



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Estudo de proteolipossomos constituídos de Na,K-ATPase utilizando a técnica de microscopia de força atômica”

Heitor Gobbi Sebinelli

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2016



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Estudo de proteolipossomos constituídos de Na,K-ATPase utilizando a
técnica de microscopia de força atômica”**

Heitor Gobbi Sebinelli

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências, na área de Química, no dia 29/07/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

RIBEIRÃO PRETO -SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Sebinelli, Heitor Gobbi

Estudo de proteolipossomos constituídos de Na,K-ATPase utilizando a técnica de microscopia de força atômica. Ribeirão Preto, 2016.

p. 65 : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Ciancaglini, Pietro.

1. Na,K-ATPase. 2. Proteolipossomo. 3. AFM.
4. TappingMode.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais Rosa e Antenor. Eles são os responsáveis pela minha vida, obrigada pelo amor, dedicação, por me incentivar sempre e não medir esforços para que eu sempre tivesse o melhor possível. Vocês são os melhores exemplos de seres humanos que eu poderia ter. As palavras são poucas para expressar a minha eterna gratidão. Ao meu irmão agradeço pelo companheirismo, amizade infinita mesmo com momentos de turbulência.

Minha vitória também é de vocês.

Agradecimentos Especiais

Agradeço a Deus pela paz, serenidade e saúde proporcionadas para que pudesse gozar de plenas condições para realizar este trabalho.

A toda minha família (tias, tios, primas, primo) e a “Vó” Tereza, pelo apoio, torcida e orações. Agradeço imensamente. Vocês são fundamentais!

Aos meus amigos de Campinas: Diego, Luis e Newton obrigado por estarem presentes mesmo que distantes e pela compreensão da distancia das impossibilidades de estar sempre presente. Também agradeço pelos churrascos, futebol, praias e bares! Muito bom compartilhar esses momentos com vocês!

Aos amigos de Ribeirão Preto Denis, Luis Felipe, Ricardo, Bruna, Caroline Vanessa e tantos outros principalmente das republicas Toca do Porco e Kremutcho: agradeço pelos momentos de descontração proporcionados desde a graduação regados a muitas cervejas e festas.

Agradeço a Larissa, que nesse período difícil foi uma forte companheira, me dando forças, apoiando, escutando, aguentando, bebendo e desbravando toda a Ribeirão Preto! Sem toda estabilidade e felicidade que você me proporcionou neste período este trabalho não seria possível! Você é muito especial! Vou te levar comigo para a vida toda!

Ao orientador Prof. Dr. Pietro, agradeço imensamente por dividir os seus conhecimentos e experiências. Por orientar e inspirar no âmbito científico e profissional. Por toda paciência dispensada neste longo processo.

Também por ser uma grande amigo tanto nos momentos de seriedade quanto de descontração. Obrigado pelo incentivo, conselhos e por me proporcionar a oportunidade de finalizar mais essa etapa da minha vida.

Essa conquista não seria possível sem o seu total apoio e dedicação.

Muito Obrigado!

Aos colegas de laboratório Amanda, Ana, Bruno, Cassiano, Ekevelyn, Maytê e Marina obrigado por tornarem o dia a dia agradável, pelas risadas, pelo companheirismo e disposição em ajudar. Agradeço pela ótima convivência. Vocês foram indispensáveis para que eu finalizasse mais essa etapa. Obrigado por tudo!

A Maytê e Ana também agradeço pelos diversos auxílios nos âmbitos intelectual e prático na escrita e nos experimentos de laboratório.

Ao Gustavo pelos trabalhos realizados em conjunto.

Obrigado a todos também que não estão atualmente no laboratório: Dani Thuanny, Carol, mas que quando presentes sempre estiveram dispostos e me ajudaram.

Deixo aqui um agradecimento especial para Juliana que me orientou e ajudou desde o início na iniciação científica até os dias de hoje frente a todas as dificuldades. Agradeço pela motivação, inspiração e perseverança em trabalhar com algo tão complexo como a NKA. Muito obrigado Ju!

Agradecimentos

A técnica do laboratório de AFM Ivana pela disponibilidade, paciência, competência e dedicação dispensadas para a realização deste trabalho. Sem a sua ajuda ele não existiria. Muito Obrigado.

Aos técnicos do laboratório Nilton e Janaína pela competência e pelo auxílio indispensável na nossa rotina de trabalho. Obrigada pela disposição em ajudar sempre.

Aos funcionários do biotério Rinaldo e “Zé”; sempre prestativos no fornecimento dos animais.

À Priscila Cerviglieri Ciancaglini e Ana Maria, pela correção dos textos em inglês.

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

Às agências de fomento:

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

Lista de Abreviaturas e Siglas

AFM: Microscopia de Força Atômica

AFM-CI: Microscopia de força atômica no modo de contato intermitente

AFM-NC: Microscopia de força atômica no modo de não-contato

ATP: Adenosina-5'-trifosfato

BSA: Albumina de soro bovino

CMC: Concentração micelar crítica

DLS: Espalhamento dinâmico de luz

DSC: Calorimetria diferencial de varredura

DOPC: Dioleoil fosfatidilcolina

DPPC: Dipalmitoil fosfatidilcolina

DPPE: Dipalmitoil fosfatidiletanolamina

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

NKA: Na,K-ATPase

PC: Fosfatidilcolina

PE: Fosfatidiletanolamina

PI: Índice de polidispersão

QELS: Espalhamento de luz quasi-elástico

SERCA: Ca²⁺-ATPase de retículo sarco/endoplasmático

SPM: Microscopia de varredura por sonda

STM: Microscopia de varredura por tunelamento

TCA: Ácido tricloacético

T_m: Temperatura crítica de transição

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

U: Unidade de atividade enzimática (nmol/min)

ΔH: Variação de entalpia de transição de fase

Δt_{1/2}: Cooperatividade de transição de fase

Å: Angstrom (10⁻¹⁰ m)

KDa: Quilo Dalton

RESUMO:

“Estudo de proteolipossomos constituídos de Na,K-ATPase utilizando a técnica de microscopia de força atômica.”

A Na, K-ATPase (NKA) é uma proteína de membrana encontrada em organismos eucariotos multicelulares cuja atividade e funções já são amplamente discutidas na literatura. Sua unidade funcional corresponde a um heterodímero formado por duas subunidades α , β com regiões transmembrana. Espécies multiméricas como dímeros e tetrâmeros dessa enzima também são conhecidos por exercer atividade enzimática. As interações lipídio-proteína são intrínsecas para a NKA, por tal motivo, proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPC:DPPE foram preparados por co-solubilização. Como controle, lipossomos de mesma composição foram produzidos por extrusão e/ou sonicação. Para as imagens de AFM, as amostras foram fixadas com glutaraldeído, para proteção mecânica e contra desidratação das vesículas.

Para lipossomos de DPPC as imagens topográficas de AFM das vesículas apresentaram formato oval, superfície perfeitamente lisa e diâmetro médio de 151 ± 46 nm, enquanto as vesículas de composição DPPC:DPPE, apesar de lisas, tiveram cantos pontiagudos e diâmetro médio de 98 ± 28 nm. Imagens de fase de ambas as composições não apresentaram qualquer indicativo de diferenças na composição química, provavelmente devido à natureza de carga neutra dos dois fosfolipídios.

As imagens de fase por AFM para os proteolipossomos tanto de DPPC-NKA, quanto DPPC:DPPE-NKA, revelaram resultados inéditos na literatura, onde a inserção da NKA aparece como nítidas regiões transições de fase de composição química distinta quando comparadas com os lipossomos. No entanto, as mudanças de fase são diferentes entre as composições estudadas, aparecendo como manchas escuras circulares para DPPC-NKA e mais visíveis como interstícios brilhantes para composição de DPPC:DPPE-NKA.

As vesículas de DPPC-NKA apresentaram diâmetro médio de 390 ± 326 nm e, nas imagens de topografia tridimensionais, protusões de 38 a 115 nm correspondentes às regiões de mudanças de fase, que, indicaram o diâmetro dos microdomínios relacionados à proteína. Já nas imagens para DPPC:DPPE-NKA o diâmetro médio dos proteolipossomos

foi de 189 ± 156 nm, e as protusões apareceram entre os interstícios, variando de 20 a 66 nm.

O estudo de DSC dos lipossomos revelou que a concentração de glutaraldeído nas condições das análises de AFM, em torno de 5% (v/v), afetam as características físico-químicas para as composições com DPPE.

A AFM foi eficiente para confirmar a reinserção da NKA em proteolipossomos pelas imagens de fase, e, para medir o diâmetro dos microdomínios pelas imagens de topografia.

Abstract:**“Proteoliposomes constituted of Na,K-ATPase studied by atomic force microscopy.”**

Na, K-ATPase (NKA) is a membrane protein present in eukaryotic multicellular organisms. Its functions and activity are already widely described in the literature. Its minimal functional structure is a heterodimer of two main subunits α , β with transmembrane domains. However, dimers and tetramers of the enzyme are also known to have enzymatic activity. Since there are intrinsic lipid-protein interactions, NKA proteoliposomes composed of DPPC and DPPC:DPPE (1:1 molar ratio) were prepared by the co-solubilization method and liposomes of the same compositions were obtained by extrusion and/or sonication to be used as control. The samples to the AFM study were prepared using glutaraldehyde to protect the vesicles from mechanical shocks and dehydration.

Liposomes composed of DPPC and DPPC:DPPE (1:1 molar ratio) were prepared by extrusion and sonication, respectively, as control. The topographical images for DPPC liposomes showed vesicles with an oval shape and smoothed surfaces with a mean diameter of 151 ± 46 nm. DPPC:DPPE vesicles also presented smoothed surfaces, but with pointed corners and mean diameter of 98 ± 28 nm. Phase images for both lipid compositions showed no differences in chemical composition. For DPPC:DPPE samples, this can be explained by the neutral net charge of both lipids.

The proteoliposomes observed in the AFM phase images showed darker and large circular spots in the vesicles. These spots represent delays in the phase oscillation of the AFM probe and are associated with different chemical composition. The phase changes showed the reconstitution of the NKA in the proteoliposomes. When compared with topographical images, this spots matched protrusions.

The mean diameter of DPPC-NKA proteoliposomes determined by AFM was 390 ± 326 nm. In the three-dimensional topographical images of composition, protrusions from 38 to 115 nm near the areas of different phases indicate the diameters of the NKA microdomains.

The phase changes for DPPC:DPPE-NKA appeared as bright interstices with the protrusions of the topographical images in between them. The size of these protrusions ranged from 20 to 66 nm and the mean diameter of the proteoliposomes was 189 ± 156 nm.

The DSC liposomes data showed that the glutaraldehyde concentration used in the AFM analysis affect the physical chemistry properties of the samples with DPPE.

AFM proved to be an efficient method to confirm the reconstitution of into proteoliposomes with phase images and to determine the diameter of the protein microdomains with the topographical images.

Sumário

1. Introdução	3
1.1 Na,K-ATPase e sua importância fisiológica	3
1.2 A estrutura cristalina e as subunidades da Na,K-ATPase	5
1.3 A relação da NKA com lipídios de membrana.....	8
1.4 Lipossomos	10
2. Objetivo	12
3. Materiais	13
4. Métodos	14
4.1 Preparação, solubilização e purificação da Na,K-ATPase	14
4.2 Dosagem de proteína.....	15
4.3 Determinação da atividade ATPase por método descontínuo.....	15
4.4 Preparação dos lipossomos.....	15
4.5 Preparação dos proteolipossomos	16
4.6 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	17
4.7 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	20
4.8 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	22
5. Resultados e Discussão.....	25
5.1 Lipossomos	25
5.1.1 Lipossomos constituídos de DPPC.....	25
5.1.2 Lipossomos constituídos de DPPC e DPPE.....	27
5.2 Proteolipossomos	29
5.2.1 Proteolipossomos constituídos de DPPC	29
5.2.2 Proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPE.....	31
6. Microscopia de Força Atômica de lipossomos e proteolipossomos.....	34
6.1 Lipossomos	35
6.1.1 Lipossomos constituídos de DPPC.....	35
6.1.2 Lipossomos constituídos de DPPC:DPPE.....	37
6.2 Proteolipossomos	39
6.2.1 Proteolipossomos constituídos de DPPC-NKA	39
6.2.2 Proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPE-NKA.....	46
7. Calorimetria diferencial de varredura e a influência do glutaraldeído nos parâmetros termodinâmicos das amostras.....	53

7.1 Lipossomos constituídos de DPPC	54
7.2 Lipossomos constituídos de DPPC:DPPE.....	56
8. Conclusão	60
9. Referências	61

1. Introdução

1.1 Na,K-ATPase e sua importância fisiológica

A Na,K-ATPase (NKA) é uma proteína de membrana encontrada em organismos eucariotos multicelulares. Ela utiliza a energia da hidrólise de uma molécula de ATP para exercer o transporte ativo, através da membrana plasmática, de três íons de sódio para fora e 2 íons potássio para o interior da célula. O descobrimento da NKA teve início nos anos 30 quando cientistas começaram a monitorar com isótopos radioativos o influxo de íons Na^+ em células biológicas. Como era consenso entre os pesquisadores que a membrana celular era impermeável a íons, com o descobrimento do influxo foi necessário assumir que havia um processo ativo ocorrendo para o bombeamento de Na^+ contra seu gradiente eletroquímico. Então durante alguns anos pesquisadores desenvolveram estudos em nervos periféricos de diferentes espécies de animais, até que finalmente foi proposto que essa função era exercida por uma enzima ATPase. Então em 1957, Jens Christian Skou descreveu em seu estudo a influência de alguns cátions na atividade desta ATPase, como os íons sódio e potássio tinham papel crucial na atividade seu estudo ajudou a batizar a enzima (Skou, 1957; Skou et al., 1992; Kaplan, 2002). Anos mais tarde, em 1997, a Fundação Nobel laureou Skou pela descoberta da primeira proteína de membrana. A Fundação Nobel dividiu o prêmio daquele ano com os pesquisadores Paul D. Boyer e John E. Walker pela elucidação do mecanismo enzimático por trás da síntese de ATP.

A descoberta da NKA desencadeou diversos estudos sobre suas funções através das décadas e até hoje. A proteína é responsável pela manutenção de gradientes químicos e elétricos da célula, além de participar da manutenção do volume celular. Nos rins, mais especificamente nos néfrons, a NKA desempenha um importante papel na recuperação de Na^+ e água. No intestino e pulmões ela tem função parecida, mas, ligada à absorção de fluídos. Por transporte ativo secundário a NKA participa do transporte de outras diversas substâncias como a translocação de glicose, aminoácidos e outros nutrientes para dentro ou fora da célula (Lingrel, 2010; Bagrov et al., 2009).

A inibição do transporte ativo de Na^+ e K^+ por glicosídeos cardíacos é conhecida desde 1953 pelo trabalho desenvolvido por Shartzmann. Anos mais tarde esse comportamento foi atribuído à inibição específica da NKA por essas substâncias, fato importante para identificação, localização e caracterização dessa proteína. (Skou et al.,

1992). A inibição da NKA conduz a mudanças na fisiologia da célula como o aumento na concentração de Ca e mudanças no pH, resultante da maior concentração intracelular de Na⁺. Recentemente, tem sido reportados estudos da participação na NKA na sinalização celular devido a presença de esteroides cardiotônicos (que podem ser endógenos) em baixas concentrações que provavelmente não inibem a bomba, apenas desencadeiam diversos processos celulares (Bagrov et al., 2009).

Em decorrência de todas essas funções desempenhadas pela NKA diversas doenças são associadas a problemas na expressão e/ou na atividade enzimática. Hipertensão, diabetes e disfunções renais e cardiológicas são algumas doenças que podem ser relacionadas a desordens com a atividade da NKA devido as diversas funções que essa proteína exerce nas células.

1.2 A estrutura cristalina e as subunidades da Na,K-ATPase

A bomba NKA pertence à família das ATPases do Tipo-P, diversas proteínas fazem parte dessa família, mas, as mais conhecidas são a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA) e a H^+ , K^+ -ATPase gástrica. Essas proteínas compreendem em sua atividade de transporte de íons transições por estados conformacionais. Essas transições formam um ciclo reacional que é descrito por Albers e Post (Albers, 1967; Post et al., 1969, 1972), no qual as enzimas desta família passam de um estado E1, de maior afinidade por Na^+ no caso da NKA, para um estado E2, de maior afinidade por K^+ . No entanto, na Figura 1 observa-se que durante o ciclo de bombeamento esses estados passam modificações. Essas modificações ocorrem durante a ligação e liberação de ATP ou água pela enzima, e nesses processos os estados de maior afinidade pelos íons ocluem ou expõem os íons ligados a NKA.

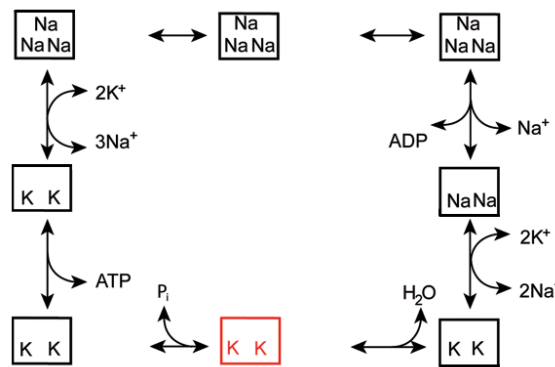


Figura 1. Esquema retirado de Morth et al. (2007). Ciclo de reação da NKA. O cristal foi obtido em uma forma análoga ao estado destacado em vermelho.

A NKA é composta por 2 subunidades principais α e β que formam um protômero. A unidade funcional mais estável dessa proteína é um heterodímero dessas subunidades, $(\alpha\beta)_2$, que dependendo do tecido de onde a NKA é extraída, pode conter uma terceira subunidade, γ .

Desde a descoberta da NKA até a publicação da primeira estrutura cristalina em alta resolução passaram-se mais de 50 anos. Diferentemente da SERCA, que tem mais de 20 estruturas cristalinas que completam todas as etapas de seu ciclo reacional com resoluções menores que 5 \AA (Toyoshima, 2008), existem poucas estruturas cristalinas para a NKA, e a maior parte corresponde ao estado E2, restando apenas uma estrutura cristalina para o estado E1. Essa escassez está relacionada às diversas dificuldades que cercam os trabalhos com a NKA. A quantidade dessa enzima na membrana é muito pequena, o que afeta a homogeneidade dos preparos das amostras. Existem ainda as

diversas isoformas das subunidades, principalmente, das proteínas FXYD. A subunidade β é outro fator de complicação devido ao sua alta região glicosilada. Diversos pesquisadores já tentaram contornar esses problemas produzindo NKA recombinante, no entanto, poucos tiveram sucesso. Blanco (2005) e Cohen e al.(2005) conseguiram expressar a proteína, porém, com algumas restrições na recuperação da atividade enzimática.

As duas primeiras estruturas cristalinas da NKA foram obtidas por Morth et al. (2007) e Shinoda et al. (2009), elas detalham um estado análogo ao $E2 \cdot P_i \cdot 2K^+$. As três estruturas seguintes também são do estado E2, porém, uma do estado de menor afinidade por ouabaína obtido por Ogawa et al. (2009), e, outros dois do estado de maior afinidade por ouabaína, descritos por Yatime et al. (2011) e por Laursen et al. (2013). Por ultimo, a única estrutura cristalina da NKA que representa um estado E1 foi obtido por Kanai et al. (2013). Cada uma destas estruturas traz informações a respeito dos sítios de ligação dos cátions, substratos, atuadores nas subunidades que compõe a estrutura da proteína e de como esses sítios se alteram a cada etapa do ciclo reacional.

A atividade da enzima através desse ciclo reacional está diretamente relacionada com a sua estrutura. Sua unidade funcional principal corresponde a um heterodímero formado por duas subunidades α e β . Uma terceira subunidade também pode ser encontrada na maioria das preparações, ela pertence à família de proteínas FXYD, e pode ser denominada como subunidade γ quando a NKA é extraída de rins (Morth et al., 2007; Shinoda et al., 2009).

