

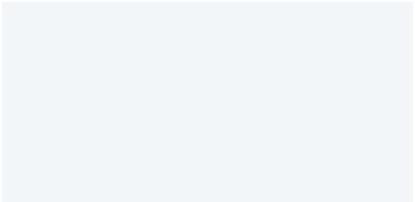


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

DENISE CAVALCANTE HISSA

**PROTEÍNA SURFACTANTE DE *LEPTODACTYLUS VASTUS* A. LUTZ 1930: DO SEU
LOCAL DE PRODUÇÃO A SUA ESTRUTURA 3D**

**FORTALEZA
2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

Denise Cavalcante Hissa

PROTEÍNA SURFACTANTE DO NINHO DE ESPUMA DA RÃ *LEPTODACTYLUS VASTUS*, A. LUTZ 1930: DO SEU
DE PRODUÇÃO A SUA ESTRUTURA 3D

Trabalho apresentado no Doutorado em
Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do
Ceará (UFCE) - Fortaleza, 2013.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

H579p Hissa, Denise Cavalcante.
Proteína surfactante do ninho de espuma da rã *Leptodactylus vastus*, A. LUTZ 1930: do seu
De produção a sua estrutura 3D. / Denise Cavalcante Hissa. – 2013.
138f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.
Orientação: Profª. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

1. Ranaspumina. 2. Cristalização. 3. Anfíbios. Título.

CDD

EXEMPLAR
1001

DENISE CAVALCANTE HISSA

PROTEÍNA SURFACTANTE DO NINHO DE ESPUMA DA RÃ *LEPTODACTYLUS VASTUS* A. LUTZ 1930: DO SEU LOCAL DE PRODUÇÃO À SUA ESTRUTURA 3D

Tese apresentada ao Doutorado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (RENORBIO - UFC), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 03/05/2013

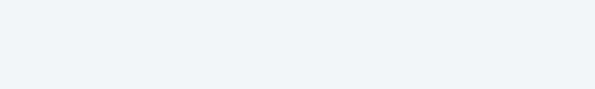
BANCA EXAMINADORA



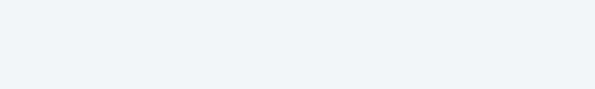
Prof. Dr. Vânia Maria Maciel Melo – Orientadora
Depto. de Biologia- Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Francisco de Assis Paiva Campos
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal do Ceará



Prof. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano
Depto. de Engenharia de Pesca - Universidade Federal do Ceará



Dr. Gustavo Arruda Bezerra
Max F. Perutz Laboratories – University of Vienna, Áustria

AGRADECIMENTOS

Acredito que a gratidão seja uma virtude. Desse modo, gostaria de aproveitar a oportunidade para expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de alguma maneira estiveram envolvidas durante o desenvolvimento desta tese. Quero deixar claro que todos os feitos presentes aqui não seriam possíveis sem a valiosa contribuição de cada um de vocês.

Deixo registrado minhas sinceras palavras de gratidão à **Profa. Vânia Maria Maciel Melo**, que se envolveu além dos restritos deveres de orientadora e professora em meu crescimento científico, atuando em minha formação desde 2004. Muito obrigada pelos ensinamentos passados, tenho uma grande admiração pela senhora! "*Um bom chefe faz com que homens comuns façam coisas incomuns*" (Peter Drucker).

Este estudo contou com a colaboração do **Prof. Dr. Karl Gruber**, do Grupo de Biologia Estrutural da Universidade de Graz, Áustria. Gostaria de agradecer não somente a oportunidade para realização dos estudos cristalográficos, permitindo meu aprendizado em um novo campo da ciência, como também a oportunidade de estar em contato com uma nova cultura, nova língua e nova realidade. Também gostaria de agradecer aos Strubis **Srinivasan Rengachari, Roland Viertlmayr, Tea Pavkov, Domen Zafred, Prashant Kumar** e **Andrzej Lyskowski** pelo compartilhamento de conhecimento. Principalmente o **Dr. Gustavo Bezerra**, que além de ser um grande amigo e participar da banca de avaliação desta tese teve uma grande atuação neste estudo, participando como mentor de todos os passos realizados no exterior.

O Laboratório de Espectrometria de Massa na Universidade de Medicina de Graz foi de grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho. **Profa. Ruth Birner-Grünberger** orientou os estudos de espectrometria de massa no exterior e **Britta Obrist** e **Stefan Spörk** ajudaram na utilização do MALDI-TOF/TOF e nano-LC.

Outras pessoas indispensáveis foram **Profa. Isabel Usón**, com ajuda no problema das fases, e **Prof. Kay Diederichs** pelos esforços com WSMR.

Ao LEM, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília nas pessoas de **Prof. Carlos Bloch, Maura Prates** em especial **Luciano Paulino**, que se tornou um orientador para meu aprendizado em Espectrometria de Massa.

Aos **Profs. Márcio Ramos e Cléverson Diniz**, do Departamento de Bioquímica da UFC, pela ajuda nas eletroforeses bidimensionais.

À **Profa. Leila Beltramini e José Luiz de Souza Lopes** do Instituto de Biofísica de São Carlos – USP, que ajudaram na obtenção de dados de Dicroísmo Circular.

Um agradecimento especial ao **Prof. Paulo Cascon** por despertar em mim o interesse pelos ninhos de espuma de anfíbios.

Ao **Prof. Hélio Costa**, pelas discussões em relação a RT-PCR e **Prof. Thalles Grangeiro** pela disponibilização de reagentes para realização de RT-PCR.

Aos professores que participaram da banca de qualificação deste trabalho: **Prof. José Tadeu Abreu de Oliveira, Prof. Francisco de Assis Paiva Campos e Prof. Alejandro Ayala**, agradeço as correções e valiosas sugestões.

Aos professores que aceitaram compor a banca de defesa da tese: **Prof. Francisco Campos, Profa. Ilka Vasconcelos, Prof. Celso Nagano e Dr. Gustavo Bezerra**, os meus sinceros agradecimentos.

Aos Biólogos **Igor Joventino, Paulo Thieres, Daniel Cassiano, Lucas Brito e Vitor Reis** pela ajuda na coleta em campo dos materiais biológicos usados neste trabalho.

A todos os atuais e ex- componentes da família **Lembiotech**, pelo companheirismo e união: Samantha, Júlio, Walderly, Geórgia, Lidianne, Vanessa N., Alysson, Hortência, Tallita, Leonardo, Luiz, Jean, Camila, Melissa, Sasha, Raphaela, Lyanderson, Gustavo Amaral, Fernanda Paes, Natália, Kizeane, Laís, Elis, Tati, Lara A., Rivalda e Seu Valdenor, principalmente Bárbara, Luína e Vanessa C. que cuidaram das minhas amostras enquanto eu estava longe. Adoro fazer parte dessa “grande família”!

Aos mais que queridos **amigos de faculdade** André A., Alysson L., Geórgia B., Paulo Thieres, Lara B., Júlio X., Natasha W. e Lia A. do **colégio**, Marina L., Maria Cristina, Natália A. e Natália M., à **brasileirada de Graz**, Carol, Fernando, Luciana V., Lígia, Luciana L., Marta, Cacau e Luiza.

Especialmente grata a **Vitor Reis**, que me apoiou bastante durante grande parte deste trabalho. “*A vida é a arte do encontro, embora haja tanto desencontro pela vida*” (Vinícius de Moraes), sou feliz por termos nos “encontrado”!

Também gostaria de dedicar este espaço aos meus familiares, principalmente minha **avó Simone**, que estiveram presentes em minha formação pessoal.

Por último, mas não menos importante, à minha família, **pai, mãe e irmãs**, que me apoiaram quando mais precisei, que vestiram a camisa e não me deixaram desistir. Estando presentes, mesmo quando fisicamente ausentes, e me fizeram entender o verdadeiro significado da palavra saudade! Amo vocês!

AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Este trabalho obteve suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Bolsa de Doutorado de Demanda Social) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior, Processo N. 201633/2010-8).

The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not "Eureka!" but "That's funny. . . ."

Isaac Asimov (1920-1992)

RESUMO

Um curioso fenômeno de algumas espécies de anfíbios é a postura de seus ovos em ninhos de espuma, o que lhes garante um modo reprodutivo terrestre ou parcialmente terrestre. Uma proteína surfactante, Lv-ranaspumina (Lv-RSN-1), de 23,5 kDa foi isolada do ninho de espuma da rã *Leptodactylus vastus*. A sequência N-terminal parcial (25 resíduos) dessa proteína revelou-se distinta de qualquer proteína depositada nos bancos de dados. Devido ao fato de surfactantes serem de grande interesse nos diversos setores da indústria moderna e da pouca informação existente sobre a proteína Lv-RSN-1, o presente estudo teve como objetivo avançar na caracterização biológica, bioquímica e biofísica da proteína Lv-RSN-1, abrangendo desde o local de sua síntese na rã até sua estrutura 3D. O estudo teve início com a pesquisa da proteína em órgãos do sistema reprodutor. As análises foram feitas por *Western blotting* usando anticorpo policlonal anti-Lv-RSN-1. A abundância relativa da Lv-RSN-1 no ninho de espuma foi estimada por eletroforese 2D. Lv-RSN-1 foi purificada de sua fonte natural por cromatografias de troca iônica, RP-HPLC e exclusão molecular, submetida à análise de sua estrutura secundária, por dicroísmo circular, e propriedades tensoativas, por redução da tensão superficial da água e emulsificação de água em querosene. Estudos de espectrometria de massa foram realizados para a análise das isoformas, presença de pontes dissulfeto e modificações pós-traducionais, bem como sequenciamento *de novo*. As propriedades tensoativas da proteína foram ainda relacionadas à sua conformação e resistência térmica. A cristalização foi realizada pela técnica de difusão de vapor em gota-sentada usando o *screen* PEG/Ion. Dois cristais foram utilizados para elucidação da estrutura 3D, um monoclinico de grupo espacial $P2_1$, resolução a 1,6 Å e um ortorrômbico de grupo espacial $P2_12_12_1$, resolução 1,75 Å, com as seguintes dimensões de célula unitária $a = 51,87$ Å $b = 25,85$ Å $c = 66,08$ Å e $a = 36,66$ Å $b = 52,90$ Å $c = 102,72$ Å, respectivamente. As fases foram obtidas por *ab initio phasing* utilizando o programa Arcimboldo. Após refinamento, os valores de R_{work} e R_{free} foram 18,70% e 23,70% para o cristal monoclinico, e 20,10% e 25,30% para o cristal ortorrômbico. Os resultados da pesquisa da Lv-RSN-1 nos órgãos da rã apontaram o oviduto como o local primário de sua síntese. O ninho de espuma apresentou uma grande diversidade de proteínas, com massa variando de 7 – 103 kDa e pI variando entre 3 - 10. Lv-RSN-1 é facilmente reconhecida no gel 2D, onde se sobressai como uma forte banda, compreendendo no mínimo 3 isoformas. Lv-RSN-1 é uma proteína de 217 resíduos de aminoácidos, pI~5, possui 4 pontes dissulfeto e nenhuma N-glicosilação ou fosforilação. Sua estrutura é constituída predominantemente (85%) por 13 feixes de α -hélices e duas folhas- β anti-paralelas. Lv-RSN-1 possui uma superfície rica em resíduos hidrofílicos, embora apresente uma cavidade lipofílica na região das folhas- β anti-paralelas. Sua conformação secundária é bastante termoestável, mantendo-se inalterada na faixa de 25 °C a 95 °C. Possui uma intrínseca atividade tensoativa, sendo capaz de reduzir a tensão superficial da água de 73 mN/m para 61 mN/m na concentração de 15 μ g/ml e de promover a emulsificação estável de uma mistura água-querosene na concentração de 100 μ g/ml. Lv-RSN-1 compartilha 40% de similaridade da sequência de aminoácidos com a ranaspumina da rã *L. fuscus*. Lv-RSN-1 também mostrou similaridade estrutural com ranasmurfina de *Polypedates leucomystax* (*Z-score* de 4,9), levando a suposição que estas duas proteínas compartilham um gene ancestral comum.

