
Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica



**“Técnicas de RMN Recentes Aplicadas às interações
proteína-ligante e a metabonômica”**

Tese apresentada à Universidade
Estadual de Campinas, como
parte das exigências do curso de
pós-graduação do Instituto de
Química, para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Tese de Doutorado

Isis Martins Figueiredo

Orientadora: Profa. Dra. Anita J. Marsaioli

05 de outubro de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Figueiredo, Isis Martins.

F469t Técnicas de RMN recentes aplicadas as interações proteína-ligante e a metabonômica / Isis Martins Figueiredo. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

***1. RMN. 2. Interação proteína-ligante. 3. Metabonômica.
I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.***

Título em inglês: Recent NMR techniques applied to protein-ligand interactions and to metabonomics

Palavras-chaves em inglês: NMR (Nuclear Magnetic Resonance), Protein-ligand interactions, Metabonomics

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Anita Jocelyne Marsaioli (orientadora), Fred Yukio Fujiwara, Ljubica Tasic, Fabio Ceneviva Lacerda Almeida, Antônio Gilberto Ferreira

Data de defesa: 05/10/2006

Dedico este trabalho à minha família,
principalmente, aos meus pais e avós,
pelo amor, incentivo e apoio,
enfim, pelo que sou.

Onde você vê um obstáculo,
alguém vê o término da viagem
e o outro vê uma chance de crescer.

Onde você vê um motivo pra se irritar,
Alguém vê a tragédia total
E o outro vê uma prova para sua paciência.

Onde você vê a morte,
Alguém vê o fim
E o outro vê o começo de uma nova etapa...

Onde você vê a fortuna,
Alguém vê a riqueza material
E o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.

Onde você vê a teimosia,
Alguém vê a ignorância,
Um outro compreende as limitações do companheiro,
percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.

E que é inútil querer apressar o passo do outro,
a não ser que ele deseje isso.
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.

"Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura."

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Anita J. Marsaioli (“*minha Anita*”), pelo privilégio de trabalhar sob sua coordenação, oportunidade em que se revelou muito mais do que uma orientadora mas, uma amiga, mãe, conselheira, sempre disposta a me auxiliar em todas interrogações deste trabalho e da minha vida... Resumindo “*Há os que lutam toda vida e estes são os imprescindíveis*”.

Ao Prof. Dr. Fred Y. Fujiwara, pelas discussões, pelo aprendizado relacionado à utilização do espectrômetro de RMN, paciência, disponibilidade e amizade.

A Profa. Dra. Ljubica Tasic (*Buba*), pelas discussões, pela colaboração relacionada às interações proteína-ligante e pela amizade.

A Profa. Dra. Márcia Ferreira, pela análise estatística dos dados, paciência, disponibilidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Miquel Pons (Universidade de Barcelona) pela acolhida em seu laboratório, discussões e treinamento nas técnicas de STD e WaterLOGSY.

Ao Instituto de Química da UNICAMP pela infra-estrutura para realização deste trabalho.

Aos meus familiares “*roommates*”, Cabeça, Stella, Gabriela e Fabiano, que sem dúvida vivenciaram comigo os bons e maus momentos, pelo apoio moral, amizade e pelo sentimento de conviver em um verdadeiro lar.

A minha *família Campineira*, Mary Ann (*Mariana*), Marcelo e Cacá, pela acolhida, apoio e amor de todos estes anos vividos juntos... bem juntos!

As minhas ex-orientadoras, grandes amigas e mães, Florângela & Maria Helena, pelo incentivo, pelas imensas discussões sobre a vida, sempre regadas à cerveja, e pela inestimável amizade.

Às minhas amigas da Sala de RMN, Sônia, Soninha e Paula, pela paciência com que sempre me auxiliaram junto aos equipamentos, pelo apoio e pela amizade.

À Dona Maria, uma pessoa muito especial, pelo amor e prontidão com que sempre nos tratou.

Aos amigos do grupo de pesquisa: Suzan (Xuja, minha irmã), Diego (Filhote), Letícia (Filhota), Lucimar (Lucimala), Lu Chen (Lu Shi Quenga), Luciana (Lucianta), Simone, Adriana Pianaro, Georgiana, Adriana Flach, Eduardo (Mattosão), Carliquica, Luiz Antônio, Marcela, Marizinha, Julia, Milena, Armando e Célio pela amizade, companheirismo e por tornarem meus dias muito mais felizes.

Aos meus amigos ressonantes, Serginho (*companheiro de copo*) e Fernando Macedo, pelo “*treinamento*” nos equipamentos de RMN, pelas discussões, incentivo e amizade.

Aos professores Aderbal, Eva, Paulo Imamura e Sebastião, pela amizade e agradável convivência durante estes anos.

Aos funcionários da CPG (Bel e Rodrigo) pela presteza e carinho e a todos os funcionários do IQ e da UNICAMP que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais professores do IQ-UNICAMP, pelo aprendizado e colaboração.

Aos meus amigos “*maringaenses*” Pricila (Prisca), Fernanda (Fefê), Mari & Mary, Willian, Cleuzinha, Turca, Lili, Conceição (Manu & Carla), Tereza Cristina, Creusa, Anderson, Stelinha & Matheus, as minhas madrinhas pelas imensas discussões sobre assuntos aleatórios, amizade, amor e carinho.

À FAPESP pela bolsa, reserva técnica, compra do espectrômetro de RMN Inova 500 e por verbas para manutenção do mesmo.

CURRICULUM VITAE

INFORMAÇÕES PESSOAIS

- Nacionalidade: Brasileira
- Data de Nascimento: 21-03-1978
- Naturalidade: Maringá-PR
- e-mail: figueiredo.isis@gmail.com

Formação

MESTRADO

2001-2003 UEM-Maringá, PR

- “Síntese e atividade antiproliferativa de tiouréias e guanidinas monoterpênicas”

Orientadora: Dra. Maria Helena Sarragiotto

GRADUAÇÃO

1997-2000 UEM-Maringá, PR

- Curso: Bacharelado em Química

PUBLICAÇÕES

1. FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI, A. J.; et al. ^1H NMR, a Rapid Alternative to Monitor Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Spreng) Processing, *J. Agric. Food Chem.* 54(12), 2006, 4102-4106.
2. FIGUEIREDO, I. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; et al. Antiproliferative Activity of New Limonene Derivatives with a Substituted Thiourea Moiety, *J. Braz. Chem. Soc.* 17(5), 2006, 954-960.
3. FIGUEIREDO, I. M. e MARSAIOLI, A. J. *Técnicas de RMN usadas na triagem e identificação de interações intermoleculares*, Aceito para publicação na Revista Química Nova em out/2006.

TRABALHOS EM CONGRESSOS

30 trabalhos apresentados de **1998-2006** dos quais os principais são:

1. FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI, A. J.; TASIC, L.; et al. “*A RMN como ferramenta primordial nas interações supramoleculares de Chaperones*” IX JORNADA BRASILEIRA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA 2006, Recife-PE; (trabalho selecionado para apresentação oral).
2. FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI, A. J. “*RMN aplicada à triagem e identificação de interações proteína-ligante*” 29^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, Águas de Lindóia-SP; (trabalho selecionado para apresentação oral).
3. FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI, A. J. “*Can Slow Exchange Regimes affect mapping results ligand-receptor interactions by DOSY-NOESY?*” 10^o BRAZILIAN NMR USERS MEETING/3^o.PORTUGUESE-BRAZILIAN NMR MEETING/1 IBEROAMERICAN NMR MEETING, 2005, Angra dos Reis-RJ.
4. FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI, A. J.; CENDES, F.; REIS, F. “*Implantação de técnicas de RMN para análise de fluidos Biológicos (plasma e liquido cerebrospinal)*” VIII JORNADA BRASILEIRA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA, 2004, Rio de Janeiro-RJ.
5. FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI, A. J.; TASIC, L.; RAMOS, C. H. I.; BOTTCHER, A. “*Human Chaperone (Hsp70) as Receptor in Ligand-Receptor Interactions Studies by DOSY-NOESY*”. Magnetic Resonance for the future, EUROMAR, EENC, 2005. Veldhoven-ND. v. 1, p. 292.
6. FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI, A. J.; MARSAIOLI JR, A.; MACEDO JR, F. C.EFRAIM, P.; PEREIRA, N. R.; FERNANDES, S. A.; GARCIA, N. H. P. “*¹H NMR an Alternative Tool to Monitor Cacao and Cupuassu Fermentation and Roasting Processes*”. II ENCONTRO LUSO BRASILEIRO DE RMN, 2003, Sintra-Pt.

Resumo

Técnicas de RMN Recentes aplicadas às interações proteína-ligantes e metabonômica

Durante as últimas décadas, muitos métodos de RMN de ^1H foram desenvolvidos e aplicados para triagem e caracterização de interações intermoleculares e para a metabonômica. Estes são temas recentes da RMN e ambos serão abordados em dois capítulos distintos neste trabalho. No **Capítulo 1** foi realizada a implantação e otimização de técnicas de RMN como (STD, WaterLOGSY, NOE pumping e DOSY-NOESY). Para tanto, utilizou-se um sistema composto por albumina de soro bovino BSA e uma mistura de cinco compostos (ác. salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e *D*-glucose) dentre os quais, apenas o ácido salicílico e a cafeína interagiram com a BSA. Além disso, uma análise comparativa entre as técnicas permitiu afirmar que os experimentos de STD e WaterLOGSY são os mais sensíveis e rápidos fornecendo complementarmente o domínio hidrofóbico e hidrofílico de ligação com o ligante. Com intuito de confirmar nossa habilidade na aplicação destas técnicas, as mesmas foram aplicadas a um sistema composto por uma Chaperone Hsp70, substratos (ATP e ADP) e um polipeptídeo **Angiotensina 2** (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe). A análise desse sistema por WaterLOGSY e a comparação com os resultados obtidos por STD permitiu a obtenção do epítipo 1 o qual é formado pela porção adenosina do ATP ou ADP quando estes estão complexados a Hsp70 e do epítipo 2 formado pela porção hidrofóbica da **Angiotensina 2** (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) que interage com a Hsp70. Já no Capítulo 2, a RMN de ^1H foi aplicada na investigação da metabonômica do líquido cerebrospinal de pacientes com Esclerose Múltipla (EM). A análise dos dados de RMN através de métodos quimiométricos (HCA, PCA e PLS-DA) revelou alguns metabólitos importantes, dentre os quais o β -hidroxibutirato (1,17 ppm) e um sinal de proteína (0,065 ppm) foram detectados apenas em amostras EM podendo ser considerados marcadores de reações bioquímicas de degradação de mielina. Portanto, este estudo alcançou com êxito os objetivos traçados de implementar novas técnicas de RMN aplicadas a sistemas biológicos além de trazer novas informações sobre a Hsp70 e EM.

Abstract

Recent NMR techniques applied to protein-ligand interactions and to metabonomics

Over the past years ^1H NMR methods have been developed and applied to the screening and characterization of protein epitopes in ligand receptor complexes and metabonomics. These are recent NMR methods issues of the present PhD thesis. To investigate protein-ligand complexes we first optimized techniques that were unavailable at IQ/UNICAMP such as STD, WaterLOGSY, NOE pumping and DOSY-NOESY which were specially designed for epitope mapping. In order to optimized these techniques we employed a mixture of five compounds (salicylic ac., caffeine, citric ac., adipic ac. and D-glucose) and bovine serum albumine (BSA). Among the studied ligands salicylic acid and caffeine were the best. From these experiments we additionally concluded that STD and WaterLOGSY were most sensitive and appropriate for epitope mapping. A second system was investigated consisting of Chaperone Hsp70, cofactor (ATP and ADP) and polypeptide Angiotensine 2 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe). Epitope 1 was characterized as containing a lipophylic domain in which the adenosine portion of ATP or ADP was bound to Hsp70. Epitope 2 was the polypeptide-binding site in which the apolar portion of Angiotensine 2 (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) was tightly bound to Hsp70. In chapter 2, ^1H NMR was the major tool employed to investigate the metabonomics of CSF of Multiple Sclerosis patients. Analyses of the ^1H NMR data applying quimiometric methods (HCA, PCA and PLS-DA) revealed that some metabolites, from which β -hydroxybutirate (1,17 ppm) and a protein signal (0,065 ppm) were detected in EM patients only. These signals were never described as EM biomarkers before. To match these observations a full set of lipolytic and proteolytic biochemical reactions were proposed which are responsible for myelin degradation. Therefore, in this study we describe the successful implementation of these new NMR techniques that were applied to biological systems revealing new aspects of the Hsp70 and MS.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E NOTAS

STD.....	“Saturation Transfer Difference”
WaterLOGSY.....	“Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy”
e-PHOGSY.....	“enhanced Protein Hydration Observed Through Gradient Spectroscopy”
DOSY.....	“Diffusion Ordered Spectroscopy”
DBPPSTE.....	“Bipolar Pulse Pairs Stimulated Echo”
DOSY-NOESY.....	“Diffusion-Ordered NOESY”
<i>tr</i> NOE.....	transferência de NOE
NOE.....	Efeito Overhauser Nuclear
BSA.....	Albumina de Soro Bovino
K_d	constante de dissociação
k_{on}	velocidade de associação
k_{off}	velocidade de dissociação
k_{ex}	velocidade de troca
ω_0	freqüência de Larmor
τ_c	tempo de correlação para reorientação molecular
$\Delta\nu$	largura de varredura (espectral)
T.....	tesla
T_1	Tempo de Relaxação Longitudinal
T_2	Tempo de Relaxação Transversal
$T_{1\rho}$	Tempo de Relaxação nas coordenadas girantes
T_{sat}	Tempo de Saturação
R_1	velocidade de relaxação longitudinal
τ	Tempo entre pulsos de radiofreqüência
τ_m	Tempo de mistura

at.....	Tempo de aquisição
δ	Deslocamento Químico
B_0	Campo Magnético Estático de um espectrômetro de RMN
d_1	Tempo de espera para reciclagem
Hz.....	hertz
lb.....	“line broadening” - apodização aplicada para diminuição da razão sinal/ruído
TF.....	transformada de Fourier
EM.....	Esclerose Múltipla
CSF.....	Cerebrospinal Fluid (fluido cerebrospinal)
HCA.....	Análise hierárquica de agrupamentos
PCA.....	Análise de Componentes Principais
PLS-DA.....	Regressão por quadrados mínimos parciais
CG-MS.....	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
LC-MS.....	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
FTIR.....	Infravermelho com transformada de Fourier
DIMS.....	Espectrometria de massas de injeção direta

INDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1. Concentrações dos compostos utilizados como ligantes nas misturas 1, 2 e 3.</i>	36
<i>Tabela 2. Comparação dos valores de difusão dos compostos da mistura 1 na ausência e na presença de 90 μM de BSA e valores de K_d para os ligantes (1) e (2) nas misturas 1 e 2.....</i>	40
<i>Tabela 3. Sumário das principais classes de chaperones descritas, suas co-chaperones, suas principais características, massa molecular aproximada (kDa) e organismos nos quais estão presentes</i>	56
<i>Tabela 4. Fator STD amplificado para os hidrogênios H-2 e H-1' para as misturas de Hsp70 (ADP/ATP) sem tampão</i>	64
<i>Tabela 5. Comparação do Fator STD para os hidrogênios H-2 e H-1'' para as misturas de Hsp70 (ADP/ATP) na presença e na ausência de P_i.....</i>	64
<i>Tabela 6. Fator STD para os hidrogênios H-2 e H-1' para a mistura de ADP e Hsp70 (tampão tris-HCl, pH=8,0) variando a posição de irradiação e o número de ciclos.....</i>	65
<i>Tabela 7. Fator STD para os hidrogênios H-2 e H-1' para a mistura de ATP e Hsp70 (tampão tris-HCl, pH=8,0) irradiando em 0,59 ppm e variando o número de ciclos</i>	66
<i>Tabela 8. Fator STD para os hidrogênios H-2 e H-1' para a mistura ATP e Hsp70 (tampão tris-HCl, pH=8,0) na presença de MgCl_2 irradiando em 0,59 ppm e variando o número de ciclos</i>	67
<i>Tabela 9. Descrição demográfica dos pacientes usados neste estudo</i>	107
<i>Tabela 10. Descrição demográfica dos controles usados neste estudo</i>	108
<i>Tabela 11. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de NOE pumping das amostras BSA/ligantes (mistura 1).....</i>	129
<i>Tabela 12. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de NOE pumping das amostras Hsp70/ATP e Hsp70/ADP</i>	130
<i>Tabela 13. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de STD das amostras BSA/ligantes (mistura 1, 2 e 3)</i>	133

<i>Tabela 14. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de STD das amostras Hsp70/ATP e Hsp70/ADP</i>	<i>134</i>
<i>Tabela 15. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de WaterLOGSY da amostra BSA/ligantes (mistura 1).....</i>	<i>137</i>
<i>Tabela 16. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de WaterLOGSY das amostras Hsp70/ATP e Hsp70/ADP</i>	<i>138</i>
<i>Tabela 17. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de NOESY da amostra BSA/ligantes (mistura 1).....</i>	<i>140</i>
<i>Tabela 18. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de difusão (DBPPSTE) da amostra BSA/ligantes (mistura 1)</i>	<i>141</i>
<i>Tabela 19. Valores de g^2 e $\ln(I)$ para o ácido salicílico (1)</i>	<i>142</i>
<i>Tabela 20. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de DOSY-NOESY da amostra BSA/ligantes (mistura 1).....</i>	<i>143</i>
<i>Tabela 21. Condições experimentais utilizadas para realizar os espectros de RMN de 1H das amostras de CSF</i>	<i>146</i>

INDICE DE ESQUEMAS

<i>Esquema 1. Representação esquemática mostrando a ligação reversível do ligante L ao receptor R para formar o complexo LR. A conformação do ligante pode mudar depois da ligação.....</i>	<i>12</i>
<i>Esquema 2. Representação esquemática mostrando a ligação reversível do ligante (L) ao receptor (R) para formar o complexo RL. Os ligantes livres em solução têm seus sinais eliminados pelo filtro de difusão (D). Os caminhos de relaxação (σ_{ij}, σ_{ip}, σ_{jp}), a partir da proteína para o ligante, se tornam visíveis durante o τ_m.</i>	<i>18</i>
<i>Esquema 3. Representação esquemática do experimento de STD. Quando a proteína torna-se saturada, os ligantes que estão complexados a ela tornam-se saturados também. Este fenômeno, chamado de difusão de spin, está representado pelas setas vermelhas. Através da subtração deste espectro de um espectro sem a saturação da proteína fornece um espectro no qual apenas os sinais dos compostos complexados à macromolécula aparecem. Em geral, a saturação da proteína consiste de uma cascata de pulsos Gaussianos.....</i>	<i>20</i>
<i>Esquema 4. Mecanismos de transferência de magnetização fundamentais do WaterLOGSY. Transferência de magnetização a partir da água para os ligantes ocorre via hidrogênios lábeis do receptor dentro e fora do sítio ativo, bem como, a partir das moléculas de água com vida longa dentro do sítio de ligação. As bolinhas azuis indicam as moléculas de água invertidas. Somente os ligantes complexados experimentam ambos tipos de transferência de magnetização. O reservatório de ligantes livres vai trocando com a macromolécula e experimentando a transferência de magnetização.....</i>	<i>28</i>
<i>Esquema 5. Modelo de interação das chaperones Hsp70 com substratos³⁷: a) interação inicial do substrato com DnaK na conformação aberta o que determina a eficiência da interação do substrato e tão logo a velocidade do ciclo; b) estados ATP e ADP complexados somente diferenciam a frequência de transição entre uma conformação aberta e fechada.....</i>	<i>58</i>

Esquema 6. Interação hipotética da Hsp70 (em amarelo) com os ligantes ATP (6) e ADP (7) através da porção hidrofóbica obtida por STD (H-2 e H-1') e hidrofílica obtida por WaterLOGSY (H-8, H-2' e H-3'), em azul moléculas de águas..... 69

Esquema 7. a) Visão geral do catabolismo de aminoácidos. O grupo amino é removido e incorporado na uréia para eliminação. A cadeia carbônica remanescente (α -cetoácido) pode ser quebrada até CO_2 e H_2O ou convertida em glicose, em acetil-CoA ou em corpos cetônicos. b) Resumo do metabolismo dos lipídeos..... 115

Esquema 8. Conversão metabólica de Acetil-CoA em corpos cetônicos. O acetoacetato é formado a partir da acetil-CoA em 3 etapas. (1) Duas moléculas de Acetil-CoA condensam-se para formar o acetoacetil-CoA. (2) Uma condensação de Claisen entre a acetoacetil-CoA e uma terceira acetil-CoA forma o β -hidróxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). (3) A HMG-CoA é degradada a acetoacetato e a acetil-CoA em uma clivagem pela HMG-CoA-liase. (4) o acetoacetato é reduzido pela β -hidroxibutirato-desidrogenase formando o β -hidroxibutirato..... 116

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Dependência do NOE homonuclear entre hidrogênios em função do produto $\omega_0\tau_c$, devido ao efeito de relaxação longitudinal..... 11*
- Figura 2. Seqüência de pulsos do experimento de NOE pumping. As barras finas e grossas representam os pulsos de 90° e 180° , respectivamente. As fases são $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = 2x, 2y, 2(-x), 2(-y)$; $\phi_3 = 2x, 2y, 2(-x), 2(-y), 2(-x), 2(-y), 2x, 2y$; $\phi_4 = 16x, 16y, 16(-x), 16(-y)$; $\phi_r = 2(x, -x, -x, x), 2(-x, x, x, -x), 2(y, -y, -y, y), 2(-y, y, y, -y), 2(-x, x, x, -x), 2(x, -x, -x, x), 2(-y, y, y, -y), 2(y, -y, -y, y)$ 17*
- Figura 3. Seqüência de pulsos do experimento de STD com uma seqüência adicional WATERGATE para eliminar sinal residual da HDO (azul). A subtração de espectros é realizada depois de cada scan através de ciclagem de fase. A freqüência do pulso seletivo é colocada ora em $-0,4$ ppm (on resonance) e ora em 30 ppm (off resonance). As fases são $\phi_1 = (x, -x, -x, x), (y, -y, -y, y), (-x, x, x, -x), (-y, y, y, -y)$; $\phi_2 = 2(y, -y), 2(x, -x)$; e $\phi_r = 2(x), 2(-x), 2(y), 2(-y), 2(-x), 2(y), 2(-y), 2(-x), 2(x), 2(-y), 2(y)$. A duração do pulso seletivo é de 50 ms, a intensidade é cerca de $\gamma B_1 = 86$ Hz e o tempo entre os pulsos é de 1 ms. O filtro $T_{1\rho}$ elimina os sinais residuais da macromolécula..... 21*
- Figura 4. Seqüência de pulsos do experimento de WaterLOGSY. O sinal da água é seletivamente invertido em varreduras alternadas de pulsos de 90° e deslocamentos de fase dos pulsos seletivos de 180° . Transferência de magnetização da água invertida tanto para os ligantes livres como complexados ocorrem durante o T_{inv} de duração de 1 a 3 s. 30*
- Figura 5. Seqüência de pulsos do experimento de DOSY-NOESY. Este experimento é uma junção da seqüência STE com a seqüência de NOESY. Os tempos t_1 e τ_m são os tempos de evolução e de mistura, respectivamente. 32*

<i>Figura 6. Os números sobre as estruturas abaixo representam os δ_H dos respectivos sinais na presença de BSA e os números em vermelho representam as $\Delta\delta_H$ dos sinais na presença e na ausência de BSA.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 7. Série de 14 espectros de RMN de 1H (500 MHz), da mistura 1, obtidos variando a intensidade (g) dos gradientes de campo pulsados. A intensidade dos sinais decai exponencialmente em função da amplitude do gradiente.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 8. Espectro de DOSY (1H, 500 MHz, DBPPSTE, 25 °C) da mistura 1 em D_2O referência (difusão da água).....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 9. Série de 14 espectros de RMN de 1H (500 MHz), da mistura 1/BSA, obtidos variando a intensidade (g) dos gradientes de campo pulsados. A intensidade dos sinais decai exponencialmente em função da amplitude do gradiente.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 10. Espectro de DOSY (1H, 500 MHz, DBPPSTE, 25 °C) da mistura 1/BSA em D_2O referência (difusão da água).</i>	<i>39</i>
<i>Figura 11. Competição entre o substrato (ácido salicílico (1)) e o inibidor competitivo (cafeína (2)) pelo mesmo sítio ativo na proteína.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 12. Mudança de conformação da proteína devido à interação de um segundo ligante num sítio alostérico.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 13. Espectro de RMN de 1H (499,883 MHz, $D_2O/2,5 \text{ mmol L}^{-1}$; de d_4-TSPA) de NOE pumping, da mistura 1 (ácido salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e D-glucose) acrescida de 90 μM de BSA, $T = 150 \text{ ms}$, $\delta = 20 \text{ ms}$, variando o τ_m (0,05; 0,30; 0,60 e 0,90) s.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 14. Gráfico do fator STD (%) versus o tempo de saturação (s) para mistura 1 (ácido salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e d-glucose). A proteína foi irradiada com um trem de pulsos Gaussianos em -0,50 ppm para o espectro de STD e em 30 ppm para o espectro de STD-controle. Os espectros foram adquiridos com um $d_1 = 1 \text{ s}$ e o tempo de saturação foi ajustado pelo número de pulsos Gaussianos. O tempo de relaxação (T_1) para cada sinal na presença de BSA (● H-4, ▲ H-3,5 e ■ H-6 de (1); ▼ H-8, ► CH₃-1, ◀ CH₃-3, ◆ CH₃-9 de (2) e ● TSPA) está apresentado no gráfico.</i>	<i>44</i>

-
- Figura 15. Gráfico do fator STD (%) versus o tempo de saturação (s) para a) mistura 2 (ácido salicílico (1) e BSA)(▲ H-3,5, ●H-4, e ■ H-6) e b) mistura 3 (cafeína (2) e BSA) (■ H-8, ▲ CH₃-3, ▼ CH₃-1 e ●CH₃-9 de (2)). O tempo de relaxação longitudinal (T₁) para cada sinal na presença de BSA está apresentado no gráfico. 46
- Figura 16. a) Espectro de STD e b) espectro de STD controle da mistura 1 (ácido salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e D-glucose) na presença de 90 μM de BSA a 25 °C. As intensidades relativas obtidas através do experimento de STD estão apresentadas em **negrito** sobre o espectro de STD e a atribuição de cada sinal está indicada em *itálico* sobre cada sinal no espectro de STD controle. Os números em **negrito** sobre as estruturas representam o mapa de epitopo. 47
- Figura 17. a) Gráfico mostrando a fração da intensidade do sinal do H-4 de (1) versus o excesso de ligante. A concentração de BSA utilizada foi de 90 μM e o tempo de saturação 2,5 s. b) Gráfico dos mesmos dados em termos do fator STD amplificado. Este segundo gráfico mostra, da mesma forma, que a fração do ligante que é saturada diminui a altas concentrações de excesso de ligante. 48
- Figura 18. Espectro de RMN de ¹H (499,883 MHz, D₂O:H₂O (9:1) 2,5 mmol L⁻¹; de d₄-TSPA) WaterLOGSY, da mistura 1 (ácido salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e D-glucose) acrescida de 90 μM de BSA variando o τ_m (0,1 a 1,0) s; a) região de 6,0 a 8,5 ppm e b) região de 0 a 4,0 ppm e c) espectro total obtido com τ_m = 0,5 s..... 50
- Figura 19. a) Mapa de contorno de DOSY-NOESY da mistura 1 (ácido salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e D-glucose) acrescida de 90 μM de BSA a 25°C, o plano de NOESY foi obtido com valor da força de gradiente de 5,15 G.cm⁻²(0,00515 T.m⁻²) (gzlvl=1350). A expansão do espectro mostra a interação do ácido salicílico com a BSA com atribuição dos hidrogênios. Os sinais da proteína encontram-se na primeira dimensão (F1) e os sinais dos ligantes na segunda dimensão (F2). b) Gráfico da força do gradiente ao quadrado versus o logaritmo neperiano da intensidade dos sinais ●(CH₃-9) de (2), ▼ (CH₂-2,5) de (4), ▲ (CH₂-b,c) de (3) e ■ (H-4) de (1). 53

<i>Figura 20. Os números sobre as estruturas abaixo representam os δ_H dos respectivos sinais do ATP (6) e ADP (7).</i>	59
<i>Figura 21. a) Decaimento exponencial da intensidade dos espectros de ATP/ADP (2:1) com a variação das amplitudes dos gradientes de 3,81 a 38,1 G.cm⁻¹ (499,883 MHz, D₂O, 2,5 mmol L⁻¹ de d₄-TSPA) de baixo para cima e b) Espectro de DOSY dos sinais em 8,51 e 8,52 ppm (499,883 MHz, D₂O, 2,5 mmol L⁻¹; de d₄-TSPA).</i>	60
<i>Figura 22. Espectros de RMN de ¹H região 3,0 a 9,5 ppm (499,99 MHz, 99,9 % D₂O) da Hsp70/ADP (1:100), a) PRESAT com nt=16, b) STD-controle com nt=432 e c) STD com nt=864. Os números em negrito sobre as estruturas representam o mapa de epitopo.</i>	62
<i>Figura 23. Espectro de RMN de ¹H região 6,0 a 8,7 ppm (499,99 MHz, 99,9 % D₂O) da Hsp70/ATP (1:100), a) STD-controle com nt=432 e b) STD com nt=864. Os números em negrito sobre as estruturas representam o mapa de epitopo.</i>	63
<i>Figura 24. Espectro de RMN de ¹H WaterLOGSY (499,99 MHz, D₂O/H₂O (9:1)) da Hsp70 (10 μM) na presença de ADP (1,0 mM) com nt = 256.</i>	67
<i>Figura 25. Expansão da região de 3,0 a 9,0 ppm do espectro de NOE pumping (499,883 MHz, D₂O, 2,5 mmol L⁻¹; de d₄-TSPA a 25°C) da mistura Hsp70/ATP (1:100) com T =150 ms e variando tempo de mistura a) 400 ms e b) 600 ms.</i>	70
<i>Figura 26. Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CD₃OD, 25 °C) da Angiotensina 2. ...</i>	71
<i>Figura 27. Expansão (6,0 a 9,0 ppm) do Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CD₃OD, 25 °C) da Angiotensina 2.</i>	72
<i>Figura 28. Expansão (2,5 a 4,8 ppm) do Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CD₃OD, 25 °C) da Angiotensina 2.</i>	72
<i>Figura 29. Expansão (0,5 a 2,5 ppm) do Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CD₃OD, 25 °C) da Angiotensina 2.</i>	73
<i>Figura 30. Expansão do mapa de contornos de RMN em 2D (H,H COSY, 499,88 MHz, CD₃OD, 25 °C) da região dos hidrogênios aromáticos (6,50 a 8,90 ppm) da Angiotensina 2.</i>	74

Figura 31. Expansão do mapa de contornos de RMN em 2D (H,H COSY, 499,88 MHz, CD ₃ OD, 25 °C) da região dos hidrogênios alfa (3,50 a 5,00 ppm) da Angiotensina 2...	75
Figura 32. Expansão do mapa de contornos de RMN em 2D (H,H COSY, 499,88 MHz, CD ₃ OD, 25 °C) da região dos hidrogênios alfa (3,50 a 5,00 ppm) da Angiotensina 2...	76
Figura 33. Expansão do mapa de contornos de RMN em 2D (H,H COSY, 499,88 MHz, CD ₃ OD, 25 °C) da região dos hidrogênios alfa (1,00 a 5,00 ppm) da Angiotensina 2...	77
Figura 34. Expansão do mapa de contornos de RMN em 2D (H,H COSY, 499,88 MHz, CD ₃ OD, 25 °C) da região dos hidrogênios alfa (1,00 a 5,00 ppm) da Angiotensina 2...	78
Figura 35. Deslocamentos químicos de ¹ H dos aminoácidos livres obtidos da literatura.	79
Figura 36. Atribuição dos deslocamentos químicos de ¹ H (em ppm) do polipeptídeo (Angiotensina 2) com base nos experimentos de RMN de ¹ H e COSY.....	80
Figura 37. Espectro de RMN de ¹ H região 0,0 a 9,0 ppm (499,99 MHz, 99,9 % D ₂ O) a) STD-controle, b) STD da mistura Hsp70/ATP e c) STD da Hsp70/ATP/Angiotensina 2. Os números em negrito sobre as estruturas representam o mapa de epitopo.	81
Figura 38. a) Lesões segmentadas, assinaladas em vermelho, em paciente com EM duplo “spin eco” (T ₂ ponderada, espessura 6mm, ângulo de excitação de 180°, TR=1800, TE=90, matriz=165x256, FOV=20x24cm). Imagens obtidas utilizando-se um aparelho de 2 Teslas, com aquisição em plano axial. b) Espectro de RM de ¹ H, NAA em 2,00 ppm, colina em 3,20 ppm e creatina em 3,00 e 3,90 ppm.	97
Figura 39. Expansão (0,5 a 4,3 ppm) do espectro de RMN ¹ H (499,886 MHz, D ₂ O, 25 °C) a) amostra de CSF de um paciente de EM com captação e b) amostra controle. 1. leucina, isoleucina e valina; 2. β -3-Hidroxibutirato; 3. lactato; 4. alanina; 5. acetato; 6. glutamina; 8. citrato; 9. creatina; 10. creatinina; 11. glucose e 12. mio-inositol.....	105
Figura 40. Expansão (0,5 a 4,3 ppm) do espectro de RMN ¹ H (499,886 MHz, D ₂ O, 25 °C) a) amostra de CSF de um paciente de EM sem captação e b) amostra controle. 1. leucina, isoleucina e valina; 2. β -3-Hidroxibutirato; 3. lactato; 4. alanina; 5. acetato; 6. glutamina; 8. citrato; 9. creatina; 10. creatinina; 11. glucose e 12. mio-inositol.....	106

<i>Figura 41. a) Sobreposição dos espectros de pacientes EM (vermelho) e controle (verde) assinalando em marrom as regiões responsáveis pela separação em dois grupos por PLS, b) Análise por PLS dos dados, assinalados em azul as amostras presentes na interface entre os grupos (discrepantes no HCA).....</i>	<i>110</i>
<i>Figura 42. Dendograma dos scores autoescalados.</i>	<i>112</i>
<i>Figura 43. Sobreposição dos 33 espectros selecionados para análise; a) Ampliação da região do espectro de RMN de ¹H de (0,058 a 0,110 ppm) mostrando um sinal alargado referente à presença de proteína, b) Ampliação da região de (0,15 a 1,25 ppm) mostrando em 1,17 ppm o duplete referente ao grupo γ-CH₃ do BHB c) Ampliação da região de (2,04 a 2,50 ppm) mostrando em 2,23 ppm o singlete referente ao grupo CH₃ do acetoacetato. Nesta região também aparecem multipletos em 2,08 e 2,09 (β-CH₂) e 2,41 ppm (γ-CH₂) da glutamina e 2,14 ppm (CH₃) e 2,36 ppm (γ-CH₂) do glutamato e um singlete em 2,36 ppm referente ao CH₂ do piruvato, estes compostos aparecem predominantemente nos pacientes EM (vermelho).....</i>	<i>113</i>
<i>Figura 44. Sobreposição dos 33 espectros selecionados para análise; a) ampliação da região do espectro de RMN de ¹H de (3,65 a 3,90 ppm) mostrando em 3,70 ppm o triplete referente ao grupo α-CH₂ da glutamina que só aparece em maior concentração nas amostras dos pacientes EM (vermelho) e b) ampliação da região do duplete em 1,47 ppm referente ao grupo β-CH₃ da alanina.</i>	<i>114</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1	INTRODUÇÃO	9
1.1.1	<i>Uso do efeito trNOE para detectar e caracterizar o ligante.....</i>	<i>10</i>
1.1.2	<i>Transferência de NOE intermolecular - NOE pumping.....</i>	<i>16</i>
1.1.3	<i>O experimento de STD.....</i>	<i>19</i>
1.1.4	<i>O experimento de WaterLOGSY.....</i>	<i>26</i>
1.1.5	<i>O experimento de DOSY-NOESY.....</i>	<i>31</i>
2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
2.1	OTIMIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE PULSOS STD, WATERLOGSY, NOE PUMPING E DOSY-NOESY	35
2.2	APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE trNOE AO SISTEMA HSP70/LIGANTES	55
2.2.1	<i>Resultados da Interação da Hsp70 e substratos por RMN</i>	<i>59</i>
3	CONCLUSÃO DO CAPÍTULO I.....	85
4	INTRODUÇÃO	91
4.1	MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	98
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
5.1	ANÁLISE DE RMN DE ¹ H DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEREBROESPINAL	103
6	CONCLUSÃO DO CAPÍTULO II.....	121
7	PARTE EXPERIMENTAL	125
7.1	INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES.....	125
7.1.1	<i>Preparação das amostras</i>	<i>125</i>
7.1.2	<i>Espectroscopia de dicroísmo circular</i>	<i>126</i>
7.1.3	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	<i>126</i>
7.1.4	<i>Técnicas Unidimensionais e trNOE.....</i>	<i>127</i>
7.1.5	<i>Técnica Bidimensional.....</i>	<i>139</i>

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é sem dúvida uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas aplicada ao estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução. Esta constatação está diretamente relacionada com o avanço tecnológico dos equipamentos de RMN durante estas seis últimas décadas.

A espectroscopia RMN de ^1H surgiu, após a II Guerra Mundial (1945-6), quando Felix Bloch¹ e Edward Purcell² observaram como a água e a parafina absorviam radiofrequência. De forma independente eles propuseram dois métodos de RMN: um baseado na radiofrequência contínua e outro na radiofrequência pulsada, pelos quais receberam o prêmio Nobel de física em 1952. Desde então, o núcleo de ^1H vem sendo o mais aplicado não só na Química e na Física, mas também na Medicina, Biologia e Agricultura.

