre a estrutura das proteínas globulares, por difração de

raios-x, conclui-se que as cadeias polipeptídicas das mesmas , não se redobram de maneira aleatória para dar origem a uma bola amorfa, mas pelo contrário, o dobramento da cadeia é exato e preciso, para produzir uma estrutura rígida e estável. Cada molécula de proteína de uma espécie, é exatamente igual à seguinte em sua conformação.

A atividade biológica, característica de cada tipo de proteína, é determinada pela conformação de sua cadeia polipeptídica. Recentes experimentos, indicam que a maneira específica, na qual as cadeias polipeptídicas são dobradas, é - uma consequência automática de sua sequência de aminoácidos.

A biossíntese de diferentes proteínas, pelas - células, deve ser algo feito com uma grande precisão, para preservar não somente a capacidade das proteínas de executarem suas pretendidas funções, mas também no sentido de preservar a individualidade da espécie.

II.3.1- Classificação das proteínas encontradas nas membranas

É importante se fazer uma discriminação entre duas categorias de proteínas, que se ligam às membranas, as quais classificaremos como extrínsecas e intrínsecas (7,18). As proteínas extrínsecas podem ser caracterizadas da seguinte maneira: a) para extraí-las molecularmente intactas das membranas, elas requerem apenas um tratamento ameno, tal como um aumento na força iônica do meio ou a adição de um agente seletor; b) elas são extraídas livres de lipídeos; e c) quando

extraídas, são relativamente solúveis em soluções tampão aquosa neutra.

Esses critérios, sugerem que as proteínas extrínsecas estão fracamente ligadas às membranas, por interações não covalentes (Provavelmente eletrostáticas e hidrofóbicas) e não estão fortemente associadas com os lipídeos das mesmas. O citocromo-c, encontrado nas membranas da mitocôndria, o qual pode ser dissociado livre de lipídeos por altas concentrações salinas, é um exemplo que satisfaz o critério para proteínas extrínsecas.

Entretanto, a maior parte (> 70%) das proteínas presentes nas membranas, tem outras características, as quais são atribuidas às proteínas intrínsecas, propriedades estas que são: a) elas requerem tratamentos mais drásticos para se dissociarem das membranas; b) em muitos casos elas permanecem ligadas aos lipídeos, mesmo depois de isoladas; e c) quando completamente livres de lipídeos, elas são normalmente insolúveis ou se agregam, quando em solução tampão aquosa neutra.

Do ponto de vista estrutural, pode-se assumir, que somente as proteínas intrínsecas são fundamentais para a integridade das membranas, enquanto que as extrínsecas, podem não ser relevantes aos problemas centrais da estrutura das membranas.

Por outro lado, a biossíntese das proteínas intrínsecas e extrínsecas e suas ligações com as membranas, podem ocorrer por processos bastante diferentes, o que torna tal diferenciação muito importante.

II.3.2 Os Citocromos

Os citocromos (22-25) foram primeiramente descobertos e chamados histohematins, em 1866 por MacMunn, entretanto, sua importância nas oxidações biológicas permaneceram encobertas até 1925, quando eles foram redescobertos por Keilin. Com um espectrômetro, ele observou que os músculos dos insetos continham substâncias parecidas com heme-proteínas, as quais evidentemente sofriam oxidação e redução, durante o processo de respiração. Ele os rebatizou de citocromos, postulando que eles agiam na cadeia respiratória, como condutores de elétrons, entre moléculas combustíveis e o oxigênio, e os dividiu em três classes principais, a,b e c, dependendo da posição característica de suas bandas de absorção, no estado reduzido.

Atualmente, os citocromos estão profundamente estudados, tanto do ponto de vista estrutural como funcional, e como característica geral dos mesmos, pode-se dizer que os citocromos formam um grupo de proteínas, que contêm ferro e que atuam sequencialmente na transferência de elétrons, das flavoproteínas para o oxigênio molecular, em células aeróbicas. Os citocromos sofrem mudanças, $Fe(II) \rightleftarrows Fe(III)$, reversíveis de valência, durante os seus ciclos catalíticos.

O citocromo terminal, da cadeia respiratória, o qual pode reagir diretamente com o oxigênio, é chamado de citocromo oxidase. As formas reduzidas dos demais citocromos, não podem ser diretamente reoxidados pelo oxigênio molecular.

Os citocromos são heme-proteínas e como tanto possuem um anel porfirina ou mais particularmente um anel

protoporfirina (Fig- II.3)

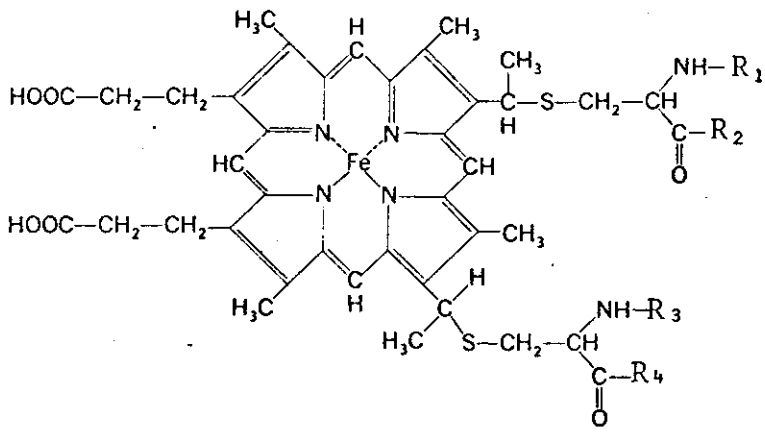


Fig. II.3 - Grupo funcional do citocromo-c

A protoporfirina forma estruturas quadridentadas complexas, com íons metálicos tais como: ferro, magnésio, zinco, níquel, cobalto e cobre. A protoporfirina com Fe(II) é chamada protoheme ou simplesmente heme; o complexo similar com Fe(III) é chamado hemin ou hematin.No heme, os quatro grupos ligantes da porfirina, formam um complexo quadrado-planar com o ferro,-sendo que a quinta e a sexta posições de coordenação do ferro estão perpendiculares a este plano. Quando a quinta e a sexta posições de coordenação do ferro são ocupados, a estrutura resultante é um hemocromo. Em quase todos os citocromos, ambas,a quinta e a sexta posições de coordenação do ferro, são ocupadas por grupos R de resíduos de aminoácidos específicos.

Os átomos de ferro dos citocromos, normalmente sofrem mudanças reversíveis entre Fe(II) e Fe(III), o que caracteriza a real função dos citocromos de servirem como condutores de elétrons, durante o processo de respiração. Na Fig. II.4, observa-se a sequência energética, da transferência eletrônica do NAD_{red} para o oxigênio.

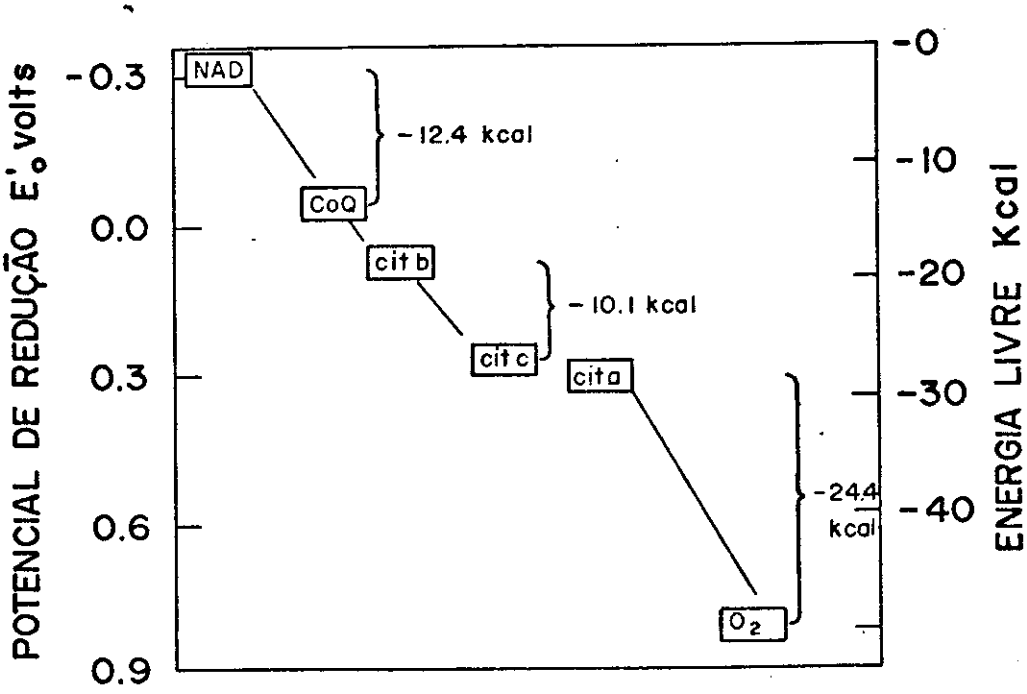


Fig.II.4 - Sequência energética do processo de transferência eletrônica do NAD_{red} para o oxigênio. (Ref. 23)

Os citocromos são normalmente obtidos com alto grau de pureza. Com uma exceção, eles estão muito fortemente ligados às membranas da mitocôndria e são difíceis de se obter em forma solúvel e homogênea. A exceção é o citocromo-c, o qual é extraído da mitocôndria por fortes soluções salinas. No ítem seguinte, nós estudaremos mais de perto o citocromo-c, por

nos interessarmos particularmente por esta proteína.

II.3.3 O Citocromo-C

O citocromo-c (22 - 28), é uma proteína mitocondrial, cuja função principal é servir de mediadora na transferência de elétrons entre o citocromo oxidase e o complexo citocromo (b - c_1). Ele caracteriza-se como uma proteína globular, que tem uma cadeia polipeptídica com 104 aminoácidos, a qual liga-se covalentemente ao grupo funcional, ferro-protoporfirina.

O citocromo-c, particularmente, presta-se ao estudo da interação membrana-proteína, já que ele pode ser facilmente removido da mitocôndria e subsequentemente ser reencorporado à mesma, com a completa restauração dc processo respiratório. O citocromo-c de algumas espécies, foram obtidos na forma cristalina, e estudados por difração de raios-x, obtendo-se assim as diferenças conformacionais entre os dois estados de oxidação (26).

Por se tratar de uma proteína homóloga, o citocromo-c, presta-se também, como um potente instrumento para o estudo evolucionário das espécies animais. Isto é feito, estudando-se as mutações existentes nas cadeias polipeptídicas das diferentes espécies. (27)

II.4 - Formação expontânea de micelas, monocamadas e bicamadas de lipídeos.

Em sistemas aquosos, os lipídeos polares formam facilmente micelas (5, 22), nas quais a cadeia de hidrocarbonos dos lipídeos, se afastam da água para formarem uma fase hidrofóbica interna à micela, e com as cabeças polares mantendo-se externamente à mesma, em contato com a água, formando assim uma fase hidrofílica.

Os lipídeos polares, podem também, quando em solução aquosa, distribuirem-se de tal maneira a formarem uma monocamada sobre a superfície líquida.

Nessa monocamada, as cadeias de hidrocarbonos ficam expostas ao ar, que é relativamente hidrofóbico, e as cabeças polares hidrofílicas ficam em contato com a água.

Bicamadas de fosfolipídeos, também se formam, sendo que nesse caso, as cadeias de hidrocarbonos voltam-se para o interior da bicamada formando uma fase hidrofóbica, enquanto que as cabeças polares formam a fase hidrofílica em contato com a água.

Essas bicamadas de fosfolipídeos apresentam características muito semelhantes àquelas das membranas celulares, tais como: a) são permeáveis à água, mas são relativamente impermeáveis aos íons; b) tem resistência e capacitância elétricas, muito altas, já que a camada de hidrocarbonos tem uma constante dielétrica baixa e é péssima condutora de eletricidade;

Devido a tais semelhanças, e porque os fosfolipídeos formam bicamadas espontaneamente, sugeriu-se que as

membranas naturais deveriam ter como base de sua estrutura, uma bicamada lipídica.

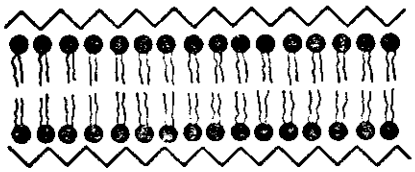
II.5 - Membranas modelo

As membranas naturais, constituem-se predominantemente de lipídeos e proteínas. As suas estruturas poderiam portanto, serem determinadas a partir das interações lipídeo-lipídeo, lipídeo-proteína e proteína-proteína, as quais podem ocorrer em meio aquoso. Destas interações, apenas a lipídeo-lipídeo é bem conhecida e aparece como dominante nos principais modelos (1 - 7).

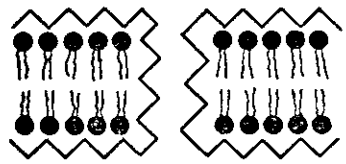
Muito pouco se sabe a respeito das interações proteína-proteína nas membranas, e sua contribuição raramente é considerada. As interações lipídeo-proteína é o aspecto mais debatido das membranas, principalmente pela falta de dados sobre a estrutura das lipoproteínas.

Os principais modelos, que se prontificaram a explicar a estrutura geral das membranas naturais foram: a) o modelo de Davson e Danielli (5, 6, 22) ou das bicamadas, - b) o modelo das subunidades (6) e c) o modelo mosaico fluido (4, 7).

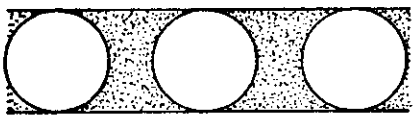
Muitos outros modelos foram apresentados, mas são apenas variações dos três modelos principais ou sistemas incompatíveis com as funções da membrana. Na Fig. II.5, nós podemos ver uma esquematização dos diversos modelos existentes - para a estrutura das membranas.



Davson e Danielli

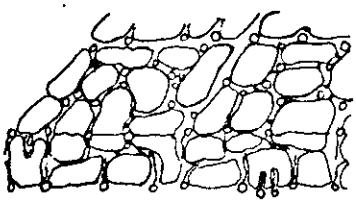


Stein e Danielli

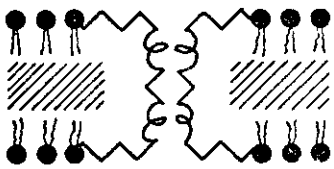


Branton

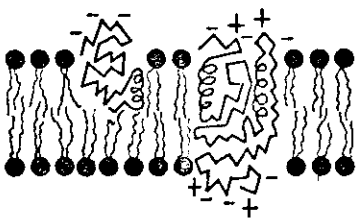
Benson



Green e Baum



Lenard e Singer



Singer e Nicolson

Fig.II.5 - Esquematização dos principais modelos existentes para a estrutura das membranas (Ref. 01).

II.5.1 - O modelo de Davson e Danielli

Um dos primeiros e mais perseverantes modelos da biologia moderna, foi o modelo das bicamadas de lipídeos, - proposto como base para a estrutura das membranas celulares, - por Davson e Danielli em 1935. A característica central do modelo, consiste em que as membranas lipídicas são formadas por uma camada de duas moléculas de espessura, na qual as cabeças polares dos lipídeos estão dirigidas para fora e as cadeias apolares dirigidas para dentro da camada (fig. II.6) Este modelo, foi originalmente proposto por Gorter e Grendel em 1925(1).

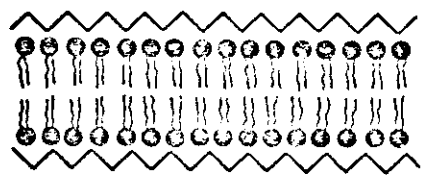


Fig.II.6 - O modelo das bicamadas de Davson e Danielli

Eles extrairam lipídeos de uma amostra com um número conhecido de eritrócitos. A solução de benzeno, com a totalidade dos lipídeos, quando dispersa em um recipiente com água, dá origem a um filme monomolecular de lipídeos, na super-

fície da água. Esta superfície de lipídeos é comprimida até certo ponto bem definido, onde a mesma começa a oferecer resistência à uma maior compressão Neste ponto, os lipídeos, presumivelmente, formam uma monocamada com uma estrutura hexagonal compacta, com as cadeias de hidrocarbonos voltadas para o ar e as cabeças polares em contato com a água. A comparação da área da monocamada comprimida e a área estimada dos eritrócitos, resultou em uma razão que era quase sempre 2:1, para todas as espécies animais testadas. Isto os levou a concluirem que, nas membranas celulares, os lipídeos se acomodavam em bicamadas moleculares.

