Universidade de São Paulo

Instituto de Física

Bioestimulação da proteína de membrana Na,K-ATPase por laser
de baixa intensidade: atividade e propriedades estruturais

Gustavo Scanavachi Moreira Campos

Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto de Física para a obtenção do título
de Mestre em Ciências

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Rosângela Itri (Orientadora) (IFUSP)

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa (IFUSP)

Prof. Dr. Pietro Ciancaglini (FFCLRP/USP)

São Paulo, São Paulo - 2014

-
-
-

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

Campos, Gustavo Scanavachi Moreira

Bioestimulação da proteína de membrana Na,K-ATPase por laser de baixa intensidade: atividade e propriedades estruturais. São Paulo, 2014.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Departamento de Física Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Rosangela Itri

Área de Concentração: Estrutura dos Líquidos e Sólidos; Cristalografia

Unitermos: 1. Biofísica; 2. Física da matéria condensada; 3. Proteínas da membrana; 4. Laser de estado sólido; 5. Física.

USP/IF/SBI-082/2014

Dedicatória

Aos meus pais Jefferson e Ana Maria,

Que são meus exemplos de dedicação, amor e que jamais mediram esforços para prover o melhor possível. Obrigado pelo incansável incentivo, por eu ter um corpo nesta nova experiência e lembrem-se que sem vocês eu não chegaria a lugar algum, logo, minhas conquistas são suas também! Minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos Carol e Filipe,

*Companheiros de jornada que sempre cuidaram de mim por eu ser o mais novo!
Obrigado pelos exemplos de conduta, pela amizade, pelo amor imensurável e certamente pelos bons exemplos de bons estudantes que foram e continuam sendo!*

Ao Luis Gabriel,

*Sobrinho maravilhoso que ainda não completou o seu segundo ano de vida!
“Neném”, hoje você ainda não sabe ler (nem falar) e já se tornou o ser mais amado de toda a família! Bem vindo!*

Agradecimentos Especiais

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade bendita e aos espíritos amigos pelas inspirações e por sempre estarem presentes! Que os irmãos possam sempre me auxiliar a trilhar o melhor caminho.

Às minhas avós que sempre me encheram de orgulho pelos admiráveis exemplos de dedicação e força! Aos meus avôs que já se encontram no plano espiritual, especialmente, ao “vô” Luís que nos deixou muita saudade, sempre lembrado por todos por sua alegria, felicidade e amor!

Às minhas tias, tios, primas e primos!

Ao meu cunhado Gean e à minha cunhada Rachel!

Aos meus amigos Alessandro e Victor, que conviveram comigo por 5 anos na mesma república! Aos atuais amigos de república Artur e Claudio!

Aos amigos de infância de Mucuri!

Aos amigos de Resende Bella, Fred, Gui, João, Marcio, Pereira, Pelife, Nath, Silvana... já estamos a 6 anos distantes mas continuamos com a mais nobre amizade!

Aos amigos que longe se encontram Carol, Duda, Haidar, Valentina, Ze...!

Aos amigos de São Paulo que fazem desta cidade minha casa: Arthur S., Babi, Chris, Gerson, Lari, Tamara...! Aos amigos da Física e dos times de esportes!

Aos colegas de Laboratório de São Paulo Andreza, Pradeep, Raffa e Robert pelas inúmeras horas de conversas, risadas e por tornarem o local de trabalho muito agradável. Às funcionárias Ellen e Lia pela disposição em ajudar.

Aos amigos de Ribeirão Preto que me acolheram em sua república Bruno, Gil, Lucas, Vitor S. e Victor F.! E à Elisa e família pelos almoços deliciosos!

Aos colegas de Laboratório de Ribeirão Preto Amanda, Ana, Bruno, Camila, Cris, Dani, Heitor, Juliana, Larissa, Maytê, Simone e Thuanny que me acolheram no laboratório com muita amizade, companheirismo e sempre estiveram dispostos em ajudar. Obrigado!

E por fim, mas não menos importante, à orientadora Rosângela Itri! Muito obrigado pela oportunidade de aprendizado e trabalho, por dividir os conhecimentos científicos, por estar sempre à disposição em ajudar e pelas inúmeras horas dispensadas para que este projeto fosse concluído!

Agradecimentos

Ao professor Pietro Ciancaglini pela oportunidade de utilizar a infraestrutura do seu laboratório e pelo auxílio na preparação e execução dos experimentos.

Ao professor Leandro Ramos Souza Barbosa pelas inúmeras discussões sobre os resultados e auxílio nas análises de SAXS.

Ao pesquisador Mateus Borba Cardoso pela preparação da linha de SAXS 1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Aos professores e funcionários do Instituto de Física – USP e da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pela bolsa e auxílios concedidos ao laboratório,

*“Nascer, morrer, renascer ainda e
progredir sempre, tal é a lei.”*

Allan Kardec.

Índice

ÍNDICE DE GRÁFICOS	II
ÍNDICE DE EQUAÇÕES	V
ÍNDICE DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIACÕES	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
1.1. NA, K-ATPASE	1
1.2. BIOESTIMULAÇÃO DE NA,K-ATPASE POR IRRADIAÇÃO DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA	6
<u>2. OBJETIVOS</u>	<u>10</u>
2.1. GERAL:	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	10
<u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>11</u>
3.1. FRAÇÃO DE MEMBRANA RICA EM NA,K-ATPASE	12
3.2. SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE NA,K-ATPASE EM C ₁₂ E ₈	13
3.3. NA,K-ATPASE RECONSTITUÍDA EM PROTEOLIPOSSOMO	14

3.4.	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV/VISÍVEL	15
3.5.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA: MÉTODO DE HARTREE	17
3.6.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO: MÉTODO DE HEINONEM E LAHTI	20
3.7.	MEDIDA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA: CINÉTICA DESCONTÍNUA	22
3.8.	ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)	25
3.9.	ESPALHAMENTO DE RAIO-X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS)	31
3.10.	BIOESTIMULAÇÃO DA NA,K-ATPASE POR LASER DE BAIXA POTÊNCIA	40
4.	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	43
4.1.	NA,K-ATPASE SOLUBILIZADA E PURIFICADA EM C₁₂E₈: ESTUDO INICIAL POR SAXS E DLS ..	43
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DE NA,K-ATPASE EM C₁₂E₈ APÓS UTILIZAÇÃO DE FILTRO DE 220 NM....	47
4.2.1.	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS	47
4.2.2.	ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	50
4.2.3.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONCENTRAÇÃO	53
4.2.4.	CONCLUSÕES PARCIAIS: NA,K-ATPASE SOLUBILIZADA E PURIFICADA EM C ₁₂ E ₈	54
4.3.	EFEITO DA ADIÇÃO DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO NOS ESTADOS AGREGADOS/OLIGOMÉRICOS DA NA,K-ATPASE SOLUBILIZADA E PURIFICADA EM C₁₂E₈: ANÁLISE DE SAXS	59
4.4.	BIOESTIMULAÇÃO DA NA,K-ATPASE	73
4.4.1.	FRAÇÃO DE MEMBRANA RICA EM NA,K-ATPASE	73
4.4.2.	NA, K-ATPASE RECONSTITUÍDA EM PROTEOLIPOSSOMO.....	76
4.4.3.	COMPARAÇÃO DA IRRADIAÇÃO ENTRE NA,K-ATPASE EM FRAÇÃO DE MEMBRANA E RECONSTITUÍDA EM PROTEOLIPOSSOMO	78
4.4.4.	CONCLUSÕES SOBRE A BIOESTIMULAÇÃO DA NA,K-ATPASE.....	84

<u>5.</u>	<u>CONCLUSÃO</u>	<u>91</u>
------------------	-------------------------------	------------------

<u>7.</u>	<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>93</u>
------------------	---------------------------------	------------------

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema da Na,K-ATPase adaptado de Morth e col (2007). O esquema apresenta as três subunidades (α, β, γ) e os três domínios intracelulares de α (A, N, P). A subunidade α está em vermelho, a β está amarelo e a γ está em verde claro. O domínio A está em roxo, o N está em marrom e o P está em laranja. Em azul está o C-terminal.	2
Figura 2 – Esquematização do Ciclo de Albers-Post (adaptado de Gadsby e col (2012)).	4
Figura 3 – Efeitos da irradiação com laser tipo diodo (InGaAIP, 685 nm, 25 mW) na atividade da Na,K-ATPase (0,1 mg/mL) presente em: (■) fração de membrana, (●) solubilizada em C ₁₂ E ₈ e (▲) vesículas de DPPC:DPPE. (Extraído de Santos e col (2007)).	8
Figura 4 - Rim ao ser extraído (esquerda), rim cortado ao meio (direita), pedaço maior ainda não sofreu incisões e pedaço menor já está preparado para ser triturado.	12
Figura 5- Espectroscopia de Absorção.	15
Figura 6- Esquema de Espalhamento de Luz Dinâmico (extraído de Giacomelli (2009)).	26
Figura 7 - Arranjo experimental esquemático utilizado na técnica de SAXS (adaptado de Barbosa e col. (2012)).	32
Figura 8 - Representação de Kratky para três conformações da BSA (extraído de Barbosa e col (2012)).	35
Figura 9 – Estrutura cristalográfica do dímero ($\alpha\beta$) ₂ da Na,K-ATPase (Kanai et al., 2013) à esquerda. À direita está a estrutura cristalográfica do monômero ($\alpha\beta$). A cor muda gradualmente do N-terminal (azul) até o C-terminal (vermelho) para as subunidades α e β (Kanai et al., 2013).	39

Figura 10 – Esquema do procedimento de irradiação.	40
Figura 11 – Membrana porosa de 220 nm.	47
Figura 12 - Gráfico de AUC para amostra de Na,K-ATPase solubilizada em C ₁₂ E ₈ e filtrada obtido por Yoneda (2014). Distribuição do coeficiente de sedimentação c(S) vs. Coeficiente (S) das amostras de Na,K-ATPase solubilizada após a filtração (100 nm) nas concentrações de 60 µg/mL (preto) e 100 µg/mL (vermelho). A corrida foi de 14 h com uma velocidade de 12000 rpm, a 13 °C (Extraído de Yoneda (2014)).	55
Figura 13 - Propriedades das espécies observadas nos experimentos a 12000 rpm (Extraído de Yoneda (2014)).	56

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Calibração da concentração de proteína pelo método de Hartree, utilizando BSA.	19
Gráfico 2 - Absorção x Comprimento de onda para solução padrão de Fosfato.	21
Gráfico 3 - Absorção em 355nm para solução padrão de Fosfato.	22
Gráfico 4 – Medida de Atividade pelo método descontínuo em função da solução de proteína.	24
Gráfico 5 – Curvas de SAXS de Na, K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ , concentração da proteína de 0,8 mg/mL, submetida a diferentes doses de irradiação (A). (B) curvas teóricas de SAXS do monômero e dímero (PDB 3WGV – Kanai et al., 2013), obtidas pelo programa CRY SOL (Svergun et al., 1995). (C) função de distribuição de distâncias p(r) correspondentes às intensidades de espalhamento das amostras de Na,K-ATPase submetidas a diferentes doses de irradiação e do monômero e do dímero.	44

Gráfico 6 - Medidas de DLS identificando a existência de diferentes populações na amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ , concentração da proteína era de 0,55 mg/mL, atividade específica de 415 U/mg.	46
Gráfico 7 – Espectro de Absorção para Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ antes e após filtração com poro de 220 nm.	48
Gráfico 8 - Absorção em 280 nm da enzima Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ em função do tempo.	49
Gráfico 9 - DLS para analisar a influência do filtro na amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ . A concentração era de 0,68 mg/mL e 0,55 mg/mL, antes e após a filtração, respectivamente.	51
Gráfico 10 - DLS da amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ em função do tempo. A concentração da proteína era de 0,54 mg/mL.	52
Gráfico 11 - Atividade Específica em função da concentração da Na, K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ em relação ao filtro de 220nm.	53
Gráfico 12 - Aumento da atividade específica da Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ e perda de concentração após utilizar o filtro de 220 nm.	54
Gráfico 13 – Função de distribuição de distâncias, p(r), para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ antes e após a utilização do filtro com poro de 100 nm.	60
Gráfico 14 - SAXS para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ ausência de SDS e na presença de 0,5 mM e 1 mM de SDS (A), a concentração da proteína era de 0,46 mg/mL. (B) SAXS para o monômero e o dímero teóricos (PDB 3WGV). Os mesmos dados são apresentados com a intensidade de espalhamento em escala logarítmica nos gráficos inseridos em (A) e (B).	61

Gráfico 15 - (A) Representação de Kratky para o monômero e o dímero teóricos (PDB 3WGV) e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ na ausência de SDS e adicionando 0,5 mM e 1 mM de SDS à amostra purificada. (B) comparação entre a amostra de proteína na ausência de SDS e as curvas teóricas; (C) comparação entre a amostra de proteína com adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS; e (D) comparação entre as curvas experimentais. A concentração da proteína era de 0,46 mg/mL. 62

Gráfico 16 - (A) Representação de Guinier para o monômero e o dímero teóricos (PDB 3WGV) e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS à amostra purificada. As setas indicam o maior valor de q utilizado no ajuste de uma equação linear: amostras experimentais (seta azul), monômero e o dímero teóricos (seta preta). (B) curvas teóricas (símbolos abertos) com os respectivos ajustes de uma equação linear (linha sólida); (C) curvas experimentais (símbolos abertos) com os respectivos ajustes de uma equação linear (linha sólida). A concentração da proteína era de 0,46 mg/mL. 64

Gráfico 17 – (A) Função de distribuição de distâncias para o monômero e o dímero teóricos (PDB 3WGV) e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS. (B) comparação entre a amostra de proteína na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS; (C) comparação entre a amostra de proteína após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS e o dímero teórico. A concentração da proteína era de 0,46 mg/mL. 66

Gráfico 18 - Atividade específica da Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ seguida de adição de SDS. A concentração da proteína era de 0,46 mg/mL 70

Gráfico 19 - Biomodulação da Na,K-ATPase presente na fração de membrana. A concentração da proteína era de 1,53 mg/mL. Para cada ponto experimental foram

irradiados 100 μ L de amostra para realizar medidas de atividade em triplicata (3 medidas de 30 μ L de amostra).	74
Gráfico 20 - Monitoramento da variação da atividade da Na,K-ATPase em fração de membrana em função do tempo pós irradiação. A concentração da proteína era de 1,53 mg/mL. Cada ponto experimental corresponde as medidas de irradiação de 100 μ L de amostra para realizar medidas de atividade em triplicata (3 medidas de 30 μ L de amostra).	75
Gráfico 21 - Biomodulação da Na,K-ATPase reconstituída em proteolipossomo. A concentração da proteína era de 1,68 mg/mL. Para cada ponto experimental foram irradiados 35 μ L de amostra para realizar medidas de atividade em triplicata (3 medidas de 10 μ L de amostra).	76
Gráfico 22 - Variação da atividade da Na,K-ATPase reconstituída em proteolipossomo em função do tempo pós irradiação. A concentração da proteína era de 1,68 mg/mL. Cada ponto experimental corresponde as medidas de irradiação de 35 μ L de amostra para realizar medidas de atividade em triplicata (3 medidas de 10 μ L de amostra).....	77
Gráfico 23 – Irradiação com o laser de $\lambda = 532$ nm: Proteolipossomo x Fração de membrana.	79
Gráfico 24 – Irradiação com o laser $\lambda = 650$ nm: Proteolipossomo x Fração de membrana.	80
Gráfico 25 – Irradiação com o laser $\lambda = 780$ nm: Proteolipossomo x Fração de membrana.	82

Índice de Equações

Equação 1 - Lei de Beer Lambert.....	15
--------------------------------------	----

Equação 2 – Atividade Enzimática.....	24
Equação 3 - Atividade Enzimática Específica.....	25
Equação 4 - Exemplo de Atividade Específica.	25
Equação 5 – Módulo do Vetor de Espalhamento de Luz.	26
Equação 6 - Intensidade média do campo elétrico associado ao feixe de luz espalhado.	27
Equação 7 – Função de auto correlação.	27
Equação 8 - Equação de Siegert para sistemas dífluidos.....	28
Equação 9 - Relação entre função de auto correlação do campo elétrico e a taxa de decaimento da função de auto correlação do campo elétrico.	28
Equação 10 - Taxa de decaimento e coeficiente de difusão translacional das partículas espalhadoras.....	28
Equação 11 - Equação de Stokes-Einstein.	29
Equação 12 - Relação entre auto correlação do campo elétrico, taxa de decaimento da função de auto correlação do campo elétrico e coeficiente de difusão para uma distribuição polidispersa de tamanhos de partículas.....	29
Equação 13 - Equação do Z average.	30
Equação 14 - Índice de polispersão.	30
Equação 15 – Módulo do vetor de espalhamento utilizado para análise dos dados de SAXS.	32
Equação 16 - Intensidade de Espalhamento de SAXS.	33
Equação 17 - Intensidade de Espalhamento de SAXS para sistema isotrópico.	33
Equação 18 - Intensidade de SAXS para sistema isotrópico e não interagente.	34
Equação 19 - Lei de Guinier.....	35

Equação 20 - Equação Linear para representação de Guinier.	36
Equação 21 - Raio de giro de Guinier obtido a partir do contraste de densidade eletrônica $\delta\rho r$	36
Equação 22 - Transformada de Fourier para obter $p r$	37
Equação 23 - Raio de Giro obtido a partir da função de distribuição de distâncias pr ..	37
Equação 24 - Raio de giro para solução com diferentes estados oligoméricos.....	38
Equação 25 - Definição de Potência.....	41
Equação 26 - Definição de Dose.	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Patologias relacionadas à Na,K-ATPase (Tabela extraída de Rose e Valdes, 1994).....	5
Tabela 2 - Comparação do raio de giro e distância máxima obtidos pela função de distribuição de distâncias para o monômero e o dímero e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ após irradiações. Como os valores de R_g e D_{max} são os mesmos para todas amostras medidas, estes valores estão apresentados uma única vez na coluna Amostras experimentais.	45
Tabela 3 - Coeficientes do ajuste linear obtidos para o monômero e o dímero teóricos e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS à amostra purificada.....	65
Tabela 4 - Valores de $R_g G$ e $I(0)$ obtidos através da lei de Guinier para o monômero e o dímero e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C ₁₂ E ₈ na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS à amostra purificada.....	65

Tabela 5 - Comparação do raio de giro obtido pela lei de Guinier e pela função de distribuição de distâncias para o monômero e o dímero teóricos e para a Na,K-ATPase solubilizada em C ₁₂ E ₈ e purificada na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS à amostra de proteína purificada.....	67
--	----

Lista de Abreviações

ADP – Adenosina Difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

AUC – Ultracentrifugação Analítica

BSA – Albumina de Soro Bovino

C₁₂E₈ – Octaetileno Glicol Monododecil Éter

Cys – Cisteína

DLS – Espalhamento de luz dinâmico

DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPE – Dipalmitoilfosfatidiletanolamina

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

KCl – Cloreto de Potássio

HEPES – Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico

PDB – Protein Data Bank (Banco de dados de proteínas)

Phe – Fenilalanina

RPM – Rotações Por Minuto

SAXS – Espalhamento de raios-X a baixos ângulos

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TCA – Ácido Tricloroacético

TDS - Tris dodecil sulfato;

Tris – Tris-(hidroximetil)-aminoetano

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

Resumo

A Na, K-ATPase é uma proteína que realiza o transporte ativo de cátions, se encontra na membrana plasmática de praticamente todas células animais e é formada por três subunidades: α (110 kDa), β (50 kDa) e γ (10 kDa).

Neste trabalho, realizou-se a extração da proteína Na,K-ATPase de rim de coelho que foi preparada em 3 diferentes condições (i) fração de membrana rica em Na,K-ATPase; (ii) solubilizada e purificada em C12E8 e (iii) reconstituída em DPPC: DPPE lipossomo (1:1 – lipídio:lipídio, 1:3 – lipídio:proteína).

Através de medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Espectroscopia de Absorção (ABS) e Espalhamento de Raio-X a Baixos Ângulos (SAXS), associadas à medidas de atividade enzimática, constatou-se que a amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ é constituída por diferentes agregados/oligômeros em solução. Com o intuito de eliminar os grandes agregados/oligômeros da amostra realizou-se a filtração (poro de 220 nm) e a adição do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) e ambos procedimentos foram capazes de eliminar as populações de grandes agregados e/ou grandes oligômeros. A retirada destas populações pelo filtro promoveu um aumento de atividade específica da enzima. Já o SDS deve promover alterações conformacionais na estrutura da proteína que causam a inativação da mesma.

Investigou-se variações de atividade da Na, K-ATPase através da irradiação da proteína presente em fração de membrana e reconstituída em lipossomo por meio de três lasers de baixa intensidade com comprimentos de onda diferentes: $\lambda = 532$ nm (5 mW), $\lambda = 650$ nm (50 mW) e $\lambda = 780$ nm (50 mW). Demonstrou-se que a variação da atividade

enzimática depende do valor de dose de energia depositada, independe do comprimento de onda estudado neste intervalo e retorna para o nível basal após 6 horas.