Novos conceitos em RMN foram continuamente descobertos e acompanhados pelo avanço tecnológico dos espectrômetros propiciando a partir dos anos 60 os estudos de RMN multinuclear com particular ênfase na RMN de ^{13}C ³. Nos anos 70 e 80 as técnicas bidimensionais, inicialmente, propostas por Jean Jeener, possibilitaram análises estruturais apuradas e o estudo detalhado da dinâmica molecular⁴.

¹ Bloch, F.; *Phys. Rev.* **1946**, *70*, 460-474.

² Purcell, E. M.; Torrey, E. C.; Pound, R. V.; *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37-38.

³ a. Lauterbur, P. C. *J. Chem. Phys.*, **1957**, *26*, 217-218; b. Holm, C. H. *J. Chem. Phys.*, **1957**, *26*, 707-709.

⁴ Grant, D. M.; Harris, R. K. "Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance" **Vol. 1**, *Historical Perspectives*, John Wiley & Sons, New York, **1996**.

Hoje, no despertar de um novo milênio, a RMN continua sendo uma técnica atual e o núcleo de hidrogênio é ainda muito especial por sua alta sensibilidade e pelo volume de informações extraídas de seus espectros. Com isso, muitos métodos de RMN de ^1H vem sendo desenvolvidos e aplicados para triagem e caracterização de processos de ligação no nível molecular (química supramolecular) e para o estudo da metabonômica de plantas, animais e insetos. Estes são temas recentes da RMN e ambos serão abordados em dois capítulos distintos neste trabalho.

A primeira parte do **Capítulo 1** tratará da implementação e otimização de técnicas modernas de RMN no IQ-UNICAMP, tais como: NOE pumping^{5,6}, STD^{7,8}, WaterLOGSY⁹ e DOSY-NOESY¹⁰ determinando os parâmetros adequados para estas seqüências de pulsos e utilizando uma solução de albumina de soro bovino (BSA) e uma mistura de cinco compostos (ác. salicílico, cafeína, ác. cítrico, ác. adipico e D-glucose).

Na segunda parte será apresentada a aplicação das técnicas de triagem por RMN às interações moleculares entre uma chaperone de 70 kDa chamada *heat shock protein* (Hsp70) e ligantes como adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e um polipeptídeo (Angiotensina 2: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe);

O **Capítulo 2** tratará da implementação e otimização de técnicas de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, acopladas a métodos estatísticos multivariados como: HCA, PCA e PLS-DA, aplicados na avaliação de amostras de líquido cerebrospinal de pacientes com Esclerose Múltipla.

⁵ Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10258-10259.

⁶ Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 414-415.

⁷ Mayer, M.; Meyer, B. *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **1999**, *38*, 1784-1788.

⁸ Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5336-5337.

⁹ Dalvit, C. *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 65-68.

¹⁰ Gozansky, E. K.; Gorenstein, D. G. *J. Mag. Reson. Series B*, **1996**, *111*, 94-96.

CAPÍTULO I

*“RMN de ^1H aplicada as Interações supramoleculares
entre proteínas e cofatores ou inibidores”*

Introdução

1.1 INTRODUÇÃO

Os processos biológicos podem ser inibidos ou promovidos pelas interações das biomoléculas (proteínas) com moléculas pequenas (cofatores ou inibidores). A formação desses complexos macromoleculares altera as energias conformacionais e as propriedades eletrostáticas das proteínas afetando o desempenho das mesmas. Do ponto de vista da RMN as proteínas formam um grande sistema de hidrogênios acoplados dipolarmente nos quais a velocidade de relaxação longitudinal (R_1) é dominada pela taxa da relaxação cruzada intramolecular (σ_{intra}). Portanto, a saturação seletiva de um sinal da proteína espalhar-se-á rapidamente para outros sinais com conseqüente alteração das amplitudes dos sinais da proteína (Efeito Overhauser Nuclear “NOE” em cascata) denominado de *difusão de spin*. Esse efeito pode ser transferido e observado no ligante que estiver próximo espacialmente da proteína, através da relaxação cruzada intermolecular (σ_{inter}). Este princípio é a base das pesquisas farmacêuticas, para avaliar associação de moléculas pequenas com proteínas que participam de processos celulares específicos¹¹.

Alinhada com essa tendência mundial a RMN têm desenvolvido metodologias com o propósito de observar as interações entre ligantes e receptores macromoleculares a partir de alterações nos deslocamentos químicos (δ), tempos de relaxação (T_1 , T_2), constantes de difusão (D) e NOEs ou transferência de saturação. Dessa forma, é possível detectar e quantificar as interações com alta sensibilidade sem o conhecimento prévio da função da macromolécula¹². Em geral, existem duas abordagens experimentais. A primeira monitora as mudanças dos deslocamentos químicos das macromoléculas, entretanto, é de difícil realização na ausência de

¹¹ Carlomagno, T.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 245-266.

¹² Hadjuk, P. J.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257-12261.

proteínas marcadas isotopicamente. Isso faz com que o estudo das propriedades dos ligantes seja mais apreciado. Essas metodologias, que serão discutidas a seguir, utilizam o efeito de transferência de NOE (*trNOE*) entre a proteína e o ligante fornecendo espectros de RMN mais simplificados e melhor resolvidos do que os espectros das macromoléculas.

1.1.1 *Uso do efeito trNOE para detectar e caracterizar o ligante*

Já está bem estabelecido que os efeitos NOEs são extremamente úteis na determinação das estruturas tridimensionais (3D) de moléculas em solução e de proteínas em particular^{13,14}. Quando uma molécula pequena se liga à proteína o seu NOE sofre alterações que levam a observar o *trNOE*. Essas mudanças são a base para o desenvolvimento de uma variedade de esquemas experimentais (seqüências de pulsos) que são designados para detectar e caracterizar a atividade de ligação.

Os princípios do *trNOE* foram observados há mais de trinta anos^{15,16}, e desde então, têm sido difundidos na determinação de estruturas 3D de ligantes que se ligam a receptores protéicos^{17,18}. A observação de *trNOE* repousa na transferência de polarização entre o receptor e o ligante e na dinâmica do equilíbrio. Moléculas pequenas ou médias ($MM < 1000-2000$) apresentam curtos τ_c , ($\omega_0 \tau_c < 1$) e exibem NOEs positivos que chegam a um máximo incremento de sinal de 50% depois de alguns segundos de excitação. Grandes moléculas apresentam longos τ_c , ($\omega_0 \tau_c > 1$)

¹³ Wultrich, K.; Wagner, G.; Richarz, R.; Perkins, S. J. *Biochemistry*, **1978**, *17*, 2253-2263.

¹⁴ Bax, A. *Annu. Rev. Biochem.*, **1989**, *58*, 223-256.

¹⁵ Balaram, P.; Bothner-By, A. A.; Breslow, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 4017-4018.

¹⁶ Clore, G. M.; Gronenborn, A. *J. Mag. Reson.*, **1983**, *53*, 423-442.

¹⁷ London, R. E. *J. Mag. Reson*, **1999**, *141*, 301-311.

¹⁸ Ni, F. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1994**, *26*, 517-606.

e exibem fortes NOEs negativos que chegam a um incremento máximo de sinal de -100% com menos de 200 ms, como mostrado na **Figura 1**.¹⁹

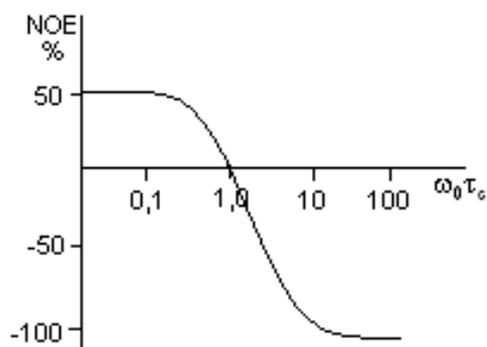
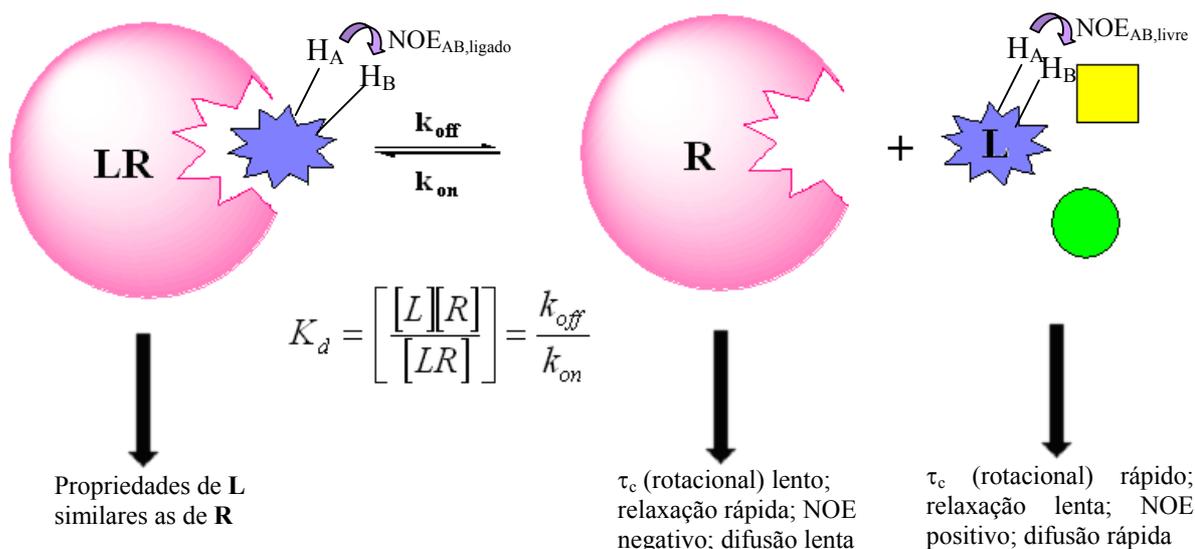


Figura 1. Dependência do NOE homonuclear entre hidrogênios em função do produto $\omega_0\tau_c$, devido ao efeito de relaxação longitudinal.

Quando uma molécula pequena (ligante) se liga a uma proteína (receptor macromolecular) esta se comporta como parte da macromolécula e adota o NOE correspondente, ou seja, passa a apresentar fortes NOEs negativos, chamados de *tr*NOE, que refletem a conformação do ligante no estado complexado (**Esquema 1**). Dessa forma, a ligação de um ligante a um receptor macromolecular pode facilmente ser diferenciado através da fase e da intensidade do NOE observado¹¹.

¹⁹ Wuthrich, K.; Pellecchia, M.; Sem, D. S. *Nature*, **2002**, *1*, 211-219.



Esquema 1. Representação esquemática mostrando a ligação reversível do ligante *L* ao receptor *R* para formar o complexo *LR*. A conformação do ligante pode mudar depois da ligação.

Além disso, para implementar e interpretar experimentos de triagem por RMN é necessário revisar alguns conceitos básicos sobre o equilíbrio de ligação de forma a permitir uma melhor distinção entre princípios biológicos e físico-químicos a partir de novos desenvolvimentos na área da RMN.

1.1.1.1 Fenômenos de troca

A natureza dinâmica dos processos de ligação entre ligante e receptor influencia os sinais nos espectros de RMN. Considerando o espectro de RMN do ligante na reação de equilíbrio mostrado no **Esquema 1**, se o processo de troca for lento comparado à diferença de deslocamento químico em Hz entre os estados de ligante livre e complexado $|\delta_{livre} - \delta_{complexado}|$ dois conjuntos distintos de sinais serão observados, um para o ligante livre e outro para o ligante complexado. Entretanto,

se o ligante se ligar ao receptor macromolecular com baixa afinidade, ou seja, no limite de troca rápida apenas um sinal \mathbf{A} , δ é igual à média ponderada das populações de $\delta\mathbf{A}_{\text{complexado}}$ e $\delta\mathbf{A}_{\text{livre}}$ ($\Delta\delta > k_{ex}$), será observado;

$$\delta\mathbf{A} = p_{\text{complexado}} \delta\mathbf{A}_{\text{complexado}} + p_{\text{livre}} \delta\mathbf{A}_{\text{livre}} \quad (1)$$

sendo, $p_{\text{complexado}}$ a razão populacional do ligante complexado à proteína e p_{livre} a razão populacional de ligantes livres¹¹.

A **equação 1** poderá ser aplicada somente se a troca química for rápida para escala de tempo da relaxação e do deslocamento químico do sistema, ou seja, se $k_{ex} = k_{off} + k_{on}$ for maior do que $|\delta_{\text{livre}} - \delta_{\text{complexado}}|$ e maior do que as constantes de relaxação (T_1^{-1} ou T_2^{-1}) do complexo. Sob essas condições, as alterações dos sinais de RMN de $\mathbf{A}_{\text{complexado}}$, geradas durante o estado de $\mathbf{L}_{\text{complexado}}$ serão transferidas para o estado de $\mathbf{L}_{\text{livre}}$ e vice-versa; esse processo de transferência será mediado pela rápida velocidade de troca $\mathbf{L}_{\text{complexado}}$ e $\mathbf{L}_{\text{livre}}$ durante o tempo t necessário para medir \mathbf{A} . Então, se k_{off} for maior do que a velocidade da relaxação transversal T_2^{-1} do complexo, a velocidade T_2^{-1} de um ligante \mathbf{L} numa mistura de ligante \mathbf{L} e receptor \mathbf{R} será dada por:

$$T_{2L}^{-1} = p_{L,\text{complexado}} T_{2L,\text{complexado}}^{-1} + p_{L,\text{livre}} T_{2L,\text{livre}}^{-1} \quad (2)$$

As populações individuais de $p_{L,\text{complexado}}$ e $p_{L,\text{livre}}$ dependem de K_d e das concentrações de \mathbf{L} e \mathbf{R} (**Esquema 1**). A partir da **equação 2** fica evidente que o sinal do ligante, numa mistura ligante-receptor em que T_2 do receptor é curto, será observado se $p_{L,\text{livre}} \gg p_{L,\text{complexado}}$, ou seja, se o ligante estiver em excesso em relação ao receptor ($[\mathbf{L}] \gg [\mathbf{R}]$). Nestas condições, se o sinal do complexo não for observado, os sinais do ligante livre fornecerão informações a respeito do epitopo do complexo¹¹.

Resumidamente, o efeito de transferência de NOE é melhor observado para sistemas com $K_d \approx 10^{-3}$ e 10^{-6} M (constantes de dissociação para complexos fracos), nas quais o k_{off} é maior do que T_1^{-1} do complexo, por exemplo para $T_1 \approx 10$ ms o $k_{off} > 100 \text{ s}^{-1}$. Para os sistemas em que a velocidade de dissociação é limitada pela difusão o k_{on} será aproximadamente $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e para um K_d entre 10^{-3} e 10^{-6} M o k_{off} será estimado entre 100 e 100000 s^{-1} .

Na investigação do equilíbrio químico entre mais de duas espécies por RMN é necessário entender as etapas do equilíbrio químico competitivo que acontece nessas situações²⁰.

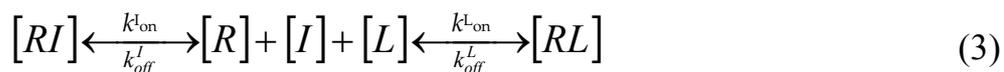
1.1.1.2 Equilíbrio químico entre mais de duas espécies

Os experimentos de ligação competitiva são métodos bem estabelecidos para determinação de afinidade e especificidade dos ligantes complexados à macromolécula. Recentemente, vários protocolos baseados na RMN empregando métodos competitivos têm sido propostos^{21,22}. Estas abordagens expandem a utilidade dos experimentos existentes para caracterizar compostos complexados de alta afinidade. O caso mais simples é com dois ligantes **L** e **I** que competem pelo mesmo sítio de ligação. Tomando **L** como o ligante previamente caracterizado e **I** como um novo ligante ou um “*inibidor*”, seus equilíbrios podem ser definidos usando $K_d = [\mathbf{R}][\mathbf{L}]/[\mathbf{RL}]$ e $K_i = [\mathbf{R}][\mathbf{I}]/[\mathbf{RI}]$. O equilíbrio apropriado para esse sistema pode ser escrito da seguinte forma:

²⁰ Peng, J. W.; Moore, J. M.; Lepre, C. A.; *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 3641-3675.

²¹ Siriwardena, A. H.; Tian, F.; Noble, S.; Prestegard, J. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3454-3457.

²² Jahnke, W.; Floerssheim, P.; Ostermeier, C.; Zhang, X.; Hemming, R.; Hurth, K.; Uzunov, D. P.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 3420-3423.



Neste caso, se a $[I]$ aumenta a $[RL]$ diminui, assim como a razão $[RL]_{+I}/[RL]_{-I}$. Para $K_I \ll K_d$ o inibidor I desloca L para $I_{Total} \ll L_{Total}$. Desta forma, um inibidor pode ser um reagente muito útil, se I for um ligante específico e L for um ligante teste, este efeito poderá ser usado para identificar a especificidade do ligante teste. Adicionalmente, se L for um ligante específico e I um ligante teste, este efeito poderá ser usado em experimentos de triagem por RMN para identificar previamente ligantes desconhecidos.

Um outro aspecto importante seria como a troca química, dirigida pelo equilíbrio químico, modula os parâmetros de RMN dos ligantes livres e complexados e do receptor. A observação desses parâmetros modulados forma a base de todos os experimentos de triagem por RMN.

As condições experimentais para triagem por RMN são, normalmente, bem estabelecidas para troca rápida, pois os experimentos são, geralmente, realizados com $L_{Total}/E_{Total} > 10$ e ligantes fracamente associados ao receptor.

Várias implementações experimentais foram exploradas durante as últimas duas décadas, variando desde de experimentos de NOE de 1D seletivos até experimentos de NOE de 1 e 2D transientes. Ambos esquemas experimentais são aplicáveis para observação de *tr*NOE. Nos experimentos de NOE transiente são utilizados pulsos de alta frequência para alterar o estado fundamental de equilíbrio que durante o tempo de mistura (τ_m) retorna ao equilíbrio através da relaxação T_1 . Os *tr*NOE intramoleculares são usualmente muito maiores do que os intermoleculares. Várias seqüências de pulsos foram desenvolvidas permitindo a interpretação quantitativa dos *tr*NOEs rendendo informações mais confiáveis com respeito a conformação dos ligantes complexados^{17,18}.

Os *tr*NOEs intramoleculares são a chave para definir as conformações do ligante complexado, enquanto que os *tr*NOEs intermoleculares ocorrem entre o ligante e o receptor macromolecular, e portanto, permitem a determinação da orientação do ligante complexado no sítio ativo da proteína²³.

A seguir, serão apresentadas seqüências de pulsos que repousam no fenômeno de *tr*NOE e que têm sido usadas para detectar e caracterizar atividade de ligação em misturas complexas de compostos. Métodos estes que fornecem o epitopo do ligante como: NOE pumping^{5,6}, STD^{7,8} (*Saturation Transfer Difference*) e WaterLOGSY⁹ (*Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy*) e o experimento DOSY-NOESY¹⁰ (*Diffusion-Ordered NOESY*) que fornece também o epitopo da proteína.

1.1.2 *Transferência de NOE intermolecular - NOE pumping*

A RMN de afinidade (*Affinity NMR*) mostra que as moléculas podem ser selecionadas no espectro a partir dos seus coeficientes de difusão relativos. Dessa forma, as moléculas de ligantes complexados podem ser “separadas espectroscopicamente” das moléculas não-complexadas²⁴. Entretanto, nota-se que a troca química tem um impacto importante na intensidade do sinal observado nos experimentos de difusão por RMN.

Com o intuito de desenvolver uma técnica para triagem rápida, um experimento chamado de NOE pumping (**Figura 2**) foi proposto por Chen e Shapiro⁵. Ao contrário do tradicional experimento de RMN de afinidade, que usa somente a

²³ Moseley, H. N.; Lee, W., Arrowsmith, C. H.; Krishna, N. R. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 5293-5299.

²⁴ Lin, M.; Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 8930-8931.

difusão para eliminar os sinais das moléculas não-complexadas, o método de NOE pumping repousa na transferência de NOE do receptor para o ligante.

A interação do ligante com a proteína altera o tempo de correlação (τ_c) e também a relaxação do ligante. Os hidrogênios localizados no sítio ativo da proteína contribuem para relaxação dos hidrogênios do ligante e vice-versa. No experimento de NOE pumping os sinais dos compostos não ligantes, que difundem rapidamente em solução, são eliminados por um filtro de difusão (**D**). Durante o tempo de mistura (τ_m), embutido na seqüência de pulsos análoga ao NOESY 1D (**N**), os efeitos da relaxação cruzada (σ_{ij} , σ_{ip} , σ_{jp}) dos núcleos da proteína com o ligante se tornam visíveis (**Esquema 2**).

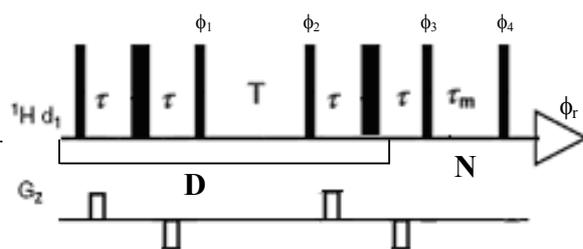
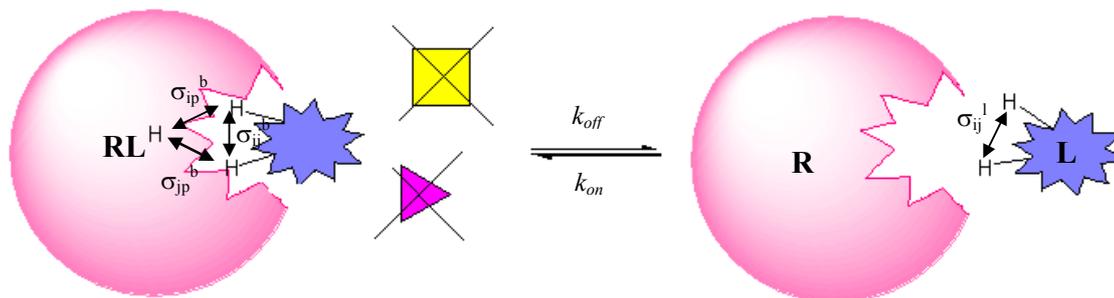


Figura 2. Seqüência de pulsos do experimento de NOE pumping. As barras finas e grossas representam os pulsos de 90° e 180° , respectivamente. As fases são $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = 2x, 2y, 2(-x), 2(-y)$; $\phi_3 = 2x, 2y, 2(-x), 2(-y), 2(-x), 2(-y), 2x, 2y$; $\phi_4 = 16x, 16y, 16(-x), 16(-y)$; $\phi_r = 2(x, -x, -x, x), 2(-x, x, x, -x), 2(y, -y, -y, y), 2(-y, y, y, -y), 2(-x, x, x, -x), 2(x, -x, -x, x), 2(-y, y, y, -y), 2(y, -y, -y, y)$.



Esquema 2. Representação esquemática mostrando a ligação reversível do ligante (L) ao receptor (R) para formar o complexo RL. Os ligantes livres em solução têm seus sinais eliminados pelo filtro de difusão (D). Os caminhos de relaxação (σ_{ij} , σ_{ip} , σ_{jp}), a partir da proteína para o ligante, se tornam visíveis durante o τ_m .

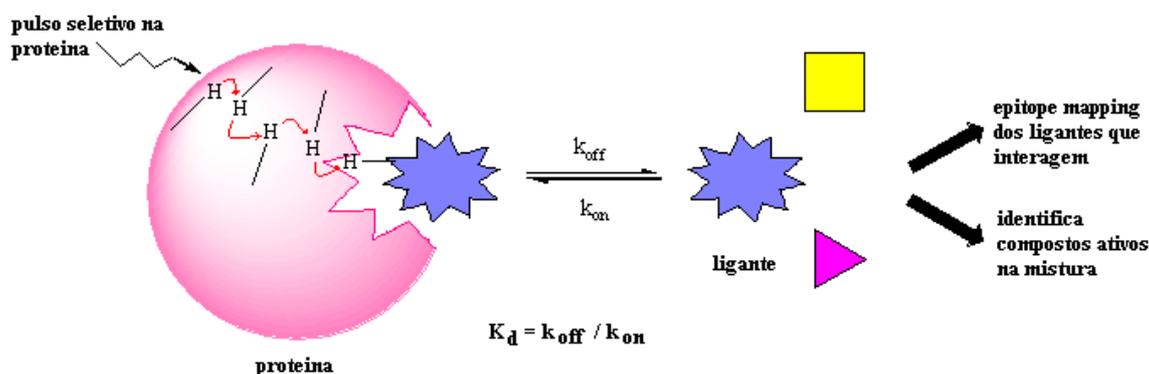
Uma outra versão do experimento de NOE pumping foi desenvolvida também por Chen e Shapiro⁶. Neste experimento, chamado de NOE pumping reverso, depois da excitação, um filtro de relaxação T_2 é aplicado para suprimir os sinais da proteína, seguido por um tempo de mistura (τ_m) tipo NOESY. Como consequência, os *tr*NOE intermoleculares entre proteína e ligantes são suprimidos. Num segundo experimento, chamado de referência, o filtro T_2 é aplicado depois do tempo de mistura (τ_m), de modo que durante o tempo de mistura *tr*NOEs intermolecular sejam desenvolvidos levando a um decréscimo da intensidade do sinal do ligante. A diferença entre esses dois experimentos fornece sinais provenientes apenas dos compostos que estão em contato com o sítio ativo da proteína. Este método de triagem rápida é especialmente útil para proteínas muito pequenas (< 10000 Da), em que a irradiação seletiva da proteína não é possível.

1.1.3 O experimento de STD

O experimento de STD (*Saturation Transfer Difference*), desenvolvido por Meyer e Mayer^{7,8}, é sem dúvida, o mais popular dos experimentos de transferência de NOE, provavelmente, por ser o mais sensível, rápido, além de possibilitar o cálculo do epitopo de ligação do ligante e as constantes de dissociação dos complexos.

Este método, como o nome sugere, fornece a diferença de dois experimentos. No primeiro experimento (*on resonance*), a magnetização dos hidrogênios do receptor ($M_z = 0$, e $\Delta M_z = M_z - M_0 = -M_z$) é seletivamente saturada via um trem de pulsos Gaussianos. O trem de pulsos de radiofrequência (*rf*) é aplicado numa frequência que contem apenas os sinais do receptor e que os sinais dos ligantes estejam ausentes (entre 0,0 e -1,0 ppm para proteínas). A saturação se propaga a partir dos hidrogênios saturados do receptor para outros hidrogênios do receptor *via* caminhos de relaxação cruzada intramolecular (^1H - ^1H); esse processo chamado de difusão de spin é eficiente devido a grande massa molecular do receptor. Como mostrado no **Esquema 3**, a saturação é transferida para os compostos complexados *via* relaxação cruzada intermolecular (^1H - ^1H) na interface receptor-ligante. As moléculas do ligante que interagem com o receptor recebem a transferência de magnetização se dissociam e voltam para a solução onde seu estado saturado persiste devido à pequena velocidade de relaxação longitudinal (R_1) do mesmo. Ao mesmo tempo, novos ligantes não-saturados trocam com o receptor enquanto mais energia de saturação continua a entrar no sistema durante aplicação contínua do pulso de *rf*, aumentando a população de ligantes livres e saturados. Um experimento de referência (*off resonance*) é obtido aplicando um trem de pulsos fora da janela espectral, onde nenhum sinal é perturbado. Os experimentos *on-resonance* e *off-resonance* são obtidos num esquema alternado e subtraídos

seqüencialmente através de ciclagem de fase. O resultado da diferença dos espectros fornece somente os sinais dos ligantes que foram saturados. Esta diferença de espectros simplifica grandemente a interpretação dos dados.



Esquema 3. Representação esquemática do experimento de STD. Quando a proteína torna-se saturada, os ligantes que estão complexados a ela tornam-se saturados também. Este fenômeno, chamado de difusão de spin, está representado pelas setas vermelhas. Através da subtração deste espectro de um espectro sem a saturação da proteína fornece um espectro no qual apenas os sinais dos compostos complexados à macromolécula aparecem. Em geral, a saturação da proteína consiste de uma cascata de pulsos Gaussianos.

A **Figura 3** mostra a seqüência de pulsos de STD. Tipicamente a saturação do receptor envolve N repetições de um pulso seletivo de 50 ms com formato Gaussiano. O trem de pulsos tem, normalmente, uma duração total de 1 a 3 s. Após o pulso seletivo de 180° na proteína aplica-se um pulso duro de 90° (ϕ_1) que transfere a magnetização dos ligantes para o plano xy . Subseqüentemente, aplica-se um filtro $T_{1\rho}$ (ϕ_2) que elimina do espectro os sinais residuais da proteína. Portanto, **A**, ϕ_1 e ϕ_2 formam a seqüência de pulsos STD. Já os pulsos ϕ_3 , ϕ_4 , ϕ_5 e ϕ_6 , selecionados em azul, formam uma seqüência chamada de WATERGATE²⁵, que eliminam o sinal residual da água (HDO) através da aplicação de duas seqüências

²⁵ Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biomol. NMR*, **1992**, *2*, 661-665.

repetidas de pulsos com fase ϕ_3 e ϕ_5 (formatado de 90) e ϕ_4 e ϕ_6 (duro de 180) ladeados de dois pulsos de gradiente de campo de igual intensidade e duração. A perda de coerência ocorre só no sinal da água permanecendo os sinais dos compostos que interagem com a proteína.

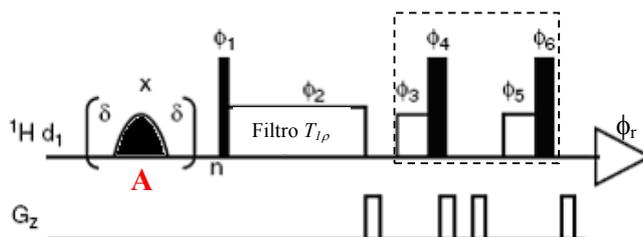


Figura 3. Seqüência de pulsos do experimento de STD com uma seqüência adicional WATERGATE para eliminar sinal residual da HDO (quadrado pontilhado). A subtração de espectros é realizada depois de cada scan através de ciclagem de fase. A frequência do pulso seletivo é colocada ora em $-0,4$ ppm (on resonance) e ora em 30 ppm (off resonance). As fases são $\phi_1 = (x, -x, -x, x), (y, -y, -y, y), (-x, x, x, -x), (-y, y, y, -y)$; $\phi_2 = 2(y, -y), 2(x, -x)$; e $\phi_r = 2(x), 2(-x), 2(y), 2(-y), 2(-x), 2(y), 2(-y), 2(-x), 2(x), 2(-y), 2(y)$. A duração do pulso seletivo é de 50 ms, a intensidade é cerca de $\gamma B_1 = 86$ Hz e o tempo entre os pulsos é de 1 ms. O filtro T_{1p} elimina os sinais residuais da macromolécula.

O experimento de STD tem vários aspectos interessantes que merecem atenção especial. Primeiro, o STD é ajustado idealmente para receptores com grandes massas moleculares (> 30000 Da). Receptores com grande MM possuem longos tempos de correlação (τ_c), que aumentam a *difusão de spin* e conseqüentemente, a transferência de saturação do receptor para o ligante. Segundo, o STD requer relativamente pequenas concentrações de receptor ($\approx 1 \mu\text{M}$). Assumindo que o ligante esteja num limite de troca rápida, a população de ligantes saturados aumentará durante o tempo de saturação (T_{sat}) devido aos pequenos valores de R_1 dos ligantes. Através desse mecanismo, uma pequena amostra de receptor saturado

poderá produzir uma quantidade amplificada de ligantes saturados. Uma terceira vantagem do STD é que somente os sinais dos ligantes no estado complexado são observados rendendo espectros muito simplificados.

A otimização dos parâmetros e a interpretação dos experimentos de STD requerem uma familiaridade com os processos de troca e são o tema de vários estudos de desenvolvimento metodológico na literatura. Para melhor quantificar a amplificação dos sinais no experimento de STD, Mayer e Meyer²⁶, introduziram o *fator STD amplificado* (A_{STD}). A resposta do STD provém diretamente do complexo receptor-ligante e é proporcional à concentração do complexo [RL]. Por esta razão, a intensidade do sinal no espectro de STD (I_{STD}) pode ser escrita como $I_{STD} = C\alpha_{STD}[RL]$, em que C é a constante de proporcionalidade que faz a conversão apropriada de unidade e α_{STD} é o fator de aumento que representa a máxima amplificação de STD. No equilíbrio a intensidade I_0 é proporcional a $[L_T]$; então $I_0 = CL_T$. Neste caso, a razão $\eta_{STD} = I_{STD}/I_0 = \alpha_{STD}[EL]/L_T = \alpha_{STD}P_B$. Já que P_B/ε , em que $\varepsilon = L_T/R_T$, temos;

$$A_{STD} = \varepsilon\eta_{STD} = \varepsilon\left\{I_{STD} / I_0\right\} = \frac{\alpha_{STD}[L]}{[L]+K_D} \quad (4)$$

Esta equação é análoga à bem estabelecida equação de velocidade da reação enzimática (v_0) de Henri-Michaelis-Menten²⁷:

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{[S]+K_M} \quad (5)$$

Usando uma analogia a cinética enzimática, A_{STD} irá atuar de maneira similar a v_0 : ou seja, irá aumentar com o aumento de $[L_T]$ até o máximo de amplificação ser alcançada quando o sítio ativo do receptor estiver saturado ($L_T \gg K_d$). Depois do

²⁶ Mayer, M.; Meyer, B, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108-6117.

²⁷ Michaelis, L.; Menten, M. *Biochem. Z* **1913**, *49*, 333-369.

ponto de saturação do receptor, o aumento continuado de L_T irá diminuir monotonicamente a resposta parcial $\eta_{STD} = I_{STD}/I_0$. Em princípio, se L_T é aproximadamente igual $[L]$, os dados de titulação do ligante podem ser plotados usando a **Equação (4)** para estimar K_D e α_{STD} .

Seguindo o argumento enzimático, A_{STD} fornecerá o número médio de ligantes saturados por receptor. Como tal, fornece um significado conveniente para a aferição inerente à sensibilidade do experimento. Ou seja, se $A_{STD} = 10$ e a concentração de receptor é de $50 \mu\text{M}$ isso fornecerá uma concentração efetiva de ligante saturado de $500 \mu\text{M}^{26}$. Uma motivação adicional para usar A_{STD} é que os espectros a partir de amostras contendo concentrações de receptor diferentes podem ser comparados. Isso seria relevante para titulação e experimentos de competição que podem envolver amostras com quantidades de receptor variadas.

Assumindo uma velocidade de ligação limitada pela difusão, o K_D para o método de STD tem sido estimado entre $10^{-8} < K_d < 10^{-3}$ M. Para ligantes fracos tendo $K_d > L_T$, mais da metade das moléculas de receptor não terão ligantes no sítio ativo. Com o aumento do K_d a população de complexo receptor-ligante $[RL]$ diminui, levando a redução no sinal de STD. Para o caso de ligantes fortes, o decréscimo de K_d aumenta o tempo de vida (k_{off}^{-1}) do complexo receptor-ligante diminuindo a constante de velocidade de troca (k_{ex}). Para K_d suficientemente pequenos, o tempo de residência do ligante no estado livre pode exceder seu valor de R_1 . Sob essas condições, o tempo de vida do complexo é tão reduzido que o receptor é incapaz de saturar os ligantes.

Recentes aplicações do experimento de STD demonstraram sua indiscutível versatilidade frente a sistemas enzimáticos. Por exemplo, Benie *et al.*²⁸ aplicou

²⁸ Benie, A. J.; Moser, R.; Boumi, F.; Blaas, D.; Peters, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14-15.

STD para identificar componentes que se ligam a HRV2 (rinovírus humana sorotipo 2) um complexo macromolecular de $8,5 \cdot 10^6$ Da. Meinecke e Meyer caracterizaram as interações de peptídeos extracelulares com uma proteína de membrana (Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) reconstituída em lipossoma²⁹. Outros exemplos alternativos de alvos incluem pequenos fragmentos de RNA **Erro! Indicador não definido.** e macromoléculas imobilizadas em suportes sólidos³⁰.

A sensibilidade intrínseca do experimento de STD é limitada pela eficiência dos caminhos de transferência de energia a partir do receptor para o ligante. O principal fator limitante da transferência de magnetização é a velocidade de relaxação longitudinal (R_1) do ligante. Já que os ligantes são, normalmente, compostos de baixa massa molecular (< 1000 Da), os valores de R_1 do estado livre são pequenos e dissipam saturação lentamente. Em contraste, quando se ligam ao receptor o R_1 do ligante pode aumentar muito. Dessa forma, a visualização da transferência de energia requer que o ligante se dissocie do receptor a uma velocidade mais rápida do que o valor de R_1 do complexo.

O receptor recebe um fluxo constante de energia através de um trem de pulsos de rf . Esta energia constante aumenta a sensibilidade do STD sobre os outros métodos de $trNOE$. Na prática, o receptor fica 100% saturado logo depois da aplicação do pulso de rf devido à difusão de spin intramolecular. Entretanto, a extensão real da saturação no receptor depende criticamente da competição entre fluxos de energia e as várias relaxações R_1 e/ou mecanismos de vazamento (leakage). Jayalakshmi e Rama Krishna³⁰ enfatizaram a importância dos mecanismos de vazamento mediados pela troca. Os hidrogênios do receptor na interface receptor-ligante relaxam com os hidrogênios do ligante não-saturado e com os hidrogênios do

²⁹ Meinecke, R.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *44*, 3059-3065.