Palavras-chave: Ninho de espuma, *Leptodactylus vastus*, ranaspumina, proteína surfactante, cristalização

ABSTRACT

An interesting phenomenon among some amphibian species is the egg deposition in foam nests, which allows a terrestrial or partially terrestrial reproduction mode. A surfactant protein, Lv-ranaspumin (Lv-RSN-1), with 23.5 kDa was isolated from the foam nest of the frog *Leptodactylus vastus*. Its partial amino acid sequence (25 residues) was distinct from any protein sequence reported to date. Due to the fact that surfactants are of great interest in many sectors of modern industry and that little information about Lv-RSN-1 is available, the present study aimed to provide advances on the protein characterization regarding its biological role, biochemical composition and biophysical data, covering from the site where Lv-RSN-1 is synthesized to the elucidation of its crystal structure. The site of synthesis analysis was performed by western blotting using polyclonal anti-Lv-ranaspumin antibodies. The relative abundance of Lv-RSN-1 in the foam nest was estimated by 2D electrophoresis. Lv-RSN-1 was purified from its natural source by ion-exchange, RP-HPLC and size-exclusion chromatography, and the purified Lv-RSN-1 was submitted to circular dichroism and tested for surface-active properties, such as the reduction in the surface tension of water and emulsifying assay of water in kerosene. Mass spectrometric studies were conducted for the analysis of the isoforms, disulfide bonds and post-translational modifications, as well as for *de novo* sequencing. Crystallization was performed by vapor diffusion sitting-drop using PEG/Ion screen. Two crystals were used for elucidation of its 3D structure, a monoclinic with space group $P2_1$, 1.6 Å resolution, and an orthorhombic $P2_12_12_1$, 1.75 Å resolution. The unit cell dimensions were $a = 51.87$ Å $b = 25.85$ Å $c = 66.08$ Å and $a = 36.66$ Å $b = 52.90$ Å $c = 102.72$ Å, respectively. Phases were solved by *ab initio* phasing using the program Arcimboldo. After the steps of refinement the R_{work} and R_{free} values were 18.70% and 23.70% for the monoclinic, and 20.10% and 25.30% for the orthorhombic structure. The obtained results pointed the oviduct as the primary site of Lv-RSN-1 synthesis. The foam nest presented a variety of proteins in the 2D gels, with molecular masses ranging from 7 – 103 kDa and pI values ranging from 3 to 10. Lv-RSN-1 was easily recognized as the main spot in the 2D gel, comprising at least 3 isoforms. Lv-RSN-1 is a protein of 217 amino acid residues, pI ~5, with 4 disulfides bonds and no N-glycosylation or phosphorylation. Its structure is mainly (~85%) composed of a bundle of 13 α -helices and of two small anti-parallel β -sheets. Lv-RSN-1 has a surface rich in hydrophilic residues, however it presents a lipophilic cavity in the region of the anti-parallel β -sheets. Its secondary conformation is highly thermo stable, showing no conformational alteration in the range from 25 °C to 95 °C. It was verified an intrinsic surface active property, reducing surface tension of water from 73 mN/m to 61 mN/m at concentration of 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and emulsifying a mixture of water and kerosene at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The protein Lv-RSN-1 shares 40% similarity with the amino acid sequence of the ranaspumin from the frog *L. fuscus*. Lv-RSN-1 also showed a structural similarity with another foam nest protein ranasmurfin from *Polypedates leucomystax* with a Z-score of 4.9, leading to the assumption that both proteins share a common ancestor.

Keywords: Foam nest, *Leptodactylus vastus*, ranaspumin, surfactant protein, crystallization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Esquema do ciclo reprodutivo típico de anuros. Fonte: http://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/Ensino_Fundamental/Origami/Documentos/Anfibios.htm..... 24
- Figura 2. Representação esquemática de passos sequenciais dos modos reprodutivos do gênero *Leptodactylus*, saindo de um modo aquático para terrestre. 1- Ovos em ninhos de espuma na superfície da água, girinos em águas lênticas, 2- ovos em ninhos de espuma em depressões próximas da água, girinos em águas lênticas, 3- ovos em ninhos de espuma em bacias escavadas pelos machos, girinos em águas lênticas, 4- ovos em ninhos de espuma em câmaras subterrâneas construídas pelos machos, girinos em águas lênticas, 5- ovos em ninhos de espuma em tocas, desenvolvimento larval no próprio ninho de espuma (Prado *et al.*, 2002)..... 25
- Figura 3. A) Ninho de espuma pelo peixe da espécie *Hoplosternum littorale* (Andrade e Abe, 1997); B) Espuma biológica produzida pela espécie de tunicado marinho *Pyura praeputialis* na Baía de Antofagasta, Chile (Castilla *et al.*, 2007); C) Ninho de espuma de anfíbio da espécie *Engystomops pustulosus* (Fonte: Bubble-wrapped frogs, Chemistry World, Jun/2009, www.chemistryworld.org)..... 26
- Figura 4. Ninhos de espuma de rãs e suas respectivas espécies produtoras. (A) ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* (B); (C) ninho de *Engystomops pustulosus* (D); (E) ninho de *Polypedates leucomystax* (F). Fontes: Imagens A e B foram cedidas pelo Dr. Paulo Cascon; Imagens C, D, e F (<http://amphibiaweb.org>); Imagem E (www.chemistryworld.org). 27
- Figura 5. Mapa de distribuição de *L. labyrinthicus* (círculos), *L. turimiquensis* (triângulos) e *L. vastus* (quadrados). Pontos de interrogação indicam indivíduos cujas espécies ainda não foram identificadas. Esquema segundo Heyer (2005)..... 29
- Figura 6. Representação esquemática da orientação das moléculas de surfactantes (Tadros, 2009). 31
- Figura 7. Desenho esquemático mostrando a formação de micelas de moléculas anfipáticas (Viades-Trejo *et al.*, 2012)..... 32
- Figura 8. A) Representação de moléculas de surfactantes mostrando a impossibilidade de formação de micelas a uma baixa concentração da molécula, B) Micela composta por 50 monômeros obtido a partir de dados de simulação por dinâmica molecular em que a concentração do surfactante está acima de sua Concentração Micelar Crítica (Garavito e Ferguson-Miller, 2001). 32
- Figura 9. Desenho esquemático dos aparelhos excretor e reprodutor (aparelho urogenital) de anuros em vista ventral (Pough *et al.*, 2001). 35

- Figura 10. Experimento da gota pendente. A) A gota é iluminada e acompanhada por câmera CCD. B) Imagem da gota formada digitalizada pelo programa SCA20 para cálculo da tensão superficial usando a equação de Laplace. 46
- Figura 11. Sistema urogenital da fêmea de *Leptodactylus vastus*, onde *gld oviduct* é uma abreviação para a região glandular do oviduto, também chamada região posterior do oviduto e *early oviduct*, equivale à região anterior do oviduto, locais onde Lv-ranaspumina foi detectada. 47
- Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE; gel 12,5%) do ninho de espuma e extratos brutos de órgãos reprodutores de *L. vastus*, aplicados 10 µg de proteínas totais/raia A) MW – Marcadores de massa molecular. 1- Fluido da espuma; 2- ovário, 3- região posterior (glandular) do oviduto, 4- região anterior do oviduto, 5- testículo, 6- cloaca da fêmea e 7- cloaca do macho. B) *Western blotting* das proteínas presentes no gel da Figura A reconhecidas pelo anticorpo anti-Lv-ranaspumina. A seta indica a proteína Lv-ranaspumina. 48
- Figura 13. Eletroforese bidimensional (Géis 2D-SDS-PAGE 12,5%) das proteínas do fluido do ninho de espuma de *L. vastus* corados com azul brilhante de Coomassie G-250. Isofocalização dos géis na faixa de pH de 3,0 – 10,0 (A) e 4,0 – 7,0 (B). Foram aplicados 370 µg de proteínas em A e 92 µg de proteínas em B. As bandas a, b e c foram excisadas e analisadas por espectrometria de massa. 49
- Figura 14. Perfis dos espectros gerados a partir da análise por MALDI-TOF (modo refletido) dos três *spots* (a b, c) excisados dos géis de 2D correspondendo à Lv-ranaspumina e digeridos com tripsina. 50
- Figura 15. Purificação da proteína Lv-ranaspumina por RP-HPLC, coluna Source 15RPC ST 4.6/100 (GE Healthcare). A proteína foi eluída com acetonitrila 78% contendo TFA 0,1%. 51
- Figura 16. Eletroforese em gel desnaturante Tricina-SDS-PAGE revelado com nitrato de prata mostrando as etapas de purificação da proteína Lv-ranaspumina. MW – Marcadores de massa molecular (Sigma), 1- Amostra bruta do ninho de espuma da rã Lv-ranaspumina (3 µg), 2- Proteínas do ninho de espuma retidas na cromatografia com DEAE-celulose (3 µg) e 3- Lv-ranaspumina purificada por RP-HPLC (3 µg). 52
- Figura 17. A) Cromatograma da Lv-ranaspumina em coluna Superdex 200 26/60 (linha contínua) e padrões de massas moleculares (linha descontínua). B) Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS em condições redutoras: 1- Marcadores de massa molecular, 2- Pico majoritário da cromatografia em Superdex 200 (5 µg), 3- Fluido total do ninho de espuma (5 µg), 4- Proteínas de baixa massa molecular separadas na coluna de Superdex 200 (5 µg) e 5- Proteínas de alta massa molecular separadas na coluna de Superdex 200 (5 µg). 53
- Figura 18. Espectrometria de massa da proteína Lv-ranaspumina nativa (A) e da proteína após redução com ditiotreitól e alquilação com iodoacetamida (B),