Abstract

The Na, K-ATPase is an active cation transporter protein, which is found in the plasma membrane of virtually all animal cells and it is comprised of three subunits: α (110 kDa), β (50 kDa) and γ (10 kDa).

In this work, we performed the extraction of protein Na, K-ATPase from the kidney of adult rabbit for three different enzyme preparations (i) membrane-bound fraction; (ii) C₁₂E₈ solubilized and purified and (iii) reconstituted in DPPC: DPPE liposome (1: 1 - lipid: lipid, 1:3 - lipid:protein).

Dynamic Light Scattering (DLS), Absorption Spectroscopy (ABS) and Small Angle X-ray Scattering (SAXS) were employed, associated with enzyme activity measurements. The results revealed that Na, K-ATPase C₁₂E₈-solubilized and purified is composed by different aggregates/oligomers. With the aim of eliminating large aggregates/oligomers from the protein sample, filtration (pore size 220 nm) and surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) addition were used. Both procedures were able to eliminate populations composed of large aggregates and/or large oligomers. The removal of these populations by the filter promoted an increase in the specific activity of the enzyme. On the other hand, SDS must promote conformational changes in the protein structure that inactivate thereof.

Finally, here we also investigated variations of Na, K-ATPase activity present in the membrane-bound fraction and reconstituted in liposome under irradiation of three low-intensity lasers with different wavelengths: $\lambda = 532$ nm (5mW), $\lambda = 650$ nm (50 mW) and $\lambda = 780$ nm (50 mW). The results give support to the conclusion that the change in the enzymatic activity depends upon the amount of energy dose deposited, it is

independent of the wavelength in the studied range and returns to the basal level after 6 hours.

1. Introdução

1.1. Na, K-ATPase

A proteína Na,K-ATPase é uma proteína de membrana celular que está presente em quase todas as células eucariotas e controla direta ou indiretamente muitas funções celulares essenciais (Rose e Valdes, 1994).

Esta proteína faz parte da família das ATPases tipo P, que representam uma família de transportadores ativos de íons caracterizados pela formação de um estado intermediário fosforilado (Kaplan, 2002; Apell, 2004). A Na,K-ATPase utiliza a energia livre de Gibbs originada na hidrólise do ATP para transportar os íons de Na^+ para fora e K^+ para dentro da célula (Apell, 2004). Este transporte é ativo, pois ocorre contra o gradiente de concentração de cada um dos íons e para cada molécula de ATP hidrolisada são transportados 3 íons de Na^+ e 2 íons de K^+ (Skou e Esmann, 1992). Em um animal em repouso, cerca de 25% do ATP celular é consumido pela Na,K-ATPase (Martin, 2005).

O transporte ativo realizado pela Na,K-ATPase gera o potencial eletroquímico ao longo da membrana citoplasmática que fornece energia para o transporte secundário intracelular de metabólitos e nutrientes como a glicose e os aminoácidos, e íons como o cálcio, cloretos e fosfatos. Além disso, este potencial eletroquímico é essencial para a regulação do volume celular e para o potencial de ação dos músculos e transmissão do impulso nervoso (Rose e Valdes, 1994; Apell, 2004; Skou e Esmann, 1992).

A Na,K-ATPase pode ser formada por diferentes associações entre duas subunidades principais α e β (Rose e Valdes, 1994). Uma estrutura cristalizada foi obtida por Morth e col (2007), e está esquematizada na Figura 1. A subunidade α (Figura 1) possui massa molecular de aproximadamente 110 kDa e contém aproximadamente 1000

resíduos de aminoácidos (Jorgensen et al., 2003). Possui 10 segmentos do tipo transmembrana 5 alças extracelulares e 4 intracelulares em sua estrutura (Jorgensen et al., 2003; Kaplan, 2002; Kühlbrandt, 2004; Yoneda, 2014). A parte extracelular compreende os domínios A (atuador), N (ligação do nucleotídeo) e P (fosforilação) (Figura 1). O domínio N é o de ligação do ATP e o domínio P catalisa a transferência do grupo γ -fosforil para a enzima (Figura 1). Durante o ciclo catalítico, o domínio P interage com o domínio N levando a auto fosforilação. Além disso, o domínio P interage com o domínio A levando a desfosforilação (Kaplan, 2002; Reinhard et al., 2012; Yoneda, 2014).

Figura 1 - Esquema da Na,K-ATPase adaptado de Morth e col (2007). O esquema apresenta as três subunidades (α , β , γ) e os três domínios intracelulares de α (A, N, P). A subunidade α está em vermelho, a β está amarelo e a γ está em verde claro. O domínio A está em roxo, o N está em marrom e o P está em laranja. Em azul está o C-terminal.

A subunidade β (Figura 1) é composta por cerca de 370 aminoácidos e possui massa molecular aparente de cerca de 50 kDa. Esta subunidade apresenta um único

segmento transmembrana, aproximadamente 30 resíduos são expostos no citosol e 300 formam a porção extracelular (Skou e Esmann, 1992; Hasler et al., 1998; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Funções estão sendo atribuídas à subunidade β : processos relacionados à polaridade da célula, como a adesão e mobilidade celular, transição de célula epitelial a mesenquimal e transformação oncogênica; afinidade aparente da enzima pelo K^+ ; além de ser essencial para a translação, estabilidade e correta inserção da subunidade α na membrana (Hasler et al. 1998; Barwe et al., 2007).

Além das subunidades α e β , a Na,K-ATPase, em alguns tecidos, pode apresentar outra subunidade que modula a atividade da enzima pela mudança da afinidade aparente pelo sódio, potássio e ATP (Gerring, 2008). Esta subunidade é chamada de γ (Figura 1), possui um único segmento transmembrana e uma massa molecular de cerca de 10 kDa (Gerring, 2006).

A menor unidade funcional da Na,K-ATPase ligada à membrana ainda não é conhecida. Alguns autores defendem que um monômero $\alpha\beta$ (Ward e Cavieres, 1993; Martin et al., 2000; Takeda e Kawamura, 2001) é suficiente para a enzima ser ativa e manter a estrutura, mas outros defendem que é necessário um oligômero de ordem maior, podendo ser um dímero $(\alpha\beta)_2$ (Thoenges e Schoner, 1997; Antolovic et al., 1999; Santos e Ciancaglini, 2003; Laughery et al., 2004; Pilotelle-Bunner et al., 2008) ou até mesmo um tetrâmero $(\alpha\beta)_4$ (Mahaney et al., 1990; Taniguchi et al., 2001; Donnet et al., 2001). Apesar de não haver um consenso nesta questão, sabe-se que as seguintes isoformas são capazes de realizar a atividade catalítica: $\alpha\beta$, $\alpha\beta_2$, $\alpha\beta_3$, $\alpha_2\beta$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\beta_3$, $\alpha_3\beta$, $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_3\beta_3$, $\alpha_4\beta$ e $\alpha_4\beta_3$ (Blanco, 2005).

Além destes oligômeros formados entre α e β , existem as estruturas formadas por apenas uma das subunidades. Em animais muitas isoformas de α e β estão presentes, como

por exemplo a α_1 e β_1 presentes praticamente em todos os tecidos; α_2 e β_2 são encontradas predominantemente no cérebro; α_3 localizada principalmente no coração e no cérebro; α_4 e β_3 encontradas nos testículos (Matin-Vassalo et al., 1989; Rose e Valdes, 1994; Malik et al., 1996; Kühlbrandt, 2004; Blanco, 2005; Madan et al., 2007; Morth et al., 2007).

Em humanos as subunidades são encontradas na forma α no cérebro, olho, coração, rim, pulmão, músculo liso, tireoide e no útero; α_2 no cérebro, olho, coração, músculo liso e tireoide; e α_3 no cérebro, coração e olho e β_4 no coração (Matin-Vassalo et al., 1989; Rose e Valdes, 1994; Malik et al., 1996; Blanco, 2005; Madan et al., 2007; Morth et al., 2007).

A hidrólise do ATP realizada pela Na,K-ATPase é descrita pelo modelo de Albers-Post esquematizado na Figura 2 (Gadsby et al., 2012).

Figura 2 – Esquematização do Ciclo de Albers-Post (adaptado de Gadsby e col (2012)).

Neste ciclo a Na,K-ATPase apresenta dois estados conformacionais distintos: uma forma E₁ que tem alta afinidade pelos íons sódio e os sítios de ligação são acessados pelo meio intracelular. Nesta conformação a enzima libera 2 K⁺ (indicado na Figura 2 com uma seta, as bolas laranjas representam os íons potássio) no interior da célula e 3 Na⁺ (bolas verdes – Figura 2) se ligam, são ocluídas e a proteína é fosforilada. Na forma E₂ a proteína apresenta alta afinidade pelo íon potássio e os sítios de ligação ficam disponíveis para o meio extracelular. Os íons de sódio são liberados no meio externo, os íons de potássio são ligados e a ligação do K⁺ estimula a desfosforilação do estado P-E₂.K₂, liberando um fosfato livre (Pi, indicado pela estrela na Figura 2), resultando no estado ocluído E₂.K₂. Após isto os íons de potássio são liberados no meio intracelular e outra molécula de ATP se liga à enzima para recomençar o ciclo de Albers-Post (Skou e Esmann, 1992; Gadsby et al., 2012).

Como já foi mencionado a Na,K-ATPase está presente em quase todos os animais e possui várias funções fisiológicas. A regulação desta enzima, bem como das isoformas, pode ter um papel importante na etiologia de muitos processos patológicos (Rose e Valdes, 1994). A Tabela 1 abaixo relaciona algumas doenças originadas pela não regulação, por alteração na expressão e/ou mau funcionamento da Na,K-ATPase em humanos.

Patologia	Número de Referências
Doenças Cardíacas	4
Hipertensão	10
Doenças Renais	4
Diabetes e doenças metabólicas	8
Anormalidades Fetais	3
Alzheimer	4
Doenças no Pulmão	3

Tabela 1 - Patologias relacionadas à Na,K-ATPase (Tabela extraída de Rose e Valdes, 1994).

A lista completa com as subdivisões das doenças e com as referências encontra-se no artigo de revisão *Understanding the Sodium Pump and Its Relevance to Disease* escrito por Rose e Valdes, 1994.

Outro papel fisiológico da Na,K-ATPase é contribuir para a manutenção da temperatura corporal. Isto ocorre, pois parte da energia liberada pela hidrólise do ATP é convertida em forma de calor (Noske et al., 2010).

Além disso, a Na,K-ATPase pode ser utilizada como alvo de drogas, por exemplo a subunidade α é o único receptor conhecido de glicosídeos cardíacos e, por isso, é utilizada como alvo de drogas para o tratamento clínico de insuficiência cardíaca e arritmias (MacGregor e Walker, 1993; Schwinger et al., 2003).

1.2. Bioestimulação de Na,K-ATPase por irradiação de laser de baixa potência

Bioestimulação ou Biomodulação são processos pelos quais uma enzima ou proteína tem sua atividade aumentada (ou estimulada) devido a sua interação com a luz (geralmente na região do visível). Existem diversos grupos de pesquisa que centram seus estudos na interação da luz em sistemas biológicos (Letokhov, 1983; Wilson, 1989; Yu et al., 1994; Marra et al., 1997; Walsh, 1997; Kilanczyk et al., 2002; Vinck et al., 2003; Kujawa et al., 2004; Kassak et al., 2006; Hamblin e Demidova-Rice, 2007; Hu et al., 2007; Santos et al., 2007).

De maneira interessante, existem alguns trabalhos na literatura que reportam variação de atividade da Na,K-ATPase após irradiação com laser de baixa potência. Kilanczyk e col (2002) fizeram o estudo da influência de um laser vermelho (670 nm, 7

mW de potência) na atividade enzimática da Na,K-ATPase presente na membrana de células *ghosts* obtidas a partir de eritrócitos humanos.

Cabe acrescentar que as células *ghosts* são resíduos da reação pós-hemolítica de células vermelhas do sangue. Assume-se que estes resíduos são desprovidos de estrutura intracelular e consistem, principalmente, de proteínas transmembranas fixadas à membrana celular (Schwoch e Passow, 1973).

Os autores variaram a dose de energia entre 19 – 95 J/cm² e constataram o aumento da atividade em todos os casos, sendo a maior delas de 400% para a dose de 57 J/cm².

Kujawa e col (2004) utilizaram um laser infravermelho (810 nm, com diferentes potências de saída: 10 mW, 200 mW e 400 mW) para irradiar células *ghosts* obtidas a partir de eritrócitos humanos que continham as proteínas Mg-ATPase e Na,K-ATPase na membrana celular. Neste estudo, os autores demonstraram que as mesmas doses de energia estimulam a atividade enzimática quando entregues em pequenas taxas de dose de energia e inibem a enzima para altas taxas de dose.

Assim como Kilanczyk e col (2002), Kassak e col (2006) realizaram a irradiação de Na,K-ATPase presente em células *ghosts* obtidas a partir de eritrócitos humanos, utilizando um laser verde (532 nm, 30 mW de potência) para este estudo. Os autores reportaram um acréscimo na atividade da Na,K-ATPase de 52% para a dose de 19 J/cm² e que este aumento foi linear em função da dose de energia chegando a 120% para a dose de 63,3 J/cm².

O grupo do Prof. Pietro Ciancaglini (Departamento de Química da USP, Ribeirão Preto) também estudou a influência da interação de luz na atividade da proteína (Santos

et al., 2007). No referido trabalho os autores estudaram a influência da dose de energia depositada (com laser de InGaAIP, 685 nm, 35 mW de potência) na atividade da enzima, sendo que esta foi extraída de membrana de rim de coelho e os estudos foram realizados com diferentes preparações da enzima: i) fração de membrana; ii) solubilizada e purificada na presença do surfactante não iônico C₁₂E₈ e iii) reconstituída em lipossomos (com um sistema de membrana modelo, constituído por DPPC:DPPE (1:1) proporção molar).

A Figura 3 reproduz os resultados obtidos (com permissão dos autores) por Santos e col. (2007).

Figura 3 – Efeitos da irradiação com laser tipo diodo (InGaAIP, 685 nm, 25 mW) na atividade da Na,K-ATPase (0,1 mg/mL) presente em: (■) fração de membrana, (●) solubilizada em C12E8 e (▲) vesículas de DPPC:DPPE. (Extraído de Santos e col. (2007)).

Para o sistema da Na,K-ATPase na fração de membrana, foi evidenciado que doses entre 4 – 24 J/cm² não alteram de forma significativa a atividade da proteína. Entretanto, doses de 32 a 40 J/cm² aumentam em cerca de 28 % a atividade ATPase da

proteína, enquanto que doses acima de 40 J/cm^2 não produzem um efeito maior (Figura 3). Por outro lado, para o sistema da enzima reconstituída em lipossomo de DPPC:DPPE (1:1), uma dose de $4 - 8 \text{ J/cm}^2$ levou a um aumento de atividade ATPase da enzima de 36 a 40 %, em relação à proteína não irradiada nas mesmas condições. Os autores também evidenciaram que o aumento da dose após cerca de 8 J/cm^2 não altera de forma significativa a atividade da proteína (Figura 3). O efeito da irradiação na Na,K-ATPase isolada e purificada na presença do surfactante C_{12}E_8 mostrou ser muito similar ao efeito evidenciado na enzima reconstituída em vesículas de DPPC:DPPE (Figura 3).

Embora o aumento da atividade da Na,K-ATPase seja incontestável (Kilanczyk et al., 2002; Kujawa et al., 2004; Kassak et al., 2006; Santos et al., 2007) - Figura 3), o mecanismo de atuação pelo qual a Na,K-ATPase tem sua atividade estimulada; a influência do meio em que está inserida; a dependência do comprimento de onda bem como potência do laser, ainda não foram bem compreendidos.

Assim, nesta dissertação de mestrado temos como objetivo estender o trabalho de Santos e col. (2007), buscando definir se e como a bioestimulação da Na,K-ATPase depende do comprimento de onda dos fótons incidentes, da potência do laser (ou da energia depositada) e da importância do mimético de membrana natural (ou seja, o microambiente onde a enzima está associada: fração de membrana, solubilizada ou reconstituída)

2. Objetivos

2.1. Geral:

O objetivo desta dissertação é investigar as variações de atividade enzimática da Na,K-ATPase, em 3 preparações diferentes: (fração de membrana, solubilizada e purificada C₁₂E₈, ou reconstituída em lipossomos), sob irradiação de fótons de baixa intensidade (potência de laser menor que 50 mW), em três comprimentos de onda diferentes (532 nm - verde, 650 nm - vermelho e 780 nm - infra-vermelho) em função da dose de energia depositada.

2.2. Objetivos Específicos:

- 1) Preparar a proteína nos 3 diferentes preparações (i) fração de membrana rica em Na,K-ATPase; (ii) solubilizada e purificada em C₁₂E₈ e (iii) reconstituída em lipossomo.
- 2) Investigar por SAXS, DLS e Espectroscopia de Absorção possíveis estados de agregação/oligomerização e estabilidade temporal da proteína solubilizada e purificada em C₁₂E₈.
- 3) Determinar as variações da atividade enzimática da Na,K-ATPase nos 3 diferentes meios à ação de lasers (dose de energia depositada e comprimento de onda).

3. Materiais e Métodos

Nesta dissertação de mestrado, todas as preparações da proteína Na,K-ATPase extraída de rim de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), conforme descrição a seguir, foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada: Sistemas Miméticos de Biomembranas do Departamento de Química da FFCLRP/USP de Ribeirão Preto, sob a supervisão do Professor Pietro Ciancaglini e da Doutora Juliana Sakamoto Yoneda. Os procedimentos para obtenção da proteína em membrana natural e purificada em C₁₂E₈ seguiram os protocolos descritos por Santos e col. (2002), enquanto que os procedimentos para a preparação da proteína reconstituída em proteolipossomo estão descritos por Santos e col. (2005).

Os reagentes utilizados neste projeto foram obtidos na melhor pureza disponível no mercado. Adenosina trifosfato (ATP), albumina de soro bovino (BSA), ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etanossulfônico (HEPES), octaetileno glicol monododecil éter (C₁₂E₈), ácido tricloroacético (TCA), tris(hidroximetil)-aminoetano (Tris), dodecil sulfato de sódio (SDS) e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos na empresa Sigma. Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Folin Ciocalteu, imidazol, sulfato de cobre pentahidratado foram comprados na empresa Merck. Acetona, ácido cítrico, carbonato de sódio, hidróxido de sódio, molibdato de amônio, tartarato de sódio e potássio e sacarose foram adquiridas na empresa Mallinckrodt AR. Fosfato de Potássio Monobásico na empresa J.T Baker. Os lipídios dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE) foram comprados na Sigma. Todas as soluções foram preparadas usando água Milli-Q (Millipore Direct-Q, resistência de 18.2 MΩ).

3.1. Fração de membrana rica em Na,K-ATPase

Os rins extraídos dos coelhos foram recebidos como na Figura 4 (esquerda). Utilizando uma tesoura e um bisturi realizaram-se cortes e incisões para remoção das partes indesejadas que foram descartadas. A região de interesse é a parte escura do rim que é rica em Na, K-ATPase (Figura 4).

Figura 4 - Rim ao ser extraído (esquerda), rim cortado ao meio (direita), pedaço maior ainda não sofreu incisões e pedaço menor já está preparado para ser triturado.

As partes de interesse foram colocadas em uma solução tampão (preparação) de Imidazol 20 mM em pH 6.8 contendo sacarose 250 mM, EDTA 6 mM e Tris 6 mM, onde foram trituradas utilizando um homogeneizador (SuperOhm) por 30 segundos (Santos et al., 2002).

A solução homogênea foi centrifugada (Sorvall RC-5B Superspeed Centrifuge) a 10 000 g por 35 min a 4° C. O pellet foi descartado (gorduras e impurezas) enquanto que o sobrenadante foi ultracentrifugado (Hitachi - Himac CP 70MX) a 180 000 g por 1 hora a 4° C (Santos et al., 2002).

Após a ultracentrifugação, o pellet constituído de fração de membrana rica em Na,K-ATPase foi ressuspenso utilizando a solução tampão de preparação mencionada anteriormente. Após estes procedimentos, as amostras foram estocadas na geladeira a 4° C.

3.2. Solubilização e Purificação de Na,K-ATPase em C₁₂E₈

A partir da preparação de membrana natural contendo Na,K-ATPase descrita acima, quantifica-se a concentração da proteína total conforme metodologia que será descrita no item 3.4. Sabendo-se a concentração da proteína na membrana natural, preparou-se uma solução de C₁₂E₈ (98% de pureza, Sigma) com esta mesma concentração. A solubilização em detergente foi feita misturando a solução de C₁₂E₈ com a solução da fração de membrana numa relação proteína:detergente de 1:1 (p/p), a 4°C, e os resíduos não solubilizados foram retirados por centrifugação a 100 000 g por 1 hora a 4° C (Santos et al., 2002).