³⁰ Jayalakshmi, V.; Rama Krishna, N. *J. Mag. Reson.* **2002**, *155*, 106-118.

solvente, bem como, outros hidrogênios distintos do receptor saturado. A saturação entra a partir de hidrogênios do receptor e se espalha via troca química com os hidrogênios do ligante e do solvente. Os mecanismos de vazamento de saturação podem ser muito importantes para alguns sistemas. Por exemplo, Mayer e James³¹ demonstraram os efeitos do vazamento da saturação através de troca química a partir de moléculas do solvente comparando os resultados de STD para ligantes complexados à RNA em H₂O versus D₂O. Os resultados de STD são significativamente menores em H₂O devido às interações DD adicionais entre os hidrogênios do RNA e as águas de hidratação.

Um outro fator que pode comprometer a saturação é a baixa massa molecular do receptor. Entretanto, alvos com massa molecular baixa (< 20000 Da) são raramente interessantes como alvos terapêuticos, ou seja, raramente encontram-se alvos com pequenos τ_c e conseqüente ineficiente difusão de spin. Nestes casos, é possível aumentar o τ_c efetivo aplicando longos tempos de saturação, ou alternativamente, aumentando a viscosidade e/ou diminuindo a temperatura de análise. Se todas essas alternativas não forem eficientes, então métodos de filtros de relaxação ($R_2=1/T_2$) podem aumentar a sensibilidade dos experimentos de STD.

Finalmente, deveria ser considerado que a deficiência na rede de relaxação cruzada (¹H-¹H) pode comprometer a eficiência da saturação. Essa deficiência pode ser devido ao movimento molecular local que efetivamente diminui as interações dipolo-dipolo ou simplesmente a falta de densidade de hidrogênios, como em alvos tipo RNA. Desta forma, alvos que apresentam baixa densidade de hidrogênios não são ideais para o STD. Neste caso, o experimento de WaterLOGSY, desenvolvido por Dalvit e colaboradores⁹, pode ser muito mais efetivo.

³¹ Mayer, M; James, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13376-13377.

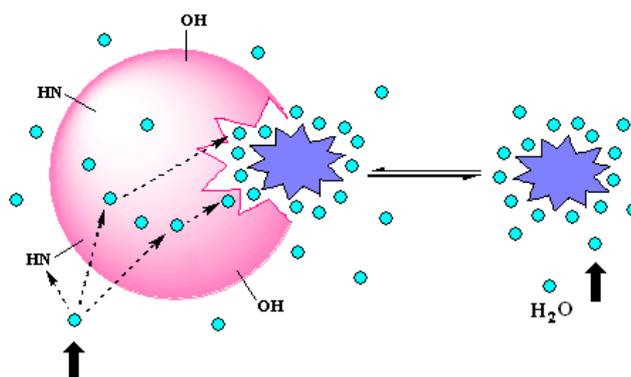
1.1.4 O experimento de WaterLOGSY

O experimento de WaterLOGSY⁹, analogamente ao STD, repousa na excitação do complexo proteína-ligante através de um trem de pulsos de *rf* seletivos. Entretanto, o WaterLOGSY consegue isto indiretamente pela perturbação seletiva da magnetização da água, ao contrário do STD, que usa a perturbação direta da magnetização do receptor. O caminho de transferência de magnetização no WaterLOGSY passa a ser água → receptor → ligante. A transferência de magnetização pode ocorrer *via* vários tipos de mecanismos, que serão discutidos a seguir. A apresentação original do WaterLOGSY propõe tanto a saturação seletiva como a inversão do sinal da água. A tendência atual favorece a inversão seletiva do sinal da água conseguida através do método e-PHOGSY (enhanced Protein Hydration Observed through Gradient Spectroscopy) [90_{+x} -sel $180_{(+x/+y)}$ - 90_{+x}] proposto por Dalvit³².

A magnetização invertida da água pode ser transferida aos ligantes complexados *via* três caminhos simultâneos, como mostrado no **Esquema 4**. Um caminho envolve a relaxação cruzada (^1H - ^1H) direta entre o ligante complexado e a água de complexação presente no sítio ativo. Por definição, as moléculas de água de complexação são as que possuem tempos de residência maior que o tempo de correlação da macromolécula. Como resultado, a velocidade que governa as relaxações cruzadas dipolo-dipolo intermoleculares entre o ligante complexado e as moléculas de água são negativas e tendem a trazer a magnetização do ligante para o mesmo estado invertido da água. Um segundo caminho, é a troca química entre os hidrogênios das águas “invertidas” e os hidrogênios lábeis NH e OH dentro do sítio ativo. A troca química desses hidrogênios com os da água invertem suas magnetizações. Esses NH/OH propagam a inversão para os hidrogênios não lábeis

³² Dalvit, C.; *J. Magn. Reson. B*, **1996**, *112*, 282-288.

do ligante *via* relaxação cruzada dipolo-dipolo intermolecular. No terceiro caminho a transferência de magnetização ocorre indiretamente com NH/OH lábeis em posições remotas (distantes das moléculas de água/regiões hidrofóbicas) *via* difusão de spin. A magnetização invertida é, então, transferida para outros spins não lábeis tornando-se um centro de propagação da saturação do spin. Dessa forma, os hidrogênios remotos NH/OH do sítio ativo atuam como pontos de entrada para a dispersão de inversão de spin através do receptor. Enquanto os mecanismos acima tratam da transferência de magnetização para os ligantes complexados, um outro mecanismo existe para transferência de magnetização para os ligantes livres, que é *via* troca química da água com hidrogênios lábeis dos ligantes e, conseqüente relaxação cruzada dipolo-dipolo intramolecular do ligante. Este efeito tem o potencial de complicar a interpretação dos dados, mas pode ser esclarecido adquirindo um WaterLOGSY controle para os ligantes livres.



Esquema 4. *Mecanismos de transferência de magnetização fundamentais do WaterLOGSY. Transferência de magnetização a partir da água para os ligantes ocorre via hidrogênios lábeis do receptor dentro e fora do sítio ativo, bem como, a partir das moléculas de água com vida longa dentro do sítio de ligação. As bolinhas azuis indicam as moléculas de água invertidas. Somente os ligantes complexados experimentam ambos tipos de transferência de magnetização. O reservatório de ligantes livres vai trocando com a macromolécula e experimentando a transferência de magnetização.*

Os esquemas de transferência de magnetização, discutidos acima, permitem que a magnetização dos compostos complexados com a macromolécula seja invertida no sítio ativo do receptor. Dessa forma, os ligantes se dissociam para solução, onde, analogamente ao experimento de STD, seu estado de magnetização perturbada é mantido devido a seus pequenos valores de R_1 . Quanto menores os valores de R_1 , maior será o tempo disponível para os ligantes se complexarem com receptor, recebendo a transferência de inversão de magnetização a partir do complexo receptor-ligante, e então ao se dissociar eles se somam ao reservatório crescente de ligantes com spins invertidos.

A diferenciação dos ligantes livres daqueles complexados com a proteína no experimento de WaterLOGSY é conseguida através da observação das diferentes

propriedades de relaxação cruzada desses ligantes com a água. Nos esquemas de transferência de magnetização descritos acima, os ligantes complexados interagem direta ou indiretamente com os spins invertidos da água *via* interações dipolo-dipolo com tempos de correlação (τ_c) relativamente longos resultando em velocidades de relaxação cruzada negativa. Em contraste, interações dipolo-dipolo de ligantes não-complexados com a água apresentam τ_c muito mais curtos levando a velocidades de relaxação cruzada positivas. Como consequência, compostos ligantes e não-ligantes apresentam sinais com fases opostas no WaterLOGSY, fornecendo uma maneira fácil de discriminá-los.

A **Figura 4** mostra um exemplo de uma seqüência de pulsos do experimento de WaterLOGSY. A característica chave é o uso do eco de spin e-PHOGSY no começo da seqüência para inverter os sinais da água enquanto defasa os outros sinais com gradientes de campo pulsado. A ciclagem de fase no segundo pulso de 90° (ϕ_2) serve para colocar a magnetização da água alternadamente em $+z$ e em $-z$. No caso de $-z$, a magnetização da água invertida é transferida para os compostos através das rotas descritas acima durante o tempo de inversão. No caso de $+z$, a magnetização da água está em equilíbrio e nada acontece. Alternando a fase do receptor de acordo com o segundo pulso de 90° obtém-se uma diferença de espectro entre as condições de água em $+z$ e água em $-z$. O sinal resultante representa somente aqueles sinais que experimentaram transferência de magnetização a partir da água. Um gradiente é aplicado durante o T_{inv} (equivalente ao tempo de mistura) para prevenir um retorno prematuro da magnetização da água ao equilíbrio. A seqüência termina com a eliminação do sinal residual da água através seqüência WATERGATE em azul, conservando os sinais que sofreram alteração por transferência de magnetização.

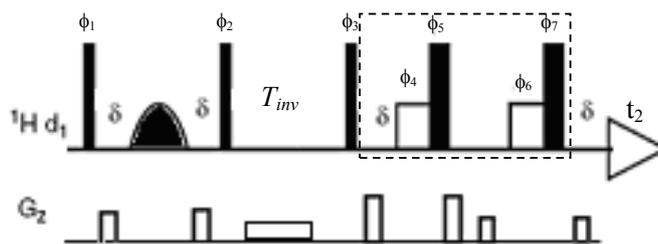


Figura 4. Seqüência de pulsos do experimento de WaterLOGSY com uma seqüência adicional WATERGATE para eliminar sinal residual da HDO (quadrado pontilhado). O sinal da água é seletivamente invertido em varreduras alternadas de pulsos de 90° e deslocamentos de fase dos pulsos seletivos de 180° . Transferência de magnetização da água invertida tanto para os ligantes livres como complexados ocorrem durante o T_{inv} de duração de 1 a 3 s.

A sensibilidade intrínseca do WaterLOGSY é limitada pela eficiência da inversão da água, bem como da eficiência do esquema de transferência de energia: água \rightarrow receptor \rightarrow ligante. Deve-se ter cuidado para evitar grandes perdas através da difusão translacional durante o período de eco de spin e-PHOGSY. Condições experimentais que diminuam o R_1 da água são desejáveis já que eles permitem que uma maior quantidade de novos ligantes troquem com o receptor. Como no experimento de STD, os valores de R_1 dos estados de ligante livres e complexado limitam a quantidade de transferência de magnetização. Para uma sensibilidade ótima, as velocidades de troca devem ser significativamente mais rápidas do que o R_1 do ligante no estado complexado.

Como todos os experimentos de triagem, o WaterLOGSY está baseado na detecção de ligantes que interagem fracamente. Ligantes com fortes afinidades terão correspondentemente tempos de residência mais longos. Similar ao caso do STD, se os tempos de residência se tornam muito longos, a inversão de spin irá desaparecer devido à relaxação longitudinal antes do ligante de dissociar para

solução. O valor limite mínimo de K_d para WaterLOGSY é de aproximadamente 0,1 μM .

Essa técnica foi aplicada com sucesso a um estudo de triagem de ligação de uma mistura de dez ligantes de baixa massa molecular (a concentrações de 100 μM cada) e uma cinase-2 dependente de ciclina (cdk2, MM 34 kDa, concentração de 10 μM) obtendo uma clara discriminação entre os compostos ligantes e não ligantes³³.

1.1.5 O experimento de DOSY-NOESY

Outro experimento que fornece informações de complexos macromoleculares é o experimento de DOSY-NOESY¹⁰, uma extensão do DOSY (DBPPSTE). Criado através da adição de uma seqüência NOESY, depois da seqüência de DOSY, o experimento de DOSY-NOESY foi o primeiro experimento 3D escrito e testado com êxito.

O propósito do DOSY-NOESY¹⁰ não é medir os coeficientes de difusão, mas apenas usar os efeitos da difusão para realçar o estudo de misturas complexas ou moléculas em equilíbrio dinâmico entre os estados livre e complexado.

Este método separa os componentes da mistura baseado nas diferentes velocidades de difusão. Se a velocidade de troca é lenta para a escala de tempo da RMN, as correlações de NOE serão separadas pelo respectivo coeficiente de difusão. Entretanto, se a velocidade de troca é de moderada a rápida para a escala de tempo da RMN, então os NOEs provenientes do complexo, terão coeficiente de difusão aparente baseado na velocidade de troca. Um regime de troca rápido e uma

³³ Dalvit, C.; Pevarello, P. Tato, M.; Veronesi, M.; Vulpetti, A.; Sundstron, M. *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 65-68.

grande diferença de massa molecular são necessários para fornecer os resultados da transferência de NOE. O experimento de DOSY-NOESY não tem a dependência dramática do tamanho molecular que tem os outros experimentos de transferência de NOE. Teoricamente, a única exigência desta técnica é a habilidade de separar os coeficientes de difusão das espécies de interesse do resto do sistema.

O experimento de DOSY-NOESY (**Figura 5**) consiste na seleção de um ligante ou conjunto de ligantes através de um filtro de difusão (D) seguido por uma seqüência de NOESY, na qual, o tempo de evolução (t_1) é variável e o tempo de mistura (τ_m) é otimizado. Como resultado obtém-se um plano de NOESY que em uma dimensão têm-se os sinais dos ligantes e na outra os sinais da proteína. Por ser um pseudo 3D, esta técnica, é muito menos sensível do que as técnicas de RMN de 1D, entretanto, este experimento fornece além do epitopo do ligante o epitopo da macromolécula sem necessidade de marcação isotópica, informação esta, que não é fornecida por nenhuma das outras técnicas.

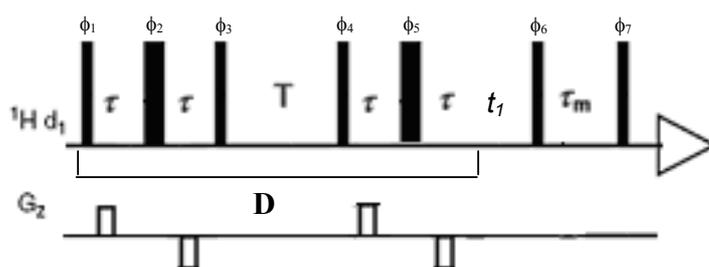


Figura 5. Seqüência de pulsos do experimento de DOSY-NOESY. Este experimento é uma junção da seqüência STE com a seqüência de NOESY. Os tempos t_1 e τ_m são os tempos de evolução e de mistura, respectivamente.

Resultados e Discussão

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Otimização das seqüências de pulsos STD, WaterLOGSY, NOE pumping e DOSY-NOESY

A parte introdutória deste trabalho apresentou as quatro metodologias mais utilizadas nos estudos de interação receptor-ligante. Entretanto, a literatura é escassa, ou melhor, inexistente com relação a uma análise comparativa destas técnicas utilizando uma mesma amostra. Portanto, esta primeira parte deste trabalho teve como objetivo principal comparar os resultados obtidos aplicando estas quatro técnicas a uma amostra modelo de Albumina de Soro Bovino (BSA) na presença de ácido adípico, ácido cítrico, cafeína, *D*-glucose e ácido salicílico. Essas moléculas pequenas foram utilizadas como modelos de metabólitos celulares, pois é conhecido que estas apresentam afinidade com as proteínas do sangue, com exceção da *D*-glucose que foi usada como controle negativo. Neste estudo, as concentrações das macromoléculas não foram variadas. Mudanças na concentração da proteína podem aumentar a viscosidade da solução se comparada à concentração do ligante, resultando em mudanças nos coeficientes de difusão do ligante independente da interação proteína/ligante.

Foram realizados três experimentos modelos (**Tabela 1**) em tampão fosfato (pH =7,0) e 99,9% de D₂O:

- 1) 90 µM de BSA + **mistura 1**;
- 2) 90 µM de BSA + **mistura 2**;
- 3) 90 µM de BSA + **mistura 3**.

Tabela 1. Concentrações dos compostos utilizados como ligantes nas **misturas 1, 2 e 3**

	ác. salicílico (1)	Cafeína (2)	ác. cítrico (3)	ác. adipico (4)	D-glucose (5)
Mistura 1	9,84 mM	10,2 mM	10,5 mM	10,4 mM	10,0 mM
Mistura 2	10,9 mM	-	-	-	10,3 mM
Mistura 3	-	10,2 mM	-	-	10,3 mM

Estes experimentos permitiram além da otimização dos parâmetros experimentais a investigação do equilíbrio químico competitivo entre mais de duas espécies por RMN²⁰.

Uma primeira avaliação da interação entre os ligantes e BSA já pode ser feita através do espectro RMN de ¹H observando a variação dos deslocamentos químicos (δ) dos ligantes da **mistura 1** na ausência e na presença de BSA. O δ_0 observado no espectro dos ligantes na presença da BSA é a media ponderada dos δ do ligante nos estados livre e complexado, como mostrado na **Equação 6**.

$$\delta_0 = (\delta_L \times f_L) + (\delta_B \times f_B) \quad (6)$$

em que, f_L e f_B são as frações molares dos ligantes livres e complexados. Além disso, o pequeno alargamento dos sinais dos ligantes (1) e (2) na presença de BSA e não a duplicação dos sinais é outro indicativo de que a interação acontece num regime de troca rápida. Os números sobre as estruturas abaixo representam os δ_H dos respectivos sinais na presença de BSA e os números em vermelho representam as $\Delta\delta_H$ dos sinais na presença e na ausência de BSA, **Figura 6**.

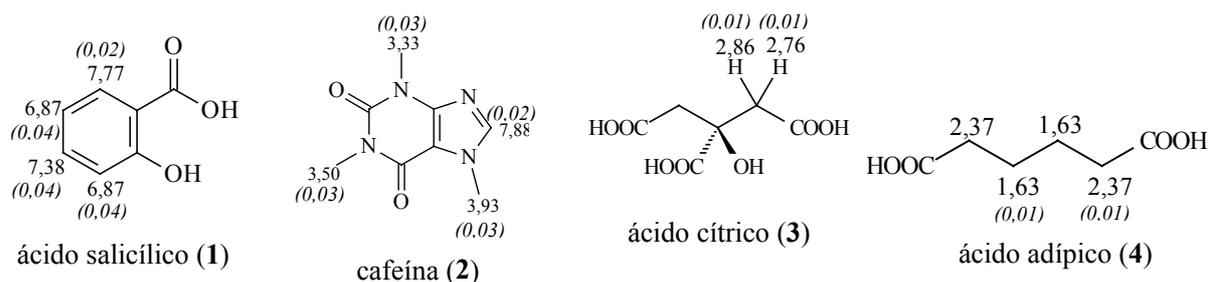


Figura 6. Os números sobre as estruturas acima representam os δ_H dos respectivos sinais na presença de BSA e os números em itálico representam as $\Delta\delta_H$ dos sinais na presença e na ausência de BSA.

Foram realizados experimentos de difusão para as **mistura 1** pura (**Figura 7 e 8**) e para **mistura 1/BSA** (**Figura 9 e 10**) aplicando a seqüência de pulsos **DBPPSTE**³⁴.

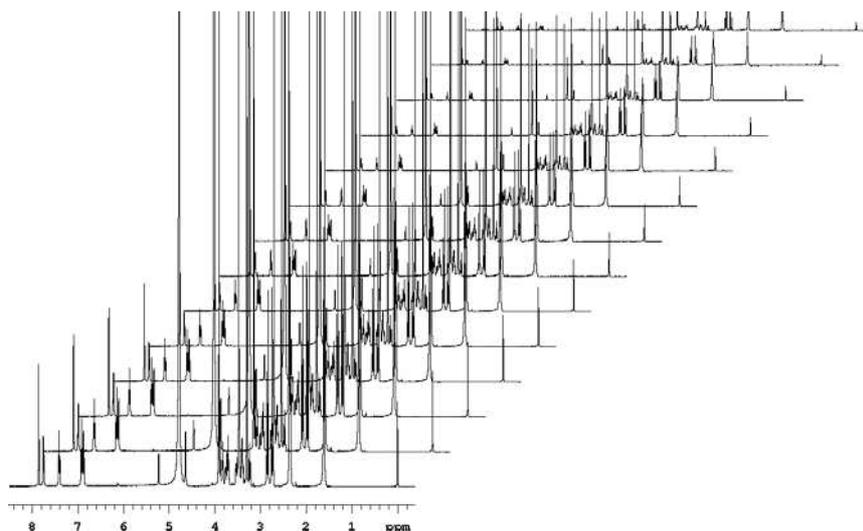


Figura 7. Série de 14 espectros de RMN de ¹H (500 MHz), da **mistura 1**, obtidos variando a intensidade (g) dos gradientes de campo pulsados. A intensidade dos sinais decai exponencialmente em função da amplitude do gradiente.

³⁴ Wu, D.; Chen, A.; Johnson, C. S.; *J. Mag. Reson. Ser A*, **1995**, *115*, 260-264.

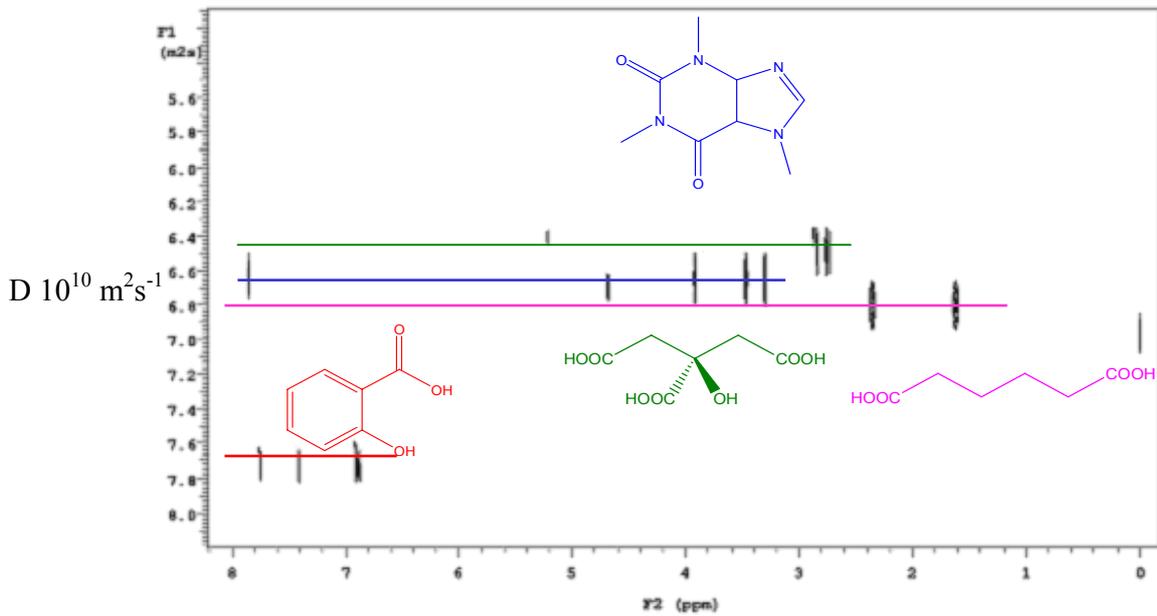


Figura 8. Espectro de DOSY (^1H , 500 MHz, DBPPSTE, 25 °C) da *mistura 1* em HDO referência (difusão da água).

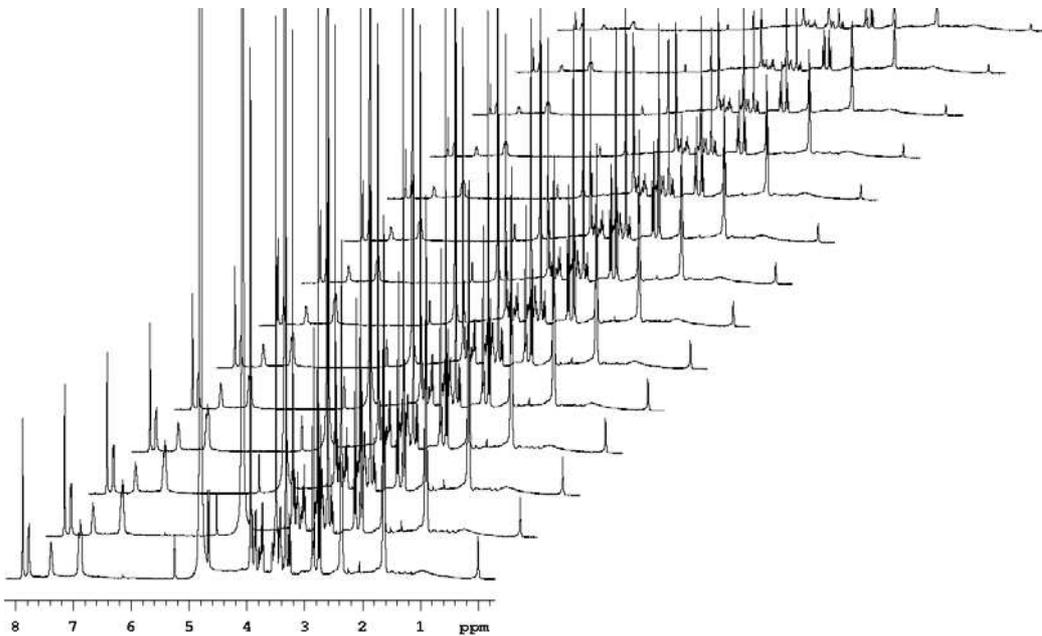


Figura 9. Série de 14 espectros de RMN de ^1H (500 MHz), da *mistura 1/BSA*, obtidos variando a intensidade (g) dos gradientes de campo pulsados. A intensidade dos sinais decai exponencialmente em função da amplitude do gradiente.

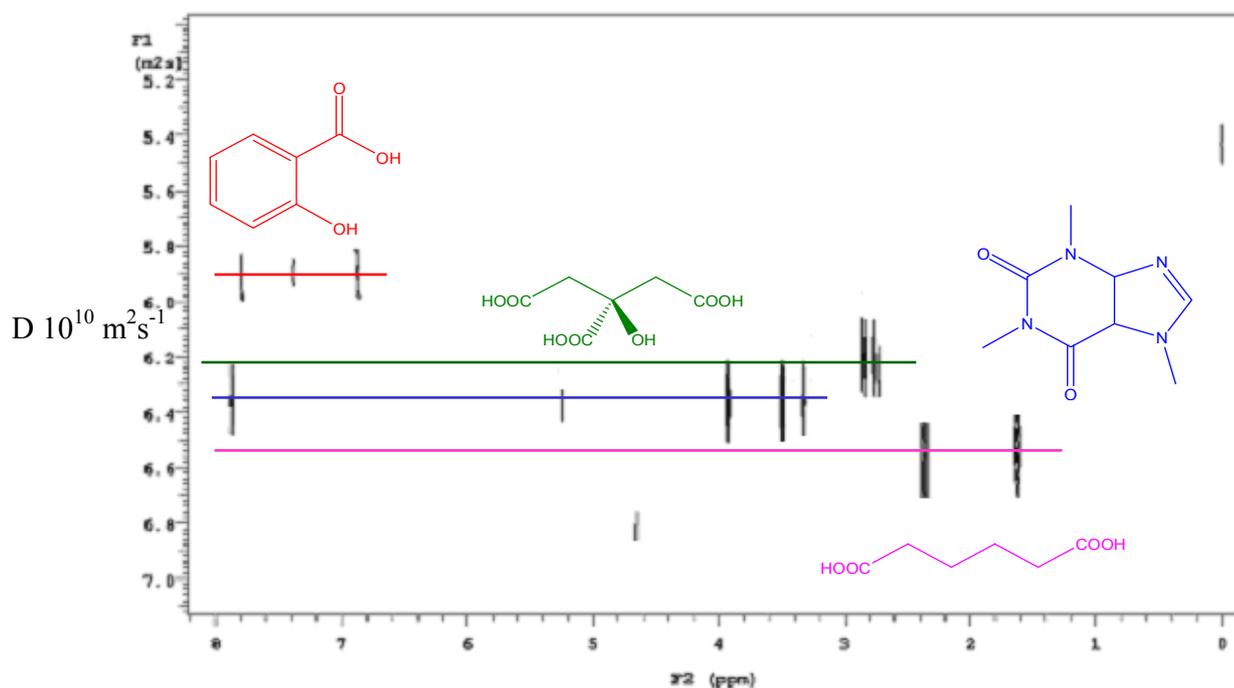


Figura 10. Espectro de DOSY (^1H , 500 MHz, DBPPSTE, 25 °C) da **mistura 1**/BSA em HDO referência (difusão da água).

Os valores de K_d para os ligantes na **mistura 1** e **2** puderam ser estimados a partir da **Equação 7**, como mostrado na **Tabela 2**.

$$K_d = P_{tot} \left(\frac{D_b - D_0}{D_0 - D_f} \right) + L_{tot} \left(\frac{D_0 - D_b}{D_b - D_f} \right) \quad (7)$$

A constante de equilíbrio foi calculada a partir da concentração de proteína (P_{tot}) e de ligante (L_{tot}) e pela medida do coeficiente de difusão (D_0) para os ligantes na presença de proteína, do coeficiente de difusão (D_f) para o ligante na ausência de proteína e do coeficiente de difusão (D_b) para a proteína pura. A **equação 7** é adequada para sistemas de equilíbrio com estequiometria 1:1.

As constantes de dissociação aparentes calculadas para os ligantes indicaram fraca interação com a proteína, uma vez que os valores de K_d encontrados foram da

ordem de 10^{-3} M. Além disso, foi possível constatar que o ácido salicílico (**1**) ($K_d = 6,9$ mM) interage numa maior proporção com a BSA do que a cafeína (**2**) ($K_d = 8,2$ mM).

$$K_d = 90.10^{-6} \left(\frac{0,91 - 5,91}{5,91 - 7,76} \right) + 9,84.10^{-3} \left(\frac{5,91 - 0,91}{0,91 - 7,76} \right) = 6,9.10^{-3} M$$

Tabela 2. Comparação dos valores de difusão dos compostos da **mistura 1** na ausência e na presença de $90 \mu\text{M}$ de BSA e valores de K_d para os ligantes (1) e (2) nas **misturas 1 e 2**

Composto	D ($10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$)		D ($10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$)		K_d (10^{-3} M)	
	Na ausência de BSA	D/D_{D_2O}	Na presença de BSA	D/D_{D_2O}	Mistura 1 Assumindo (1:1)	Mistura 2 Assumindo (1:1)
BSA	-	-	$0,91 \pm 0,08$	0,04		
Ácido salicílico (1)	$7,76 \pm 0,35$	0,36	$5,91 \pm 0,50$		6,9	3,6
Cafeína (2)	$6,81 \pm 0,06$	0,32	$6,45 \pm 0,50$	0,30	8,2	
Ácido cítrico (3)	$6,50 \pm 0,04$	0,30	$6,29 \pm 0,25$	0,29		
Ácido adípico (4)	$6,86 \pm 0,04$	0,32	$6,64 \pm 0,05$	0,31		
D-glucose (5)	$5,23 \pm 0,04$	0,24	$5,25 \pm 0,09$	0,25		
D ₂ O	$21,6 \pm 0,13$	1,00	$21,4 \pm 0,12$	1,00		
TSPA	$7,06 \pm 0,04$	0,33	$5,52 \pm 0,33$	0,26		

O aumento do valor de K_d para o ácido salicílico (**1**) na **mistura 1** ($K_d = 6,9$ mM) se comparado à (**1**) na **mistura 2** ($K_d = 3,6$ mM) pode ser racionalizado de duas formas, ou:

1) na **mistura 1**, ambos ligantes (1) e (2) estão competindo pelo mesmo sítio na BSA, **Figura 11**.

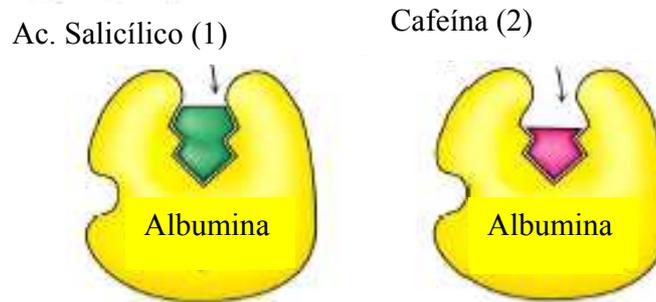


Figura 11. Competição entre o substrato (**ácido salicílico (1)**) e o inibidor competitivo (**cafeína (2)**) pelo mesmo sítio ativo na proteína.

2) na **mistura 1**, a cafeína se liga a um sítio alostérico modificando a conformação da proteína (**Figura 12**) e alterando a topologia do sítio ativo do ácido salicílico enfraquecendo a ligação e, portanto, aumentando K_d .

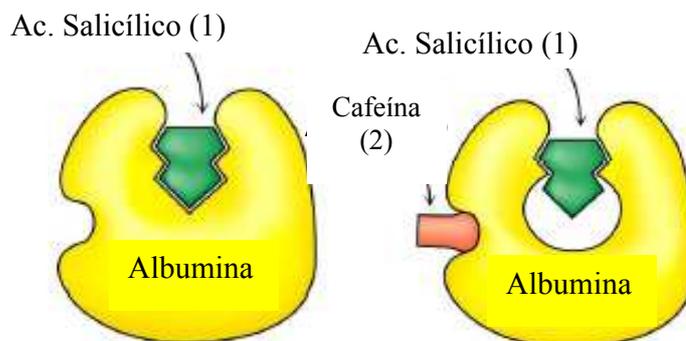


Figura 12. Mudança de conformação da proteína devido à interação de um segundo ligante num sítio alostérico.

Entretanto, as constantes de dissociação determinadas por difusão sofrem distorções acarretadas pelas alterações conformacionais e dinâmicas impostas pela

complexação. Portanto, é de fundamental importância avaliar as associações supramoleculares aplicando metodologias complementares e uma alternativa escolhida foi o uso do experimento de NOE pumping.

Neste experimento, calibrou-se, inicialmente, a magnitude do gradiente necessária para cancelar os sinais das moléculas pequenas. Logo após, adquiriu-se espectros variando os tempos de mistura (τ_m) em (0,05; 0,30; 0,60 e 0,90) s. Os resultados indicaram um aumento substancial das intensidades dos sinais dos ligantes com o aumento do τ_m , (**Figura 13**).

Com um τ_m de 0,30 s foram observados incrementos de NOE para os hidrogênios **H-6**, **H-4**, **H-5,3** do ácido salicílico (**1**) e para as metilas **CH₃-1** e **CH₃-3** da cafeína (**2**), já com τ_m igual a 0,60 s um incremento para metila **CH₃-9** da cafeína (**2**) foi observado, e finalmente com um τ_m de 0,90 s foi observado incremento no **H-8** da cafeína (**2**) que ainda não havia sido observado. Estes resultados demonstraram uma correlação intermolecular do ácido salicílico (**1**) e da cafeína (**2**) com a BSA, como pode ser observado na **Figura 13**.

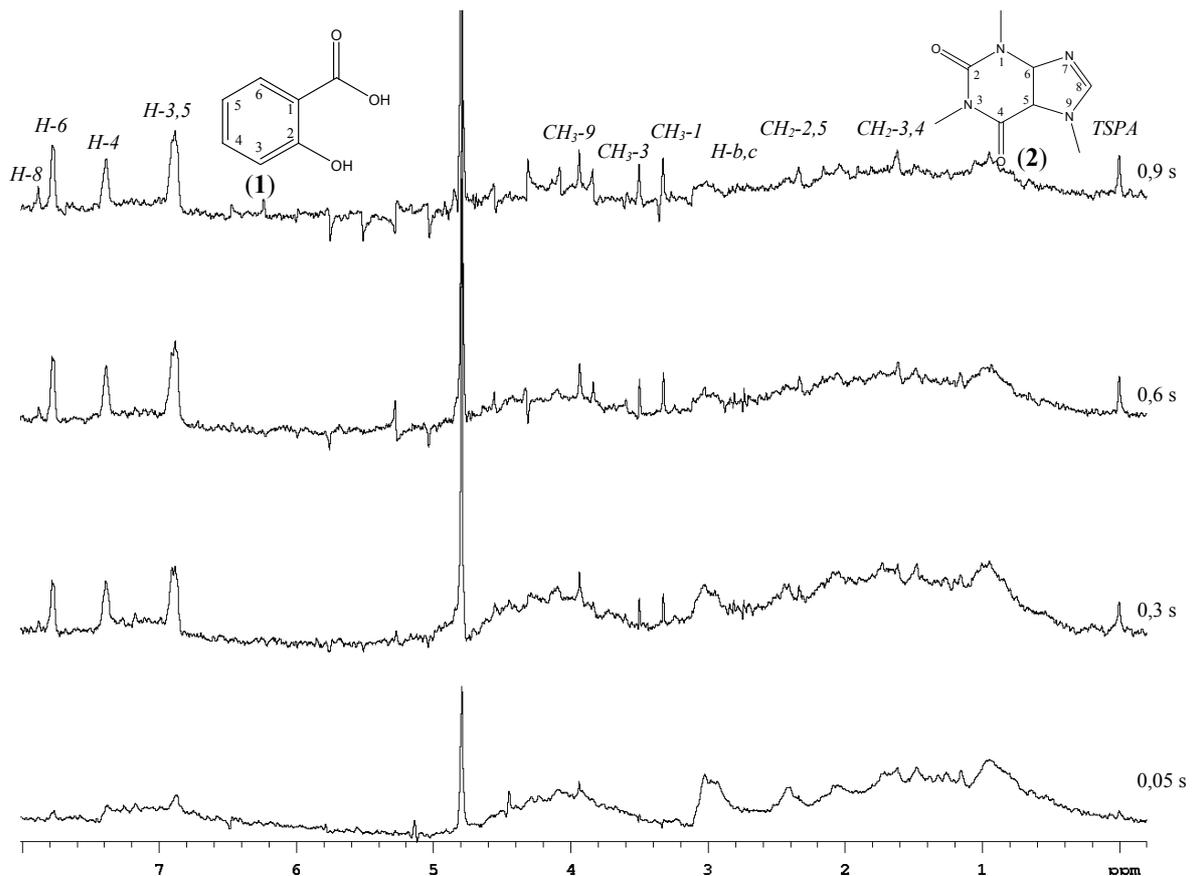


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H (499,883 MHz, $\text{D}_2\text{O}/2,5 \text{ mmol L}^{-1}$; de $\text{d}_4\text{-TSPA}$) de NOE pumping, da **mistura 1** (ácido salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e D-glucose) acrescida de $90 \mu\text{M}$ de BSA, $T = 150 \text{ ms}$, $\delta = 20 \text{ ms}$, variando o τ_m (0,05; 0,30; 0,60 e 0,90) s.