Baseado no experimento de Gorter e Grendel, e nas várias propriedades comuns entre as membranas celulares e as bicamadas de lipídeos, tais como: a livre permeabilidade à água e a baixa permeabilidade aos íons, a alta resistência elétrica e outras mais, Davson e Danielli, postularam o modelo das bicamadas lipídicas, como sendo a estrutura básica para todas as membranas naturais.

Eles originalmente propuseram, com base em medidas de tensão superficial, que as proteínas deveriam estar - adsorvidas na interface lipídeos-água. Alguns anos mais tarde, esta hipótese foi modificada e refinada por Robertson (1950)para o chamado "modelo da membrana unitária". De acordo com esta hipótese, a membrana unitária consistiria de uma bicamada de vários lipídeos polares, em que cada uma das superfícies seria coberta por uma monocamada de moléculas de proteínas, com as cadeias polipeptídicas, das mesmas, na forma extendida ou configuração - β. A espessura total da membrana unitária, sugeriu-se ser em torno de 90 Å ; a da bicamada lipídica somente -

seria por volta de 50 a 60 Å.

Este modelo de membrana se impôs por muitos anos, porque explicava muitas das propriedades das membranas biológicas. Como exemplos podemos citar (6): a) a bicamada de lipídeos com uma estrutura hexagonal compacta, explicava o fato de muitas das membranas naturais conterem por volta de 40% de lipídeos em peso; b) os fosfolipídeos tendem a formar, espontaneamente, bicamadas em sistemas aquosos. A bicamada é uma das configurações dos lipídeos, que se encontra no estado de mínima energia, portanto é termodinamicamente estável e não requer energia para sua manutenção, c) a fase contínua de hidrocarbonos, pode também responder pela alta resistência elétrica das membranas naturais; d) o modelo também explica a alta permeabilidade das membranas naturais a solventes apolares e sua relativa impermeabilidade aos íons; e) o modelo da membrana unitária também é consistente com eletromicrografias de secção das células, seguindo fixação com tetraóxido de ósmio. Nestas micrografias aparecem duas linhas densas, que supostamente representam as cabeças polares e as proteínas na superfície das membranas, separadas por uma faixa menos densa que representaria as cadeias de hidrocarbonos, que realmente são menos eletrondensas.

Assim como existem muitas evidências que mantem vivo o modelo das bicamadas, existem também argumentos contra a sua validade. Dentre esses argumentos (6), que são contra o referido modelo, podemos citar: a) uma interação hidrofóbica das proteínas da membrana com os lipídeos pode ser observada em componentes isolados da membrana e pode também ocorrer

em membranas naturais; b) fosfolipases, extensivamente degradam os fosfolipídeos das membranas naturais, os quais deveriam ser protegidos pela camada de proteínas na superfície da membrana , segundo o modelo de Davson e Danielli, enquanto a degradação de proteínas pela ação de proteínases, sobre as membranas naturais, é bastante limitada em muitos casos, c) microscopia eletrônica de células, utilizando-se a técnica de "freeze-etching" mostrou haver estruturas particulares, dentro e sobre as membranas, as quais foram interpretadas como sendo lipoproteínas que extendiam-se através de toda a espessura das membranas.

Entretanto, muitos dos argumentos contra o modelo de Danielli, estão baseados na suposição de que o mesmo se propõe descrever correta e completamente a estrutura das membranas biológicas, isto não é de fato o propósito do modelo.

O modelo das bicamadas, somente postula que o arranjo das membranas em bicamadas lipídicas, é o fator dominante que governa a estrutura das membranas e que as proteínas associadas com os lipídeos formam um complexo, no qual a morfologia, a grosso modo, é determinada pelos lipídeos.

A esquematização de secção reta do modelo de Danielli normalmente o descreve como uma estrutura simétrica, isto é de fato apenas uma simplificação. Muitas das funções da membrana, tais como transporte ativo e diferenças funcionais entre interior e exterior das membranas, não seriam possíveis em uma estrutura simétrica.

Portanto o fato de se considerar uma representação simétrica para as membranas, no modelo de Danielli, refle

te somente a falta de conhecimento sobre as diferenças entre as duas metades da membrana.

Talvez uma das maiores falhas do modelo das bicamadas, é que ele realmente não sugere nenhum teste crucial de sua validade, no entanto o modelo provou ser útil, principalmente como ponto de partida para o desenvolvimento de outros modelos.

II.5.2 - O modelo das subunidades

O modelo das subunidades (6), que surgiu mais recentemente, foi primeiramente tratado por Green, o qual se baseou principalmente em seus trabalhos com as membranas da mitocôndria. O fato do conceito de subunidades ter explicado com bastante sucesso a estrutura dos vírus e a descoberta de que as grandes proteínas frequentemente constituem-se de subunidades, provavelmente foram fatores que estimularam a tentativa de se explicar a estrutura geral das membranas com base em conceitos similares.

A organização das membranas em subunidades, as quais são grandes em comparação com as dimensões moleculares, tem uma vantagem óbvia, que é a de reduzir grandemente a informação genética necessária, para especificar a sua estrutura. Auto-formação e efeitos de amplificação através de mudanças cooperativas na estrutura são facilmente entendidos e espera-se que ocorram. Estas vantagens são obtidas somente se uma ou poucas classes de subunidades estão presentes, e isto é o que geralmente postula-se para as membranas. Para máior clareza, as

subunidades foram subdivididas em três classes: subunidades estruturais, subunidades funcionais e subunidades de formação.

As mais sugestivas evidências das subunidades estruturais foram obtidas das membranas dos cloroplastos, das membranas dos bastões retinais e de determinadas membranas de junções celulares. Entretanto, mesmo nesses casos, as subunidades estruturais não puderam ser estabelecidas sem ficar alguma dúvida.

A maior objeção ao modelo de subunidades, é - que a principal característica das subunidades de formação, não foi encontrada nas membranas. A auto-formação das membranas a partir de uma ou de algumas classes de entidades iguais, não - foi demonstrada. De fato, o número limitado de diferentes formas e as restrições em seu tamanho, que são características do modelo de subunidades, são incompatíveis com a grande variedade de formas e tamanhos encontrados nas membranas celulares. Seria muito difícil explicar o crescimento e diferenciação das membranas, com o desenvolvimento de novas funções nas mesmas, - com base no modelo de subunidades.

Realmente, a única conclusão a respeito do modelo, foi que ele contribuiu muito pouco para o entendimento - geral da estrutura e funções das membranas.

II.5.3 - Modelo Mosaico Fluido

O modelo mosaico fluído foi proposto por Singer e Nicolson (4, 7). Eles propuseram o modelo, baseados em considerações termodinâmicas e em resultados experimentais que

ajustavam-se muito bem, com a idéia de uma estrutura mosaico para as membranas. Neste modelo as moléculas de proteínas globulares intrínsecas, alternam-se com partes de bicamadas lipídicas. As proteínas globulares, postulou-se serem anfipáticas, assim como o são os fosfolipídeos. Isto é, elas são moléculas assimétricas, com um dos extremos altamente polar e o outro apolar. A região polar é a que está em contato com a fase aquosa, sobre a membrana, e a região apolar é a que está envolvida no interior hidrofóbico da membrana (Fig. II.7). A estrutura adotada para as proteínas e portanto a extensão a qual ela está embebida na membrana, está sob controle termodinâmico, de tal maneira que a energia livre do sistema como um todo seja mínima.

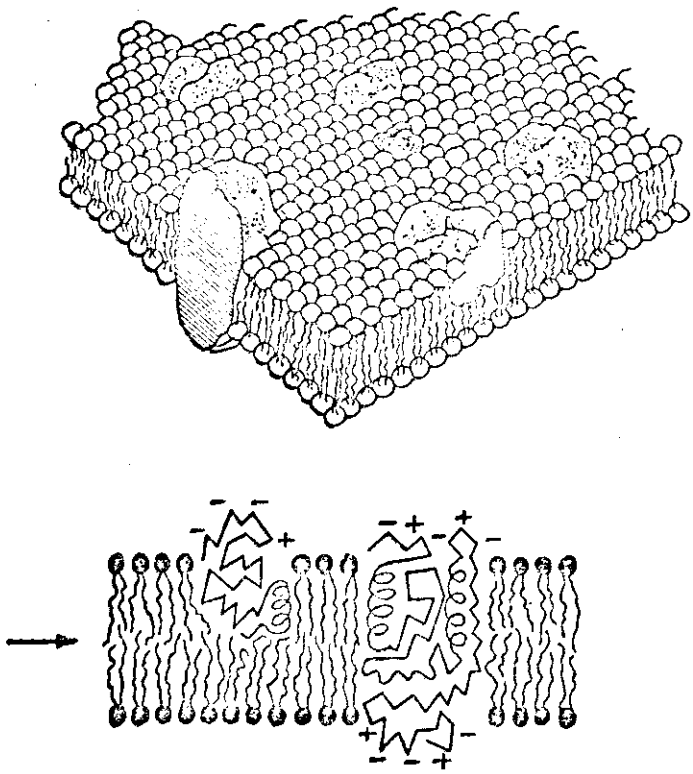


Fig.II.7 - Modelo Mosaico Fluido devido a Singer e Nicolson (Ref. 07)

Uma proteína integral, com tamanho e forma apropriados, pode atravessar a membrana toda, isto é, ela poderá estar em contato com a fase aquosa em ambos os lados da membrana.

Destas considerações, fica claro que diferentes proteínas, se tiverem uma sequência de aminoácidos apropriada para adotar uma estrutura anfipática, podem ser proteínas integrais das membranas. Das mesmas considerações pode-se também explicar porque algumas proteínas estão ligadas à membrana e outras são livremente solúveis no citoplasma. A diferença pode ser devida a sua sequência de aminoácidos, ou seja que determinadas proteínas não admitem um caráter anfipático ou pelo contrário adotem uma estrutura na qual os grupos iônicos estão distribuídos de uma forma esfericamente simétrica , no estado de mínima energia livre do sistema.

A estrutura mosaico pode ser diversificada de várias maneiras, desde que se tome o devido cuidado. É importante observar, que a estrutura mosaico não necessáriamente se restringe à esquematização da fig. II.7. As interações proteína - proteína que não são explicitamente consideradas na referida figura, devem ser muito importantes na determinação das propriedades das membranas.

Os fosfolipídeos da estrutura mosaico são predominantemente arranjados como uma bicamada interrompida, com suas cabeças polares em contato com a fase aquosa.

Como evidências experimentais do modelo mosaico fluido, existem alguns experimentos feitos com a técnica de

"freeze-etching", que sugerem fortemente que uma quantidade substancial das proteínas, está profundamente embebidas em muitas das membranas funcionais. A proposta do modelo, de que algumas proteínas, dependendo de sua estrutura e tamanho, poderiam atravessar a membrana de lado a lado ficando em contato com a fase aquosa de ambos os lados da membrana, foi evidenciada por processos químicos para o caso das membranas do eritrócito humano. Experimentos mais recentes, usando várias técnicas e para diferentes sistemas de membrana são também consistentes com o modelo mosaico fluido.

Este modelo mosaico fluido, mostrou-se bastante razoável e consistente com a estrutura e organização básicas das membranas biológicas.

CAPÍTULO III

Difração de Raio-x

III.1 Difração de raios-x por membranas.

Algumas membranas naturais tem a propriedade de se empilharem paralelas e regularmente espaçadas. Isto levou alguns pesquisadores a concluirem, que tais sistemas deveriam espalhar raios-x em reflexões de Bragg discretas, ou seja, em ângulos determinados pela equação de Bragg, $n\lambda = 2d \operatorname{sen}\Theta$.

Muitos trabalhos foram feitos, não só com sistemas de membranas artificiais, mas também, com sistemas naturais, preparados por sedimentação e parcial desidratação. Entretanto, é também possível obter informações estruturais úteis, de baixa resolução, de dispersões aquosas de membramas.

Todos os experimentos mencionados suportam bastante bem,a hipótese de que o elemento estrutural básico das membranas é uma bicamada lipídica. Entretanto, tais resultados, não necessariamente, indicam a existência de uma bicamada contínua em toda a membrana, podendo haver interrupções na mesma.

Nos sistemas de membranas, naturais ou artificiais, as mesmas não se empilham de maneira regular e repetitiva, de tal forma a terem uma estrutura periódica tridimensional, como um cristal. A desordem no empacotamento das membranas, restringe a informação possível de se obter, a partir dos experi

mentos de difração. Entretanto, tais experimentos,nos fornecem evidências de que as membranas possuem uma estrutura unidimensional na direção perpendicular ao seu plano.

Com a combinação de longos tempos de registro da difração e com o alto grau de mobilidade dos componentes da membrana, o que se obtem , é um diagrama que corresponde à estrutura média das membranas, no tempo e no espaço.

As estruturas laterais dentro de cada membrana difratam independentemente, e a menos que elas sejam regulares e repetitivas, como é o caso das cadeias de hidrocarbonos, a difração será muito difusa e fraca para ser observada experimentalmente.

III.2 Geometria do experimento de difração de raios-x por membranas.

Os diagramas de difração de raios-x por membranas, podem ser interpretados por analogia direta com uma grade de difração ótica, cada plano da membrana (Plano das cabeças polares em cada bicamada) corresponde a uma fenda na grade de difração ótica. As difrações de Bragg são devido a interferência construtiva entre os raios-x espalhados pelos diferentes planos.

Os planos da amostra atuam como espelhos paralelos e difratam os raios-x introduzindo diferenças de fase devido às suas separações espaciais (Fig. III.1).Se a diferença de fase introduzida for um múltiplo inteiro do comprimento de onda, a radiação espalhada interferirá construtivamente, origi-

nando uma reflexão de Bragg.

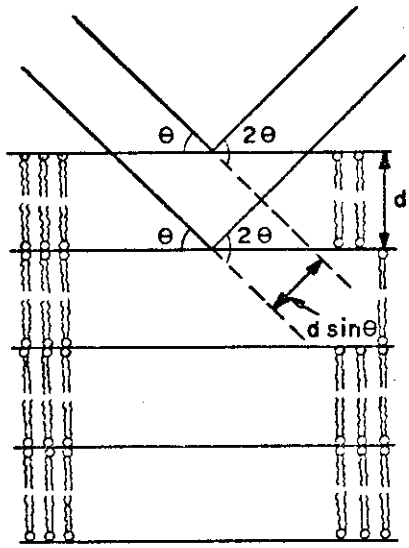


Fig. III.1 - Difração de Raios-X por um arranjo lamelar de membranas de espessura d (Ref. 02)

A ordem da reflexão é definida pelo número de comprimentos de onda necessários para a interferência construtiva. Esta condição, é conhecida como a lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen}\theta \qquad \text{(III.1)}$$

onde n é um inteiro, θ é o ângulo entre os planos da amostra e o feixe incidente, d é o espaçamento entre os planos e λ é o comprimento de onda da radiação utilizada. Esta condição define também uma relação recíproca entre o ângulo de difração θ e a espessura da membrana d, quanto maior o ângulo menor a espessura.

Os diagramas de difração de raios-x por amostras lamelares de membranas são usualmente observados na região de baixo ângulo ($\theta < 5^{o}$). Sob estas condições $\text{sen}\theta \simeq \theta$, portanto, as reflexões de Bragg estarão igualmente espaçadas e ocorrerão em posições definidas por múltiplos inteiros do inverso da espessura das membranas (Ver Fig. IV.5). As posições das reflexões definem não só a direção de empilhamento das membranas, mas também o valor aproximado da separação interplanar.