A Na,K-ATPase solubilizada foi purificada em sistema HPLC Äkta (Amersham Biosciences) empregando-se col.una de Sepharose 6FF (2,6 x 200 cm), equilibrada e eluída com tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e C₁₂E₈ 0,005 mg/mL, a 4°C. O eluato foi monitorado continuamente a 280 nm (banda de absorção do Triptofano, conforme será descrito no item 3.6.1) e as frações coletadas foram acompanhadas por atividade PNFFase (Santos et al., 2002). As frações que apresentaram atividade foram reunidas e concentradas em sistema Amicon (Santos et al., 2002). Após este procedimento as amostras que correspondem a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ foram estocadas na geladeira a 4° C.

3.3. Na,K-ATPase reconstituída em proteolipossomo

A mistura de fosfolípidios DPPC e DPPE na razão molar 1:1 (Santos et al., 2005) foi dissolvida em clorofórmio e espalhada nas paredes internas de tubos de ensaio, seguido de evaporação do solvente através da passagem de uma corrente de nitrogênio. Para garantir a completa remoção do solvente, os filmes lipídicos foram mantidos a vácuo por 1 hora. Em seguida os filmes foram ressuspensos em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e C₁₂E₈ 10 mg/mL e deixados em banho à temperatura de 60°C durante uma hora com agitações a cada 10 minutos em Vortex. Posteriormente a mistura lipídio-detergente foi sonicada por 1 minuto, utilizando-se um sonicador de ponta (VibraCell VC-600) e deixada por 1 hora à temperatura ambiente (Santos et al., 2005, Yoneda, 2014).

À mistura de lipídio-detergente foi adicionada a amostra de proteína solubilizada e purificada em C₁₂E₈ numa razão lipídio-proteína de 1:3, por 10 minutos em banho de gelo. O detergente foi então removido pela adição da resina Bio-Beads (200 mg/mL), em intervalos de 5, 10 e 45 minutos. A resina foi centrifugada em centrífuga clínica (FANEM – Excelsa Baby I, diâmetro = 15 cm) a 3.000 rpm por 10 minutos e, finalmente, a suspensão de vesículas foi ultracentrifugada por 1 hora, a 100.000 g a 4°C, obtendo-se assim os proteolipossomo (Santos et al., 2005; Yoneda, 2014). Este procedimento de preparação de proteolipossomo é chamado de co-solubilização (Santos et al., 2005). As amostras foram estocadas na geladeira a 4° C.

Para se determinar o tamanho do proteolipossomo foram realizadas medidas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando um N5 Submicron Particle Size Analyser (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) equipado com um laser de hélio-neônio (λ

= 632.8 nm). As medidas foram feitas em um ângulo de 90° e os valores obtidos são resultado da média de 5 repetições (5 minutos com intervalos de 1 min entre as medidas). Desta maneira, determinou-se que os proteolipossomo possuíam o diâmetro médio de 700 nm.

3.4. Espectroscopia de Absorção UV/Visível

A espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível é a técnica experimental na qual se incide radiação eletromagnética de comprimentos de onda entre 200 e 800 nm em uma amostra e mede-se a razão da intensidade de luz antes (I_0) e após (I) a amostra (Bernath, 2005), como esquematizado na Figura 5:

Figura 5- Espectroscopia de Absorção.

A equação que descreve a absorção em um meio homogêneo, pouco denso e transparente é dada pela Lei de Beer-Lambert (Goldemberg, 1972):

$$I = I_0 \times 10^{-kL} \quad \text{reescrita como: } A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon Lc, \quad \text{com } k = \epsilon c$$

Equação 1 - Lei de Beer Lambert

onde ϵ é o coeficiente de extinção molar dos centros absorvedores ($M^{-1}cm^{-1}$), L é o caminho ótico (cm) e c é a concentração dos centros absorvedores (M). Em casos onde há espalhamento de luz, o valor de ϵ é dado pela contribuição dos centros absorvedores e dos centros espalhadores, ou seja: $\epsilon_T = \epsilon_{absorção} + \epsilon_{espalhamento}$.

O espectro de absorção de proteínas apresenta apenas 2 bandas de absorção (Leach e Schera, 1960; Noble et al, 2007) na região entre 200 e 300nm, uma centrada em 220 nm devido às ligações peptídicas e outra dada pelas cadeias laterais da Cisteína – Cys (250 nm), Fenilalanina - Phe (257 nm), Tirosina – Tyr (274 nm) e Triptofano – Trp (280 nm) sendo o pico máximo de absorção em 280 nm, pelo fato do coeficiente de extinção molar do Triptofano ser o maior ($\epsilon=5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Coulter et al, 1935; Wetlaufer et al, 1958; Vajdos et al, 1995).

O espectro de absorção para proteínas, que não possuem grupos metálicos, deve ser zero para os comprimentos de onda maiores que 320 nm (Grimsley e Pace, 2004). Caso não seja, valores significativos de absorção devem ser analisados como espalhamento de luz causado pela existência de diferentes estados oligoméricos da proteína na solução. Do ponto de vista experimental, isto ocorre pois o espalhamento de luz reduz a intensidade de fótons após a amostra e o espectrofotômetro identifica absorção como sendo a razão entre a intensidade de luz antes e após a amostra.

Do ponto de vista fenomenológico, este efeito é explicado pelo espalhamento de Rayleigh (Leach e Schera, 1960), que demonstrou que a intensidade do espalhamento de luz depende do inverso do comprimento de onda elevado à quarta potência ($\propto \lambda^{-4}$) e é proporcional ao tamanho do centro espalhador elevado a sexta potência ($\propto d^6$) (Leach e Schera, 1960; Bernath, 2005). Desta maneira, é possível perceber que o espectro de absorção possui contribuição do espalhamento de luz em todos os comprimentos de onda, mas esta contribuição é maior para comprimentos de onda na região dos 200 nm e diminui para maiores comprimentos de onda.

A concentração da proteína pode então ser calculada medindo-se a absorção (A) em 280 nm (proporcional à absorção do Trp) e utilizando-se a equação de Beer-Lambert (Equação 4) (Vajdos et al, 1995; Noble et al, 2007). Entretanto, não foi possível utilizar este método para determinar a concentração da Na,K-ATPase, pois a amostra possuía espalhamento de luz (item 4.1). Sendo assim, a intensidade de absorção não era diretamente proporcional à concentração (Leach e Schera, 1960; Grimsley e Pace, 2004).

Por outro lado, a presença de estados oligoméricos da proteína pode ser evidenciada no espectro de absorção para comprimentos de onda maiores de 320 nm. Desta maneira, utilizamos a técnica de absorção UV-Vis para investigar variações da concentração (em $\lambda = 280$ nm) e as mudanças no estado oligomérico (em $\lambda = 350$ nm) da Na,K-ATPase ao ser filtrada com um filtro com 220 nm de poro (item 4.2). Além disso, o monitoramento do espectro de absorção da Na,K-ATPase foi realizado para investigar a estabilidade da amostra após a filtração (item 4.2).

As medidas do espectro de absorção foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro UV-Vis Ultrospec 5300 Pro da Amersham Biosciences (Amersham Biosciences, Corp, NJ, USA) com uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. O espectro foi medido de 200 a 750 nm com passo e velocidade de varredura de 1 nm e 1856 nm/min, respectivamente

3.5. Determinação da concentração de proteína: Método de Hartree

A determinação da concentração de proteína foi realizada pelo método descrito por Hartree (1972), com algumas adaptações. Este método consiste em adicionar 20 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% (p/v) e 170 μ L de H₂O a 10 μ L de proteína. Na sequência, adiciona-se 180 μ L do Reagente A (2g de tartarato de sódio e potássio, 100g

de carbonato de sódio e 20g de hidróxido de sódio dissolvidos em 1 L de água) aguardando 10 minutos em banho térmico a 50° C; 20 µL do Reagente B (2g de tartarato de sódio e potássio, 1g de sulfato de cobre pentahidratado e 0,4g de hidróxido de sódio dissolvidos em 1 L de água) esperando 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim, adiciona-se 600 µL de Folin Ciocalteau, diluído 15 vezes, aguardando 10 minutos em banho térmico a 50° C. Após esfriar, lê-se a absorbância da mistura em 650nm (Hartree, 1972) e obtém-se o valor da absorção em função do volume da proteína: $Abs/\mu L$.

O método de Hartree (1972) modificou o método de biureto de Lowry e col. (1951) tornando-o mais sensível pela adição do reagente de Folin Ciocalteus. Do ponto de vista bioquímico, o método de Hartree (1972) pode ser explicado da seguinte maneira: a proteína reage com sulfato de cobre alcalino na presença do tartarato de sódio e potássio resultando em um complexo de cobre tetradentado. Este complexo é formado pela ligação de quatro ligações peptídicas com um átomo de cobre (conhecida como reação de biureto) que confere uma coloração violeta de pouca intensidade para amostra. Para deixar o método mais sensível (Hartree, 1972), adiciona-se o reagente de Folin Ciocalteus, que é reduzido ao complexar com os grupos aromáticos da proteína, resultando em um complexo de cor azulada muito intensa que possui absorção entre 650nm e 750nm (Lowry, et al. 1951; Hartree, 1972; Legler, et al. 1985).

O método descrito acima foi utilizado para determinar a concentração da proteína total presente na fração de membrana e da Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ e também da enzima reconstituída em proteolipossomo.

Para utilizar este método é necessário fazer uma curva de calibração com uma proteína padrão. No nosso caso, utilizamos albumina de soro bovino (BSA) na

concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e medimos a absorção em 650 nm para diferentes volumes de proteína, como mostra o Gráfico 1.

Gráfico 1 - Calibração da concentração de proteína pelo método de Hartree, utilizando BSA.

Conforme podemos observar, existe uma relação linear entre o valor de absorção e a quantidade de proteína em solução. Portanto, ao fazer o ajuste linear obtém-se o coeficiente angular, que possui a unidade de medida de $Abs/\mu\text{g}$. O fator padrão é definido como o inverso deste valor, ou seja, em $\mu\text{g}/Abs$.

Para determinar a concentração de uma proteína multiplica-se o valor medido $Abs/\mu\text{L}$ pelo fator padrão determinado $\mu\text{g}/Abs$, resultando na unidade de medida $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, que é a concentração da proteína.

3.6. Determinação da concentração de fosfato: Método de Heinonem e Lahti

A quantificação de fosfato inorgânico proveniente da hidrólise do ATP pela Na,K-ATPase foi determinado pelo método descrito por Heinomen e Lahti (1981).

Inicialmente uma solução padrão de fosfato, foi obtida dissolvendo-se 0,272g de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico) em 800 mL de H_2O , na presença de 10 mL de H_2SO_4 (ácido sulfúrico) e completando com H_2O para 1L, resultando numa concentração de 1 $\mu\text{mol Pi/mL}$. Para se obter a curva de calibração, diferentes volumes da solução padrão de fosfato foram usadas e completado o volume com água para 0,5 mL. A esta solução foi adicionado o volume de 0,5 mL de molibdato de amônio (10mM) agitando por 10 segundos, 1 mL de acetona P.A. agitando por 10 segundos e 0,5 mL de ácido cítrico (0,4M) agitando por 10 segundos.

O Gráfico 2, abaixo, mostra os respectivos espectros de absorção para concentrações crescentes de fosfato, que complexaram com o molibdato e foram estabilizadas pelos outros reagentes.

Gráfico 2 - Absorção x Comprimento de onda para o complexo formado na reação da solução de fosfato padrão com os reagentes descritos no método de Heinonem e Lahti.

Conforme percebemos do Gráfico 2, o máximo de absorção ocorre para comprimento de onda da ordem de 355 nm. Assim, para este comprimento de onda construiu-se o Gráfico 3 de valor de absorção em função da quantidade de fosfato, que resultou numa relação linear. O inverso do coeficiente angular é o fator padrão ($\text{nmol}/_{Abs}$) de proporcionalidade entre volume de fosfato e o valor de absorção.

Gráfico 3 - Absorção em 355nm do complexo formado na reação da solução de fosfato padrão com os reagentes descritos no método de Heinonem e Lahti.

Como o fator padrão é o inverso do coeficiente angular, obtém-se neste caso o valor de $277 (7) \text{ nmol}/Abs$.

3.7. Medida de Atividade Enzimática: cinética descontínua

Como já mencionado anteriormente (item 1.1) a Na,K-ATPase hidrolisa uma molécula de ATP formando uma molécula de adenosina difosfato (ADP) e um fosfato inorgânico (Pi). Pode-se então quantificar a atividade enzimática da proteína medindo-se o Pi utilizando o método descrito por Heinonen e Lathi (1981).

Para medir então a atividade da Na,K-ATPase, o meio reacional foi HEPES 50 mM contendo ATP 3 mM, pH 7,5 em presença de KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM e NaCl 50 mM em volume final de 1,0 mL (Santos et al., 2005). A reação foi iniciada pela adição de enzima ao meio reacional, deixada por um período de tempo pré-estabelecido e cessada pela adição de 0,5 mL de solução gelada de ácido tricloroacético (TCA) 30% (p/v). As

amostras foram centrifugadas a 10 000 rpm, a 10° C por 10 minutos. Na sequência, adicionou-se molibdato de amônio (10mM), acetona P.A. e ácido cítrico (0,4M) seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente (item 3.6). Após este procedimento, a amostra possuía uma cor amarelada e mediu-se a absorção em 355 nm (Heinonen e Lahti, 1981).

As determinações da concentração de fosfato inorgânico (Heinonen e Lahti, 1981) e de concentração da proteína (Hartree, 1972) foram realizadas em triplicata e os correspondentes erros experimentais foram determinados como sendo a diferença entre a média de cada valor e o ponto experimental de maior valor. Isto é feito pois seria inviável realizar a propagação dos erros da atividade, que está ligado com os erros de todo o processo, que por sua vez é muito extenso (se inicia na extração de proteína e segue acumulando incerteza até a medida de absorção).

Para melhor explicar o método de análise da atividade enzimática apresentamos um exemplo no Gráfico 4. Obteve-se os valores da absorção em 355 nm de fosfato inorgânico em função do volume de proteína (mantendo o mesmo tempo de reação, no caso de 20 minutos).

Gráfico 4 – Medida de Atividade pelo método descontínuo em função da quantidade de proteína.

A equação para obter a atividade enzimática é descrita como (Santos et al., 2005):

$$K = \frac{Abs \times 3 \times F}{V (mL) \times t (min)}$$

Equação 2 – Atividade Enzimática.

onde *Abs* é o valor da absorção medido pelo espectrofotômetro, *F* é o fator padrão determinado pela dosagem do fosfato, *V* é o volume da enzima em mL, *t* é o tempo de reação em minutos. A medida de absorção utiliza apenas um terço da amostra, portanto a atividade enzimática precisa ser multiplicada pelo fator de correção: 3.

A unidade de medida da atividade enzimática, *K*, é U/mL , onde adota-se $U = \frac{n \text{ mol } Pi}{t (min)}$.

Outra grandeza obtida é a atividade enzimática específica, chamada de K_{esp} , que é a atividade enzimática normalizada pela concentração da proteína. Esta é dada pela seguinte equação (Santos et al, 2005):

$$K_{esp} = \frac{K}{C}$$

Equação 3 - Atividade Enzimática Específica.

onde C é a concentração da proteína, dada em mg/mL , obtida através do método de Hartree (Hartree, 1972). A unidade de medida para a atividade enzimática específica é U/mg .

Para o exemplo dado no Gráfico 4, a concentração da proteína é de $0,26 \mu g/\mu L$.

Portanto a atividade enzimática e a atividade enzimática específica são:

$$\text{coeficiente angular } Abs/mL = 5,3.$$

$$K = \frac{5,3 \times 3 \times 277}{20} = 220 \text{ } U/mL \quad e \quad K_{esp} = \frac{220}{0,26} = 846 \text{ } U/mg$$

Equação 4 - Exemplo de Atividade Específica.

3.8. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Para compreender a teoria do DLS é necessário utilizar a teoria ondulatória da luz. Uma fonte emite luz monocromática que incide sobre uma solução contendo centros espalhadores. O feixe de luz é espalhado segundo um ângulo θ em relação à direção do feixe de luz incidente na amostra (Berne e Pecora, 2000), como esquematizado na Figura 6.

Figura 6- Esquema de Espalhamento de Luz Dinâmico (extraído de Giacomelli (2009)).

onde $\vec{K}_i$ é o vetor do feixe incidente, $\vec{K}_e$ é o vetor do feixe espalhado e $\vec{q}$ é o vetor de espalhamento, cujo módulo é dado pela seguinte Equação 5 (Berne e Pecora, 2000):

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

Equação 5 – Módulo do Vetor de Espalhamento de Luz.

n_0 é o índice de refração do meio e λ é o comprimento de onda do feixe incidente.

Quando as moléculas da solução são iluminadas pelo feixe de luz incidente, as cargas elétricas constituintes da amostra experimentam uma força devida ao campo elétrico associado à radiação eletromagnética (Maxwell, 1865; Griffiths, 1981) e, por isso, são aceleradas. Estas cargas elétricas aceleradas emitem radiação e a superposição de todos estes campos elétricos emitidos resulta no campo elétrico espalhado, que depende da posição instantânea de cada um destes centros (emissores) espalhadores (Berne e Pecora, 2000; Arzenšek, 2010; Enoki, 2010).

A posição dos centros espalhadores muda devido às flutuações térmicas acarretando uma variação da intensidade $A(t)$ do campo elétrico espalhado a cada instante de tempo t e esta flutuação na intensidade é dada por (Berne e Pecora, 2000):

$$\langle A(t_0, T) \rangle = \frac{1}{T} \int_{t_0}^{t_0+T} A(t) dt$$

Equação 6 - Intensidade média do campo elétrico associado ao feixe de luz espalhado.

onde t_0 , T , são o tempo inicial e total da medida, respectivamente.

O sistema em questão possui a propriedade estacionária, o que significa que não depende do tempo inicial t_0 . Estas são hipóteses assumindo que o sistema pode ser representado pela mecânica estatística, supondo que as partículas não interagem entre si, o movimento dos centros espalhadores é browniano e que o tempo de experimento tende ao infinito (Berne e Pecora, 2000).

Por outro lado, seja t um tempo qualquer, o valor de $A(t + \tau)$ é tão próximo de $A(t)$ quanto menor for o valor de τ , pois as partículas têm pouco tempo para mudar de posição. Essa dependência de $A(t)$ com $A(t + \tau)$ pode ser introduzida na Equação 6 resultando na função de auto correlação de intensidade de luz (Berne e Pecora, 2000; Arzenšek, 2010):

$$\langle A(0)A(\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t) A(t + \tau) dt, \text{ que pode ser reescrita na forma:}$$

$$g^{(2)}(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t) A(t + \tau) dt$$

Equação 7 – Função de auto correlação.

Pela equação de Siegert é possível obter a função de auto correlação $g^{(1)}(\tau)$ do campo elétrico a partir da função $g^{(2)}(\tau)$ (Berne e Pecora, 2000):

$$g^{(2)}(\tau) = \beta (1 + |g^{(1)}(\tau)|^2)$$

Equação 8 - Equação de Siegert para sistemas difusos.

onde β é um parâmetro que depende do equipamento.

A taxa de decaimento da função $g^{(1)}$, definida como Γ , está relacionada a frequência de relaxação do movimento da partícula e é obtida a partir do ajuste da função de auto correlação $g^{(1)}$. Os parâmetros $g^{(1)}$ e Γ possuem a seguinte relação de proporcionalidade (Berne e Pecora, 2000; Enoki, 2010):

$$g^{(1)}(\tau) \sim e^{-\Gamma\tau}$$

Equação 9 - Relação entre função de auto correlação do campo elétrico e a taxa de decaimento da função de auto correlação do campo elétrico.

Existem alguns algoritmos para obter o valor de Γ através do ajuste da função de auto correlação do campo elétrico. Os dois principais são os Métodos dos Cumulantes (Koppel, 1972) e o Método de Contin (Provencher, 1982).

Uma vez obtida a taxa de decaimento Γ pode-se calcular o valor da difusão translacional D das partículas espalhadoras como (Enoki, 2010):

$$\Gamma = D \times q^2$$

Equação 10 - Taxa de decaimento e coeficiente de difusão translacional das partículas espalhadoras.

Por outro lado, Stokes e Einstein derivaram uma equação para a dispersão de partículas esféricas imersas em um fluido que seguem o regime de movimento browniano tal que:

$$D = \frac{\kappa_B T_a}{6\pi\eta r}$$

Equação 11 - Equação de Stokes-Einstein.

onde κ_B é a constante de Boltzmann, T_a é a temperatura absoluta, η a viscosidade do fluido e r é o raio da partícula esférica. Desta maneira é possível obter o raio hidrodinâmico médio a partir do coeficiente de difusão D .