O experimento de NOE pumping foi eficiente na detecção dos componentes ativos na mistura, entretanto, os espectros de NOE pumping apresentaram uma razão sinal/ruído pequena, além de ser menos eficiente na redução dos sinais da proteína. Com isso, para usar este método seria necessário aumentar as concentrações dos componentes da mistura a fim de obter espectros melhor resolvidos e acrescentar ao final da seqüência de pulsos um filtro T_2 a fim de reduzir os sinais residuais das macromoléculas.

A partir desses resultados, passou-se para implementação e otimização do experimento de STD.

Objetivando uma otimização dos parâmetros de aquisição foi obtida uma série de espectros de STD para as **misturas 1 e 2** variando o tempo de saturação de 100 ms a 10 s, como mostrado nas **Figs 14 e 15a**, respectivamente.

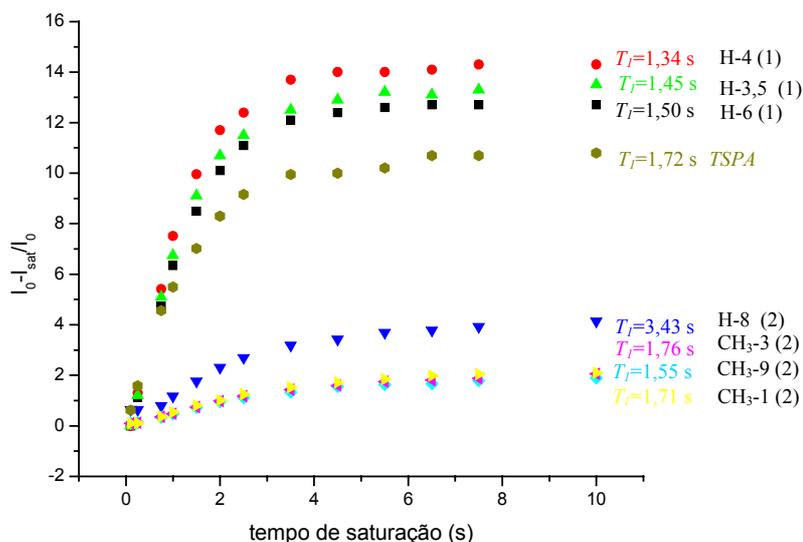


Figura 14. Gráfico do fator STD (%) versus o tempo de saturação (s) para **mistura 1** (ácido salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e D-glucose). A proteína foi irradiada com um trem de pulsos Gaussianos em -0,50 ppm para o espectro de STD e em 30 ppm para o espectro de STD-controle. Os espectros foram adquiridos com um $d_1 = 1$ s e o tempo de saturação foi ajustado pelo número de pulsos Gaussianos. O tempo de relaxação (T_1) para cada sinal na presença de BSA (● H-4, ▲ H-3,5 e ■ H-6 de (1); ▼ H-8, ► CH₃-1, ◀ CH₃-3, ◆ CH₃-9 de (2) e ● TSPA) está apresentado no gráfico.

O fator STD máximo para o composto (1) foi conseguido com tempos de saturação em torno de 4,0 s tanto para a **mistura 1** como para a **mistura 2** (Figuras

14 e 15a), já para **mistura 3** cujo **H-8** possui tempo de relaxação (T_1) maior, o fator STD máximo não foi alcançado até 7,5 s (**Figura 15b**). Esses dados indicaram que tempos de saturação muito longos não aumentam a sensibilidade do experimento de STD e que tempos de saturação muito curtos não são favoráveis devido à baixa intensidade de sinal do STD. Tipicamente, são usados tempos de saturação entre 2 e 3 s nos experimentos de STD. Além disso, a **Figura 15b**, mostra claramente que hidrogênios com tempos de relaxação (T_1) pequenos atingem um máximo de intensidade em tempos de saturação mais curtos. Por exemplo, o **H-8** apresentou um $T_1 = 4,06$ s não atingindo um máximo de intensidade de sinal com $T_{\text{sat}} < 7,5$ s.

Uma outra constatação importante foi que para **mistura 1** a percentagem de interação foi 2% menor para **(1)** e 3% menor para **(2)** quando comparadas à percentagem de interação desses compostos nas **misturas 2 e 3** nas quais não foram adicionados outros ligantes. Essa redução no efeito STD pela adição de outros candidatos a ligantes fornece fortes evidências de uma possível competição pela BSA entre os compostos **(1)** e **(2)**, como já havia sido observado por difusão.

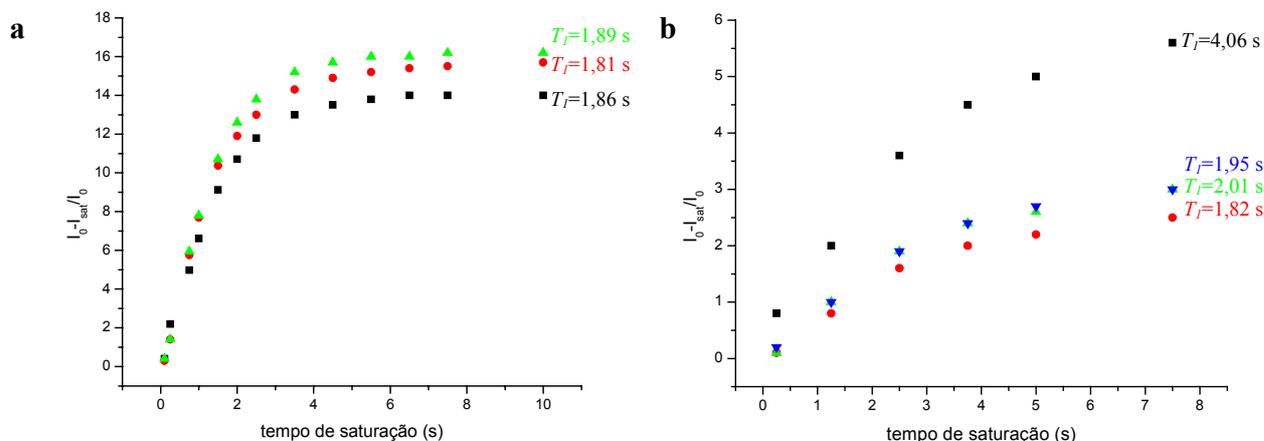


Figura 15. Gráfico do fator STD (%) versus o tempo de saturação (s) para **a) mistura 2** (ácido salicílico (1) e BSA)(▲ H-3,5, ● H-4, e ■ H-6) e **b) mistura 3** (caféina (2) e BSA) (■ H-8, ▲ CH₃-3, ▼ CH₃-1 e ● CH₃-9 de (2)). O tempo de relaxação longitudinal (T_1) para cada sinal na presença de BSA está apresentado no gráfico.

A **Figura 16a** mostra o espectro de STD da **mistura 1** e o mapa de epitopo de (1) e (2) na presença de 90 μM de BSA (razão molar proteína-ligante igual a ~ 122). Os dados apresentados no espectro são as intensidades relativas ao espectro de referência (STD controle) e obtidas a partir da Equação (4). O mapa de epitopo dos ligantes (1) e (2) foram obtidos pela normalização do sinal mais intenso de cada ligante para 100.

O espectro de STD da **mistura 1** mostrou que a BSA se ligou ao composto (1) através dos intensos sinais dos **H-6** (7,77 ppm), **H-4** (7,38 ppm) e **H-3,5** (6,87 ppm) com um fator STD de 12 a 14 % e ao composto (2), em menor proporção (1 a 2 %), através dos **H-8** (7,88 ppm), da **CH₃-9** (3,93 ppm), **CH₃-3** (3,50 ppm) e **CH₃-1** (3,33 ppm).

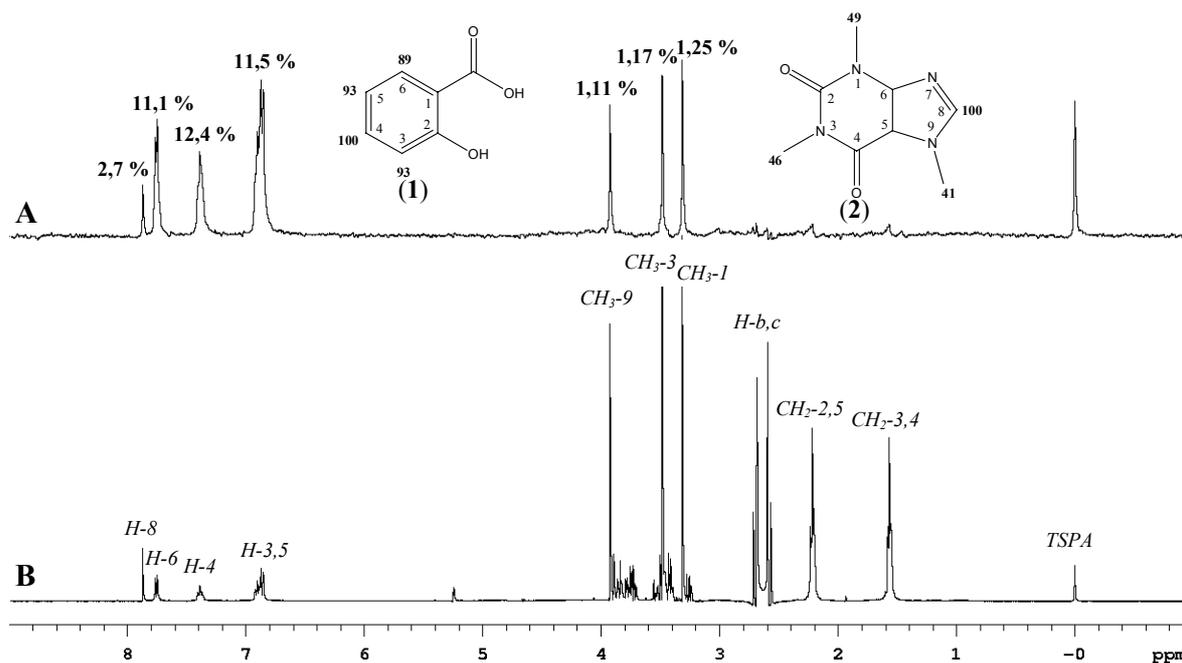


Figura 16. *a)* Espectro de STD e *b)* espectro de STD controle da **mistura 1** (ácido salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e D-glucose) na presença de 90 μM de BSA a 25 $^{\circ}\text{C}$. As intensidades relativas obtidas através do experimento de STD estão apresentadas em **negrito** sobre o espectro de STD e a atribuição de cada sinal está indicada em *itálico* sobre cada sinal no espectro de STD controle. Os números em **negrito** sobre as estruturas representam o mapa de epitopo.

Além disso, foram realizados experimentos de STD variando a concentração do composto **(1)** de 3,66 a 25,0 mM, com o intuito de determinar o efeito do excesso de ligante sobre as intensidades dos sinais, **Figuras 17a** e **17b**. Através da **Figura 17a** fica claro que a fração de ligante que é saturada é continuamente reduzida quando o excesso de ligante é aumentado. Da mesma forma, o gráfico do fator STD amplificado versus a concentração de **(1)**, **Figura 17b**, revela que a intensidade com que o sinal do **H-4** aumenta é maior a baixas concentrações de ligante e começa a diminuir a altas concentrações. Estes gráficos mostram claramente, que a

razão proteína ligante não pode ser aumentada indiscriminadamente existindo uma concentração ideal na qual a maior intensidade do sinal é alcançada.

Também foi possível, através do fator STD amplificado, quantificar a concentração de ligante “ativo”, permitindo uma estimativa da quantidade de proteína necessária para o experimento, por exemplo, quando o **H-4** apresentou um fator STD amplificado de 1,41 na presença de 90 μM de BSA, a concentração de ligante ativo foi de 127 μM .

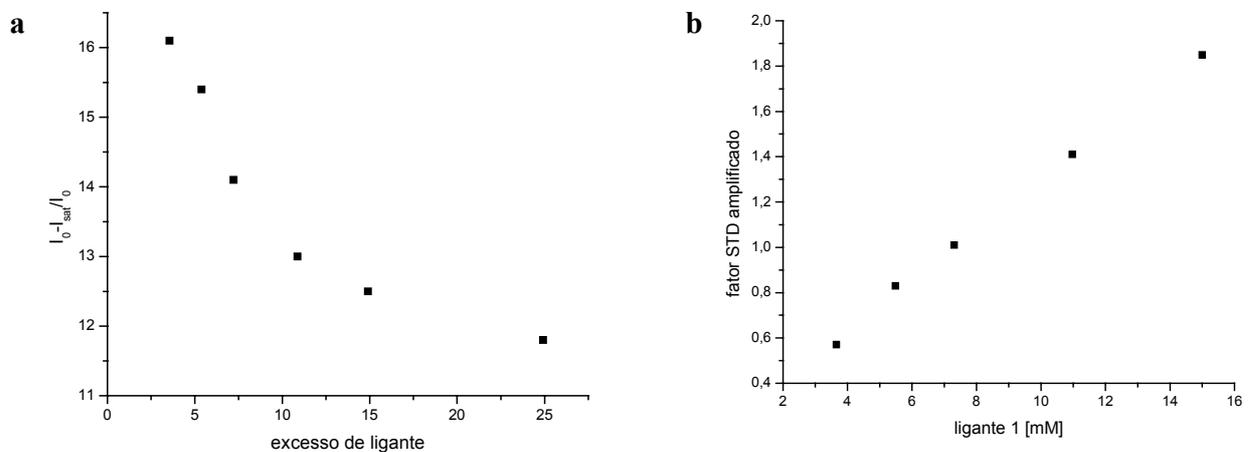


Figura 17. a) Gráfico mostrando a fração da intensidade do sinal do H-4 de (1) versus o excesso de ligante. A concentração de BSA utilizada foi de 90 μM e o tempo de saturação 2,5 s. **b)** Gráfico dos mesmos dados em termos do fator STD amplificado. Este segundo gráfico mostra, da mesma forma, que a fração do ligante que é saturada diminui a altas concentrações de excesso de ligante.

Os resultados obtidos na implementação da técnica de STD indicaram que este é um método rápido na triagem de ligantes na mistura e uma boa escolha na determinação do mapa de epítipo do ligante se os tempos de relaxação (T_1) individuais de seus hidrogênios forem similares.

Após a otimização dos parâmetros da sequência de pulsos STD, passou-se para otimização do experimento de WaterLOGSY. Para tanto foi utilizada a mesma amostra contendo 90 μM de BSA e **mistura 1** acrescida de 20 μL de H_2O , pois, não foi observado nenhum sinal no espectro quando o experimento foi realizado com 99,9 % de D_2O .

O tempo de mistura (τ_m) para este sistema variou de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 s. Com um τ_m de 0,1 s não se observou NOE positivo para nenhum componente da mistura, entretanto, observou-se NOEs negativos para os hidrogênios metílicos de **(2)**, **Figura 18b**, ou seja, com τ_m muito curtos este composto aparece como não complexado. Já com um τ_m de 0,3 s observou-se NOEs positivos para os hidrogênios aromáticos do ácido salicílico **(1)** em 7,77 ppm (**H-6**), 7,38 ppm (**H-4**) e 6,87 ppm (**H-3,5**) (**Figura 18a**), além de NOEs negativos para os compostos **(2)**, **(3)** e **(4)**. Com τ_m superiores a 0,5 s sinais positivos continuaram sendo observados para **(1)** e começaram a ser observados para os sinais em 7,88 ppm (**H-8**), 3,93 ppm (**CH₃-9**), 3,50 ppm (**CH₃-3**) e em 3,33 ppm (**CH₃-1**) da cafeína **(2)** indicando a interação destes com a BSA, enquanto que um NOE negativo em 2,86 e 2,76 ppm (**CH_{b,c}**) proveniente do ácido cítrico **(3)** e em 2,37 ppm (**CH₂-2,5**) e em 1,63 ppm (**CH₂-3,4**) proveniente do ácido adípico **(4)** indicou que estes compostos bem como a *D*-glucose (3,0 a 4,0 ppm) não interagem com esta proteína. Ao aumentar o τ_m para 0,8 e 1,0 s observou-se um incremento de sinal para os compostos **(1)** e **(2)** que interagem com a BSA o que não foi observado para os compostos **(3)** e **(4)** que não interagem com a BSA indicando que a transferência de magnetização, nesse caso, foi mais efetiva com τ_m maiores. A **Figura 18c** mostra o espectro total de WaterLOGSY para o sistema, obtido com um τ_m de 500 ms.

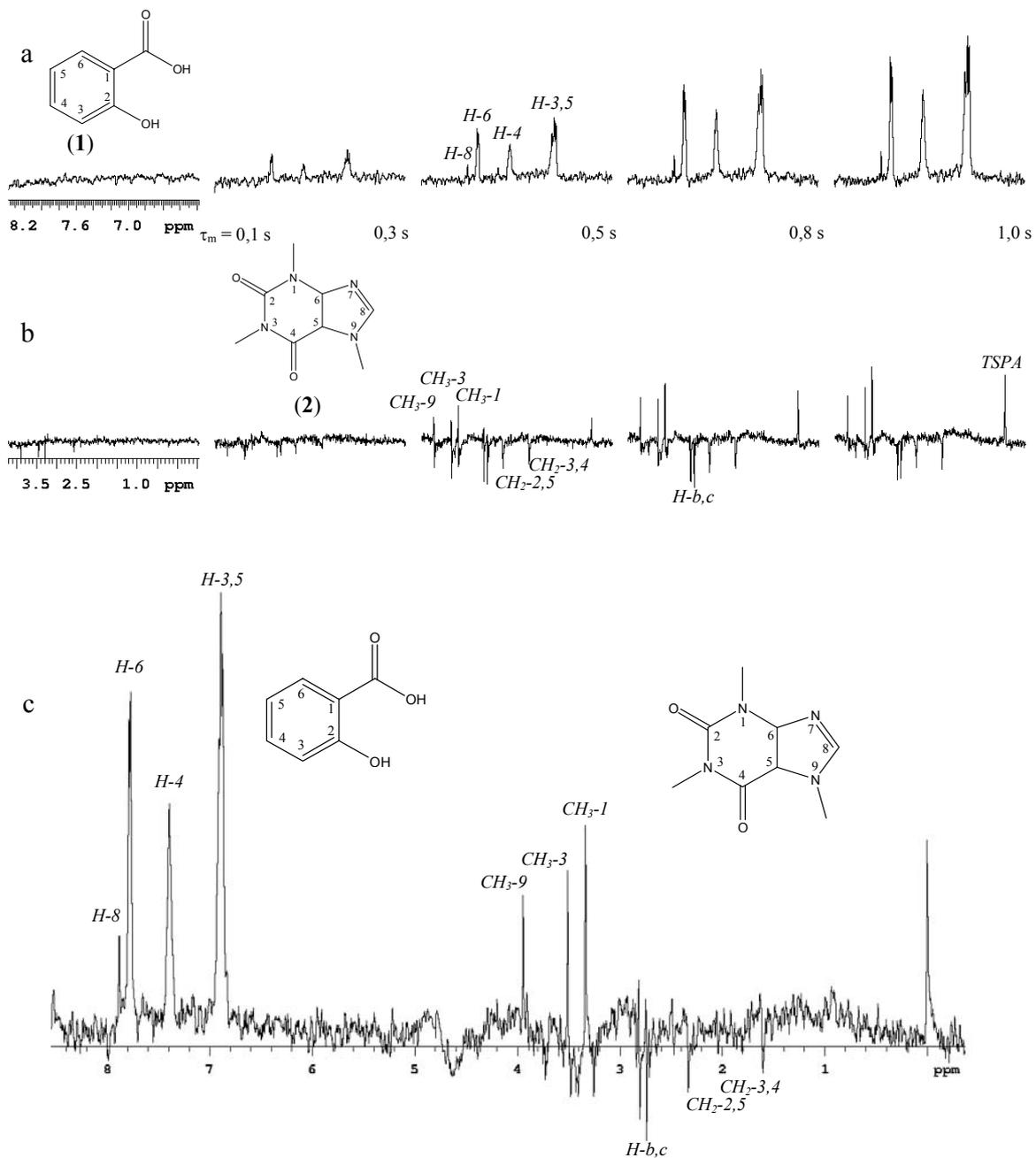


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (499,883 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1) 2,5 mmol L^{-1} ; de d_4 -TSPA) WaterLOGSY, da mistura 1 (ácido salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e D-glucose) acrescida de 90 μM de BSA variando o τ_m (0,1 a 1,0) s; **a)** região de 6,0 a 8,5 ppm e **b)** região de 0 a 4,0 ppm e **c)** espectro total obtido com $\tau_m = 0,5$ s.

Estes resultados confirmaram os resultados já obtidos por NOE pumping e STD e mostraram a eficiente aplicação da técnica de WaterLOGSY na separação de misturas para identificação de componentes ativos.

Em seguida, esta mesma amostra foi submetida a um experimento de DOSY-NOESY (**Figura 19a**) com o intuito de identificar quais os segmentos da proteína interagem com o ligante. Este experimento utiliza o efeito da difusão para melhorar o estudo de misturas complexas ou moléculas em equilíbrio dinâmico entre os estados livre e complexado.

Para calcular o valor da força de gradiente (g) apropriada para obter o plano de difusão do ácido salicílico (**1**), composto de interesse na mistura, fez-se um experimento de difusão usando a seqüência de pulsos DBPPSTE³⁴. Neste experimento de difusão variou-se o valor da magnitude do gradiente de 3,81 a 49,5 G.cm⁻¹ ou (0,038 a 0,495 T.m⁻¹). Com isso, obteve-se o decaimento dos sinais e os respectivos valores de difusão para os sinais de cada composto. De posse desses dados, fez-se um gráfico dos valores da força do gradiente (g^2) ao quadrado versus o logaritmo neperiano da intensidade ($\ln I$) de um determinado sinal fornece uma reta para cada composto, (**Figura 19b**). Fez-se uma regressão linear do decaimento do sinal do ácido salicílico (**1**) rendendo uma reta de equação $y = A_0 + B x$, em que A_0 é o valor da intensidade do sinal quando g^2 é igual a zero. De posse de todos parâmetros experimentais o valor de g pode ser calculado a partir da **Equação 8** que descreve o quanto à magnitude da “magnetização” foi afetada pela força do gradiente no experimento de DOSY;

$$\ln A = \ln A_0 - D_n \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) (\gamma g \delta)^2 \quad (8)$$

em que, γ é a razão magnetogirica, δ é o tempo do pulso de gradiente, g é o valor do gradiente na qual o composto de interesse apresenta maior amplitude de seu sinal e portanto seleciona o plano de difusão deste composto, D_n é o coeficiente de difusão da espécie n , Δ é o tempo de difusão entre os gradientes de pulso, A_0 é a amplitude do sinal na ausência de gradiente de campo, A é a amplitude do sinal resultante sob a influência de gradiente de campo. O valor de g obtido a partir da **Equação (8)** é dividido pelo g_{cal} da sonda utilizada, rendendo o valor do parâmetro (g_{zlv11}) a ser utilizado no experimento de DOSY-NOESY.

Na seqüência NOESY foi necessário calibrar o tempo de mistura em 300 ms e adquirir espectros com fase 1,2. No plano de NOESY com coeficiente de difusão de $5,91 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, obtido por DOSY-NOESY, foram observadas correlações entre os hidrogênios **H-6** e **H-3,5** do ácido salicílico (**1**) e a BSA. Já o hidrogênio **H-4** apresentou uma fraca correlação com a BSA.

Dessa forma foi possível sugerir de acordo com a literatura³⁵, que a BSA interage com o ácido salicílico (**1**) na região alifática da proteína, ou seja, de 0,90 a 1,40 ppm região dos hidrogênios metílicos de todos aminoácidos, de 1,60 a 3,30 ppm (H_β e CH alifáticos) e na região de 3,90 a 4,80 ppm (H_α e H_β dos aminoácidos serina e treonina). Entretanto, com um τ_m de 300 ms espera-se uma difusão de spin na albumina, tornando impossível evidenciar mais precisamente sobre os grupos da albumina que fazem parte do epitopo. Portanto, experimentos com τ_m menores serão realizados, futuramente, para observar regiões específicas da proteína que participam da interação

³⁵ Wuthrich, K.; *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, 1986, John Wiley & Sons.

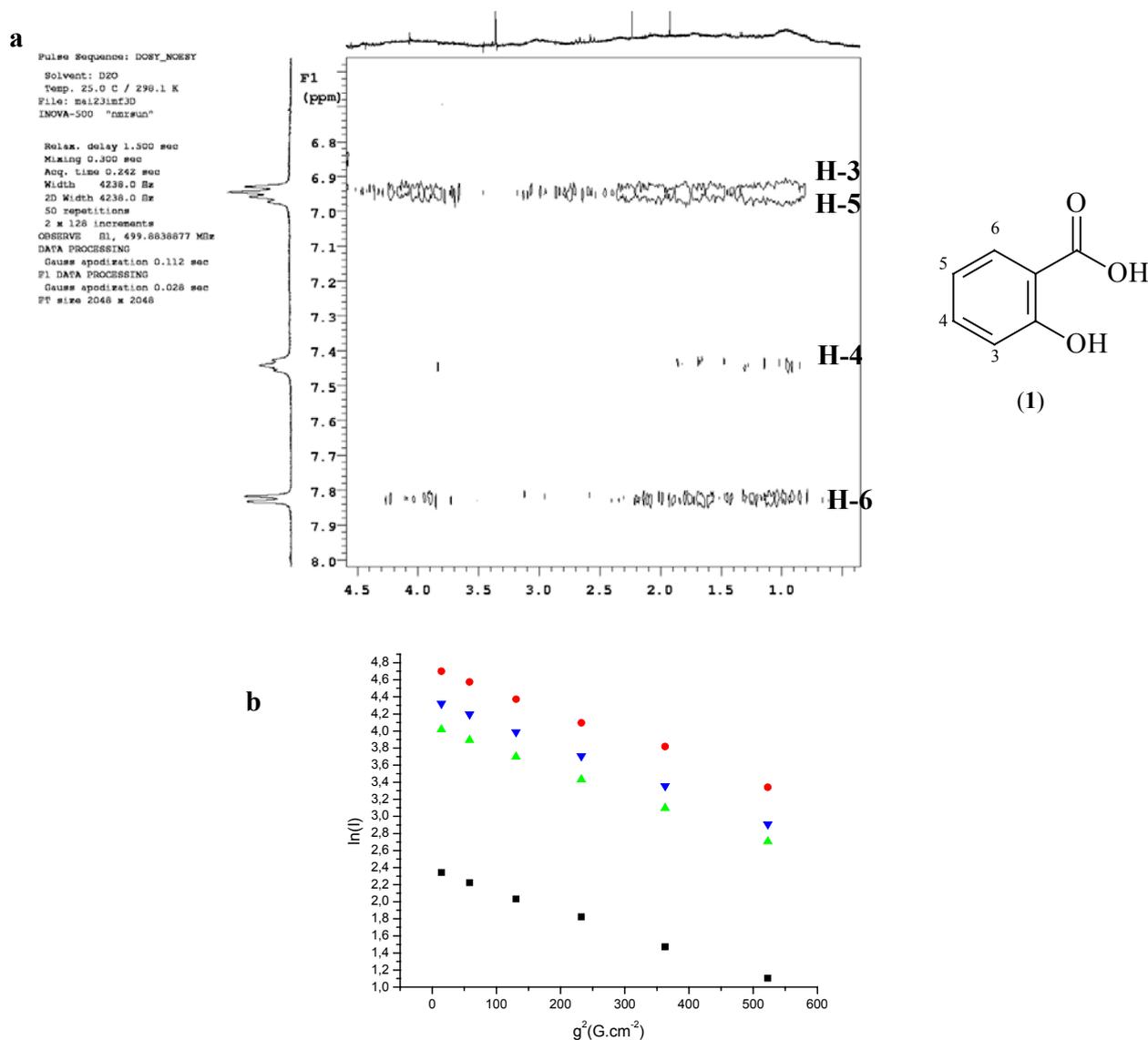


Figura 19. a) Mapa de contorno de DOSY-NOESY da **mistura 1** (ácido salicílico, cafeína, ácido cítrico, ácido adipico e D-glucose) acrescida de 90 μM de BSA a 25°C, o plano de NOESY foi obtido com valor da força de gradiente de 5,15 $\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($0,00515 \text{ T}\cdot\text{m}^{-1}$) ($gzlvl=1350$). A expansão do espectro mostra a interação do ácido salicílico com a BSA com atribuição dos hidrogênios. Os sinais da proteína encontram-se na primeira dimensão (F2) e os sinais dos ligantes na segunda dimensão (F1). **b)** Gráfico da força do gradiente ao quadrado versus o logaritmo neperiano da intensidade dos sinais ● (CH_3 -9) de (2), ▼ (CH_2 -2,5) de (4), ▲ (CH_2 -b,c) de (3) e ■ (H-4) de (1).

Um resultado curioso foi o **H-4** do ácido salicílico (**1**) ser o ponto que apresentou menor interação com a proteína através do experimento de DOSY-NOESY, conflitando com o resultado obtido através do experimento de STD, o qual indicou ser o **H-4** o ponto de maior interação. Como não existem outros exemplos na literatura será necessário realizar uma série de experimentos com outros sistemas para averiguar a origem da discrepância.

Dentre as técnicas implementadas, a técnica de STD é a mais completa fornecendo, além dos compostos ativos na mistura, o epitopo dos ligantes e sugerindo uma possível competição entre estes pela BSA. Além disso, esta técnica permite também calcular a quantidade de ligante ativo na mistura através do fator STD amplificado.

Entretanto, de maneira geral, os resultados obtidos para o sistema BSA ligantes indicaram que os experimentos de difusão, STD, WaterLOGSY, NOE pumping e DOSY-NOESY são técnicas de triagem eficientes para identificação de compostos ativos que se ligam a alvos macromoleculares numa escala de K_d entre 10^{-3} e 10^{-8} M.

De posse desses resultados passou-se para a aplicação dessas técnicas na investigação dos mecanismos de interação entre uma chaperone, seus cofatores (ATP e ADP) e um polipeptídeo, como será mostrado a seguir.

2.2 Aplicação das técnicas de *tr*NOE ao sistema Hsp70/ligantes

As chaperones foram descritas inicialmente como proteínas de choque-térmico ou “*heat shock proteins*” (Hsp), por apresentarem sua síntese induzida em células submetidas a condições de estresse ou durante o desenvolvimento de doenças. As chaperones apresentam afinidade por seqüências inespecíficas de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na superfície dos polipeptídeos não-enovelados. Além de auxiliar o enovelamento protéico, as chaperones também participam do transporte de polipeptídeos recém sintetizados através de membranas para outras organelas, previnem o processo de agregação protéica e interações não desejadas durante o enovelamento e atuam como marcadores para proteólise de agregados protéicos. Algumas chaperones são capazes de promover a dissolução de agregados protéicos formados no meio intracelular.

Mais de vinte famílias de chaperones já foram descritas em procariontes e eucariontes e suas classificações são feitas com base nas suas massas moleculares³⁶. A **Tabela 3** relaciona as principais famílias descritas e algumas de suas características mais importantes.

³⁶ Cowan, N. J.; Lewis, S. A.; *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 990-991.

Tabela 3. Sumário das principais classes de chaperones descritas, suas co-chaperones, suas principais características, massa molecular aproximada (kDa) e organismos nos quais estão presentes

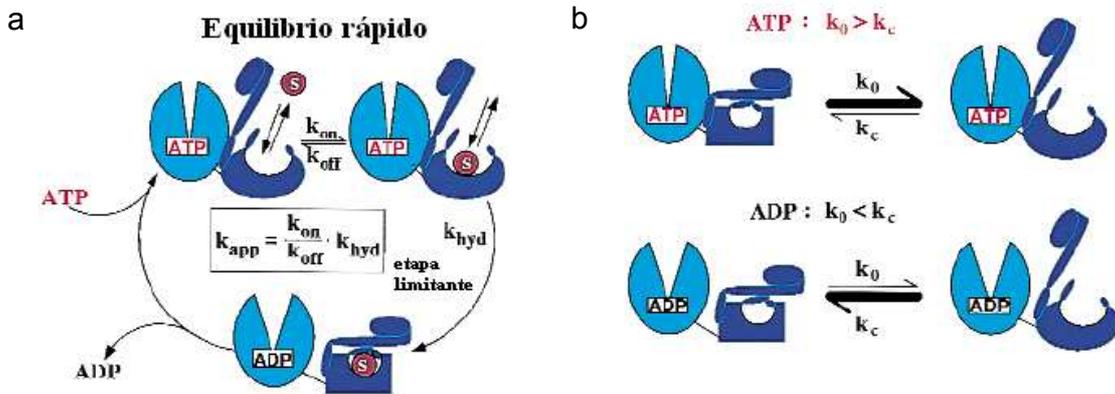
Chaperone	Co-chaperone	MM (kDa)	Características
Hsp100	?	~ 100	Atividade ATPásica; atua na dissociação de agregados, facilita proteólise; essencial para termotolerância em leveduras e plantas.
Hsp90	Hsp70, foldases e Hsp40	~ 90	Estabiliza proteínas para o processo de enovelamento; mais abundante proteína não ribossomal e do reticulo endoplasmático; previne agregação protéica e possui atividade ATPásica.
Hsp70 (DnaK)	Hsp40 (DnaJ/GrpE)	~ 70/~ 40/~ 20	Atividade ATPásica; estabiliza outras proteínas para o enovelamento, transporta proteínas através de membranas e para proteólise; possui homologas nas mitocôndrias e cloroplastos; previne a agregação protéica
Hsp60	Hsp10	~ 60/~ 10	Atividade ATPásica; promove eficientes enovelamentos protéicos; previne agregação protéica; encontrada principalmente na mitocôndria e cloroplastos de eucariotos; possuem homólogos no citoplasma
Hsp pequenas	?	~ 15 a 30	Bloqueia agregação protéica de maneira dependente da temperatura; está envolvida com a regulação de polimerização/dissolução da actina, não apresentam atividade ATPásica, formam complexos oligoméricos de 200 a 800 kDa

A família Hsp70 pode ser encontrada no citoplasma, retículo endoplasmático, mitocôndria e cloroplasto. Devido a grande capacidade de interagir com regiões hidrofóbicas de outras proteínas, a Hsp70 desempenha um importante papel no processo de enovelamento, degradação, translocação de polipeptídeos por membranas e dissolução de agregados. Também apresentam a característica de participarem em sistemas de cooperação com outras famílias de chaperones como Hsp60, Hsp90 e Hsp104. O estado de alta e baixa afinidade por substratos é regulado pela presença de nucleotídeos de adenina.

A Hsp70 é composta por um domínio N-terminal de 45 kDa de ligação de nucleotídeos (NBD) que possui atividade ATPásica e um domínio C-terminal de 25 kDa de ligação de substratos (SBD) que apresenta sítios de ligação para substratos, este último pode ser dividido em dois subdomínios, um β -sandwich de 15kDa e um α -helicoidal. Existem modelos cristalinos destes dois domínios, mas não é muito bem entendido como eles interagem.

A afinidade das Hsp70 por seus substratos é regulada pela presença de ADP num estado de alta afinidade ou ATP num estado de baixa afinidade no NBD. Esse domínio pode ser subdividido em dois subdomínios (NBD1 e NBD2) e funciona uma concha a qual os nucleotídeos se ligam dentro. O domínio SBD possui um sítio de ligação a substrato (resíduos de aminoácidos hidrofóbicos) constituídos principalmente de estrutura secundária de folha β (SBD1) e uma longa α hélice que funciona como uma “tampa” (SBD2) capaz de fechar-se sobre o substrato. Na ausência de nucleotídeos existe um equilíbrio da SBD2 nas conformações aberta e fechada sobre o substrato. A presença de ADP no SBD provoca uma mudança conformacional neste, sendo transmitida para o SBD e deslocando o equilíbrio para conformação fechada do SBD2. O ATP induziria um efeito inverso, ou seja, o ATP desloca o equilíbrio SBD2 para conformação aberta.

O mecanismo de ação das Hsp70 ocorre diretamente em função da ligação de ATP num estado de baixa afinidade, seguido pela hidrólise do ATP a ADP+P_i (P_i = fosfato) e ligação do ADP com alta afinidade a Hsp70³⁷ (**Esquema 5**).



Esquema 5. Modelo de interação das chaperonas Hsp70 com substratos³⁷: **a)** interação inicial do substrato com DnaK na conformação aberta o que determina a eficiência da interação do substrato; **b)** estados ATP e ADP complexados somente diferenciam a frequência de transição entre uma conformação aberta e fechada.

De modo geral, as Hsp70 interagem sem especificidade com muitas proteínas não enoveladas ou enoveladas, porém sua interação com as co-chaperonas pode ser um fator responsável pela regulação da afinidade por substratos. A Hsp40 além de aumentar a atividade ATPásica da Hsp70, também pode transportar substratos para Hsp70, fato que modula a atividade e especificidade da Hsp70. A GrpE pode interagir com NBD para promover a troca ADP-ATP e acredita-se que sua interação com o SBD poderia provocar o desligamento de substratos.

³⁷ Bukau, B.; Mayer, M. P. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, 62, 670-684.

Com o intuito de verificar a aplicação das técnicas anteriormente implementadas (STD, WaterLOGSY e NOE pumping) no mapeamento das interações supramoleculares e a possível contribuição destas técnicas para um melhor entendimento dos mecanismos de interação foi utilizado um sistema de Hsp70 com seus cofatores (ATP/ADP) e um polipeptídeo, a fim de aplicá-los na prevenção de processos de agregação protéica.