Além desses dados, os diagramas de difração de raios-x, contêm também informações a respeito da densidade eletrônica média das membranas, na direção perpendicular ao plano das mesmas. Estas informações estão contidas na intensidade das reflexões de Bragg, e dependem de sua variação em todo o espaço recíproco.

Dispersões aquosas de membranas, podem também ser usadas em estudo por difração de raio-x, todavia nós não teremos mais as reflexões de Bragg discretas, e sim um espalhamento contínuo com alguns máximos difusos.

Contudo as informações obtidas, usando-se tais amostras, são menos precisas, assim como a resolução que se obtém é inferior.

III.3 - Correções das Intensidades

Inicialmente, fizemos um cálculo da absorção dos raios-x pela amostra, baseando-se em sua espessura e composição química. Os valores da absorção encontrados para as diferentes ordens de difração, revelaram ser desnecessária tal correção.

As intensidades das reflexões de Bragg, foram corrigidas por um fator h devido à geometria da amostra e à curvatura do substrato. Se as bicamadas fossem planos perfeitamente empilhados, elas dariam origem a uma fileira de pontos igualmente espaçados no espaço recíproco. Em nosso caso, trata-se de bicamadas que tem uma certa desorientação com respeito a normal ao plano da amostra e além disso, o substrato tem uma certa curvatura. Estes fatores fazem com que os pontos do espaço recíproco sejam alargados e se tornem cascas esféricas, cujo raio aumenta ao se aumentar a distância à origem do espaço recíproco, ou seja, quando a ordem da reflexão aumenta.

Uma outra correção, por outro fator h, é introduzida devido ao fato de que na varredura microdensitométrica, a fenda tem uma altura limitada e portanto "Vê" uma porção constante das diferentes ordens. Como as reflexões aparecem sobre o filme, como arcos de dimensão crescente, a perda da intensidade detectada é proporcional à ordem da reflexão

Portanto, em se considerando essas duas correções, devemos multiplicar as intensidades por fator h^2.

III.4 - Teoria da difração de raios-x e determinação da estrutura de sistemas lamelares.

A intensidade difratada por um grupo de átomos, é dada pelo quadrado da amplitude da onda difratada, ou seja:

$$I(\vec{x}^*) \quad \alpha \quad | \; F(\vec{x}^*) \; |^2 \qquad \text{(III.2)}$$

onde $\vec{x}^*$ é o vetor da rede recíproca: $\vec{x}^* = \frac{\text{sen}\Theta}{\lambda}$.

Seja então uma grupo de átomos $A_1, A_2, A_3 \ldots A_r$, que tem fatores de espalhamento f_1, f_2, $f_3 \ldots f_r$ e suas posições são definidas pelos vetores $\vec{x}_1$, $\vec{x}_2$, $\ldots \vec{x}_r$, em relação à uma origem arbitrária. Neste caso, a amplitude total é dada por

$$F(\vec{x}^*) = \sum_{n=r}^{r} f_n \cdot \exp(-2\pi i \vec{x}^* \cdot \vec{x}_n) \qquad \text{(III.3)}$$

e $F(\vec{x}^*)$ é chamado de fator de estrutura do grupo de átomos. A definição de objeto difratador, pode ser generalizada pela substituição dos átomos individuais, por uma função, $\rho(\vec{x})$, que representa a densidade eletrônica do meio. Neste caso a equação (III.3) ficaria:

$$F(\vec{x}^*) = \int \rho(\vec{x}) \exp(-2i\pi \vec{x}^* \cdot \vec{x})\, dv_x \qquad \text{(III.4)}$$

onde a integração se estende por todo o espaço objeto.

Como pode-se notar, na equação (III.4), a função $F(\vec{x}^*)$ é a transformada de Fourier de $\rho(\vec{x})$. Portanto, fazendo-se a transformada inversa, pode-se obter $\rho(\vec{x})$, ou seja:

$$\rho(\vec{x}) = \int F(\vec{x}^*) \exp(2\pi i \vec{x}^* \cdot \vec{x})\, dv_x^* \qquad \text{(III.5)}$$

e a integral é calculada em todo o espaço recíproco (32). Portanto, conhecendo-se o fator de estrutura da amostra, nós podemos determinar a sua densidade eletrônica.

O fator de estrutura é um número complexo e da equação (III.3) podemos reescrevê-lo como:

$$F(\vec{x}^*) = \sum_{n} fn \; S_n \qquad \text{(III.6)}$$

onde S_n é um número complexo e pode ser escrito como:

$$S_n = (A + iB)_n \qquad \text{(III.7)}$$

Entretanto, o que nós medimos experimentalmente é a magnitude de $F(\vec{x}^*)$, ou seja:

$$|F(\vec{x}^*)| = \{ I(\vec{x}^*) \}^{1/2}$$

$$|F(\vec{x}^*)| = \left| \sum_n f_n S_n \right|$$

$$= \left| \sum_n f_n (A + iB)_n \right|$$

$$= \{ (\sum_n f_n A_n)^2 + (\sum_n f_n B_n)^2 \}^{1/2} \qquad \text{(III.8)}$$

A fase do fator de estrutura complexo

$$F(\vec{x}^*) = F(\vec{x}^*) \; e^{i\alpha(\vec{x}^*)} \qquad \text{(III.9)}$$

onde a fase $\alpha(\vec{x}^*)$ é dada por:

$$\alpha(\vec{x}^*) = \tan^{-1} \frac{\sum_n f_n B_n}{\sum_n f_n A_n} \qquad \text{(III.10)}$$

e não a obtemos experimentalmente.

Portanto, para determinarmos a densidade eletrônica da amostra, nós necessitamos conhecer não só a amplitude, mas também a fase do fator de estrutura. Então temos um problema a resolver, que é a determinação das fases do fator de estrutura.

III.4.1 Determinação das Fases do fator de estrutura das membranas.

No caso de termos uma estrutura centrossimétrica, as fases, $\alpha(\vec{x}^*)$, para todas as reflexões de Bragg, serão sempre 0 ou π rad . Isto pode ser facilmente concluido das equações (III.9) e (III.10), pois para uma estrutura centrossimétrica temos $B = 0$ então $\alpha(\vec{x}) = \tan^{-1} 0 = 0$ ou π , tal - que $F(\vec{x}^*) = \pm |F(\vec{x}^*)|$.

Quando nós graficamos a intensidade, $|F(x^*)|^2$, em uma dimensão, de uma estrutura centrossimétrica versus a distância no espaço recíproco (x^*), nós encontramos que a mesma - tem um caráter ondulatório, com vários picos. Nos pontos em que a intensidade é nula, o fator de estrutura também o será, mas a sua fase muda de 0 para π (i.e. as amplitudes passam de positivas para negativas) ou vice-versa, nestes pontos.

Entretanto, resta ainda determinar qual será a combinação correta das fases, visto que existem $2^{h_{max}}$ possíveis combinações das mesmas, onde h_{max} é o número de reflexões de Bragg, obtidas do diagrama de difração.

Existem alguns métodos para se determinar a - combinação de fases correta, um deles é o"método do inchamento"- das membranas (8,9,21), um outro método menos usado é o da "substituição isomorfa" (10,21). Entretanto uma terceira técnica, mais direta, mostra-se bastante prática. O método consiste em se usar um modelo teórico, para confirmar se uma particular combinação de fases é correta ou não. Como em nosso caso, este método presta-se sempre que pudermos utilizar um modelo para o perfil de densidade eletrônica da membrana, baseado em sua composição química e evidências de sua estrutura.

Este método, pode ser considerado bastante - bom, pois em quase todos os casos existe uma única combinação - de fases, que produz um perfil de densidade eletrônica que se - ajusta bem ao modelo, sendo os demais quase que sempre absurdos.

Portanto, no caso em que se dispõe de um modelo confiável para o perfil de densidade eletrônica da membrana, este método torna-se extremamente útil, mas devemos considerar, que não podemos usá-lo como uma solução para todos os casos de determinação de fases.

III.4.2 Um modelo para o perfil de densidade eletrônica das membranas.

Os perfis de densidade eletrônica calculados utilizando-se a teoria descrita nos ítens anteriores, devem ser interpretados em termos da composição química das membranas. Em vista disso, torna-se imperativo compararmos os perfis calculados com aqueles obtidos a partir de uma estrutura modelo para as membranas.

Os perfis propostos baseando-se na composição química das membranas, normalmente utilizam-se do modelo das bicamadas ou modelo de Davson e Danielli e também em alguns experimentos (2,8-12, 21), que suportam bastante bem a estrutura proposta por este modelo. Utilizando-se os valores da densidade eletrônica das moléculas constituintes das membranas é possível se propor aproximadamente qual será o perfil de densidade eletrônica das membranas. Digo aproximadamente, porque este perfil

modelo é baseado na densidade eletrônica das moléculas livres e nós não conhecemos qual é o efeito das interações das moléculas sobre a distribuição eletrônica das mesmas, bem como o efeito das interações com o meio em que estão dispersas. No presente estudo as moléculas constituintes das membranas são fosfolipídeos e proteínas e o meio em que estão dispersas é aquoso.

As cabeças polares dos fosfolipídeos e as proteínas não hidratadas, tem uma densidade eletrônica aproximadamente de 0,45 $e/Å^3$, enquanto que para as cadeias de metileno é 0,296 $e/Å^3$ e para os grupos metil, terminais dos fosfolipídeos é de 0,165 $e/Å^3$ (2). Portanto, com relação a água, que tem uma densidade eletrônica de aproximadamente 0,334 $e/Å^3$, as proteínas e as cabeças polares dos fosfolipídeos se comportarão como espalhadores positivos, enquanto as cadeias de hidrocarbonos como negativos.

Baseando-se nas considerações acima expostas, um esquema razoável para o perfil de densidade eletrônica das membranas seria o ilustrado na Fig. III.2, onde os picos laterais correspondem às proteínas e/ou às cabeças polares dos fosfolipídeos e o pico negativo central corresponde aos terminais metil dos mesmos.

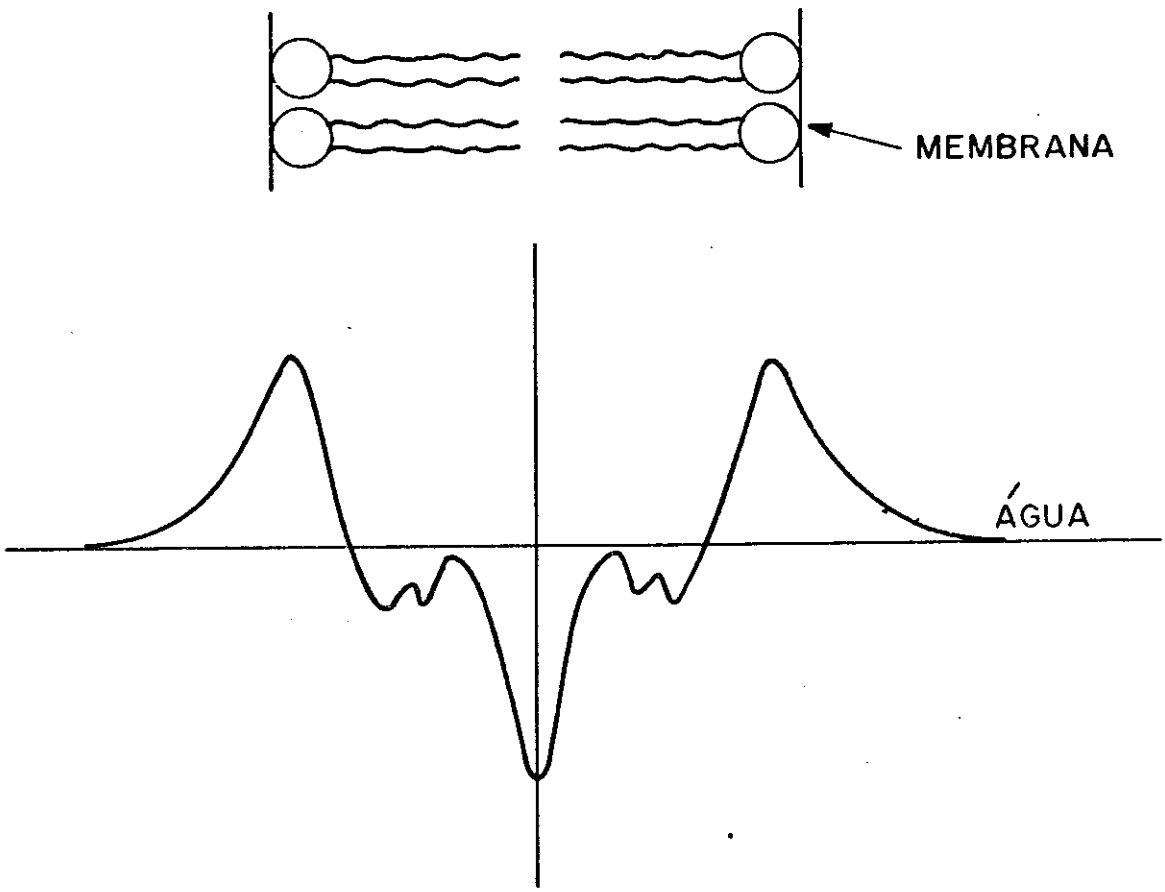


Fig. III.2 - Esquema do Perfil de Densidade Eletrônica esperado para as membranas de fosfolipídeos.

III.4.3 Método para a obtenção do perfil de densidade eletrônica das membranas.

O perfil de densidade eletrônica de uma membrana centrossimétrica é dado por:

$$\rho(x) = \int F(x^*) \cos(2\,\Pi\, x.x^*)\, dx^* \qquad \text{(III.11)}$$

onde x é a coordenada perpendicular ao plano da membrana, $F(x^*)$ é o fator de estrutura e x^* é a coordenada recíproca.

Portanto, para calcularmos $\rho(x)$, nós necessitamos da função contínua $F(x^*)$ e nós temos apenas os valores discretos de $|F(h/d)|$, obtidos das reflexões de Bragg.