É importante acrescentar que o sentido físico do raio hidrodinâmico médio obtido pelo DLS é o valor do raio de uma esfera rígida que possui o mesmo coeficiente de difusão translacional das partículas espalhadoras da amostra.

Geralmente a amostra apresenta partículas de tamanhos distintos o que significa que a função $g^{(1)}(\tau)$ deve ser dada pela soma de exponenciais Γ_n , que implicam em valores de D diferentes (Arzenšek, 2010):

$$g^{(1)}(\tau) \sim \sum e^{-\Gamma_n \tau} \quad \rightarrow \quad D_n = \frac{\Gamma_n}{q^2}$$

Equação 12 - Relação entre auto correlação do campo elétrico, taxa de decaimento da função de auto correlação do campo elétrico e coeficiente de difusão para uma distribuição polidispersa de tamanhos de partículas.

Para uma distribuição de tamanhos de raio podemos obter um valor do tamanho “efetivo” do raio hidrodinâmico fazendo-se a média das distribuições de tamanho encontradas ponderada pela porcentagem de cada uma das populações. Este é o chamado Média Z ou *Z average* (Z) (Berne e Pecora, 2000; Arzenšek, 2010):

$$Z = \sum \frac{N_i r_i}{N_i}$$

Equação 13 - Equação do Z average.

Onde N_i é o número de partículas com tamanho r_i .

Outro parâmetro importante em medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico é o índice de polidispersão PI, que é uma estimativa do número de populações de diferentes tamanhos de raios hidrodinâmicos presentes na amostra. Este índice é calculado pela fórmula (Arzenšek, 2010):

$$PI = \frac{\sigma^2}{Z^2}$$

Equação 14 - Índice de polidispersão.

onde σ é o desvio padrão da distribuição de tamanhos caso ela fosse uma distribuição gaussiana. O PI pode ser visto como a variância relativa das distribuições de tamanho e para valores < 0.2 a amostra é considerada monodispersa (Arzenšek, 2010).

As medidas de DLS foram realizadas utilizando um N5 Submicron Particle Size Analyser (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) equipado com um laser de hélio-neônio ($\lambda = 632.8$ nm). As medidas foram feitas em um ângulo de 90° e os pontos experimentais são resultado da média de 5 repetições. Cada repetição dura 5 minutos com intervalos de 1 min entre elas.

A configuração do experimento e o processamento dos dados foram realizados pelo programa PCS Control (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA). Este software utiliza o Método dos Cumulantes (Koppell, 1972) para obter os valores de Γ e substitui o

raio pelo diâmetro na Equação 11. Desta maneira os valores obtidos são os diâmetros hidrodinâmicos.

No caso da amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈, foram realizadas medidas de DLS antes e após a utilização do filtro com poro de 220 nm e realizou-se o monitoramento a cada 3 horas (até 12 horas) após a filtração. O cálculo do *Z average* foi feito para obter o valor do diâmetro médio e a variação dos mesmos em relação ao filtro e ao tempo.

Os gráficos de distribuição de tamanhos possuem o eixo das ordenadas expressos em porcentagem de intensidade de luz espalhada. Sendo assim, é possível analisar apenas o tamanho das populações presentes na amostra e não a quantidade delas, pois partículas grandes espalham mais luz, geram um pico de intensidade grande, mas não indicam que estão em grande quantidade. Como visto anteriormente, isto ocorre pois o espalhamento de luz depende do raio da partícula elevado à sexta potência (aproximação de Rayleigh) (Arzenšek, 2010).

3.9. Espalhamento de Raio-X a Baixos Ângulos (SAXS)

A técnica do Espalhamento de Raio-X a Baixos Ângulos (SAXS) possibilita a obtenção de informações estruturais de macromoléculas em solução através da análise do espalhamento de Raios-X causado por esta amostra (Guinier e Fournet, 1955; Glatter e Kratky, 1982; Barbosa et al., 2012).

O arranjo experimental de SAXS está apresentado na Figura 7. Um feixe proveniente de uma fonte de Raios-X de alta intensidade passa por um monocromador (ou filtro), se torna monocromático e é colimado para atingir a amostra. O feixe

transmitido ($\vec{K}_t$) é absorvido no *Beam Stopper* e o feixe espalhado ($\vec{K}_e$) é medido pelo detector (Barbosa et al., 2012).

O dado obtido a partir do SAXS é a variação da intensidade do raio-x espalhado, $I(q)$, em função do vetor de espalhamento $\vec{q}$, que se correlaciona com o ângulo de espalhamento 2θ e com o comprimento de onda λ pela Equação 15 (Barbosa et al., 2012):

Figura 7 - Arranjo experimental esquemático utilizado na técnica de SAXS (adaptado de Barbosa e col.. (2012)).

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$$

Equação 15 – Módulo do vetor de espalhamento utilizado para análise dos dados de SAXS.

A intensidade de espalhamento $I(q)$ é o resultado da interação do feixe de raio-x com os elétrons da amostra, sendo proporcional à Transformada de Fourier do contraste de densidade eletrônica $\delta\rho(\vec{r})$ entre os centros espalhadores e o meio considerado contínuo, tal que (Glatter e Kratky, 1982):

$$I(q) = V^{-1} \left\langle \left| \int \delta\rho(\vec{r}) d\vec{r} e^{i\vec{q}\vec{r}} \right|^2 \right\rangle$$

Equação 16 - Intensidade de Espalhamento de SAXS.

onde V é o volume total do objeto espalhador, $\vec{r}$ é o vetor de posição dos centros espalhadores dentro do objeto espalhador e a integral é calculada em todo o volume V . As chaves indicam a média de todas as posições e orientações possíveis de todos os objetos espalhadores no sistema. Por fim, $\rho(\vec{r})$ é a densidade de espalhamento local definido como a multiplicação da densidade eletrônica pelo raio do elétron (Barbosa et al., 2012).

Para um sistema isotrópico, a intensidade de espalhamento $I(q)$ pode ser reescrita (Santos et al 2003; Barbosa et al., 2010) como o produto de uma função $P(q)$, chamada fator de forma, com uma função $S(q)$, chamada função de interferência, como na Equação 17:

$$I(q) = k P(q) S(q)$$

Equação 17 - Intensidade de Espalhamento de SAXS para sistema isotrópico.

k é um parâmetro que depende do arranjo experimental e da densidade numérica dos objetos espalhadores (no nosso caso, proteínas) .

O fator de forma $P(q)$ é diretamente correlacionado à estrutura do objeto espalhador em solução (Barbosa et al., 2012), ou seja, permite obter informações sobre a conformação, tamanho e forma da proteína (Glatter e Kratky, 1982; Barbosa et al., 2012).

A função $S(q)$ é derivada da interação entre os centros espalhadores (Barbosa et al., 2012). Para um sistema suficientemente diluído os objetos espalhadores não

interagem entre si e função de interferência é aproximadamente 1 (Santos et al., 2003). Desta maneira a intensidade $I(q)$ é proporcional à $P(q)$ (Santos et al., 2003; Barbosa et al., 2010):

$$I(q) = k P(q), \quad S(q) \sim 1$$

Equação 18 - Intensidade de SAXS para sistema isotrópico e não interagente.

Uma informação sobre o estado oligomérico da proteína pode ser obtida diretamente da Equação 18, pois a intensidade de espalhamento para o ângulo $\theta = 0$ ($q = 0$) é diretamente proporcional à massa molecular do objeto espalhador e, portanto, à quantidade de monômeros que forma um agregado proteico responsável pelo espalhamento de raio-x (Barbosa et al., 2012).

Uma análise preliminar do estado conformacional da proteína pode ser realizada utilizando-se a representação de Kratky (Glatter e Kratky, 1982; Barbosa et al., 2012). Esta consiste em graficar a intensidade de espalhamento multiplicada pelo quadrado do vetor de espalhamento, $I(q)q^2$, em função do vetor de espalhamento, q .

A Figura 8 mostra a representação de Kratky para três estados conformacionais da proteína albumina de soro bovino (BSA). São curvas simuladas por Barbosa e col. (2012):

Figura 8 - Representação de Kratky para três conformações da BSA (extraído de Barbosa e col. (2012)).

Através da representação de Kratky da Figura 8 pode-se identificar a proteína na forma nativa por uma curva em forma de sino com um pico bem definido e sua posição depende do tamanho médio da proteína (quanto mais para esquerda maior é o tamanho). Estados conformacionais intermediários (semi flexível) apresentam um pico menos intenso, mais alargado e os valores de $I(q)q^2$ aumentam com o crescimento de q . Já a proteína desenovelada não possui pico e a curva cresce em função do vetor de espalhamento (Barbosa et al., 2012).

Outra representação que auxilia na análise dos dados de SAXS é a representação de Guinier (Guinier e Fourmet, 1955). Segundo a Lei de Guinier a curva de espalhamento para $q \rightarrow 0$ pode ser aproximada por:

$$I(q \rightarrow 0) \cong I(0)e^{-\frac{R_g^2 q^2}{3}}$$

Equação 19 - Lei de Guinier.

Calculando o logaritmo natural da Equação 19 chega-se a uma equação linear:

$$\ln I(q \rightarrow 0) = \ln I(0) + \ln e^{-\frac{R_{gG}^2 q^2}{3}} \rightarrow \ln I(q \rightarrow 0) = \ln I(0) - \frac{R_{gG}^2 q^2}{3}$$

$$\therefore \ln I(q \rightarrow 0) = \ln I(0) - \frac{R_{gG}^2}{3} q^2$$

$$\therefore y = B - A x$$

Equação 20 - Equação Linear para representação de Guinier.

A Equação 20 mostra a relação linear entre $\ln I(q \rightarrow 0)$ e q^2 . Portanto é possível realizar um ajuste linear da curva experimental e obter o raio de giro de Guinier R_{gG} e $I(0)$ a partir dos coeficientes da reta ajustada.

O raio de giro de “Guinier” R_{gG} corresponde ao valor quadrático médio da distância r da flutuação de densidade eletrônica do objeto espalhador, $\delta\rho(\vec{r})$, em relação ao seu centro de gravidade e pode ser definido pela Equação 21 (Guinier e Fourmet, 1955; Barbosa et al., 2012):

$$R_{gG}^2 = \frac{\int r^2 \delta\rho(\vec{r}) d\vec{r}}{\int \delta\rho(\vec{r}) d\vec{r}}$$

Equação 21 - Raio de giro de Guinier obtido a partir do contraste de densidade eletrônica $\delta\rho(\vec{r})$.

O $I(0)$ é a intensidade de espalhamento extrapolada para $q \rightarrow 0$. Esta medida não é possível de ser realizada, pois para $q = 0$ o espalhamento é muito intenso e há o *Beam Stopper* antes do detector para impedir que o feixe atinja e danifique o detector.

Podemos ainda obter informações sobre a proteína estudada através da função de distribuição de pares de elétrons $p(r)$ (Guinier e Fourmet, 1955; Glatter e Kratky, 1982). Esta é obtida através da transformada de Fourier do fator de forma $P(q)$,

consequentemente da $I(q)$, pois estas duas só diferem pela constante k . A transformada é dada por (Barbosa et al, 2010):

$$p(r) = \left(\frac{1}{2\pi^2}\right) \int_0^\infty I(q)(qr)^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dq$$

Equação 22 - Transformada de Fourier para obter $p(r)$.

A $p(r)$ é chamada de função de distribuição de distâncias quando o sistema é homogêneo (Barbosa et al., 2012). Neste caso ela representa a probabilidade de encontrar dois elementos espalhadores separados por uma distância r dentro do volume da partícula espalhadora (Barbosa et al., 2010).

A partir da função de distribuição de distâncias é possível determinar a dimensão máxima (D_{max}) da proteína, que é o valor de r quando $p(r) = 0$ (Barbosa et al., 2012). Do ponto de vista físico este parâmetro representa a maior distância entre dois centros espalhadores dentro do volume do objeto espalhador. Com a função $p(r)$ pode-se obter raio de giro R_g da proteína (Barbosa et al., 2012). A Equação 23 apresenta a relação entre o R_g e a função $p(r)$ (Guinier e Fournet, 1955; Glatter e Kratky, 1982; Barbosa et al., 2012):

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{max}} r^2 p(r) dr}{2 \int_0^{D_{max}} p(r) dr}$$

Equação 23 - Raio de Giro obtido a partir da função de distribuição de distâncias $p(r)$.

Para soluções de proteína que apresentam diferentes estados oligoméricos o resultado do raio de giro deve ser interpretado como a média ponderada do raio de giro de todas as espécies presentes na amostra (Barbosa et al., 2012):

$$R_g = \frac{\sum R_{gn} \times n}{\sum n}$$

Equação 24 - Raio de giro para solução com diferentes estados oligoméricos.

onde R_{gn} é o raio de giro de uma dada espécie e n é a quantidade de cada espécie.

Para se obter a $p(r)$ a partir da $I(q)$ utiliza-se softwares que realizam a integral da Equação 22 por iterações numéricas. Dois exemplos de softwares com esta função são os o GNOM (Svergun, 1992) e o GIFT (Bergmann et al., 2000; Popovski, 2009). Neste projeto as $p(r)$ foram obtidas utilizando o GIFT (Bergmann et al., 2000; Popovski, 2009).

O GIFT (Bergmann et al., 2000; Popovski, 2009) converte a transformada de Fourier (Equação 22) em um problema de mínimo dos múltiplos quadrados que depende de um parâmetro de estabilização para avaliar o erro entre a solução obtida e a curva experimental. Este parâmetro é chamado de “Multiplicador de Lagrange” (Popovski, 2009). Como a estabilidade da solução depende das especificações utilizadas para iniciar a iteração numérica, o GIFT varia os valores de inicialização e obtém diferentes soluções. Para identificar qual solução mais se aproxima dos dados experimentais analisa-se o valor do Multiplicador de Lagrange de cada solução obtida (Bergmann et al., 2000; Popovski, 2009).

Para análise da função $P(q)$, pode-se iniciar a mesma através da simulação de curvas téóricas de SAXS a partir da estrutura cristalográfica da proteína, se conhecida, e compará-las aos dados experimentais. As semelhanças e diferenças entre as curvas podem auxiliar na compreensão da conformação da amostra de proteína.

A estrutura cristalográfica do dímero $(\alpha\beta)_2$ da Na,K-ATPase obtida por Kanai e col. (2013) foi utilizada neste trabalho para construir a curva teórica do dímero $(\alpha\beta)_2$ (PDB 3WGV - Figura 9 à esquerda). O monômero $(\alpha\beta)$ foi obtido ao retirar uma unidade $\alpha\beta$ do dímero (Figura 9 à direita) através do software CRY SOL (Svergun et al., 1995).

Figura 9 – Estrutura cristalográfica do dímero $(\alpha\beta)_2$ da Na,K-ATPase (Kanai et al., 2013) à esquerda. À direita está a estrutura cristalográfica do monômero $(\alpha\beta)$. A cor muda gradualmente do N-terminal (azul) até o C-terminal (vermelho) para as subunidades α e β (Kanai et al., 2013).

Todos os experimentos de SAXS de amostras de Na, K-ATPase solubilizadas e purificadas em $C_{12}E_8$ pré e pós irradiação foram realizados no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Linha de SAXS 1, em Campinas. O comprimento de onda do feixe de raio-x foi de 1.488 Å, à temperatura ambiente com distância da amostra ao detector de aproximadamente 1300 mm. As amostras foram colocadas no porta amostra entre duas janelas de mica com 1 mm de espaçamento e este arranjo estava perpendicular ao feixe incidente.

Os dados foram obtidos com 5 minutos de exposição ao feixe, o sinal foi recebido por um detector bidimensional. O sinal foi normalizado levando em consideração a variação da intensidade do feixe de raio-x durante o tempo do experimento e o sinal de fundo foi retirado após medir o espalhamento da solução tampão.

Com o objetivo de desagregar a Na,K-ATPase purificada em C₁₂E₈, filtrou-se a amostra com um filtro de 100 nm de poro, adicionou-se o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) à solução e a concentração do surfactante na amostra foi de 0,5 mM e 1 mM. Mediu-se a curva de SAXS imediatamente após a adição do SDS.

3.10. Bioestimulação da Na,K-ATPase por laser de baixa potência

A medida foi realizada utilizando 3 lasers: $\lambda = 532$ nm com potência ajustável entre 0 e 5 mW; $\lambda = 650$ nm com potência fixa de 50 mW e $\lambda = 780$ nm com potência ajustável entre 0 e 50 mW. Utilizou-se a potência máxima de cada um dos lasers que foram posicionados a uma distância de 25 cm perpendicularmente ao plano da solução de proteína, como esquematizado na Figura 10.

Figura 10 – Esquema do procedimento de irradiação.

Após a irradiação, uma alíquota de Na,K-ATPase era adicionada ao meio reacional e realizava-se o procedimento de medida de atividade como descrito no item 3.7. No caso da fração de membrana foram irradiados 100 μ L de amostra para realizar

medidas de atividade em triplicata (3 medidas de 30 µL de amostra). No caso proteolipossomos foram irradiados 35 µL de amostra (3 medidas de 10 µL de amostra).

Além disso, realizaram-se medidas de atividade para verificar a estabilidade da bioestimulação. Para isto irradiaram-se amostras de Na,K-ATPase (proteolipossomo e fração de membrana), mantidas fora do gelo após a irradiação e mediu-se a atividade enzimática de 2 em 2 horas até 6 horas. Para cada uma dessas medidas de atividade manteve-se um controle que foi a amostra de proteína sem irradiação mantida fora do gelo pelo mesmo período de tempo que as amostras irradiadas.

O padrão internacional adota a dose, J/cm², como a unidade de medida de irradiação por laser. Portanto, para padronizar os valores de irradiação do experimento, medimos o tamanho do spot dos laser (cm²).

Por outro lado, sabemos que a potência se relaciona com a energia tal que:

$$P = \frac{E}{t}$$

Equação 25 - Definição de Potência.

Onde P é a potência, E energia e t o tempo de irradiação. Com o valor da potência do laser, do tempo de irradiação cronometrado durante o experimento e do tamanho do spot (A), o valor da dose foi calculado como mostra a Equação 26:

$$E = P \times t \quad e \quad a \text{ dose: } D = \frac{E (J)}{A (cm^2)} = \frac{P \times t (J)}{A (cm^2)}$$

Equação 26 - Definição de Dose.

Para obter o tamanho do spot mediu-se o raio do feixe no plano de incidência e calculou-se a área utilizando a fórmula da área da circunferência.

Para comparar os resultados entre a irradiação da fração de membrana e do proteolipossomo normalizou-se a dose utilizada pela massa de proteína presente no volume irradiado. Este valor foi obtido multiplicando-se a concentração de cada amostra de proteína pelo volume irradiado.

4. Resultados e Discussão

4.1. Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈: estudo inicial por SAXS e DLS

Um dos objetivos iniciais do projeto era investigar se ocorrem mudanças conformacionais nas amostras de Na,K-ATPase solubilizadas em C₁₂E₈ quando irradiadas por laser de baixa potência. Para isto, o equipamento para a irradiação foi levado ao LNLS e a irradiação foi realizada com as mesmas doses utilizadas nas medidas preliminares de atividade, instantes antes de se medir a curva de SAXS. As amostras de proteína foram trazidas em gelo da FFCLPR-USP (aonde foram produzidas, item 3.2) e mantidas em banho de gelo ao longo do dia das medidas.

O resultado da primeira medida de SAXS está apresentado no Gráfico 5. É interessante acrescentar que as amostras utilizadas nesta medida (concentração de enzima de 0,8 mg/mL determinada pelo método de Hartree, item 3.4) possuíam atividade específica de 480 U/mg antes da irradiação.

Gráfico 5 – Curvas de SAXS de Na, K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈, concentração da proteína de 0,8 mg/mL, submetida a diferentes doses de irradiação (A). (B) curvas teóricas de SAXS do monômero e dímero (PDB 3WGV – Kanai et al., 2013), obtidas pelo programa CRY SOL (Svergun et al., 1995). (C) função de distribuição de distâncias $p(r)$ correspondentes às intensidades de espalhamento das amostras de Na,K-ATPase submetidas a diferentes doses de irradiação e do monômero e do dímero.