2.2.1 Resultados da Interação da Hsp70 e substratos por RMN

Nesta investigação foi realizada a atribuição de todos os sinais do ATP (6) e ADP (7) em 99,9 % de D₂O, através de técnicas de RMN de 1 e 2D, como mostrado na **Figura 20**.

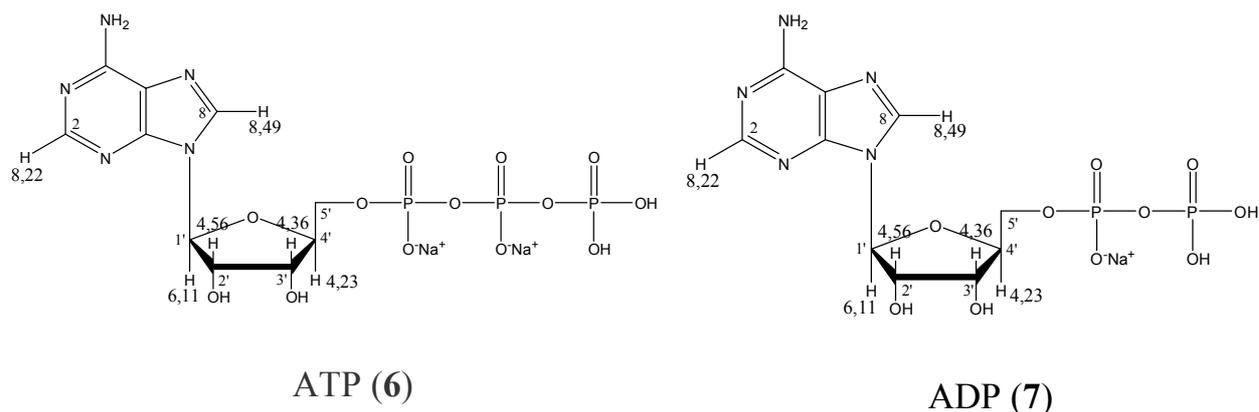


Figura 20. Os números sobre as estruturas abaixo representam os δ_H dos respectivos sinais do ATP (6) e ADP (7).

A Hsp70 liofilizada (apresentou conformação igual à proteína na forma nativa comprovado por dicroísmo circular) foi ressuspensa em 1,2 mL de 99,9% de D₂O, sem tamponar o meio, de forma que a concentração final da proteína, determinada por UV, fosse de 10 μ M. A uma alíquota de 600 μ L dessa solução adicionou-se ATP e a outra alíquota de mesmo volume ADP em concentrações finais de 1 mM.

Inicialmente, foi realizado um experimento de difusão (*DBBPSTE*³⁴) a fim de determinar valores dos coeficientes de difusão para o ATP e o ADP livres (**Figura 21a** e **21b**) e complexados à Hsp70, respectivamente. Além de indicar qual a amplitude de gradiente necessária para cancelar seus sinais.

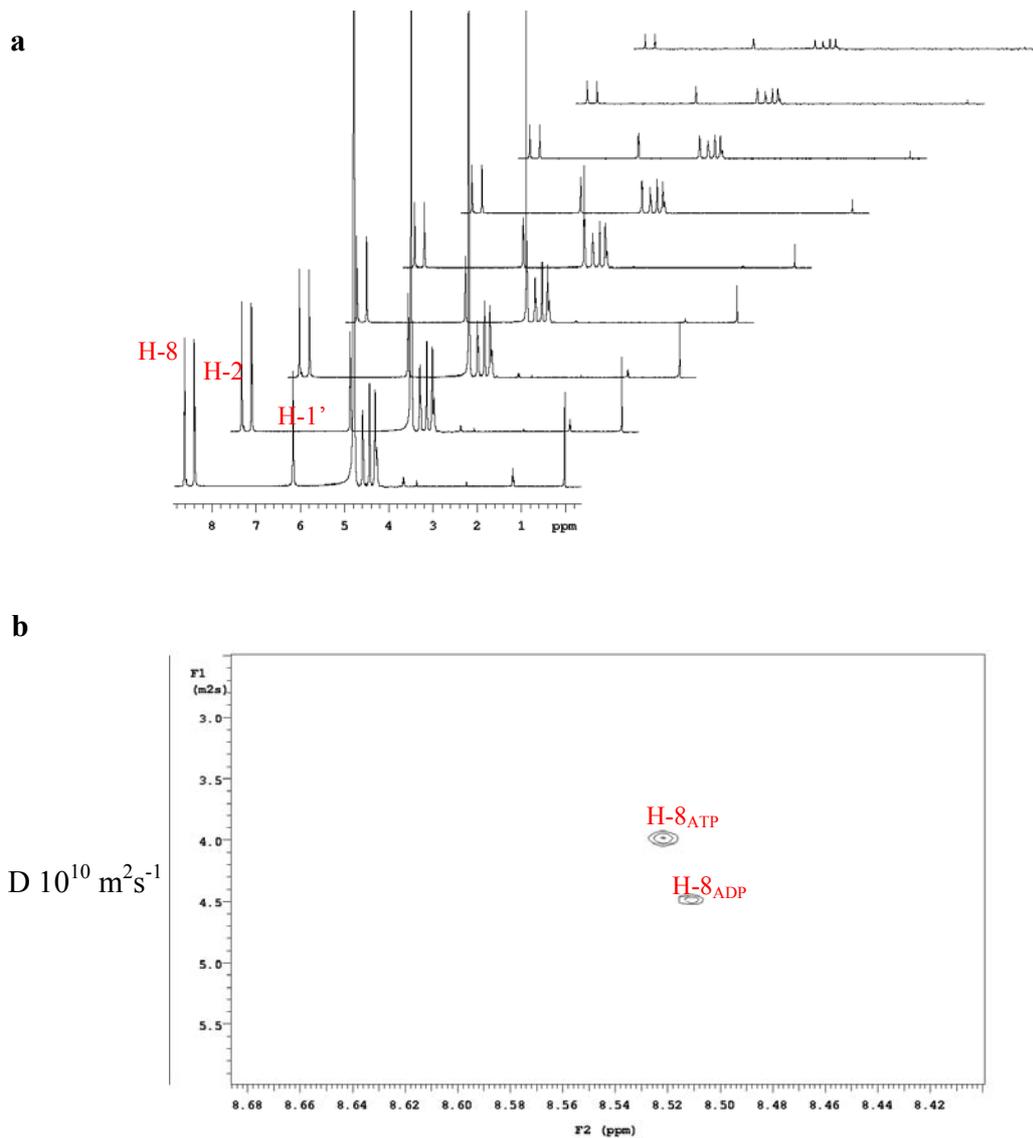


Figura 21. a) Decaimento exponencial da intensidade dos espectros de ATP/ADP (2:1) com a variação das amplitudes dos gradientes de 3,81 a 38,1 $G \cdot cm^{-1}$ (499,883 MHz, D_2O , 2,5 $mmol L^{-1}$ de d_4 -TSPA) de baixo para cima e **b)** Espectro de DOSY dos sinais em 8,51 e 8,52 ppm (499,883 MHz, D_2O , 2,5 $mmol L^{-1}$; de d_4 -TSPA).

A simples comparação entre os coeficientes de difusão do ATP e do ADP na mistura tanto na ausência [$(D_{\text{ATP}} = 3,99 \pm 0,02 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$ e $(D_{\text{ADP}} = 4,25 \pm 0,03 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$] como na presença de Hsp70 [$(D_{\text{ATP}} = 3,14 \pm 0,03 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$ e $(D_{\text{ADP}} = 3,35 \pm 0,04 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$] já pode ser um indicativo de interação, contudo, acredita-se que esta medida não fornece resultados muito confiáveis, devido à dificuldade em separar os sinais dos dois compostos, portanto, passou-se para otimização do experimento de STD para este sistema.

Otimizados os parâmetros experimentais para o experimento de STD, foram conduzidos três experimentos de RMN de 1D, um saturando o sinal da água (PRESAT) o qual forneceu o espectro de hidrogênio completo da mistura (**Figura 22a**), outro de STD controle (**Figura 22b**) e outro de STD (**Figura 22c**), neste último a proteína foi irradiada em 0,12 ppm durante 2,50 s tanto para mistura de Hsp70 e ADP (1:100) como para a mistura de Hsp70 e ATP (1:100), como mostrado nas **Figuras 22c e 23b**, respectivamente.

Além disso, para descartar resultados falsos positivos foi feito um espectro de STD do ADP puro, em que não foi observado nenhum sinal, indicando que todos os sinais presentes no espectro da mistura são resultantes da transferência de magnetização da proteína para o ligante.

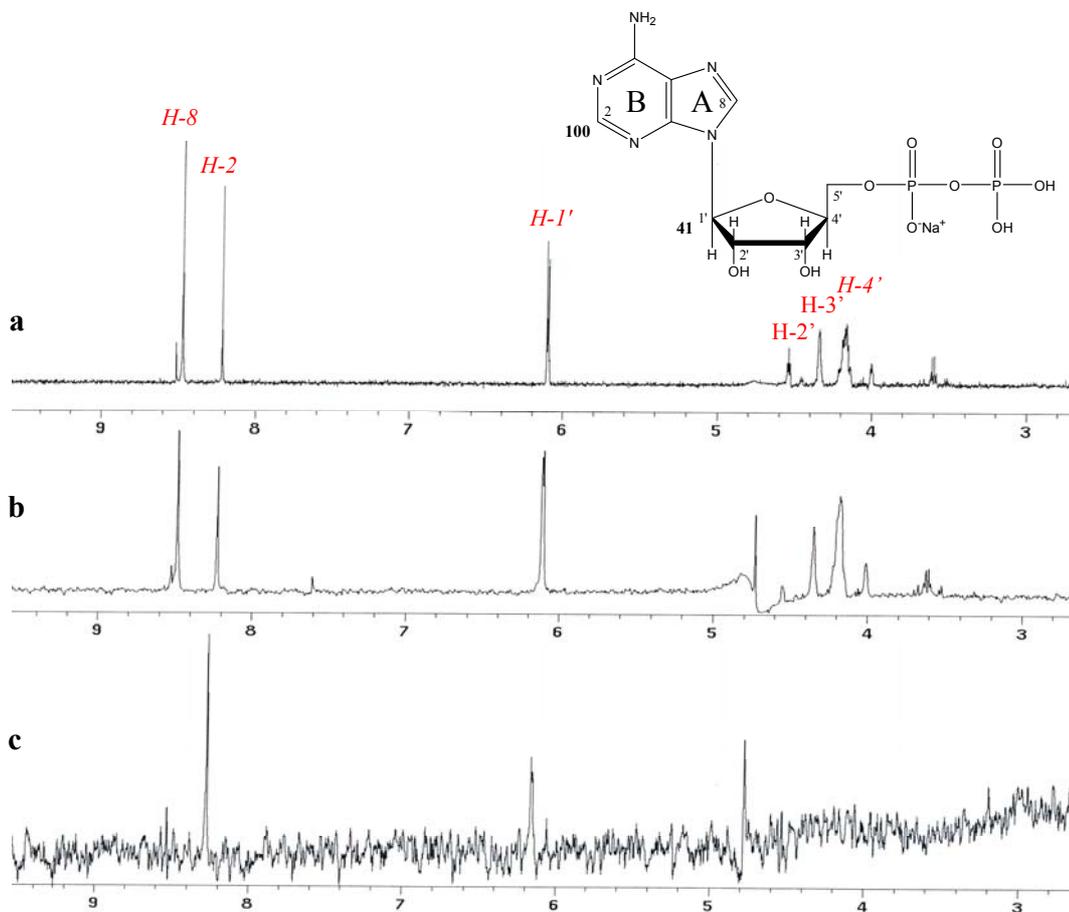


Figura 22. Espectros de RMN de ¹H região 3,0 a 9,5 ppm (499,99 MHz, 99,9 % D₂O) da Hsp70/ADP (1:100), **a)** PRESAT com nt=16, **b)** STD-control com nt=432 e **c)** STD com nt=864. Os números em negrito sobre as estruturas representam o mapa de epitopo.

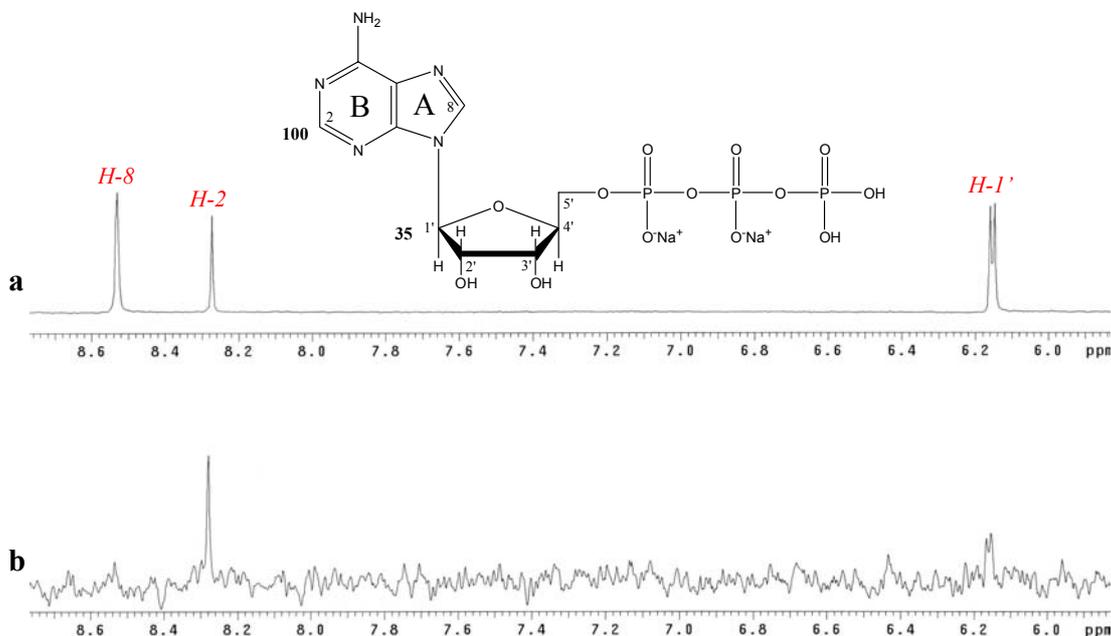


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H região 6,0 a 8,7 ppm (499,99 MHz, 99,9 % D_2O) da Hsp70/ATP (1:100), **a)** STD-control com $nt=432$ e **b)** STD com $nt=864$. Os números em negrito sobre as estruturas representam o mapa de epitopo.

A comparação dos espectros de STD, ilustrados nas **Figuras 22c** e **23b**, mostrou que tanto para mistura Hsp70/ADP como para mistura Hsp70/ATP apenas os hidrogênios **H-2** (8,28 ppm) da porção adenosina e **H-1'** (6,15 ppm) anomérico de (6) e de (7) interagiram diretamente com a proteína.

Além disso, foi adquirido um espectro de STD da amostra de Hsp70/ADP acrescida de 2,0 mM de ATP, com o intuito de obter informações sobre o mecanismo de competição entre estas espécies em solução. Entretanto, não foi possível distinguir os sinais do ATP daqueles do ADP, logo, este experimento isolado não forneceu nenhuma informação sobre o equilíbrio entre estas espécies.

Devido aos diferentes números de mol de ligantes utilizados para as misturas Hsp70/ADP, Hsp70/ATP e Hsp70/ADP/2ATP foram calculados os valores do *fator STD amplificado* para os experimentos realizados como apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Fator STD amplificado para os hidrogênios H-2 e H-1' para as misturas de Hsp70 (ADP/ATP) sem tampão

	Hsp70+ADP	Hsp70+ATP	Hsp70+ADP+2ATP
H-2	0,21 %	0,14 %	0,40 %
H-1'anomérico	0,08 %	0,05 %	0,16 %

Esses valores indicaram que na ausência de tampão a Hsp70 interagiu com o ADP numa proporção maior do que com ATP e a adição de 2,0 mM de ATP a mistura de Hsp70/ADP aumentou a proporção de interação sugerindo que o aumento da concentração de ligante pode deslocar o equilíbrio para forma complexada.

Os fatores STD obtidos para os **H-2** e **H-1'** da mistura Hsp70/ATP e Hsp70/ATP/ADP na ausência de tampão foram comparados com os resultados obtidos para essas mesmas misturas na presença de 20 mM de tampão fosfato (pH = 6,9), ou seja, na presença de 20 mM de P_i , **Tabela 5**.

Tabela 5. Comparação do Fator STD para os hidrogênios H-2 e H-1' para as misturas de Hsp70 (ADP/ATP) na presença e na ausência de P_i

	Hsp70+ADP+ATP (na presença P_i)	Hsp70+ADP+ATP (na ausência P_i)	Hsp70+ATP (na presença P_i)	Hsp70+ATP (na ausência P_i)
H-2	1,33 %	1,90 %	1,39 %	2,60 %
H-1'	0,55 %	0,47 %	0,49 %	0,75 %

Os resultados indicaram que a presença de P_i diminui a interação tanto do ATP como da mistura ADP/ATP com a Hsp70, ou seja, a presença de P_i , aumenta a constante de dissociação do ATP provocando uma diminuição da população complexada e conseqüentemente uma diminuição da intensidade do sinal no experimento de STD.

Além desses experimentos na ausência de tampão e com tampão fosfato também foram realizados experimentos de STD com a mistura Hsp70/ADP na presença de tampão tris-HCl (pH=8,0). Esses experimentos foram realizados variando o número de ciclos em 50 e 75 e a posição de irradiação entre 0,19; 0,59 e -0,15 ppm. Os resultados mostraram que para a irradiação da proteína em 0,59 ppm, a percentagem de interação foi maior se comparado às posições 0,19 e -0,15 ppm indicando que este ponto se localiza mais próximo ao sítio ativo, tornando a transferência de magnetização para o ADP mais efetiva, **Tabela 6**.

Tabela 6. Fator STD para os hidrogênios H-2 e H-1' para a mistura de ADP e Hsp70 (tampão tris-HCl, pH=8,0) variando a posição de irradiação e o número de ciclos

	Irradiação em -0,15 ppm		Irradiação em 0,19 ppm		Irradiação em 0,59 ppm	
	nº ciclos	nº ciclos	nº ciclos	nº ciclos	nº ciclos	nº ciclos
	50	75	50	75	50	75
H-2	1,0 %	1,2 %	1,2 %	1,5 %	21 %	5,3 %
H-1'	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,6 %	17 %	5,4 %

Foram obtidos espectros de STD para mistura de Hsp70/ATP irradiando-se a proteína em 0,59 ppm e variando-se o número de ciclos em 25, 50, 75, 100, 150 e 200, como mostrado na **Tabela 7**. Esses resultados sugerem que nessas condições o ADP se liga a Hsp70 cerca de 17 % mais que o ATP.

Tabela 7. Fator STD para os hidrogênios H-2 e H-1' para a mistura de ATP e Hsp70 (tampão tris-HCl, pH=8,0) irradiando em 0,59 ppm e variando o número de ciclos

	nº ciclos					
	25	50	75	100	150	200
H-2	3,2 %	4,2 %	2,4 %	2,0 %	2,2 %	2,3 %
H-1'	0,7 %	1,2 %	1,1 %	0,8 %	0,9 %	0,8 %

Com isso, foi possível observar que em qualquer condição a Hsp70 interage mais com o ADP que com ATP, como já havia sido reportado por Mayer *et. al.*³⁸, fato este que pode ser explicado através do ciclo ATPase da Hsp70 que consiste numa alternância entre o estado ATP-complexado com baixa afinidade e rápidas velocidades de troca com substrato e um estado ADP-complexado com alta afinidade e baixas velocidades de troca com o substrato, **Esquema 5**.

Além disso, as mudanças nas condições de pH das misturas indicaram que em pH = 8,0 (tampão Tris-HCl) as interações entre Hsp70 e seus substratos são maiores indicando que este pH favorece as interações.

A necessidade de íons metálicos para estrutura e função das cinases é complexa e não está bem estabelecido o quanto esses íons podem contribuir para regulação de suas atividades³⁹. As cinases necessitam de Mg²⁺ para transferir o fosfato- γ do ATP para os substratos contendo serina ou treonina e de Mn²⁺ para os substratos contendo tirosina. Por esta razão, a mistura de Hsp70 e ATP foi avaliada na presença de Mg²⁺ esperando que este cátion aumentasse a proporção de ligação do ATP, entretanto isso não foi observado, (**Tabela 8**). Isso pode ser atribuído a uma

³⁸ Bukau, B.; Laufen, T.; Paal, K.; Rudger, S.; Schroder, H.; Mayer, M. P.; *Nature*, **2000**, 7, 586-593.

³⁹ Taylor, S. S.; Cox, S.; Doyle, M. L.; Herberg, F. W.; *Biochem.* **1999**, 38, 6352-6360.

concentração inadequada de íons metálicos inibindo a atividade de cinase dessas proteínas.

Tabela 8. Fator STD para os hidrogênios H-2 e H-1' para a mistura ATP e Hsp70 (tampão tris-HCl, pH=8,0) na presença de MgCl₂ irradiando em 0,59 ppm e variando o número de ciclos

	nº ciclos 50	nº ciclos 75	nº ciclos 100
H-2	0,3 %	0,3 %	0,3 %
H-1'	0,1 %	0,1 %	0,1 %

Além disso, visando mapear o epitopo do ATP/ADP do ponto de vista das moléculas de água no sítio ativo foi realizado um experimento de WaterLOGSY, para mistura Hsp70/ADP (**Figura 24**) e Hsp70/ATP sem tampão e com tempo de mistura (τ_m) otimizado em 500 ms.

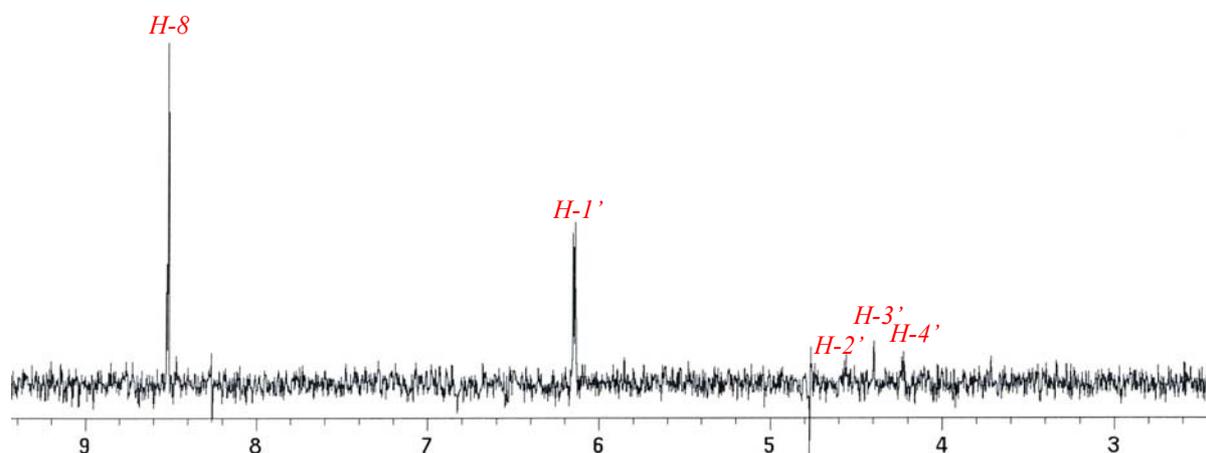
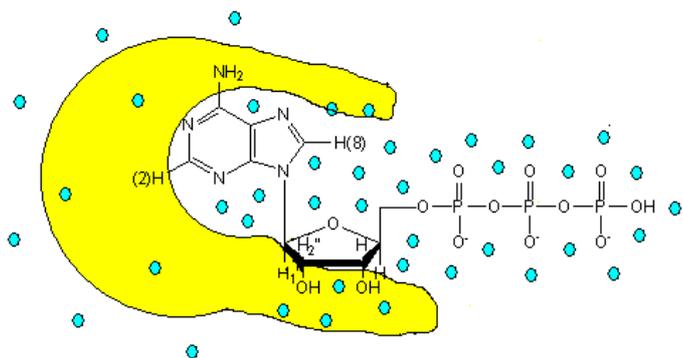


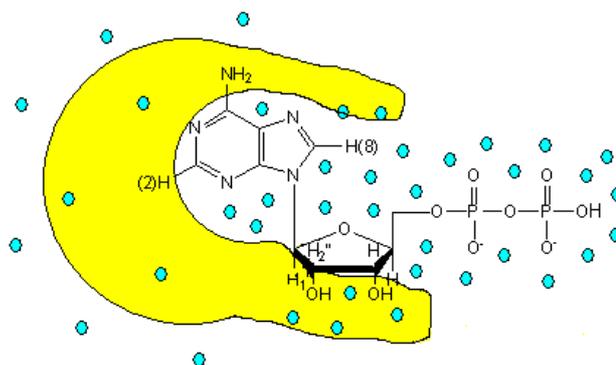
Figura 24. Espectro de RMN de ¹H WaterLOGSY (499,99 MHz, D₂O/H₂O (9:1)) da Hsp70 (10 µM) na presença de ADP (1,0 mM) com nt = 256.

A análise do espectro de WaterLOGSY (**Figura 24**) mostrou a interação entre a Hsp70 e o ADP através dos sinais do **H-8** (8,52 ppm) da porção adenosina, do **H-1'** (6,15 ppm) anomérico e dos hidrogênios (**H-2'**, **H-3'** e **H-4'**) da ribose, indicando a participação destes na interação, da mesma forma para mistura Hsp70/ATP.

A comparação dos resultados obtidos por STD e WaterLOGSY indicou claramente que o sítio ativo da Hsp70 que interage com ADP e ATP possui dois domínios, um que é hidrofóbico e aloja o **H-2** e **H-1'**, o qual apresentou 100 % de interação no experimento de STD, e outro domínio mais hidrofílico, onde estão alojados o **H-8** e a ribose **H-2'**, **H-3'** e **H-4'**, os quais apresentaram interação no experimento de WaterLOGSY. A partir destes resultados foi possível propor um esquema de interação entre a Hsp70 e os substratos (6) e (7), como ilustrado no **Esquema 6**.



ATP (6)



ADP (7)

Esquema 6. Interação hipotética da Hsp70 (em amarelo) com os ligantes ATP (6) e ADP (7) através da porção hidrofóbica obtida por STD (H-2 e H-1') e hidrofílica obtida por WaterLOGSY (H-8, H-2' e H-3'), em azul moléculas de águas.

A fim de confirmar os resultados obtidos através de STD e WaterLOGSY otimizou-se o experimento de NOE pumping para o sistema Hsp70/ATP.

Realizou-se o estudo independente da relação Hsp70/ATP utilizando uma amplitude de gradiente de $38,11 \text{ G.cm}^{-1}$ ou $(0,00381 \text{ T.m}^{-1})$ um tempo de difusão de 150 ms e variando os tempos de mistura entre 0,4 e 0,6 s.

No espectro de NOE pumping da mistura Hsp70/ATP (1:100), (**Figura 25**), observou-se tanto para um τ_m de 400 ms como de 600 ms correlações positivas com os hidrogênios **H-8** (8,52 ppm), **H-2** (8,26 ppm) e **H-1''** (6,14 ppm) do ATP.

Os resultados obtidos por NOE pumping confirmaram a interação entre Hsp70 e o ATP, como já havia sido observado por STD e WaterLOGSY.

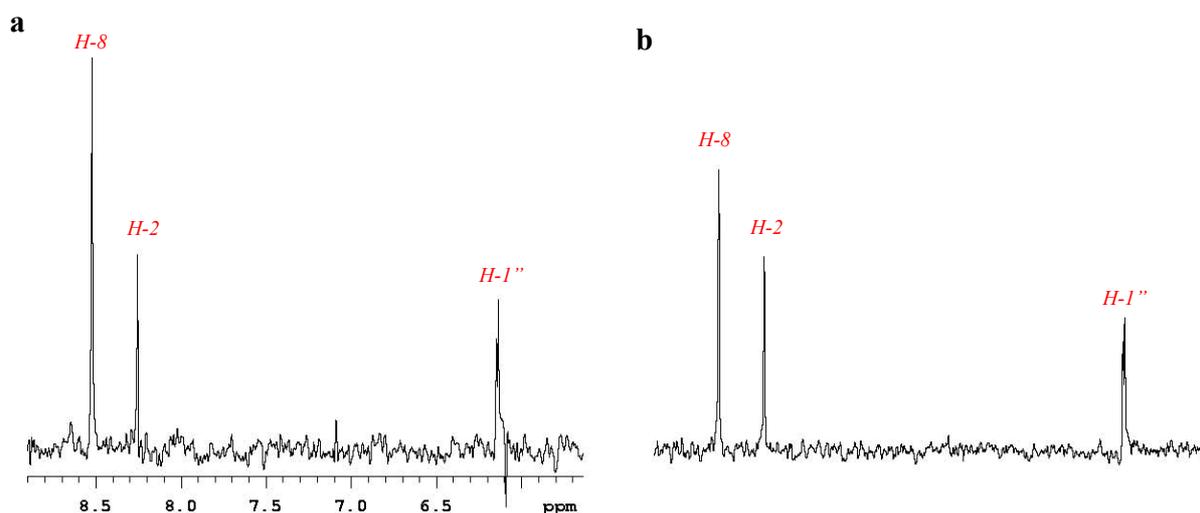


Figura 25. Expansão da região de 3,0 a 9,0 ppm do espectro de NOE pumping (499,883 MHz, D_2O , $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$; de d_4 -TSPA a 25°C) da mistura Hsp70/ATP (1:100) com $T = 150 \text{ ms}$ e variando tempo de mistura **a)** 400 ms e **b)** 600 ms.

A maior interação Hsp70/ADP do que Hsp70/ATP comprovada por técnicas mais recentes de RMN está alinhada com os dados da literatura⁴⁰, e confirmaram o nosso domínio das técnicas espectroscópicas para elucidar interações entre

⁴⁰ Mayer, M. P. *Nature Struc. Mol. Biol.*, **2004**, *11*(1), 6-8.

proteínas e ligantes, técnicas estas nunca antes aplicadas a este sistema. Como a Hsp70 é uma Chaperone cuja atividade repousa numa interação lábil com um polipeptídeo pequeno controlada por ATP^{37,38}, ampliamos nossos experimentos para evidenciar sua associação a **Angiotensina 2** (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), um polipeptídeo com um grupo fosforilável na posição 4.

Inicialmente, foi realizada a atribuição dos sinais de ¹H da **Angiotensina 2** com base em experimentos de RMN de ¹H (**Figura 26, 27, 28 e 29**), H,H-COSY (**Figuras 30, 31, 32, 33 e 34**) e comparação com a literatura³⁵. Os espectros foram realizados em deuterometanol. Vale ressaltar que os deslocamentos químicos da **Angiotensina 2** em deuterometanol e em água deuterada são semelhantes porém em deuterometanol os sinais são mais bem resolvidos.

No espectro de RMN de ¹H da **Angiotensina 2** (**Figura 26**) e nas suas expansões (**Figura 27, 28 e 29**) estão assinalados os deslocamentos químicos dos hidrogênios.

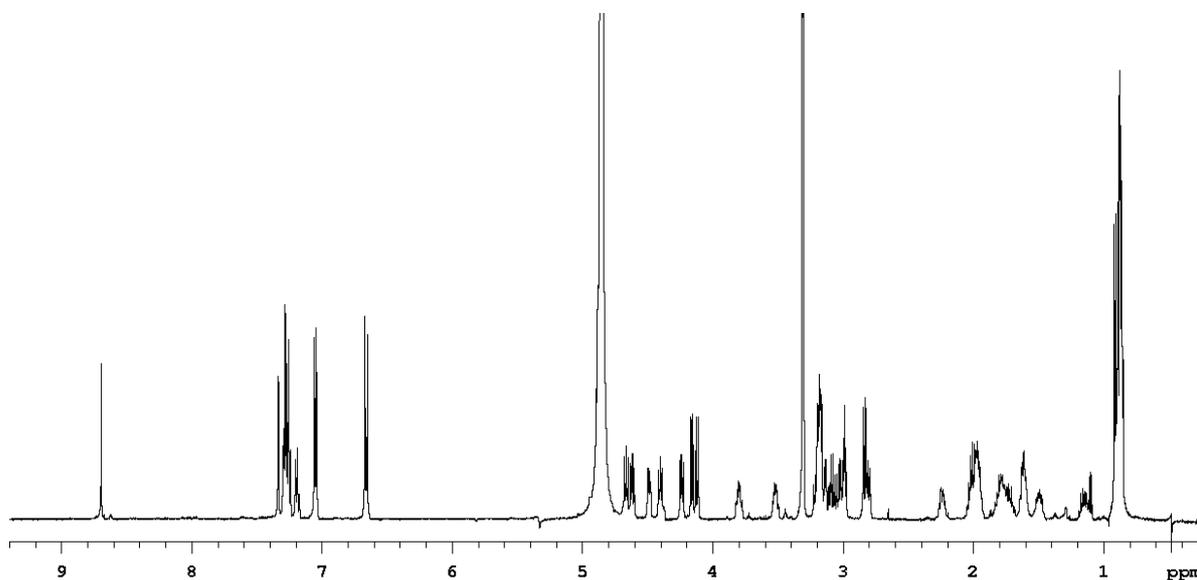


Figura 26. Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CD₃OD, 25 °C) da Angiotensina 2.

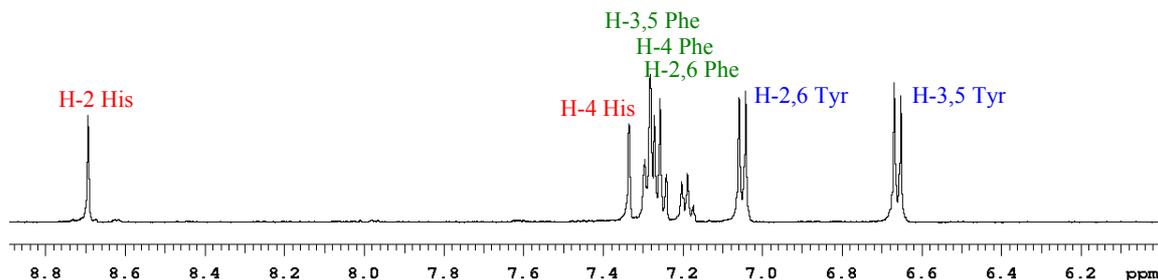


Figura 27. Expansão (6,0 a 9,0 ppm) do Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CD_3OD , 25 °C) da Angiotensina 2.

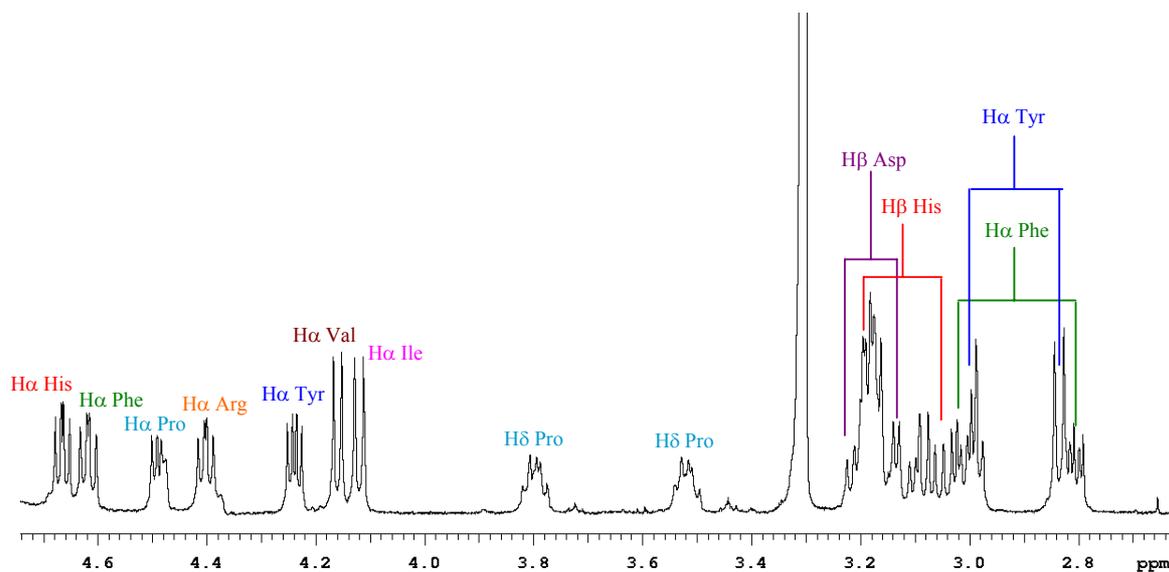


Figura 28. Expansão (2,5 a 4,8 ppm) do Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CD_3OD , 25 °C) da Angiotensina 2.