A subunidade α da NKA tem 998 resíduos de aminoácidos, que, resultam em uma massa de aproximadamente 110 kDa. Nessa subunidade estão presentes três importantes domínios que juntos somam dez segmentos transmembrana, do $\alpha M1$ ao $\alpha M10$: o atuador (A), o de ligação de nucleotídeo (N) e o de fosforilação (P).

A subunidade β é proteína de aproximadamente 370 resíduos de aminoácidos e por volta de 55 kDa. Ela tem uma única hélice transmembrana ligada por 4 ligações de hidrogênio a subunidade α próxima as regiões de $\alpha M7$ e $\alpha M10$ (Figura 2). Apenas uma pequena porção fica exposta ao citosol, cerca 30 resíduos de aminoácidos, enquanto aproximadamente 300 resíduos altamente glicosilados estão enovelados e voltados para a região extracelular. Sabe-se que a subunidade β tem como função principal inserir apropriadamente a subunidade α na membrana, no entanto, diversos estudos apontam que ela também participa da atividade enzimática (Shinoda et al., 2009; Kaplan, 2010).

Por último, a subunidade γ e as outras proteínas da família FXYD desempenham uma função puramente regulatória da atividade enzimática da NKA de acordo com o tecido de onde é extraída, e localiza-se próxima a hélice α M9. Essa subunidade tem aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos e 7 a 12 kDa de massa molar.

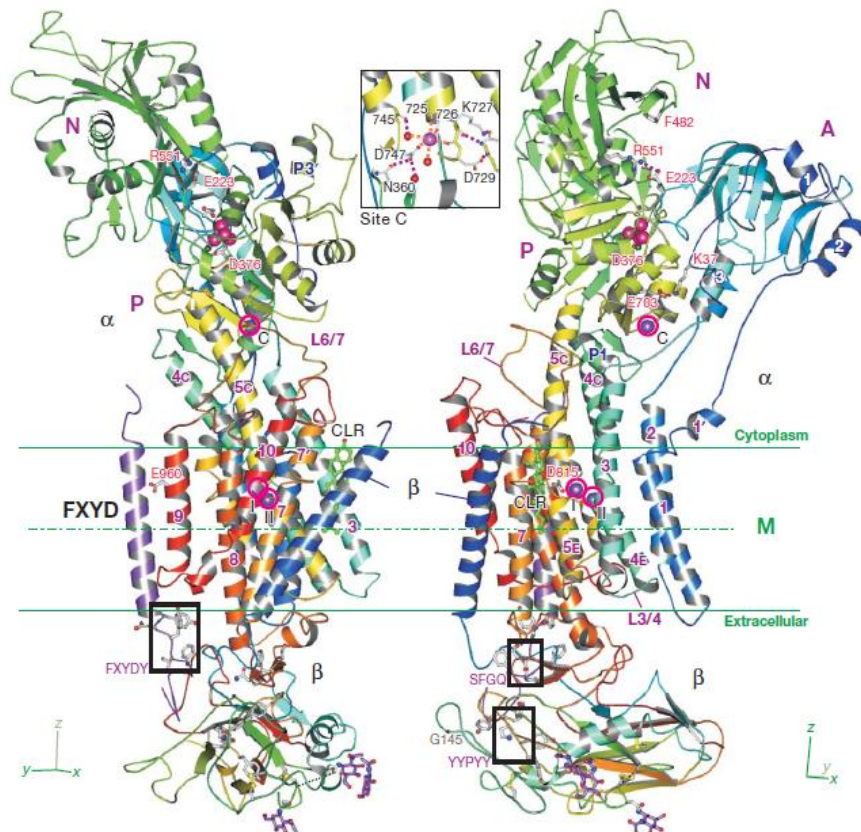


Figura 2. Figura adaptada de Shinoda et al. (2009). Estrutura cristalina de NKA a uma resolução de 2,4 Å. Para as subunidades α e β , as cores variam gradualmente de azul no grupo amino-terminal para vermelho no grupo carboxi-terminal. A proteína FXYD está em roxo. Os domínios estão representados como: (A) atuador; (N) nucleotídeo; (P) fosforilação.

1.3 A relação da NKA com lipídios de membrana

Proteínas de membrana interagem com os lipídios via bicamada circundante aos segmentos transmembrana, mas também, essa interação pode ocorrer de forma específica lipídio-proteína e pode influenciar a estabilidade e/ou atividade catalítica da NKA, no caso estimulação da atividade foi encontrada para os lipídios neutros fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE). Este efeito parece ser mediado por uma interação em um sítio específico de ligação para fosfolipídios neutros presente na subunidade α próximo às α -hélices transmembrana 2 e 4 (Haviv et al., 2013). Caracterizações indiretas, utilizando sistemas de proteolipossomos, já foram realizadas mostrando a dependência da atividade da NKA com diferentes composições lipídicas (Cohen et al., 2005; Cornelius, 2008). Além disso, Esmann e Marsh (2006) fizeram um estudo sistemático da interação de lipídios com a NKA, utilizando espectroscopia de ressonância eletrônica de spin. Esses autores mostraram a estequiometria e seletividade de alguns lipídios marcados com a NKA. (Haviv et al., 2013). Além disso, uma proporção alta de colesterol (ao redor de 30% em mol) causa impacto na fluidez da membrana e na estrutura cristalográfica da NKA, revelando um sítio específico de ligação do colesterol (Morth et al., 2007; Shinoda et al., 2009; Toyoshima et al., 2011).

No nosso laboratório, um protocolo foi desenvolvido para a construção de proteolipossomos, ou seja, de sistemas lipídicos vesiculares nos quais a NKA é incorporada. Inicialmente, um estudo foi realizado verificando o efeito da composição lipídica na atividade catalítica e na orientação da proteína incorporada. Sistemas binários de lipídios com PC e PE foram eficientes na incorporação da NKA, sendo o melhor resultado obtido para um sistema com razão lipídio:lipídio igual a 1:1 (p/p) e lipídio:proteína igual a 1:3 (p/p). A integridade dos sistemas foi verificada pela liberação de calceína mediada por detergente ou alameticina. A orientação foi determinada por estudos de inibição enzimática, utilizando ouabaína e vanadato. Em proteolipossomos de DPPC:DPPE a orientação foi *inside-out* (Santos e Ciancaglini, 2000; Santos et al., 2005). Com esse método de preparação de proteolipossomos bem estabelecido pelo nosso grupo, estudos de influência da bicamada lipídica na estabilidade e atividade catalítica da Na,K-ATPase foram possíveis (Rigos et al., 2006; Santos et al., 2006; Yoneda et al., 2013), além de outros trabalhos envolvendo a NKA solubilizada com detergente ($C_{12}E_8$), avaliando importantes propriedades dessa enzima (Esmann e Skou, 1986; Cornelius et al., 1991; Esmann, 1992; Silvius, 1992; Santos et

al., 2002). Esses trabalhos investigaram a relação estrutura-função e estabilidade da NKA pela utilização de técnicas biofísicas, tais como Dicroísmo Circular, Absorção de Infravermelho, Espectroscopia de Emissão de Fluorescência, Tensão Superficial, Elasticidade Dilatacional, Espalhamento de raios-X em Baixo Ângulo e Calorimetria Diferencial de Varredura (Rigos et al., 2008; 2010; Barbosa et al., 2010; Yoneda et al., 2013). Outro estudo mostrou a influência da proporção de colesterol na bicamada sobre a atividade catalítica e estabilidade da NKA (Yoneda et al., 2014).

Como já descrito anteriormente, a NKA possui inúmeras funções e diversas descobertas têm mostrado a relevância dessa enzima. No entanto, esta enzima continua sendo alvo de diversas pesquisas a fim de agregar informações e enriquecer o conhecimento a seu respeito. Um dos aspectos de grande importância no entendimento da NKA é o estudo da interação proteína–bicamada lipídica, uma vez que a NKA e lipídios da bicamada podem estar associados a importantes propriedades regulatórias e sinalizadoras na célula. Sistemas bem caracterizados, nos quais a NKA é reconstituída, são essenciais para averiguar como a proteína afeta a organização da membrana e como a formação de microdomínios pode influenciar no seu funcionamento.

1.4 Lipossomos

Os lipossomos são sistemas miméticos de biomembranas provenientes da característica anfifílica dos fosfolipídios. Eles são estruturados em uma cabeça hidrofílica e duas longas cadeias carbônicas hidrofóbicas para cada molécula. Essa natureza conduz a formação de membranas permeáveis, pois, quando em contato com a água, a região hidrofílica fica voltada para o ambiente aquoso e as cadeias carbônicas interagem entre si mediadas pelas interações hidrofóbicas que são dirigidas pelas próprias moléculas de água que acabam ganhando um maior grau de liberdade. Quando as cadeias de ácido graxo ficam próximas também ocorrem as forças de Van der Waals que estabilizam ainda mais formando uma bicamada (Bozzuto et al., 2015). Os fosfolipídios estruturais de membrana podem ter diferentes geometrias que se relacionam com a composição de suas cabeças polares e cadeias carbônicas. Os formatos desses fosfolipídios podem ser divididos em três categorias: cilíndrico, cônico e cônico invertido. Cada uma dessas categorias de fosfolipídios favorecem a formação de um tipo de estrutura de membrana: os cilíndricos favorecem membranas planas da qual surgem os lipossomos. Os de formato cônico estruturam tubos de fase hexagonal invertida que tem curvatura negativa, e, os de formato cônico invertido formam micelas com curvatura positiva (Figura 3).

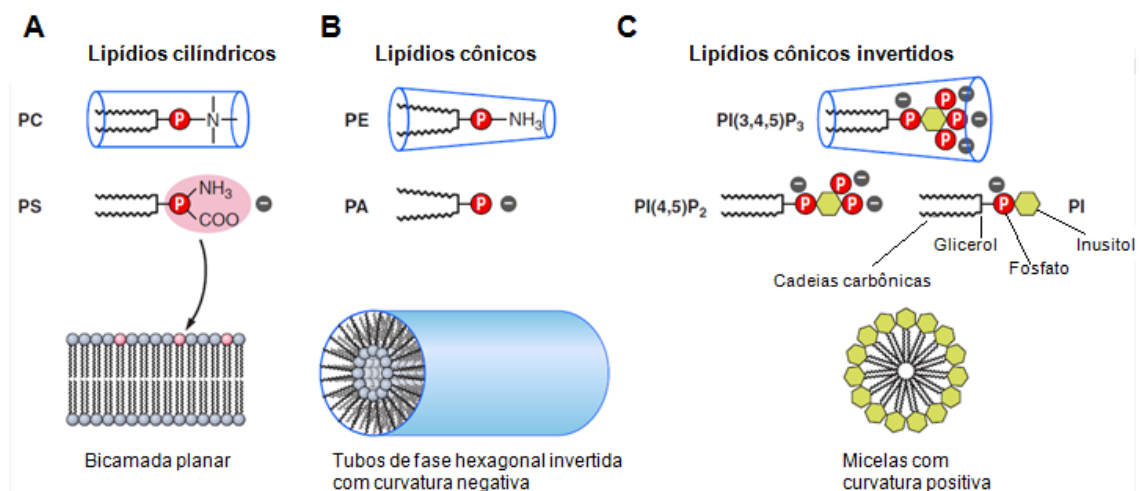


Figura 3. A classificação do formato dos fosfolipídios e suas específicas estruturas de membranas quando sozinhos: A) Lipídios cilíndricos; B) Lipídios cônicos; C) Lipídios cônicos invertidos. Figura adaptada de Suetsugu et al., (2014).

Misturas de fosfolipídios de diferentes geometrias podem estruturar-se em membranas planares, no entanto existe a necessidade de que na sua composição existam aqueles de geometria cônica, assim como acontece nas membranas nativas. Assim,

membranas planares dobram-se espontaneamente formando vesículas a fim de evitar totalmente o contato da região hidrofóbica interna da bicamada com o meio aquoso. Durante esse processo espontâneo ocorre a formação de vesículas com estruturas multilamelares de bicamadas. É possível através de algumas técnicas de preparo mimetizar a formação de vesículas de membranas planares unilamelares.

Um exemplo de preparo de vesículas unilamelares está apresentado no esquema de desenhos na Figura 4, a seguir. Na etapa A, os fosfolipídios são dissolvidos em solvente orgânico que deve ser escolhido de acordo com a solubilidade dos lipídios de trabalho. Na etapa B, o desenho representa a formação do filme do lipídios após a secagem do solvente, na figura esse filme é chamado de “lipid cake”. As etapas C e D representam a ressuspensão do filme lipídico para um meio aquoso e formação de vesículas multilamelares mediante a agitação mecânica e a aquecimento da solução de lipídios a temperaturas acima da transição de fase (gel para líquido cristalino). Por fim, na etapa E são mostrados os lipossomos unilamelares formados após os processos de extrusão ou sonicação.

Entre as diversas técnicas de análise da formação de lipossomos este trabalho utilizou dois métodos diferentes: Espalhamento Dinâmico de Luz e Microscopia de Força Atômica.

A teoria da técnica de Espalhamento Dinâmico de luz está detalhada na seção 6 dos materiais e métodos. Essa técnica permite obter informações do diâmetro médio e da polidispersividade dos lipossomos ainda em solução (Müller et al., 2004; Siow et al., 2007; Tejera-Garcia et al., 2011; Craievich et al., 2015).

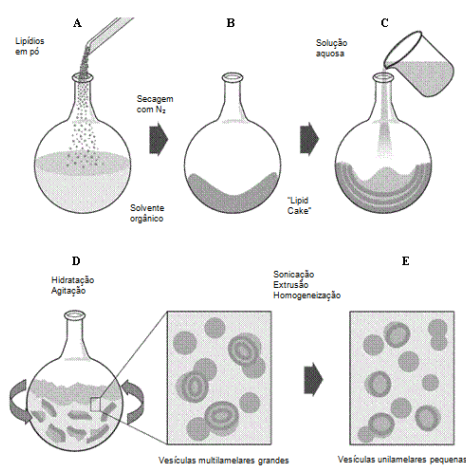


Figura 4. Preparo de lipossomos. A) Solubilização dos fosfolipídios. B) Produção de filmes lipídicos (Lipid Cake). C e D) Ressuspensão dos filmes em tampão aquoso para a formação de vesículas multilamelares. Processos de sonicação e extrusão para a formação de vesículas unilamelares. Imagem adaptada de Avanti Polar Lipids.

2. Objetivo

- Preparar lipossomos de composição DPPC pelo método de extrusão e de lipossomos de composição DPPC:DPPE na razão 1:1 pelo método de sonicação.
- Preparar proteolipossomos de composição DPPC-NKA e DPPC:DPPE-NKA pelo método de co-solubilização com detergente C₁₂E₈.
- Analisar a formação e a dimensão dos diâmetros dos lipossomos e proteolipossomos por DLS e AFM e comparar os resultados proporcionados por cada técnica.
- Estudar a formação de domínios lipídicos e/ou proteicos nos lipossomos e proteolipossomos utilizando as imagens de fase e topográficas da AFM.
- Estudar a influência que o glutaraldeído usado na AFM exerce sobre a bicamada lipídica dos lipossomos de DPPC e DPPC:DPPE com a técnica de DSC.

3. Materiais

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura e apirogênica Millipore Direct-Q. Todos os reagentes utilizados foram da maior pureza comercialmente disponível. Ácido tricloroacético (TCA), 2-amino-2-hidroximetil-propane-(1,3)-diol (Tris), ácido etanosulfônico-2[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina] (HEPES), 1,3-diazaciclopenta-2,4-dieno (Imidazol), adenosina 5'-trifosfato (ATP), soro albumina bovina e glutaraldeído (especialmente purificado para uso fixativo em microscopia eletrônica, 25% (p/v)) foram adquiridos da Sigma. Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), cloreto de potássio, cloreto de sódio e cloreto de magnésio foram comprados da Merk. Dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) e dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE) foram obtidos da Avanti Polar Lipids. A resina Biobeads foi adquirida da BioRad.

4. Métodos

4.1 Preparação, solubilização e purificação da Na,K-ATPase

As frações de membrana da Na,K-ATPase foram extraídas a partir da medula externa de rim de coelho, homogeneizadas em tampão Imidazol 20 mM, pH 6,8, contendo sacarose 0,25 M, EDTA 6 mM e Tris 6 mM, a 4°C. O homogeneizado bruto obtido foi centrifugado a 10.000xg por 35 minutos, a 4°C, sendo que o pellet foi desprezado e o sobrenadante submetido a uma ultracentrifugação a 180.000xg por 1 hora, a 4°C. O pellet obtido na ultracentrifugação foi ressuspensão e novamente homogeneizado no tampão inicial. Então, a fração de membrana obtida foi incubada com C₁₂E₈ na relação proteína:detergente de 1:1 (p/p) a 4°C, conforme descrito por Santos et al. (2002).

A Na,K-ATPase solubilizada foi purificada empregando-se a técnica de cromatografia por exclusão (HPLC), em sistema Äkta purifier (Amersham Biosciences) empregando-se coluna 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 continuamente monitorado a 280 nm e as frações coletadas foram acompanhadas por atividade pNFFase e ATPase. As frações que apresentaram atividade ATPase foram reunidas e concentradas por ultrafiltração tangencial, em sistema Labscale (Millipore).

4.2 Dosagem de proteína

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método descrito por Hartree (1972) e adaptado na por Santos (2002) na presença de SDS 2% (p/v) utilizando a soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

4.3 Determinação da atividade ATPase por método descontínuo

A atividade ATPase foi determinada descontinuamente, a 37°C, utilizando-se um espectrofotômetro Spectronic Modelo Genesis 2 (Milton Roy), pela dosagem do fosfato inorgânico liberado, em meio reacional HEPES 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 3 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM e NaCl 50 mM em volume final de 1,0 mL, conforme descrito por Santos e Ciancaglini (2000). A reação foi iniciada pela adição de enzima ao meio reacional e interrompida pela adição de solução gelada de TCA 30% (p/v), em tempos reacionais pré-estabelecidos.

Os tubos foram colocados em banho de gelo para diminuir a hidrólise do ATP e imediatamente centrifugados por 10 minutos. Em seguida, a dosagem de fosfato foi avaliada seguindo o método descrito por Heinonen e Lathi (1981). Uma unidade de enzima (1U) foi definida arbitrariamente como 1 nmol de fosfato liberado por minuto, nas condições padrões do teste. Os resultados foram descritos como a média de determinações realizadas em triplicatas.

4.4 Preparação dos lipossomos

A mistura de lipídios DPPC e DPPE na proporção de 1:1 (p/p) foi dissolvida em clorofórmio e metanol na proporção de 20%. Em seguida esse solvente foi removido através da passagem de um fluxo de nitrogênio, para formar um filme nas paredes do tubo de ensaio. Estes filmes foram mantidos no vácuo por 1 hora, para garantir a completa remoção do solvente. Os filmes foram então ressuspensos em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM, resultando em uma concentração lipídica final de 1 mg/mL. As suspensões de fosfolipídios foram mantidas por uma hora sob regime de agitação de 10 em 10 minutos em temperaturas acima da temperatura de transição dos fosfolipídios utilizados (DPPE, $T_t = 63,6$ °C) e por fim foram submetidas ao processo de sonicação com sonicador de ponta por no mínimo 1 minuto ou até a solução tornar-se límpida.

4.5 Preparação dos proteolipossomos

Os proteolipossomos foram preparados pelo método de co-solubilização. Neste método lipídios são dissolvidos com uma mistura de clorofórmio:metanol na proporção 4:1 em tubos de ensaio e então secados em fluxo contínuo de nitrogênio, formando assim filmes de lipídios nas paredes dos tubos. Então os tubos são mantidos à vácuo por no mínimo 1 hora a fim de garantir a total remoção do solvente. Por último, os filmes contidos nos tubos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e C₁₂E₈ 10 mg/mL conforme descrito por Santos et al. (2005) e mantidos por uma hora em temperatura acima da temperatura de transição dos fosfolipídios com agitação de 10 em 10 minutos. Algumas adaptações na co-solubilização foram realizadas em comparação com Santos et al. (2005) a fim de se obter proteolipossomos maiores e estão detalhadas a seguir. A Na,K-ATPase solubilizada na forma ($\alpha\beta$)₂ foi incubada com a mistura de lipídios-detergente por 10 minutos, em banho de gelo, e na razão de 3:1 de massa de proteína para massa de fosfolipídios. O detergente foi removido pela adição da resina Bio-Beads (200 mg/mL), em intervalos repetidos de 5, 15, e 45 minutos. A resina foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e finalmente, a suspensão de vesículas é ultracentrifugada por 1 proteolipossomo. Ao final do preparo a enzima retém sua orientação praticamente toda na posição *inside-out* (>95%), Figura 5, de acordo com os experimentos de cinética e inibição enzimática (Santos et al.,2005).