Conforme observamos no Gráfico 5A, as curvas de SAXS são coincidentes, independentes da dose de luz depositada sobre a amostra, mas com perfil muito diferente do espalhamento do monômero e do dímero da enzima (Gráfico 5B). As funções de distribuição de distâncias $p(r)$ refletem esta observação (Gráfico 5C), evidenciando que os objetos espalhadores das amostras de Na,K-ATPase solubilizada em C₁₂E₈ são muito maiores que da enzima na forma monomérica ou dimérica. Portanto, a amostra deve ser

constituída por agregados/oligômeros da enzima. A tabela 1 abaixo exibe os valores de raio de giro (R_g) e da distância máxima (Dmax) obtidos através da $p(r)$:

	Monômero	Dímero	Amostras experimentais
Dmax (Å)	150 (10)	160 (10)	550 (30)
R_g (Å)	47 (1)	54 (1)	183 (3)

Tabela 2 - Comparação do raio de giro e distância máxima obtidos pela função de distribuição de distâncias para o monômero e o dímero e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ após irradiações. Como os valores de R_g e Dmax são os mesmos para todas amostras medidas, estes valores estão apresentados uma única vez na coluna Amostras experimentais.

No Gráfico 5 – (C) observa-se que amostras experimentais possuem frequências de tamanhos maiores que 150 Å, sendo 200 Å o tamanho com maior quantidade de ocorrências, enquanto que o monômero e o dímero não possuem frequências de tamanhos maiores que 150 Å e 160 Å, respectivamente. Além disso, as amostras experimentais possuem o R_g e o Dmax cerca de 3 vezes maiores do que os do dímero. Assim, nossos resultados revelam a presença de grandes centros espalhadores (agregados ou oligômeros) na amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$.

Com o intuito de verificarmos o estado oligomérico/agregados de proteína utilizamos a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para identificar se existiam diferentes populações na amostra recém-preparada (não irradiada). O Gráfico 6 apresenta medidas de DLS onde é possível perceber a existência de populações com diferentes valores de diâmetros hidrodinâmicos. As 5 repetições da medida de DLS da mesma amostra recém-preparada (Gráfico 6) mostram populações com cerca de 50, 100, 300 e até 500 nm de diâmetro hidrodinâmico. O Z average é de 101 nm e o índice de polidispersão (PI) é de 0,420, o que identifica uma amostra bastante polidispersa ($>0,2$). Cada medida experimental foi de 5 minutos com intervalos de 1 min entre elas.

Gráfico 6 - Medidas de DLS identificando a existência de diferentes populações na amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$, concentração da proteína era de 0,55 mg/mL, atividade específica de 415 U/mg.

Comparando o valor do raio de giro obtido através da função de distribuição de distâncias para monômero ($\alpha\beta$) (Tabela 2) observa-se que este é 5 vezes menor do que o menor valor de raio encontrado nos experimentos de DLS, 25 nm (50 nm de diâmetro). Tal observação é coerente com os dados de SAXS, evidenciando que a amostra solubilizada em $C_{12}E_8$ pode ser composta por diferentes espécies em equilíbrio em solução. Dos dados de DLS, uma das espécies pode ser um oligômero composto por pelo menos 5 monômeros.

Portanto, considerando as informações obtidas através das curvas de SAXS e DLS constatamos que a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ possui populações de diferentes tamanhos podendo ser agregados e/ou oligômeros funcionais (ou não) da proteína. A partir desta descoberta, buscamos metodologias para descartar oligômeros

muito grandes da solução antes do estudo de irradiação. Segue abaixo caracterizações do sistema utilizando filtros após a purificação.

4.2. Caracterização de Na,K-ATPase em C₁₂E₈ após utilização de filtro de 220 nm

Com o objetivo de separar as diferentes populações (Gráfico 6) a amostra foi filtrada utilizando uma membrana porosa de 220 nm. A amostra foi colocada em uma seringa que encaixa na parte 1 do filtro, sendo filtrada e coletada na parte 2 (Figura 11).

Figura 11 – Membrana porosa de 220 nm.

Para verificar se o uso do filtro era eficaz, realizou-se medidas de DLS, Espectroscopia de Absorção UV-Vis, atividade enzimática e concentração da proteína antes e após a utilização do filtro.

4.2.1. Espectroscopia de Absorção UV-Vis

O Gráfico 7 apresenta uma comparação do espectro de absorção da enzima solubilizada em C₁₂E₈ após a purificação (linha preta), seguida de passagem pelo filtro de 220 nm (linha vermelha). Há uma diminuição de 26% na intensidade de absorção em 280

nm. Assim, podemos afirmar que deve haver uma redução na concentração da proteína em solução.

Gráfico 7 – Espectro de Absorção para Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ antes e após filtração com poro de 220 nm.

Como já foi discutido anteriormente as proteínas não possuem bandas de absorção em comprimentos de onda maiores que 320 nm e qualquer intensidade medida para estes comprimentos de onda devem ser vistos como espalhamento de luz causado por diferentes oligômeros e agregados proteicos presentes na amostra.

Sendo assim, é possível afirmar que o filtro retira parte destas populações de grandes dimensões, pois há uma redução de 57% na absorção em 350 nm. Por outro lado, o filtro não foi capaz de retirar todas as populações que geram o espalhamento de luz, porque mesmo após sua utilização ainda existe “absorção” em comprimentos de onda superiores a 320 nm.

Para verificar a estabilidade da amostra de proteína após a utilização do filtro, realizou-se a medida de espectroscopia de absorção ao longo do tempo. O Gráfico 8 apresenta o resultado obtido da variação de intensidade da absorção da enzima em 280 nm.

Razão da absorção em 280 nm em função do tempo

Gráfico 8 - Absorção em 280 nm da enzima Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ em função do tempo.

De maneira interessante, observamos um aumento da intensidade de absorção em 280nm, sem que se adicione proteína à solução. Portanto, tal variação deve ser entendida como contribuição de espalhamento de luz devido a formação de agregados de dimensões maiores. No caso do Gráfico 8, a intensidade de absorção em 280 nm aumenta ao longo do tempo e após 20 horas já é de 96% da absorção antes de filtrar. Lembrando que o filtro retira os agregados maiores que 220 nm, e que o espalhamento de luz é proporcional ao tamanho do agregado, os resultados indicam que novos agregados se formam com o tempo.

Pode-se concluir então que a amostra recém-preparada de proteína Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈, embora possua atividade (conforme veremos no item 4.2.3), é composta por diferentes populações, contendo agregados/oligômeros responsáveis pelo espalhamento de luz. Estas espécies são retiradas por filtração, mas novos agregados grandes são formados em menos de 24 horas.

4.2.2. Espalhamento de Luz Dinâmico

O Gráfico 9 (parte superior) apresenta resultados de DLS da solução de Na,K-ATPase solubilizada em C₁₂E₈ antes de filtrar, revelando que a solução é composta por 5 populações maiores que 220 nm e Z average de 105 nm. Imediatamente após a utilização do filtro, todas as populações são menores que 220 nm e o Z average é de 61 nm (Gráfico 9 – inferior), lembrando que os tamanhos referem-se ao diâmetro hidrodinâmico como já foi discutido anteriormente no item 3.8.

Gráfico 9 - DLS para analisar a influência do filtro na amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈. A concentração era de 0,68 mg/mL e 0,55 mg/mL, antes e após a filtração, respectivamente.

Como algumas populações foram retiradas e houve uma redução de 36% no valor do Z average, pode-se garantir que o filtro atua na amostra retirando oligômeros maiores que 220 nm.

Entretanto, monitorando a cinética de agregação após a utilização do filtro, observamos no Gráfico 10 (esquerda) o aparecimento de populações maiores que 220 nm ao longo do tempo. Em 9 horas de experimento já é possível observar populações com 200 nm, 300 nm, 400nm e até 600 nm de diâmetro.

Gráfico 10 - DLS da amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ em função do tempo. A concentração da proteína era de 0,54 mg/mL.

Por outro lado, o Gráfico 10 (direita) mostra o aumento de 33% do Z average nas primeiras 3 horas, sendo que 12 horas após a filtração o valor do Z average praticamente dobra.

Os dados de DLS revelam então a presença de populações de diferentes tamanhos da Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈, que podem ser oligômeros e ou agregados formados pelas subunidades α e β (Brotherus et al., 1981; Craig, 1982; Ivanov et al., 2004; Blanco, 2005; Rigos et al., 2010; Rigos et al., 2008; Tokhtaeva et al., 2012; Barbosa et al., 2012). Além disto, os dados de DLS mostram que as espécies com diâmetro hidrodinâmico maior que 220 nm são excluídas por filtração, mas são formadas novamente ao longo do tempo. Estes dados estão de acordo com o monitoramento da amostra de proteína realizado por Espectroscopia de Absorção UV-Vis.

4.2.3. Atividade Enzimática e Concentração

A atuação do filtro também foi investigada através das medidas de atividade enzimática e concentração da proteína. O Gráfico 11 apresenta a atividade específica da enzima medida para diferentes filtrações realizadas.

Atividade específica em função da concentração da Na,K-ATPase antes e após a utilização do filtro de 220 nm

Gráfico 11 - Atividade Específica em função da concentração da Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ em relação ao filtro de 220nm.

Observando-se as amostras separadamente (mesma cor) pode-se ver que os “quadrados” (após o filtro) se movem para a esquerda em relação aos “triângulos” (antes do filtro), o que significa que após utilizar o filtro de 220 nm a concentração da proteína diminui, de acordo com os dados de Espectroscopia de Absorção. Por outro lado, há um aumento da atividade específica, que pode ser identificado com a posição mais alta dos “quadrados” (após o filtro) em relação aos “triângulos” (antes do filtro) para a mesma amostra.

Para ressaltar este efeito, o Gráfico 12 apresenta o aumento da atividade específica em função da variação da concentração para a mesma amostra antes e depois de utilizar o filtro de 220nm. Pode-se observar que a redução na concentração é acompanhada do aumento da atividade específica. Portanto, as populações retiradas da solução pelo filtro (diâmetros maiores que 220 nm) possuem pouca ou nenhuma atividade enzimática.

Gráfico 12 - Aumento da atividade específica da Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ e perda de concentração após utilizar o filtro de 220 nm.

4.2.4. Conclusões Parciais: Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$

As medidas de SAXS, DLS e Espectroscopia de Absorção revelaram a existência de agregados e/ou oligômeros de Na,K-ATPase obtidos durante o processo de solubilização e purificação da Na,K-ATPase em $C_{12}E_8$. Este resultado não havia sido reportado na literatura pois a maior parte dos trabalhos experimentais estavam centrados nas medidas de atividade da enzima solubilizada em $C_{12}E_8$ (Cornelius, 2001; Santos et al, 2002; Santos et al, 2003; Santos et al, 2007; Rigos et al, 2008; Miles et al, 2013).

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento desta dissertação de mestrado motivaram a aluna de doutorado Juliana Sakamoto Yoneda, orientada pelo prof. Pietro Ciancaglini (FFCLRP/USP), a realizar medidas de Ultracentrifugação Analítica (AUC), com a amostra filtrada. Cabe acrescentar que a preparação de amostra de proteína solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ foi a mesma descrita neste projeto (item 3.2), mas exclusivamente neste experimento Yoneda não concentrou a amostra de proteína (Figura 2) e utilizou um filtro de 100 nm.

Figura 12 - Gráfico de AUC para amostra de Na,K-ATPase solubilizada em $C_{12}E_8$ e filtrada obtido por Yoneda (2014). Distribuição do coeficiente de sedimentação $c(S)$ vs. Coeficiente (S) das amostras de Na,K-ATPase solubilizada após a filtração (100 nm) nas concentrações de 60 $\mu\text{g/mL}$ (preto) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (vermelho). A corrida foi de 14 h com uma velocidade de 12000 rpm, a 13 °C (Extraído de Yoneda (2014)).

Os picos apresentados na Figura 12 representam populações e a massa de cada uma delas é obtida a partir do coeficiente de sedimentação (S). Os dados obtidos estão apresentados na Figura 13:

$\mu\text{g/mL}$	Espécie $\rightarrow$	1	2	3	4	5	6	7
~60	s (S)	6,44	14,17	20,36	27,13	33,76	41,60	51,42
	$s_{20,w}$ (S)	7,43	16,35	23,5	31,3	38,9	48,0	59,3
	MM (kDa)	190	620	1080	1640	2280	3110	4280
	%	26	29	18	16	7	5	2
~100	s (S)	6,25	14,49	20,48	27,02	34,83	44,32	53,80
	$s_{20,w}$ (S)	7,21	17,71	23,6	31,2	40,2	51,1	62,0
	MM (kDa)	177	623	1046	1585	2320	3330	4455
	%	26	28	17	16	10	4	1

Figura 13 - Propriedades das espécies observadas nos experimentos a 12000 rpm (Extraído de Yoneda (2014)).

Na Figura 13, s(S) é o coeficiente de sedimentação (S), $s_{20,w}$ é coeficiente de sedimentação a 20°C em água pura, MM é a massa molecular em KDa e % é o percentual de uma dada população na amostra.

Yoneda comparou as propriedades da espécie 1 com as previsões teóricas e pôde concluir que esta representa o monômero ($\alpha\beta$). Além disso, o experimento mostrou a presença de 7 populações diferentes com massa moleculares maiores do que o monômero ($\alpha\beta$) indicando que a amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C_{12}E_8 possui agregados/oligômeros. Desta maneira os dados obtidos por Yoneda corroboraram com os dados obtidos neste projeto, embora realizados com concentrações diferentes de enzima e com um filtro de tamanho menor.

A amostra de enzima solubilizada e purificada em C_{12}E_8 que não foi retida pelo filtro apresenta atividade enzimática (Gráfico 12) e é composta por populações de diferentes tamanhos (DLS – Gráfico 9). Sendo assim, a amostra estudada após a filtração

deve conter algumas isoformas cataliticamente competentes descritas por Blanco e col. (2005) como $\alpha\beta$, $\alpha\beta_2$, $\alpha\beta_3$, $\alpha_2\beta$, $(\alpha\beta)_2$, $\alpha_2\beta_3$, $\alpha_3\beta$, $\alpha_3\beta_2$, $(\alpha\beta)_3$, $\alpha_4\beta$ e/ou $\alpha_4\beta_3$; e/ou tetrâmetro $(\alpha\beta)_4$ (Mahaney et al., 1990; Taniguchi et al., 2001; Donnet et al., 2001). Considerando que a subunidade α possui massa molar de 110 kDa e que a β possui 50 kDa (item 1.1), pode-se comparar a massa molar das isomorfias com a massa molar das 7 espécies encontradas por Yoneda (2014) (Figura 12). Desta maneira, temos a sugestão que apenas duas isoformas estão presentes na amostra filtrada de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$: a estrutura $\alpha\beta$ com massa molar de 160 kDa que é compatível com a espécie 1 - 177 kDa e a estrutura $(\alpha\beta)_4$ com massa molar de 640 kDa que é compatível com a espécie 2 - 623 kDa (Figura 13).

Além disso, as medidas de Espectroscopia de Absorção mostraram que há espalhamento de luz mesmo após a filtração (Gráfico 7), portanto ainda existem agregados/oligômeros grandes na amostra filtrada de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$, conforme também observado por UAC.

Uma indicação da existência de diferentes estados agregados/oligoméricos em amostras de Na,K-ATPase solubilizada em $C_{12}E_8$ já havia sido feita por Periyasamy e col. (1983) ao realizar experimentos de *cross-linking* de amostras de proteína preparadas por dois diferentes métodos de solubilização (Brotherus et al., 1981; Craig et al., 1982). Os autores Brotherus e col. (1981) e Craig e col. (1982) afirmam que ao utilizar seus métodos de solubilização da Na,K-ATPase em $C_{12}E_8$ a maior estrutura presente em solução seria um dímero $(\alpha\beta)_2$. Porém Periyasamy e col. (1983) determinaram estruturas com massa maior do que o dímero $(\alpha\beta)_2$, como a estrutura $(\alpha\beta)_4$, evidenciando a existência de agregados ou oligômeros.

Os agregados/oligômeros evidenciados nesta dissertação podem ser formados por diferentes associações estequiométricas de α e β (Rigos et al., 2001), associações de β em ordens superiores como as reportadas para a Na,K-ATPase solubilizada em SDS e em tris dodecil sulfato (TDS) por Ivanov e col. (2004) e por Tokhtaeva et al. (2012) em fração de membrana; e/ou associações da subunidade α em ordens superiores como as estudadas por Ivanov e col. (2004) para Na,K-ATPase solubilizada em SDS e tris dodecil sulfato (TDS) e a estrutura α_4 reportada por Barbosa et al. (2010) ao analisar a amostra de proteína (concentração de 2 mg/mL) solubilizada e purificada em C₁₂E₈ por SAXS.

Como as estruturas descritas acima podem ser formadas por muitas subunidades α e/ou β elas seriam relevantes na concentração da amostra de proteína e podem possuir um diâmetro hidrodinâmico maior que 220 nm. Estas duas características condizem com as medidas de Hartree, DLS e Espectroscopia de Absorção, que constataram que as populações retiradas são maiores que 220 nm e representam até 30% da concentração da proteína.

Ademais, os agregados/oligômeros constituídos de $\alpha_n\beta_m$, com $n \neq m$ e $n, m > 4$, como sugerido por Rigos et al. (2001) e Tokhtaeva et al. (2012), ainda não foram detectados e não é conhecido se possuem atividade enzimática. Já as associações de α_i e β_j foram reportadas na literatura e não possuem atividade (Ivanov et al., 2004; Tokhtaeva et al., 2012), como a estrutura α_4 descrita por Barbosa et al. (2010). Estas informações reportadas na literatura são compatíveis com as obtidas experimentalmente nas medidas de atividade, onde foi demonstrado que as amostras retiradas possuem pouca ou nenhuma atividade. Desta maneira, as populações retiradas por filtração podem ser compostas por associações de α_i e β_j .

Apesar do filtro ser eficiente em retirar as associações de subunidades α e/ou β o monitoramento da evolução temporal da Na,K-ATPase em $C_{12}E_8$ por DLS e por Espectroscopia de Absorção demonstrou que o equilíbrio de estados populacionais é deslocado com o tempo e há a formação de novos estados agregados/oligoméricos.

As conclusões apresentadas mostram que a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ apresenta diferentes estados de oligomerização e distintos agregados em solução. Isto é muito importante pois é um alerta à comunidade científica para que se tenha cuidado ao interpretar os resultados obtidos com esta amostra de proteína em trabalhos já reportados na literatura ou em futuros experimentos.

4.3. Efeito da adição de dodecil sulfato de sódio nos estados agregados/oligoméricos da Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$: análise de SAXS

Nos primeiros experimentos de SAXS (Gráfico 5 - item 4.1) os agregados/oligômeros de ordem superior impossibilitaram o estudo da Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$. Com o intuito de dissociar estas populações, adicionou-se SDS nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM à solução de proteína purificada.

O Gráfico 13 apresenta a função de distribuição de distâncias, $p(r)$, para uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ antes e após a utilização do filtro com poro de 100 nm. O poro deste filtro foi menor do que os utilizados anteriormente (220 nm).

Gráfico 13 – Função de distribuição de distâncias, $p(r)$, para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ antes e após a utilização do filtro com poro de 100 nm.

O raio de giro, $R_g = 150$ (4) Å, e a distância máxima, $D_{max} = 420$ (20) Å, da amostra de enzima após a filtração são respectivamente 19% e 24% menores do que o $R_g = 183$ (3) Å e $D_{max} = 550$ (30) Å da amostra de proteína antes de filtrar. Observa-se também que as duas $p(r)$ possuem a mesma frequência de tamanhos até o valor de $r = 200$ Å, mas para valores de $r > 200$ Å a amostra filtrada (linha vermelha) possui menor ocorrência de frequências de distâncias do que a amostra antes de filtrar (linha preta). Estas informações sugerem a diminuição dos centros espalhadores maiores após a filtração.

O Gráfico 14 apresenta as curvas de SAXS obtidas experimentalmente para a amostra de Na,K-ATPase filtrada com um filtro de 100 nm e para as curvas teóricas do monômero e do dímero.

Gráfico 14 - SAXS para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ ausência de SDS e na presença de 0,5 mM e 1 mM de SDS (A), a concentração da proteína era de 0,46 mg/mL. (B) SAXS para o monômero e o dímero teóricos (PDB 3WGV). Os mesmos dados são apresentados com a intensidade de espalhamento em escala logarítmica nos gráficos inseridos em (A) e (B).

Analisando o Gráfico 14 é possível perceber uma diminuição da intensidade de espalhamento quando se adiciona SDS às amostras. Ao mesmo tempo, observa-se o aparecimento de um pico alargado em torno de $q = 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ (Gráfico 14 – A inserto) com adição de SDS. Este pico alargado é característico do espalhamento de micelas de SDS como demonstrado por Santos e col. (2003) ao estudar a interação de BSA com diferentes concentrações de SDS. Os perfis de espalhamento teórico de $(\alpha\beta)_2$ e de $\alpha\beta$ são apresentados no Gráfico 14 - lado direito.

Com o intuito de estudar o grau de enovelamento da amostra de proteína, utilizou-se a representação de Kratky, conforme apresentado no Gráfico 15. A representação com as 5 curvas, Gráfico 15 – A, foi separada em 3 representações, Gráfico 15 – B, Gráfico 15 – C e Gráfico 15 – D para melhorar a visualização e a comparação entre os dados.