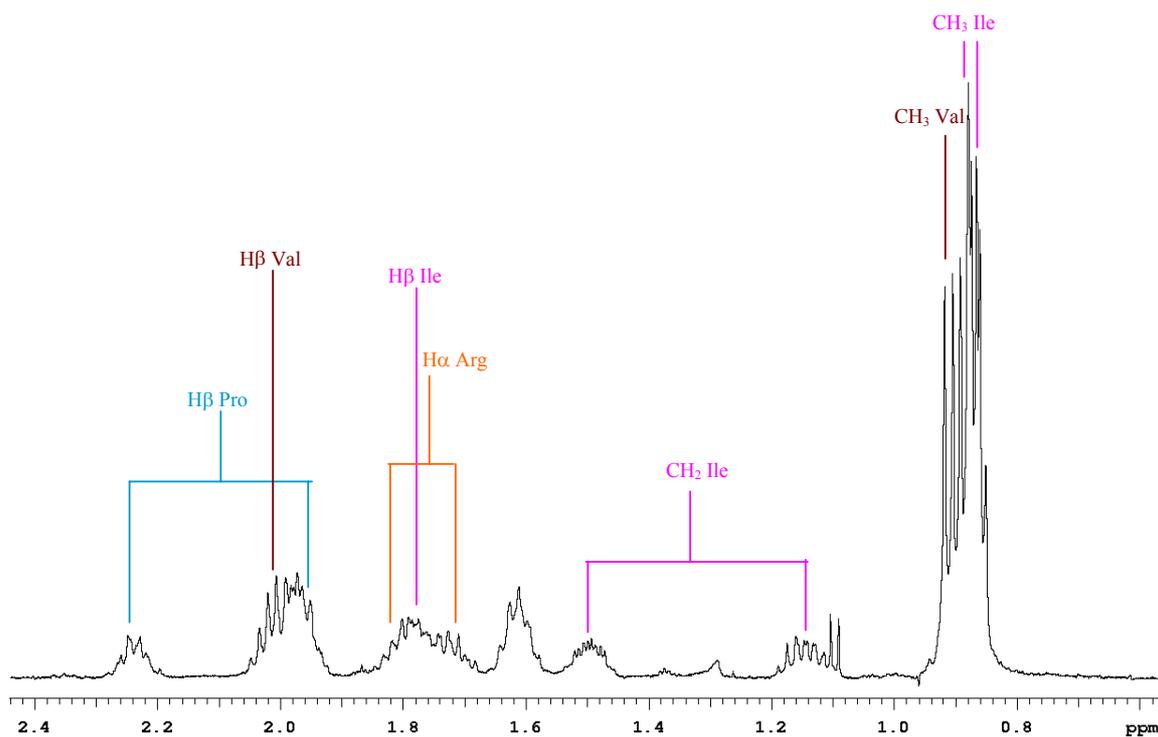


Figura 29. Expansão (0,5 a 2,5 ppm) do Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CD_3OD , 25 °C) da **Angiotensina 2**.

Como mostrado na **Figura 30**, na região de 6,50 a 8,90 ppm observamos 3 sistemas de spins acoplados. Uma correlação a longa distância entre o H-2 (8,71 ppm) e o H-4 (7,38 ppm) da Histidina (vermelho). Correlações orto entre os H-3,5 (7,33 ppm) com os H-2,6 (7,20 ppm) e H-4 (7,31 ppm) e correlações meta entre os H-4 (7,31 ppm) e H-2,6 (7,20 ppm) da fenilalanina (verde). Além, das correlações orto e meta entre os H-3,5 (6,66 ppm) e os H-2,6 (7,10 ppm) da tirosina (azul),

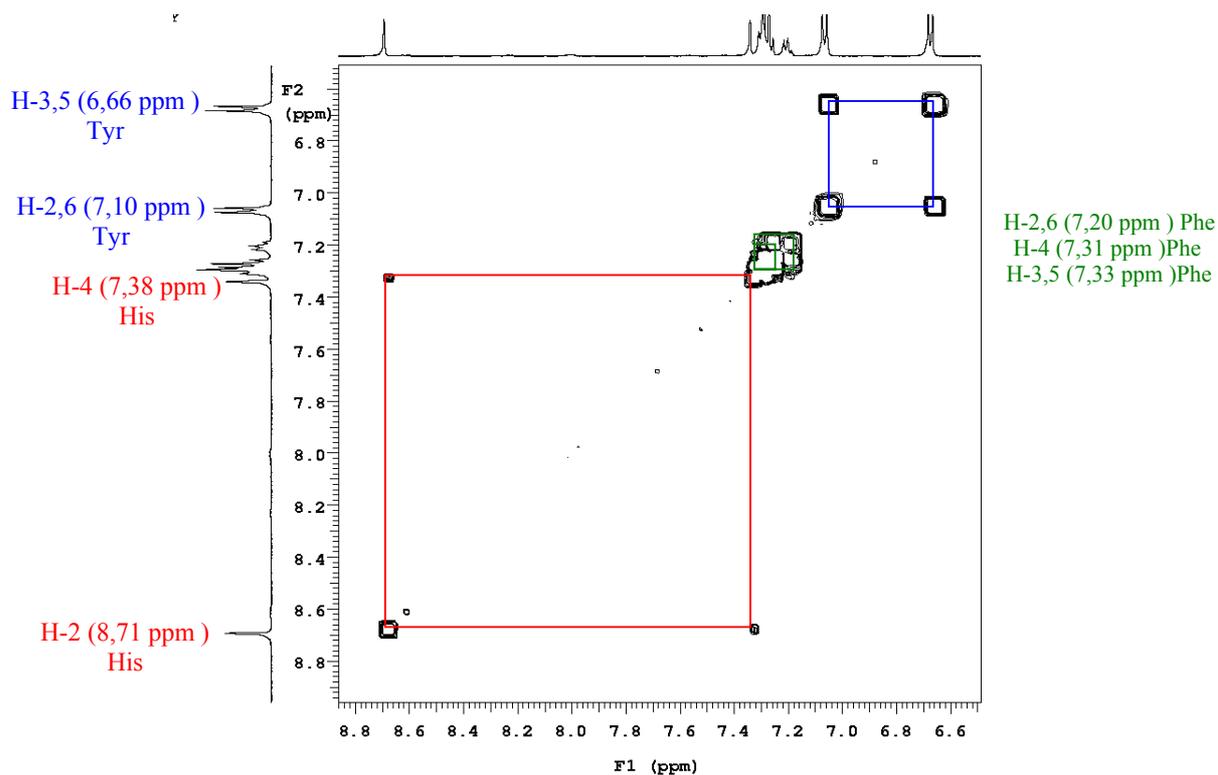


Figura 30. Expansão do mapa de contornos de RMN em 2D (H,H COSY, 499,88 MHz, CD_3OD , 25 °C) da região dos hidrogênios aromáticos (6,50 a 8,90 ppm) da Angiotensina 2.

Na **Figura 31** estão assinalados o H_α (azul, 4,23 ppm) e suas correlações com os H_β (2,99 e 2,76 ppm) da tirosina; o H_α (verde, 4,62 ppm) e suas correlações com os H_β (3,01 e 2,81 ppm) da fenilalanina e o H_α (vermelho, 4,65 ppm) e suas correlações com os H_β (3,19 e 3,05 ppm) da histidina.

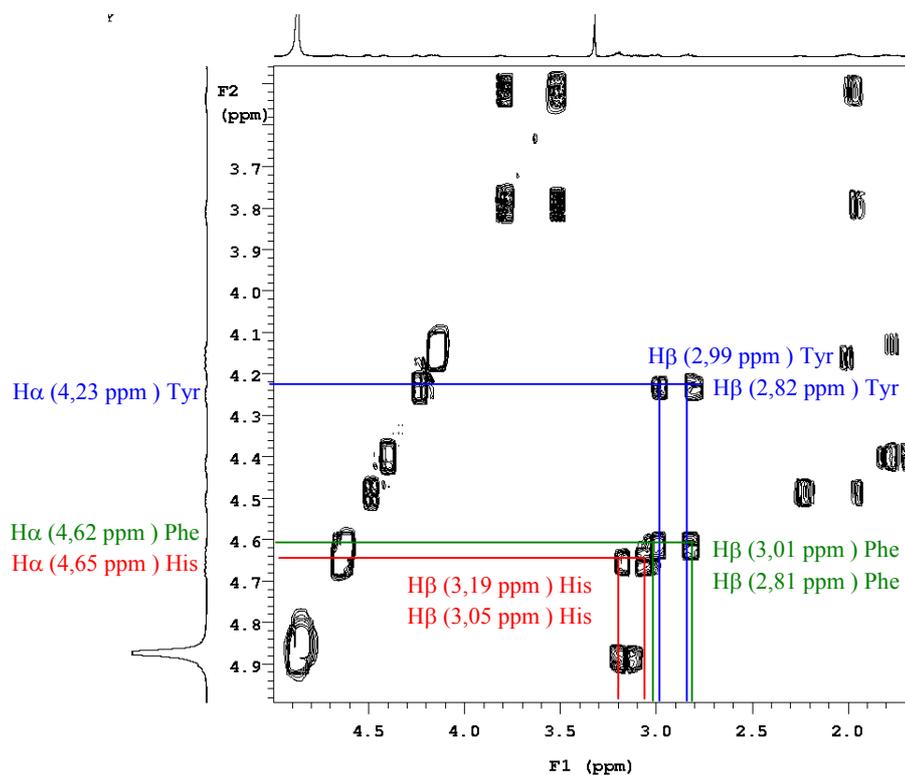


Figura 31. Expansão do mapa de contornos de RMN em 2D (H,H COSY, 499,88 MHz, CD_3OD , 25 °C) da região dos hidrogênios alfa (3,50 a 5,00 ppm) da Angiotensina 2.

Já na **Figura 32** estão assinalados o H_α (rosa, 4,11 ppm) e sua correlação com o H_β (1,76 ppm) da isoleucina; o H_α (vermelho terra, 4,17 ppm) e sua correlação com o H_β (1,98 ppm) da valina; o H_α (laranjado 4,40 ppm) e suas correlações com os H_β (1,71 e 1,81 ppm) da arginina; o H_α (azul claro, 4,49 ppm) e suas correlações com os H_β (1,95 e 2,22 ppm) da prolina e o H_α (roxo, 4,89 ppm) e suas correlações com os H_β em (3,11 e 3,21 ppm) da asparigina.

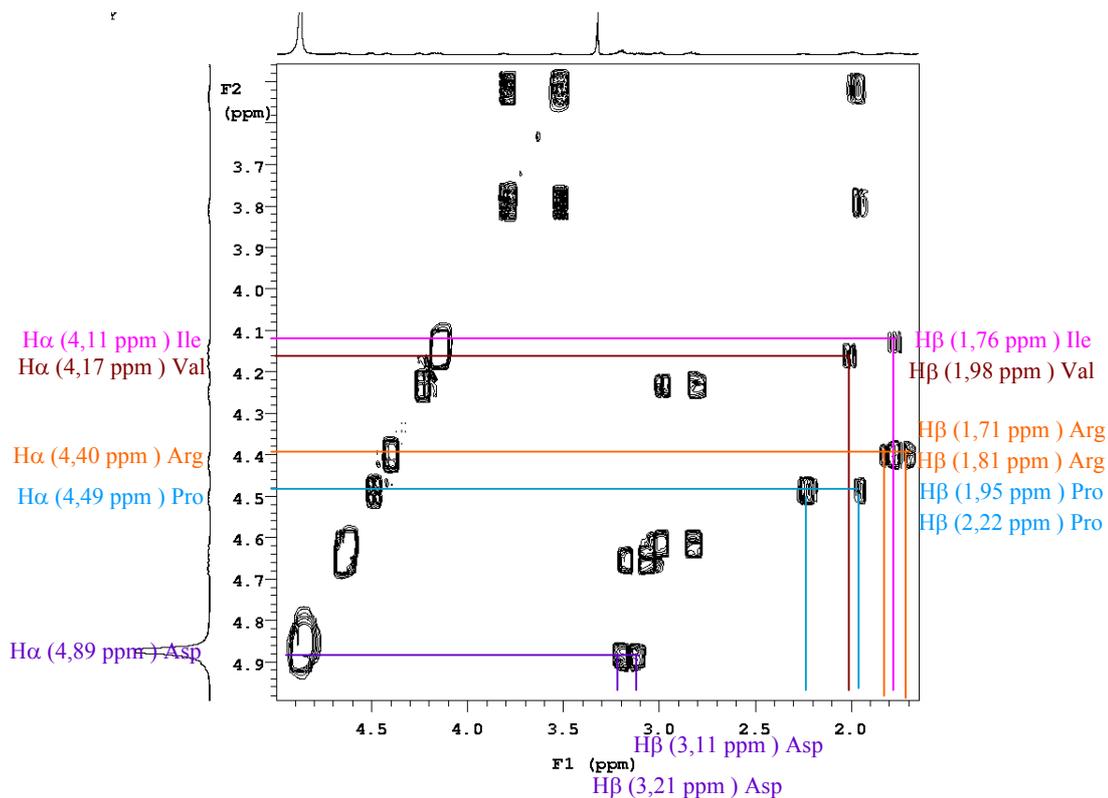


Figura 32. Expansão do mapa de contornos de RMN em 2D (H,H COSY, 499,88 MHz, CD₃OD, 25 °C) da região dos hidrogênios alfa (3,50 a 5,00 ppm) da Angiotensina 2.

A **Figura 33** mostra a correlação entre os H β (2,22 e 1,95 ppm) e os H γ (1,95 ppm) e a correlação entre os H γ (1,95 ppm) e os H δ (3,52 e 3,79 ppm) para a prolina.

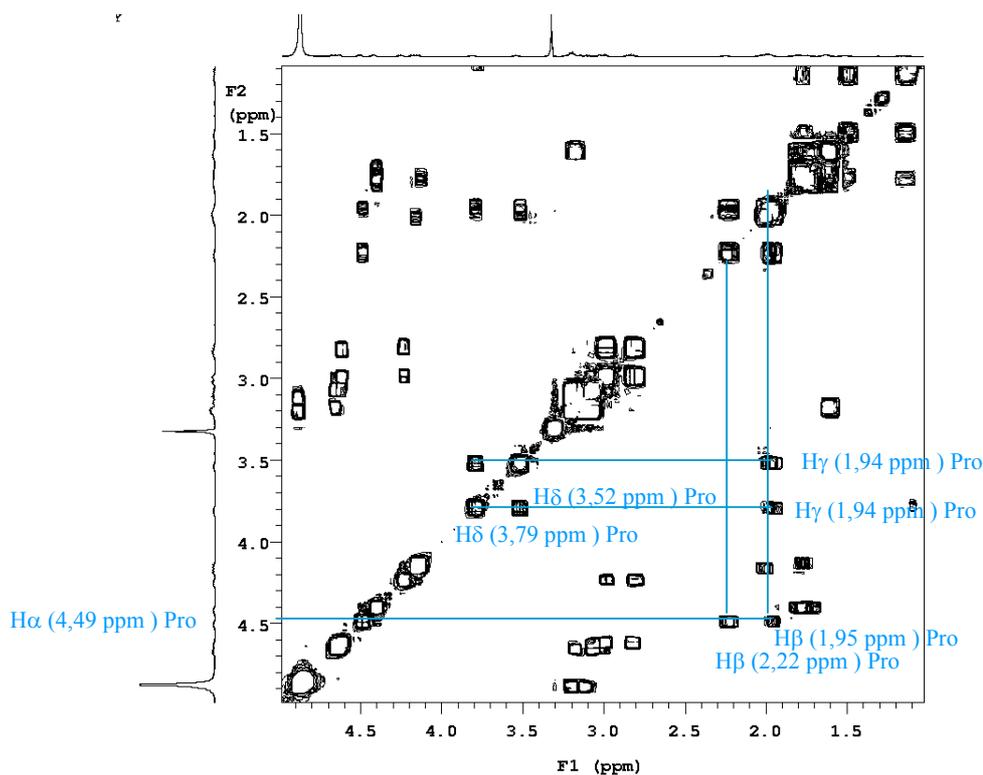


Figura 33. Expansão do mapa de contornos de RMN em 2D (H,H COSY, 499,88 MHz, CD_3OD , 25 °C) da região dos hidrogênios alfa (1,00 a 5,00 ppm) da Angiotensina 2.

A **Figura 34** mostra o acoplamento entre o H_β em (vermelho terra, 2,02 ppm) e os H_γ em (0,90 ppm) para valina e o acoplamento entre o H_β em (rosa, 1,76 ppm) e os H_γ em (1,49 e 1,14 ppm) e em (0,86 ppm) e o acoplamento dos H_γ em (1,49 e 1,14 ppm) com H_δ em (0,87 ppm) para a isoleucina.

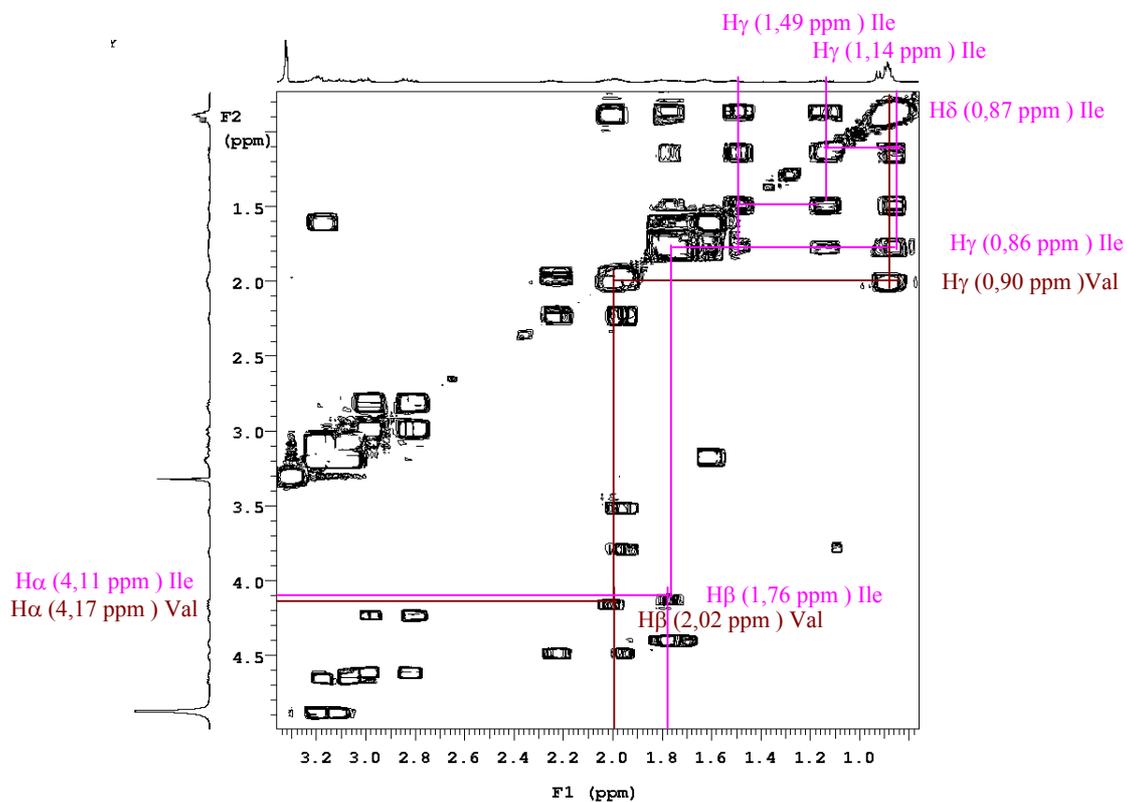


Figura 34. Expansão do mapa de contornos de RMN em 2D (H,H COSY, 499,88 MHz, CD₃OD, 25 °C) da região dos hidrogênios alfa (1,00 a 5,00 ppm) da Angiotensina 2.

Os valores dos deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio do polipeptídeo **Angiotensina 2** foram comparados com valores dos δ dos aminoácidos livres obtidos da literatura³⁵ (**Figura 35**).

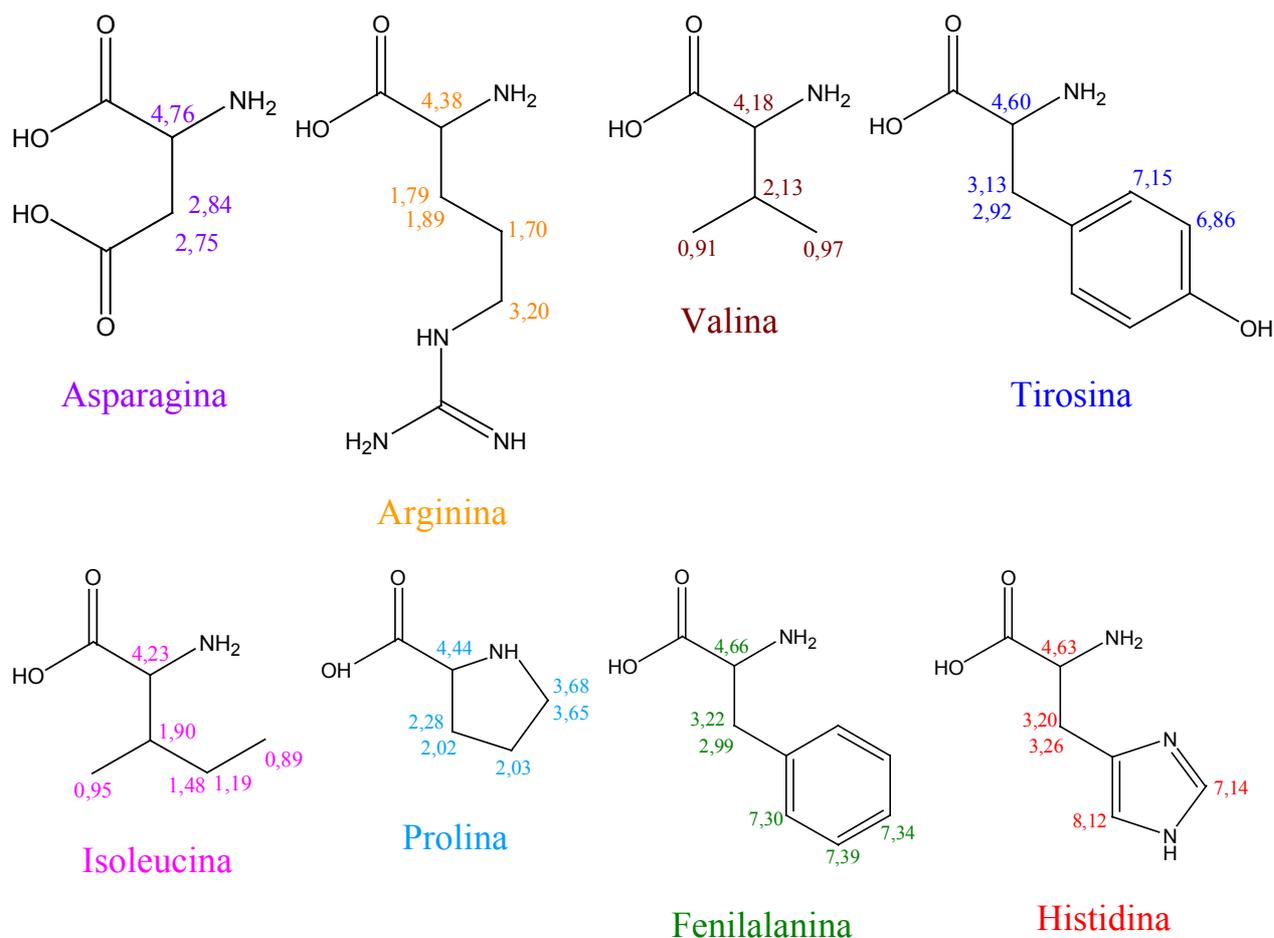


Figura 35. Deslocamentos químicos de ¹H dos aminoácidos livres obtidos da literatura³⁵.

Dessa forma foi possível atribuir inequivocamente os deslocamentos químicos dos hidrogênios do polipeptídeo **Angiotensina 2**, como pode ser observado na **Figura 36**.

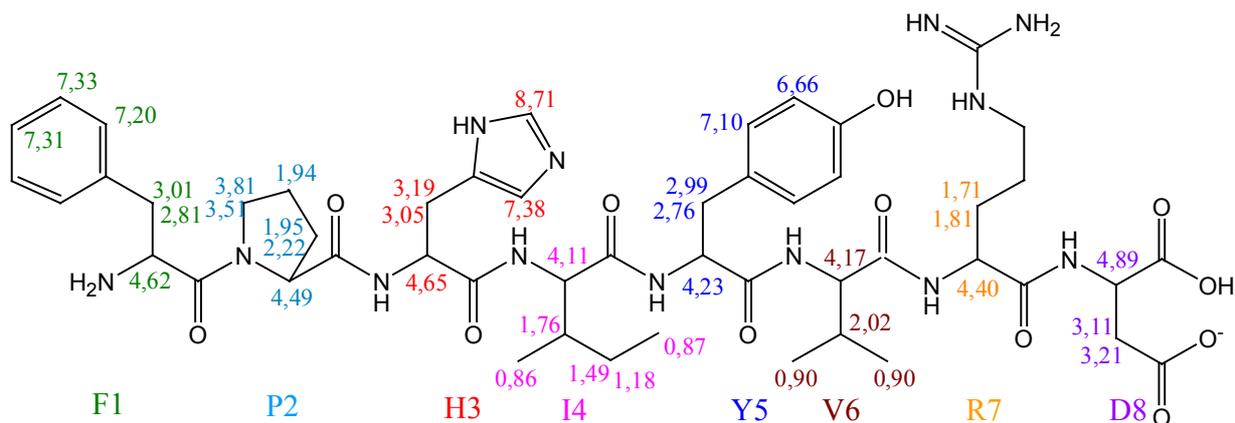


Figura 36. Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H (em ppm) do polipeptídeo (*Angiotensina 2*) com base nos experimentos de RMN de ^1H e COSY.

O experimento de STD com a Hsp70 e ATP, mostrou que o ATP se ligou a Hsp70 através do **H-1'** anomérico (6,15 ppm) e dos **H-8** (8,52 ppm) e **H-2** (8,26 ppm) da porção adenosina. As percentagens de interação foram 0,16; 0,82 e 0,37 %, respectivamente, e podem ser observadas em negrito no espectro de STD, **Figura 37b**. Em seguida, adicionou-se 1,0 mM do polipeptídeo à mistura de Hsp70 e ATP e o espectro de STD mostrou que a Hsp70 continuou complexada ao ATP através dos **H-1'** com 0,39 %, **H-8** com 0,15 % e **H-2** com 0,65 % no domínio ATPase e no domínio de complexação do polipeptídeo (*Angiotensina 2*) interagiu na parte alifática através dos sinais dos **H γ** da valina (0,91 ppm) com 0,49 % e dos **H γ** e **H δ** da isoleucina (0,88 e 0,89 ppm) com 0,53 % de interação e na parte aromática através dos **H-2** da histidina (8,71 ppm) com 0,50%, com os **H-3,5** e **H-4** (7,33 e 7,31 ppm) com 0,63 % e **H-2,6** (7,20 ppm) da fenilalanina com 0,75 % e através dos **H-3,5** e **H-2,6** (6,66 e 7,10 ppm) da tirosina com 0,59 e 0,51 % , como pode ser observado na **Figura 37c**.

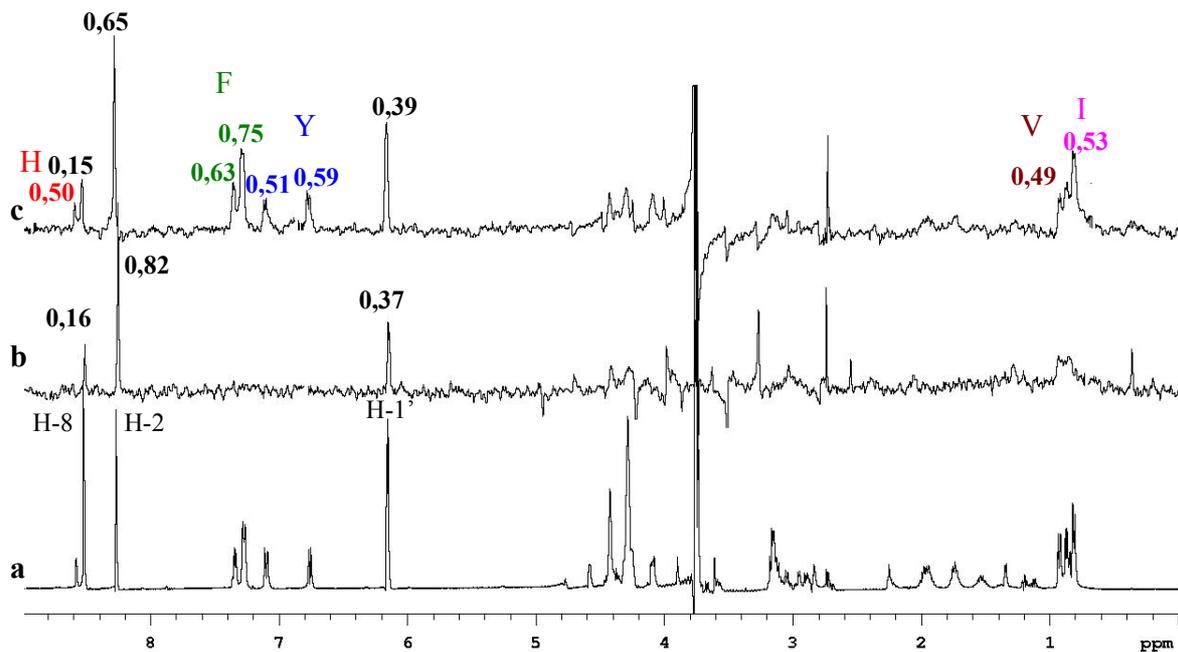


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H região 0,0 a 9,0 ppm (499,99 MHz, 99,9 % D_2O) **a)** STD-controle, **b)** STD da mistura Hsp70/ATP e **c)** STD da Hsp70/ATP/Angiotensina 2. Os números em negrito sobre as estruturas representam o mapa de epitopo.

Dessa forma é possível afirmar que a Angiotensina 2 interage com a Hsp70 através de sua porção hidrofóbica (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe).

Portanto, nesta primeira etapa do trabalho, contatou-se que os experimentos de transferência de NOE como: STD, WaterLOGSY, NOE pumping e DOSY-NOESY, otimizados e implementados no IQ-UNICAMP permitiram a detecção de interação proteína-ligante para os sistemas testados. Além disso, as técnicas forneceram informações complementares umas as outras.

Conclusão do Capítulo I

3 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO I

Esta primeira parte do trabalho abordou a aplicação de técnicas de RMN de ^1H de 1 e 2 dimensões no mapeamento das interações proteína-ligante.

As técnicas de RMN de 1D como NOE pumping, STD e WaterLOGSY e RMN de 2D como DOSY-NOESY foram eficientemente implementadas e otimizadas utilizando para isso um sistema composto por BSA e uma mistura de ligantes. Com isso observou-se que apenas o ácido salicílico (**1**) e a cafeína (**2**) interagiram com a BSA. Além disso, foi possível avaliar os resultados obtidos para cada técnica, fazendo uma análise comparativa entre elas, permitindo afirmar que o experimento de STD é o mais sensível, rápido e de fácil interpretação, além de fornecer o epitopo de ligação dos ligantes. Uma outra constatação importante foi que o experimento de WaterLOGSY também é muito sensível e fornece o epitopo mapeado pelas moléculas de água, ou seja, comparando os resultados obtidos por STD e WaterLOGSY é possível obter o domínio hidrofóbico e hidrofílico de ligação com o ligante.

Após a otimização, estas técnicas foram aplicadas um sistema de Chaperone formado pela Hsp70 e seus cofatores (ATP/ADP). Sua análise por STD permitiu afirmar que a Hsp70 se liga em maior proporção ao ADP se do que ao ATP. Além disso, mudanças nas condições de pH das misturas indicaram que em pH=8,0 (tampão tris-HCl) as interações entre Hsp70 e seus substratos são maiores do que em pH menores. A análise desse sistema por WaterLOGSY e a comparação com os resultados obtidos por STD permitiu propor um possível epitopo de ligação Hsp70/ATP e Hsp70/ADP composto por um domínio hidrofóbico e outro hidrofílico. A análise do sistema Hsp70/ATP/polipeptídeo (Angiotensina 2) através

de STD permitiu afirmar que a Hsp70 interage tanto com ATP como com a Angiotensina 2.

Finalmente, este trabalho permitiu:

- testar o limite de cada técnica;
- avaliar as interações em sistemas biológicos importantes;
- despertar o interesse da comunidade científica para técnicas de RMN aplicadas às interações intermoleculares com macromoléculas desencadeando uma série de novos trabalhos no IQ e no Brasil.

CAPÍTULO 2

“RMN de ^1H aplicada a metabolômica humana”



Introdução



4 INTRODUÇÃO

Durante a década passada, foi introduzido um novo arranjo de metodologias e tecnologias analíticas relacionadas à análise dos metabólitos secundários de microrganismos, plantas e animais. Estava nascendo o campo científico da metabolômica. O metaboloma é definido como a coleção qualitativa e quantitativa de todos os metabólitos de baixa massa molecular presentes na célula que participam de reações metabólicas necessárias para a manutenção, crescimento e função celular. A metabolômica trata do delineamento do status bioquímico de sistemas a fim de ampliar as bases do entendimento de como as doenças se manifestam⁴¹.

Os experimentos utilizados na metabolômica (amostras, preparação das amostras, análise instrumental, processamento e interpretação dos dados) fornecem ferramentas originais para melhorar a condição das informações biológicas relacionadas ao metaboloma e, mais usualmente, a genômica funcional⁴². Geralmente, o metaboloma inclui espécies orgânicas como: aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas e lipídios. O tamanho do metaboloma varia muito, dependendo do organismo estudado; *Saccharomyces cerevisiae* contém aproximadamente 600 metabólitos⁴³, as plantas tem uma estimativa de 200000 metabólitos primários e secundários⁴⁴, enquanto que, o metaboloma humano deve ser ainda maior.

⁴¹ Ellis, D. I.; Dunn, W. B. *Trends Anal. Chem.*, **2005**, *24*, 285-294.

⁴² Sumner, L. W.; Mendes, P.; Dixon, R. A. *Phytochemistry*, **2003**, *62*, 817-836.

⁴³ Forster, J.; Famili, I.; Fu, P.; Palsson, B. O.; Nielsen, J. *Genome Res.* **2003**, *13*, 244-253.

⁴⁴ Fiehn, O. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155-171.

Do ponto de vista de grupos funcionais e esqueletos carbônicos os metabólitos constituem um conjunto de moléculas com grandes variações que se manifestam nas propriedades químicas e físicas. Já o proteoma (arranjo de 20 aminoácidos) e transcriptoma (arranjo de quatro nucleotídeos ligados a um açúcar e um fosfato) são mais uniformes. Conseqüentemente, analisar todos metabólitos numa simples análise seria o ideal e é o objetivo da metabolômica e metabonômica.

A Metabolômica almeja a identificação e quantificação de todos os metabólitos do sistema biológico utilizando técnicas hifenadas à cromatografia para a prévia separação dos metabólitos (GC-MS⁴⁵, LC-MS, LC-NMR). Já a Metabonômica é uma análise global de todos os metabólitos endógenos de tecidos e fluidos biológicos sem prévia separação cromatográfica (RMN⁴⁶, FTIR, DIMS⁴⁷).

Existem várias vantagens em estudar metabolômica em comparação a proteômica e transcriptômica, como:

- O número total de metabólitos, normalmente, é menor do que o número de genes e proteínas na célula. Por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* contem mais de 6000 genes e apenas 600 metabólitos, ou seja, a complexidade da amostra é reduzida;
- A teoria da Análise de Controle Metabólico⁴¹ e trabalhos experimentais têm mostrado que a concentração do fluxo metabólico e enzimático não varia significativamente durante as reações bioquímicas mas, a concentração dos metabólitos varia;

⁴⁵ Tanaka, K.; Hine, D. G. *J. Chromatogr. A* **1982**, 239, 301-322.

⁴⁶ Nicholson, J. K.; Buckingham, M. J.; Sadler, P. J. *Biochem. J.* **1983**, 211, 605-615.

⁴⁷ Vandergreef, J. *Trends Anal. Chem.* **1986**, 5, 241-246.

- O metaboloma é produto direto da expressão gênica e reflete o nível funcional da célula, mais apropriadamente, as mudanças no metaboloma são o reflexo do proteoma ou transcriptoma;
- Pesquisas têm mostrado que os fluxos metabólicos são regulados não somente pela expressão gênica mas também pelo estresse ambiental⁴⁸;
- É estimado que experimentos de metabolômica são duas ou três vezes menos dispendiosos do que experimentos de proteômica e transcriptômica.

As aplicações da metabolômica têm se expandido em paralelo com a genômica e com as técnicas de proteômica e transcriptômica com o objetivo de determinar a função gênica em microrganismos, plantas e animais⁴¹. Hoje, muitas aplicações diferentes são realizadas. Estas incluem:

- determinação de biomarcadores que mudam como um indicador da presença de uma doença ou em resposta a intervenção de drogas^{49,50};
- determinação do efeito de estresse bioquímico ou ambiental em plantas ou microrganismos⁵¹;
- avaliação da saúde humana⁵²;
- engenharia metabólica⁵³.

⁴⁸ Johnson, H. E.; Broadhurst, D.; Goodacre, R.; Smith, A. R. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 919-928.

⁴⁹ Lafrance, D.; Lands, L. C.; Burns, D. H. *Talanta*, **2003**, *60*, 635-641.

⁵⁰ Bundy, J. G.; Spurgeon, D. J.; Svendsen, C.; Hankard, P. K.; Osborn, D.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. *FEBS Lett.* **2002**, *521*, 115-120.

⁵¹ Le Gall, G.; Colquhoun, I. J.; Davis, A. L.; Collins, G. J.; Verhoeven, M. E. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2447-2456.

⁵² Watkins, S. M.; German, J. B.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 512-516.

⁵³ Teusink, B.; Westerhoff, H. V. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1889-1893.

Evidentemente, métodos analíticos e validação instrumental são importantes para avaliar a precisão, exatidão e aplicabilidade dos métodos.

Na metabolômica a espectroscopia de RMN fornece um método de triagem rápido e não-destrutivo que requer uma preparação mínima da amostra⁵⁴. A maioria das aplicações emprega a RMN de ^1H para estudos clínicos, pois grande parte dos metabólitos conhecidos contém átomos de hidrogênio, além disso o sistema não é baseado em metabólitos particulares, ou seja, todos metabólitos presentes numa concentração mínima será detectado. Inicialmente, a sensibilidade da técnica depende da abundância natural do átomo estudado (^1H , ^{31}P , ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N), embora aumentos na sensibilidade podem ser obtidos através de longos tempos de análise ou aplicação de campos magnéticos mais fortes ou ainda usando sondas criogênicas. A espectrometria de massas fornece um grande aumento na sensibilidade se comparado a RMN⁵⁵.