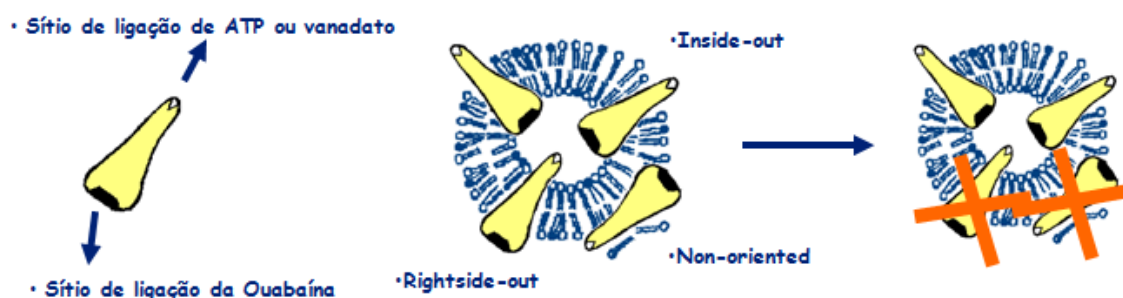


Figura 5. Orientação da Na,K-ATPase após preparo do proteolipossomo.

4.6 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Uma técnica comum e eficiente para determinar experimentalmente o tamanho de partículas em solução é o espalhamento dinâmico de luz (DLS) ou espalhamento quasi-elástico (QELS). Sua aplicação é viável tanto para partículas inorgânicas quanto para biomoléculas.

A técnica se baseia no monitoramento da intensidade de luz espalhada na ordem de microssegundos em um ângulo pré-determinado e característico de cada equipamento (Santos e Castanho, 1996).

Durante o experimento, as flutuações na intensidade de luz espalhada são detectadas em função do tempo. Elas são decorrentes do movimento Browniano do soluto, pois, neste fenômeno são geradas interferências construtivas e destrutivas devido às variações das distâncias entre as partículas com o tempo. A luz captada pelo detector é proveniente da interação da radiação eletromagnética incidente nos elétrons das partículas (centros espalhadores) da amostra com o campo elétrico oscilante dessa radiação, que por sua vez, transforma os elétrons da amostra em dipolos oscilantes os quais reemitem a radiação no mesmo comprimento de onda incidente (Espalhamento de Rayleigh) (Craievich et al., 2015).

Sendo assim a intensidade de luz espalhada por uma partícula, tendo como base o espalhamento de Rayleigh, é dada por:

$$I = I_0 = \frac{1 + \cos^2 \theta}{2r^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 - 2}\right) \left(\frac{d}{2}\right)^6$$

I : intensidade de radiação espalhada

*I*₀ : intensidade de radiação incidente

λ : comprimento de onda incidente

r : distância até o centro espalhador

θ : ângulo da luz espalhada

n : índice de refração

d : diâmetro da partícula

Destarte, para obter-se a medida do tamanho das partículas em solução é necessário relacionar as flutuações de intensidade de luz espalhada em função do tempo

com uma função de autocorrelação. Esta etapa é realizada pelo correlador do próprio equipamento, que, utiliza o número de fótons que chega ao detector em determinados intervalos de tempo. A função que rege esta autocorrelação é dada por $G(t)$:

$$G(t) = A + Be^{\frac{-2t}{\tau}}$$

A e B : Parâmetros obtidos do ajuste dos pontos experimentais na função de autocorrelação.

Onde $G(t)$ fornece a variação do numero de fótons que chega no detector no tempo (t_0) e após o intervalo no tempo (t).

Consequentemente, quando a intensidade decai na forma de uma exponencial simples, a função de autocorrelação é interpretada como uma função de decaimento exponencial com tempo de relaxação (τ) característico:

$$G(t) = A + \left[B_1 e^{\frac{-t}{\tau_1}} + B_2 e^{\frac{-t}{\tau_2}} \right]^2$$

τ = tempo de relaxação característico

Então, fundamentando-se nas funções de autocorrelação citadas é possível correlacionar cada tempo de relaxação (τ_i) com um modo de difusão:

$$D = \left(\frac{1}{\tau_i} \right) q^{-2}$$

Sendo o coeficiente de difusão translacional das partículas dado pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$$

K : constante de Boltzmann

T : temperatura em Kelvin

η : a viscosidade do meio

R_H : raio hidrodinâmico da partícula

Por fim, algoritmos aplicados pelo equipamento permitem utilizar os valores de coeficiente de difusão para calcular o raio hidrodinâmico das partículas.

Neste trabalho foram submetidos ao experimento de espalhamento de luz amostras de lipossomos e proteolipossomos compostos por DPPC, DPPE e NKA que quando em soluções aquosas, formam vesículas esféricas.

O equipamento Beckman Coulter Submicron Particle Size Analyzer (modelo N5), equipado com Laser de HeNe Laser (potencia: 25 mW laser), temperatura de 25° C e com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A análise foi realizada a um ângulo de 90°, utilizando os dados de distribuição de diâmetro por distribuição unimodal (n=5). Para a realização do experimento as amostras de lipossomos e proteolipossomos foram diluídas em água até entrarem na faixa ideal de análise do aparelho, entre 5×10^4 e 1×10^6 cps.

4.7 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura é uma técnica na qual um programa escalar de temperatura transfere calor a uma taxa constante para uma amostra e uma referência inerte. Amostra e referência são colocadas em celas separadas sob pressão constante. As celas contêm aquecedores elétricos e sensores de temperatura individuais. Então, se a amostra passa por um evento termicamente induzido, os sensores termoelétricos detectam a diferença de temperatura resultante e o computador processa essa diferença e a compensa fornecendo energia para o aquecimento ou resfriamento da amostra, de acordo com o evento decorrente (McElhaney, 1982; Johnson, 2013). Com esse modo de operação é possível calcular quanta energia, e conseqüentemente, quanto calor é necessário para aumentar a temperatura da amostra em 1 °C, o que se traduz na capacidade calorífica (C_p) da espécie analisada (Demetzos, 2008).

$$C_p = \frac{\frac{dt}{dT} \cdot \Delta P \cdot V_{cel} \cdot \rho \cdot C_{solvente} - (V_{cel} - V_{soluto}) \cdot \rho \cdot C_{solvente}}{V_{cel} \cdot [Soluta]} \cdot MM$$

V_{cel} = volume da célula

ρ = densidade do soluto

V_{soluto} = volume na célula da amostra

$C_{solvente}$ = capacidade calorífica do solvente

MM = massa molar do soluto

Essas informações resultam em um termograma de capacidade calorífica por temperatura, que, pode ser explorado para fornecer a entalpia de acordo com a variação da temperatura da amostra, como demonstrado pela equação de entalpia (ΔH).

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} C_p dT$$

Estudos do comportamento termotrópico de membranas biológicas e de membranas compostas por lipídios sintéticos com a utilização do DSC são reportados desde os anos 60. Afinal, essa técnica permitiu aos cientistas obter informações não apenas de entalpia, mas, também de transição principal (T_m) e cooperatividade de

transição de fase ($\Delta T_{1/2}$) provenientes do polimorfismo encontrado nessas amostras. Baseando-se nesses estudos, em seu artigo de 1982, McElhaney discutiu a influência da adição de proteínas, colesterol e diferentes composições de lipídios na transição da fase gel para líquido-cristalina. Essa transição de fase ocorre devido a diminuições das interações de van de Waals entre as cadeias carbônicas de lipídios estruturais, tornando as bicamadas das membranas mais fluídas. Sabe-se também da existência de um fenômeno chamado de pré-transição que ocorre logo antes da transição principal para diversas soluções de fosfolipídios puros. Na Figura 6, encontra-se um termograma geral para uma suspensão de um fosfolipídio puro com as representações dos parâmetros termodinâmicos citados acima, que, envolvem a transição de fases.

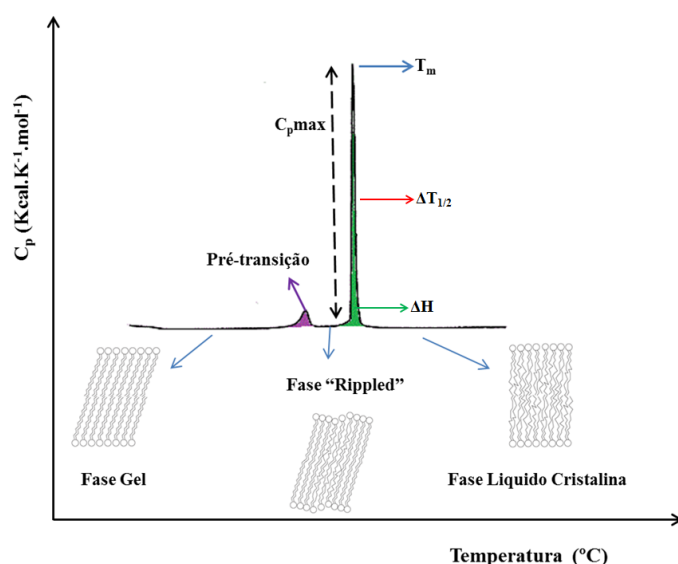


Figura 6. Figura adaptada de Shinoda et al. (2009). Estrutura cristalina de NKA a uma resolução de 2,4 Å. Para as subunidades α e β , as cores variam gradualmente de azul no grupo amino-terminal para vermelho no grupo carboxi-terminal. A proteína FXYP está em roxo. Os domínios estão representados como: (A) atuador; (N) nucleotídeo; (P) fosforilação.

Considerando essa teoria, as amostras e as referências (tampão) foram inicialmente deaeradas e aplicadas no calorímetro (300 μ L de cada). Então foi realizada uma varredura de temperatura de 10 °C a 90 °C, com velocidade de aquecimento/resfriamento de 0,5 °C/min. As informações obtidas em forma de potência são transformadas em capacidade calorífica molar com o programa fornecido pela CSC, o CpCalc, e resultam nos parâmetros calorimétricos mencionados no texto; ΔH , T_c e $\Delta T_{1/2}$. A montagem dos gráficos foi realizada pelo programa OriginPro versão 8.0 (Bolean et al., 2010 e 2011).

4.8 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Em meados de 1980 as técnicas de microscopia de varredura por sonda (SPM) começaram a ser desenvolvidas de forma promissora. A primeira foi a microscopia de varredura por tunelamento (STM) nos laboratórios da IBM, realizada pelos pesquisadores Gerd Binnig e Heinrich Rohrer (1982), projeto pelo qual foram premiados com o prêmio Nobel de Física alguns anos mais tarde, em 1986. Neste mesmo ano, Binnig com a ajuda de Christopher Gerber e Calvin Quate, baseando-se nos princípios da STM, introduziu a microscopia de força atômica (AFM). Os equipamentos das técnicas citadas têm grandes similaridades, e é possível traçar um esquema geral (Figura 7).

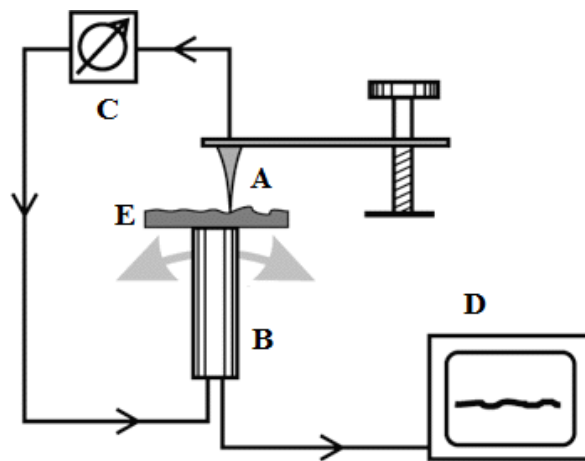


Figura 7. Esquema geral de um equipamento de AFM ou STM. A) Sonda (ponta ou tip); B) Piezo-escâner; C) Foto-detector da posição vertical da sonda; D) Computador; E) Superfície da amostra. Figura adaptada de Neves et al., 1998 e Howland & Benatar., 1993.

Enquanto a STM necessita de amostras que tenham boa condutividade, a AFM ampliou o espectro para análises de amostras isolantes. A diferença entre as duas se dá pela forma de detecção, a STM utiliza para avaliar a superfície de suas amostras o tunelamento quântico através de uma barreira de potencial. Para AFM, a topografia é medida por um laser apontado para o cantiléver, então, quando o cantiléver se move, um fotodiodo mede o deslocamento do laser pela deflexão do cantiléver de acordo com as repulsões sofridas pela ponta. Dessa forma, como a detecção das características da superfície é realizada de forma diferente para o equipamento de AFM alguns itens são alterados. Os instrumentos que compõem o mecanismo de detecção estão mostrados na Figura 8.

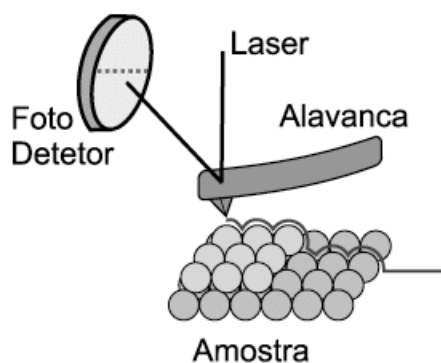


Figura 8. Esquema do detector de AFM. Imagem adaptada de Neves et al., 1998.

Com essa instrumentação os equipamentos de AFM apresentam 3 principais métodos de análise: Modo de contato (C), Modo de Contato Intermitente (CI) e Modo de Não-Contato (NC). Essas técnicas são associadas com as forças de Van der Waals, que podem ser de características atrativas ou repulsivas. A Figura 9, a seguir ilustra as forças que são utilizadas para cada uma das técnicas.

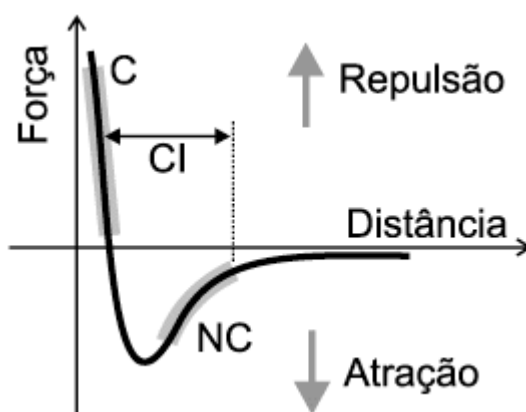


Figura 9. Curva teórica mostrando as forças de interação referentes a cada modo de operação da AFM: Modo de Contato (C), Modo de Contato Intermitente (CI) e Modo de Não-Contato (NC). Imagem retirada de Neves et al, 1998.

No modo de contato, a força de Van de Waals é positiva, ou seja, a interação entre a ponta e a amostra tem uma força resultante repulsiva. Assim, o cantiléver se dobra devido a uma deformação elástica, a qual pode ser relacionada com a Lei Hooke e fornecer o deslocamento vertical (eixo z) da amostra. O computador armazena essas informações juntamente com a posição (xy) correspondente para formar a imagem topográfica da amostra (Craievich et al., 2015).

No modo de não-contato, para captar informações topográficas o cantiléver, distante da amostra, é calibrado de forma a manter uma oscilação constante e próxima da sua frequência de ressonância. Então, ao dirigir a ponta do equipamento para regiões mais próximas da amostra, as forças de atração de Van der Waals diminuem a frequência de oscilação do cantiléver, gerando informações sobre a superfície da amostra, Figura 10 (Lohr, 2006, Craievich et al., 2015).

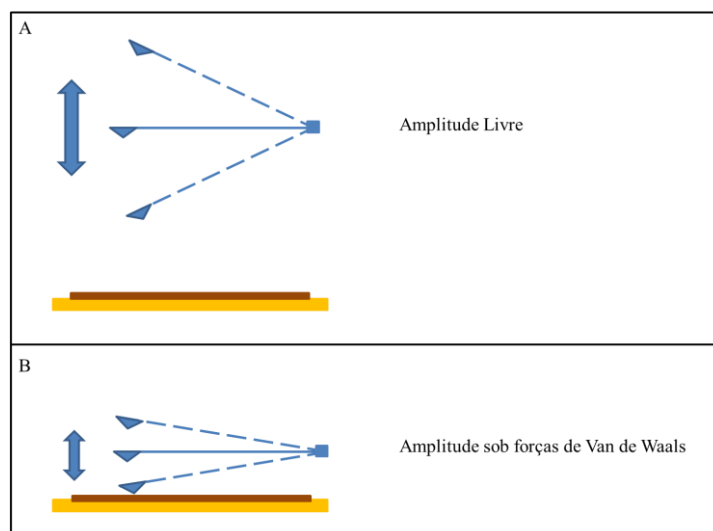


Figura 10. Representação das amplitudes de oscilação da sonda de acordo com a proximidade e ação das forças de Van der Waals pra o modo de contato intermitente. A) Amplitude livre e distante da amostra; B) Amplitude sob ação das forças de Van de Waals e em contato intermitente com a amostra.

Por último, o modo de contato intermitente utiliza o cantiléver oscilando como no modo de não-contato, no entanto, muito mais próximo da amostra e tocando-a levemente por ínfimos espaços de tempo.

As micrografias foram obtidas com um equipamento Shimadzu SPM-9600 Scanning Probe Microscope no modo intermitente com sondas de silício de dureza variando de 34 a 50 Nm^{-1} e frequência de ressonância entre 324-369 Hz.

As estatísticas calculadas pelo equipamento contaram as vesículas nas imagens de maior ampliação das amostras. Como resultado foram 46 e 102 para os lipossomos de DPPC e DPPC:DPPE, e, 26 e 52 para os proteolipossomos de DPPC-NKA e DPPC:DPPE-NKA, respectivamente. Portanto, os resultados das análises estatísticas não têm características de distribuição gaussiana.

O eixo da distribuição de tamanhos das vesículas foi sempre distribuído em 20 intervalos, correspondente ao número de “bins”.

5. Resultados e Discussão

5.1 Lipossomos

5.1.1 Lipossomos constituídos de DPPC

Inicialmente foram caracterizados os lipossomos de composição mais simples, DPPC. Essa análise foi utilizada como branco para as comparações com a superfície da amostra de proteolipossomos de DPPC-NKA. Para isso os lipossomos de DPPC foram preparados utilizando o método de extrusão por uma membrana de policarbonato de 100 nm.

Vesículas de diâmetro 103 ± 3 foram obtidas quando a suspensão coloidal foi medida por DLS, valor que é próximo ao dos poros da membrana utilizada para extrusão. A solução também se mostrou monodispersa, para isso os valores de PI (índice de polidispersão) devem ser menores do que 0,2, e o valor obtido foi de 0,043.

Após a confirmação por DLS de que os lipossomos de DPPC estavam nos parâmetros desejados, parte dessa mesma amostra foi utilizada para análise por AFM. Ambas as técnicas permitem análise de diâmetro médio e dispersão das vesículas. Dessa forma, uma correlação entre as análises foi descrita por Ruozi et al. (2005), na qual, os autores inclusive propõem que a substituição de uma técnica pela outra é possível. Cabe destacar também que, neste mesmo artigo, Ruozi e colaboradores (2005) não ~~foi~~ utilizaram uma etapa de fixação e os experimentos foram conduzidos diretamente em solução aquosa aguardando a deposição dos lipossomos em solução até a superfície da mica, para posteriormente, romper as vesículas antes das análises.

As análises de AFM realizadas para os lipossomos de DPPC mostraram que o diâmetro médio das vesículas foi de 151 ± 46 nm. A Figura 10 a seguir mostra os lipossomos selecionados pelo equipamento para o cálculo de diâmetro médio e desvio padrão. A pequena diferença de tamanhos encontrada pode ser atribuída à etapa de fixação dos lipossomos sobre a mica que pode ampliar o tamanho das vesículas e até mudar seu formato devido a sua deposição sobre uma superfície (Jass et al., 2000).