Gráfico 15 - (A) Representação de Kratky para o monômero e o dímero teóricos (PDB 3WGV) e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ na ausência de SDS e adicionando 0,5 mM e 1 mM de SDS à amostra purificada. (B) comparação entre a amostra de proteína na ausência de SDS e as curvas teóricas; (C) comparação entre a amostra de proteína com adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS; e (D) comparação entre as curvas experimentais. A concentração da proteína era de 0,46 mg/mL.

Nesta representação o monômero e o dímero apresentam uma curva tipo sino (Gráfico 15) que é típica de proteínas enoveladas (item 3.8). A curva da Na,K-ATPase na

ausência de SDS possui um formato semelhante ao do dímero, porém o pico está deslocado para esquerda em relação as curvas teóricas, o que indica que o tamanho médio da proteína deve ser bem maior (Gráfico 15 - B). Ao adicionar SDS este pico move-se para direita indicando a diminuição no tamanho médio dos centros espalhadores (Gráfico 15 - D).

Além disso, as curvas de Kratky da proteína na presença de SDS se assemelham à curva do dímero (Gráfico 15 - C), o que poderia sugerir que elas possuem o mesmo envelope, mas isto não pode ser afirmado pois a semelhança entre estas curvas terminam em $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$, onde aparece o padrão da micela de C_{12}E_8 (Santos et al., 2003). Apesar do SDS diminuir o tamanho médio da proteína, estas têm raio de giro maior do que o dímero, pois os picos das curvas experimentais continuam à esquerda da representação do espalhamento do dímero $(\alpha\beta)_2$ (Gráfico 15 - C).

O tamanho médio dos centros espalhadores foi avaliado utilizando-se o raio de giro de “Guinier” R_{gG} e a intensidade de espalhamento em $q = 0$, $I(0)$, obtidos por extrapolação da Lei de Guinier para $q \rightarrow 0$ (Gráfico 16).

Gráfico 16 - (A) Representação de Guinier para o monômero e o dímero teóricos (PDB 3WGV) e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS à amostra purificada. As setas indicam o maior valor de q utilizado no ajuste de uma equação linear: amostras experimentais (seta azul), monômero e o dímero teóricos (seta preta). (B) curvas teóricas (símbolos abertos) com os respectivos ajustes de uma equação linear (linha sólida); (C) curvas experimentais (símbolos abertos) com os respectivos ajustes de uma equação linear (linha sólida). A concentração da proteína era de 0,46 mg/mL.

O Gráfico 16 – B apresenta o ajuste linear para as curvas teóricas do monômero e do dímero e o Gráfico 16 – C mostra o ajuste linear para os dados experimentais. Os coeficientes angulares e lineares obtidos estão apresentados na Tabela 3.

$y = B - Ax$	Monômero	Dímero	0 mM SDS	0,5 mM SDS	1 mM SDS
B	3	4	6	5	5
A	677 (6)	974 (1)	8477 (244)	4538 (155)	3880 (122)

Tabela 3 - Coeficientes do ajuste linear obtidos para o monômero e o dímero teóricos e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS à amostra purificada.

Utilizando-se os coeficientes apresentados na Tabela 3 e a Equação 20 (item 3.9) foi possível obter os valores do raio de giro de “Guinier” R_{gG} e da intensidade de espalhamento $I(0)$. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

	Monômero	Dímero	0 mM SDS	0,5 mM SDS	1 mM SDS
R_{gG} (Å)	45 (4)	54 (2)	159 (27)	117 (22)	108 (19)
$I(0)$ (un. arb.)	22 (1)	46 (1)	499 (1)	181 (1)	118 (1)

Tabela 4 - Valores de R_{gG} e $I(0)$ obtidos através da lei de Guinier para o monômero e o dímero e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS à amostra purificada.

Analisando a Tabela 4, observa-se que, em relação a intensidade de espalhamento $I(0)$ da amostra de Na,K-ATPase purificada em C₁₂E₈ na ausência de SDS, há redução de 64 % e de 76 % do valor de $I(0)$ para as amostras com adição de 0,5 mM de SDS e 1 mM de SDS, respectivamente. Além disso, o $I(0)$ da amostra com 1 mM de SDS é 35 % menor do que o $I(0)$ da amostra com 0,5 mM de SDS. Portanto, pode-se afirmar que o surfactante dissocia os centros espalhadores (agregados/oligômeros) causando a diminuição do tamanho das estruturas presentes na solução de proteína.

Cabe acrescentar que a intensidade de espalhamento para o ângulo $q = 0$ pode representar a média ponderada dos valores de $I(0)$ das várias populações presentes na amostra. Desta maneira, a comparação dos $I(0)$ das amostras de proteína na ausência de SDS e após a adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS indica que a média ponderada dos valores de $I(0)$, considerando todas as populações presentes na amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈, é reduzida. Este fato sugere que o surfactante dissocia

os centros espalhadores “grandes” reduzindo a quantidade destas populações que passam a contribuir menos para a média do $I(0)$, resultando na diminuição do valor.

Para obter mais informações sobre o raio de giro e a distância máxima das amostras de proteína, as respectivas funções de distribuição de distâncias, $p(r)$, estão apresentadas no Gráfico 17 – A, B e C e as tabelas insertas no Gráfico 17 - A apresentam os valores de R_g e Dmax para as curvas teóricas e experimentais.

Gráfico 17 – (A) Função de distribuição de distâncias para o monômero e o dímero teóricos (PDB 3WGV) e para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS. (B) comparação entre a amostra de proteína na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS. (C) comparação entre a amostra de proteína na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS.

e 1 mM de SDS; (C) comparação entre a amostra de proteína após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS e o dímero teórico. A concentração da proteína era de 0,46 mg/mL.

Para comparar os valores de R_g obtidos através da $p(r)$ e os obtidos pela lei de Guinier R_{gG} construiu-se a Tabela 5:

	Monômero	Dímero	0 mM SDS	0,5 mM SDS	1 mM SDS
R_{gG} (Å)	45 (4)	54 (2)	159 (27)	117 (22)	108 (19)
R_g pela $p(r)$ (Å)	47 (1)	54 (1)	150 (4)	123 (8)	110 (9)

Tabela 5 - Comparação do raio de giro obtido pela lei de Guinier e pela função de distribuição de distâncias para o monômero e o dímero teóricos e para a Na,K-ATPase solubilizada em $C_{12}E_8$ e purificada na ausência de SDS e após adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS à amostra de proteína purificada.

Como os valores de R_g calculados pela $p(r)$ são compatíveis com os valores de R_{gG} e apresentam menor incerteza (Tabela 5), a discussão sobre as mudanças no raio de giro foram realizadas utilizando os valores determinados através da $p(r)$.

Analisando as $p(r)$ apresentadas no Gráfico 17 – A (Tabela inserida), pode-se ver que o raio de giro, R_g , e a distância máxima, D_{max} , da Na,K-ATPase solubilizada em $C_{12}E_8$ e purificada sem adição de SDS são aproximadamente 3 vezes maior do que os valores do dímero $(\alpha\beta)_2$ indicando certamente a presença de agregados/oligômeros maiores na amostra de proteína.

Ao adicionar SDS à amostra de proteína (0,5 mM e 1 mM) há redução das frequências de tamanhos na $p(r)$ e há o deslocamento do pico de maior ocorrência para a esquerda (tamanhos menores): sem SDS o pico está centrado em cerca de $r = 200$ Å e com a adição de SDS o pico se encontra próximo a $r = 100$ Å, como apresentado no Gráfico 17 – B. A maior redução está indicada pela área cinza no Gráfico 17 – B e ocorre entre a amostra na ausência de SDS (símbolos pretos) e a amostra após adição de 0,5 mM de SDS (símbolos vermelhos).

Por outro lado, a variação da função $p(r)$ entre a amostra com 0,5 mM de SDS (símbolos vermelhos) e a amostra com 1 mM de SDS (símbolos azuis) não é grande como evidenciado pela área rosa no Gráfico 17 – B e Gráfico 17 – C. Além disto, a D_{max} das amostras após adição do surfactante é praticamente a mesma e o valor do R_g destas amostras são compatíveis considerando a incerteza (Tabela 4). Isto poderia sugerir que o aumento da concentração de SDS para 1 mM não modificaria a amostra de proteína, mas isto não está correto, pois, como mencionado anteriormente, há redução do valor de $I(0)$ em relação a amostra de proteína com 0,5 mM de SDS. Analisando a variação destes parâmetros entre a amostra com 0,5 mM de SDS e a amostra com 1 mM de SDS, pode-se supor que a diminuição do $I(0)$ indica que o SDS dissocia algumas subunidades α e/ou β que formam os centros espalhadores (agregados e/ou oligômeros) diminuindo a massa destes agregados/oligômeros, mas a manutenção dos valores de R_g e de D_{max} podem indicar que as subunidades α e/ou β que permaneceram nos agregados/oligômeros foram alteradas, possivelmente, desenoveladas, de forma que o tamanho destes agregados e/ou oligômeros permanecessem o mesmo.

Analisando o Gráfico 17 – C, pode-se ver que a $p(r)$ da amostra de Na,K-ATPase após a adição de 1 mM de SDS é a que mais se aproxima da $p(r)$ do dímero, sendo muito semelhantes até o valor de $r = 100 \text{ \AA}$, mas ainda assim continua com uma grande diferença entre os valores de frequências de tamanhos (área azul claro – Gráfico 17 – C). Além disso, o menor raio de giro encontrado foi para amostra com 1mM de SDS e é mais de 2 vezes maior do que o calculado para o dímero $(\alpha\beta)_2$. O mesmo ocorre para a dimensão máxima e para o $I(0)$. Pode-se concluir então que o SDS interage com os agregados e/ou oligômeros reduzindo a ordem de sua estrutura, mas não é suficiente (até

1 mM) para dissociar a proteína formando uma solução que contenha apenas dímeros $(\alpha\beta)_2$.

Por outro lado, ao comparar o R_g e o D_{max} entre amostras experimentais, observa-se que na presença de 0,5 mM de SDS o raio de giro reduz 11% em relação a amostra pura (0 mM de SDS) e a distância máxima não se altera (Tabela inserida no Gráfico 17 – A). Já com 1 mM de SDS, o raio de giro diminui 21% enquanto a distância máxima se mantém praticamente a mesma em relação à Na,K-ATPase sem surfactante (Tabela inserida no Gráfico 17 – A).

Para interpretar a variação do R_g discutido acima, é necessário lembrar que caso a amostra de proteína apresente um equilíbrio de diferentes estados oligoméricos o raio de giro deve ser interpretado como a média ponderada do R_g de todas as espécies presentes na amostra (Equação 20 - item 3.8).

Portanto, ao analisar os dados obtidos levando em consideração o conceito apresentado, pode-se perceber que a redução do raio de giro ao adicionar o surfactante indica que o SDS interage com os agregados/oligômeros “grandes” dissociando-os em agregados/oligômeros com menor R_g , desta maneira a quantidade n destas populações “grandes” deve ser reduzida e contribui menos para a média do raio de giro, resultando na diminuição do valor do raio de giro.

Analisando as amostras experimentais, observa-se que 0,5 mM de SDS e 1 mM de SDS não diminuem a D_{max} da amostra na ausência do surfactante, sugerindo que estas concentrações não são suficientes para dissociar todos os agregados presentes na solução de proteína e ainda existem centros espalhadores com este tamanho máximo.

Os dados e análises obtidos até este ponto indicam que SDS interage com os agregados/oligômeros realizando um processo de dissociação das subunidades α e β reduzindo a ordem destes agregados/oligômeros. Este fato sugere que o surfactante poderia ser utilizado na preparação da amostra de Na,K-ATPase solubilizada em $C_{12}E_8$ e purificada para se obter populações com menor tamanho. Entretanto, qual seria o efeito de adicionar SDS à atividade da enzima?

Com o intuito de realizar este estudo mediu-se a atividade da proteína na presença de diferentes concentrações de SDS e o resultado está apresentado no Gráfico 18.

Gráfico 18 - Atividade específica da Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ seguida de adição de SDS. A concentração da proteína era de 0,46 mg/mL

Conforme podemos observar através do Gráfico 18 ocorre uma diminuição da atividade específica da amostra sem surfactante (550 U/mg,) seguindo um padrão de decaimento exponencial em função do aumento da concentração de SDS. Nas concentrações de surfactante utilizadas nos experimentos de SAXS, 0,5 mM e de 1 mM,

a atividade específica é de 43 U/mg e 40 U/mg, respectivamente, o que significa uma redução de 92% na atividade enzimática.

Comparando estes dados da influência do SDS na atividade enzimática com a redução de tamanho dos centros espalhadores na presença de SDS analisada através do SAXS, poderíamos ter a indicação de que os agregados/oligômeros maiores são responsáveis pela atividade, pois ao diminuir o tamanho dos agregados/oligômeros há a diminuição da atividade enzimática. Mas isto é refutado pela análise da variação da atividade específica (Gráfico 12) que mostrou que após a filtração há o aumento da atividade enzimática, o que indicou que os agregados/oligômeros “grandes” não são responsáveis pela atividade.

Então, para determinar a relação entre a diminuição do tamanho dos centros espalhadores com a redução da atividade enzimática na presença de SDS devemos lembrar que os resultados de DLS evidenciaram a existência de diferentes populações na amostra de Na,K-ATPase solubilizada em C₁₂E₈ e purificada (também demonstrado por Yoneda, 2014), o que nos permite afirmar que existem distintos estados agregados e oligoméricos na solução de proteína. Portanto, o SDS deve dissociar as subunidades α e β dos agregados/oligômeros maiores reduzindo a ordem destas populações, o que explica a redução no tamanho visto por SAXS, e simultaneamente provocar alguma modificação nos sítios catalíticos das unidades funcionais (Blanco, 2005), desnaturação e/ou desenovelamento, o que justificaria a redução na atividade enzimática.

Após os agregados/oligômeros serem dissociados, as subunidades α e β retiradas dos agregados/oligômeros provavelmente se reassociam para formar novas estruturas em solução. Uma estrutura que possivelmente seja formada neste processo é a estrutura α_4

detectada por Barbosa e col. (2010). Barbosa e col. (2010) determinaram que concentrações de $C_{12}E_8$ superiores a 2,7 mg/mL em uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ são capazes de dissociar as subunidades α e β e promoverem a reassociação das subunidades α em estruturas α_4 . As medidas e simulações de SAXS realizadas por Barbosa e col. (2010) indicaram que a estrutura α_4 encontra-se em um envelope com formato de um elipsoide oblato. Além disso a estrutura α_4 possui apenas 10% da atividade enzimática inicial (Barbosa et al, 2010), assim como as amostras de proteína após adicionar SDS estudadas neste projeto (Gráfico 18). Portanto a estrutura α_4 pode estar presente na amostra de proteína de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ após utilizar o surfactante.

Além disso, retornando as curvas de SAXS para o monômero e dímero teóricos para a Na,K-ATPase solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ na ausência de SDS e após a adição de 0,5 mM e 1 mM de SDS (Gráfico 14) e lembrando que os valores de $I(0)$, R_g e D_{max} diminuem com o aumento da concentração de SDS, poderíamos inicialmente sugerir o uso de SDS para dissociar os agregados em $(\alpha\beta)_2$. Isto poderia ser feito, porém os dados de atividade enzimática apresentados no Gráfico 18 mostram que a proteína perde sua atividade ao interagir com SDS.

Pode-se concluir então que as análises de SAXS auxiliaram no estudo da interação do SDS com a proteína Na,K-ATPase e mostraram que a solução de proteína apresenta diferentes estados agregados e/ou oligoméricos. Além disso, ao se comparar a ação do SDS com a ação do filtro (item 4.2) pode-se afirmar que os dois são capazes de reduzir o tamanho dos agregado/oligômeros em solução mas o surfactante diminui a atividade enzimática da Na,K-ATPase, enquanto o uso do filtro aumenta a atividade enzimática

específica, sugerindo que a filtração é uma boa opção para a retirada dos oligômeros muito grandes de Na,K-ATPase em solução. Lembrando que oligômeros menores voltam a se reassociar com o tempo, este procedimento seria útil apenas para medidas experimentais que envolvem pequenos tempos de observação, da ordem de alguns minutos, pois há aumento da intensidade de espalhamento de luz (Gráfico 8) e do valor do diâmetro médio (Gráfico 10) desde o instante em que a amostra é filtrada.

4.4. Bioestimulação da Na,K-ATPase

Conforme descrito nos itens anteriores, devido a polidispersão de espécies que coexistem em solução após a solubilização e purificação da proteína em C₁₂E₈, assim como a agregação das mesmas com o tempo, não foi possível estabelecer um controle do estado oligomérico/agregado que estaria sendo irradiado em cada instante t de tempo. Por isso, tal limitação impossibilitou a realização de um estudo seguro da influência do laser na atividade enzimática da Na,K-ATPase purificada em C₁₂E₈ após utilização do filtro.

Os experimentos de irradiação foram então realizados com o laser de $\lambda = 650$ nm, laser $\lambda = 780$ nm e laser $\lambda = 532$ nm com amostras de Na,K-ATPase de duas preparações diferentes: em fração de membrana e em proteolipossomo DPPC:DPPE (1:1), conforme preparações descritas em Materiais e Métodos.

4.4.1. Fração de membrana rica em Na,K-ATPase

Os dados de variação de atividade enzimática em função de dose para a amostra de fração de membrana contendo Na,K-ATPase, para diferentes comprimentos de onda estão apresentados no Gráfico 19 a seguir:

Gráfico 19 - Biomodulação da Na,K-ATPase presente na fração de membrana. A concentração da proteína era de 1,53 mg/mL. Para cada ponto experimental foram irradiados 100 μ L de amostra para realizar medidas de atividade em triplicata (3 medidas de 30 μ L de amostra).

Conforme podemos observar no Gráfico 19, a irradiação de Na,K-ATPase com os três comprimentos de onda diferentes apresenta uma região de inibição da atividade específica para valores de dose menores que 10 J/cm². Para valores de dose entre 10-30 J/cm² há uma região de aumento da atividade, sendo o maior aumento de cerca de 15%. Para os lasers de 650nm e de 780nm doses superiores a 35 J/cm² promovem redução da atividade da proteína e o mesmo ocorre para o laser de 532 nm após doses de 55 J/cm².

Portanto, a irradiação de Na,K-ATPase em fração de membrana realizada com os 3 comprimentos de onda estudados (532, 650 e 780 nm) induziu um aumento de até 15% da atividade enzimática dependente da dose de energia depositada.

Para verificar a estabilidade da atividade da enzima pós irradiação realizou-se o monitoramento da resposta da atividade enzimática da Na,K-ATPase ao longo do tempo. Para esta medida escolheu-se a dose de 18 J/cm², correspondente ao máximo de

estimulação para os três lasers empregados (Gráfico 19). O resultado pode ser apreciado no Gráfico 20:

Gráfico 20 - Monitoramento da variação da atividade da Na,K-ATPase em fração de membrana em função do tempo pós irradiação. A concentração da proteína era de 1,53 mg/mL. Cada ponto experimental corresponde as medidas de irradiação de 100 µL de amostra para realizar medidas de atividade em triplicata (3 medidas de 30 µL de amostra).

Durante as 2 primeiras horas o controle manteve-se constante (dado não mostrado) e as amostras irradiadas sofreram uma redução de atividade. Apesar disto, as amostras irradiadas continuaram com maior atividade, sendo 4% de aumento para o laser verde e vermelho e 7 % para o laser infravermelho. Após 4 horas de observação, a amostra controle apresentou uma redução de 2% no valor da atividade e a irradiada com $\lambda = 532$ nm teve um decréscimo maior resultando na diminuição da variação da atividade de 1%, ou seja, praticamente retornou à atividade basal. Não houve variação da atividade entre 2 e 4 horas para as amostras irradiadas com $\lambda = 650$ nm e $\lambda = 780$ nm. Após 6 horas, todas as amostras irradiadas e o controle possuíam a mesma atividade enzimática.

4.4.2. Na,K-ATPase reconstituída em proteolipossomo

Os dados de bioestimulação obtidos para a proteína reconstituída em proteolipossomo DPPC:DPPE (1:1) estão apresentados no Gráfico 21:

Gráfico 21 - Biomodulação da Na,K-ATPase reconstituída em proteolipossomo. A concentração da proteína era de 1,68 mg/mL. Para cada ponto experimental foram irradiados 35 μ L de amostra para realizar medidas de atividade em triplicata (3 medidas de 10 μ L de amostra).

Conforme podemos observar, no intervalo de doses estudados, irradiar a enzima com $\lambda = 532\text{nm}$ foi capaz de estimular a atividade da enzima apenas com a dose de 6 J/cm^2 , sendo o aumento de 15%. Antes e depois deste valor a irradiação induz redução da atividade. Por outro lado, irradiação com os lasers de 650 nm e de 780 nm promove bionibição para doses inferiores a 3 J/cm^2 e superiores a 8 J/cm^2 . Entre 3-8 J/cm^2 há uma região de aumento da atividade específica da enzima com cerca de 15% de estimulação máxima.