Para obtermos $F(x^*)$, a partir de $|F(h/d)|$, nós utilizamos o "teorema da amostragem de Fourier" (8,9,30,31), que permite calcular $F(x^*)$ por meio da seguinte expressão:

$$F(x^*) = \sum_{h=-h_{max}}^{h_{max}} |F(h/d)| \cdot \exp\{-i\,\alpha(h)\} \cdot \mathrm{sinc}\{\Pi\,(x^*d-h)\} \qquad \text{(III.12)}$$

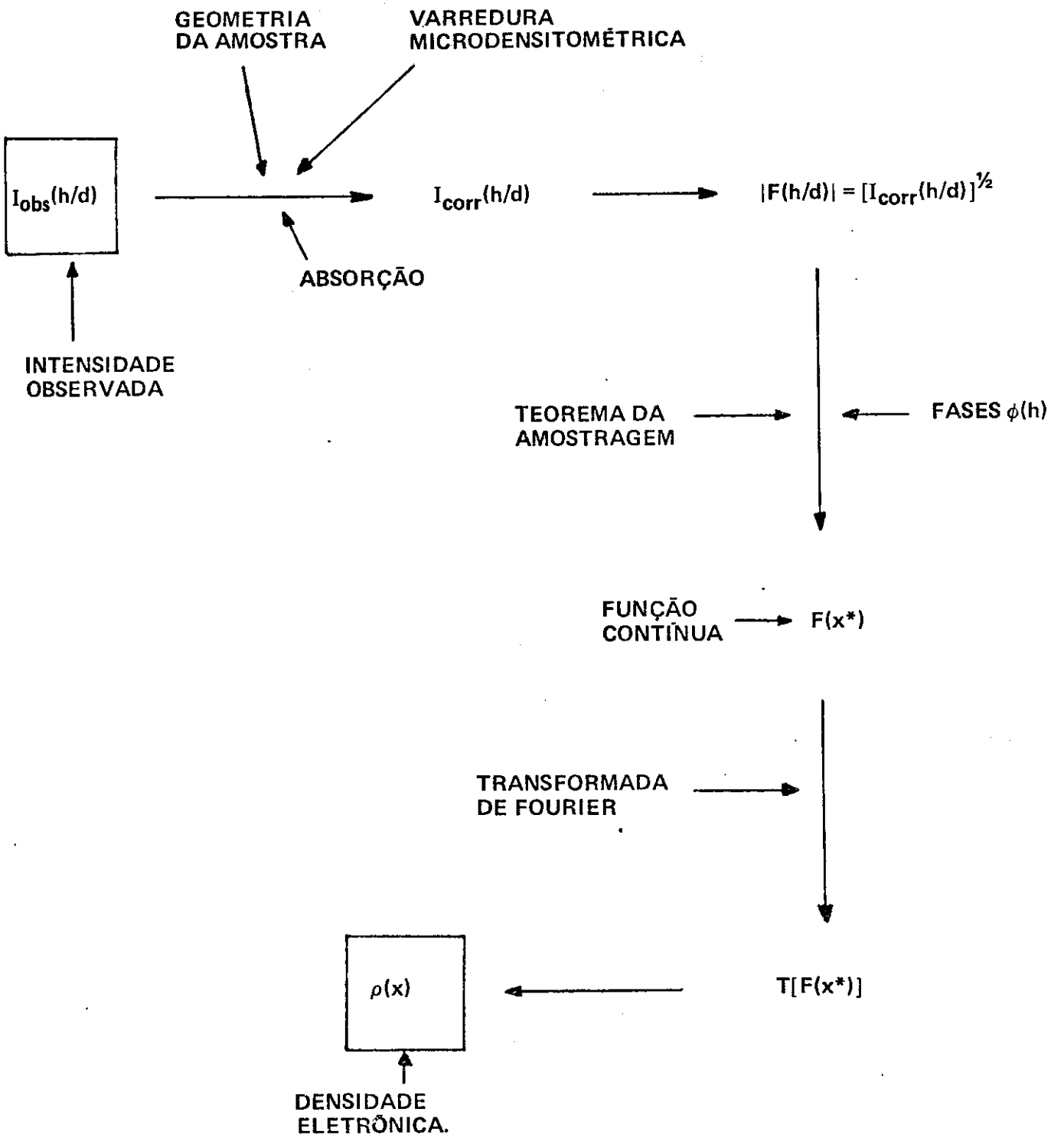
onde $\alpha(h)$ é a fase da reflexão de Bragg de ordem h, h_{max} é a ordem da última reflexão observada, d é a espessura da membrana e a função $\mathrm{sinc}(x)$ é definida como $\mathrm{sinc}(x) = \mathrm{sen}(x)/(x)$

O valor de $|F(0/d)|^2$ não é observado experimentalmente, entretanto ele é necessário para a obtenção de $F(x^*)$. $|F(0/d)|$ é escolhido arbitrariamente, e alguma incerteza em seu valor não afeta significantemente $F(x^*)$. Tendo-se agora $F(x^*)$, nós podemos calcular $\rho(x)$, fazendo-se a sua transformada de Fourier.

Entretanto, devemos lembrar, que em se reconstruindo o perfil de densidade eletrônica a partir de um número finito de harmônicos, como é o nosso caso, nós inevitavelmente introduziremos características não inerentes ao perfil, ou seja, oscilações não devidas à detalhes estruturais.

A seguir apresentamos um esquema dos cálculos realizados para a obtenção do mapa de densidade eletrônica.

ESQUEMA PARA OBTENÇÃO DE $\rho(x)$



CAPÍTULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 - Materiais e Métodos:

Os materiais utilizados foram comprados da Sigma Chemical Cº - St. Louis -U.S.A. Nos experimentos utilizamos Lecitina Dipalmítica, tipo-L-α (L-α Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline) com pureza de 98%; Cardiolipina (Diphosphatidyl Glycerol) que se encontrava em solução de etanol a 3,4 mg/ml; e o Citocromo-C tipo III com pureza de 99%.Os materiais - foram utilizados sem purificações adicionais.

O método utilizado nas experiências foi difração de raios-x a baixo ângulo, que em princípio não é diferente dos demais métodos de difração de raios-x. Entretanto, ele requer instrumentos especiais. A dificuldade real está em produzir um feixe de raios-x suficientemente fino, com um halo de radiação parasita bastante pequeno, e ainda ter intensidade suficiente para difração e mais, a radiação deve ser monocromática.

Para tal experimento nós usamos uma câmera de baixo ângulo tipo Kratky (Fig. IV-1),fabricada pela Rigaku - Denki Cº- (Japan), com colimação linear (Fenda de 20 μm) e caminho de vácuo (29). Utilizamos um gerador Phillips com tubo de cobre de foco fino, operado a 20mA e 40 Ky (0,8 Kw).A ra

diação utilizada foi Kα do cobre (λ = 1,54 Å) , obtido por monocromatização com filtro de Níquel.

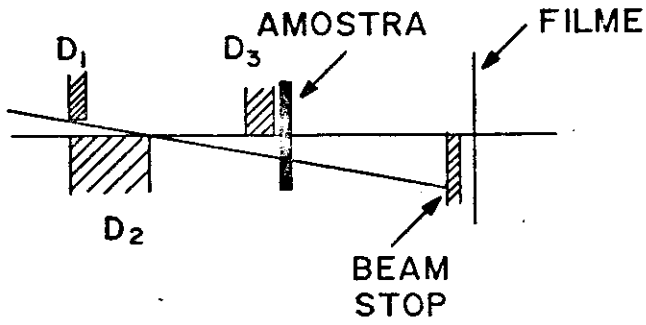


Fig.IV.1 - Esquematização da Câmera de Kratky

Para a análise microdensitométrica dos diagramas de difração, utilizamos um microdensitômetro Nalumi de varredura automática, com fenda de iluminação de 240 x 360 μm e da foto multiplicadora de 180 x 300 μm.

Nas fotos IV.1 e IV.2 mostramos, respectivamente, a montagem de Laboratório e o sistema de fendas de Kratky, utilizados em nossos experimentos.

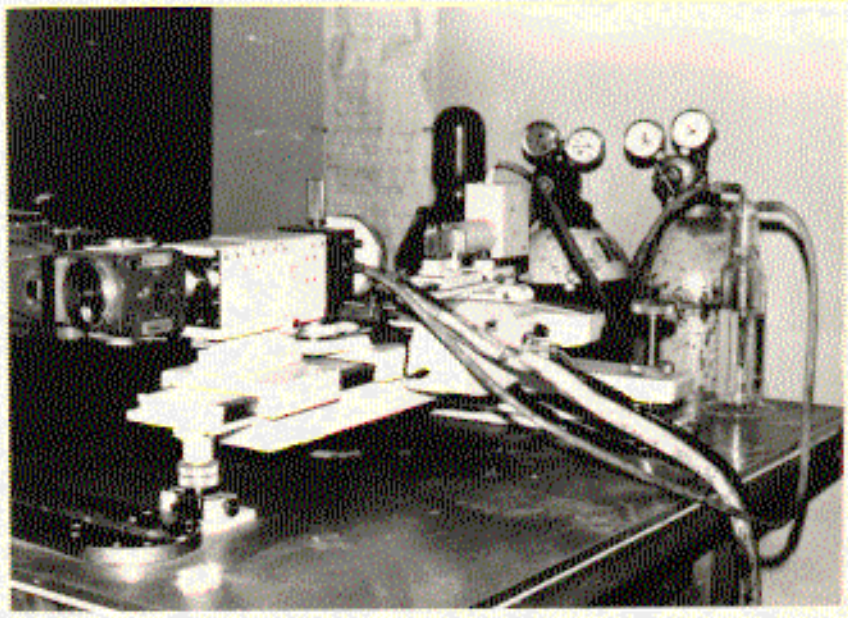


Foto IV.1 - Montagem de laboratório utilizada.

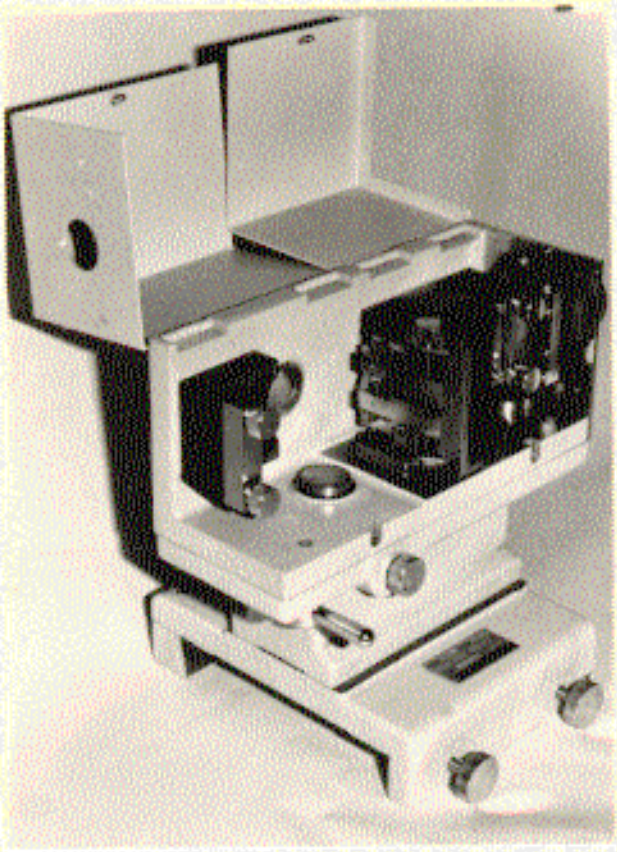


Foto IV.2 - Sistema de Fendas de Kratky.

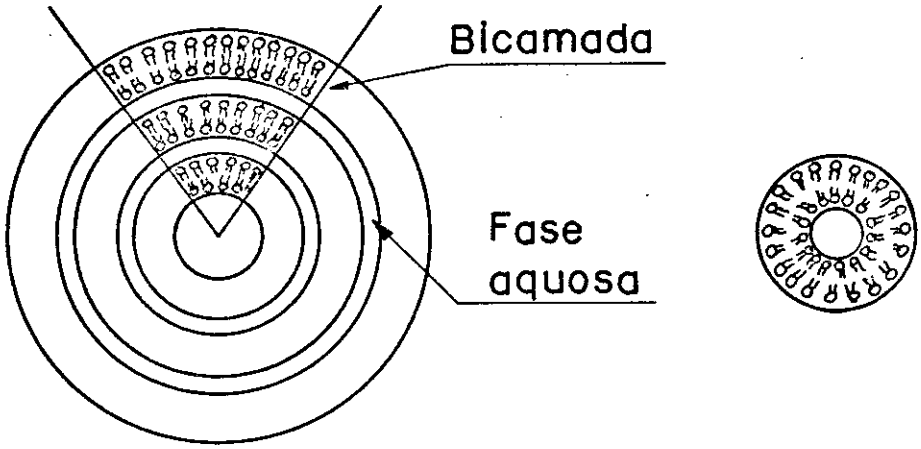
IV.2 Preparo das dispersões

Foram preparados dispersões com três composições diferentes, uma dispersão somente de D.P.L. (Lecitina - Dipalmítica), uma outra misturando-se D.P.L. e Cardiolipina e uma última onde tinhamos DPL/ Cardiolipina e Citocromos-C.

Nós usamos D.P.L. e Cardiolipina por serem - fosfolipídeos abundantes nas membranas. A cardiolipina, foi - particularmente escolhida, por se tratar de um fosfolipídeo que tem uma carga resultante negativa e era nosso desejo que a membrana tivesse realmente uma carga não nula, pois os citocromos ligam-se eletrostaticamente às mesmas.

a) Preparo da dispersão de D.P.L:

A lecitina Dipalmítica , foi dissolvida em clorofórmio e posteriormente secada nas paredes de um tubo de ensaio, por uma corrente de nitrogênio. Em seguida adicionou-se soluçõe tampão (KH_2PO_4) 0,01 Molar de pH = 7,25. A concentração da dispersão foi de 20 mg/ml. Esses fosfolipídeos, quando dissolvidos em solução aquosa, formam expontaneamente vesículas multilamelares concêntricas, separadas por camadas aquosas (Fig. IV.2a). Para obtermos uma população bastante homogênea - de vesículas unilamelares (Fig. IV.2b), nós submetemos a dis - persão ao ultrason.



a b

Fig.IV.2 - Representação esquemática das vesículas

a - Vesícula multilamelar

b - Vesícula unilamelar

Uma onda de ultrason que se propaga em um meio, consiste de compressões e rarefações alternadas. Se esta onda é aplicada a um líquido e se for bastante forte, se formará uma quantidade inumerável de bolhas microscópicas que implodirão. Este fenômeno é conhecido como cavitação. Ainda mais, quando a energia é suficientemente intensa, as bolhas implodirão com tal força, que produzirão mudanças de pressão local,da ordem de milhares de atmosfera. A energia mecânica liberada é tão intensa como para romper as paredes celulares ou como em nosso caso quebrar as vesículas multilamelares, para que se formem vesículas unilamelares.

O aparelho de ultrason utilizado foi um Branson- B-12 operado a aproximadamente 30 watts, que foi cedido

pelo departamento de biologia Celular da UNICAMP.

b) Preparo da dispersão de D.P.L./Cardiolipina:

A cardiolipina encontra-se em solução de etanol, a uma concentração de 3,4 mg/ml. Para obtermos a dispersão D.P.L./Cardiolipina, juntamos o D.P.L. com a solução de Cardiolipina, em proporções previamente determinadas. A seguir é feita a secagem desta solução por uma corrente de nitrogênio. Os procedimentos seguintes para a obtenção da dispersão são idênticos aos descritos em (a) para as dispersões de D.P.L.

As dispersões foram preparadas segundo uma proporção molar de 4:1, respectivamente de D.P.L. e Cardiolipina. A concentração da dispersão foi de 40 mg/ml, ou seja 40 mg de fosfolipídeos (D.P.L. + Cardiolipina na proporção 4:1) - por mililitro de dispersão. Outras dispersões com diferentes - proporções entre D.P.L. e Cardiolipina foram preparadas, mas - os diagramas de difração obtidos não foram bons e sua análise foi abandonada.

c) Preparo da dispersão de D.P.L./Cardiolipina/Citocromo-C

Para prepararmos a dispersão D.P.L./Cardiolipina/Citocromo-C, adicionamos os citocromos-C a uma parte da solução de D.P.L./Cardiolipina já preparada da maneira indicada no ítem anterior. Isto torna-se obrigatório para que tenhamos a certeza de que a proporção de D.P.L./Cardiolipina nas duas dispersões, com e sem citocrmos-C, seja a mesma. Esta manutenção das proporções torna-se necessária, para que possamos finalmente comparar os efeitos da inclusão dos citocromos-C, sobre

o perfil de densidade eletrônica das membranas.

Os citocromos-C serão juntados à dispersão de vesículas unilamelares de DPL/Cardiolipina, em uma quantidade que é aproximadamente a metade daquela que seria necessária para que obtivéssemos uma estrutura hexagonal compacta, dos citocromos-C, em torno das vesículas de DPL/Cardiolipina.

O cálculo para a obtenção dessa quantidade de citocromos-C, é feito com base na área ocupada por cada uma das moléculas de D.P.L. e Cardiolipina, na superfície das vesículas. As moléculas de DPL e de Cardiolipina, tem formas aproximadamente cilíndricas e a área que consideraremos como sendo a ocupada por uma molécula na superfície das vesículas, é a área da secção reta destes cilindros. Essas moléculas, de D.P.L e Cardiolipina, colocam-se lado a lado para formarem a membrana, portanto o que precisamos obter é a área total desta membrana que será a área disponível para os citocromos-C se ligarem.

Por sua vez, as moléculas dos citocromos-C, tem forma aproximadamente esférica (Proteína globular) e a área que consideramos como sendo efetivamente a área de contato com a membrana, será a da secção reta destas esferas, na região equatorial das mesmas.