A partir da imagem da Figura 11, os lipossomos foram escolhidos e numerados pelo computador para análise de diâmetro médio. As informações são apresentadas no histograma da Figura 12, juntamente com o valor da média e do desvio padrão. Esse procedimento foi adotado para todas as amostras.

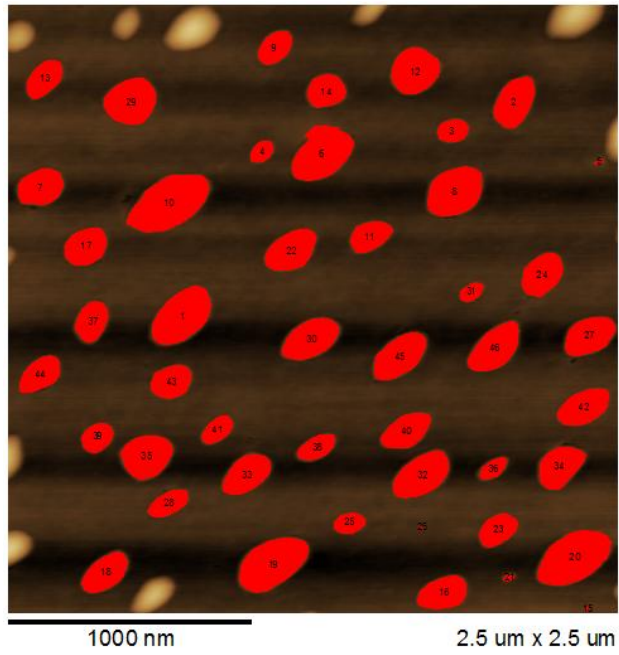


Figura 11. Imagem de AFM da amostra de lipossomos constituídos DPPC representando a variedade de tamanhos das vesículas selecionadas e sua numeração para análise de diâmetro médio.

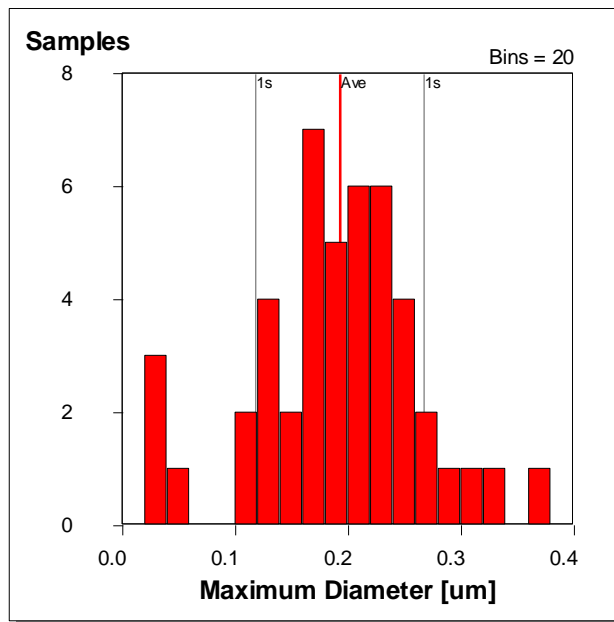


Figura 12. Gráfico em colunas da amostra de lipossomos de DPPC representando o número de vesículas pelo diâmetro máximo. A linha vermelha vertical representa o valor do diâmetro médio e as linhas cinzas verticais (1s) representam o desvio padrão.

5.1.2 Lipossomos constituídos de DPPC e DPPE

Os resultados obtidos análises entre DLS e AFM dos lipossomos de DPPC motivaram a continuidade dos experimentos, que tem por curso natural o aumento gradual da complexidade das amostras. Seguindo essa estratégia, lipossomos de composição lipídica binária foram preparados. A composição de DPPC:DPPE na razão molar 1:1 foi utilizada levando em consideração os resultados de recuperação de 75% da atividade enzimática para proteolipossomos descritos por Santos et al. (2005) para esta composição lipídica. Entretanto, o método de preparo desses lipossomos foi por sonicação ao invés de extrusão por membrana de policarbonato ou co-solubilização. A sonicação é um método de preparo de vesículas unilamelares que foi escolhido para efeito de comparação entre polidispersividades proporcionadas pelos diferentes métodos de preparo e qual seria o melhor para comparação com os proteolipossomos.

O diâmetro dos lipossomos na análise por DLS foi de 233 ± 5 nm com um índice de polidispersão de 0,279. Esses resultados são indicativos de que a dispersão coloidal obtida não é monodispersa, e por tal existem populações que diferem entre si em diâmetro e número de partículas. Essas características ficaram em evidencia após a análise de distribuição por AFM onde encontra-se uma região da amostra na qual o diâmetro médio dos lipossomos é de 98 ± 28 nm (Figuras 13 e 14).

Ao comparar os resultados entre duas técnicas de medida de diâmetro destaca-se a grande diferença do tamanho médio das vesículas. A causa dessa diferença se deve provavelmente a obtenção dos resultados de DLS. Foi utilizada a análise por intensidade, na qual, partículas maiores espalham mais luz do que partículas menores. Sendo assim, a região escolhida para análise de AFM continha lipossomos menores do que a os lipossomos medidos por DLS, evidenciando assim que a população de lipossomos maiores é mesmo pequena, e, que ao espalhar uma maior quantidade de luz desviou o diâmetro médio dos lipossomos para um valor maior.

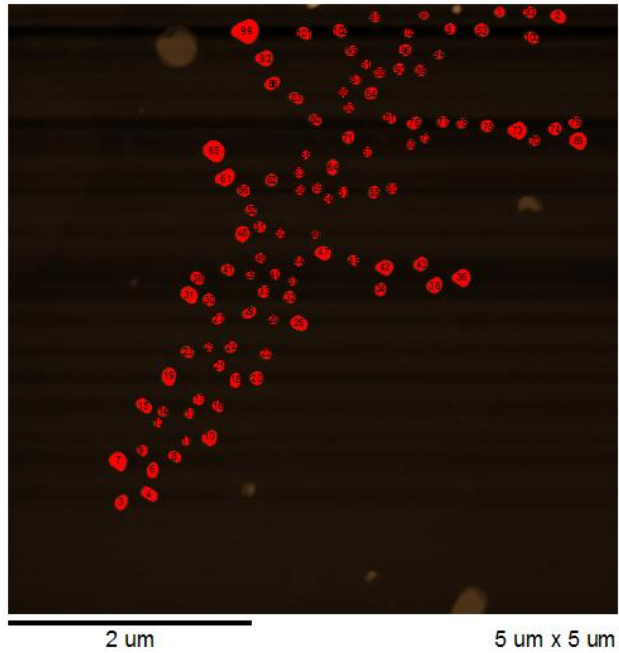


Figura 13. Imagem de AFM da amostra de lipossomos constituídos DPPC:DPPE representando a variedade de tamanhos das vesículas selecionadas e sua numeração para análise de diâmetro médio.

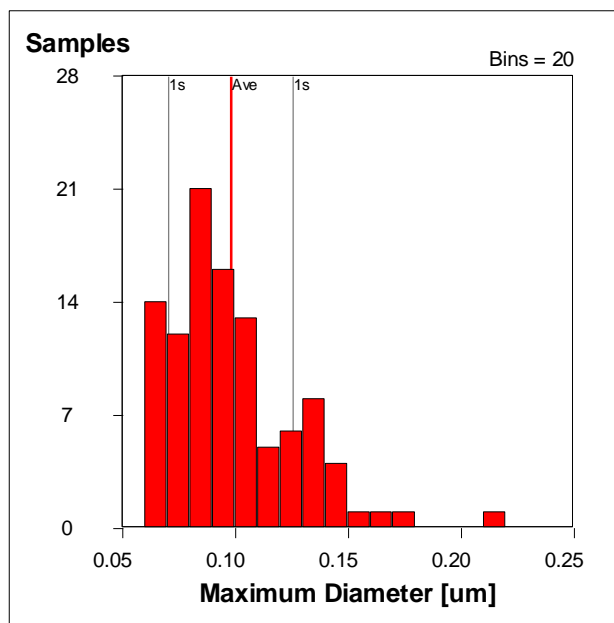


Figura 14. Gráfico em colunas da amostra de lipossomos de DPPC:DPPE representando o número de vesículas pelo diâmetro máximo. A linha vermelha vertical representa o valor do diâmetro médio e as linhas cinzas verticais (1s) representam o desvio padrão.

5.2 Proteolipossomos

5.2.1 Proteolipossomos constituídos de DPPC

O preparo de proteolipossomos da NKA com maior diâmetro baseou-se no protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório para reconstituição da proteína em lipossomos pelo método de co-solubilização (Santos et al., 2005). No método padronizado, os proteolipossomos apresentavam 75% de recuperação da atividade catalítica e diâmetro de vesículas de 300 nm, para sistemas constituídos de DPPC e DPPE na razão 1:1 (p/p).

No método de co-solubilização, proteína e fosfolipídios são solubilizados em concentração de detergente acima da CMC para formar uma solução com micelas homogêneas de proteína, fosfolipídios e detergente. O detergente atua como um facilitador para a interação da proteína com os lipídios. A inserção da proteína em ambiente lipídico ocorre durante retirada seletiva do detergente efetuada pela adição da resina (BioBeads). As micelas contendo os fosfolipídios e as moléculas de proteína vão se desfazendo conforme a concentração de detergente decresce até valores menores que os da CMC. Esse processo é controlado principalmente pelos fatores de concentração da NKA solubilizada, da proporção resina:detergente (p/p) e do tempo que a resina fica em contato com a solução (proteína:fosfolipídios:detergente). Em valores abaixo da CMC do detergente, os proteolipossomos tomam forma vesicular com a proteína inserida em uma bicamada de fosfolipídios que mimetiza a membrana nativa (Silvius, 1992; Rigaud et al., 1995).

No protocolo de Santos et al. (2005) foram estabelecidos 200 mg de resina por mililitro de solução e intervalos de 5, 10 e 45 minutos para trocas de resina. Assim, baseando-se na revisão realizada por Rigaud et al. (1995) sobre a reconstituição de proteínas de membrana em lipossomos, um único fator foi modificado no protocolo: segunda troca de resina foi realizada com 15 minutos ao invés de 10. Essa estratégia foi escolhida para aumentar o tempo interação da solução com a resina e favorecer as interações entre os fosfolipídios e proteína. Este processo contribuiu para a formação de lipossomos maiores. A recuperação em massa de proteína para essa amostra foi 0,88 mg dos 2,4 mg usados para o preparo, 36,6%.

Nas análises de DLS os proteolipossomos de DPPC-NKA tem diâmetro médio de 855 ± 102 nm e índice de polidispersividade de 1,451. Essas informações descrevem

que a solução contem populações de proteolipossomos de diversos tamanhos.

Entretanto, dentro dessas populações existem aquelas em que os diâmetros são muitos maiores do que os obtidos no protocolo anterior. Em sequência, as informações do experimento de AFM corroboram tais afirmações ao permitir observar proteolipossomos variando de diâmetros entre 390 ± 326 nm (Figuras 15 e 16).

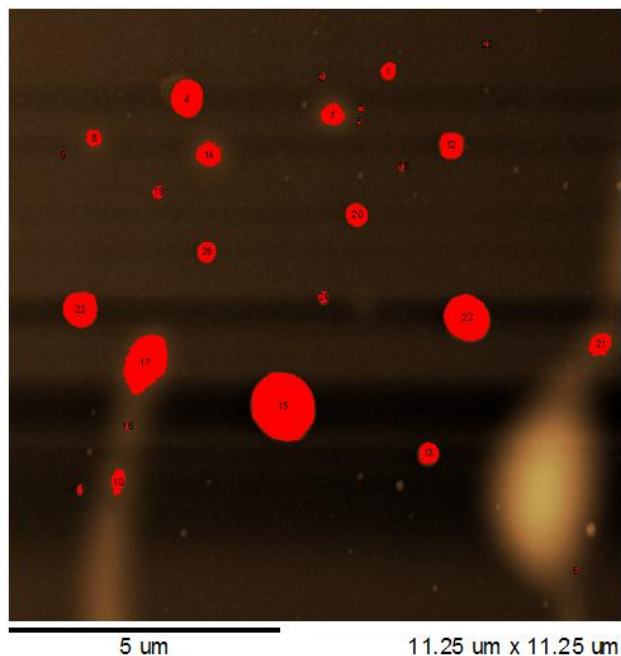


Figura 15. Imagem de AFM da amostra de proteolipossomos constituídos de DPPC-NKA representando a variedade de tamanhos das vesículas selecionadas e sua numeração para análise de diâmetro médio.

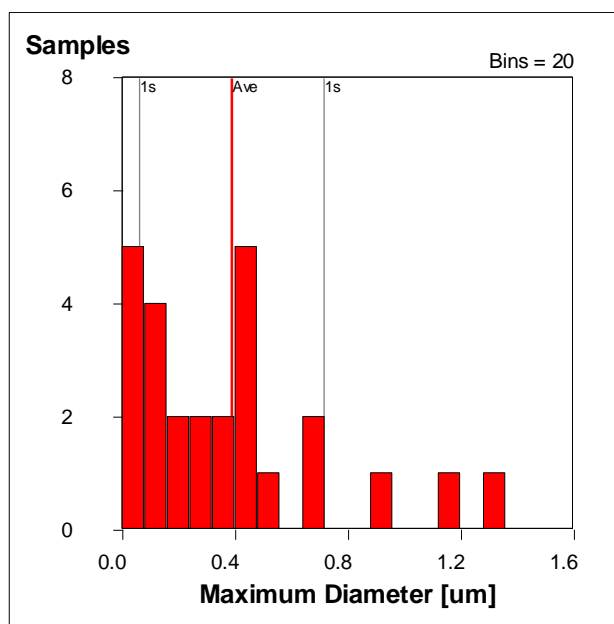


Figura 16. Gráfico em colunas da amostra de DPPC-NKA referente ao número de proteolipossomos pelo diâmetro máximo. A linha vermelha vertical representa o valor do diâmetro médio e as linhas cinza verticais (1s) representam o desvio padrão.

5.2.2 Proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPE

Os proteolipossomos de composição DPPC:DPPE em razão molar 1:1 tiveram recuperação em massa de proteína de 0,92 mg das 2,4 mg usadas no preparo por co-solubilização, o que resulta em uma porcentagem de 38,3%. A atividade catalítica para essa composição lipídica foi de 91,6 %, o que representa aproximadamente um valor 30% maior do que a recuperação na qual apenas DPPC foi utilizado, como era esperado já que alguns autores defendem que lipídios neutros e composições mais complexas de lipídios favorecem a atividade da NKA (Santos et al., 2005; Haviv et al., 2013).

Tal como ocorreu para as amostras de DPPC-NKA, as informações fornecidas pelos experimentos de DLS dos proteolipossomos de DPPC:DPPE-NKA mostraram vesículas de maior diâmetro e alto índice de polidispersividade, no caso 490 ± 75 nm e 1,001, respectivamente. A comparação dessas informações com as obtidas da região da mica escolhida para estudo de AFM apesar de concordar a respeito da polidispersividade da amostra, contrasta um pouco em relação aos diâmetros obtido, já que para a AFM o diâmetro médio dos proteolipossomos é de 189 ± 156 nm (Figuras 17 e 18).

As informações de massa de proteína e atividade recuperadas das amostras de proteolipossomos, diâmetros de DLS e AFM e polidispersividade para todas as amostras estudadas estão resumidas na Tabela 1 a seguir.

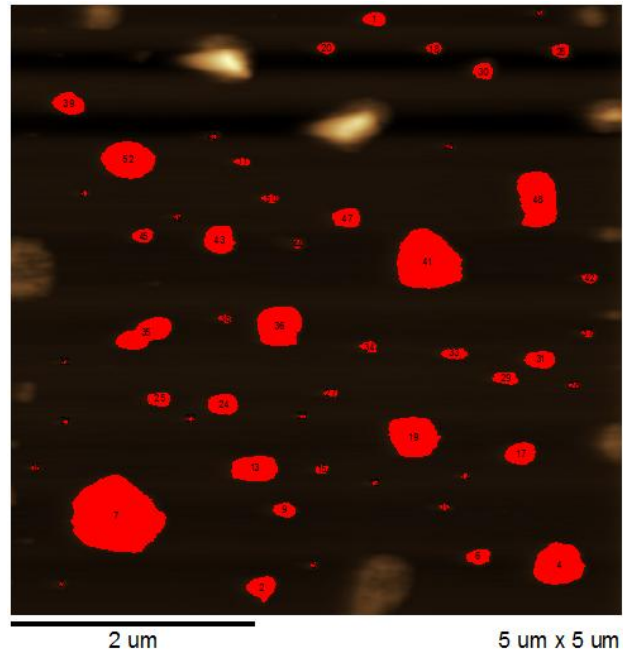


Figura 17. Imagem de AFM da amostra de proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPE-NKA representando a variedade de tamanhos das vesículas selecionadas e sua numeração para análise de diâmetro médio.

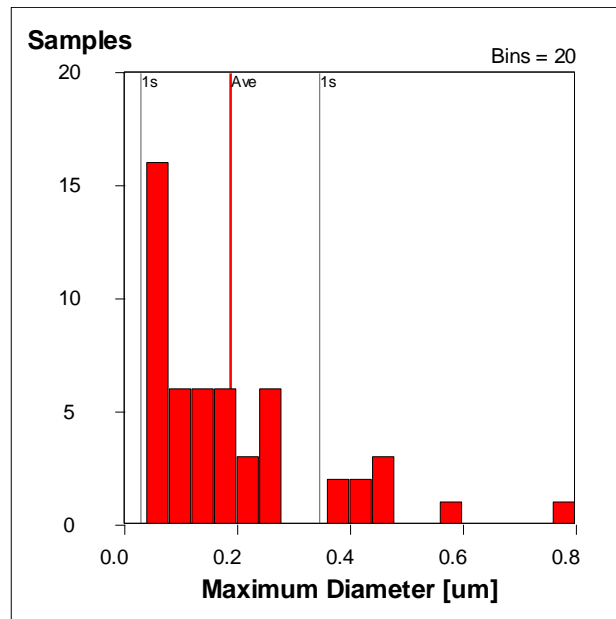


Figura 18. Gráfico em colunas da amostra de DPPC:DPPE-NKA referente ao número de proteolipossomos pelo diâmetro máximo. A linha vermelha vertical representa o valor do diâmetro médio e as linhas cinza verticais (1s) representam o desvio padrão.

Tabela 1: Comparação de parâmetros bioquímicos e biofísicos entre os sistemas de proteolipossomos com a NKA, obtidos por diferentes protocolos.

Lipossomo/ Proteolipossomo	Atividade	Proteína	Diâmetro		
	NKA (%)	(10 ⁻² mg)	DLS (nm)	IP	Diâmetro AFM (nm)
DPPC	--	--	103 ± 3	0,041	151 ± 46
DPPC:DPPE	--	--	233 ± 5	0,279	98 ± 28
NKA-DPPC*	75	--	320 ± 62	--	--
NKA-DPPC	61	88	855 ± 102	1,451	390 ± 326
NKA-DPPC:DPPE	91	92	490 ± 75	1,001	189 ± 156

*Santos et al. (2005)

6. Microscopia de Força Atômica de lipossomos e proteolipossomos.

A AFM-CI ainda fornece a análise de contraste de fase, na qual, durante a varredura a sonda ainda detecta as forças atrativas e repulsivas mesmo que pequenas que a amostra exerce (Zhong et al., 1993; Garcia et al., 2002). Hoper et al. (1995) mostrou que essas forças poderiam ter maiores valores ajustando as amplitudes da oscilação calibrada e da detectada. Com isso Magonov et al. (1997) demonstrou que as forças atrativas e repulsivas deslocam a frequência de oscilação do cantiléver gerando um deslocamento que pode ser positivo quando a resultante das forças é repulsiva, ou, negativo quando a resultante é atrativa. O deslocamento de fase está exemplificado na Figura 19. Os mesmos autores associaram ainda esses deslocamentos de fase às propriedades de dureza da amostra considerando mais alguns fatores como o módulo de Young, a área de contato entre a sonda e a amostra, o raio de contato e a dureza relativa entre a ponta da sonda com a amostra. Esses fatores juntos permitem mapear as regiões de dureza e conseqüentemente de diferentes composições da amostra.