- mostrando mudança de massa devido à incorporação de grupos carbamidometilas nos resíduos de cisteínas..... 54
- Figura 19. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE 12,5%) da proteína Lv-ranaspumina nativa e após tratamento para desfosforilação e desglicosilação. MW- Marcadores de massa molecular, 1- Lv-ranaspumina nativa, 2- Lv-ranaspumina após tratamento de desglicosilação, 3- Lv-ranaspumina após tratamento de desfosforilação, 4- Fetuína desglicosilada, 5- Fetuína nativa, 6- Fosfitina nativa e 7- Fosfitina desfosforilada..... 55
- Figura 20. Espectros de massa da proteína Lv-ranaspumina após tratamentos enzimáticos de desfosforilação e desglicosilação, comparados com a da proteína nativa..... 56
- Figura 21. Espectro de dicroísmo circular da proteína Lv-ranaspumina nativa em água (0,2 mg/mL) (linha contínua) e desnaturada por carbamidometilação (linha descontínua). 57
- Figura 22. Espectros de dicroísmo circular da proteína Lv-ranaspumina submetida a diferentes tratamentos térmicos..... 58
- Figura 23. *ThermoScan* da proteína Lv-ranaspumina monitorado no comprimento de onda 208 nm entre a faixa de temperatura de 20 a 95 °C..... 58
- Figura 24. Atividade emulsificante da Lv-ranaspumina (0,1 mg/mL) em condições nativa (1) e após desnaturação por tratamento com solução de uréia/tiourea e redução das pontes dissulfeto por reação de carbamidometilação dos resíduos de cisteínas (2)..... 59
- Figura 25. Atividade de redução da tensão superficial da água das proteínas Lisozima (◆), Albumina sérica bovina (✕) e Lv-ranaspumina (●)..... 60
- Figura 26. Principais fragmentos obtidos pelo sequenciamento manual *de novo* (MALDI-TOF/TOF) construindo a sequência final de Lv-RSN-1. Lv-RSN-1 foi digerida em gel com diferentes enzimas e os peptídeos gerados foram fracionados com nanoLC acoplado a um MALDI *spotter*. Em preto, a sequência final de aminoácidos da Lv-RSN-1 obtida pela sobreposição dos fragmentos com ajuda do mapa de densidade eletrônica. As sequências coloridas são de alguns dos peptídeos sequenciados *de novo* obtidos pela digestão com tripsina em vermelho; Glu-C em verde; quimotripsina em cinza; Lys-C em magenta; e Asp-N em azul. Em laranja estão os aminoácidos que não discordaram entre o sequenciamento *de novo* e o mapa de densidade eletrônica. As setas indicam os 6 fragmentos finais após sobreposição dos fragmentos obtidos..... 63
- Figura 27. Espalhamento dinâmico da luz da proteína Lv-RSN-1(1 mg/ml) em água mostrando uma solução homogênea com apenas uma espécie de molécula.64
- Figura 28. Padrão de difração do cristal de Lv-RSN-1 crescido após três semanas na condição N. 8 do *kit* de cristalização PEG/Ion..... 65

- Figura 29. Cristais de Lv-RSN-1 obtidos sob diferentes condições de cristalização..... 66
- Figura 30. Espectro de MALDI-TOF obtido em modo linear positivo de um cristal de Lv-RSN-1. Moléculas mono, duplamente e triplamente carregadas positivamente estão indicadas. O quadro mostra uma vista expandida do pico correspondente à proteína monocarregada..... 67
- Figura 31. Espectrometria de massa da proteínaLv-RSN-1 após 2 h de reação com HgCl_2 , K_2PtCl_4 , $\text{KAu}(\text{CN})_2$ e $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Os picos residuais da proteína nativa estão marcados em cada gráfico e os picos derivados da incorporação do átomo estão marcados em ordem numérica..... 68
- Figura 32. Mapa de densidade eletrônica para algumas regiões da proteína Lv-RSN-1 obtido após resolução das fases do conjunto de dados equivalente ao cristal monoclinico. A alta resolução da estrutura permitiu a formação de um mapa robusto para a maior parte da proteína, sendo possível deduzir os aminoácidos com precisão para construção manual do esqueleto de aminoácidos com base nos fragmentos obtidos com o sequenciamento *de novo*. A) hélice formada pelos resíduos 134 – 144, LVKFLKDLKYK; B) hélice formada pelos resíduos 49 – 62, QDFKELLERVLQKA; C) *harpin* formado pelos resíduos 182 – 191, IFVKNIGDSF e D) alça formada pelos resíduos 77 – 89, GLEELLGSIGVST. Em A, B e C observa-se um mapa de densidade eletrônica bem definido, enquanto que em D, por ser uma região flexível, observa-se a ausência do mapa para alguns resíduos. 70
- Figura 33. Construção manual das sequencias obtidas por sequenciamento *de novo* no mapa de densidade eletrônica. Em A) observa-se uma lisina que após alguns passos de refinamento mostrou-se ser de fato uma tirosina (B)..... 71
- Figura 34. Gráficos de Ramachandran (Lovell *et al.*, 2003) das estruturas resolvidas a partir dos cristais de Lv-RSN-1 obtidos neste estudo. A) refere-se ao cristal monoclinico e B) refere-se ao cristal ortorrômbico..... 72
- Figura 35. Estrutura geral da Lv-RSN-1. A) Representação em *cartoon*; pontes dissulfeto em ciano; letras N e C representam as extremidades N e C-terminais da proteína. B) Figura A após rotação de 65° ao longo do eixo X. C) Representação em tubo da Lv-RSN-1 na mesma orientação de (A) flexibilidade com base no fator B de cada aminoácido individual. As figuras foram geradas com o programa PyMol (DeLano Scientific, em <http://www.pymol.org/citing>)..... 75
- Figura 36. Diagrama topológico de LV-RSN-1. Elementos de estrutura secundários foram determinados com base no algoritmo do servidor Dali (Holm e Rosenström, 2010)..... 76
- Figura 37. A) Representação da superfície da proteína Lv-RSN-1 mostrando a cavidade hidrofóbica proposta. A coloração está de acordo com o potencial lipofílico, onde regiões representadas em vermelho são hidrofóbicas e em azul são hidrofílicas. Os cálculos foram realizados pelo programa VASCO (Steinkellner *et al.*, 2009). B) Representação em *cartoon* da proteína para uma melhor visualização da cavidade lipofílica; N e C representam as extremidades N e C-terminais da proteína, respectivamente. As figuras

- foram geradas usando o programa PyMol (DeLano Scientific, <http://www.pymol.org/citing>)..... 76
- Figura 38. Predição de interações proteína-proteína com base na estrutura de Lv-RSN-1 obtida com o programa SPIDER (Porollo e Meller, 2007)(A) e utilizando o programa cons-PPI (Chen e Zhou, 2005) (B). Em vermelho, estão as regiões preditas de participarem de interações proteína-proteína..... 77
- Figura 39. Comparação estrutural entre Lv-RSN-1 de *Leptodactylus vastus*, Lf-RSN-1 de *L. fuscus* (GenBank:AAT66300) e ranasmurfina (PDB id:2vh3-A) de *Polypedates leucomystax*. A e B) Alinhamentos estruturais baseados na sequência de aminoácidos utilizando Dali (Holm and Rosenström, 2010). Elementos de estrutura secundária são mostrados acima da sequência de aminoácidos. α -hélices e folhas- β são representadas por cilindros violetas e setas azuis, respectivamente. Resíduos estruturalmente equivalentes estão em caixa alta e resíduos não-estruturalmente equivalentes estão em caixa baixa. Aminoácidos de mesma identidade estão marcados com barras verticais. Cisteínas formadores de pontes dissulfeto estão em laranja. A) Alinhamento entre Lv-RSN-1 e Lf-RSN-1. A estrutura de Lf-RSN-1 de *L. fuscus* foi obtida por modelagem molecular utilizando o programa Yasara (Krieger *et al.*, 2002), tendo a estrutura de Lv-RSN-1 como molde. B) Alinhamento entre Lv-RSN-1 e ranasmurfina. C) Superposição estrutural de Lv-RSN-1 (cinza) e Lf-RSN-1 (violeta). D) Superposição estrutural entre Lv-RSN-1 (cinza) e ranasmurfina (violeta, PDB id: 2vh3-A)..... 78
- Figura 40. Representação esquemática do arranjo das ranaspuminas e carboidratos na interface ar-água do ninho de espuma de *Engystomops pustulosus*. Proteínas surfactantes (predominantemente Rsn-2) realizam o papel primário na redução da tensão superficial, permitindo a inicial formação de espuma. Esta camada é posteriormente estabilizada pela incorporação de lectinas (Rsn-3- Rsn-5, através de suas caudas hidrofóbicas) que se ligam a matriz de polissacarídeos (Fonte: Fleming *et al.* 2009)..... 82
- Figura 41. Modelo proposto para explicar a atividade surfactante de Ep-RSN-2 de *Engystomops pustulosus*. A proteína adota uma conformação estendida na interface ar-água comparada com uma conformação compactada quando em solução. Essa mudança conformacional expõe as fases apolares da hélice e dos segmentos de folhas- β para o ar, mantendo as fases polares em contato com a água (Mackenzie *et al.*, 2009)..... 98
- Figura 42. Filogenia das famílias e sub-famílias de anuros com base na revisão taxonômica de (Pyron e Wiens 2011) usando análises de *maximum likelihood*.....105
- Figura 43. Representação esquemática das relações filogenéticas entre as espécies de rãs mencionadas neste estudo (Pyron e Wiens 2011) e as estruturas de proteínas encontradas em seus respectivos ninhos de espuma. Pontes dissulfeto estão em laranja e o cromóforo zinco representado por uma esfera amarela.....106

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Proteínas isoladas de ninhos de espuma de rãs. 28
- Tabela 2. Sequenciamento manual *de novo* dos peptídeos obtidos após digestão em gel da Lv-RSN-1. *Score* foi calculado utilizando o programa BioTools (Bruker Daltonics). Legenda: ND - Não determinada, SI - sequencia incompleta, * - constituem isoformas. Aminoácidos sublinhados discordaram com o mapa de densidade eletrônica. 62
- Tabela 3. Espalhamento dinâmico da luz da proteína Lv-RSN-1 (1 mg/ml) em água. 64
- Tabela 4. Dados estatísticos referentes à coleta, processamento e refinamento das estruturas de Lv-ranaspumina referentes ao cristal monoclinico e ortorrômbico. Valores em parênteses referem-se à camada de resolução mais alta. Para calcular R_{free} , 5% das reflexões foram excluídas do refinamento. $^{\dagger}R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	bidimensional
3D	tridimensional
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CD	Dicroísmo Circular
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiotreitol
HCCA	ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
IAA	Iodoacetamida
IEF	Focalização Isoelétrica
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MS	Espectrometria de Massa
Mt	Megatoneladas
NCBI	National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
PDB	Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência em fase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TOF	Time of flight