A técnica de RMN é aplicada extensivamente nas pesquisas clínicas e farmacêuticas para análise de biofluidos ou tecidos, com especial ênfase na RMN de ^1H . Uma série de seqüências de pulsos pode aumentar as informações espectrais e minimizar os efeitos de grandes excessos de componentes. Por exemplo, biofluidos que contem um grande excesso de água apresentam espectros com informações espectrais mínimas. Entretanto, a aplicação de seqüências de pulsos de supressão de água pode eliminar este efeito. Além disso, a aplicação de seqüências de eco de spin e de difusão pode aumentar a detecção de alguns tipos de compostos.

Neste trabalho, a RMN de ^1H de alta resolução com supressão de água será aplicada ao estudo dos metabólitos relacionados ao líquido cerebrospinal (CSF) de pacientes com Esclerose Múltipla (EM).

⁵⁴ Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 384A-391A.

⁵⁵ Lenz, E. M.; Brigh, J.; Knigh, R.; Wilson, I. D.; Major, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35*, 599-608.

A EM é uma doença degenerativa, sem cura que afeta mais de um milhão de pessoas em todo o mundo atingindo principalmente os adultos jovens entre 20 e 40 anos de idade. A incidência é maior em mulheres (na proporção de 3 por 1), na raça branca e em países do Hemisfério Norte, onde o índice é de 100 doentes por 100.000 habitantes a cada ano. No Hemisfério Sul, a incidência cai acentuadamente para 1 a 5 doentes por 100.000 habitantes. A EM não é letal, mas sua progressão pode acarretar, nos casos graves, em paralisia de membros ou perda da visão. Manifesta-se em surtos, com sintomas que levam horas ou dias para aparecer, persistindo por dois a quatro meses e desaparecendo gradualmente. A repetição desses surtos é que determina a gravidade de cada caso⁵⁶.

A EM é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC) de etiologia desconhecida e caracterizada pela infiltração de células do sistema imune com destruição localizada da mielina, desencadeada por reação auto-imune contra proteínas que constituem a bainha de mielina, resultando na perda de oligodendrócitos e axônios⁵⁷. A Ressonância Magnética de Imagem (MRI) é a técnica mais sensível para o diagnóstico bem como para a avaliação da atividade da EM. Os subgrupos de pacientes com EM diferem no tipo e na quantidade da inflamação e são divididos em dois grupos: EM *sem captação* por (MRI), ou seja, sem realce e sem critério de imagem que defina atividade inflamatória e EM *com captação* que significa pacientes com EM que apresentam lesão cerebral captada por MRI após a administração venosa do agente de contraste paramagnético (gadolínio). Esse contraste denota aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e atividade inflamatória em curso.

⁵⁶ <http://www.pmrp.com.br/SSAUDE/doencas/i16esclerosem.htm>

⁵⁷ Sutherland, G. R.; Auty, A.; Peeling, J.; Lynch, J.; *Can. J. Neurol. Sci.* **1993**, *20*, 194-198.

Já espectroscopia de RMN de ^1H clínica (de baixa resolução) tem se mostrado um método sensível para análise de tecidos, surgindo como uma ferramenta não invasiva, capaz de ajudar a classificar as lesões através da análise da sua composição química *in vivo*. Recentes avanços repousam na aplicação da RMN de ^1H clínica nas áreas desmielinizadas de pacientes EM mostrando que as placas ativas e crônicas diferem no seu padrão bioquímico⁵⁸ e fornecendo mais informações sobre os processos patológicos da doença do que a MRI. Placas ativas são caracterizadas por um aumento na concentração do lactato, dependendo da reação inflamatória e por um aumento na razão colina/creatina, marcador de quebra de mielina. Placas crônicas são definidas por um decréscimo na razão N-acetilaspártato/creatina, refletindo um dano axonal irreversível⁵⁹.

A **Figura 38a** mostra a MRI de um paciente com EM e seu respectivo espectro de RM de ^1H *in vivo*. O espectro de RM mostra a discreta redução do sinal de N-acetilaspártato (NAA), atribuída a perda de neurônio e perda axonal e um aumento discreto no sinal da colina em 3,20 ppm decorrente do turnover de membrana.

⁵⁸ Matthews, P. M.; Francis, G.; Antel, J.; Arnold, D. L. *Neurology*, **1991**, *41*, 1251-1256.

⁵⁹ Simone, I. S.; Frederico, F.; Trojano, M.; Tartorella, C.; Liguori, M.; Giannini, P.; Picciola, E.; Natile, G.; Livrea, P. *J. Neurol. Sci.*, **1996**, *144*, 182-190.

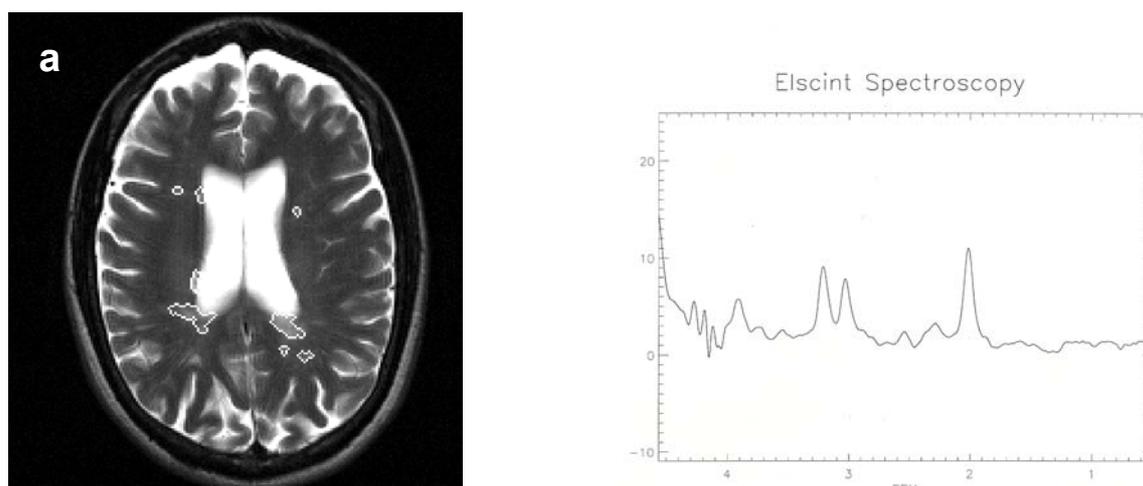


Figura 38. a) Lesões segmentadas em paciente com EM duplo “spin eco” (T_2 ponderada, espessura 6mm, ângulo de excitação de 180° , $TR=1800$, $TE=90$, matriz= 165×256 , $FOV=20 \times 24$ cm). Imagens obtidas utilizando-se um aparelho de 2 Teslas, com aquisição em plano axial. **b)** Espectro de RM de 1H , NAA em 2,00 ppm, colina em 3,20 ppm e creatina em 3,00 e 3,90 ppm.

Pela sua própria complexidade, há muito que se conhecer sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos na EM. Assim, técnicas como a RMN clínica, que podem refletir o que ocorre no cérebro, *in loco*, fornecem informações seguras para o entendimento dos processos bioquímicos que ocorrem ou predominam no tecido normal e patológico.

Porém, a baixa resolução da RMN clínica resulta em espectros com muitos sinais sobrepostos ou indistinguíveis da linha de base. A utilização da RMN de 1H de alta resolução *in vitro*, fornece informações mais detalhadas sobre a composição química de CSF de pacientes EM permitindo a identificação de metabólitos bioquimicamente importantes. Uma vez identificada por RMN a importância de

uma determinada substância *in vitro*, os parâmetros da RMN clínica podem ser finamente ajustados aumentando a sensibilidade e resolução para a mesma⁶⁰.

Dessa forma, neste trabalho a RMN de ¹H será acoplada a métodos quimiométricos como: análise hierárquica de agrupamentos (HCA), análise de componentes principais (PCA) e regressão por quadrados mínimos parciais⁶¹ (PLS), fornecendo uma ferramenta estatística poderosa na discriminação de espectros de diferentes classes de amostras, reduzindo o grande número de variáveis espectrais e fornecendo os metabólitos chaves envolvidos na doença.

4.1 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) é um processo hierárquico no qual, em cada passo a matriz de dados é diminuída em uma dimensão, pela reunião de pares semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo. O objetivo da HCA é exibir os dados em um espaço bidimensional de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) reflete a similaridade de suas propriedades, portanto quanto mais próximos estiverem os pontos no espaço amostral, mais similares eles são. Os resultados são apresentados na forma de dendogramas, os quais agrupam amostras ou variáveis em função da similaridade. A distância euclidiana e a técnica de conexão baseada na distância do vizinho mais próximo são as metodologias mais utilizadas para o cálculo da similaridade^{62,64}.

Já a análise de componentes principais (PCA) é um método de análise multivariada utilizado para projetar dados n-dimensionais em um espaço de baixa

⁶⁰ Nafe, R.; Herminghaus, S.; Raab, P. et al. *J Neurooncol*, **2003**, 63 (3), 233-245.

⁶¹ Martens, H.; Naes, T. **Multivariate Calibration**. Johan Wiley & Sons, Chichester, USA, p.418, 1989.

dimensão, normalmente duas ou três. Isso é feito através do cálculo de componentes principais obtidas fazendo-se combinações lineares das variáveis originais. PCA é um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de *scores* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados. Os *scores* fornecem a composição das PCs em relação às amostras, enquanto os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as PCs são ortogonais, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos *scores* e dos *loadings*. O estudo conjunto de *scores* e *loadings* ainda permite estimar a influência de cada variável em cada amostra^{62,63,64,65}.

A Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA) é um método bem conhecido da comunidade científica e, como qualquer outro método de regressão, tem como objetivo encontrar uma relação entre a matriz (X) contendo os espectros das amostras e o vetor que armazena as respectivas concentrações (Y). O resultado é uma equação semelhante à equação (9):

$$Y = Xb + e \quad (9)$$

⁶² Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O.; *Quim. Nova*, **1999**, 22, 724-731.

⁶³ Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B.; *Chemometrics: A Practical Guide*, Wiley, New York, **1998**.

⁶⁴ Sharaf, M. A.; Illmar, D. L.; Kowalski, B. R.; *Chemometrics*, Wiley-Interscience, New York, **1986**.

⁶⁵ Ferreira, M. M. C.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**(6), **2002**, 742-753.

em que, b é o vetor de regressão e e é o vetor que representa os erros do modelo. O método PLS é especialmente indicado, quando X contém variáveis altamente correlacionadas, como por exemplo dados espectroscópicos^{66,67,68}.

Este estudo, realizado em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Fernando Cendes (FCM-UNICAMP), teve como objetivo mapear os componentes presentes no CSF de pacientes com Esclerose Múltipla (EM), obtidos com RMN de alta resolução e correlacioná-los às manifestações clínicas e laboratoriais desses pacientes de modo a estabelecer um padrão morfológico que possibilite a interpretação adequada destes dados. Além disso, esta interação permitiu a correlação entre os resultados de RMN de alta resolução *in vitro* obtidos no IQ-UNICAMP e aqueles obtidos através de imagens e espectros de RMN *in vivo* no Hospital das Clínicas – UNICAMP.

⁶⁶ <http://lqta.iqm.unicamp.br/>

⁶⁷ Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, Wiley, New York, **1989**.

⁶⁸ Geladi, P.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chim. Acta*, **1986**, *185*, 1-17.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de RMN de ^1H das Amostras de Líquido Cerebroespinal (CSF)

Com permissão do conselho de ética da UNICAMP⁶⁹, foram coletadas 120 amostras de CSF, das quais 60 são controles e 60 são EM. As amostras EM foram divididas em dois grupos neste trabalho sendo que 30 são EM (com captação) e 30 são EM (sem captação). Esta divisão foi realizada com intuito de verificar se existe algum marcador biológico capaz de diferenciar a atividade da EM a partir da RMN de ^1H *in vitro*.

Para análise por RMN ^1H foram adicionados 500 μL de líquido cerebroespinal (CSF) a 100 μL de D_2O contendo 2,5 mmol.L^{-1} de trisililpropionato de sódio- d_4 (TSPA). A aquisição dos espectros foi realizada imediatamente a 25°C. Este protocolo permite minimizar a degradação dos metabólitos. Como os espectros obtidos apresentaram um sinal residual do solvente (HDO) bastante intenso foi necessário otimizar experimentos para suprimir este sinal.

A pré-saturação do sinal do solvente, com um pulso de baixa potência na frequência da água (PRESAT do pacote WATER/VARIAN), forneceu bons resultados na supressão do sinal residual de HDO em D_2O . O ajuste da posição e potência do pulso de saturação resultou na remoção do sinal residual (HDO) em amostras com mais de 80 % de H_2O .

⁶⁹ Todos os indivíduos participantes desse estudo foram devidamente esclarecidos quanto às finalidades da pesquisa, através de formulário de consentimento informado. O formulário, assim como este estudo, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Após a aquisição, os espectros foram processados com correção da linha de base (baseline correction), correção da inclinação e posição do espectro (drift correction e vertical position) além do ajuste da altura do sinal do TSPA de forma que este sinal tivesse a mesma altura em todos os espectros. Isso foi necessário, pois, a eficiência da saturação não é exatamente a mesma em todos os espectros.

Uma análise minuciosa dos espectros de RMN de ^1H das amostras controle (**Figuras 39a e 40a**) revelou a presença dos seguintes metabólitos: aminoácidos como leucina, isoleucina e valina (região de 0,90 a 1,10 ppm); lactato (1,33 ppm, *d*); alanina (1,45 ppm, *d*); acetato (1,92 ppm, *s*); 5 amostras apresentaram glutamina (2,40 ppm, *m* e 2,04 ppm, *m*); 3 amostras glutamato (2,33 ppm, *m* e 1,89 ppm, *m*) e 5 amostras uma mistura de glutamato/glutamina; piruvato (2,38, *s*); citrato (2,61 ppm, *dd*); creatina (3,03 ppm, *s*); creatinina (3,04 ppm, *s*) e D-glucose. Inicialmente, foi realizada uma comparação entre os espectros de RMN de ^1H das amostras controles e dos pacientes EM *com* e *sem captação* (**Figura 39 e 40**) a fim de observar as diferenças entre os metabólitos presentes no CSF. Os espectros dos pacientes EM *sem* e *com captação* apresentaram, diferentemente dos controles, um alargamento da linha de base e dos sinais da glutamina/glutamato e citrato (**Figura 39a e 40a**) muito possivelmente devido à interação desses metabólitos com uma proteína (imunoglobulina, IgG) presente nestas amostras como observado através de testes laboratoriais e através de um sinal alargado em 0,065 ppm presente somente nas amostras dos pacientes EM. Além disso, a maioria amostras EM (*sem* e *com captação*) apresentaram em 1,17 ppm um duplete atribuído ao β -hidroxibutirato (BHB), que não foi encontrado nas amostras controles.

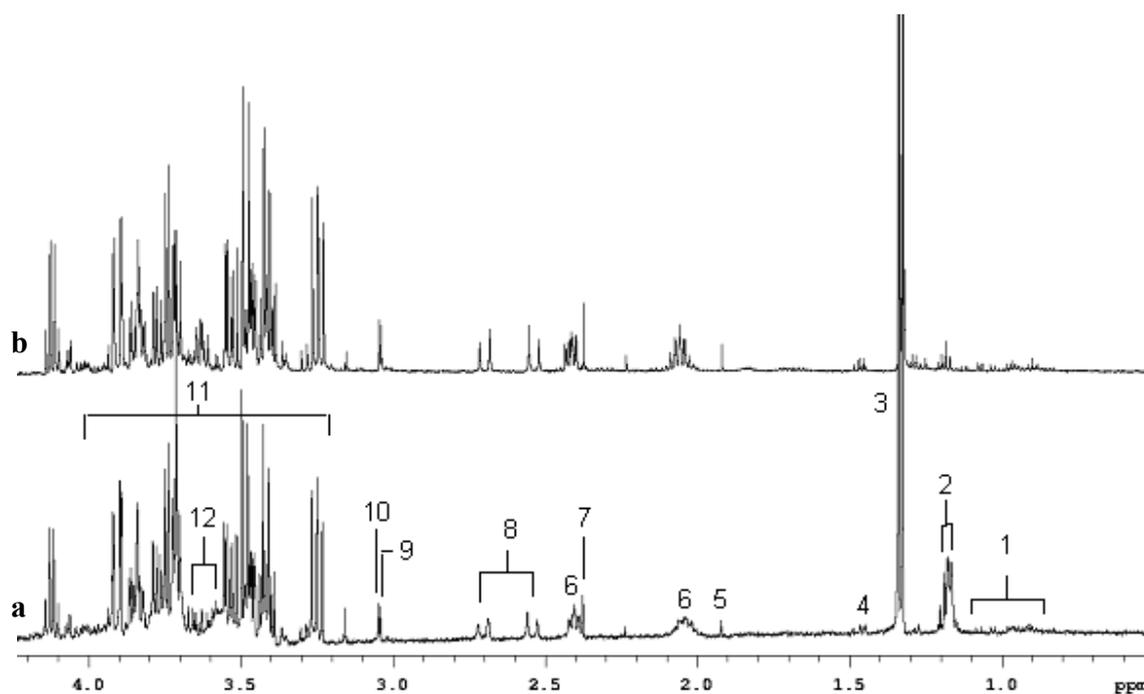


Figura 39. Expansão (0,5 a 4,3 ppm) do espectro de RMN ^1H (499,886 MHz, D_2O , 25 °C) **a)** amostra de CSF de um paciente de EM com captação e **b)** amostra controle. 1. leucina, isoleucina e valina; 2. β -3-Hidroxibutirato; 3. lactato; 4. alanina; 5. acetato; 6. glutamina; 8. citrato; 9. creatina; 10. creatinina; 11. glucose e 12. mio-inositol.

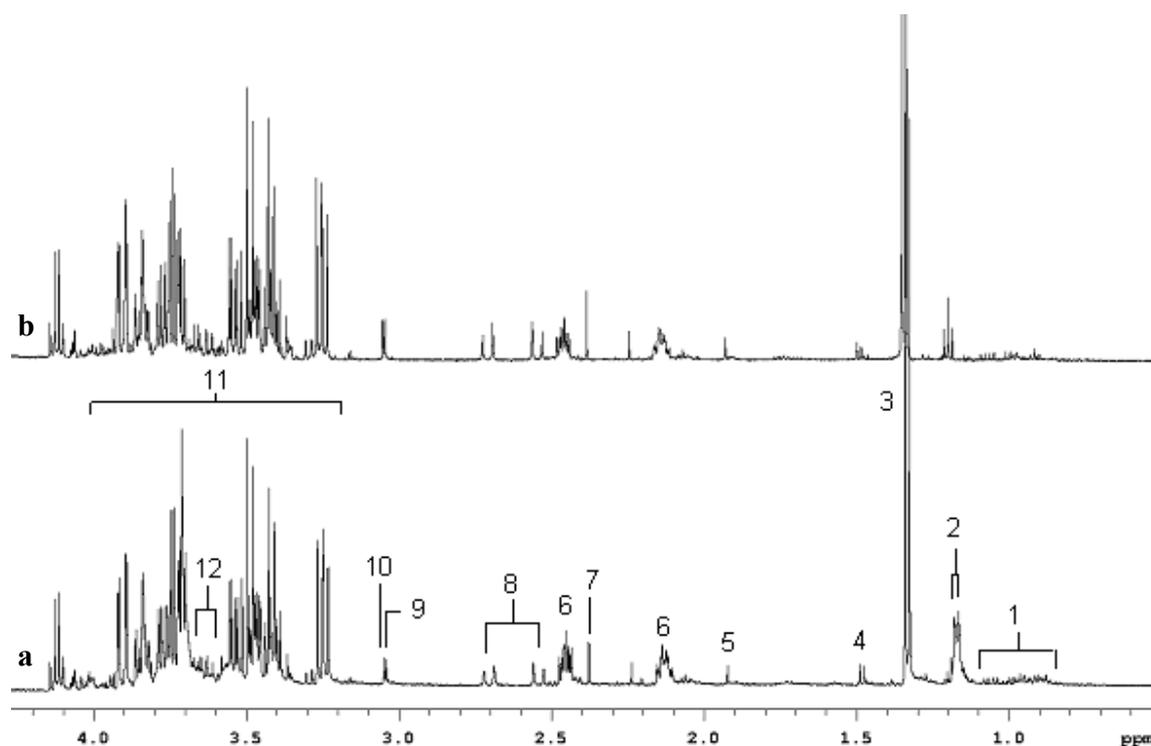


Figura 40. Expansão (0,5 a 4,3 ppm) do espectro de RMN ^1H (499,886 MHz, D_2O , 25 °C) **a)** amostra de CSF de um paciente de EM sem captação e **b)** amostra controle. 1. leucina, isoleucina e valina; 2. β -3-Hidroxibutirato; 3. lactato; 4. alanina; 5. acetato; 6. glutamina; 8. citrato; 9. creatina; 10. creatinina; 11. glucose e 12. mio-inositol.

Após a análise visual dos espectros passou-se para a construção dos modelos de regressão. Para tanto, foram usadas 33 amostras, sendo 24 amostras de EM (**Tabela 9**) e 12 amostras de controle (**Tabela 10**) essa seleção foi feita com base na qualidade da amostra, no tipo de doença e na idade do paciente, tornando as características do grupo bastante homogêneas. As amostras de CSF que apresentaram acidente de punção, ou seja, amostras com presença de hemácias, ou de pacientes com idades muito discrepantes foram descartadas.

Tabela 9. Descrição demográfica dos pacientes usados neste estudo

Paciente	Sexo	Idade início da doença	Duração da doença	Índice IgG	Forma Clínica
EMc1	F	39	6	1,03	RR
EMc2	F	23	1	0,56	RR
EMc3	F	22	2	1,20	RR
EMc4	F	31	1	1,90	RR
EMc5	M	28	7	0,90	RR
EMc6	M	40	10	1,49	PS
EMc7	F	26	3	1,46	PP
EMc8	F	16	7	0,89	RR
EMc9	M	35	7	0,40	PS
EMc10	F	32	3	1,32	RR
EMc11	M	25	5	0,98	RR
EMc12	M	35	2	1,05	PS
EMc13	M	36	2	1,30	RR
EMc14	F	22	1	1,10	RR
EMs1	F	33	7	0,58	RR
EMs2	F	27	15	0,53	RR
EMs3	F	32	6	0,60	RR
EMs4	F	32	3	1,10	RR
EMs5	F	27	10	0,79	RR
EMs6	M	26	9	0,67	RR
EMs7	F	26	6	0,82	RR
EMs8	F	28	3	0,30	RR
EMs9	M	34	15	0,97	RR
EMs10	M	30	4	0,40	RR

RR: Remitente Recorrente, PP: Progressiva Primária e PS: Progressiva Secundária

Tabela 10. Descrição demográfica dos controles usados neste estudo

Controles	sexo	idade	Características
CT1	M	32	Dor de cabeça (1 mês)
CT2	M	22	Polineuropatologia idiopática
CT3	F	70	Polineuropatologia idiopática
CT4	M	25	Linfoma não-Hodgkin
CT5	M	40	Dor de cabeça (2 meses)
CT6	F	34	Dor de cabeça (3 meses)
CT7	F	40	Dor de cabeça (5 meses)
CT8	F	38	Doença degenerativa do SNC
CT9	M	56	Doença degenerativa do SNC
CT10	F	37	Polineuropatologia idiopática
CT11	M	35	Polineuropatologia idiopática
CT12	M	32	Polineuropatologia idiopática

Após todas essas correções os espectros foram transformados em duas colunas de pontos (X e Y) em que em X temos a frequência em Y a amplitude dos sinais. Estes dados foram fornecidos a Profa. Márcia M. Castro (IQ-UNICAMP) que os transferiu para o programa MATLAB 5.1⁷⁰. Esse programa além de permitir o ajuste dos espectros ainda transforma o conjunto de espectros individuais em uma matriz de dados, a qual é transferida para o Pirouette (InfoMetrix software) para realização das análises de HCA, PCA e PLS.

Na tentativa de minimizar os efeitos causados pela dificuldade de obtenção de um espectro ideal, ou seja, espectros sem variações aleatórias ou sistemáticas indesejáveis de diferentes origens, foram empregadas técnicas de tratamentos

⁷⁰ **MATLAB** – The language of technical Computing. **MATLAB User's guide**, 5.1. The MathWorks Inc., 1997.

matemáticos nos espectros antes da construção do conjunto de dados propriamente dito, como uma segunda correção de linha de base e ajuste linear.

A análise por PLS dos espectros de RMN de ^1H das 33 amostras de CSF, com os dados autoescalados (**Figura 41b**) possibilitou a separação de dois grupos distintos de amostras um do grupo controle (em verde) e outro de pacientes EM (em vermelho). Nessa análise, utilizando quatro variáveis latentes (66,0 % das informações dos dados originais), apenas uma amostra é predita na classe errada (EMc3). Além disso, permitiu selecionar no espectro as principais regiões responsáveis pela separação entre os grupos e essas regiões estão assinaladas de vermelho na **Figura 41a**.

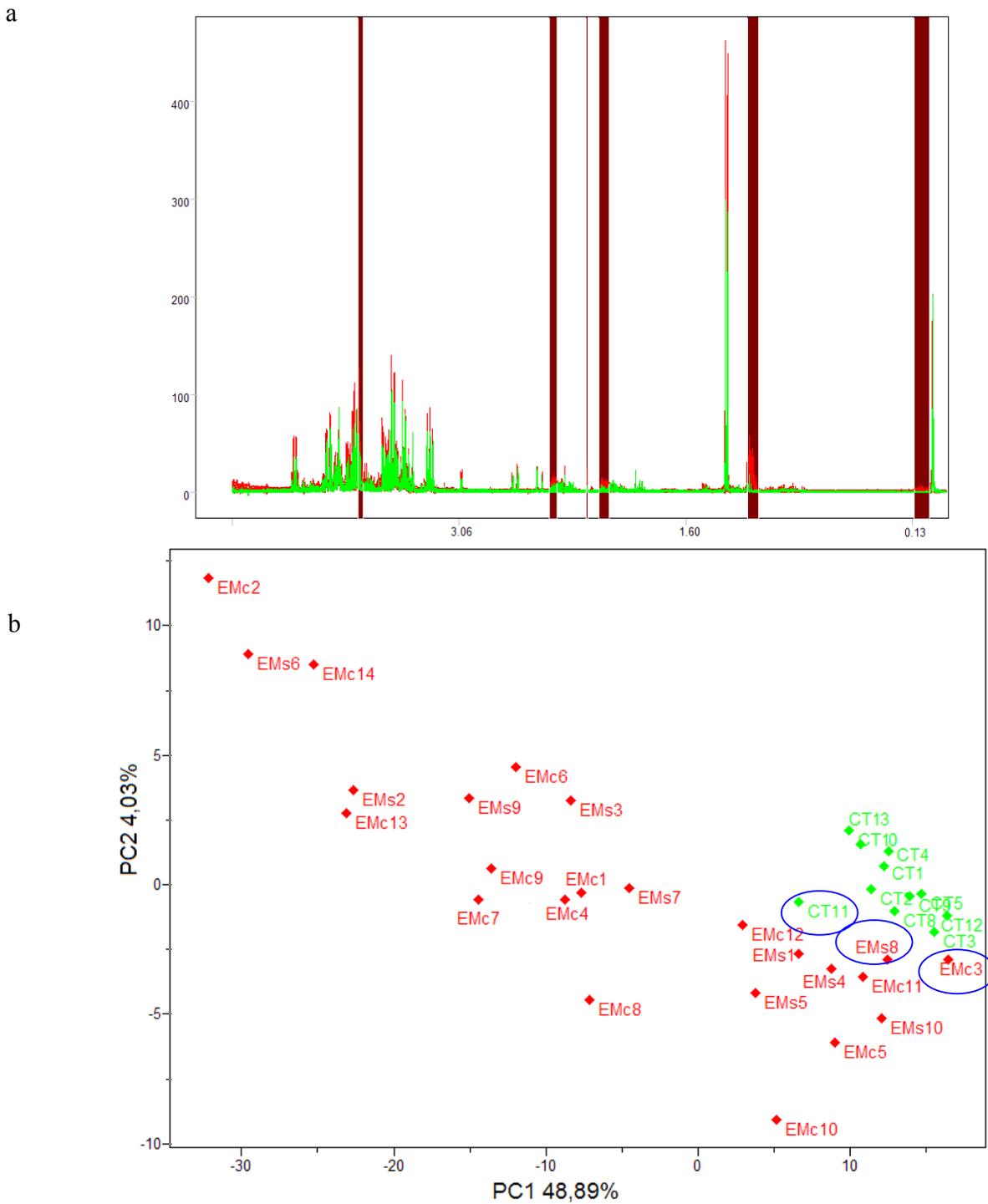


Figura 41. a) Sobreposição dos espectros de pacientes EM (vermelho) e controle (verde) assinalando em marrom as regiões responsáveis pela separação em dois grupos por PLS, **b)** Análise por PLS dos dados, assinalados em azul as amostras presentes na interface entre os grupos (discrepantes no HCA).

Os principais sinais responsáveis pelas separações entre os grupos de paciente EM e controles por PLS (**Figura 41b**) foram: 1) o sinal alargado em 0,065 ppm referente à presença de proteína na amostra (**Figura 43a**); 2) o dubleto em 1,17 ppm referente ao grupo γ -CH₃ do BHB (**Figura 43b**); 3) o singlete em 2,23 ppm referente ao grupo CH₃ do acetoacetato⁷¹ (**Figura 43c**); 4) os multipletos em 2,08 e 2,09 (β -CH₂) da glutamina, o multipleteo em 2,14 ppm (CH₃) do glutamato, um multipleteo em 2,36 ppm (γ -CH₂) do glutamato e um multipleteo em 2,41 ppm (γ -CH₂) da glutamina (**Figura 43c e 44**) e 5) um dubleto em 1,47 ppm da alanina (**Figura 44**). Estes sinais apareceram apenas na amostras de pacientes EM (vermelho), não aparecendo nas amostras dos controles (verdes).

Esses resultados foram confirmados pela análise hierárquica de agrupamentos (HCA), na qual foram selecionadas as mesmas variáveis utilizadas no PLS (**Figura 41a**). Para a obtenção do dendograma foram utilizados distância Euclidiana e método de conexão incremental (**Figura 42**).

⁷¹ Foxall, P. J. D.; Nicholson, J. K.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 793-811.

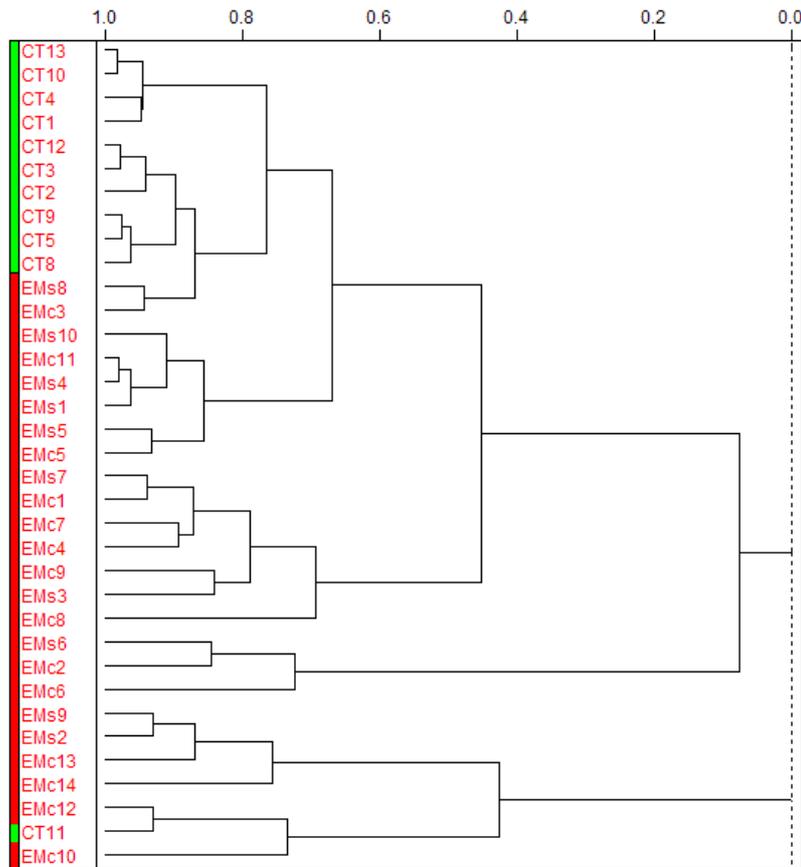


Figura 42. Dendrograma dos scores autoescalados.

No HCA (**Figura 42**) nota-se que das amostras controles, apenas a amostra CT11 está fora do grupo controle e das amostras EM apenas duas amostras se apresentam próximas aos controles: EMc3 e EMs8, este resultado confirma os resultados obtidos por PLS (**Figura 41b**) no qual estas amostras estão na interface entre os grupos controle e EM.

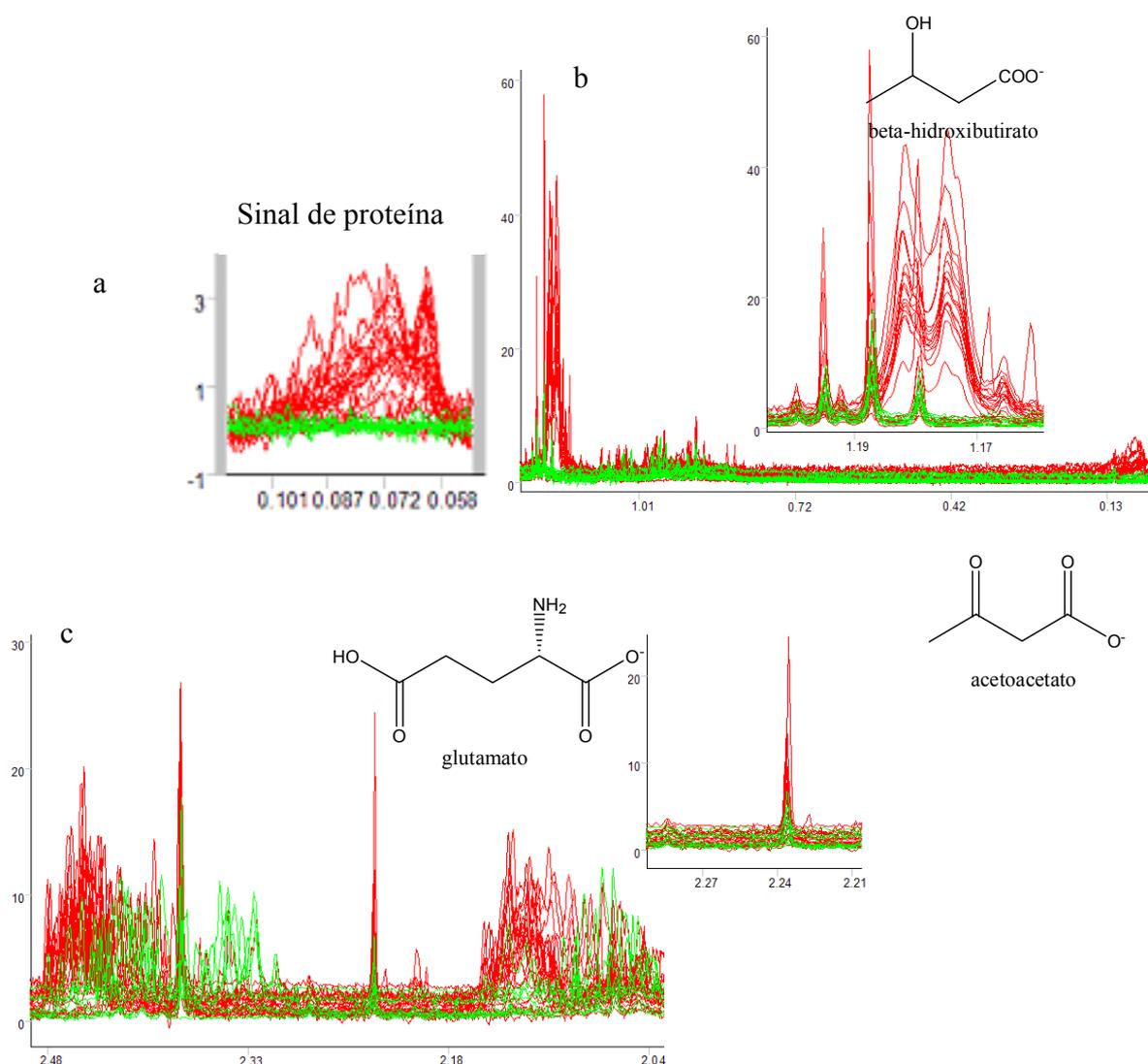


Figura 43. Sobreposição dos 33 espectros selecionados para análise; **a)** Ampliação da região do espectro de RMN de ^1H de (0,058 a 0,110 ppm) mostrando um sinal alargado referente à presença de proteína, **b)** Ampliação da região de (0,15 a 1,25 ppm) mostrando em 1,17 ppm o duplete referente ao grupo $\gamma\text{-CH}_3$ do BHB **c)** Ampliação da região de (2,04 a 2,50 ppm) mostrando em 2,23 ppm o singlete referente ao grupo CH_3 do acetoacetato. Nesta região também aparecem multipletos em 2,08 e 2,09 ($\beta\text{-CH}_2$) e 2,41 ppm ($\gamma\text{-CH}_2$) da glutamina e 2,14 ppm (CH_3) e 2,36 ppm ($\gamma\text{-CH}_2$) do glutamato e um singlete em 2,36 ppm referente ao CH_2 do piruvato, estes compostos aparecem predominantemente nos pacientes EM (vermelho).