As das amostras de lipossomos e proteolipossomos utilizaram o mapeamento de dureza de Magonov et al. (1997), porém, sem os estudos de módulo de Young, o que impossibilita uma discussão entre quais regiões tem maior dureza. Por tal, as barras ao lado das imagens de fase que fornecem a variação em graus dos deslocamentos de fase não serão discutidas nesse momento.

O foco dessa pesquisa então voltou-se para a associação entre as imagens de fase e as de topografia, as regiões onde foram encontrados diferentes deslocamentos de fase coincidiam com os relevos das imagens de topografia, como foi proposto por Pang et al. (1999) e recentemente realizado por Bhatia et al. (2016). Vale ressaltar que as amostras aqui foram tratadas com glutaraldeído antes das análises (Kiernan, 2000; Kirat et al. 2005).

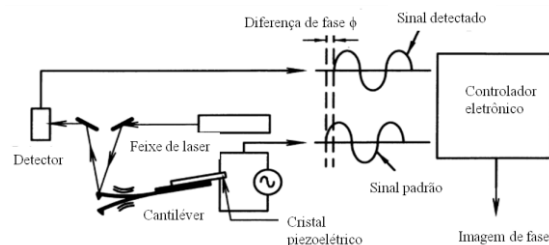


Figura 19. Diagrama esquemático das imagens de contraste de fase da AFM-CI. A imagem é produzida monitorando-se a diferença entre a amplitude da oscilação calibrada e a detectada. Imagem adaptada de Pang et al. (1999).

6.1 Lipossomos

6.1.1 Lipossomos constituídos de DPPC

A Figura 20-A mostra uma imagem de fase das vesículas unilamelares de composição de DPPC 1,5 mg/mL. Os lipossomos de DPPC são monocromáticos, portanto, não há diferenças de fase na superfície de suas membranas. Em seguida há uma imagem da topografia (Figura 20-B) na qual a atenção se redireciona para a estrutura dos lipossomos, onde são observados além do formato oval ou arredondado, a inexistência de irregularidades na interface superficial da membrana.

Ao traçar as linhas A-B e C-D na imagem de altura da Figura 20-C obtêm-se os perfis apresentados em sequência na Figura 20-D. Essa estratégia permite observar com maior exatidão a superfície das vesículas unilamelares. Para os lipossomos de DPPC, as superfícies das vesículas se mostraram bastante regulares e lisas.

As dimensões dessa vesícula de acordo com as linhas traçadas foram de 282 nm de comprimento por 163 de largura e 28 nm de altura, valores ligeiramente maiores do que a média para as análises de DLS (103 ± 3 nm) e da própria AFM (151 ± 46 nm).

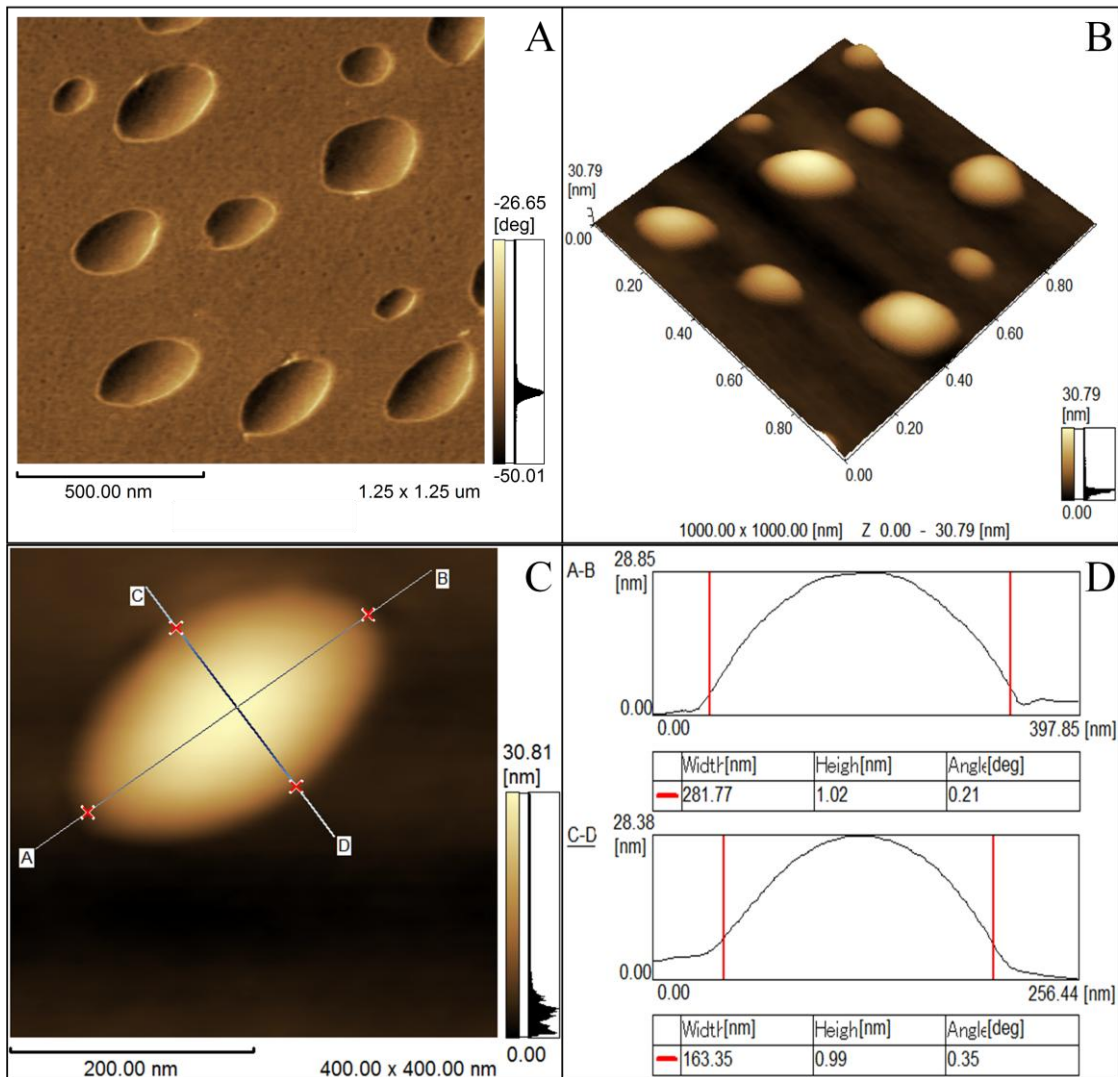


Figura 20. Imagens de AFM de lipossomos de DPPC 1,5mg/mL. A) Imagem de fase. B) Imagem topografica. C) Imagem da análise topografica de linha. D) Perfis horizontal e vertical de um lipossomo.

6.1.2 Lipossomos constituídos de DPPC:DPPE

Lipossomos de DPPC:DPPE apresentaram características superficiais parecidas com os constituídos unicamente de DPPC. Na Figura 20-A, a superfície não tem nenhum tipo de variação de cor que indique a presença de mudança fase, apesar de a composição lipídica integrar dois diferentes fosfolipídios. A origem desse fato pode decorrer da carga líquida neutra dos fosfolipídios utilizados, já que as forças de atração e repulsão que afetam as mudanças de fase da AFM devem ser similares para os fosfolipídios DPPC e DPPE.

A observação do formato dos lipossomos de DPPC:DPPE na Figura 20-B revelou que apesar de não influenciar nas características de fase da imagens de AFM, a adição do DPPE pode ter alterado o formato das vesículas que passaram do formato oval ou arredondado para um com estruturas mais pontiagudas em decorrência da formato cônico do DPPE. As análises de linha da Figura 20-C resultaram nos perfis de comprimento, largura e altura da Figura 20-D. O lipossomo analisado tem comprimento na linha de A-B 114,36 nm, largura de C-D de 109,66 nm e altura variando de 46,56 até 52,74 nm. Os valores de diâmetro dentro dos parâmetros obtidos para DLS e AFM. As alturas variam ligeiramente de acordo com a região que a linha é traçada.

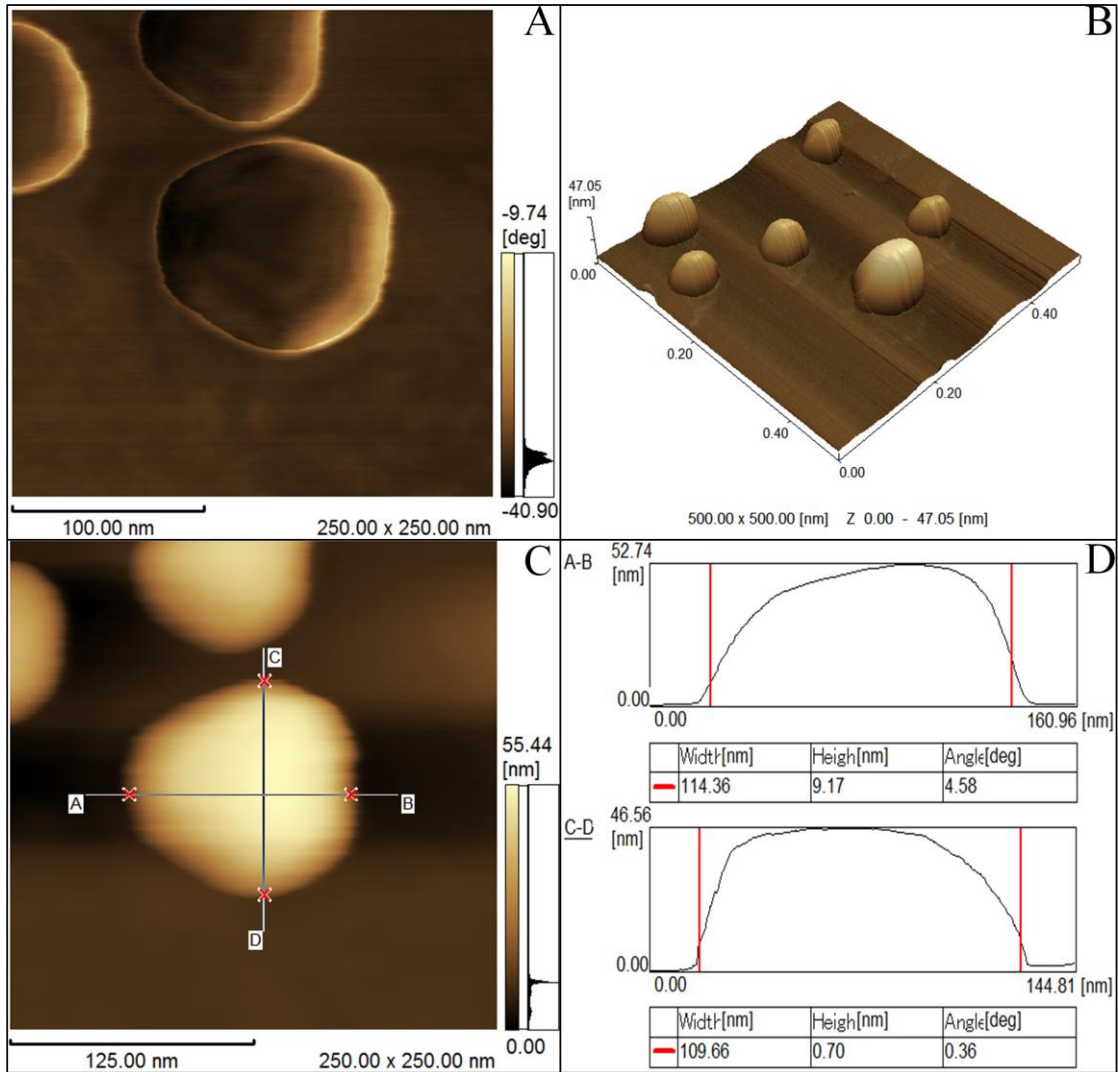


Figura 21. Imagens de AFM de lipossomos de DPPC:DPPE razão molar 1:1 e 1,0 mg/mL. A) Imagem de fase. B) Imagem em 3D da topografia da vesícula. C) Imagem da análise topográfica de linha. D) Perfis horizontal e vertical traçados pelas retas AB e CD na imagem topográfica do lipossomo.

6.2 Proteolipossomos

6.2.1 Proteolipossomos constituídos de DPPC-NKA

A amostra de DPPC-NKA proporcionou imagens muito distintas em comparação com as de lipossomo. Existem alguns artefatos derivados da orientação da varredura (no caso da direita para a esquerda) da imagem e da alta inclinação a que a ponta e o cantiléver sofrem ao se deparar com a vesícula. Esses artefatos são observados nas imagens como sombreamento no canto superior direito da imagem de fase na Figura 22-A e a alta luminosidade nos contornos dos proteolipossomos, respectivamente. A imagem em três dimensões da Figura 22-B apresenta de forma didática os relevos encontrados para essa amostra.

Na Figura 22-A, destacam-se diversas vesículas de tamanhos diferentes que, no entanto, tem características semelhantes quanto aos deslocamentos de ângulo de fase representados pelos diversos tons claros e escuros. Para observar mais cuidadosamente essas regiões foi escolhido um proteolipossomo de $\sim 1,0$ μm de diâmetro e ~ 140 nm de altura. Nesse proteolipossomo é possível notar que as regiões de transição de fase têm uma tendência a tomar uma conformação circular, além de aglutinarem-se umas sobre as outras (Figura 22-C) constantemente sobrepondo-se.

A fim de elucidar essas regiões de diferentes características de fase, as imagens foram comparadas com as de topografia, Figuras 22-C e 22-D. Nessa comparação é notório que as imagens das análises são complementares e as informações topográficas mostram que onde existem protusões salientes encontra-se nas imagens de fase regiões de diferente composição química e dureza as quais são mostradas em tons mais escuros, como indicado pelos círculos vermelhos.

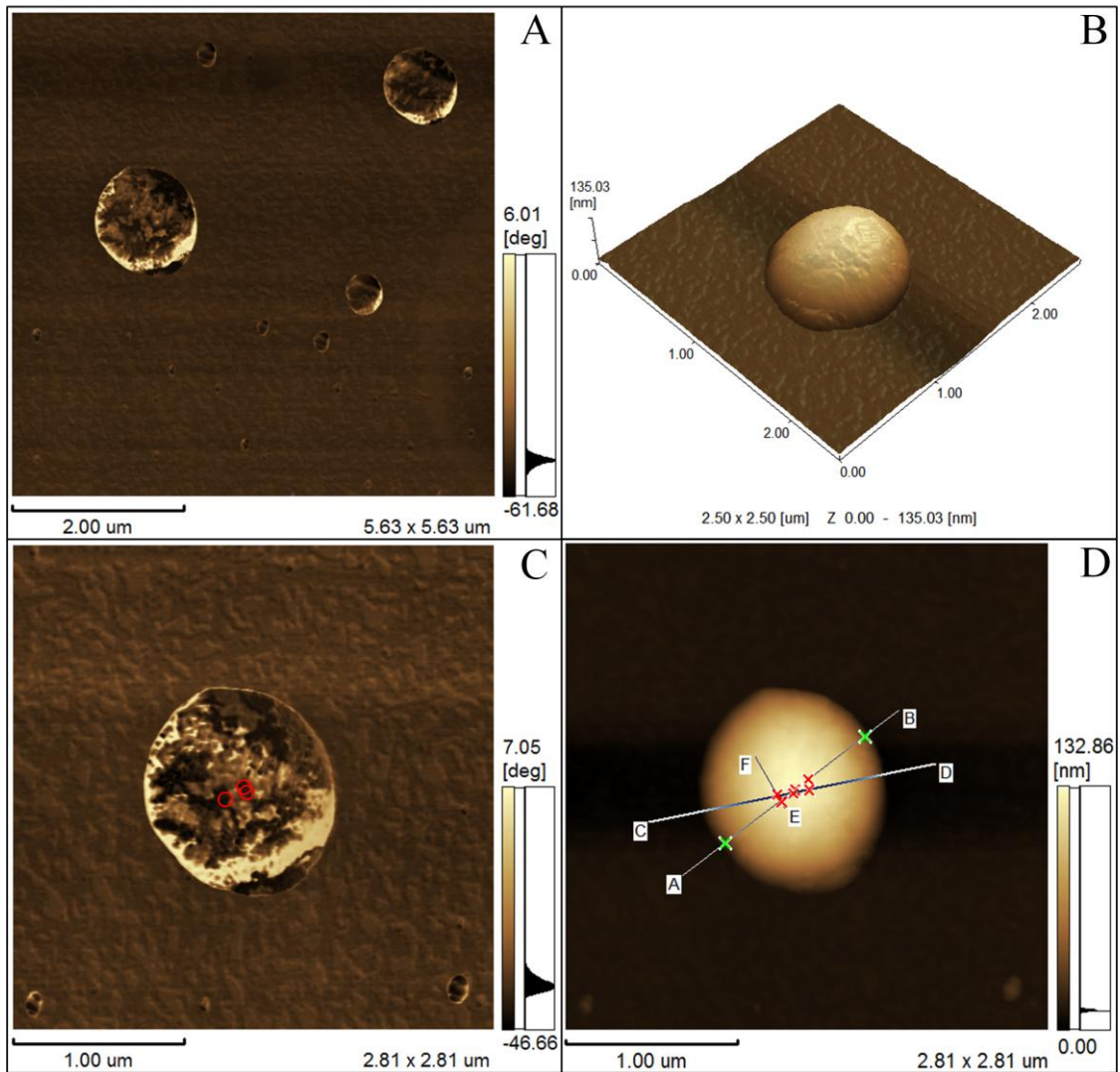


Figura 22. Imagens do detalhamento de um proteolipossomo de 1,02 μm da composição DPPC-NKA. A) Imagem de fase. B) Imagem em 3D da topografia da vesícula. C) Imagem de topografia sobreposta pela imagem de fase adaptada e com as retas AB, CD e EF traçadas. D) Perfis topográficos do proteolipossomo obtidos através das retas AB, CD e EF.

Na imagem de altura da Figura 22-D as retas AB, CD e EF representam cortes na vesícula e passam tanto por regiões claras quanto escuras quando comparada com a imagem de fase, onde estão marcados em vermelho as protusões que puderam ser analisadas. A partir dessas retas foram traçados os perfis de altura e diâmetro das protusões. Foi possível obter as dimensões de algumas protusões, nas quais os tamanhos são 46,79 a 100,00 nm de diâmetro (Figura 23). As informações de altura não são confiáveis para esse tipo de análise, pois, são provenientes dos locais da vesícula aonde as retas verticais coloridas cortam o perfil do proteolipossomo.

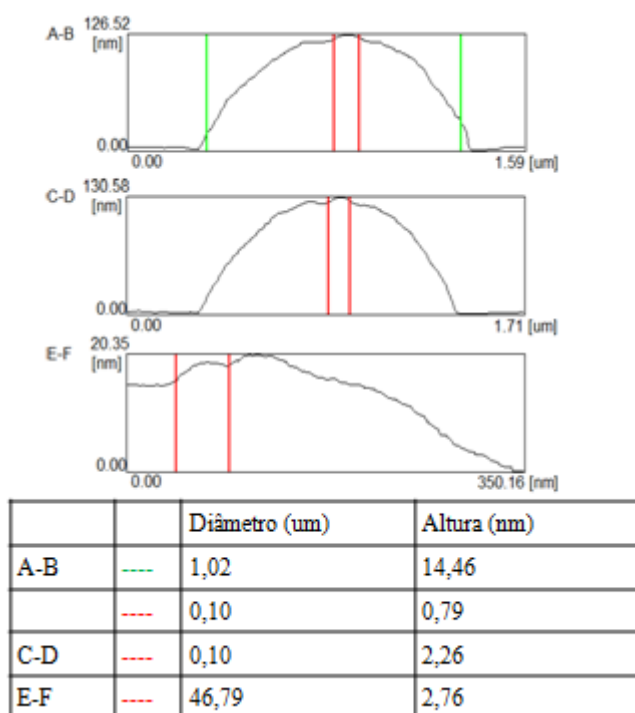


Figura 23. Perfis dos cortes realizados na imagem topográfica do proteolipossomo de DPPC-NKA na Figura 21-D. Retas discriminadas nos perfis e na tabela com os respectivos diâmetros das protusões.