TABELA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras	Massa Monoisotópica
Ácido aspártico	D	Asp	115.026
Ácido glutâmico	E	Glu	129.042
Alanina	A	Ala	71.0371
Arginina	R	Arg	156.101
Asparagina	N	Asp	114.042
Cisteína	C	Cys	103.009
Fenilalanina	F	Phe	147.068
Glicina	G	Gly	57.0214
Glutamina	Q	Gln	128.058
Histidina	H	His	137.058
Isoleucina	I	Iso	113.084
Leucina	L	Leu	113.084
Lisina	K	Lys	128.094
Metionina	M	Met	131.04
Prolina	P	Pro	97.052
Serina	S	Ser	87.032
Tirosina	Y	Tyr	163.063
Treonina	T	Thr	101.047
Triptofano	W	Trp	186.079
Valina	V	Val	99.0684

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. Ninhos de Espuma.....	23
2.2. O Ninho de Espuma de <i>L. vastus</i>	28
2.3. Proteínas Surfactantes	30
3. OBJETIVOS.....	34
3.1.1. Objetivos Gerais.....	34
3.1.2. Objetivos específicos	34
4. METODOLOGIA	35
4.1. Coleta do Material Biológico.....	35
4.2. Determinação de proteínas	36
4.3. Produção de anticorpos policlonais	36
4.4. Imunodeteção do órgão produtor da proteína lv-ranaspumina..	36
4.5. Focalização isoeletrica (IEF) e eletroforese bidimensional (2D) ..	37
4.6. Purificação da lv-ranaspumina	38
4.7. Desnaturação e carbamidometilação com iodoacetamida da proteína lv-ranaspumina.....	39
4.8. Análise de espectroscopia por Dicroísmo Circular (CD).....	39
4.9. Caracterização das modificações pós-traducionais	40
4.10. Caracterização por Difusão Dinâmica da Luz (DLS)	40
4.11. Espectrometria de massa (MS)	41
4.11.1. Análise das isoformas de Lv-ranaspumina.....	41
4.11.2. Análise da proteína nativa e desnaturada.....	41
4.11.3. Sequenciamento <i>de novo</i>	42
4.12. Cristalografia da proteína lv-ranaspumina.....	43
4.12.1. Cristalização	43
4.12.2. <i>Screening</i> de incorporação de metais pesados para MAD e SAD	43
4.12.3. Programas para coleta de dados, processamento e determinação da estrutura	44
4.12.4. Análise do cristal por Espectrometria de Massa	45

4.13. Ensaio de atividade emulsificante.....	45
4.14. Ensaio de redução da tensão superficial da água.....	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1. Imunodeteção da proteína lv-ranaspumina na rã <i>L. vastus</i>	46
5.2. Perfil dos géis 2D do fluido do ninho de espuma de <i>L. vastus</i>	48
5.3. Espectro de MS	50
5.4. Estudo da proteína lv-ranaspumina	51
5.4.1. Purificação por RP-HPLC.....	51
5.4.2. Espectrometria de massa	53
5.4.3. Modificações pós-traducionais	55
5.4.4. Dicroísmo circular (CD)	56
5.5. Atividade surfactante	59
5.5.1. Atividade emulsificante	59
5.5.2. Redução da tensão superficial da água.....	59
5.6. Sequenciamento <i>de novo</i>	61
5.7. Caracterização por espalhamento dinâmico da luz	64
5.8. Cristalografia da proteína Lv-RSN-1	65
5.8.1. Cristalização.....	65
5.8.2. Espectrometria de massa do cristal.....	66
5.8.3. Endereçamento das fases por MAD e SAD.....	67
5.8.4. Coleta de dados, processamento e determinação da estrutura.....	69
5.8.5. Estrutura de Lv-RSN-1.....	74
6. DISCUSSÃO	80
6.1. Local de produção da proteína lv-ranaspumina.....	80
6.2. Caracterização da proteína Lv-RSN-1.....	81
6.3. Endereçamento das fases do cristal e resolução da estrutura e da sequência de aminoácidos	86
6.4. Estrutura <i>versus</i> função biológica (ação surfactante)	92
6.5. Considerações Evolutivas.....	100
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

ANEXOS A - ARTIGO PUBLICADO CONTENDO ALGUNS DOS RESULTADOS OBTIDOS NESTE ESTUDO	119
ANEXO B - FIGURA DOS PRINCIPAIS ESPECTROS DE MASSA PARA SEQUENCIAMENTO <i>DE NOVO</i>, FIGURA 26	123

1. INTRODUÇÃO

Muitas espécies de tunicados, peixes e anfíbios depositam seus ovos em espumas estáveis a fim de proteger o desenvolvimento de seus ovos e larvas (Castilla *et al.*, 2007; Cooper *et al.*, 2005). Embora seja um fenômeno que desperta a curiosidade de estudiosos, sabe-se ainda muito pouco sobre os ninhos de espumas. Algumas das questões ainda não totalmente esclarecidas incluem o processo de produção dos ninhos, a estabilidade, já que alguns permanecem estáveis por longos períodos (mais de um mês), a composição e função.

Estudos recentes vêm mostrando que os ninhos de espumas de anfíbios são uma rica fonte de proteínas surfactantes. Essas proteínas foram denominadas ranaspuminas, ou proteínas de ninhos de espuma de rãs, por Cooper *et al.* (2005). Desde então, um total de 9 proteínas, isoladas de ninhos de espumas de 4 espécies de rãs vem sendo estudadas, confirmando se tratarem de uma nova família de proteínas (Fleming *et al.*, 2009; Hissa *et al.*, 2008; Castilla *et al.*, 2007; Cooper *et al.*, 2005).

Estudos comparativos das sequências de aminoácidos das ranaspuminas têm contribuído para elucidar a evolução dos ninhos de espumas. Ranaspumina-2 (Ep-RSN-2) e Ranasmurfina, isoladas respectivamente dos ninhos de espuma das rãs *Engystomops pustulosus* e *Polypedates leucomystax*, por exemplo, não compartilham similaridades em suas sequências de aminoácidos ou estruturas, corroborando com a ideia de que os ninhos de espuma de anfíbios evoluíram várias vezes, independentemente, na natureza (Faivovich *et al.*, 2012; Pyron e Wiens, 2011; Frost *et al.*, 2006).

Estudos com o ninho da rã tropical *Leptodactylus vastus*, espécie endêmica da América do Sul e de ocorrência restrita ao nordeste do Brasil, levaram ao isolamento da proteína Lv-ranaspumina (Lv-RSN-1) (ranaspumina de *L. vastus*). Sua sequência N-terminal não apresenta similaridade com nenhuma proteína conhecida, sugerindo tratar-se de uma nova proteína (Hissa *et al.*, 2008).

O ninho de espuma de *L. vastus*, assim como Lv-RSN-1, formam emulsões água-óleo estáveis, ressaltando o potencial dessas proteínas para aplicações industriais, especialmente nas áreas de alimentos e petrolífera, onde há um grande demanda por compostos tensoativos, incluindo surfactantes, emulsificantes, dentre outros.

Surfactantes são compostos anfipáticos que possuem a capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial de um líquido. Estes compostos possuem diversas

aplicações, envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A maioria dos surfactantes comerciais utilizado na indústria atualmente é de origem sintética, obtidos a partir de derivados do petróleo (Nitschke e Pastore, 2002). Entretanto, tem se observado um crescente interesse por surfactantes naturais ou biosurfactantes, seguindo a tendência mundial por práticas sustentáveis, o que tem incrementado a biotecnologia verde.

Outro fato que merece destaque é que se conhecem poucas proteínas na natureza capazes de formar espumas estáveis (Cooper e Kennedy, 2010), como Lv-RSN-1. Essa propriedade de Lv-RSN-1, aliada a possibilidade de sua clonagem e expressão heteróloga, coloca essa proteína como uma candidata a ser testada para aplicações industriais.

Desse modo, pretende-se avançar na caracterização bioquímica de Lv-RSN-1 visando contribuir para esclarecer alguns questionamentos sobre sua participação na construção do ninho de espuma, seu local de síntese, sua sequência completa de aminoácidos, sua estrutura tridimensional e a relação estrutura-função. Essas informações, por sua vez, servirão para traçar relações filogenéticas entre as ranaspuminas, assim como para ressaltar seu potencial biotecnológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. NINHOS DE ESPUMA

As mais de 7000 espécies de anfíbios conhecidas são agrupadas em três ordens: Gymnophiona (cecílias), Caudata (salamandras) e Anura (rãs, sapos e pererecas). A ordem dos anuros é a maior, compreendendo mais de 5065 espécies, sendo sua maior diversidade encontrada nas regiões tropicais (*AmphibiaWeb*, 2013).

A diversidade de modos de reprodução nos anuros é uma das maiores observadas para os vertebrados (Duellman e Trueb, 1986). Suas estratégias reprodutivas derivam de uma combinação de atributos morfológicos, fisiológicos e comportamentais; sendo o conceito de modo reprodutivo em anfíbios definido por Salthe e Duellman (1973) como sendo uma combinação de traços que incluem o local de oviposição, as características dos ovos e da desova, a taxa e duração do desenvolvimento da larva (girino) e tipo de cuidado parental (se presente).

Características como ausência de ovos com casca calcárea, ciclo de vida bifásico e pele permeável, explicam o fato de os anfíbios terem uma grande dependência da água e/ou locais úmidos, sendo o mais típico e generalizado ciclo reprodutivo caracterizado por ovos depositados na água que se desenvolvem em girinos aquáticos exotróficos (que obtêm energia proveniente de alimentos presentes no ambiente) que, em sua metamorfose se tornam rãs/sapos/pererecas terrestres ou semi-terrestres (Figura 1).

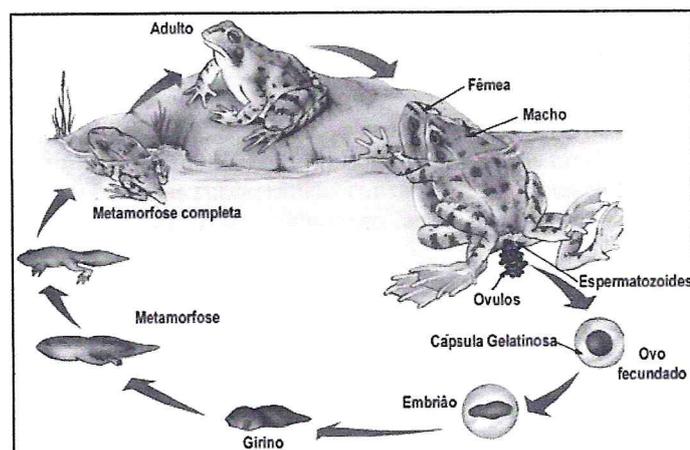


Figura 1. Esquema do ciclo reprodutivo típico de anuros. Fonte: http://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/Ensino_Fundamental/Origami/Documentos/Anfibios.htm.

Entretanto, anfíbios possuem uma grande diversidade de modos reprodutivos, incluindo uma tendência de reprodução terrestre mais derivada, contra uma reprodução aquática mais primitiva, tornando-se gradualmente menos dependente da água. Para anuros, Duellman e Trueb (1986) reconheceram 29 modos reprodutivos e desde então, novos modos reprodutivos foram constantemente descritos, sendo, atualmente, reconhecidos 39 modos (Haddad e Prado, 2005).