Portanto, assim como para o sistema de fração de membrana, a irradiação com os três lasers foi capaz de promover um aumento de até 15% da atividade enzimática, com

regiões de inibição antes e após este pico de estimulação. Este padrão semelhante de bioestimulação e bioinibição sugere que a biomodulação não depende do comprimento de onda, mas da dose utilizada.

Gráfico 22 - Variação da atividade da Na,K-ATPase reconstituída em proteolipossomo em função do tempo pós irradiação. A concentração da proteína era de 1,68 mg/mL. Cada ponto experimental corresponde as medidas de irradiação de 35 µL de amostra para realizar medidas de atividade em triplicata (3 medidas de 10 µL de amostra).

Em termos de estabilidade pós irradiação, o Gráfico 22 apresenta a variação de atividade para o sistema do proteolipossomo com o tempo. A dose de energia escolhida para o estudo foi de 6 J/cm², correspondendo ao máximo da estimulação observada no Gráfico 21.

Pode-se ver que a bioestimulação promovida pelos três lasers decai ao longo do tempo e a taxa de decaimento para os três laser é praticamente a mesma. Além disso, 6 horas após a irradiação as amostras de proteína possuem a mesma atividade do que a amostra não irradiada, pois a variação da atividade específica das irradiadas é apenas 2%

maior. O mesmo efeito ocorreu para a Na,K-ATPase em fração de membrana (Gráfico 20).

O retorno da atividade estimulada para o nível basal também foi detectado por Santos e col.. (2007) para a amostra de proteína em fração de membrana. Nos estudos de Santos e col.. (2007) a atividade estimulada diminui ao longo do tempo e após 7 horas a atividade enzimática é igual à da amostra antes de irradiar.

4.4.3. Comparação da Irradiação entre Na,K-ATPase em fração de membrana e reconstituída em proteolipossomo

Neste projeto foram utilizados 3 comprimentos de onda e doses diferentes para investigar como a irradiação da Na,K-ATPase com fótons de baixa intensidade podem aumentar a atividade enzimática da mesma. Os resultados obtidos foram comparados com os 4 artigos publicados na literatura que investigaram a biomodulação da Na,K-ATPase (Kilanczyk et al, 2002; Kujawa et al, 2004; Kassak et al, 2006; Santos et al, 2007) e cada um deles utilizou apenas um comprimento de onda.

Portanto, para facilitar a comparação entre os meios miméticos, dividiu-se os resultados da Na, K-ATPase em fração de membrana e reconstituída em proteolipossomo em função do comprimento de onda e estão apresentados nos Gráficos 23 a 25. A dose foi normalizada pela massa de proteína presente no volume irradiado. O volume irradiado da fração de membrana rica em Na,K-ATPase foi de 100 μ L e a concentração da proteína foi de 1,53 mg/mL, resultando na normalização de 0,153 mg; enquanto o proteolipossomo foi irradiado em alíquotas de 35 μ L e a concentração era de 1,68 mg/mL, portanto o fator de normalização foi de 0,058 mg.

O Gráfico 23 apresenta a curva de biomodulação da Na,K-ATPase para o comprimento de onda de 532 nm. O sistema com o proteolipossomo possui uma região estreita de aumento da atividade específica (70-120 J.cm⁻²/mg). Já o intervalo de estimulação da fração de membrana é mais extenso (50-200 J.cm⁻²/mg). A maior estimulação ocorre aproximadamente em 100 J.cm⁻²/mg para os dois sistemas, sendo o aumento de cerca de 15% e 11% para o proteolipossomo e fração de membrana, respectivamente. O proteolipossomo apresenta duas regiões de diminuição da atividade, antes e após o pico de estimulação, enquanto que para a fração de membrana este efeito só ocorre antes do pico de estimulação.

Gráfico 23 – Irradiação com o laser de $\lambda = 532$ nm: Proteolipossomo x Fração de membrana.

Kassak e col. (2006) realizaram a irradiação de 110 μ L de células *ghosts* obtidas a partir de eritrócitos humanos na concentração de 1 mg/mL com o laser de $\lambda = 532$ nm (30 mW). Os autores detectaram acréscimo linear da atividade da Na,K-ATPase presente na amostra com o aumento de dose no intervalo entre 19 – 63 J/cm². Para comparar os resultados obtidos pelos autores com os obtidos neste trabalho, foi realizada a

normalização pela massa de proteína irradiada mencionada anteriormente (produto do volume irradiado pela concentração da proteína). Para a dose normalizada de 110 J.cm²/mg Kassak e col. (2006) reportaram um aumento de cerca de 15% da atividade enzimática, assim como neste projeto; após este valor de dose normalizada há diminuição da estimulação da atividade (Gráfico 23) mas no caso de Kassak e col. (2006) há aumento na estimulação da atividade chegando a 160% de aumento, sendo muito diferente dos nossos resultados. O aumento de atividade de 15% promovido pela irradiação de células *ghosts*, descrito por Kassak e col. (2006), foi também verificado neste projeto, mas a relação linear entre dose e aumento da atividade não foi observada.

A comparação entre a variação da atividade enzimática para o sistema da fração de membrana rica em Na,K-ATPase e para o proteolipossomo para o comprimento de onda de $\lambda = 650$ nm está apresentada no Gráfico 24.

Gráfico 24 – Irradiação com o laser $\lambda = 650$ nm: Proteolipossomo x Fração de membrana.

As curvas de variação de atividade específica são parecidas para os dois sistemas estudados: possuem uma região de redução da atividade entre 0-50 J.cm⁻²/mg e após 150 J.cm⁻²/mg; possuem um intervalo de aumento da atividade entre 50-150 J.cm⁻²/mg, com o pico de estimulação centrado em aproximadamente 100 J.cm⁻²/mg, sendo 15% de aumento para o proteolipossomo e de 11% para a fração de membrana.

Santos e col.. (2007) realizaram a irradiação da proteína Na,K-ATPase reconstituída em proteolipossomo e em fração de membrana com um laser de $\lambda = 685$ nm (35 mW) e Kilanczyk e col. (2002) utilizaram um laser de $\lambda = 670$ nm (7 mW) para irradiar células *ghosts* obtidas a partir de eritrócitos humanos. Nos dois estudos os lasers promoveram o aumento da atividade enzimática, mas o percentual de aumento e as doses necessárias para o acréscimo são diferentes. No caso de Santos e col. (2007) a Na,K-ATPase reconstituída em proteolipossomo foi estimulada na região de 0-20 J/cm² e em fração de membrana entre 30-40 J/cm², tendo uma variação máxima de atividade de 40%. Cabe acrescentar que os autores não especificaram o volume de amostra de proteína irradiada impossibilitando a normalização para comparação com os dados deste projeto. Já em Kilanczyk e col. (2002), a Na,K-ATPase em células *ghosts* de eritrócitos humanos aumenta a atividade sob irradiação no intervalo de doses entre 19-95 J/cm², sendo o máximo de aumento de cerca de 250%. Cabe acrescentar que os autores não especificaram o volume de amostra de proteína irradiada impossibilitando normalização para comparação com os dados deste projeto.

No Gráfico 25 apresentamos a comparação entre o variação da atividade enzimática para o sistema da fração de membrana rica em Na,K-ATPase (fração de membrana) e para o proteolipossomo para o comprimento de onda de 780 nm. As curvas

apresentam uma região de redução da atividade enzimática entre 0-50 J.cm²/mg seguida de uma região de aumento da atividade (50-200 J.cm²/mg). O máximo de estimulação para a fração de membrana é obtida com cerca de 150 J.cm²/mg, enquanto que para o proteolipossomo é de aproximadamente 100 J.cm²/mg. Nos dois casos o aumento máximo é de 12%.

Gráfico 25 – Irradiação com o laser $\lambda = 780$ nm: Proteolipossomo x Fração de membrana.

Kujawa e col. (2004) estudaram a influência da irradiação na atividade de duas ATPases (Mg-ATPase e Na,K-ATPase) presentes em células *ghosts* de eritrócitos humanos utilizando um laser com $\lambda = 810$ nm, com potência variável configurado com 10 mW, 200 mW e 400 mW, mas com a mesma dose. Os autores somaram a variação da atividade das duas ATPases e reportaram aumento da atividade específica sob irradiação para as três potências do laser, mas o intervalo de dose e as curvas de estimulação se mostraram dependentes da potência do laser utilizada. Considerando a atividade total das

duas ATPases, a potência de 10 mW aumentou a atividade quando irradiadas com dose entre 1-30 J/cm², para 200 mW a estimulação acontece entre 1-20 J/cm² e 400 mW a proteína aumenta a atividade somente até 5 J/cm². Após esta dose, há redução da atividade. O aumento máximo da atividade foi de 39%, 23% e 21% para as potências de 10, 200 e 400 mW, respectivamente.

Analisando os dados obtidos por Kujawa e col. (2004) é possível observar que a resposta da proteína é diferente em função da potência do laser. Isto sugere que o efeito da estimulação depende da taxa de entrega de dose de energia, pois lasers de potências diferentes necessitam de tempos de exposições diferentes para entregar a mesma dose de energia (laser com maior potência precisa de menos tempo, ou seja, maior taxa de entrega de dose). Por outro lado, como as potências utilizadas pelos autores são muito diferentes, sendo de 200 mW e 400 mW, 20 e 40 vezes maiores do que a potência de 10 mW, pode ser que os mecanismos de interação da irradiação não sejam os mesmos neste grande intervalo de potências, ou seja, até 50 mW (laser de baixa potência) o mecanismo de interação seja um, enquanto que para potências maiores a interação seja outra.

Além disso, com o aumento da potência do laser Kujawa e col. (2004) reportaram a diminuição da atividade enzimática para as mesmas doses. Tal fato sugere que altas taxas de entrega de dose de energia (laser de alta potência) devem saturar o sistema levando a possível desnaturação da proteína.

Para comparar os dados obtido por Kujawa e col. (2004) foi realizada a normalização da dose pela massa de proteína irradiada (concentração 1 mg/mL; volume irradiado 0,5 mL). O maior aumento aqui encontrado na atividade utilizando o laser de 780 nm foi de 15% para a dose normalizada de 100 J.cm⁻²/mg (proteolipossomo) e 150

J.cm⁻²/mg (fração de membrana) enquanto que Kujawa e col. (2004) obteve o máximo de 39% de aumento (10 mW de potência) para a dose normalizada de 20 J.cm⁻²/mg (*ghosts* de eritrócito humano). Os resultados são discrepantes. Isto possivelmente ocorre pois Kujawa e col. (2004) consideram a atividade de duas ATPases juntas e neste projeto levamos em conta apenas a atividade da Na,K-ATPase, além do que o meio onde a Na,K-ATPase se encontra é diferente, proteolipossomo e fração de membrana neste projeto e *ghosts* de eritrócito humano no caso de Kujawa e col. (2004).

Tendo em vista as análises e comparações apresentadas, pode-se concluir que os experimentos realizados neste projeto, com fótons com comprimentos de onda variando de 532 a 780 nm, podem alterar a atividade enzimática da enzima, de acordo com os resultados reportados na literatura (Kilanczyk et al, 2002; Kujawa et al, 2004; Kassak et al, 2006; Santos et al, 2007).

Além disso, a grande semelhança entre as curvas de biomodulação entre a Na,K-ATPase em fração de membrana e reconstituída em proteolipossomo (Gráficos 23-25), para o mesmo comprimento de onda, indicam que a reconstituição em proteolipossomo é efetiva para se investigar variações da enzima por irradiação.

4.4.4. Conclusões sobre a Bioestimulação da Na,K-ATPase

Com o intuito de encontrar uma explicação do processo envolvido na biomodulação da Na,K-ATPase por lasers de baixa potência estão expostas as hipóteses reportadas na literatura, seguidas das conclusões obtidas a partir das análises dos dados experimentais deste projeto e uma comparação com as hipóteses apresentadas.

Os autores (Kilanczyk et al, 2002; Kujawa et al, 2004; Kassak et al, 2006) afirmam que o primeiro efeito seria a absorção de luz, onde a absorção de fótons excita o material e insere energia no sistema desencadeando uma cascata de reações bioquímicas. Este seria o efeito primário e cada autor sugere algumas organelas celulares que poderiam absorver os fótons. Kilanczyk e col. (2002) sugerem que os responsáveis pela absorção da luz seriam os componentes da cadeia respiratória (flavinas, desidrogenases, citocromos e citocromo c oxidase). Para Kujawa e col. (2004) as enzimas mitocondriais, ou citocromos e flavinas presentes na cadeia respiratória mitocondrial, ou porfirinas endógenas poderiam absorver a luz infravermelha $\lambda = 810$ nm. Já Kassak e col. (2006) sugerem que o comprimento de onda de 532 nm poderia ser absorvido por hemoglobina, enzima catalase e peroxidase.

Como efeito secundário, Kilanczyk e col. (2002) sugerem que a energia absorvida ativaria os componentes da cadeia respiratória que levaria a mudanças no estado redox da mitocôndria e aumento da concentração de ATP no meio intracelular, o que estimularia a atividade da Na,K-ATPase. O autor também propõe que o aumento da atividade poderia ocorrer pelo aumento da concentração de Na^+ no interior da célula, deslocamento das subunidades na membrana plasmática ou aumento da afinidade pelos íons de sódio. Esta última possibilidade não deve ocorrer pois os dados obtidos pelo pós doutorando Leandro Barbosa no grupo de col.aboração do prof. Pietro Ciancaglini (FFCLRP/USP) mostraram que, no ensaio da atividade, ao se variar a concentração de ATP a constante de afinidade pelo substrato não mudou. Do mesmo modo, ao se fixar o ATP e sódio (Na), e variar o potássio (K), a constante de afinidade para o K não se alterou e o mesmo ocorreu quando se fixou ATP e K e se variou Na.

Já para Kujawa e col. (2004) e Kassak e col. (2006) o efeito secundário seria o aumento da “temperatura local” causado pela energia absorvida. O acréscimo da “temperatura local” poderia causar modificações estruturais na proteína, como deslocamento dos sítios catalíticos, o que aumentaria a atividade enzimática. Esta “temperatura local” seria a temperatura em apenas uma microrregião e não aumentaria a temperatura média da amostra, uma vez que a temperatura do sistema, durante a irradiação com laser de baixa potência, sofre apenas pequenas alterações, de 0,1 a 0,5 °C (Basford, 1989; Babapour et al., 1995).

Por outro lado, as análises e comparações realizadas neste projeto permitem-nos fazer as seguintes observações sobre o mecanismo de interação do laser com as amostras de proteína:

Independente (ou pouco depende) do comprimento de onda, pois os três lasers com os comprimentos de onda de 532, 650 e 780 nm foram capazes de estimular a atividade enzimática, bem como os reportados na literatura: 532 nm (Kassak et al, 2006), 670 nm (Kilanczyk et al, 2002), 685 nm (Santos et al, 2007) e o 810 nm (Kujawa et al, 2004). Este fato possibilita duas hipóteses: (i) a amostra de proteína possui banda de absorção em todos estes comprimentos de onda, (ii) o processo primário não é de absorção de fótons por um cromóforo da proteína. Como foi descrito no item 3.4 a proteína Na,K-ATPase não possui cromóforos para comprimentos de onda maiores que 320 nm e no Gráfico 7 vemos o espectro de absorção da Na,K-ATPase que comprova esta informação. Portanto, pode-se afirmar que a hipótese (ii) deve estar correta e o processo primário não deve ser a absorção de fótons por cromóforos da proteína.

Independente (ou pouco depende) do sistema onde a Na,K-ATPase está inserida,

pois o proteolipossomo e a fração de membrana tiveram respostas semelhantes. Isto indica que o efeito da irradiação ocorre na proteína. A hipótese de que a energia inserida na amostra ativaria a mitocôndria, ou componentes da hemoglobina, ou componentes da cadeia respiratória (Kilanczyk et al, 2002; Kujawa et al, 2004; Kassak et al, 2006;), não explica o efeito da irradiação na fração de membrana e no proteolipossomo, pois estes componentes não estão presentes nestas amostras.

Depende da dose, pois para os 3 lasers utilizados e para os dois sistemas estudados o aumento e a redução da atividade enzimática mudou em função da variação da dose de irradiação. Isto sugere que o efeito da irradiação depende da energia depositada no sistema.

O efeito da estimulação não é permanente. Kujawa e col. (2004) demonstraram que não houve peroxidação dos lipídios da membrana após a irradiação e Santos e col. (2007) verificaram que a proteína retorna ao nível basal de atividade enzimática algumas horas após a bioestimulação promovida pelo laser. Analisando o Gráfico 20 e o Gráfico 22 vemos que este retorno ao nível basal também foi verificado nesta dissertação. Portanto, as alterações promovidas na enzima não são permanentes.

Tendo em vista as características do efeito da irradiação é podemos sugerir um sistema primário de interação do laser com a proteína Na,K-ATPase. Para isso é necessário lembrar que o laser emite uma onda eletromagnética que possui um campo elétrico oscilatório ($\vec{E}$) e um campo magnético ($\vec{B}$) oscilatório, que são ortogonais entre si e entre a direção de propagação da onda.

Tsong (1990) apresenta alguns componentes da proteína que poderiam interagir com o campo elétrico, como por exemplo: os aminoácidos lisina, arginina e histidina que possuem carga positiva e o aspartato e o glutamato que possuem carga negativa. Como essas cargas nem sempre se anulam elas poderiam interagir com o campo elétrico oscilatório; um peptídeo possui um dipolo elétrico de 3,5 D (Debye), portanto, a estrutura secundária α -hélice formada por n amino ácidos possui um dipolo elétrico de 3,5n D e poderia interagir com o campo elétrico oscilatório. Uma lista com outras possibilidades de componentes da proteína que poderiam interagir com o campo elétrico se encontra no review *Electrical Modulation of Membrane Proteins*, Tsong, 1990.

Ao considerarmos apenas a subunidade α da Na, K-ATPase, existem 10 α -hélices do tipo transmembrana que poderiam interagir com o campo elétrico e a energia absorvida poderia ser utilizada para realizar uma pequena mudança conformacional na enzima.

Com isto, o efeito da estimulação não teria uma relação direta com o meio e sim diretamente com a proteína. Isto justificaria o fato da estimulação da atividade ser observada em todos os meios estudados (fração de membrana, proteolipossomo) e os reportados na literatura (solubilizada e purificada em $C_{12}E_8$ e eritrócitos humanos).

Por outro lado os lasers utilizados neste projeto (verde, vermelho e infravermelho) possuem diferentes intensidades de campo elétrico ($\vec{E}$). Mas como a mesma dose (J/cm^2) foi utilizada nas irradiações, houve uma normalização "temporal" da quantidade de energia depositada pelos lasers. Assim, a diferença de intensidade de campo elétrico ($\vec{E}$) dos lasers pode ter sido compensada pelos diferentes tempos de exposição da amostra de proteína permitindo que a amostra absorvesse a mesma quantidade de energia. Isto

justificaria o porquê a estimulação da atividade enzimática depende da dose utilizada e não depende do comprimento de onda dentro do intervalo estudado.

Cabe questionar se um campo elétrico é capaz de estimular a atividade da proteína Na,K-ATPase. Sepersu e Tsong (1984) mostraram que um campo elétrico senoidal pode aumentar a atividade da Na,K-ATPase e determinaram que as condições que otimizam este efeito é dada pela intensidade de 20 V/cm e frequência de 10^3 Hz. O experimento consistiu em colocar a amostra de células *ghost* obtidas a partir de eritrócitos humanos entre duas placas planas e paralelas e gerar um campo elétrico senoidal entre estas placas.

Além disso, Westerhoff e col. (1986) e Astumian e Robertson (1989) realizaram cálculos analíticos e simulações computacionais e mostraram que um campo elétrico é capaz de aumentar a atividade da Na,K-ATPase.

Comparando a frequência de oscilação do campo elétrico determinada por Sepersu e Tsong (1984), 10^3 Hz, com o mesmo parâmetro para um laser na região da luz visível, 10^{15} Hz, (lasers utilizados), percebe-se que há uma diferença da ordem de 10^{12} entre os valores. Quanto essa discrepância, Tsong (2002) afirma que não é conhecido os limites de frequência (altas ou baixas) e amplitude de campo elétrico que podem interagir com um sistema biológico, ademais ainda não foram realizados experimentos como os de Sepersu e Tsong (1984) com frequências de campo elétrico da ordem da luz visível (10^{15} Hz).