Na tentativa de traçar medidas de altura confiáveis utilizou-se uma outra forma de análise, na qual, o programa traça diversas retas horizontais sobre a imagem topográfica a fim de extrair diversos perfis de linha. A Figura 24 mostra em uma imagem de fase por onde os cortes realizados passam na imagem topográfica. Dessa forma também se torna possível relacionar as regiões de protusões com as regiões de deslocamento de fase.

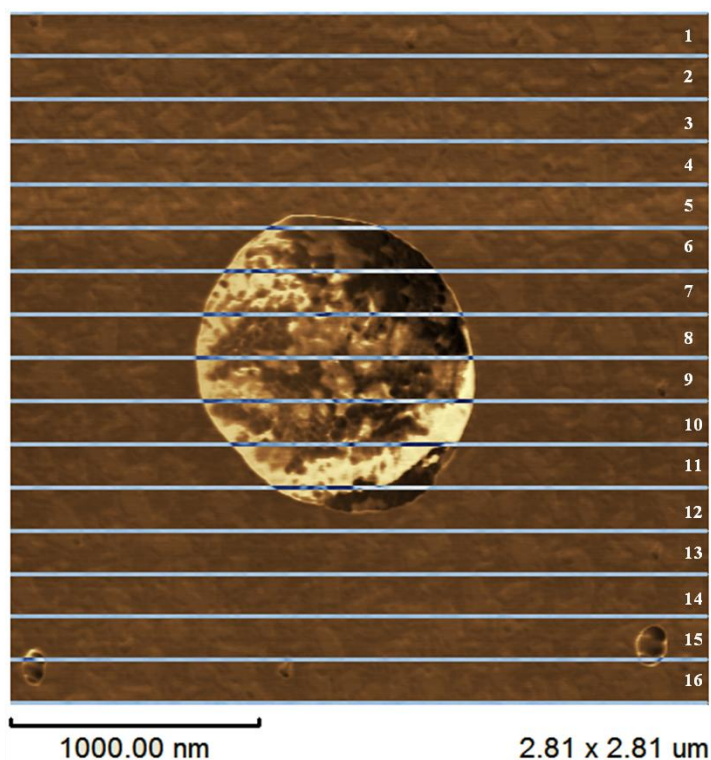


Figura 24. Imagem de fase do proteolipossomo de composição DPPC-NKA demonstrando os cortes usados para análise de perfil.

O gráfico apresentado na Figura 25 mostra os cortes que foram escolhidos da figura anterior remontando a vesícula em três dimensões de forma esclarecer onde passam e as distorções que sofrem os perfis devido às variações de escalas, como se observa nos perfis de 6 a 12 na Figura 26.

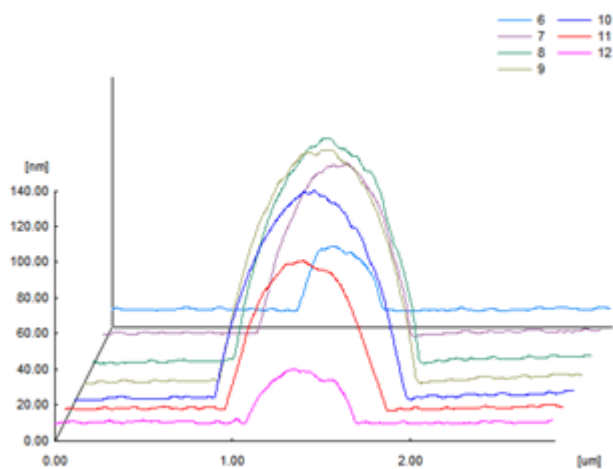


Figura 25. Demonstração gráfica dos perfis de corte referentes a imagem de fase na Figura 24.

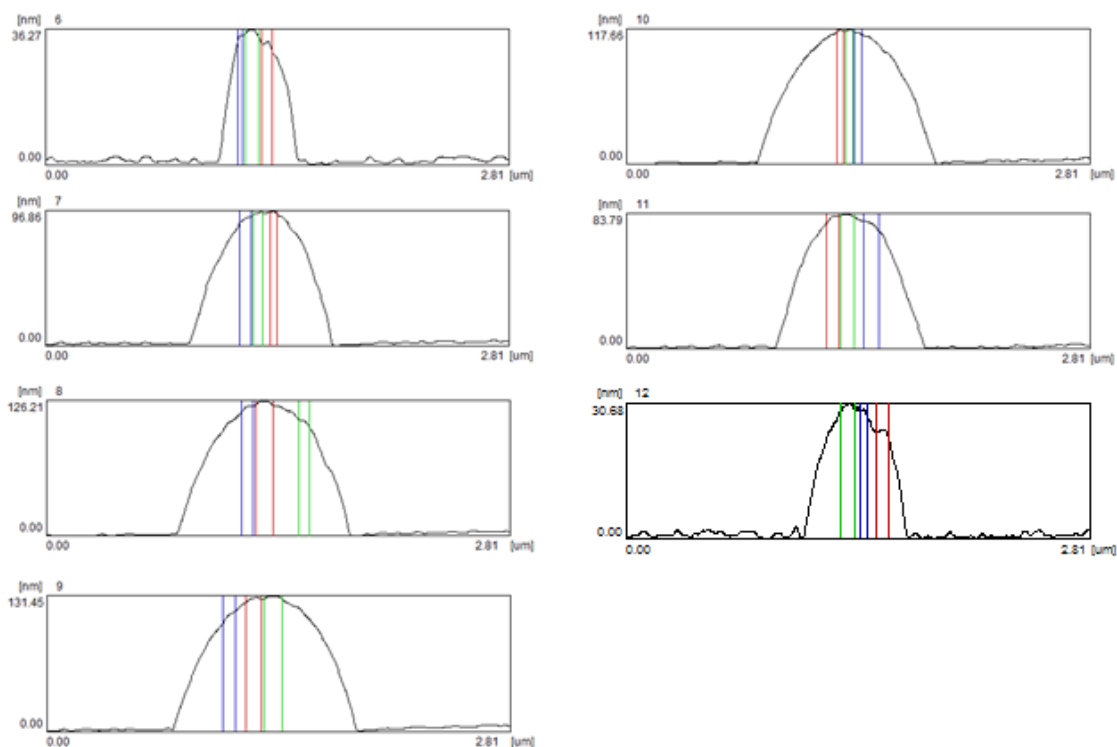


Figura 26. Perfis da análise de corte dos diâmetros das protusões do proteolipossomo de composição DPPC-NKA da Figura 24.

Desses perfis foram traçadas novas retas verticais onde uma maior gama de protusões foi verificada. No entanto, no que diz respeito às medições das alturas das vesículas pouco se evoluiu. As protusões estão demasiadamente aglomeradas dificultando o exercício de estabelecer o começo e o final de cada uma. O equipamento fornece os dados de diâmetro em micrômetros e os de altura em nanômetros, o que é uma vantagem já que as alturas das protusões têm dimensões menores, porém, também conduz a uma discrepância entre o número de casas utilizadas para as análises em relação às medições de diâmetros. Na Tabela 2 a seguir encontram os parâmetros obtidos para as protusões. Os diâmetros variaram de 38 até 115 nm (média de 73 ± 18 nm), enquanto as alturas de 0,244 a 4,620 nm, com um valor médio de $2,051 \pm 1,79$ nm.

Tabela 2: Dimensões das protusões dos proteolipossomos de DPPC-NKA.

Perfil (n°)	Diâmetro (um)	Altura (nm)	Perfil (n°)	Diâmetro (um)	Altura (nm)
6			10		
---	0,066	1,030	---	0,044	1,095
---	0,088	1,513	---	0,049	2,894
---	0,038		---	0,049	3,742
7			11		
---	0,049	1,758	---	0,082	
---	0,066	1,164	---	0,088	1,401
---	0,071		---	0,099	
8			12		
---	0,088	4,620	---	0,082	0,575
---	0,077		---	0,093	1,244
---	0,066	4,439	---	0,055	0,244
9					
---	0,099				
---	0,115	3,000			
---	0,082				

A grande diversidade dos tamanhos das protusões dificulta a interpretação, já que, uma tentativa de comparação entre a região da proteína que fica externa a membrana e as medidas encontradas demonstrou que os diâmetros não são compatíveis com as dimensões da forma $\alpha\beta\gamma$ completa da NKA obtidas por cristalografia (Morth et al., 2007; Shinoda et al., 2009; Ogawa et al., 2009), e tão pouco com quaisquer estados oligoméricos conhecidos como os recentemente por Yoneda et al. (2016) onde encontra-se uma discussão a respeito da presença de sete espécies multiméricas principais que compõe a NKA solubilizada em $C_{12}E_8$ logo após a etapa purificação por cromatografia de exclusão.

Em contra partida, o grupo MEMPHYS de pesquisa em colaboração com Flemming Cornelius publicou também neste ano um estudo sobre a presença da NKA em GUVs utilizando a AFM (Bathia et al., 2016). Nele os proteolipossomos foram preparados por co-solubilização com $C_{12}E_8$ utilizando composições binárias dos lipídios DPPC, DOPC e colesterol. As vesículas lipídicas foram preparadas na mica e posteriormente rompidas para análise AFM. No interior dessas vesículas foram encontradas protusões que puderam ser separadas em duas populações principais, as de 1 a 3 nm e as de 4 a 6 nm de altura, ambas com 50 nm de diâmetro. Os valores de altura foram creditados aos domínios externos a membrana que compõe a NKA. As protusões de 4 a 6 nm são indicativos da proteína na sua orientação natural (*rightside-out*), e de 1 a 3 nm relativos às orientações “*inside-out*” e “*non-oriented*” (inserida ao contrario do que na membrana natural e deitada sobre a membrana, respectivamente).

Os valores das alturas das protusões encontradas para a amostra de DPPC-NKA

indicaram duas populações distintas, uma de ~1 nm e outra de ~4 nm. Considerando todas as abstrações tanto de se realizar essas medidas de altura em vesículas côncavas e quanto ao que diz respeito a adição de glutaraldeído, os resultados ainda induzem a relacionar essas alturas às diferentes orientações da proteína reconstituída. Nesse caso, a população de ~1 nm refere-se a população de proteína orientada como *rightside-out* e *non-oriented*, e, a população de ~4 nm com a orientada como *inside-out*.

6.2.2 Proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPE-NKA

Após as análises da amostra de proteolipossomos composta por DPPC-NKA, investigamos os proteolipossomos constituídos por uma combinação binária dos fosfolipídios DPPC e DPPE na proporção 1:1. O método de reconstituição da proteína em membrana sintética lipídica foi o mesmo utilizado para a combinação anterior, co-solubilização com detergente $C_{12}E_8$. Esperava-se imagens semelhantes às encontradas para a amostra de DPPC-NKA, com extensas regiões de vales e picos onde se destacavam intensos deslocamentos de fase entre os domínios proteicos e os lipídicos, características que permitiram identificar a presença da NKA.

Todavia o que as imagens revelaram para a amostra de DPPC:DPPE-NKA foram proteolipossomos bastante diferentes. Como explicados na seção de análise de diâmetro observa-se uma grande variedade de tamanhos de vesículas (Figura 27-A), assim para uma análise inicial escolheu-se uma de ~400 nm de diâmetro e ~12 nm de altura com a intenção de observar com mais detalhes seu interior. A imagem de topografia da Figura 27-B das vesículas mostrou que a vesícula era mais achatada e tinha protusões ainda mais agrupadas.

As grandes regiões de intensas transições de fase encontradas na amostra anterior deram lugar a pequenos interstícios mais claros entre as protusões na imagem de fase da Figura 27-C. As protusões encontradas tem coloração mais escura do que os interstícios, que aparecem mais claros e brilhantes, levando a dedução de que sejam decorrentes dos domínios proteicos, enquanto, os interstícios se referem aos domínios lipídicos. A imagem de altura da Figura 27-D mostra análise do diâmetro e altura de algumas protusões que passem pelas linhas traçadas A-B e C-D. As protusões encontradas tiveram entre 49,18 e 21,37 nm de diâmetro, e, altura de 0,13 até 0,64 nm, Figura 28.

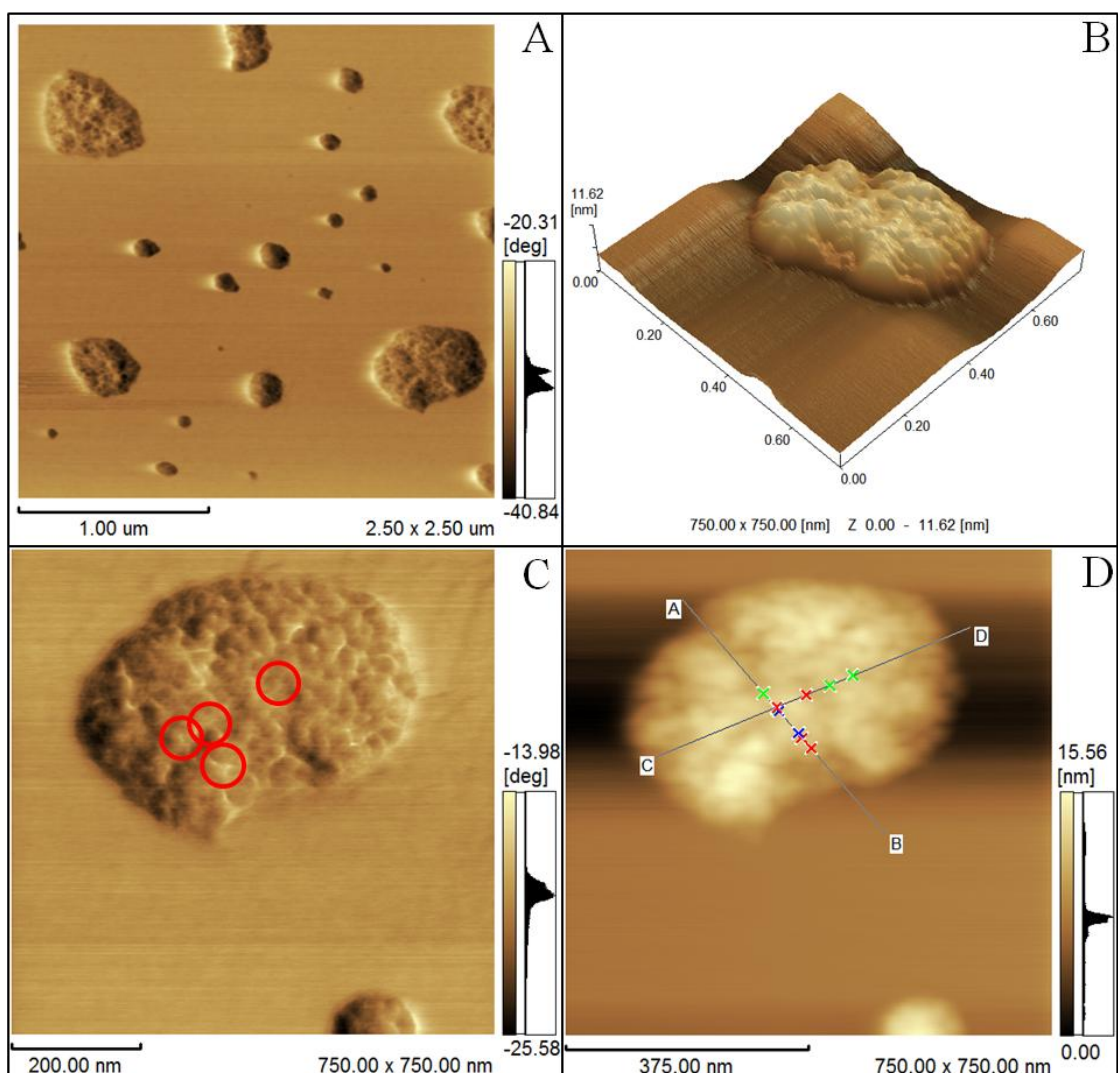


Figura 27. Imagens de AFM da amostra de proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPE-NKA. A) Imagem de fase; B) Imagem topográfica em três dimensões; C) Aproximação da imagem de fase; D) Imagem de análise de linha da imagem topográfica.

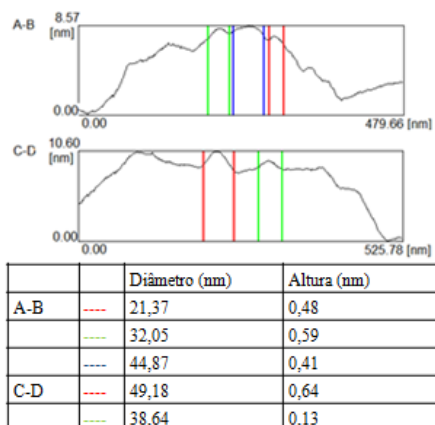


Figura 28. Perfis dos cortes realizados na imagem topográfica do proteolipossomo de DPPC:DPPE-NKA na Figura 27-D. Retas discriminadas nos perfis e na tabela com os respectivos diâmetros das protusões.

Para entender melhor o comportamento das protusões utilizou-se a análise de linhas na Figura 29, como anteriormente realizado para a amostra de DPPC-NKA. Dessa análise observam-se os cortes mostrados na forma de gráfico das figuras seguintes, Figuras 30 e 31. Diversas protusões foram analisadas de onde obteve-se as informações dispostas na Tabela 3 como os valores dos diâmetros e das alturas da amostra de DPPC:DPPE-NKA. A média do diâmetro dessas protusões foi $37,5 \pm 0,015$ nm e da altura foi $0,694 \pm 0,466$ nm.

Para essa composição de proteolipossomo sabe-se que a orientação da NKA é 100% como *inside-out* (Santos et al., 2005). Então, esperava-se que as alturas das protusões tivessem valores ao redor de 4,0 nm, o que não ocorreu. No entanto, as razões para isso podem não estar ligadas somente a orientação. Não se pode descartar uma maior interação do DPPE com a NKA que leve a um maior número de ligações cruzadas efetuadas pela adição de glutaraldeído, que, culminou em deformações da estrutura conhecida da NKA (Kiernan et al., 2000). Outra hipótese é de que a amostra possa ter demorado demais para ser analisada, levando a um processo de desidratação das vesículas.

A fim de solucionar esses problemas e entender como o processo de retirada de detergente influencia na formação de proteolipossomos realizou-se análise de vesículas de menor diâmetro.

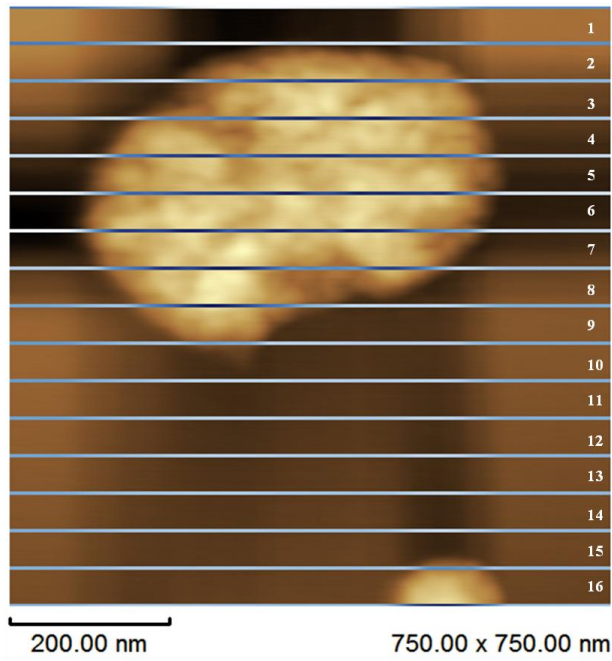


Figura 29. Imagem de fase do proteolipossomo de composição DPPC:DPPE-NKA demonstrando os cortes usados para análise de perfil.