Membros da família Leptodactylidae exibem diversos modos reprodutivos, variando de uma reprodução desde aquática até terrestre, com muitas formas intermediárias. O gênero *Leptodactylus* Fitzinger 1826, por exemplo, caracteriza-se por apresentar desova em ninhos de espuma, sendo essa considerada, por muitos autores, como uma forte evidência evolutiva da tendência para o habitat terrestre (Figura 2) (Duellman e Trueb, 1986).

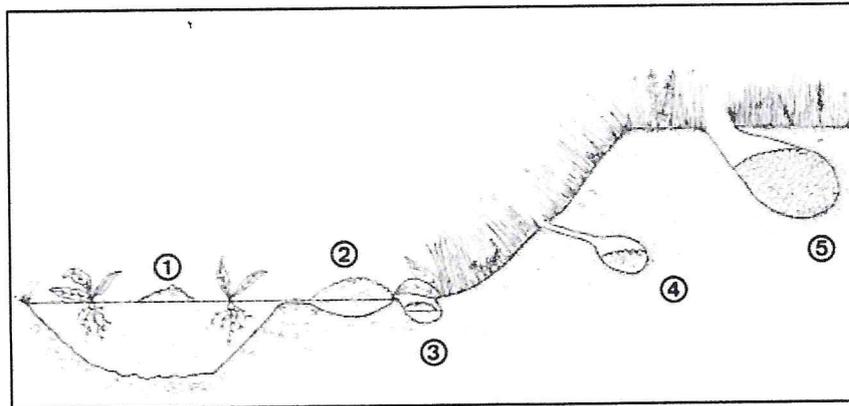


Figura 2. Representação esquemática de passos sequenciais dos modos reprodutivos do gênero *Leptodactylus*, saindo de um modo aquático para terrestre. 1- Ovos em ninhos de espuma na superfície da água, girinos em águas lênticas, 2- ovos em ninhos de espuma em depressões próximas da água, girinos em águas lênticas, 3- ovos em ninhos de espuma em bacias escavadas pelos machos, girinos em águas lênticas, 4- ovos em ninhos de espuma em câmaras subterrâneas construídas pelos machos, girinos em águas lênticas, 5- ovos em ninhos de espuma em tocas, desenvolvimento larval no próprio ninho de espuma (Prado *et al.*, 2002).

A produção de ninhos de espuma é uma estratégia comumente utilizada não somente por anfíbios como, também, por peixes e tunicados (Figura 3), em que seus ovos são depositados em espumas ambientalmente estáveis a fim de proteger os ovos e larvas ao longo de seu desenvolvimento inicial (Castilla *et al.*, 2007; Cooper *et al.*, 2005; Hostache e Mol, 1998; Andrade e Abe, 1997) contra intensa predação aquática, ataque de patógenos (Fleming *et al.*, 2009; Downie, 1993; Heyer, 1969), danos térmicos (Gorzula, 1977), baixa oxigenação, desidratação por falta de chuva e imprevisibilidade de evaporação de poças temporárias (Heyer, 1969). Estas duas últimas estratégias são comumente observada sem espécies que habitam ambientes com vegetação aberta e com disponibilidade de água restrita a curtos períodos do ano (Arzabe, 1999; Cardoso e Arzabe, 1993). Outras vantagens dos ninhos são o suprimento de oxigênio para os ovos (Seymour e Loveridge, 1994), manutenção da temperatura adequada para os ovos e embriões (Dobkin e Gettinger, 1985) e fonte de alimento para os girinos (Tanaka e Nishihira, 1987).

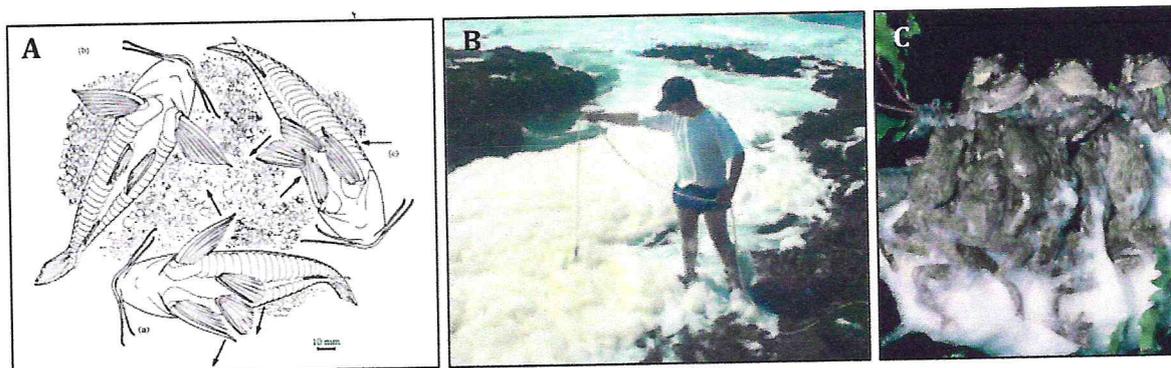


Figura 3. A) Ninho de espuma pelo peixe da espécie *Hoplosternum littorale* (Andrade e Abe, 1997); B) Espuma biológica produzida pela espécie de tunicado marinho *Pyura praeputialis* na Baía de Antofagasta, Chile (Castilla *et al.*, 2007); C) Ninho de espuma de anfíbio da espécie *Engystomops pustulosus* (Fonte: Bubble-wrapped frogs, Chemistry World, Jun/2009, www.chemistryworld.org).

Além dos poucos estudos sobre a evolução desta estratégia reprodutiva, informações referentes à composição bioquímica e mecanismos moleculares envolvidos na produção dos ninhos de espumas são também escassas. O primeiro relato sobre a composição de ninhos de anfíbios foi publicado por Cooper *et al.* (2005), que estudando o ninho de espuma da rã *Engystomops pustulosus* (Figura 4) revelaram a presença de uma mistura de proteínas, as quais denominaram ranaspuminas (RSN, proteínas de espuma de rã). Essa espécie de rã é encontrada no norte da América do Sul, na América Central e no sul do México. As posturas de seus ninhos ocorrem em corpos d'água naturais ou artificiais (Amphibiaweb, 2013). Nesse primeiro estudo, Cooper *et al.* (2005) mostraram que as ranaspuminas podiam adsorver na interface água/ar devido à presença de uma ou mais proteínas surfactantes. Desde o trabalho pioneiro de Cooper *et al.* (2005), outros estudos com o mesmo enfoque foram feitos com os ninhos das rãs *Polypedates leucomystax* (Oke *et al.*, 2008) e *Leptodacylus vastus* (Hissa *et al.*, 2008) (Figura 4).

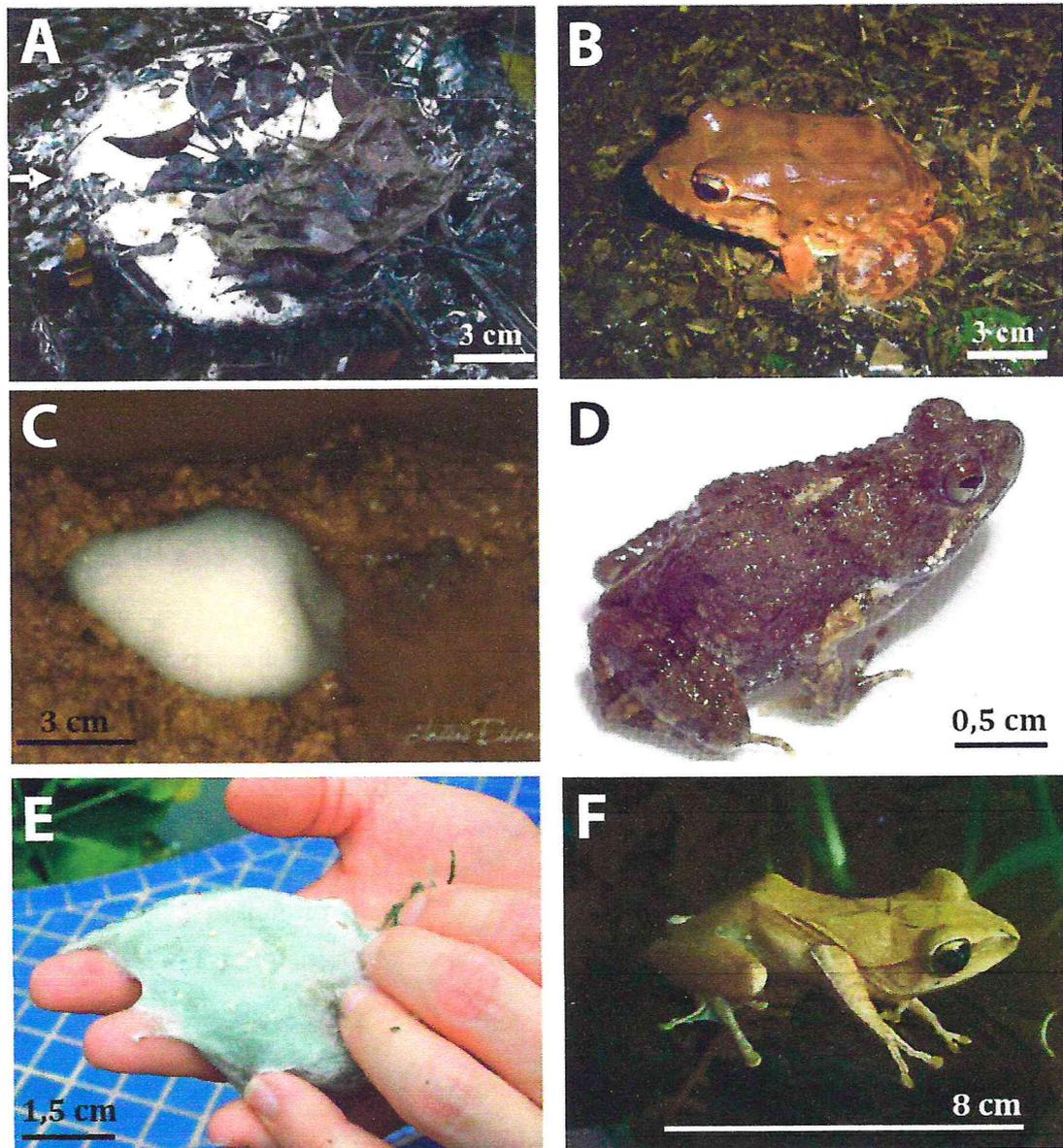


Figura 4. Ninhos de espuma de rãs e suas respectivas espécies produtoras. (A) ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* (B); (C) ninho de *Engystomops pustulosus* (D); (E) ninho de *Polypedates leucomystax* (F). Fontes: Imagens A e B foram cedidas pelo Dr. Paulo Cascon; Imagens C, D, e F (<http://amphibiaweb.org>); Imagem E (www.chemistryworld.org).