No quadro abaixo, nós mostramos os pesos moleculares e as áreas ocupadas pelas moléculas (28) constituintes da membrana, logo em seguida mostramos também uma representação esquemática das moléculas e das áreas consideradas. (Fig. IV.3).

	Peso Molecular	Área ($Å^2$/Molécula)
D.P.L.	734,1	40
Cardiolipina	1.462	100
Citocromo-C	12.400	707

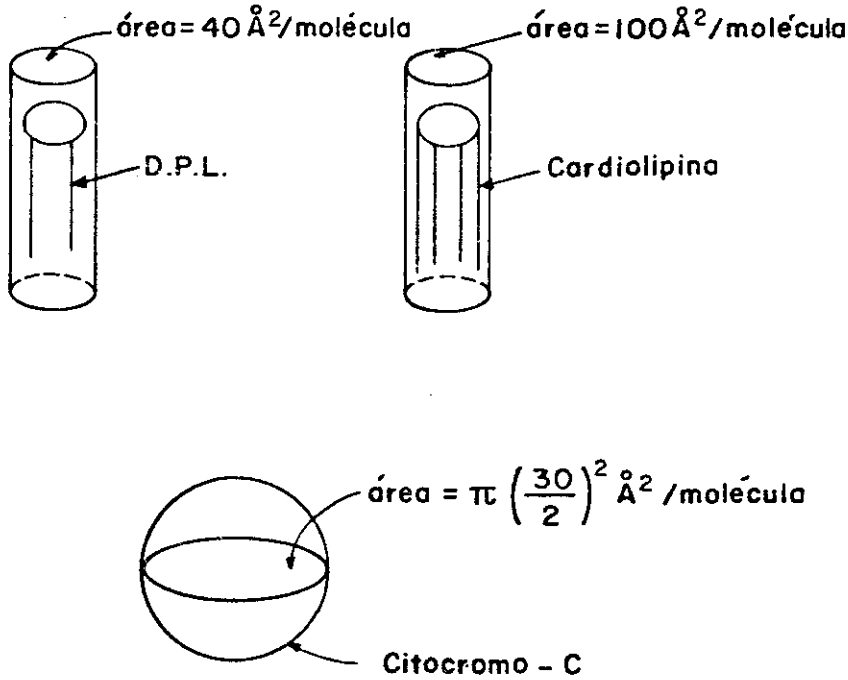


Fig. IV.3 - Representação esquemática das moléculas de D.P.L., Cardiolipina e Citocromo-C.

Inicialmente consideraremos 0,5 ml da dispersão anteriormente obtida, ou seja, 20mg de DPL/Cardiolipina em dispersão, na proporção 4:1 (em mol). Precisamos então saber qual é o número de moléculas de D.P.L. e de Cardiolipina -

presentes nestas quantidade de dispersão, para posteriormente calcularmos a área total das vesículas (membrana).

Temos então que:

1 mol de DPL 734,1 gr

1 mol de Cardiolipina 1.462 gr

Seja m o número de mols de Cardiolipina e 4m o nº de de mols de DPL necessários para se obter 20 mg da dispersão desejada, logo devemos resolver a seguinte equação:

$$4m \cdot 734,1 + m \cdot 1462 = 0,02 \text{ gr}$$

ou seja: $m = 4,54 \cdot 10^{-6}$ mols.

Então devemos juntar:

DPL = 13,33 mg

Cardiolipina = 6,66 mg

Em moléculas esses números são:

DPL = $2,73 \times 10^{18}$ moléculas

Cardiolipina = $10,92 \times 10^{18}$ moléculas

Sendo que cada molécula de DPL ocupa uma área de 40 $Å^2$ e a cardiolipina ocupa 100 $Å^2$, a área total, ocupada por todas as moléculas de DPL e Cardiolipina será:

Área Total = $(10,92 \cdot 40 \times 2,73 \cdot 100)\ 10^{18} = 7,1 \times 10^{20}\ Å^2$

Como a área ocupada por uma molécula de citocromo-C é de 707 $Å^2$, o número de citocromos-C necessários para

uma estrutura hexagonal compacta será:

$$\text{nº de citocromos-C} = \frac{7{,}1 \times 10^{20}}{707} \simeq 1.10^{18} \text{ moléculas}$$

o que equivale em peso à:

Peso de citocromos-C = 0,0206 gr = 20,6 mg

Para o nosso caso, juntamos a metade desta - quantidade ou seja 10,3 mg, assim sendo nós teremos 0,5 ml - de dispersão, com a seguinte composição:

Cardiolipina = 6,66 mg
DPL = 13,33 mg
Citocromo-C = 10,3 mg

Após adicionarmos os citocromos-C à dispersão de DPL/Cardiolipina, a mesma foi novamente submetida ao ultrasom de acordo com processo já detalhado anteriormente (ítem-a).

IV.3 - Preparo e secagem das amostras para os experimentos de difração

As amostras para os experimentos são preparadas, depositando-se as dispersões sobre um substrato de vidro de forma cilíndrica (Fig. IV.4), de área aproximadamente - igual a 1 cm^2 e cujo raio de curvatura é em torno de 2cm.

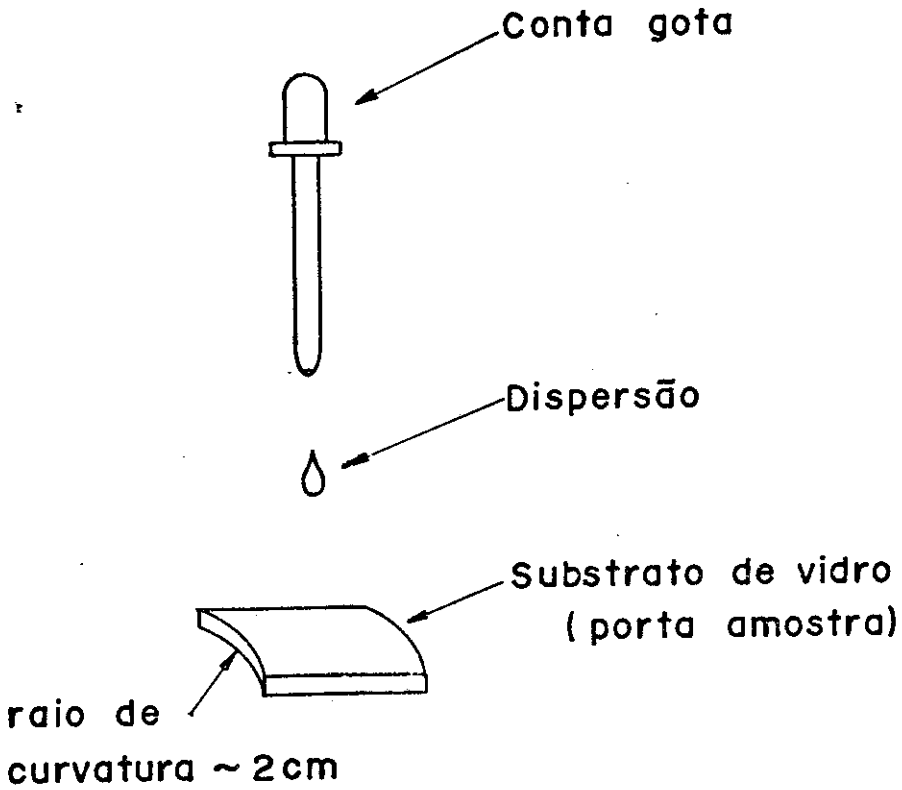


Fig. IV.4 - Esquematização do substrato de vidro utilizado e do preparo da amostra.

As amostras são, posteriormente, levadas à secagem em ambiente de umidade constante. Estes ambientes de umidade constante, são obtidos sabendo-se que alguns produtos químicos, quando em excesso, em contato com uma solução aquosa saturada do mesmo e a uma determinada temperatura, se mantidos em um ambiente fechado, são capazes de manter a umidade do meio ambiente constante.

Inicialmente as amostras foram secadas a quatro umidades diferentes, 15%, 56%, 75% e 81%, à temperatura ambiente. Entretanto, para os experimentos finais foram utilizadas somente amostras de 56% e 75%, que foram as que produzi

ram melhores diagramas de difração.

As amostras secadas à 15% de umidade, normalmente apresentam-se "rugosas". Isto talvez se deva ao fato da atmosfera ser muito seca e consequentemente a secagem muito rápida, não havendo tempo suficiente para que os fosfolipídeos atinjam seu grau máximo de ordenação nas membranas. Quando mantemos a umidade muito alta, as amostras conseguidas também apresentam um alto grau de desordem e em ambos os casos obtemos diagramas de difração de qualidade inferior.

Portanto, faz-se necessário escolhermos uma faixa de umidades intermediária (De 70% a 80% de umidade),para que obtenhamos bons diagramas de difração de raios-x,pelas amostras assim mantidas.

Para mantermos a umidade das amostras durante a exposição aos raios-x, ou seja, durante a obtenção dos diagramas de difração, fazemos passar através da câmera porta amostras um fluxo de Nitrogênio, que antes passa por um lavador de gases que contém um sal que nos dá a umidade desejada.

IV.4 - Obtenção dos diagramas de difração de Raios-X por membranas

Os diagramas de difração foram obtidos, utilizando-se os instrumentos e especificações detalhados no ítem - IV.1.

Na Fig. IV.5, nós mostramos um esquema de como obtermos os diagramas de difração pelas membranas.

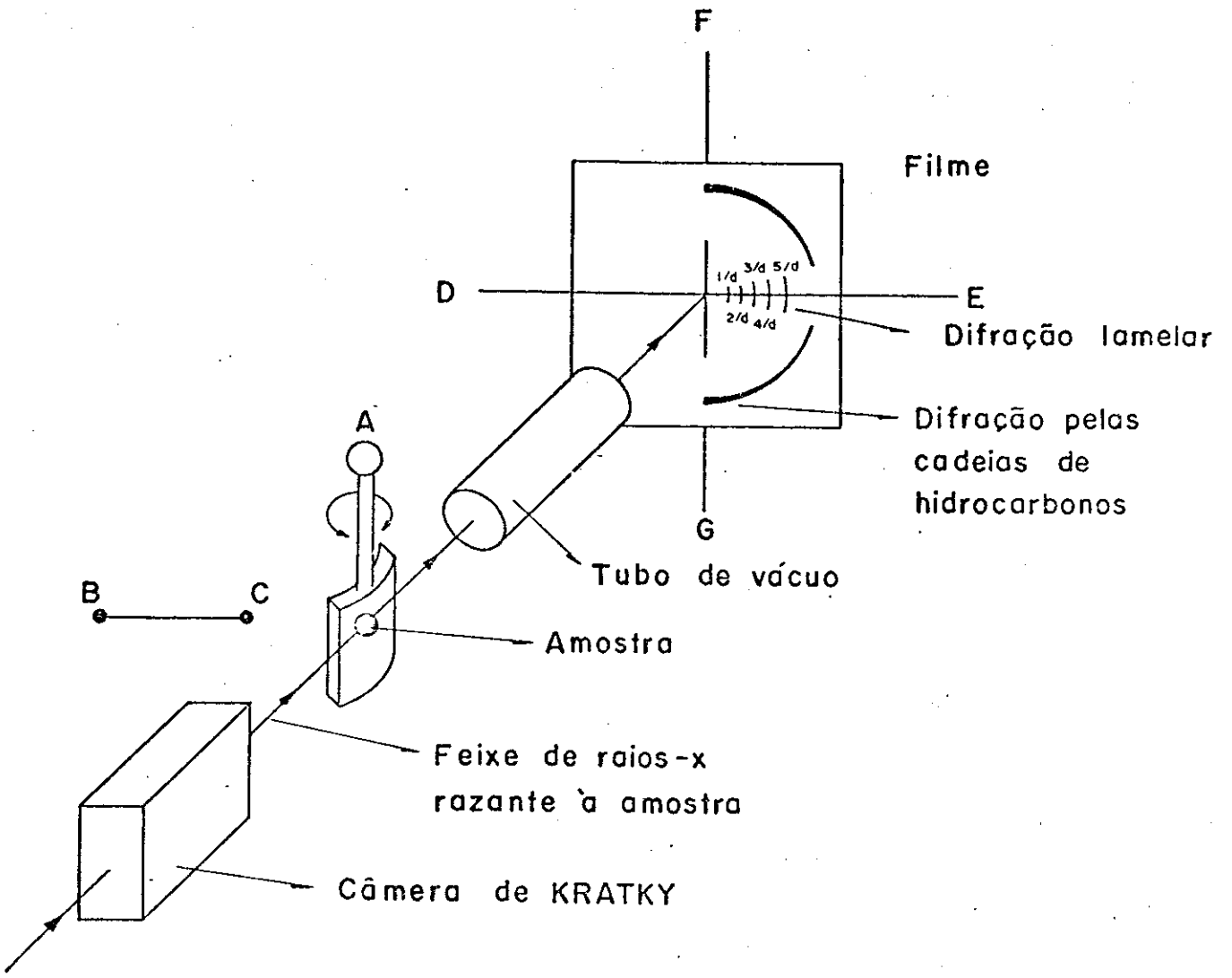


Fig. IV.5 - Esquematização da obtenção dos diagramas de difração de Raios-X por membranas

Conforme podemos ver na esquematização anterior, o feixe de raios-x incide sobre a amostra de forma a apenas tangenciá-la na sua superfície cilíndrica, sendo que sua penetração na mesma é de apenas alguns microns (na direção perpendicular a do feixe incidente). Existe um mecanismo de controle, que nos possibilita a aproximação da amostra até o feixe - (Direção B-C na Fig. IV.5), assim como um eixo (Eixo A na Fig. IV.5) que nos permite girar a amostra.

IV.4.1 - Característica dos diagramas difração de raios-x - por membranas

O filme é colocado perpendicular à direção do feixe de raios-x incidente. Nos diagramas obtidos nós observamos as difrações lamelares na direção meridional (Direção D-E na fig. IV.5), que são devidas ao empilhamento das membranas e um anel de difração na direção equatorial (Direção F-G na Fig. IV.5), que é devido ao arranjo das cadeias de hidrocarbonos, - dentro de cada membrana. Este anel, que normalmente é difuso, tem uma intensidade que é decrescente, no sentido da direção equatorial para meridional, chegando a ser praticamente nula neste ponto.

O fato das membranas difratarem raios-x em uma direção, que é perpendicular àquela em que difratam as cadeias de hidrocarbonos dos fosfolipídeos nela contidos, vem evidenciar a característica das mesmas, de que os fosfolipídeos ordenam-se dentro de cada membrana, perpendicularmente à mesma *.

* Devemos salientar, entretanto, que em nossos diagramas não conseguimos registrar a difração equatorial (Anel da cadeia de hidrocarbonos), pelo fato de que a nossa câmera porta filmes (cassete) é pequena, e assim sendo este anel caía fora da região - abrangida pelo filme.

Os filmes são colocados no cassete, normalmente superpostos em número de três ou mais, isto para que nós não percamos tempos de exposição tão altos, como são os nossos (Os tempos de exposição variam entre 5 e 40 horas), quando, por exemplo, ocorre saturação do filme por excesso de exposição para as linhas mais intensas. Neste caso, nós podemos escolher um filme posterior, no qual estas linhas não estão saturadas e compor o diagrama de difração total normalizando adequadamente as intensidades. A revelação dos filmes foi feita com o revelador a $18^{o}C$, durante 3 min. Os filmes usados foram Ilford Industrial G para todas as experiências.

IV.4.2 - Diagramas de difração de raios-x obtidos para as diferentes amostras.

Dentre os diagramas obtidos desde o início das medidas (Cerca de setenta), selecionamos três, o melhor para cada tipo de dispersão analisada. Esses três diagramas são mostrados nas fotos IV.3, IV.4 e IV.5, respectivamente obtidos das amostras de D.P.L, DPL/Cardiolipina e D.P.L/Cardiolipina / Citocromo-C. Os diagramas foram todos obtidos à temperatura ambiente e a distância entre o filme e a amostra foi a mesma em todos os casos, igual a 50 mm (A mínima possível). As demais condições em que foram obtidos os diagramas e que não são comum aos mesmos, encontram-se especificadas junto a cada um dos diagramas.