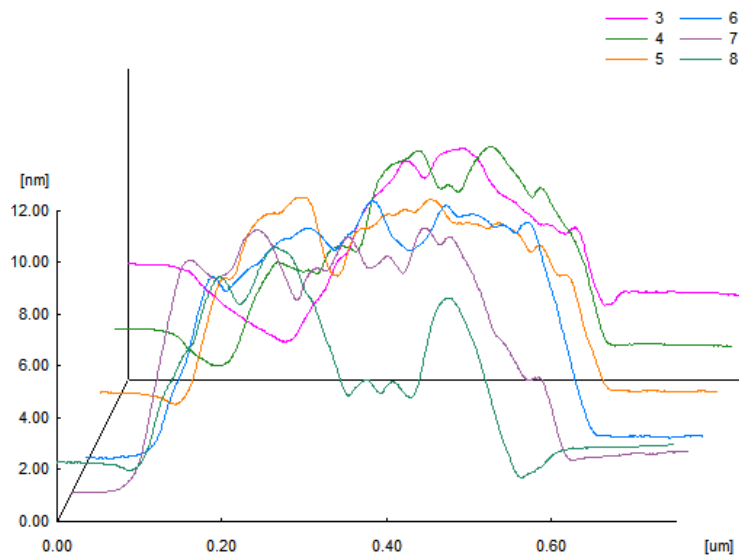


Figura 30. Demonstração gráfica dos perfis de corte referentes a imagem de fase na Figura 29.

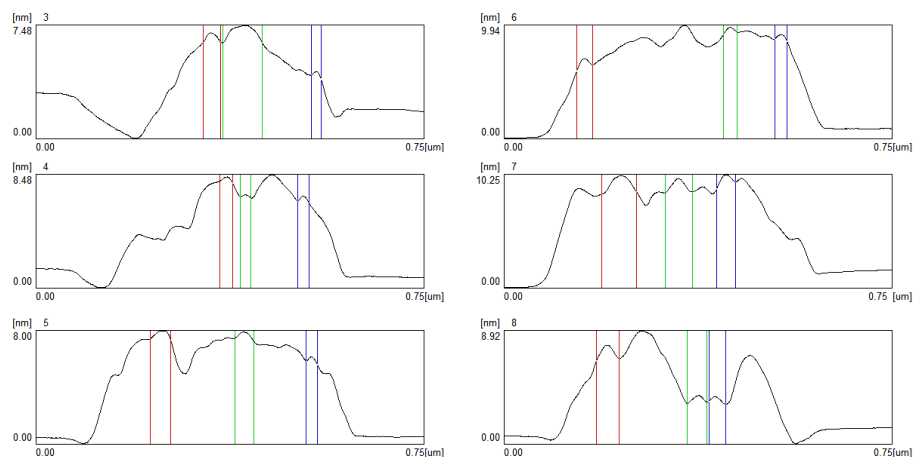


Figura 31. Perfis da análise de corte dos diâmetros das protusões do proteolipossomo de composição DPPC-NKA das Figuras 29 e 30.

Tabela 3: Dimensões das protusões de um proteolipossomo de composição DPPC:DPPE-NKA.

Perfil (nº)	Diâmetro (um)	Altura (nm)	Perfil (nº)	Diâmetro (um)	Altura (nm)
3			6		
---	0,035	0,649	---	0,032	0,418
---	0,078	1,150	---	0,028	0,533
---	0,021	0,209	---	0,025	0,382
4			7		
---	0,026	0,305	---	0,069	1,206
---	0,022	0,362	---	0,054	1,779
---	0,026	0,253	---	0,038	1,681
5			8		
---	0,041	0,446	---	0,045	0,598
---	0,038	0,249	---	0,040	0,598
---	0,023	0,629	---	0,034	1,038

Na Figura 32 encontram-se imagens de um proteolipossomos de 200 nm diâmetro com as mesmas características de transições de fase e morfológicas encontradas para o proteolipossomo anterior. O mesmo procedimento adotado para as amostra anteriores foi repetido, e linhas de cortes para analisar as protusões dessa vesícula foram realizadas (Figura 32-D e 33).

Não foi possível medir todas as protusões encontradas na vesícula devido ao pequeno tamanho do proteolipossomo e a aglomeração das protusões. As medidas realizadas estão dispostas na Tabela 4. Nessa tabela observa-se que algumas puderam ser medidas com maior precisão, como as do corte de número 11. Algumas protusões tem altura compatíveis com o estudo de Bathia et al. (2016), no entanto não são a maioria. Os valores variaram muito e dificultam a interpretação.

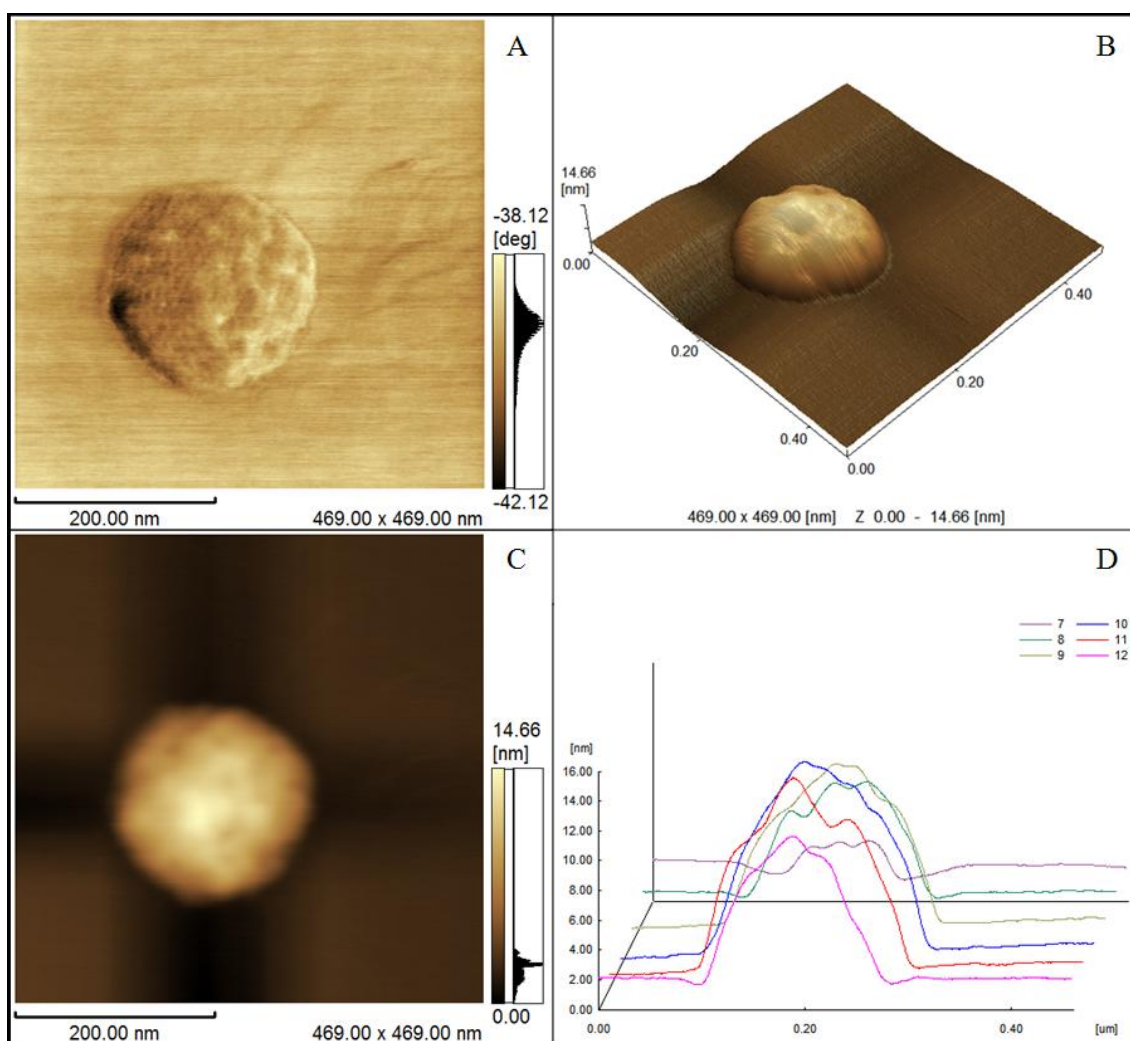


Figura 32. Imagens de AFM da amostra de proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPE-NKA. A) Imagem de fase; B) Imagem topográfica em três dimensões; C) Imagem topográfica em duas dimensões; D) Gráfico de análise de linha da imagem topográfica.

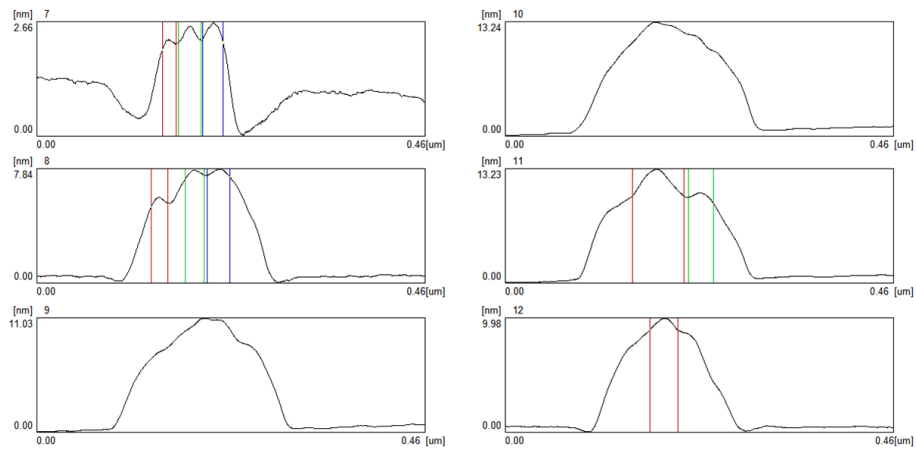


Figura 33. Perfis da análise de linha dos diâmetros das protusões do proteolipossomo de 200 nm de composição DPPC:DPPE-NKA da Figura 31-D

Tabela 4: Dimensões das protusões de um proteolipossomo de composição DPPC:DPPE-NKA de menor diâmetro.

Perfil (n ^o)	Diâmetro (um)	Altura (nm)	Perfil (n ^o)	Diâmetro (um)	Altura (nm)
7			10		
---	0,017	0,077	---	----	----
---	0,028	0,352	---	----	----
---	0,025	0,416	---	----	----
8			11		
---	0,021	0,365	---	0,062	3,318
---	0,023	0,352	---	0,031	0,516
---	0,028	0,424	---	----	
9			12		
---	----	----	---	0,034	1,052
---	----	----	---	----	
---	----	----	---	----	

7. Calorimetria diferencial de varredura e a influência do glutaraldeído nos parâmetros termodinâmicos das amostras.

A calorimetria diferencial de varredura é um método bastante eficiente para caracterizar as propriedades físicas e energéticas de modelos de membrana e outros materiais que passam por uma transição de fase (McElhaney, 1982; Demetzos, 2008). Essa técnica já foi amplamente usada no estudo de domínios de membrana, pois tem como vantagem não utilizar sondas (Epanand, 2007).

A principal transição de fase de bicamadas fosfolipídicas ocorre ao fornecer energia térmica, isso altera as interações de van der Waals das cadeias carbônicas e os lipídios passam da fase gel para a fase líquida cristalina de maior mobilidade das cadeias. As características térmicas dessa mudança de fase e citadas na descrição do método de DSC permitem estudar desde a pureza dos fosfolipídios até a influência que a adição de outros fosfolipídios ou diversas outras substâncias exercem sobre esses sistemas miméticos de biomembranas (Demetzos, 2008).

No intuito de avaliar uma possível influência do glutaraldeído na indução da formação de microdomínios nas membranas das amostras analisadas por AFM, dedicou-se esse estudo envolvendo os lipossomos de DPPC e de DPPC:DPPE. Os experimentos foram conduzidos com adição de 0 a 10% (v/v) glutaraldeído, entretanto, é importante frisar que nas amostras de AFM a proporção de glutaraldeído é em torno de 5% (v/v).

7.1 Lipossomos constituídos de DPPC

Termogramas de DPPC estão descritos na literatura (McMullen et al., 1993; Tristram-Nagle e Nagle, 2004), e também já foram estudados por nosso grupo de pesquisa (Bolean et al., 2010). Os termogramas da adição de glutaraldeído aos lipossomos de DPPC foram cedidos por Bolean (2016) para discussão e comparação com os resultados obtidos para as amostras de composição binária de DPPC e DPPE na razão molar 1:1. Como mostrado na seção 4.7 dos Métodos desse trabalho os parâmetros termodinâmicos obtidos para os lipossomos de DPPC sem glutaraldeído seguem os publicados na literatura citados acima. Existem duas transições importantes para esse fosfolípido, uma chamada pré-transição por volta de 33 °C, e outra a transição principal em 41 °C.

Na Figura 35 é possível observar nos termogramas as duas transições do DPPC para todas as concentrações de glutaraldeído estudadas. A tabela 5 apresenta os parâmetros termodinâmicos obtidos desses termogramas para os lipossomos de DPPC na concentração 1,5 mg.mL⁻¹. A entalpia de transição para essa amostra variou pouco, diferença de apenas 1,39 °C entre a maior e a menor. Além disso, o aumento e a diminuição dos valores, aparentemente, não teve relação com a adição de glutaraldeído, já que, a variação não foi gradual. Da mesma forma, a temperatura de transição (T_c) foi aleatória e pouco variou entre os extremos (1,1 °C). No entanto, é possível observar que houve um pequeno alargamento que acompanhou a crescente adição de glutaraldeído. Os valores da meia altura do pico ($\Delta T_{1/2}$) aumentaram de 2,06 até 2,67 °C, mostrando que enfraquece, mesmo que pouco, as forças de Van der Waals existentes no interior da bicamada de DPPC.

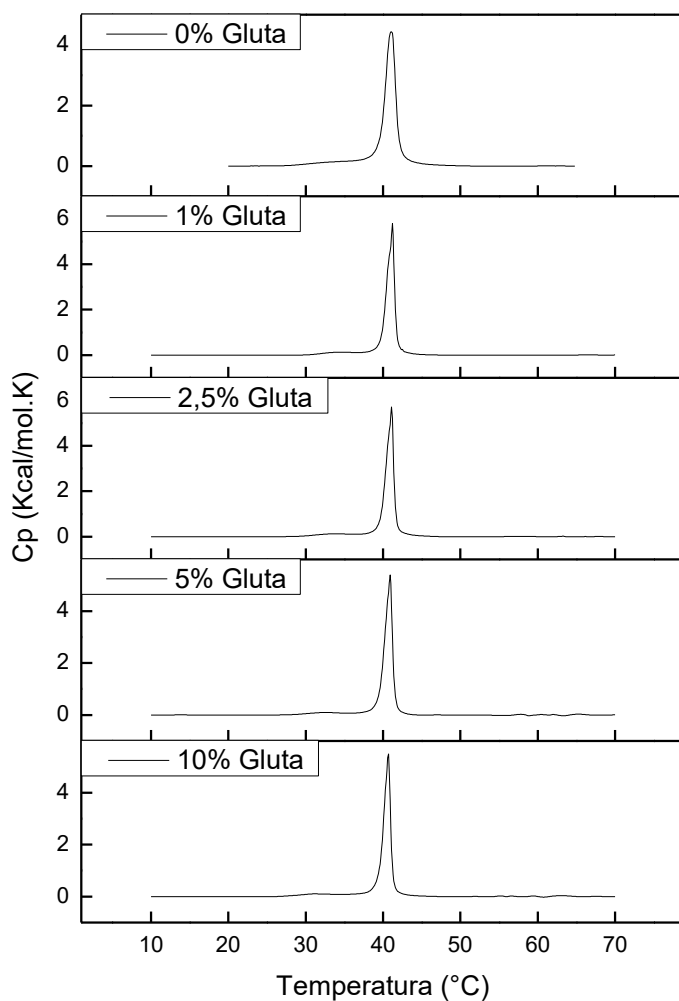


Figura 34. Termogramas de lipossomos de DPPC de concentração $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o efeito da adição de diferentes quantidades de glutaraldeído. Análise gentilmente cedida por Bolean et al. (2016).

Tabela 5: Parâmetros termodinâmicos para os lipossomos de DPPC após diferentes adições de glutaraldeído.

GLU (%)	ΔH (Kcal.mol ⁻¹)	T_c (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0	8.43	41.9	2.06
1	8.29	42.8	2.39
2.5	7.93	43.0	2.52
5	7.04	42.7	2.62
10	8.26	42.4	2.67

7.2 Lipossomos constituídos de DPPC:DPPE

Os lipossomos compostos de DPPC:DPPE também foram publicados tanto por nosso grupo de pesquisa quanto já descrito por outros autores (Blume et al., 1980; Yoneda et al., 2013; 2014). Sabe-se que DPPC e DPPE são fosfolipídios miscíveis em praticamente toda sua gama de proporções (Blume, 1980). Sendo assim, o termograma esperado para esta composição binária é de um pico mais largo localizado entre as transições principais dos dois fosfolipídios (41 °C para o DPPC e 63,6 °C para o DPPE) e o desaparecimento da pré-transição do DPPC.

A Figura 35 contém os termogramas obtidos para a amostra de DPPC:DPPE de onde foram retirados os parâmetros termodinâmicos da Tabela 6. Nos termogramas é possível observar a presença de um ombro em um pico de longa transição de fase. Então, para uma análise mais precisa dessa amostra foi necessário efetuar a deconvolução da transição para revelar a localização e característica dos picos que a compunham. A largura da meia altura desses picos deconvoluídos forneceu as informações de cooperatividade de transição de fase ($\Delta T_{1/2}$) da Tabela 7, e a soma desses valores forneceu a largura da meia altura pra o pico antes da deconvolução.

Os parâmetros da Tabela 6 mostram que com a adição de glutaraldeído houve uma sensível diminuição dos valores de entalpia e da temperatura de transição de fase. Tendência a qual não se repetiu nos dados de $\Delta T_{1/2}$, onde a variação foi pequena até a amostra de 5%, e depois, teve aumento repentino de 4,86 °C. As variações dos parâmetros termodinâmicos da amostra de 10% de glutaraldeído variaram muito em relação às outras amostras e considerando que essa concentração extrapola o dobro da concentração utilizada nas amostras de AFM, estes dados foram desconsiderados para elaboração das discussões seguintes.

Para um melhor entendimento da atuação do glutaraldeído nos lipossomos de composição binária, voltou-se a atenção para os dados da Tabela 7, onde encontram-se os parâmetros termodinâmicos para a deconvolução do termograma.

Para os dados dessa tabela os padrões de decréscimo em função do glutaraldeído se mantiveram. Embora os valores nominais de entalpia dos picos 1 sejam maiores, o decaimento tanto para os picos 1 quanto para os picos 2 foram muito próximos, 0,76 e 0,84 Kcal.mol⁻¹ respectivamente. O mesmo se observou para as temperaturas de transição, onde os deslocamentos de temperatura foram de 6,85 °C pra os picos 1 e 6,98 °C para os picos 2. Esses resultados mostram que os lipossomos perderam estabilidade

térmica conforme o glutaraldeído foi adicionado.

A $\Delta T_{1/2}$ da transição de fase fornece informações a respeito das interações de Van der Waals que ocorrem no interior da bicamada lipídica, quando a cooperatividade das cadeias hidrocarbônicas das moléculas de fosfolipídio é alta a transição de fase ocorre como picos finos bem e definidos, e quando essa cooperatividade é baixa os picos tendem a se alargar (Bolean et al., 2010). Assim quando se compara a transição de fase do DPPC, onde moléculas do mesmo fosfolipídio tem alta cooperatividade, com a transição de fase da composição binária DPPC:DPPE, onde as cadeias carbônicas dos fosfolipídios interagem menos, percebe-se que a transição se torna larga, como mencionado no início deste capítulo. A menor interação entre elas deve-se as diferentes geometrias dos fosfolipídios, cilíndrica pra o DPPC e cônica para DPPE. A segregação de fase não pode ser observada nas imagens de contraste de fase de AFM provavelmente devido às cargas totais dos dois lipídios serem parecidas. Porém, sua observação se deu nas imagens topográficas de AFM indicadas como os formatos pontiagudos das vesículas dos lipossomos de DPPC:DPPE. Sabe-se que o DPPE tem geometria cônica, a qual favorece estruturas de membrana com curvatura negativa como as do tipo tubo de fase hexagonal invertida, o que explicaria essa conformação.