O estudo sobre o ninho de espuma de *P. leucomystax* levou à descoberta de uma nova proteína, denominada ranasmurfina (Tabela 1). Ranasmurfina possui um novo padrão de estrutura tridimensional e função biológica desconhecida (Oke *et al.*, 2008), quando comparada as 89561 estruturas de proteínas conhecidas, depositadas no *Protein Data Bank* (2013). *P. leucomystax* é amplamente distribuída entre os países do sul e sudeste asiático (*Amphibiaweb*, 2013). Rãs da família Rhynchophoridae, como *P. leucomystax*, depositam seu ninhos em folhas e galhos, sendo o líquido liberado pela cloaca agitado pelas patas traseiras das fêmeas para formação da espuma.

Fleming *et al.* (2009) sequenciaram seis proteínas do ninho de *E. pustulosus*, identificadas como Ep-RSN-1 a Ep-RSN-6, sendo Ep-RSN-2 a única a apresentar atividade surfactante (Tabela 1). Mackenzie *et al.* (2009) elucidaram a estrutura tridimensional da Ep-RSN-2 por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Tabela 1. Proteínas isoladas de ninhos de espuma de rãs.

Proteína	Espécie de rã	Classe	Massa Molecular (kDa)	Estrutura (<i>Protein Data Bank</i>)	Publicação
Ranasmurfina	<i>Polypedates leucomystax</i>	Desconhecida	2 x 13	2VH3	Oke <i>et al.</i> , 2008
Ep-RSN-1	<i>Engystomops pustulosus</i>	Cistatina-like	14,2	Desconhecida	Fleming <i>et al.</i> , 2009
Ep-RSN-2	<i>E. pustulosus</i>	Surfactante	11,0	2WGO_A	Mackenzie <i>et al.</i> , 2009
Ep-RSN-3	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	18,9	Desconhecida	Fleming <i>et al.</i> , 2009
Ep-RSN-4	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	21,3	Desconhecida	Fleming <i>et al.</i> , 2009
Ep-RSN-5	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	18,8	Desconhecida	Fleming <i>et al.</i> , 2009
Ep-RSN-6	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	27,2	Desconhecida	Fleming <i>et al.</i> , 2009
Lf-RSN-1	<i>Leptodactylus fuscus</i>	Desconhecida	23,7	Desconhecida	GenBank: AAT66300.1
Lv-ranaspumina (Lv-RSN-1)	<i>L. vastus</i>	Surfactante	23,5	4K82, 4K83	Presente estudo

2.2. O NINHO DE ESPUMA DE *L. VASTUS*

A rã-pimenta do nordeste, nome popular da espécie *Leptodactylus vastus* A. Lutz 1930 (Figura 4) é endêmica da América do Sul, ocorrendo especificamente no nordeste

brasileiro. Após o estudo de Heyer (2005), esta rã foi separada da espécie *L. labyrinthicus* tornando-se a única espécie do grupo *L. pentadactylus* de ocorrência nos estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Bahia, Maranhão e Sergipe (Figura 5).

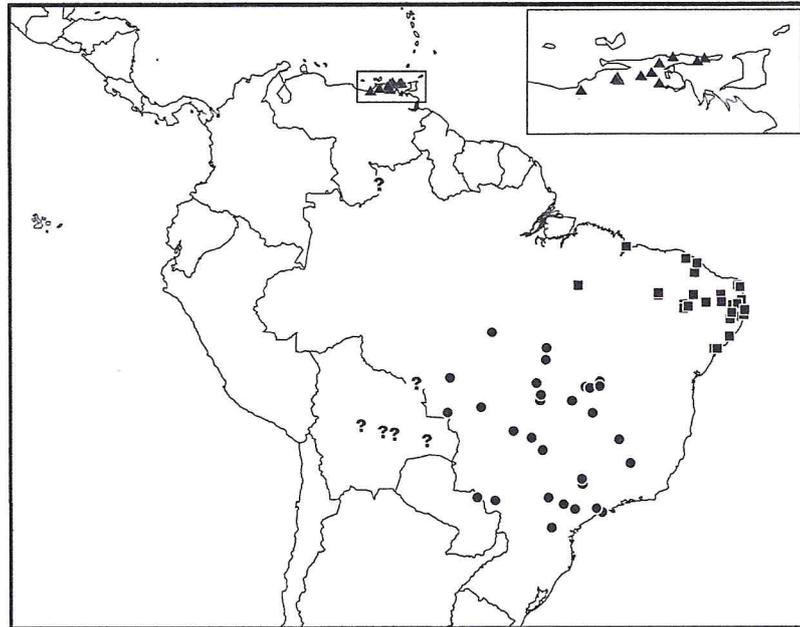


Figura 5. Mapa de distribuição de *L. labyrinthicus* (círculos), *L. turimiquensis* (triângulos) e *L. vastus* (quadrados). Pontos de interrogação indicam indivíduos cujas espécies ainda não foram identificadas. Esquema segundo Heyer (2005).

A reprodução desta espécie ocorre principalmente em cavidades próximas de poças d'águas onde as fêmeas liberam os ovos juntamente com um fluido rico em proteínas, que é agitado pelo macho em rápidos movimentos de suas patas traseiras, formando uma espuma e simultaneamente fertilizando os ovos machos (Hödl, 1990).

O primeiro trabalho a descrever a composição química de ninho de espuma de *L. vastus* revelou a presença de várias proteínas de massas moleculares variando de 7-103 kDa. Dentre essas, foi isolada uma proteína surfactante, cuja sequência N-terminal (UniProtKB/Swiss-Prot: P85507) não mostrou similaridade com nenhuma proteína depositada nos bancos de dados (Hissa *et al.*, 2008). Além da descoberta de uma nova proteína surfactante, os autores realizaram testes de rastreio em vários sistemas biológicos incluindo camundongos, larvas de *Artemia* sp., espécies de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos filamentosos. Os resultados mostraram que o extrato concentrado das proteínas do ninho não produz nenhum efeito deletério contra esses alvos. Assim, os

autores sugeriram que a função primordial das proteínas era a formação e estabilidade do ninho de espuma, provendo umidade, oxigenação e alimento aos ovos e/ou girinos.

2.3. PROTEÍNAS SURFACTANTES

Surfactantes ou tensoativos são compostos anfipáticos com propriedades de atividade superficial, resultante da adsorção destes compostos na superfície de líquidos ou na interface entre dois líquidos imiscíveis (Nitschke e Pastore, 2002).

Desde sua introdução, no começo do século 20, o uso de surfactantes sintéticos vem crescendo exponencialmente, sendo estimado uma produção global anual de 12 Mt, estando entre os químicos sintéticos mais produzidos globalmente (Foley *et al.*, 2012). Seu mercado está estimado a atingir 41 bilhões de dólares no ano 2018 (Acmite Market Intelligence, 2010).

Surfactantes são usados em quase todos os setores da indústria moderna de alimentos, farmacêutica e cosmética, no setor petrolífero e na área ambiental, onde são exploradas suas propriedades tensoativas, emulsificantes, de-emulsificantes, molhantes, dentre outras (Muthusamy *et al.*, 2008).

Estima-se que 0,57 t de intermediários petroquímicos são utilizados por cada tonelada de surfactante produzido. Assumindo esta taxa para a produção global atual verifica que sua produção consome por volta de 7,4 Mt de intermediários petroquímicos. Essa produção resulta em uma liberação aproximada de 4279 Kg de CO₂ para cada tonelada de intermediário do petróleo usado para produção de surfactantes, levando à emissão anual de $31,6 \times 10^9$ Kg de CO₂ (Patel, 2004).

Desse modo, considerando a demanda da sociedade moderna por surfactantes, seu custo de produção, a crescente preocupação ambiental dos consumidores, associada a novas legislações de proteção do meio ambiente, pesquisas estão se voltando para produção de surfactantes renováveis. Diferentemente dos surfactantes sintéticos, surfactantes naturais ou biossurfactantes se destacam pela maior biodegradabilidade, menor toxicidade e compatibilidade ambiental. Além disso, a maioria dos biossurfactantes se mantém estável em extremos de pH, salinidade e temperatura (Desai e Banat, 1997).

Biossurfactantes microbianos vem sendo vastamente estudados como uma alternativa aos surfactantes sintéticos (Mukherjee *et al.*, 2006), dentre estes estão compostos glicolipídicos, lipopeptídeos e fosfolipídios (Banat *et al.*, 2000). Dentre os

surfactantes de origem vegetal, destacam-se as saponinas e, de origem animal, os ácidos biliares.

Os surfactantes mencionados acima possuem uma cabeça polar (hidrofílica) e uma cauda apolar (hidrofóbica) (Figura 6). Esta dupla natureza pode ser facilmente visualizada em surfactantes convencionais como o dodecil sulfato de sódio (SDS) e até mesmo naturais, como o lipopeptídeo surfactina (Banat *et al.*, 2000).

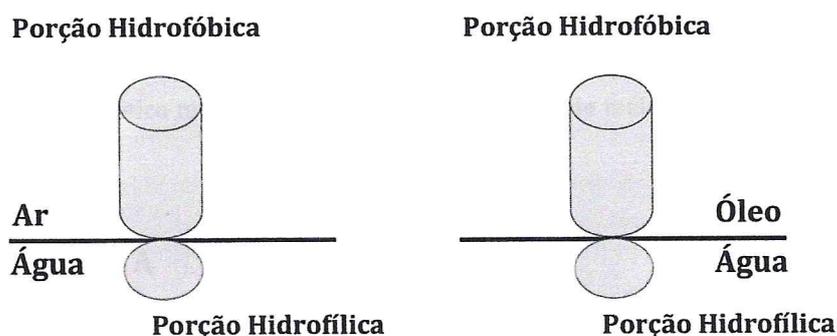


Figura 6. Representação esquemática da orientação das moléculas de surfactantes (Tadros, 2009).

Devido a estas propriedades, muitos surfactantes possuem a tendência de se agregar organizadamente formando micelas, quando em uma concentração acima da chamada concentração micelar crítica (CMC; Figura 7). O tamanho e a forma das micelas dependem do tipo, tamanho e estereoquímica da molécula do surfactante, bem como do ambiente em que ela está inserida (Bogusz *et al.*, 2000). As micelas frequentemente são, equivocadamente, assumidas como uniformes em que desenhos simplistas as relatam com formas esféricas em que as caudas hidrofóbicas estendem-se para dentro da micela; enquanto que, na realidade, as caudas hidrofóbicas estão organizadas compactamente de modo mais desorganizado (Figura 8). Além do mais, micelas não são estruturas estáticas, são fluidas e heterogêneas, podendo exibir dramáticas flutuações em suas formas (Garavito e Ferguson-Miller, 2001). Vale ressaltar que muitas micelas podem ter potenciais aplicações como em sistemas de liberação de fármacos, *nano-containers*, catalisadores, sensores, dentre outros (Wei *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006).