IV.5 - Análise microdensitométrica dos diagramas de difração de raios-x por membranas.

Para a obtenção das intensidades, das difra - ções lamelares das membranas, nós utilizamos um microdensitômetro Naluni de varredura automática,com fenda de iluminação fixada em 240 x 360 μm e fenda da fotomultiplicadora em ... 180 x 300 μm.

O "background" para estes diagramas é determinado, supondo-se que a intensidade mínima entre os máximos de difração é nula, assim sendo uma curva suave (background) é traçada através dos mínimos da curva de intensidades (13).

A intensidade líquida espalhada pela amostra, será obtida descontando-se da curva de intensidades traçada pelo microdensitômetro, os correspondentes valores da curva de "background" (curva tracejada). Nos traçados microdensitométricos a seguir, o ponto A é a origem do eixo da coordenada recíproca $x^* = (2 \operatorname{sen}\Theta)/\lambda$. O fator de escala entre o traçado microdensitométrico e o diagrama de difração de raios-x é conhecido. As intensidades serão medidas em unidades arbitrárias. Essas intensidades I(h), serão posteriormente corrigidas (9,-13,21) por um fator h^2, sendo um fator h devido à estrutura da amostra, e o outro à análise microdensitométrica.

A partir dos traçados microdensitométricos,- nós podemos determinar a separação entre os máximos de difração, e conhecendo-se a distância filme-amostra nós conseguimos facilmente determinar o ângulo de difração desses picos (Ângulo de Bragg), e consequentemente, através da equação de Bragg, a espessura das membranas na direção perpendicular ao seu plano.

Os traçados microdensitométricos dos gráficos IV.1. IV.2 e IV.3, correspondem respectivamente às fotos - IV.3, IV.4 e IV.5 do ítem anterior. A mesma correspondência existe entre a tabela IV.1 e as referidas fotos.

IV.6 - Análise estrutural das membranas

A partir dos dados obtidos dos diagramas de difração de raios-x, pelas membranas e encontrados na tabela IV.1, nós podemos determinar o perfil de densidade eletrônica - das membranas e consequentemente sua estrutura.

Para obtenção deste perfil, nós utilizamos um programa de computador+, que se baseia na teoria descrita no capítulo-III. Este programa inicialmente faz as correções das intensidades, ou seja, dos valores de $|F(h/d)|$. Em seguida ele reconstrói $F(x^*)$ (função contínua), o fator de estrutura, usando o teorema da amostragem. (8, 9, 21, 30, 31)

Utilizando a função $F(x^*)$ calculada, nós fazemos a sua trasnformada de Fourier obtendo assim o perfil de densidade eletrônica da membrana. O programa é executado com todas as possíveis combinações de fases e o perfil de densidade - eletrônica é corretamente escolhido por comparação com o modelo descrito no capítulo III. Ainda, a esse programa, anexamos uma parte que nos permite a obtenção dos perfis de densidade eletrônica, diretamente do graficador do computador. O computador usado foi um PDP-10 - da UNICAMP.

Os perfis obtidos e mostrados nos gráficos - IV.4, IV.5 e IV.6, correspondem respectivamente aos traçados microdensitométricos dos gráficos IV.1, IV.2 e IV.3.

+ - O referido programa está em meu poder e poderá ser consultado, por quem desejar.

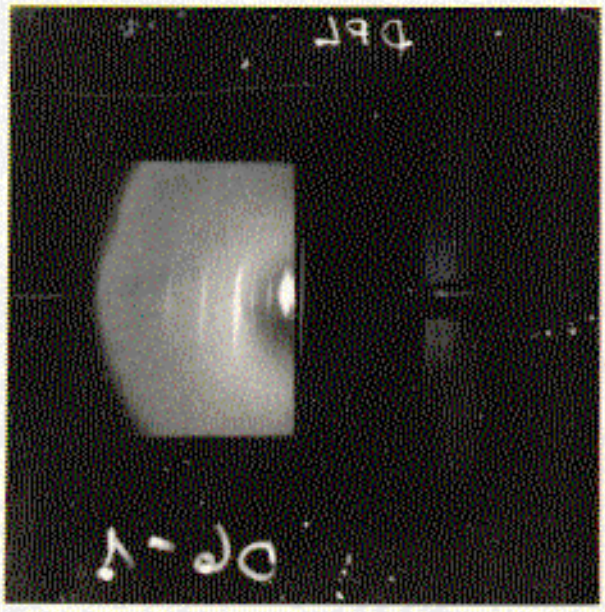


Foto IV.3 - Diagrama de Difração de raios-x por membranas de D.P.L.

Características do diagrama da Foto IV.3

Amostra:- D.P.L.

Fenda da Câmera de Kratky: 20 µm x 2 mm

Umidade da amostra durante secagem = 56%

Umidade da amostra durante exposição- 56%

Tempo de exposição: 07 horas

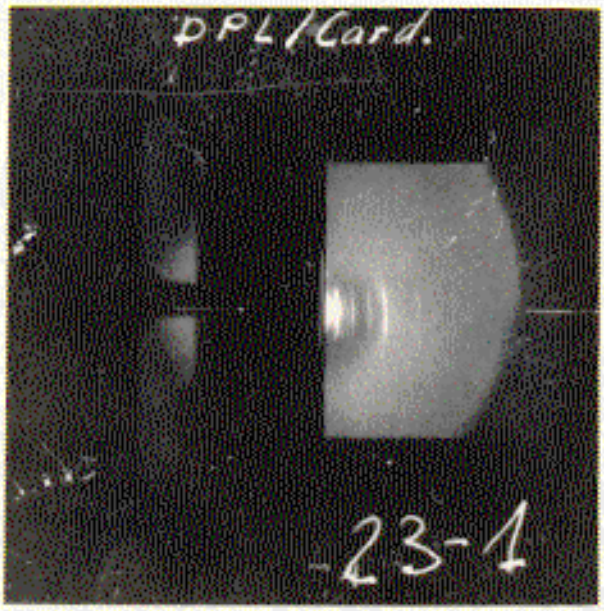


Foto IV.4 - Diagrama de Difração de raios-x por membranas de D.P.L./Cardiolipina

Características do diagrama da Foto IV.4

Amostra:- D.P.L./Cardiolipina

Fenda da Câmera de Kratky: 20 µm x 1 mm

Umidade da amostra durante secagem = 56%

Umidade da amostra durante exposição = 75%

Tempo de exposição: 20 horas e 50 min.

Foto IV.5 - Diagrama de Difração de raios-x por membranas de D.P.I./Cardiolipina/Citocromo-C.

Características do diagrama da Foto IV.5

Amostra :- D.P.I./Cardiolipina/Citocromo-C

Fenda da Câmera de Kratky: 20 µm x 3 mm

Umidade da amostra durante a secagem = 75%

Umidade da amostra durante a exposição= 75%

Tempo de exposição: 40 horas e 20 min.

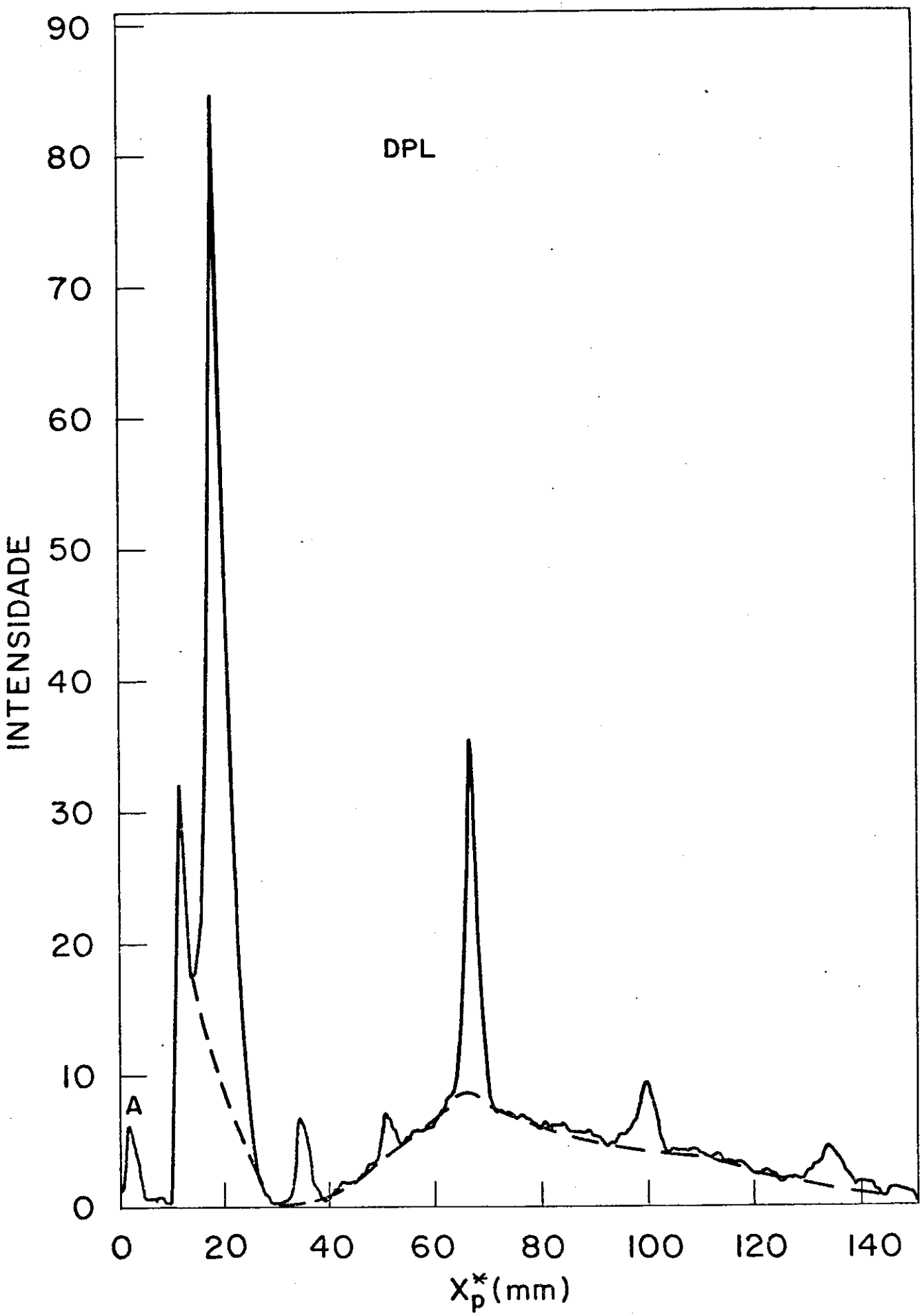


Gráfico IV.1 - Traçado microdensitométrico do diagrama de difração por membranas de D.P.L. (——) e respectiva curva de "background" (----).

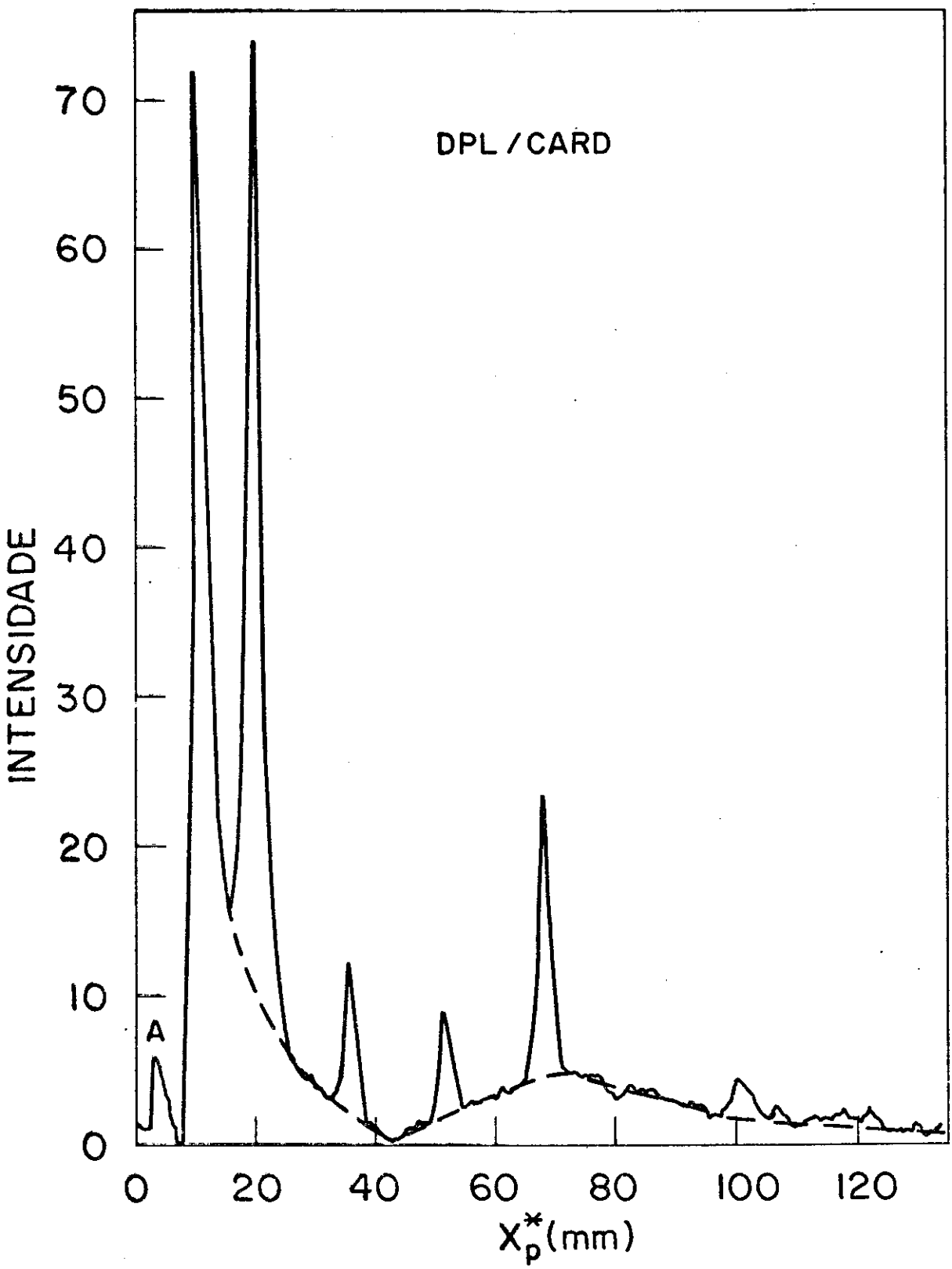


Gráfico IV.2 - Traçado microdensitométrico do diagrama de difração por membranas de D.P.L./Cardiolipina (———) e respectiva curva de "background" (-----).