As variações de $\Delta T_{1/2}$ dos picos 1 e dos picos 2 tiveram diferentes resultados. Enquanto as $\Delta T_{1/2}$ para os picos 1, referentes a composição de DPPC tiveram uma diminuição (-0,93 °C), houve um aumento para os picos 2 (+ 0,55). Isso mostra que o glutaraldeído desestabiliza as forças de Van der Waals das cadeias carbônicas para as regiões ricas em moléculas de DPPE, estabiliza a regiões ricas em DPPC, mesmo que esse efeito seja muito pequeno para ambos lipídios.

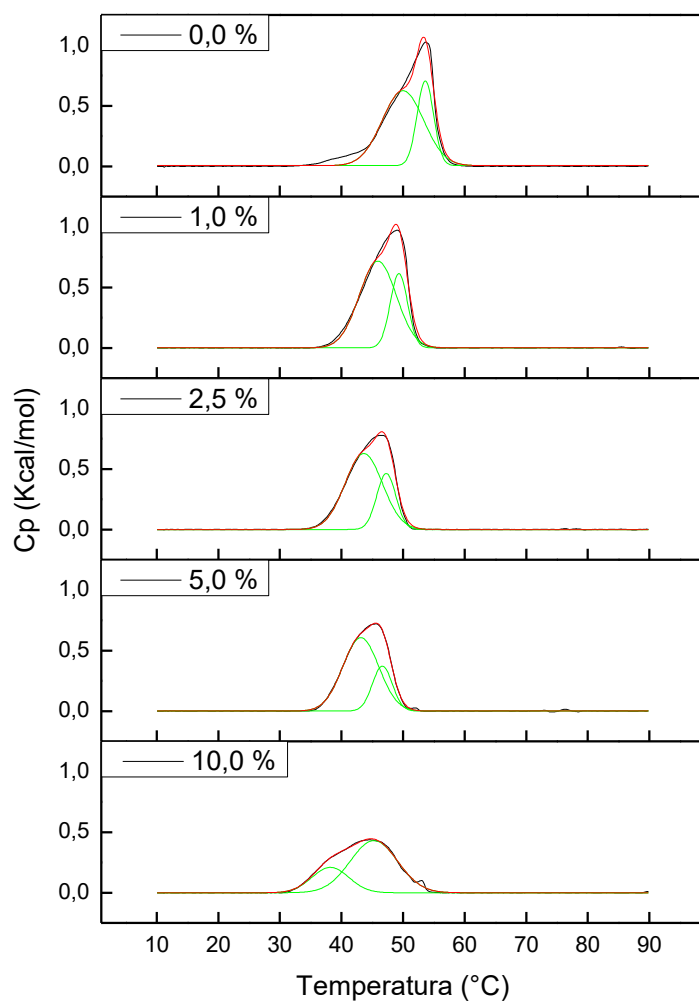


Figura 35. Termogramas e deconvoluções para a amostra de lipossomos de DPPC:DPPE de concentração 1,0 e o efeito da adição de diferentes quantidades de glutaraldeído.

Tabela 6: Parâmetros termodinâmicos para as amostra de lipossomos de DPPC:DPPE após as adições de glutaraldeído.

GLU (%)	ΔH (Kcal.mol ⁻¹)	T_c (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0,0	8,06	53,7	9,38
1,0	7,72	49,0	8,82
2,5	6,64	46,3	9,16
5,0	6,03	45,6	9,06
10,0	5,75	44,4	13,68

Tabela 7: Parâmetros referentes aos Picos 1 e 2 da deconvolução do termograma da Figura 36 para amostra de lipossomos de DPPC:DPPE após as adições de glutaraldeído.

GLU (%)	Picos 1			Picos 2		
	ΔH (Kcal.mol ⁻¹)	T _c (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH (Kcal.mol ⁻¹)	T _c (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0,0	5,21	49,9	6,72	2,34	53,6	2,67
1,0	5,39	45,9	6,01	2,17	49,3	2,82
2,5	4,77	43,6	6,07	1,79	47,3	3,09
5,0	4,45	43,1	5,85	1,50	46,6	3,22
10,0	1,57	38,2	5,99	4,15	45,3	7,70

É possível que esse pequeno efeito seja resultado de uma reação de polimerização da cabeça polar do fosfolípido DPPE, que tem um grupo etanolamina disponível, com os grupos –CHO do glutaraldeído (Kiernan, 2000). No entanto, como mostram os termogramas, a influência desta possível ligação entre o grupo amina e o aldeído é pequena para invalidar nossos estudos de AFM e talvez aconteçam em grande escala apenas nas concentrações acima de 5% de glutaraldeído, permitindo assim sua utilização neste tipo de análise.

8. Conclusão

Lipossomos de composição DPPC e DPPC:DPPE na razão molar 1:1 foram produzidos por extrusão e sonicação, respectivamente. Para as vesículas de DPPC as imagens de topografia observadas apresentaram formato oval superfície perfeitamente lisa e diâmetro médio de 151 ± 46 nm, enquanto as vesículas de composição binária apesar de lisas, a maioria tinha cantos pontiagudos e diâmetro médio de 98 ± 28 nm. As imagens de fase de ambas as composições não apresentaram qualquer indicativo de diferenças na composição química, provavelmente devido à natureza de carga neutra dos dois fosfolipídios que compõem os lipossomos.

As imagens de fase por AFM para os proteolipossomos tanto de DPPC-NKA, quanto DPPC:DPPE-NKA, revelaram resultados inéditos na literatura onde a inserção da NKA aparece como nítidas regiões de transição de fase, revelando distinta composição química quando comparadas aos lipossomos. As mudanças de fases foram diferentes entre as composições estudadas, aparecendo como manchas circulares escuras para DPPC-NKA e mais visíveis como interstícios brilhantes para composição de DPPC:DPPE-NKA. As vesículas de DPPC-NKA apresentaram diâmetro médio de 390 ± 326 nm e, nas imagens de topografia tridimensionais, protusões que variaram entre 38 e 115 nm próximas às regiões de mudanças de fase que indicaram o diâmetro dos microdomínios relacionados à proteína. Já nas imagens para DPPC:DPPE-NKA o diâmetro médio dos proteolipossomos foi de 189 ± 156 nm, e as protusões apareceram entre os interstícios, variando de 20 a 66 nm.

O estudo de DSC dos lipossomos revelou que a concentração de glutaraldeído nas condições da análise, em torno de 5% (v/v), afetam as características físico-químicas para as composições com DPPE.

Na reconstituição em ambiente lipídico a NKA e seus oligômeros podem assumir diferentes orientações com domínios proteicos externos à dupla camada lipídica. A AFM foi eficiente para confirmar a reinserção da NKA em proteolipossomos por imagens inéditas de transição de fase, que, com auxílio das imagens de topografia também permitiram medir o diâmetro dos microdomínios proteicos. Porém, diferenciar as espécies oligoméricas da NKA em ambiente lipídico permanece um desafio, que ainda poderá ser estudado empregando-se outras técnicas biofísicas.

9. Referências

- Albers, R. W. (1967) Biochemical Aspects of Active Transport. *Annual Review of Biochemistry*. 36: 727-756.
- Bagrov, A.Y.; Shapiro, J.I. and Fedorova, O.V. (2009) Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev.* 61(1):9-38.
- Barbosa, L.R.S.; Rigos, C.F.; Yoneda, J.S.; Itri, R.; Ciancaglini, P. (2010) Unraveling the Na,K-ATPase α Subunit Assembling Induced by Large Amounts of C12E8 by Means of Small-Angle X-ray Scattering, *Journal of Physical Chemistry. B* 114: 11371-11376.
- Bhatia, T.; Cornelius, F.; Brewer, J.; Bagatolli, L. A.; Simonsem, A. C.; Ipsen, J. H.; Mouritsen, O. G. (2016) Spatial distribution and activity of Na⁺/K⁺-ATPase in lipid bilayer membranes with phase boundaries. *Biochim. et Biophys Acta.* 1858: 1390-1399.
- Binning, G.; Rohrer, H.; Gerber, Ch.; Weibel, E. (1982) Surface Study by Scanning Tunneling Microscopy. *Physical Review Letters.* 49:57-61.
- Blanco, G. (2005) The Na/K-ATPase and its isozymes: what we have learned using the baculovirus expression system. *Frontiers in Bioscience.* 10:2397-2411.
- Blume, A. (1980) Themotropic behavior of Phosphatidylethanolamine-Cholesterol and Phosphatidylethanolamine-Phosphatidilcholine-Cholesterol mixtures. *Biochemistry.* 19: 4908-4913.
- Bolean, M.; Simão, A. M. S.; Favarin, B. Z.; Millán, J. L.; Ciancaglini, P. (2010) The effect of cholesterol on the reconstitution of alkaline phosphatase into liposomes. *Biophysical Chemistry.* 152: 74-79.
- Bolean, M.; Simão, A. M. S.; Favarin, B. Z.; Millán, J. L.; Ciancaglini, P. (2011) Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase. *Biophysical Chemistry.* 158: 111-118.
- Bolean, M.; Borin, I. A.; Simão, A. M. S.; Hoylaerts, M. F.; Millán, J. L.; Bagatolli, L.; Ciancaglini, P. (2016) Lipid-protein interactions detected in proteoliposomes by atomic force microscopy. em fase final de redação
- Bozzuto, G.; Molinare, A. (2015) Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine.* 10: 975-979.
- Craievich, A. F. et al. (2015) Técnicas de nanocaracterização: Princípios e aplicações. Volume 3. Coleção nanociência e nanotecnologia. Organização da Róz et al. 1ª Edição. Rio de Janeiro, Campus/Elsevier, pp. 218.
- Cohen, E.; Goldshleger, R.; Shainskaya, A.; Tal, D.M.; Ebel, C., le Maire, M.; Karlsh, S.J. (2005) Purification of Na⁺,K⁺-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid-protein interactions. *J Biol Chem.* 280(17):16610-8.
- Cornelius, F. (1991) Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of the exchange reaction performed by reconstituted Na/K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1071: 19-66.

- Cornelius, F. (2008) Cholesterol-dependent interaction of polyunsaturated phospholipids with Na,K-ATPase. *Biochemistry* 47(6):1652-1658.
- Demetzos, C. (2008) Differential scanning calorimetry (DSC): A tool to study the thermal behavior of lipids bilayers and liposomal stability. *Journal of Liposome Research*. 18: 159-173.
- Epand, R. M. (2007) Detecting the presence of membrane domains using DSC. *Biophysical Chemistry*. 126:197-200.
- Esmann, M.; Marsh, D. (2006) Lipid-protein interactions with the Na,K-ATPase. *Chem Phys Lipids*. 141(1-2):94-104.
- Fujita, M.; Mizutani, W.; Shigekawa, H.; Tokumoto, H. (2002) Patterning DNA on micron scale on mica. *Ultramicroscopy*. 91(1-4): 281-5.
- Garcia, R.; Ruben, P.. (2002) Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*. 47: 197-301.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem*. 48: 422-427.
- Haviv, H.; Habeck, M.; Kanai, R.; Toyoshima, C.; Karlisch, S.J. (2013) Neutral phospholipids stimulate Na,K-ATPase activity: a specific lipid-protein interaction. *J Biol Chem*. 288(14):10073-81.
- Heinonen, S.K. and Lathi, R.J (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analyt. Biochem*. 113: 313-317.
- Höper, R.; Gesang, T; Possart, W.; Hennemann, O.-D. (1995) Imaging elastic sample properties with an atomic force microscopy in the tapping mode. *Ultramicroscopy*. 60:17.
- Howland, R.; Benatar, L. (2000) A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy. http://www.cma.fcen.uba.ar/files/Practical_Guide.pdf . Acessado pela última vez em 28/06/2016 as 8:30 am.
- Jass, J.; Tjärnhage, T.; Puu, G. (2000) From liposomes to supported, planar bilayers structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*. 74: 3153-3163.
- Jorgensen, P.L.; Andersen, J.P.; (1986) Thermoinactivation and aggregation of alpha beta a units in soluble and membrane bound (Na,K)-ATPase. *Biochemistry*. 25(10): 2889-97.
- 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: 201-207.
- Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem*. 71: 511-535.
- Kiernan, J. A. (2000) Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*. 1: 8-12.
- Kirat, K. El; Burton, I.; Dupres, V.; Dufrene, Y. F. (2005) Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *Journal of Microscopy*. 218: 199-207.

- Kumar, S.; Chaudhury, K.; Sen, P. Guha, S. K. (2005) Atomic force microscopy: a powerful tool for high-resolution imaging of spermatozoa. *Journal of Nanobiotechnology*. 3:9.
- Laursen, M.; Yatime, L.; Nissen, P.; Fedosova, N.U. (2013) Crystal structure of the high-affinity Na⁺,K⁺-ATPase-ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(27):10958-63.
- Lingrel J.B., The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase, *Annu Rev Physiol*. 72 (2010) 395-412.
- Magonov, S. N.; Elings, V.; Whangbo, M.-H. (1997) Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. *Surface Science*. 375: L385-391.
- McElhaney, R. N. (1982) The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 30: 229-259.
- McMullen, T. P.; Lewis, R. N.; McElhaney, R. N. (1993) Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochemistry*. 32(2): 516-22.
- Morth, J.P.; Pedersen, B.P.; Toustrup-Jensen, M.S.; Sørensen, T.L.; Petersen, J.; Andersen, J.P.; Vilsen, B.; Nissen, P. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450(7172):1043-9.
- Neves, B. R. A.; Vilela, J. M. C.; Andrade, M. S. (1998) Scanning Probe Microscopy: an introduction. *Cerâmica*. Vol.44.n 290.
- Ogawa, H.; Shinoda, T.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump (N⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *PNAS*. 106: 13742-13747.
- Pang, G. K. H.; Baba-Kishi, K. Z.; Patel, A. (1999) Topographic and phase-contrast imaging in atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*. 81: 35-40.
- Post, R. L.; Kume, S.; Tobin, T.; Orcutt, B.; Sen, A. K.(1969) Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. *J. G. Physiol*. 54: 306-326.
- Post, R. L.; Hegyvary, C.; Kume, S. (1972) Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion. *The Journal of Biological Chemistry*, 247: 6530-6540.
- Radmacher, M.; Cleveland, J. P.; Fritz, M.; Hansma, H. G.; Hansma, P. K.(1994) Mapping interaction forces with atomic force microscope. *Biophysical Journal*. 66: 2159-2165.
- Radmacher, M.; Fritz, M.; Kacher, C. M.; Cleveland, J. P.; Hansma, P. K. (1996) Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophysical Journal*. 70: 556-567.
- Rigaud, J-L.; Pitard, B.; Levy, D. (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et biophysica Acta*. 1231: 223-246.
- Rigos, C.F; Nobre, T.M; Zanicquelli, M.E.D; Ward, R.J; Ciancaglini, P. (2008) The association of Na,K-ATPase subunits by circular dichroism, surface tension and dilatational elasticity. *J. Colloid Interface Sci*. 325: 478-484.

- Rigos, C.F.; de Lima Santos H.; Ward, R.J.; Ciancaglini, P. (2006) Lipid bilayer stabilization of the Na,K-ATPase reconstituted in DPPC/DPPE liposomes. *Cell Biochem Biophys.* 44(3):438-45.
- Ruozi, B.; Tosi, G.; Forni, F.; Fresta, M.; Vandelli, M. A. (2005) Atomic force microscopy and photon-correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes.
- Ruozi, B.; Tosi, G.; Leo, E.; Vandelli, M. A. (2007) Application of atomic force microscopy to characterize drug and gene carriers. *Talanta.* 73: 12-22.
- Ruozi, B.; Tosi, G.; Tonelli, M.; Bondioli, L.; Mucci, A.; Forni, F.; Vandelli, M. A. (2009) AFM phase imaging of soft-hydrated samples: A versatile tool to complete the chemical-physical study of liposomes. *Journal of Liposome Research.* 19(1): 59-67.
- Santos, N.C.; Castanho M.A. (1996) Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus. *Biophys J.* 71(3):1641-50.
- Santos, H.L.; Ciancaglini, P. (2000) A practical approach to the choice of a suitable detergent and optimal conditions to solubilize a membrane protein. *Biochem. Educ.* 28: 178-182.
- Santos, H.L.; Lamas, R.P. and Ciancaglini, P. (2002) Solubilization of Na,K-ATPase from rabbit kidney outer medulla using only C12E8. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 277-288.
- Santos, H.L.; Lopes, M.L.; Maggio, B. and 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, C.F.; Ciancaglini, P. (2006) Kinetics behaviors of Na,K-ATPase: comparison of solubilized and DPPC:DPPE-liposome reconstituted enzyme. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 142(3-4):309-16.
- Skou, J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23 394-401.
- Shinoda, T.; Ogawa, H.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature.* 459(7245):446-450.
- Silvius, J. R. (1992) Solubilization and Functional Reconstitution of Biomembrane Components. *Annu. Rev. Diaphys. Diamal. Struct.* 21:323-48.
- Siow, L.F.; Rades, T.; Lim, M. H. (2007) Effect of intra/extraliposomal distribution of sodium chloride on the stability of large unilamellar vesicles. *Cryoletters.* 28(6): 429-444.
- Suetsugo, S.; Kurisu, S.; Takenawa, T. (2014) Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiological Reviews.* 94: 1219-1248.
- Taniguchi, K; Kaya, S.; Mardh, S. (2001) The oligomeric nature of Na/K transport ATPase. *Journal of Biochemistry.* 129(3): 335-342.
- Targosz-Korecka, M.; Brzezinka, G.D.; Danilkiewickz, J.; Rajfur, Z.; Szymonski, M. (2015) Glutaraldehyde fixation preserves the trend of elasticity alterations for endothelial cells exposed to TNF- α , Cytoskeleton.
- Tejera-Garcia, R.; Ranjan, S.; Zamotin, V.; Sood, R.; Kinnunen, K. J. (2011) Making unilamellar liposomes using focused ultrasound. *Langmuir.* 27: 10088-10097.
- Toyoshima, C.; Kanai, R.; Cornelius, F. (2011) First crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase: new light on the oldest ion pump. *Structure,* 19(12):1732-1738.

- Tristan-Nagle, S.; Nagle, J. F.; (2004) Lipid bilayers: thermodynamics, structure, fluctuations and interactions. *Chemical Physics of Lipids*. 127: 3-14.
- Vinckier, A.; Semenza, G. (1998) Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 430: 12-16.
- Yatime, L.; Laursen, M.; Morth, J.P.; Esmann, M.; Nissen, P.; Fedosova, N.U. (2011) Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase. *J Struct Biol*. 174(2):296-306.
- Yoneda, J.S.; Rigos, C.F and Ciancaglini P. (2013), Addition of subunit γ , ions K⁺, and lipid restores the thermal stability of solubilized Na,K-ATPase *Arch. Biochem. Biophys.* 530(2):93-100.
- Yoneda, J. S.; Rigos, C. F.; Lourenço, T. F. A.; Sebinelli, H. G.; Ciancaglini, P. (2014) Na,K-ATPase reconstituted in ternary liposome: The presence of cholesterol affects protein activity and thermal stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 564: 136-141.
- Yoneda, J. S.; Scanavachi, G.; Sebinelli, H. G.; Borges, J. C.; Barbosa, L. R. S.; Ciancaglini, P.; Itri, R. (2016) Multimeric Species in equilibrium in detergent solubilized Na, K-ATPase. *Int. Journal of Biological Macromolecules*. 89:238-245.
- Yu, M.; Ivanisevic, A. (2004) Encapsulated cells, an atomic force microscopy study. *Biomaterials*. 25: 3655-3662.
- Zhong, Q.; Inniss, D.; Kjoller, K.; Elings, V. B. (1993) Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science Letters*. 290: L688-L692.