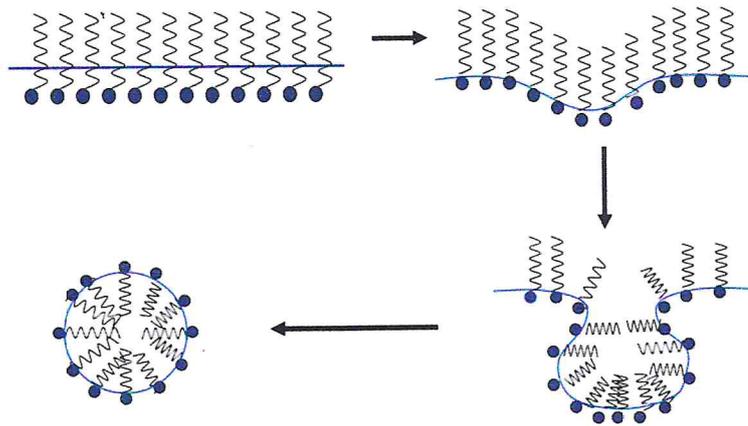


Figura 7. Desenho esquemático mostrando a formação de micelas de moléculas anfipáticas (Viades-Trejo *et al.*, 2012).

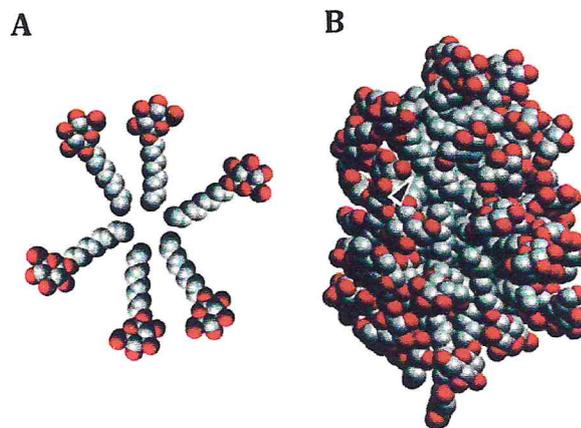


Figura 8. A) Representação de moléculas de surfactantes mostrando a impossibilidade de formação de micelas a uma baixa concentração da molécula, B) Micela composta por 50 monômeros obtido a partir de dados de simulação por dinâmica molecular em que a concentração do surfactante está acima de sua Concentração Micelar Crítica (Garavito e Ferguson-Miller, 2001).

Apesar de incomuns na natureza, algumas proteínas também podem se ordenar nas interfaces entre ambientes com diferentes graus de polaridade e reduzir a tensão superficial. Nesse caso, mesmo que não seja tão aparente, elas também devem possuir um domínio hidrofílico e um domínio hidrofóbico específico. Exemplos de proteínas com propriedade tenso-ativas incluem: caseínas, albuminas séricas, surfactantes pulmonares, hidrofobinas, oleosinas e ranaspuminas. Apesar da característica comum de redução da tensão superficial, essas proteínas não seguem um padrão comum de características biofísicas ou bioquímicas.

Surfactantes pulmonares são constituídos de misturas de proteínas (~10%, SP-A, B, C e D) e fosfolipídios (~90%) que revestem as estreitas vias aéreas dos pulmões, sendo a atividade surfactante proveniente, principalmente, da porção fosfolipídica (Dieudonne *et al.*, 2001). Caseínas são uma classe heterogênea de proteínas, extensivamente fosforiladas com estruturas flexíveis e naturalmente *unfolded*, formadoras de micelas que são mantidas por íons de cálcio e interações hidrofóbicas (Van der Ven *et al.*, 2001). Albuminas séricas são as proteínas mais abundantes no sistema circulatório e principais responsáveis pelo transporte de ácidos graxos no sangue. Elas possuem uma moderada capacidade de redução da tensão superficial (Curry *et al.*, 1998). Hidrofobinas são uma classe de proteínas de baixa massa molecular (7-9 kDa), de fungos filamentosos, com a presença característica de 4 pontes dissulfeto e uma estrutura terciária anfipática relacionada às suas propriedades surfactantes (Linder *et al.*, 2005). As oleosinas são proteínas vegetais com a função biológica de estabilizar vesículas lipídicas constituídas por um N-terminal hidrofílico, um núcleo hidrofóbico e um outro segmento hidrofílico na porção C-terminal (Vargo *et al.*, 2012). A classe de proteínas ranaspuminas, alvo deste estudo e cujo nome é proveniente da contração “proteínas de espumas de rã”, possuem a peculiar característica de terem como função biológica a formação de espumas e, para tanto, necessitem da propriedade de redução da tensão superficial (Cooper *et al.*, 2005).

Como mencionado anteriormente, surfactantes naturais possuem diversas vantagens quando comparados aos surfactantes sintéticos. Porém, para aplicação industrial, estes possuem a desvantagem de sua produção ainda ser muito cara. Vários estudos relatam a produção de surfactantes microbianos com o objetivo de atingir largas escalas de produção via fermentação (Mukherjee *et al.*, 2006). Já os surfactantes proteicos de origem não-microbiana, para que sejam obtidos em larga escala, precisam ser produzidos sob forma recombinante com expressão em sistema heterólogo.

3. OBJETIVOS

3.1.1. Objetivos Gerais

Este estudo teve por objetivo realizar a caracterização da proteína Lv-ranaspumina isolada do ninho de espuma da rã *Leptodactylus vastus*, abrangendo desde a sua produção à estrutura 3D, com o intuito de obter informações que ajudem a elucidar sua função na construção do ninho de espuma, bem como demonstrar seu potencial biotecnológico.

3.1.2. Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência da proteína Lv-ranaspumina em órgãos do sistema reprodutivo de *L. vastus*.
- Determinar a sequência completa de aminoácidos da Lv-ranaspumina.
- Resolver a estrutura cristalográfica da Lv-ranaspumina.
- Entender o papel da Lv-ranaspumina no ninho de espuma.

4. METODOLOGIA

4.1. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Quatro indivíduos da espécie *L. vastus*, sendo duas fêmeas e dois machos, foram coletados na mata do Campus da Universidade Federal do Ceará (Brasil), durante o período chuvoso (Março e Abril) do ano de 2009. Os animais foram sacrificados com 5% de xilocaína em pomada e dissecados para retiradas dos órgãos do sistema reprodutivo: ovário, região anterior do oviduto, região glandular do oviduto (também denominada *pars convoluta dilata* ou ovisaco, como descrito por Bhaduri e Rudra, 1944) e cloaca das fêmeas e testículo e cloaca dos machos (Figura 9). Os órgãos foram congelados em nitrogênio líquido, e utilizados para a extração de proteínas totais. As fêmeas examinadas neste estudo estavam sexualmente maduras e possuíam oócitos bem desenvolvidos em seus ovários, indicando que foram coletadas durante sua época de reprodução. Os espécimes utilizados neste estudo foram preservados em Formaldeído 10% e armazenados na Coleção de Anfíbios e Répteis da Universidade Federal do Ceará, NUROF (*voucher* A4480, A4642, A4550 e A4481).

Os ninhos de espuma foram cuidadosamente coletados nas laterais de poças d'água, colocados em bolsas plásticas estéreis e levados para laboratório onde foram manualmente limpos, retirando-se ovos, fragmentos de folhas, galhos e partículas minerais. A espuma foi mantida em repouso na geladeira para que naturalmente voltasse ao seu estado fluido viscoso original. Esse fluido foi liofilizado antes de ser utilizado nos ensaios.

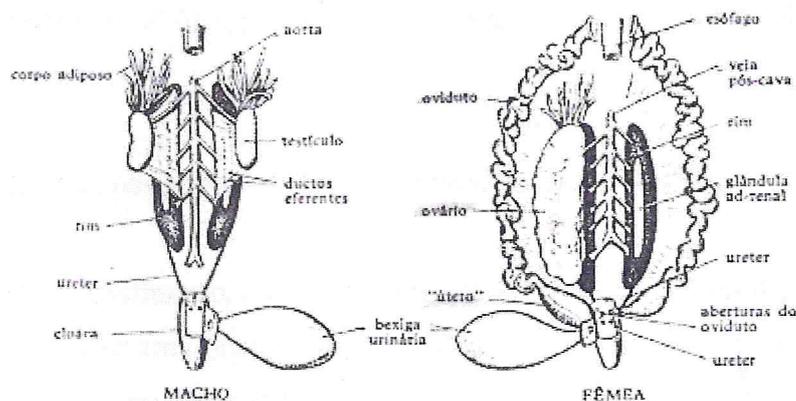


Figura 9. Desenho esquemático dos aparelhos excretor e reprodutor (aparelho urogenital) de anuros em vista ventral (Pough *et al.*, 2001).

4.2. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método convencional de Bradford, utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão (Bradford, 1976).

4.3. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Um coelho albino de três meses de idade da raça Nova Zelândia foi utilizado para obtenção de anticorpos policlonais. A preparação do antígeno foi feito como se segue. Primeiramente, 10 µg de fluido bruto do ninho de espuma foram aplicados em 10 raias de um gel de Tricina-SDS-PAGE (Schägger e Von Jagow, 1987) de 9,0 x 10,5 cm. Após a corrida eletroforética, uma raia foi separada das demais e corada com solução de 0,06% (m/v) de Azul Brilhante de Coomassie (CBB) G-250 em 10% (v/v) de Ácido Acético, para orientar a excisão da banda da proteína de interesse nas demais raias. A tira de gel contendo as réplicas das raias foi macerada em solução salina e centrifugada a 10000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante dessa suspensão (0,5 ml) foi misturado (1:1, v/v) com adjuvante completo de Freund (Sigma) e aplicado via intramuscular no coelho, imediatamente após a colheita do soro pré-imune. Um reforço com o antígeno preparado nas mesmas condições foi aplicado via subcutânea, sem adição de adjuvante, aos 14, 21, 28 e 35 dias após a primeira injeção. Após cada administração do antígeno, coletou-se o sangue a partir da veia marginal da orelha. O sangue foi deixado em repouso para coagulação por 2 h, à temperatura ambiente, e depois a 4 °C por 16 h. Em seguida, o soro foi removido do coágulo, centrifugado a 10000 g por 5 min a 4 °C e armazenado a -20 °C até o seu uso (Rios *et al.*, 1992).

4.4. IMUNODETECÇÃO DO ÓRGÃO PRODUTOR DA PROTEÍNA LV-RANASPUMINA

Para esse procedimento, os órgãos obtidos como descrito em 4.1 foram utilizados para preparação de extratos brutos em água ultrapura. Para tanto, cada órgão congelado em Nitrogênio líquido foi macerado em água ultrapura e as suspensões obtidas foram centrifugadas a 10000 g por 20 min, 4 °C para obtenção dos sobrenadantes. Em seguida, a

concentração de cada sobrenadante foi ajustada para alíquotas de 20 µg de proteínas que foram aplicados em cada raia do gel de Tricina-SDS-PAGE de 9,0 x 10,5 cm.