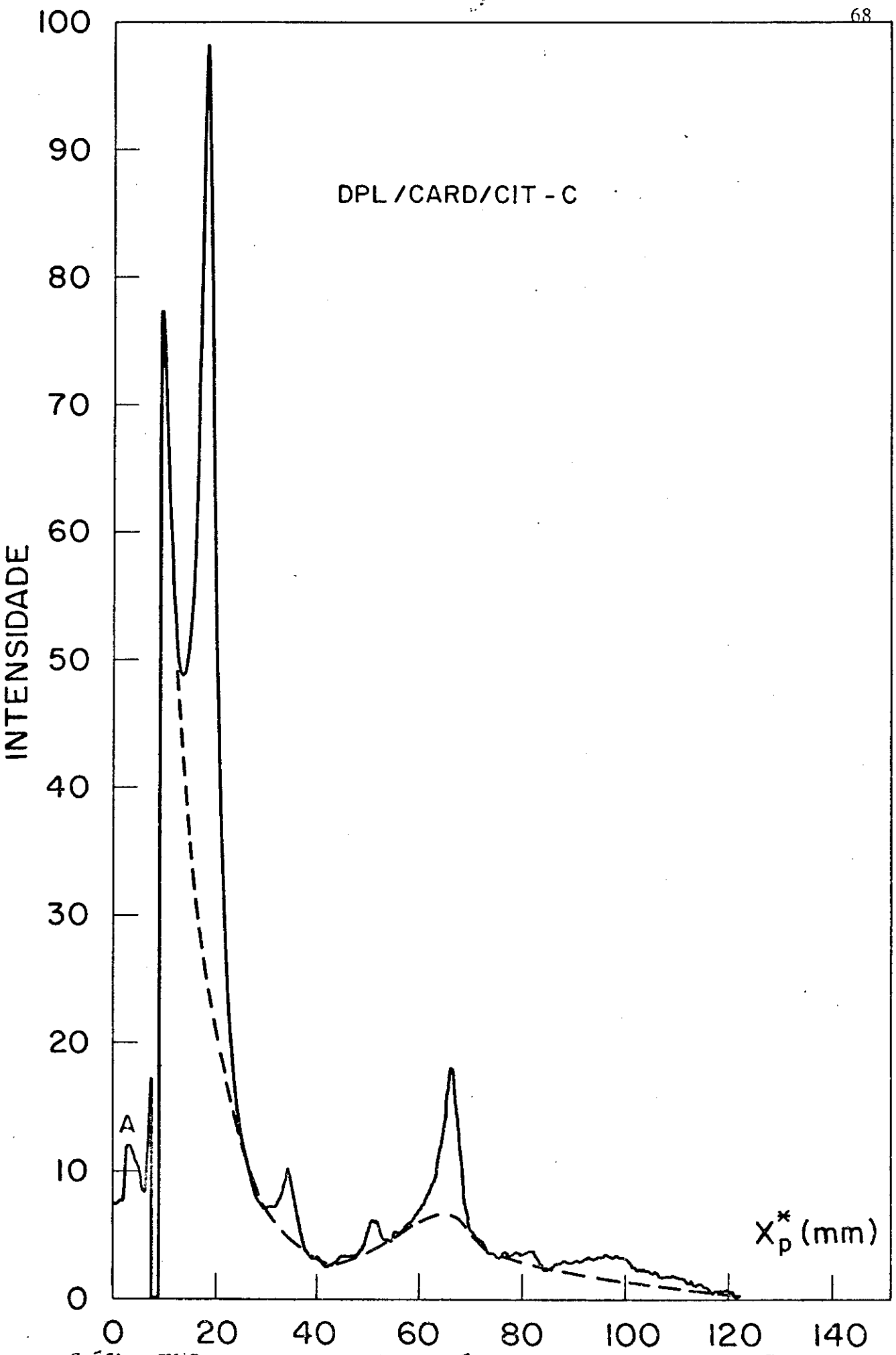


Gráfico IV.3 - Traçado microdensitométrico do diagrama de difração por Membranas de D.P.L/Cardiolipina/Citocromo-C (———) e respectiva curva de "background" (----).

Tabela IV-1 - Intensidades * das difrações lamelares

Dispersão	DPL	DPL/Card	DPL/Card/CiT-C
Umidade	56%	75%	75%
Espessura da membrana (Å)	55,06	57,76	58,37
h			
1	73,0	63.8	73.2
2	6,8	10.3	5.2
3	3.0	7.0	2.4
4	26.5	18.6	11.2
5	0.0	0.0	1.0
6	5.5	2.6	1.8
7	0.0	0.0	0.0
8	3.1	0.0	0.0

* Antes das correções por h^2

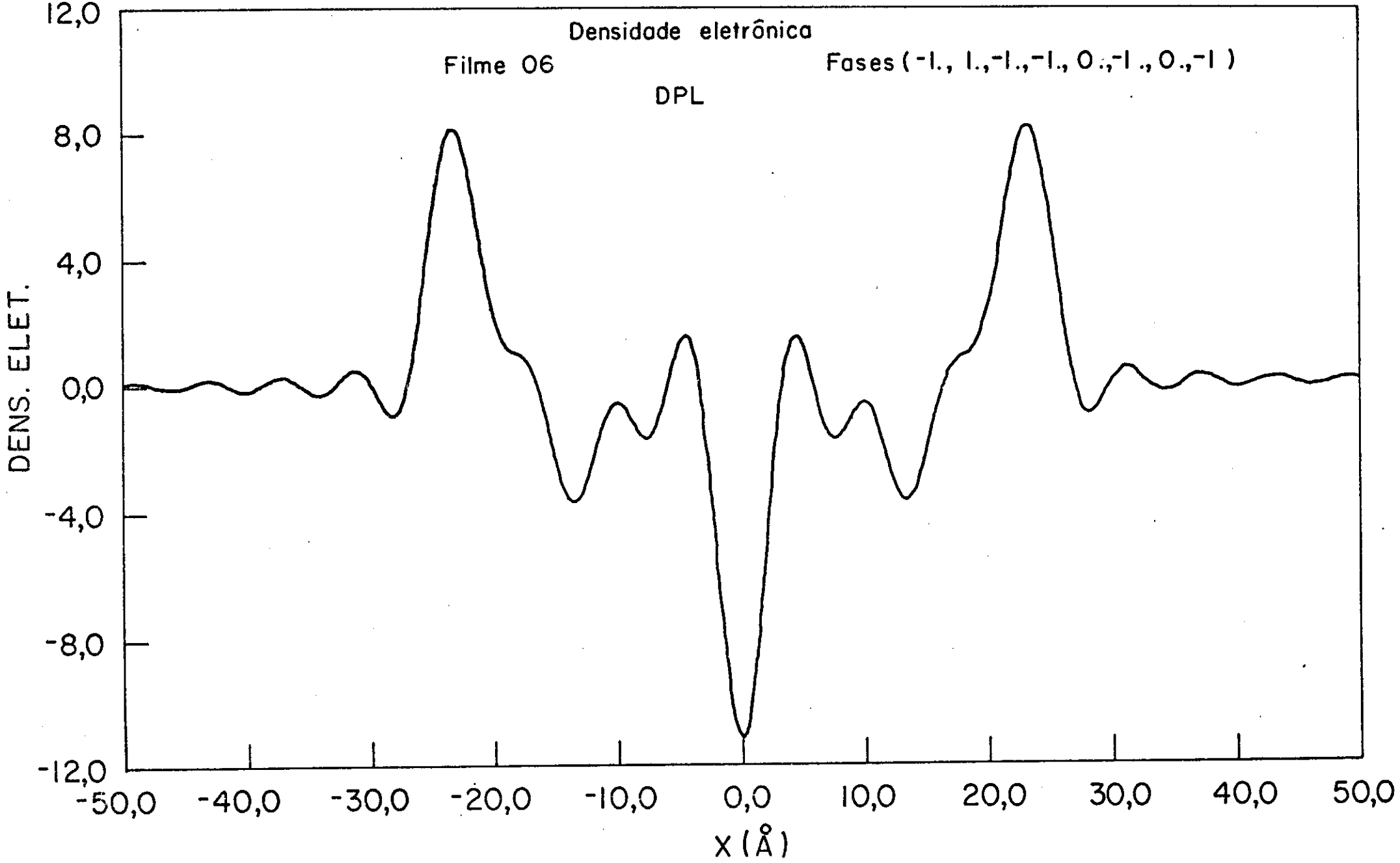


Gráfico IV.4 - Perfil de Densidade Eletrônica das membranas de D.P.L.

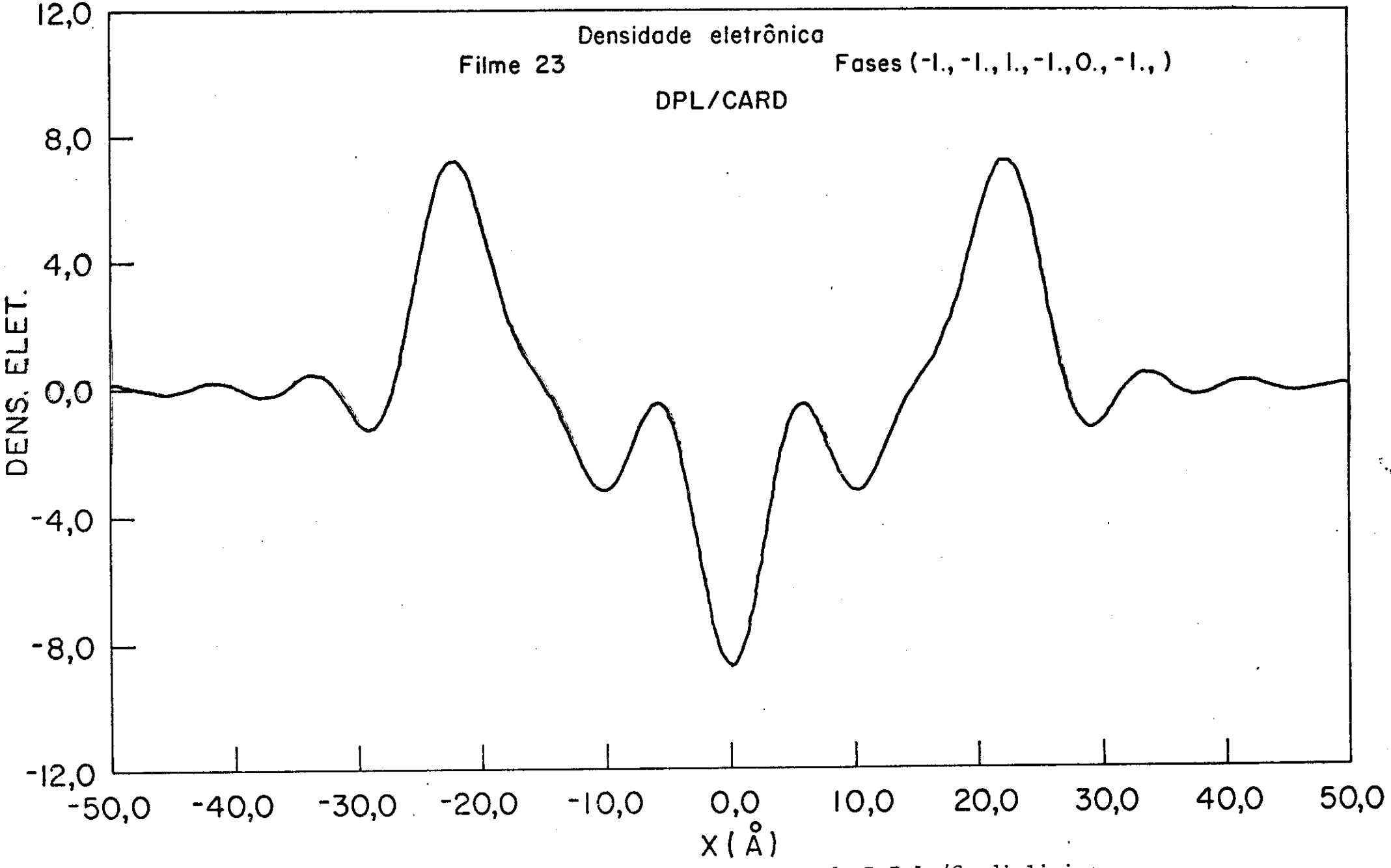


Gráfico IV.5 - Perfil de Densidade Eletrônica das membranas de D.P.L./Cardiolipina

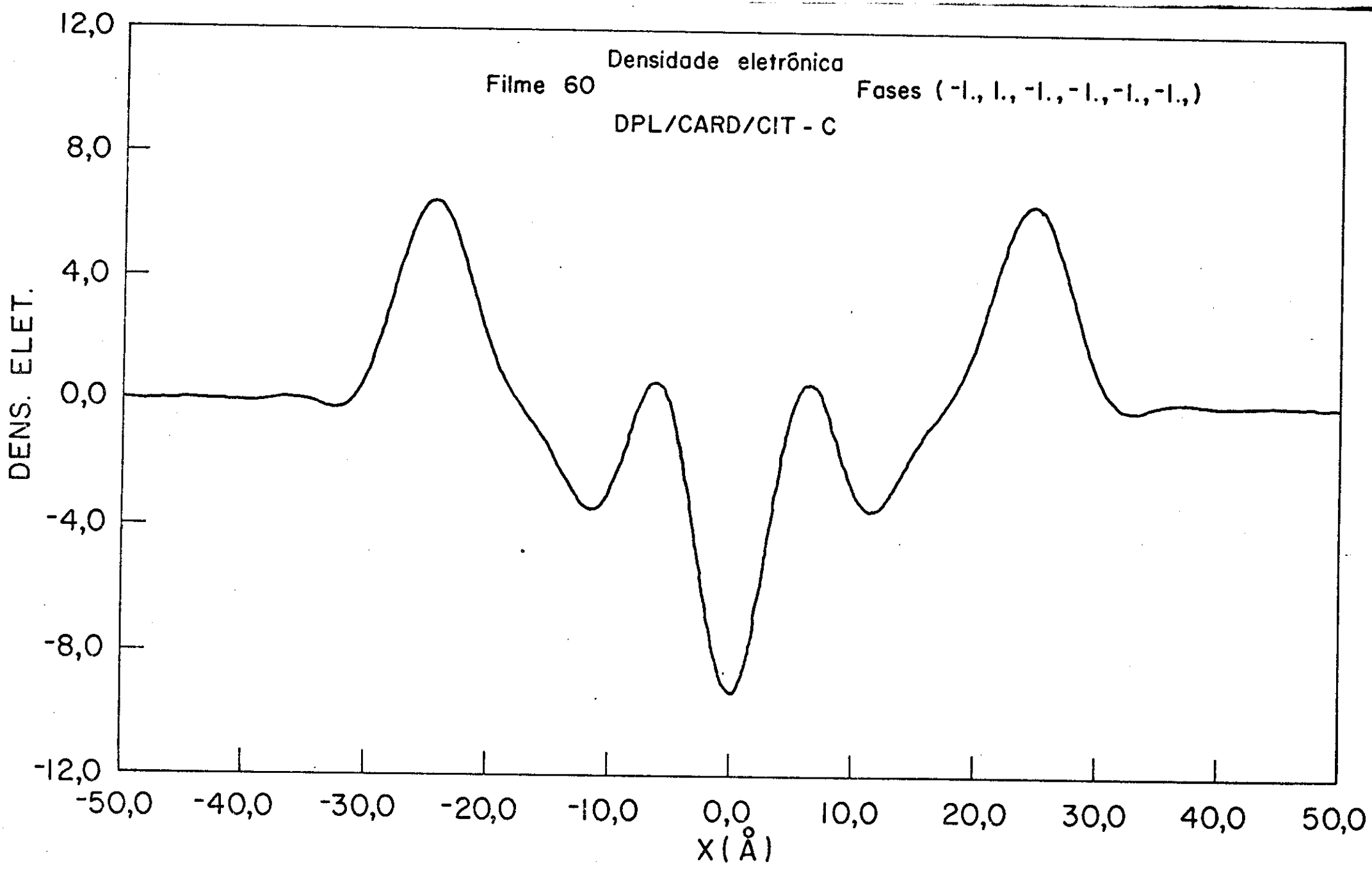


Gráfico IV.6 - Perfil de Densidade Eletrônica das membranas de D.P.L/Cardiolipina/Citocromo-C

CAPÍTULO V

RESULTADOS E CONCLUSÕES

V.1 - Resultados

Desde o início de nosso trabalho, nos preocupamos em otimizar as condições experimentais, e isso nos levou a alguns resultados preliminares.

Uma variação sistemática da geometria da difração, levou-nos a concluir que conseguíamos uma melhor resolução nos diagramas de difração, quando utilizávamos, no sistema de colimação de Kratky, uma fenda de 20 μm de largura e uma altura entre 1 e 3 mm.

Para quase todas as amostras utilizadas, a umidade que se mostrou mais adequada para mantermos as mesmas, foi por volta de 75%. Determinamos também que a proporção entre os fosfolipídeos, DPL e Cardiolipina, de 4:1 (em mols), respectivamente, foi a que produziu melhores diagramas de difração.