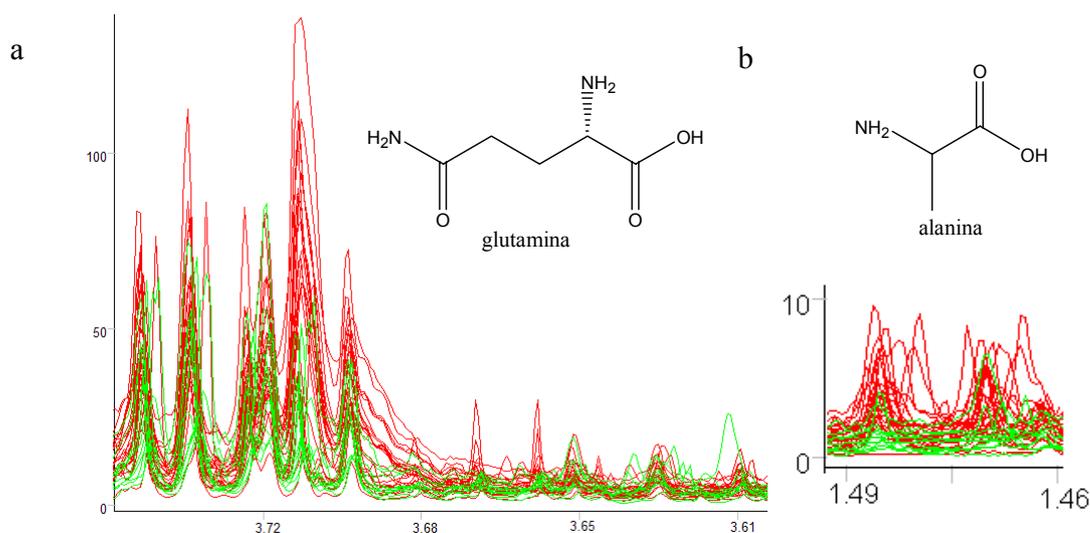
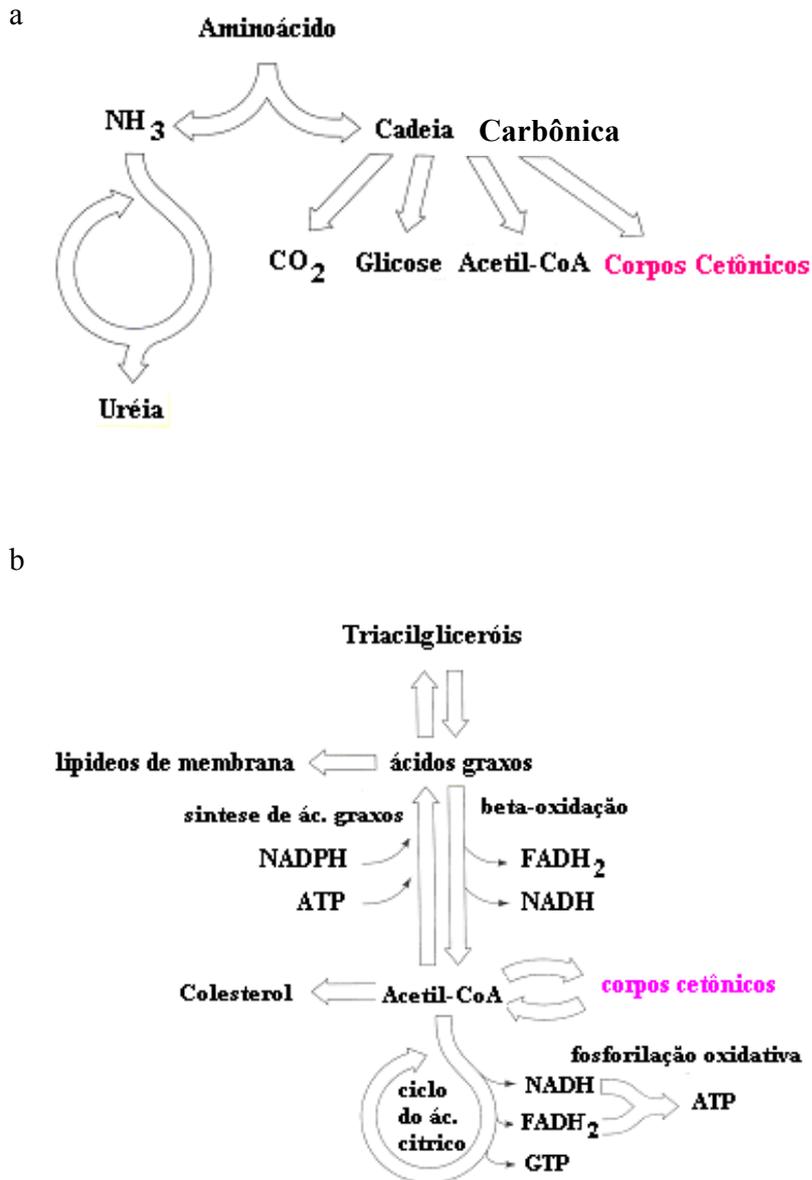
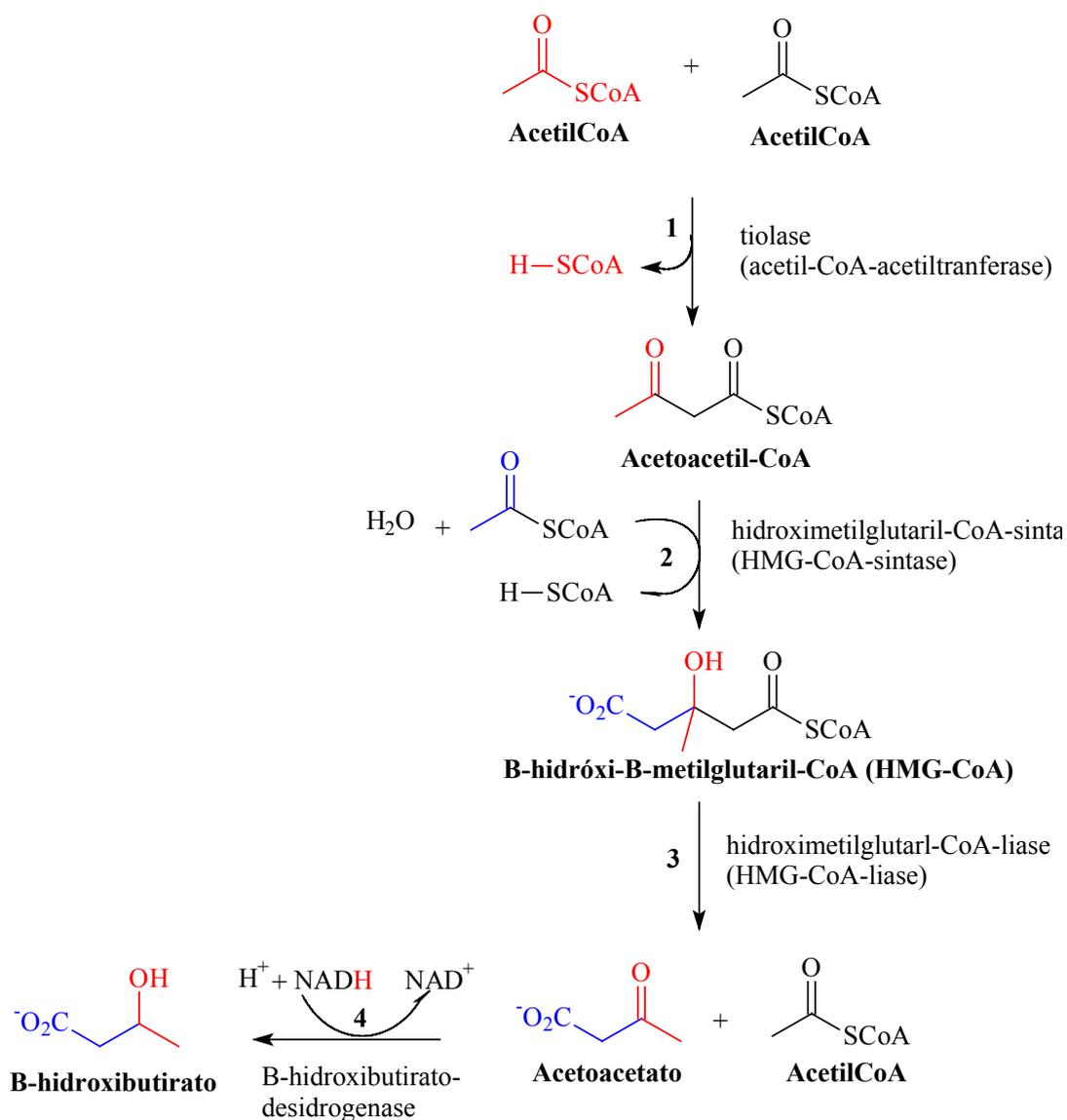


Figura 44. Sobreposição dos 33 espectros selecionados para análise; **a)** ampliação da região do espectro de RMN de ^1H de (3,65 a 3,90 ppm) mostrando em 3,70 ppm o tripleto referente ao grupo $\alpha\text{-CH}_2$ da glutamina que só aparece em maior concentração nas amostras dos pacientes EM (vermelho) e **b)** ampliação da região do dubleto em 1,47 ppm referente ao grupo $\beta\text{-CH}_3$ da alanina.

A análise das principais rotas metabólicas revelou que a glutamina, o glutamato e a alanina estão relacionados com a degradação de proteínas. Já o BHB e o acetoacetato, denominados de *corpos cetônicos* (**Esquema 7a, 7b e 8**), fazem parte de uma rota alternativa a rota da glicose para obter energia no caso de jejum prolongado, sendo carregados através da corrente sanguínea em condições normais para o coração e músculo esquelético e para o cérebro em condições anormais. Entretanto, é importante ressaltar que tanto os pacientes EM como os controles foram submetidos às mesmas condições de coleta das amostras. Dessa forma, o incremento das concentrações desse metabólito apenas nos pacientes com EM pode ser um indicio de alteração metabólica e não de jejum.



Esquema 7. a) Visão geral do catabolismo de aminoácidos. O grupo amino é removido e incorporado na uréia para eliminação. A cadeia carbônica remanescente (α -cetoácido) pode ser quebrada até CO_2 e H_2O ou convertida em glicose, em acetil-CoA ou em corpos cetônicos. **b)** Resumo do metabolismo dos lipídeos.



Esquema 8. Conversão metabólica de Acetil-CoA em corpos cetônicos. O acetoacetato é formado a partir da acetil-CoA em 3 etapas. (1) Duas moléculas de Acetil-CoA condensam-se para formar o acetoacetil-CoA. (2) Uma condensação de Claisen entre a acetoacetil-CoA e uma terceira acetil-CoA forma o β -hidróxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). (3) A HMG-CoA é degradada a acetoacetato e a acetil-CoA em uma clivagem pela HMG-CoA-liase. (4) o acetoacetato é reduzido pela β -hidroxibutirato-desidrogenase formando o β -hidroxibutirato.

Acredita-se que o aumento na concentração do acetoacetato e do BHB (corpos cetônicos) no CSF de pacientes EM, seria decorrente de uma atividade enzimática anormal do cérebro, acarretando a degradação de proteínas e fosfolipídios nos neurônios resultando na desmielinização destes pacientes constatada por MRI. A presença de proteínas, como comentado anteriormente foi comprovada no grupo de pacientes EM pelo sinal em 0,065 ppm e pelos testes de IgG. Estas proteínas poderiam ser responsáveis pela degradação da parte lipídica e proteica da mielina, a qual daria origem aos corpos cetônicos originados “*in situ*”.

Consistente com esta hipótese, foi observado nos pacientes EM, um aumento nas concentrações dos aminoácidos glicogênicos como: alanina, glutamato e glutamina, os quais, seriam provenientes da degradação da mielina, mas não seriam transformados em fonte alternativa de energia. Enquanto, que os aminoácidos cetogênicos seriam transformados corpos cetônicos e utilizados como fonte de energia não alterando suas concentrações em relação aos pacientes controle.

Além disso, esta segunda parte do trabalho demonstrou como a RMN aliada às análises quimiométricas tem auxiliado no monitoramento das mudanças metabólicas de amostras de CSF, permitindo não só a caracterização dos metabólitos, bem como a correlação com o diagnóstico e a progressão da doença.

Conclusão do Capítulo II

6 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO II

Esta segunda parte do trabalho abordou a aplicação de técnicas de RMN de ^1H com supressão de água, acopladas a métodos quimiométricos (HCA, PCA e PLS), para análise das rotas metabólicas do CSF de paciente com EM.

Vale ressaltar que a otimização do experimento de RMN de ^1H com supressão de água foi essencial, já que as amostras de CSF não foram liofilizadas. Esta técnica acoplada as análises quimiométricas forneceram bons resultados permitindo o relato de um biomarcador (β -hidroxibutirato) em amostras de CSF de pacientes com EM.

A presença do β -hidroxibutirato apenas nas amostras de EM sugere que o cérebro de pacientes com EM utilize as proteínas e fosfolipídios resultantes da desmielinização como fonte alternativa de energia. Este dado foi corroborado pelo sinal em 0,065 ppm nas amostras de pacientes EM o qual foi atribuído a proteínas proteolíticas responsáveis pela degradação da mielina.

Fica, pois, registrado neste capítulo, a importância da RMN e da metabonômica para desvendar detalhes bioquímicos de problemas da área médica. Este trabalho consiste num dos primeiros exemplos deste tipo no nosso instituto.

Parte Experimental

7 PARTE EXPERIMENTAL

CAPITULO 1

7.1 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES

7.1.1 *Preparação das amostras*

As amostras de Albumina de soro bovino (BSA, Aldrich) foram preparadas em 600 μL de D_2O (99 %) e 20 mM de solução tampão fosfato (pH=7,0). A concentração da proteína foi de 90 μM . À solução de BSA foram adicionados os ligantes: ácido salicílico (9,84 mM, Aldrich), cafeína (10,2 mM, Carlo Erba), ácido cítrico (10,5 mM, Reagen), ácido adípico (10,4 mM, Aldrich) e D-glucose (10,0 mM).

A Hsp70 foi preparada em 100 mM de NaCl e 20 mM de tampão tris-HCl. Uma alíquota de 600 μL dessa proteína foi liofilizada e ressuspensa em 600 μL de D_2O com concentração final de 10 μL . Sua conformação, após liofilização, foi confirmada através de dicroísmo circular. À solução de Hsp70 foram adicionados ATP (1 mM) e ADP (1 mM).

A Hsp70 foi cedida pelo Dr. Carlos H. I. Ramos (Laboratório Nacional de Luz Sincrotron) e pela Profª. Dra. Ljubica Tasic (IQ-UNICAMP) e a Angiotensina 2 foi cedida pelo Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (UNESP/Araraquara).

7.1.2 *Espectroscopia de dicroísmo circular*

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO (J-720) em cubeta circular de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram registrados em um intervalo de 195 a 250 nm, a 25°C, com uma média de 8 varreduras. Os espectros das proteínas sem liofilizar e depois de liofilizadas foram comparados e permitiram afirmar que as mesmas não sofreram mudanças em suas conformações.

7.1.3 *Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)*

Todos os experimentos unidimensionais de RMN foram realizados em espectrômetros Varian INOVA-500 ($B_0 = 11,7$ T), operando a 499,885 MHz para ^1H . O espectrômetro Varian INOVA-500 ($B_0 = 11,7$ T), é equipado com sondas de 5 mm para detecção indireta (com acessórios de gradiente de campo lineares pulsados localizado na coordenada z), pulso seletivo e estações de trabalho Sun para processamento de espectros via rede.

As amostras foram analisadas em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro. O sinal de deutério do solvente foi utilizado para ajuste da homogeneidade do campo magnético.

Os experimentos unidimensionais foram adquiridos utilizando “*softwares*” padrões Varian sob condições típicas, como seguem. Os espectros foram processados nas estações de dados utilizando o programa *VNMR* do equipamento (Varian, *Inc.*).

7.1.4 Técnicas Unidimensionais e *trNOE*

RMN de 1H

Os espectros de RMN de 1H foram adquiridos com pulsos de 30° (duração do pulso: 2,5-4,0 μs), janela espectral de 8 kHz (número de pontos 32 K), tempos de aquisição (at) e espera de reciclagem (d_1) de 3,0 s e 1,0 s, respectivamente. Foram acumulados cerca de 32-64 transientes e a resolução digital do espectro de 0,5 Hz/ponto. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm, tomando-se como padrões de referência interna o trimetilsililpropionato de sódio (TSPA, 0,00 ppm) ou HOD (4,67 ppm).

Experimento de Difusão

Nos experimentos de difusão realizados neste trabalho foi utilizada uma seqüência (Dbppste) de gradiente de campo pulsado. Essa seqüência foi escolhida, pois é a seqüência ideal para sistemas de ligantes complexados a macromoléculas que apresentam rápida relaxação transversal (T_2).

O programa de processamento de dados (macro DOSY no espectrômetro VARIAN) envolve a seleção dos sinais por altura ou área para serem processados na análise, onde cada sinal apresenta um decaimento exponencial específico. Os coeficientes calculados para cada sinal selecionado foram listados, juntamente com os respectivos desvios padrão. O valor do coeficiente de difusão e do desvio padrão de cada espécie envolvida na análise foi dado através da média aritmética de todos os coeficientes da mesma espécie. Coeficientes com valores diferentes daqueles apresentados pela maioria de uma mesma espécie foram descartados.

A forma final é um espectro de pseudo 2D onde numa dimensão temos os deslocamentos químicos de hidrogênio e na outra os coeficientes de difusão.

As condições e os procedimentos passo a passo de DOSY estão descritos abaixo no experimento de DOSY-NOESY.

NOE pumping VARIAN (passo a passo)

Como mostrado na Figura 2, p. 17, o experimento de NOE pumping* é composto de uma seqüência de eco estimulado seguido por uma típica seqüência de NOESY 1D.

PASSO 1: Fazer o shim automático na freqüência do deutério. Entrar no pacote WATER selecionar a seqüência de pulsos PRESAT e adquirir um espectro com $pw=0,5$ $nt=1$ $gain=0$, colocar o cursor no sinal da água e digitar movetof. Fazer $satfrq=tof$, $nt=1$, $gain='n'$ e $pw=6,5$ e selecionar AUTOCALIBRATE NOW. Este método calibra a posição e a potência do pulso de saturação (tof). Em seguida adquirir um espectro de RMN de 1H com $d_1=2$ s, $satpwr=6$, $satmode='ynn'$, $composit='n'$ e $nt=16$.

PASSO 2 (calibrar o gradiente): Fazer um experimento de NOE pumping com tempo de mistura de 0,001s e variando a força de gradiente até que a intensidade do sinal restante seja de no máximo 5%. Dessa forma, escolhe-se a magnitude do gradiente de forma a cancelar todos os sinais das moléculas pequenas em solução. Depois de otimizar o gradiente deve-se otimizar o tempo de mistura.

* Escrita por Bruce Adams, Palo Alto, VARIAN.

Tabela 11. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de NOE pumping das amostras BSA/ligantes (mistura 1)

Condições experimentais	
Nome da seqüência	noepump
Instrumento	INOVA-500
Solvente	D ₂ O
	Ligante: ≈10 mM
Concentração	Proteína: 90 µM
Referência	2,5 mM de <i>d</i> ₄ -TSPA
sfrq (frequência)	499,88 MHz
tn (núcleo)	¹ H
at (tempo de aquisição)	3,28 s
np (número de pontos)	65,5 K
sw (janela espectral)	10000 Hz
d1 (tempo de espera)	1,5 s
nt (número de transientes)	1536
lb (constante para apodização exponencial)	5
pw (largura do pulso de 90°)	6,5
gzlvl (amplitude de gradiente)	38,11 G.cm ⁻¹
delta_t (tempo de difusão)	150 ms
gt	0,002 ms
tau	0,0025 ms
mix (tempo de mistura)	Variou 50, 300, 600 e 900 ms
spin	off
temperatura	25°C

Tabela 12. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de NOE pumping das amostras Hsp70/ATP e Hsp70/ADP

Condições experimentais	
Nome da seqüência	noepump
Instrumento	INOVA-500
Solvente	D ₂ O
	Ligante: 1 mM
Concentração	Proteína: 10µM
Referência	2,5 mM de <i>d</i> ₄ -TSPA
sfrq (frequência)	499,88 MHz
tn (núcleo)	¹ H
at (tempo de aquisição)	3,28 s
np (número de pontos)	31,4 K
sw (janela espectral)	4792,1 Hz
d1 (tempo de espera)	1,5 s
nt (número de transientes)	1536
lb (constante para apodização exponencial)	5
pw (largura do pulso de 90°)	7,0
gzlv11 (amplitude de gradiente)	38, 11 G.cm ⁻¹
delta_t (tempo de difusão)	150 ms
gt	0,002 ms
tau	0,0025 ms
mix (tempo de mistura)	Variou 400 e 600 ms
spin	off
temperatura	25°C

STD

No experimento de STD** (Figura 3, p. 21) a irradiação da proteína foi realizada na região de 1,0 a -1,0 ppm, variando de acordo com a estrutura da proteína. A irradiação fora da faixa de frequência dos H da proteína foi realizada em 30 ppm (fora da janela espectral) onde nenhum sinal da proteína ou do ligante estão presentes. Os espectros de STD 1D foram multiplicados por uma função de alargamento de linha de 1-3 Hz antes da transformada de Fourier. A potência de irradiação do pulso seletivo em todos experimentos de STD foi de $(\gamma/2\pi)B_1 = 86$ Hz. A pré-saturação seletiva dos hidrogênios da proteína foi realizada através de um trem de pulsos Gaussianos de duração de 50 ms cada, separados por um intervalo de 1 ms. O número de repetições (n) do pulso seletivo determina o período de saturação, o valor padrão de n é 40, levando a um tempo de saturação de 2,04 s. O tempo adicional (d_1) foi de 100 ms. Se os ligantes estudados tiverem longos tempos de relaxação, este intervalo pode ser aumentado, de modo que não apareçam artefatos espectrais. O número total de FIDs acumulados foi de 256 para BSA e 1024 para Hsp70, e a largura espectral foi de 12 ppm, normalmente. Todos os espectros de STD 1D das amostras contendo os ligantes foram obtidos com uma trava de spin de 30 ms, chamada de filtro $T_{1\rho}$, depois do pulso de 90° , que elimina o sinal residual da proteína facilitando a análise. Como a trava de spin provoca um leve decréscimo na intensidade do sinal dos ligantes também, o espectro referência (controle) foi adquirido da com uma trava de spin de mesma intensidade a fim de minimizar este efeito. Os experimentos tiveram duração aproximada de 30 min a 1 h. cada.

** Sequência cedida pelo Dr. Miquel Pons (Universidade de Barcelona)

STD VARIAN (passo a passo)

PASSO 1: igual ao experimento NOE pumping. Ainda dentro do PRESAT, calibrar o pw e colocar o cursor sobre o sinal da proteína e digitar dn='1H' e sd para achar o valor de dof.

PASSO 2 (STD controle): Chamar a seqüência STD_cont. Colocar os valores de tof e pw calibrados anteriormente. Digitar satfrq=tof, selfrqs=tof, selfrq=selfrq1, cycles1=50 e d1=1. Este experimento é adquirido com metade do valor de nt que é usado no STD, pois neste não há subtração espectral.

PASSO 3 (STD): Para este experimento colocar d1=1, cycles1=igual ao valor usado no STD controle, satfrq=tof, selfrqs=tof, selfrq=dof, nt=2 vezes o valor usado no experimento de STD controle.

PASSO 4 (cálculo do epitopo): Para calcular as percentagens de interação e o mapa de epitopo é necessário adquirir um espectro de STD e um espectro de STD controle da mesma amostra, nas mesmas condições. O espectro de STD controle fornecerá a intensidade I_0 dos sinais, enquanto que o espectro de STD fornecerá as intensidades I_{SAT} . De posse desses valores calcula-se as proporções de interação a partir da equação $(I_0 - I_{SAT})/I_0$. O mapa de epitopo consiste na normalização do sinal mais intenso para 100 %.

Tabela 13. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de STD das amostras BSA/ligantes (mistura 1, 2 e 3)

Condições experimentais	
Nome da seqüência	satxfer1d
Instrumento	INOVA-500
Solvente	D ₂ O
	Ligante: ≈10 mM
Concentração	Proteína: 90 µM
Referência	2,5 mM de d ₄ -TSPA
sfrq (frequência)	499,88 MHz
tn (núcleo)	¹ H
at (tempo de aquisição)	0,6 s
np (número de pontos)	14,4 K
sw (janela espectral)	12000 Hz
d1 (tempo de espera)	1 s
nt (número de transientes)	256
tof (transmitter off set)	-162,3
pw (duração do pulso de 90°)	6,5
satmode	'ny'
selfrq (posição de irradiação da proteína)	-2731,2
selfrqs	-162,3
selshape	Gauss
selpwr	4
selpw	50000
selshapes	Gauss
selpwrs	13
selpws	3740,1
slpwr	35

slpw	62,337
mix	10 ms
gzlv11	34,68 G.cm ⁻¹
gt1	0,001 ms
gzlv12	11,43 G.cm ⁻¹
gt2	0,001 ms
gstab	0,0004 ms
hsglv1	16,14 G.cm ⁻¹
hsgt	0,015 ms
Cycles1 (número de ciclos)	Variou 25, 50, 75, 100 e 150
spin	off
temperatura	25°C

Tabela 14. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de STD das amostras Hsp70/ATP e Hsp70/ADP

Condições experimentais	
Nome da seqüência	satxfer1d
Instrumento	INOVA-500
Solvente	D ₂ O
	Ligante: 1 mM
Concentração	Proteína: 10µM
Referência	2,5 mM de d ₄ -TSPA
sfrq (frequência)	499,88 MHz
tn (núcleo)	¹ H
at (tempo de aquisição)	0,6 s
np (número de pontos)	14,4 K
sw (janela espectral)	12000 Hz
d1 (tempo de espera)	1 s

nt (número de transientes)	2048
tof (transmitter off set)	-173,9
pw (duração do pulso de 90°)	7,5
satmode	'ny'
selfrq (posição de irradiação da proteína)	(-2423,5 = 0,19 ppm); (-2219,6 = 0,59 ppm) e (-2102,0 = -0,15 ppm)
selfrqs	-173,9
selshape	Gauss
selpwr	4
selpw	50000
selshapes	Gauss
selpwrs	13
selpws	3740,1
slpwr	35
slpw	62,337
mix	10 ms
gzlv11	34,68 G.cm ⁻¹
gt1	0,001 ms
gzlv12	11,43 G.cm ⁻¹
gt2	0,001 ms
gstab	0,0004 ms
hsglv1	16,14 G.cm ⁻¹
hsgt	0,015 ms
Cycles1 (número de ciclos)	Variou 25, 50, 75, 100, 150 e 200
spin	off
temperatura	25°C

WaterLOGSY VARIAN (passo a passo)

Nas amostras contendo D₂O foram adicionados 10 % de H₂O para aquisição dos espectros de WaterLOGSY.

Na seqüência de pulsos do WaterLOGSY^{***} (Figura 4, p. 30) o primeiro pulso seletivo de 180° não requer alta seletividade. Os primeiros dois pulsos de gradiente (PFG) tiveram duração de 1-2 ms e potência de 6 G.cm⁻¹. Essa potência é suficiente para destruir a magnetização indesejada, e ao mesmo tempo, evita perda de sinal devido à difusão ocorrida entre o primeiro e o segundo pulso de gradiente. Um curto tempo de recuperação de 1-2 ms é aplicado ao final do tempo de mistura antes do pulso de detecção. A supressão da água foi realizada com a seqüência de WATERGATE.

PASSO 1 igual ao experimento de NOE pumping.

PASSO 2 (calibração do pulso sobre o sinal da H₂O): Após adquirir o espectro de RMN de ¹H, na mesma janela, selecionar o sinal HDO com dois cursores, selecionar PBox - 180°- eburp - close - name: W_shape (determinar pw90=6.5 e potência= 56). Dessa forma, formata-se o pulso seletivo na frequência da água e obtêm-se os valores de pws1 e pwslvl1, que serão colocados na seqüência WaterLOGSY. Importante ressaltar que os valores de pws1 devem ser bem próximo a 50 ms e pwslvl1 deve ficar entre 4 -6.

PASSO 3 (WaterLOGSY): Sobre o experimento anterior chamar a seqüência WaterLOGSY (wlogsy_noe) ajustar os valores de tof, satfrq=tof, pws1, pwslvl1, mix, nt e adquirir o espectro com um nt mínimo de 32.

^{***} Seqüência cedida pelo Dr. Miquel Pons (Universidade de Barcelona)

Tabela 15. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de WaterLOGSY da amostra BSA/ligantes (mistura 1)

Condições experimentais	
Nome da seqüência	wlogsy_noe
Instrumento	INOVA-500
Solvente	D ₂ O + 10% H ₂ O Ligante: ≈ 10 mM
Concentração	Proteína: 90 µM
Referência	2,5 mM de <i>d</i> ₄ -TSPA
sfrq (frequência)	499,88 MHz
tn (núcleo)	¹ H
at (tempo de aquisição)	0,6 s
np (número de pontos)	9,6 K
sw (janela espectral)	8003 Hz
d1 (tempo de espera)	2 s
nt (número de transientes)	512
tof (transmitter off set)	-167,3
pw (duração do pulso de 90°)	6,5
satmode	'nn'
shape	Gauss
pws	3549
pwslvl	13
shape1	W_shape
pws1 (duração do pulso seletivo p/ H ₂ O)	49150 µs (otimizado pelo pBox)
pwslvl1 (potência do pulso seletivo na H ₂ O)	6 (otimizado pelo pBox)
led	0,002 ms
satfrq	-167,3
mix (tempo de mistura)	Variou 100, 300, 500, 800 e 1000 ms

temperatura	25°C
spin	off

Tabela 16. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de WaterLOGSY das amostras Hsp70/ATP e Hsp70/ADP

Condições experimentais	
Nome da seqüência	wlogsy_noe
Instrumento	INOVA-500
Solvente	D ₂ O + 10% H ₂ O
	Ligante: 1 mM
Concentração	Proteína: 10µM
Referência	2,5 mM de <i>d</i> ₄ -TSPA
sfrq (frequência)	499,88 MHz
tn (núcleo)	¹ H
at (tempo de aquisição)	0,6 s
np (número de pontos)	9,6 K
sw (janela espectral)	8003 Hz
d1 (tempo de espera)	2 s
nt (número de transientes)	1024
tof (transmitter off set)	-171
pw (duração do pulso de 90°)	6,5
satmode	'nn'
shape	Gauss
pws	3549
pwslvl	13
shape1	W_shape
pws1 (duração do pulso seletivo p/ H ₂ O)	49150 µs (otimizado pelo pBox)
pwslvl1 (potência do pulso seletivo na H ₂ O)	6 (otimizado pelo pBox)

led	0,002 ms
satfrq	-167,3
mix (tempo de mistura)	500 ms
spin	off
temperatura	25°C

7.1.5 *Técnica Bidimensional*

DOSY-NOESY

O experimento de DOSY-NOESY**** (Figura 5, p. 32) consiste numa seqüência de eco estimulado, seguida por uma seqüência de NOESY.

PASSO 1 (calibrar o tempo de mistura com experimento NOESY): Através de um experimento de NOESY variar o tempo de mistura (τ_m) de forma a observar NOE intermolecular.

**** Seqüência cedida pelo Dr. Elliott Gozansky (Universidade do Texas)

Tabela 17. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de NOESY da amostra BSA/ligantes (mistura 1)

Condições experimentais	
Nome da seqüência	noesy
Instrumento	INOVA-500
Solvente	D ₂ O
	Ligante: ≈ 10 mM
Concentração	Proteína: 90 μM
Referência	2,5 mM de d ₄ -TSPA
sfrq (frequência)	499,88 MHz
tn (núcleo)	¹ H
at (tempo de aquisição)	0,24 s
np (número de pontos)	2048 K
sw = sw1(janela espectral)	4254,4 Hz
d1 (tempo de espera)	1,5 s
nt (número de transientes)	64
ni (número de incrementos)	2 X 256
pw (duração do pulso de 90°)	6,7
phase	1,2
mix (tempo de mistura)	100 e 300 ms
spin	off
temperatura	25°C

PASSO 2 (experimento de difusão para calibrar g): Fazer um experimento de difusão (DBPPSTE) variando a força do gradiente (gzlvl) de forma a obter o decaimento do sinal.

Tabela 18. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de difusão (DBPPSTE) da amostra BSA/ligantes (mistura 1)

Condições experimentais	
Nome da seqüência	dbppste
Instrumento	INOVA-500
Solvente	D ₂ O
	Ligante: \approx 10 mM
Concentração	Proteína: 90 μ M
Referência	2,5 mM de <i>d</i> ₄ -TSPA
sfrq (frequência)	499,88 MHz
tn (núcleo)	¹ H
at (tempo de aquisição)	3,28 s
np (número de pontos)	65,5 K
sw (janela espectral)	10000 Hz
d1 (tempo de espera)	5,0 s
nt (número de transientes)	32
pw (duração do pulso de 90°)	7,2
gzlv11 (magnitude do gradiente))	3,81 a 49,54 G.cm ⁻¹
del (tempo de difusão)	150 ms
spin	off
temperatura	25°C

Este experimento possibilitou a construção do gráfico do logaritmo neperiano da intensidade do sinal $\ln(A)$ versus a magnitude do gradiente ao quadrado g^2 para o ligante (Figura 19b, p. 49).

Tabela 19. Valores de g^2 e $\ln(I)$ para o ácido salicílico (1)

gzlv11	gcal	g (gzvlv1 x gcal)	g^2	Intensidade do sinal	$\ln(A)$
3000	0,003811	11,43	130,71	17,64	2,870
5000	0,003811	19,05	363,1	15,41	2,735
7000	0,003811	26,68	711,7	12,81	2,550
9000	0,003811	34,30	1176	9,90	2,293
11000	0,003811	41,92	1757	7,27	1,984

Plotando-se $\ln(I)$ versus g^2 foi possível obter o valor da intensidade do sinal (A_0) para gradiente igual a zero. A partir da regressão linear da reta foi possível obter o valor da intensidade do sinal para $g=0$. Dessa forma foi possível calcular o plano de difusão para o ácido salicílico (1):

$$\ln A = \ln A_0 - D_n \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) (\delta \gamma g)^2$$

Substituindo os valores experimentais na fórmula, calcula-se o valor do gzlv1.

$$2,87 = 2,937 \left[-5,91 \cdot 10^{-6} \left(150 \cdot 10^{-3} - \frac{2 \cdot 10^{-3}}{3} \right) (26,751 \cdot 10^3 g 2 \cdot 10^{-3})^2 \right]$$

$$g = 1350$$

PASSO 3 (DOSY-NOESY): Os parâmetros experimentais otimizados foram o tempo de mistura (τ_m) 300ms e a força do gradiente (gzlvl) 1350.

Tabela 20. Condições experimentais utilizadas para realizar espectro de DOSY-NOESY da amostra BSA/ligantes (mistura 1)

Condições experimentais	
Nome da seqüência	DOSY_NOESY
Instrumento	INOVA-500
Solvente	D ₂ O
	Ligante: \approx 10 mM
Concentração	Proteína: 90 μ M
Referência	2,5 mM de <i>d</i> ₄ -TSPA
sfrq (frequência)	499,88 MHz
tn (núcleo)	¹ H
at (tempo de aquisição)	0,24 s
np (número de pontos)	2048 K
sw = sw1(janela espectral)	4238 Hz
d1 (tempo de espera)	1,5 s
nt (número de transientes)	50
pw (duração do pulso de 90°)	6,5
gzlvl (magnitude do gradiente)	1350 (5,15 G.cm ⁻²)
diff (tempo de difusão)	150 ms
gt	0,003 ms
eddy	0,007 ms
gths	0,007 ms
gzhs	0,003 ms
recover	0,02 ms
mix	300 ms

spin	off
temperatura	25°C

CAPITULO 2

As amostras de CSF foram obtidas por punção lombar. Para análise por RMN ^1H foram adicionados 500 μL de líquido cerebrospinal (CSF) a 100 μL de D_2O contendo 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de trimetilsililpropionato de sódio- d_4 (TSPA) em tubos de RMN de 5 mm. As amostras de líquido cerebrospinal foram cedidas pelo Prof. Dr. Fernando Cendes (FCM-UNICAMP) e seu aluno de doutorado Fabiano Reis.

Os espectros foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA-500 ($B_0 = 11,7$ T), operando a 499,886 MHz para ^1H , usando sonda tripla de ressonância (H, C, N) de 5 mm. O sinal residual da água foi suprimido usando seqüência de pulsos PRESAT (pacote WATER), procedimento igual ao **PASSO 1** do experimento de NOE pumping. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e referenciados em relação ao TSPA calibrado para 0 ppm.

Tabela 21. Condições experimentais utilizadas para realizar os espectros de RMN de ^1H das amostras de CSF

Condições experimentais	
Nome da seqüência	Water2
Instrumento	INOVA-500
Solvente	100 μL de D_2O e 500 μL de H_2O
Referência	2,5 mM de d_4 -TSPA
sfrq (frequência)	499,88 MHz
tn (núcleo)	^1H
at (tempo de aquisição)	2,73 s
np (número de pontos)	65,5 K
sw (janela espectral)	12000 Hz
d1 (tempo de espera)	1,5 s
nt (número de transientes)	64
pw (duração do pulso de 90°)	6,5
temperatura	25°C

Toda análise quimiométrica (HCA, PCA e PLS-DA) foi realizada pela Profa. Dra. Márcia Miguel Castro Ferreira do IQ/UNICAMP com o programa Pirouette (software Infometrix).