Por outro lado, Tsong (1990) afirma que a ativação da enzima pelo campo elétrico não deve causar desnaturação e a repetição dos experimentos mostrou que a ativação é completamente reversível. Santos e col. (2007) observaram que a atividade da enzima

estimulada retorna para o nível basal após algumas horas, assim como observamos aqui (Gráfico 20 e Gráfico 22). Esta semelhança nos efeitos observados pode sugerir que a interação do laser com a proteína seja através do campo elétrico. Outros experimentos seriam necessários para comprovar esta hipótese.

Antes de especular uma hipótese para o processo secundário do mecanismo de aumento da atividade enzimática, deve-se analisar o significado da medida de atividade das amostras irradiadas terem valores maiores do que as sem irradiar.

Por fim, para analisar o significado do aumento da atividade das amostras irradiadas é necessário entender o que é determinado na medida de atividade enzimática. Relembrando, a medida de atividade é realizada adicionando-se ATP no meio reacional e introduzindo a amostra de proteína nesta solução. Espera-se a reação acontecer em um tempo t estabelecido e cessa-se a reação com TCA. Mede-se então a quantidade de fosfato inorgânico resultante da hidrólise de ATP (item 3.6 e item 3.7). Portanto, determinar aumento na atividade enzimática significa medir maior quantidade de fosfato (P_i) na solução final. Este aumento na quantidade de P_i pode ser explicado pelo aumento da velocidade de hidrólise do substrato realizada pela Na,K-ATPase ser maior. Ou seja, se uma proteína sem irradiar demora T_1 para realizar a troca 1 vez, a proteína irradiada demoraria um tempo menor que T_1 , e portanto no mesmo tempo t de experimento ela teria realizado essa troca um número maior de vezes;

Assim, embora não conheçamos ainda as causas das variações de atividade fotoestimulada da enzima, pode-se observar um comportamento que é dose dependente e independe do comprimento de onda usado.

5. Conclusão

As principais conclusões deste trabalho são:

- SAXS e DLS mostraram que a amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ é constituída por um conjunto de estados oligoméricos e/ou agregados em equilíbrio em solução. O diâmetro médio das populações presentes na amostra é bem maior que o previsto para a estrutura dimérica ($\alpha\beta$)₂ ou ($\alpha\beta$)₄ reportada na literatura.
- A filtração (poro de 220 nm) foi capaz de retirar os grandes agregados/oligômeros da amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈ (27 % da massa total de proteína), reduzindo o diâmetro médio em 41% e aumentando em até 30% a atividade enzimática específica. Portanto, estas populações de grandes dimensões são cataliticamente inativas. De maneira interessante, também demonstramos que após a filtração as grandes populações são novamente formadas e um novo equilíbrio de estados oligoméricos e/ou agregados é obtido em 20 horas.
- O surfactante SDS, quando adicionado à amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada em C₁₂E₈, dissociou as subunidades dos grandes agregados/oligômeros resultando na redução do raio de giro de 11% (0,5 mM de SDS) e 21 % (1 mM de SDS). Porém, o surfactante iônico simultaneamente agiu também nas populações com atividade catalítica causando alguma mudança estrutural e/ou conformacional que resultou na perda de 90% da atividade enzimática.
- A irradiação com o uso de três lasers: $\lambda = 532$ nm (5 mW), $\lambda = 650$ nm (50 mW) e $\lambda = 780$ nm (50 mW) foi capaz de bioestimular Na,K-ATPase presente tanto em fração de membrana quanto reconstituída em lipossomo.

- A máxima estimulação da atividade enzimática foi de 15 % para a dose normalizada de aproximadamente $100 \text{ J.cm}^2/\text{mg}$ para a amostra de Na,K-ATPase presente na fração de membrana e para a reconstituída em lipossomo. Cerca de 6 horas após a irradiação a atividade enzimática retornou para nível basal em todos os casos (para os 3 lasers e para os dois sistemas).
- A bioestimulação depende do valor de dose de energia depositada e não depende do comprimento de onda estudado neste intervalo.
- Sugerimos que o efeito da bioestimulação induzida deve ocorrer devido à interação entre o campo elétrico do laser com os dipolos presentes na α -hélice de Na, K-ATPase. Entretanto, este ponto ainda precisa ser melhor investigado e será tema de futuros trabalhos.

7. Referências

- Antolovic, R.; Hamer, E.; Serpersu, E.H.; Kost, H.; Linnertz, H.; Kovarik, Z.; Schoner, W. (1999) Affinity labelling with MgATP analogues reveals coexisting Na⁺ and K⁺ forms of the alpha-subunits of Na⁺/K⁺-ATPase. *European Journal of Biochemistry*, 261,181-189.
- Apell, H.J. (2004) How to P-Type ATPases transport ions?. *Bioelectrochemistry* 63: 149-156, 2004.
- Arzenšek, D. *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*, 2010.
- Astumian, R.D.; Robertson, B. (1989) Nonlinear effect of an oscillating electric field on membrane proteins. *The Journal of Chemical Physics* 91: 4891.
- Babapour, R.; Glassberg, E.; Lask, G.P. (1995) Low-energy system. *Clinics in Dermatology* 13:87–90.
- Barbosa, L.R.S.; Rigos, C.F.; Yoneda, J.S.; Itri, R.; Ciancaglini, P. (2010) Unraveling the Na,K-ATPase $\alpha 4$ subunit assembling induced by large amounts of C12E8 by means of small-angle X-ray scattering. *Journal Physics Chemistry B* 114-35.
- Barbosa, L.R.S.; Spinozzi, F.; Mariani, P.; Itri, R. (2012) Small-angle X-ray scattering applied to proteins in solution. *Proteins in Solution and at Interfaces: Methods and Applications in Biotechnology and Materials Science*.
- Barwe, S.P.; Kim, S.; Rajasekaran, S.A.; Bowie, J.U.; Rajasekaran, A.K. (2007) Janus model of the Na,K-ATPase beta-subunit transmembrane domain: distinct faces

- mediate alpha/beta assembly and beta-beta homo-oligomerization. *Journal of Molecular Biology*, 365(3),706-14.
- Basford, J.R. (1989) Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. *Lasers in Surgery and Medicine* 9:1–5.
- Bergmann, A.; Fritz, G.; Glatter, O. (2000) Solving the indirect Fourier transformation including the structure factor requires a nonlinear least-squares approach. The Boltzmann simplex simulated annealing proves to be a very efficient for this task. *Journal of Applied Crystallography* 33: 1212-1216.
- Bernath, P. F. *Spectra of Atoms and Molecules*, Oxford University Press; 2 edição, 2005
- Berne, B.J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Dover Publications, 2000.
- Blanco, G. (2005) Na,K-ATPase Subunit Heterogeneity as a Mechanism for Tissue-Specific Ion Regulation. *Seminars in Nephrology* 25: 292-303.
- Brotherus, J.R.; Moller, J.V.; Jorgensen, P.L. (1981) Soluble and Active Renal Na,K-ATPase with Maximum Protein Molecular Mass $170,000 \pm 9,000$ Daltons; Formations of Larger Units By Secondary Aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 100.
- Cornelius, F. (2001) Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase Activity by Phospholipids and Cholesterol. I. Steady-State Kinetics. *Biochemistry* 40: 8842-8851.

- Coulter, C.B.; Stone, F. M.; Kabat, E. A. (1935) The structure of the ultraviolet absorption, spectra of certain proteins and amino acids. *The Journal of General Physiology* 19(5): 739–752.
- Craig, W.S. (1982) Determination of the distribution of sodium and potassium ion activated adenosinetriphosphatase among the various oligomers formed in solutions of nonionic detergents. *Biochemistry* 25: 2667-2674.
- Craig, W.S. (1982) Monomer of sodium and potassium ion activated adenosinetriphosphatase displays complete enzymatic function. *Biochemistry* 21: 5707-5717.
- Donnet, C.; Aristarkhova, E. and Sweadner, K.J. (2001) Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and gamma subunit association with the C-terminal domain. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 7357-7365.
- Eisberg, R.; Resnick, R. *Quantum Physics of Atoms, Molecules, Solids, Nuclei and Particles*, John Wiley & Sons; 2 edição, 1985.
- Enoki, T. A. *Caracterização por Espalhamento de Luz de Dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos*, São Paulo, 2010. Dissertação - Universidade de São Paulo.
- Gadsby, D.C.; Bezanilla, F.; Rakowski, R.F.; Paul De Weer; Holmgren, M. (2012) The dynamic relationships between the three events that release individual Na⁺ ions from the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature Communications* 3: 669.

- Geering, K. (2006) FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Seminars in Nephrology* 25: 304-311.
- Geering, K. (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 17(5): 526-32.
- Giacomelli, F.C. Estruturação e Comportamento Físico-Químico de Sistemas Coloidais sob Efeito de Campo Elétrico Externo como Perspectiva para a Ciência Macromolecular, Porto Alegre, 2009, Tese - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Girotti, A.W. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *The Journal of Lipids Research* 39: 1529-1542.
- Glatter, O.; Kratky, O.; *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, 1982.
- Goldemberg, J. A interação da radiação eletromagnética com a matéria. Funbec, 1972.
- Griffiths, D.J *Introduction to Electrodynamics*. Addison Wesley; 3 edição, 1999.
- Grimsley, G.R.; Pace, C.N. (2004) Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science* 33.
- Guinier A.; Fournet, G. *Small-Angle Scattering of X-Rays*. Wiley & Sons, 1955.
- Hamblin, M.R., Demidova-Rice, T.N. (2007) Cellular chromophores and signaling in low level light therapy, *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE* 6428, art. no. 642802

- Hartree, E. F. (1972) Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. *Analytical Biochemistry* 48: 422-427.
- Hasler, U.; Wang X.Y.; Crambert, G.; Beguin, P.; Jaisser, F.; Horisberger, J.D.; Geering, K. (1998) Role of the beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 30826-30835.
- Heinonen, J.K.; Lahti, R.J. (1981) A New and Convenient Colorimetric Determination of Inorganic Orthophosphate and Its Application to the Assay of Inorganic Pyrophosphatase. *Analytical Biochemistry* 113: 313-317.
- Hu, W.P.; Wang, J.J.; Yu, C.L.; Che, C.C.; Chen, G.S.; Yu, H.S. (2007) Helium-Neon Laser irradiation stimulates Cell proliferation through Photostimulatory effects in mitochondria. *Journal of Investigative Dermatology* 127: 2048-57.
- Ivanov A.V.; Gable, M.E.; Askari, A. (2004) Interaction of SDS with Na⁺/K⁺-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 29832-29840.
- Jorgensen, P.L.; Hakansson, K.O.; Karlsh, S.J.D. (2003) Structure and Mechanism of Na, K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annual Review of Physiology* 65: 817-849.
- Kanai, R.; Ogawa, H.; Vilsen, B.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. (2013) Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺,K⁺-ATPase preceding the E1P state. *Nature* 502: 201–206.

- Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry* 71: 511-535.
- Kassak, P.; Sikurova, L.; Kvasnicka, P.; Bryszewska, M. (2006) The response of Na⁺,K⁺-ATPase of human erythrocytes to green laser light treatment. *Physiological Research*, 55, 189-194.
- Kilanczyk, E.; Palecz, D.; Bryszewska, M. (2002) Effect of Red Laser Light on Na⁺,K⁺-ATPase Activity in Human Erythrocyte Membranes Sensitized with Zn-Phthalocyanine. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 20-2.
- Kirschbrown, J. (2007) Small-Angle X-ray Scattering: A Concise Review.
- Koppel, D.E. (1972) Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants, *Journal of Chemical Physics* 57: 4814.
- Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5.
- Kujawa, J.; Zavodnik, L.; Zavodnik, I.; Vyacheslav, B.; Lapshyna, A.; Bryszewska, M. (2004) Effect of Low-Intensity (3.75-25 J/cm²) Near-Infrared (810 nm) Laser Radiation on Red Blood Cell ATPase Activities and Membrane Structure. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery* 2: 111-117.
- Laughery, M.; Todd, M.; Kaplan, J.H. (2004) Oligomerization of the Na,K-ATPase in cell membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36339-48.

- Leach, S. J.; Schera, H. A. (1960) Effect of Light Scattering on Ultraviolet Difference Spectral. *Journal of the American Chemical Society*, 82 (18): 4790–4792.
- Legler, G.; Müller-Platz, C.M.; Mentges-Hettkamp, M.; Pflieger, G.; Jülich, E. (1985) On the chemical basis of the Lowry protein determination. *Analytical Biochemistry* 150(2):278-87
- Letokhov, V. (1983) Laser-induced chemistry. *Nature* 305: 103-8.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* (1):265-75.
- MacGregor, S.E.; Walker, J.M. (1993) Inhibitors of the Na,K-ATPase. Review *Comparative Biochemistry and Physiology* 105C:1-9.
- Madan, P.; Rose, K.; Watson, A.J. (2007) Na/K-ATPase beta1 subunit expression is required for blastocyst formation and normal assembly of trophectoderm tight junction-associated proteins. *Journal of Molecular Biology* 282: 12127-12134.
- Mahaney, J.E.; Girard, J.P.; Grisham, C.M. (1990) Saturation transfer EPR measurements of the rotational motion of a strongly immobilized ouabain spin label on renal Na,K-ATPase. *FEBS Letters* 260: 160-164.
- Malik, N.; Canfield, V.A.; Beckers, M.C.; Gros, P.; Levenson, R. (1996) Identification of the mammalian Na,K-ATPase β 3 subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 22754-22758.

- Marra, E.; Vacca, R.A.; Moro L.; Greco, M. (1997) Photomodulation of biosynthetic activities in cell systems by low-power visible light. *Trends Photochem Photobiol* 4:257–67.
- Martin, D.W. (2005) Structure-function relationships in the Na⁺,K⁺-pump. *Seminars in Nephrology* 25: 282-91.
- Martin, D.W.; Marecek, J.; Scarlata, S.; Sachs, J.R. (2000) $\alpha\beta$ protomers of Na⁺,K⁺-ATPase from microsomes of duck salt gland are mostly monomeric: Formation of higher oligomers does not modify molecular activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 3195-3200.
- Martin-Vasallo, P.; Dackowski, W.; Emanuel, J.R.; Levenson, R. (1989) Identification of a putative isoforma of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 4613-4618.
- Maxwell, J. Clerk (1865) A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 155: 459-512.
- Morth, J.P.; Pedersen, B.P.; Toustrup-Jensen, M.S.; Sørensen, T.L.M.; Petersen, J.; Andersen, J.P.; Vilsen, B.; Nissen, P. (2007) Cristal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 150, 1043-1050.
- Noble, J. E.; Knight, A.E.; Reason, A. J.; Matola, A.D.; Bailey, M. J. A. (2007) A Comparison of Protein Quantitation Assays for Biopharmaceutical Applications *Mol Biotechnol* 37: 99–111.

- Noske, R.; Cornelius, F.; Clarke, R.J. (2010) Investigation of the enzymatic activity of the Na^+, K^+ -ATPase via isothermal titration microcalorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797(8): 1540-5.
- Ogawa, H.; Shinoda, T.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na^+, K^+ -ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(33): 13742-7.
- Periyasamy, S.M.; Huang, W.; Askari, A. (1983) Subunit Associations of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) - dependent Adenosine Triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* 258(16): 9878-9885.
- Pilotelle-Bunner, A.; Matthews, J.M.; Cornelius, F.; Apell, H.J.; Sebban, P. and Clarke, R.J. (2008) ATP binding equilibria of the $\text{Na}(+), \text{K}(+)$ -ATPase. *Biochemistry* 47(49): 13103-14.
- Popovski, G. (2009) Software Manual GIFT.
- Provencher, S. W. (1982) Contin: A General Purpose Constrained Regularization Program for Inverting Noisy Linear Algebraic and Integral Equations, *Computer Physics Communications* 27: 229-242.
- Reinhard, L.; Tidow, H.; Clausen, M.J.; Nissen, P., (2012) Na^+, K^+ -ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na^+, K^+ -ATPase. *Molecular and Cellular Life Sciences* 70: 205-22.

- Rigos, C.F.; Nobre, T.M.; Zaniquelli, M.E.D.; Ward, R.J.; Ciancaglini, P. (2008) The association of Na,K-ATPase subunits studied by circular dichroism, surface tension and dilatational elasticity, *Journal of Colloid and Interface Science* 325: 478-484.
- Robertson, C.A., Evans, D.H.; Abrahamse, H. (2009) Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96: 1–8.
- Rose, A.M.; Valdes, R.Jr. (1994) Understanding the Sodium Pump and Its Relevance to Disease. *Clinical Chemistry* 40/9: 1674-1685.
- Santos, H.L.; Ciancaglini, P. (2003) Kinetic characterization of the Na,K-ATPase from the rabbit outer renal medulla: properties of the ($\alpha\beta$)₂ dimer. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B* 135: 539-549.
- Santos, H.L.; Lamas, R.P.; Ciancaglini, P. (2002) Solubilization of Na,K-ATPase from rabbit kidney outer medulla using only C12E8. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35: 277-288.
- Santos, H.L.; Lopes, M.L.; Maggio, B.; Ciancaglini, P. (2005) Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41: 239-248.
- Santos, H.L.; Rigos, F.C.; Tedesco, C. A.; Ciancaglini, P. (2007) Biostimulation of Na,K-ATPase by low-energy laser irradiation (685 nm, 35 mW): Comparative effects in

- membrane, solubilized and DPPC:DPPE-liposome reconstituted enzyme. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 89: 22-28.
- Santos, S.F.; Zanette, D; Fischer, H; Itri, R. (2003) A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *Journal of Colloid and Interface Science* 262: 400-408.
- Schwinger, R.H.G.; Bundgaard, H.; Muller-Ehmsen, J.; Kjeldsen, K. (2003) The Na, K-ATPase in the failing human heart. *Cardiovascular Research* 57: 913-920.
- Sepersu, E.H.; Tsong, T.Y. (1984) Activation of Electrogenic Rb⁺ Transport of (Na,K)-ATPase by an Electric Field. *The Journal of Biological Chemistry* 259(11): 7155-7162.
- Skou, J.C.; Esmann, M. (1992) The Na,K-ATPase. *The Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 24(3): 249-261.
- Svergun, D. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography* 25: 495-503.
- Svergun, D.; Barberato, C.; Koch, M. (1995) CRY SOL – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography* 28: 768-773, 1995.

- Takeda, K.; Kawamura, M. (2001) The functional unit of Na,K-ATPase is a monomeric alphabeta protomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280: 1364-1366.
- Taniguchi, K.; Kaya, S.; Abe, K. and Mardh, S. (2001) The oligomeric nature of Na/K-transport ATPase. *The Journal of Biochemistry* 129(3): 335-342.
- Thoenges, D.; Schoner, W. (1997) 2'-O-Dansyl analogs of ATP bind with high affinity to the low affinity ATP site of Na⁺/K⁺-ATPase and reveal the interaction of two ATP sites during catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 16315-16321.
- Tokhtaeva, E.; Clifford, R.J.; Kaplan, J.H.; Sachs, G.; Vagin, O. (2012) Subunit Isoform Selectivity in Assembly of Na,K-ATPase α - β Heterodimers. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 26115-26125.
- Tsong, T. Y. (2002) – Na,K-ATPase as a Brownian Motor: Electric Field-Induced Conformational Fluctuation Leads to Uphill Pumping of Cation in the Absence of ATP. *Journal of Biological Physics* 28: 309–325.
- Tsong, T.Y (1990) Electrical Modulation of membrane proteins. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 19:83-106.
- Vajdos, C.N.F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4:2 411-2423.

- Vinck, E.M.; Cagnie, B.J.; Cornelissen, M.J.; Declercq, H.A.; Cambier, D.C., (2003) Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation, *Lasers in Medical Science* 18(2): 95-99.
- Walsh, L.J. (1997) The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1 Soft Tissue application. *Australian Dental Journal* 42: 245-7.
- Ward, D.G.; Cavieres, J.D. (1993) Solubilized $\alpha\beta$ Na,K-ATPase remains protomeric during turnover yet shows apparent negative cooperativity toward ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5332-5336.
- Westerhoff, H.V.; Tsong, T.Y.; Chocks, P.B., Chen, Y.D; Astumian, R.D. (1986) How enzymes can capture and transmit free energy from an oscillating electric field. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 4734-4738."
- Wetlaufer, D. B.; Edsall, J. T.; Hollingworth, B. R. (1958) Ultraviolet Difference Spectra of Tyrosine Groups in Proteins and Amino Acids. *Journal of Biological Chemistry* 233:1421-1428.
- Wilson, P.C. (1989) *Photosensitizing Compounds: their Chemistry, Biology and Clinical Use*. Wiley Interscience: Chichester 73.
- Yoneda, J. S. Estudos Biofísicos da Interação entre a Na,K-ATPase e a subunidade gama, ATP, Na⁺, K⁺, DPPC, DPPE e colesterol, Ribeirão Preto 2014. Tese - Universidade de São Paulo

Yu W.; Naim J.O.; Lanzafame R.J. (1994) The effects of photo-irradiation on the secretion of TGF and PDGF from fibroblasts in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*, Supplement 6:8.