Como resultados finais deste trabalho, determinamos as fases, o perfil de densidade eletrônica e a espessura da membrana, para os diferentes sistemas, DPL, DPL/Cardiolipina e DPL/Cardiolipina/Citocromo-C. A espessura das membranas foi determinada a partir dos perfis de densidade eletrônica das mesmas, considerando-se a separação entre os dois mínimos - imediatamente externos às cabeças polares. Os dados obtidos são os seguintes:

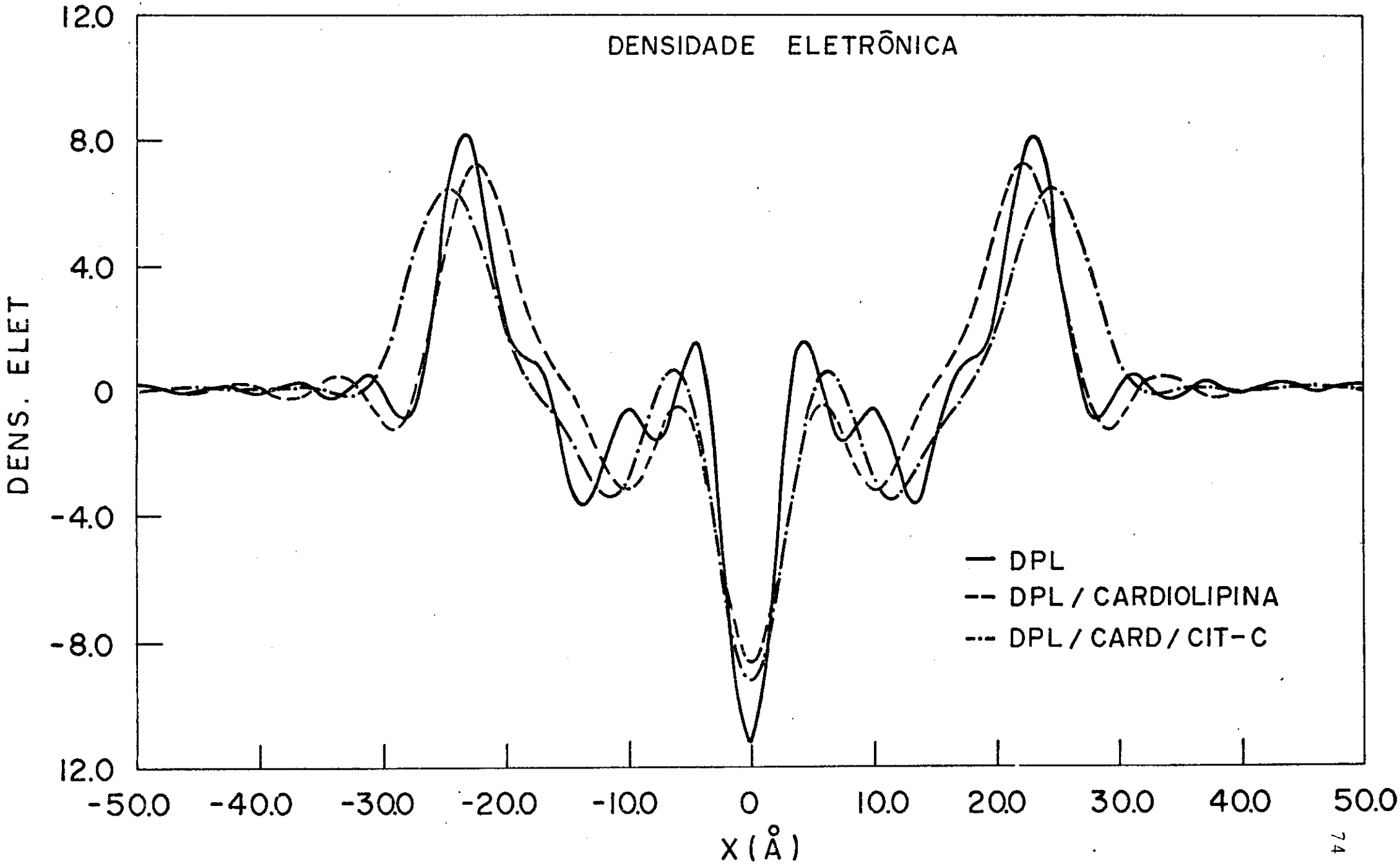


Gráfico V.1 - Perfis de densidade eletrônica das membranas de DPL, DPL/Card, DPL/Card/Cit.-c

	Espessura das membranas	Fases
D.P.L.	56,4 Å	(-1,1,-1,-1,0,-1,0,-1)
D.P.L./Cardiolipina	58,2 Å	(-1,-1,1,-1,0,-1)
D.P.L/Cardiolipina/ Citocromo-C	65,6 Å	(-1,1,-1,-1,-1,-1)

Os perfis de densidade eletrônica, para os três sistemas, são superpostos e apresentados no Graf. V.1. A resolução foi de 4 Å para o sistema D.P.L. e de 5 Å para os demais.

V.2 - Conclusões

Uma primeira comparação entre os perfis de densidade eletrônica dos sistemas D.P.L. e D.P.L./Cardiolipina, apresenta algumas diferenças relevantes.

Dentre essas diferenças, nós podemos enumerar quatro de maior importância, que são: a) O aumento na espessura das membranas, quando se passa do sistema DPL para o sistema DPL/Cardiolipina. Esse aumento pode ser devido à repulsão eletrostática das cabeças polares das moléculas de cardiolipina, assim como pode ser devido ao fato de que as cadeias de hidrocarbonos da cardiolipina são mais longas que as do D.P.L.

ou aos dois simultaneamente. b) O alargamento dos picos devido às cabeças polares dos fosfolipídeos. Este alargamento deve- se ao fato de que as moléculas de cardiolipina possuem uma cabeça polar maior que a do D.P.L. e consequentemente irão alargar os referidos picos. c) O encurtamento e consequentemente alargamento do pico negativo no centro da região hidrofóbica, o que é com certeza devido à deslocalização dos grupos metil terminais, quando a cardiolipina é adicionada ao sistema contendo apenas D.P.L. d) A perda na resolução do grupo fosfato das cabeças polares, que aparece imediatamente na parte interna dos picos devidos às cabeças polares.

Na comparação final entre os perfis de densidade eletrônica dos sistemas D.P.L./Cardiolipina e DPL/Cardiolipina/Citocromo-C, ressalta-se um aumento na espessura da membrana, assim como um alargamento dos picos correspondentes às cabeças polares dos fosfolipídeos e uma consequente perda de definição dos mesmos. Enquanto que essas alterações ocorrem na parte hidrofílica das membranas, a parte hidrofóbica das mesmas, ou seja, a região central dos perfis de densidade eletrônica, é insensível à introdução dos citocromos-C, permanecendo praticamente inalterada.

Essas observações levam-nos verificar que os citocromos-C ligam-se superficialmente às membranas de fosfolipídeos, penetrando apenas na região das cabeças polares dos mesmos. Esta verificação ajusta-se plenamente com a suposição de que os citocromos-C ligam-se eletrostaticamente às moléculas de cardiolipina, que tem uma carga elétrica resultante.

Esses resultados também concordam com os obtidos por Brown e Wüthrich, utilizando métodos de N.M.R.e E.S.R., em novembro de 1977 (18).

Eles concluíram, a partir de suas experiências, que a incorporação dos citocromos-C nas bicamadas lipídicas, afeta o comportamento dinâmico da superfície das mesmas. Todavia, o interior da bicamada permanecia praticamente insensível à introdução das proteínas. Baseando-se nessas conclusões, eles propuseram um modelo como o esquematizado na Fig. V.1.

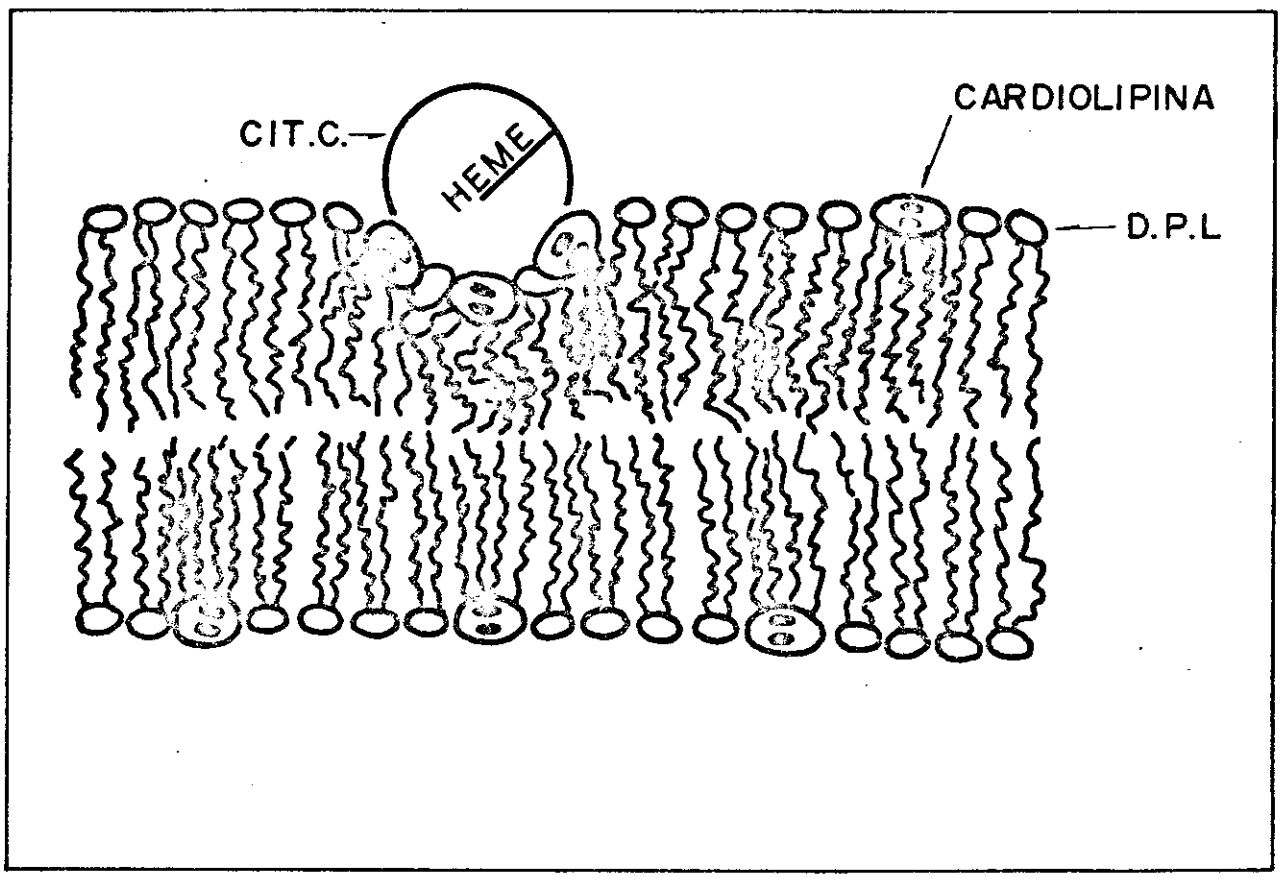


Fig. IV.1 - Modelo para as membranas de D.P.L./Cardiolipina/Citocromo-C. proposto por Brown e Wüthrich (Ref. 18)

Nós acreditamos que o modelo estrutural para as membranas, esboçado na Fig. V.1, concorda razoavelmente bem com o nosso perfil de densidade eletrônica obtido para as mem -

branas e que se conseguíssemos uma resolução maior nesses per - fis, eles mostrariam uma conformação que concordaria mais de perto com esse modelo, ou seja, deveria aparecer uma "saliência" na parte externa, dos picos que correspondem às cabeças polares, que seria devida aos citocromos-c.

Uma continuação deste trabalho seria orientado à determinação de perfis de densidade eletrônica de maior resolução, que permitissem avaliar o grau de penetração do citocromo, na região das cabeças polares. Tem-se proposto que as interações hidrofóbicas, também contribuem na ligação do cito - cromo-c à membrana, portanto, uma determinação mais precisa do seu grau de penetração, seria importante para a verificação desta hipótese.

BIBLIOGRAFIA

(01) Jain, M.H. - The Bimolecular Lipid Membrane: A Systen, Van Nostrand Reinhold Company, (1972).

(02) Levine, Y.K. - Prog. Bioph. Molec. Biol, 24, 1, (1972)

(03) Blaurock, A.E. - Biophysical Journal, 13, 281, (1973)

(04) Israelachvili, J.N. - Biochimica et Biophysica Acta, 469, 221, (1977)

(05) Israelachvili, J,N., Mitchell, P.J and Ninham, B.W. Biochimica et Biophysica Acta, 470, 185, (1977)

(06) Stoeckenius, W. and Engelman, D.M. - The Journal of Cell Biology, 42, 613, (1969)

(07) Singer, S.J. and Nicolson, G.L. - Science, 175, 720, (1972)

(08) Lesslauer, W., Cain, J.E. and Blasie, J.K.-Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1499, (1972)

(09) Podo, F. Cain, J.E. and Blasie, J.K. Biochimica et Biophysica Acta, 419, 19, (1976)

(10) McInstosh, T.J., Waldbillig, R.C. and Robertson, J.D. - - Biochimica et Biophysica Acta, 448, 15, (1976)

(11) Blaurock, A.E. - Biophysical Journal, 13, 290, (1973)

(12) Herbette, L. Marguardt, J., Scarpa, A. and Blasie, J.K., - Biophysical Journal, 20, 245, (1977)

(13) Lesslauer, W,, Cain, J. and Blasie, J.K. - Biochimica et Biophysica Acta, 241, 547, (1971)

(14) Papahadjopoulos, D. and Miller, N. - Biochimica et Biophysica Acta, 135, 624, (1977)

(15) Gulik-Krzywricki, T., Schechter, E. and Luzzati, V., - Nature , 223, 1116, (1969)

(16) Shipley, G.G., Leslie, R.B. and Chapman, D., Nature, 222 561, (1969)

(17) Levine, Y.K. and Wilkins, M.H.F. - Nature, 230, 69, (1971)

(18) Brown, L.R. and Wüthrich, K., - Biochimica et Biophysica Acta, 468, 389, (1977)

(19) Berden, J.A., Barker, R.W. and Radda, G.K. - Biochimica et Biophysica Acta, 375, 186, (1975)

(20) Kleemann, W. and McConnell, H.M. - Biochimica et Biophysica Acta, 419, 206, (1976)

(21) Zaccai, G., Blasie, J.K. and Schoenborn, B.P. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 376, (1975)

(22) Lehninger, A.L. - Biochimistry, Worth Publisher, INC (1970)

(23) Lehninger, A.L. - Bioenergetics, W.A. Benjamin, INC, (1971)

(24) Chance, B., Lee, C.P., Mela, L. and De Vault, D. Structure and Function of Cytochrames, University of Tokyo Press and University of Park Press (1968)

(25) Vanderkooi, J., Erecińska, M. and Chance, B. Biochemistry and Biophysics, 157 , 531, (1973)

(26) Dickerson, R.E., Takano, T., Eisenberg, D. Kallai, O., Samson, L., Cooper, A. and Margoliash, E. - - J. Biol. Chem., 246, 1511, (1971)

(27) Wold, F. - Macromolecules: Structure and Function, Prentice-Hall, Inc, (1971)

(28) Kimelberg, H.K. and Papahadjopoulos - The Journal of Biol. Chem., 246, 1142, (1971)

(29) Brumberger, H. - Small Angle x-Ray Scattering (Proceedings of the conference held at Syracuse University, June 1965), Gordon and Breach, Science Publishers, (1967).

(30) Sayre, D. - Acta Cryst, 5, 843, (1952)

(31) Papoulis, A. - The Fourier Integral and Its Applications, McGraw-Hill Book Company, (1962)

(32) Guinier, A. - x-Ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals, and Amorphous Bodies, W. H. Freeman and Company (1963).