Ao final da corrida, as proteínas resolvidas no gel foram transferidas (100 V, 1 h) para membrana de PVDF (poro 0,45 µm, Millipore) de acordo com o procedimento descrito por Towbin *et al.* (1979). A membrana foi bloqueada com 5% (m/v) de leite em pó desnatado em Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, 0,15 M NaCl e 0,5% Tween 20 por uma hora. Em seguida, foi incubada por 2 h à temperatura ambiente com o soro anti-*Lv-ranaspumina*, diluído 1:500 (v/v) na solução bloqueadora. Após a incubação, a membrana foi lavada 4 vezes por 10 min com o mesmo tampão sem o leite desnatado e incubada com o anticorpo secundário, IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com fosfatase alcalina (1:20000, v/v, Sigma) por 2 h à temperatura ambiente. A membrana foi lavada e a reação revelada pela adição do composto 5-Bromo-4-Cloro-Indolil-Fosfato Nitroazul de Tetrazólio preparado de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, SP, Brasil).

4.5. FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF) E ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D)

Os parâmetros para IEF foram empiricamente determinados, seguindo-se direcionamentos descritos por Gorg *et al.* (2000). A IEF foi realizada utilizando-se o sistema Ettan™ IPGPhor II™ (GE Healthcare Bio-Science, NJ, USA), onde tiras contendo géis de poliacrilamida com gradientes de pH imobilizados (IPG) nas faixas 3,0 – 10,0 e 4,0 – 7,0 (13 cm, GE Healthcare Bio-Science) foram primeiramente reidratadas por 16 h a 22 °C com as proteínas totais do fluido diluídas no tampão de reidratação contendo 7 M Uréia, 2 M Tiouréia, 10 mg/mL CHAPS, 10 mg/ml DTT, 0,01 mg/ml Azul de Bromofenol e 0,6 % (v/v) de anfólitos (Tampão IPG, GE Healthcare Bio-Science) e cobertas com óleo mineral. A IEF foi realizada em modo gradual: 200 V por 1 h, 500 V por 1,5 h, 5000 V por 2,5 h e 10000 V até atingir 18000 V/h. Após focalização, cada gel IPG foi transferido para tubos rosqueados contendo 5 ml de tampão de equilíbrio [50 mM Tris-HCl, pH 8,8, contendo 6 M Uréia, 30% (v/v) Glicerol, 2% (m/v) SDS e 1% (m/v) Azul de Bromofenol] contendo DTT 1% (m/v). Após agitação por 15 min, a primeira solução de equilíbrio foi substituída por uma nova solução, dessa vez contendo 2,5% (m/v) Iodoacetamida. A segunda dimensão da 2D-SDS-PAGE (Laemmli, 1970) foi conduzida em um sistema vertical (Hoefer SE 600, GE Healthcare Bio-Science) sob 25 mA de corrente constante por gel e 250 V de tensão máxima.

Os géis possuíam dimensões idênticas (140 x 140 x 1 mm) sendo constituídos de 12,5% de poliacrilamida. A eletroforese foi feita em triplicata. Os géis foram corados com 0,06% (m/v) Azul Brilhante de Coomassie (CBB) G-250 em 10% (v/v) de Ácido Acético, após passo anterior de fixação em 25% (v/v) 2-Propanol e 10% (v/v) de Ácido Acético. As imagens dos géis foram obtidas utilizando-se um Imager Scanner (GE Healthcare Bio-Science) acoplado ao software LabScan. As análises dos géis foram realizadas utilizando-se o software ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare Bio-Science).

4.6. PURIFICAÇÃO DA LV-RANASPUMINA

Lv-ranaspumina foi purificada a partir do fluido da espuma por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, seguida de cromatografia líquida da alta eficiência em fase reversa, RP-HPLC (SHIMADZU Co., Kyoto, Japão). 50 mg do fluido liofilizado foram dissolvidos em 5 mL tampão Tris-HCl (pH 7,3) 0,05 M e aplicados na coluna de DEAE-celulose, previamente equilibrada com o mesmo tampão para um fluxo de 1,5 mL/min. Utilizou-se, ainda, o mesmo tampão para eluição das proteínas não-retidas. As proteínas adsorvidas foram eluidas de forma isocrática com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,3, contendo NaCl 0,5 M. A fração retida foi dialisada contra água ultrapura, utilizando-se membranas de diálise com exclusão 10 kDa e, em seguida, liofilizada. 2,0 mg desta fração foram dissolvidos em água ultrapura contendo 0,1% (v/v) TFA (Solvente A) e submetidos a RP-HPLC equipado com uma coluna "Source" 15RPC ST 4.6/100 (GE Healthcare Bio-Science), previamente lavada com acetonitrila (ACN) contendo TFA 0,1% (v/v) (solvente B) e equilibrada com o solvente A. As frações foram eluidas e coletadas manualmente sob um gradiente linear (2 a 98%) de solvente B, de 5 a 48 minutos, sob um fluxo de 1 mL/min.

Após a coleta das frações, estas foram liofilizadas e analisadas em gel de Tricina-SDS-PAGE (Schägger e Von Jagow, 1987), revelado por solução de Nitrato de Prata (Blum *et al.*, 1987).

Alternativamente, 50 mg de fluido liofilizado dissolvido em 5 ml Tris-HCl 20 mM pH 8,0 foram primeiro submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de Mono Q 4.6/100 (GE Healthcare), previamente equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas não retidas foram eluidas com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e as proteínas retidas foram eluidas com um gradiente linear de Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 0-1M (aplicados 5 vezes o volume da coluna). Seguiu-se o processo de purificação com cromatografia de

exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HiLoad 26/60 (GE Healthcare), equilibrada com 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo NaCl 100 mM, previamente calibrada com padrões de massas moleculares (Bio-Rad) para confirmação da massa molecular da proteína de interesse. A fração correspondente a esta proteína foi concentrada para 14,8 mg/mL (baseado na quantificação por Bradford) para utilização nos ensaios de cristalização. A homogeneidade da amostra foi determinada por análise em SDS-PAGE (gel 12%), utilizando-se marcadores de massa molecular (Thermo Scientific).

4.7. DESNATURAÇÃO E CARBAMIDOMETILAÇÃO COM IODOACETAMIDA DA PROTEÍNA LV-RANASPUMINA

Lv-ranaspumina foi desnaturada através de incubação em 0,05 M de DTT contendo Uréia 3,5 M e Tiouréia 1 M (70 °C, 60 min), com posterior adição de 0,05 M de Iodoacetamida (IAA) (37 °C, 60 min). Essa amostra foi exaustivamente dialisada contra água ultrapura em uma unidade de ultrafiltração Amicon® (Millipore, MA, USA), liofilizada. A proteína, nas formas nativa e desnaturada, foi analisada por dicroísmo circular e utilizada nos ensaios de emulsificação.

4.8. ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA POR DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

Os conteúdos de estrutura secundária da proteína purificada foram avaliados por espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Os espectros de CD foram realizados em um espectropolarímetro de CD Jasco J-815 (Tokyo, Japão) nos comprimentos de onda entre 190 a 250 nm, em cubetas cilíndricas de quartzo de caminho óptico de 1 mm, a 25 °C. Cada espectro foi obtido pela média de 8 varreduras e pela subtração do espectro de referência. O resultado foi expresso em elipticidade molar (θ). Os espectros de CD da proteína nativa e desnaturada (0,2 mg/mL) foram medidos em água ultrapura. A estimativa do conteúdo de estrutura secundária foi realizado com o pacote de desconvolução CDPro, com os programas *Selcon3*, *Continll* e *CDSSTR* utilizando-se um conjunto de referência contendo espectros de CD de 56 proteínas (Provencher e Glockner, 1981; Sreerama e Woody, 1993; Johnson, 1999).

Foi realizado também uma varredura por temperatura (Thermoscan) no comprimento de onda 208 nm, na faixa de 20 °C até 95 °C sendo medida a cada 0,2 °C.

4.9. CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

A proteína foi analisada quanto à presença de fosforilação e N-glicosilação. Desse modo, a proteína foi desfosforilada e desglicosilada para em seguida verificar mudanças em sua massa, por espectrometria de massa e SDS-PAGE com revelação por prata, tendo a proteína não modificada como referência. Para a desfosforilação, incubaram-se 28,5 U da enzima Fosfatase Alcalina da mucosa intestinal bovina (Catálogo P0114, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) com 25 µg da Lv-ranaspumina em 5 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM NaCl, 1mM MgCl₂ e 0,1 mM DTT por 30 min a 30 °C, num volume final da reação de 25 µl. Utilizou-se fosfitina como controle positivo. Para a desglicosilação, utilizou-se o kit de desglicosilação da companhia *BioLabs* (Catálogo P6039S, Ipswich, MA, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Para tanto, se utilizou 25µg da Lv-ranaspumina para um volume final de 25µl. Fetuína foi usada como controle positivo.

4.10. CARACTERIZAÇÃO POR DIFUSÃO DINÂMICA DA LUZ (DLS)

A caracterização por Difusão Dinâmica da Luz (DLS) da proteína em solução foi realizada a fim de se determinar sua homogeneidade em solução. O espalhamento dinâmico da luz é um meio rápido de acessar a distribuição de tamanho das moléculas em solução. Essa análise é comumente realizada antes de iniciar os passos de cristalização de uma proteína, pois a presença de heterogeneidades conformacionais dificultam as moléculas de proteínas de se arranjamem de forma ordenada, como o requerido para a formação de um cristal. A proteína foi dissolvida em água ultrapura ou em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 100 mM NaCl e centrifugada por 16 000 g por 10 min a 4 °C, sendo testada nas concentrações de 1 mg/ml e 6,7 mg/ml a 25 °C, no instrumento "Protein Solutions DynaPro MS/X" controlado pelo software Dynamics v6, utilizando-se uma cubeta de quartzo com capacidade mínima de 12 µl.

4.11. ESPECTROMETRIA DE MASSA (MS)

4.11.1. Análise das isoformas de Lv-ranaspumina

Os *spots* correspondentes as isoformas da proteína de interesse revelados nos géis de eletroforese 2D na faixa de pH 4,0-7,0, foram excisados do gel, descorados com 50 mM NH_4HCO_3 , desidratados com 100% Acetonitrila, secadas em *Speedvac* (Labconco, Kansas, Mi, USA) e reidratados com a solução de digestão (12,5 ng/ μL de Tripsina em 50 mM NH_4HCO_3). Após 1 h de incubação a 4 °C, o sobrenadante da solução de digestão foi substituído por 50 mM NH_4HCO_3 e deixado *overnight* a 37 °C. Posteriormente, a solução de digestão foi extraída por 30 min com 10 μL de 25 mM NH_4HCO_3 /Acetonitrila (1:1, v/v), sendo o sobrenadante contendo os peptídeos trípticos secados em *SpeedVac* e armazenados a -20 °C. Os produtos da digestão foram dissolvidos em 10 μL de água ultrapura e 1,0 μL da mistura de cada peptídeo foi dissolvido (1:3, v/v) na solução da matriz constituída por Ácido α -Ciano-4-Hidroxicinâmico (HCCA) (10 mg/mL HCCA em 50% (v/v) Acetonitrila e 10% (v/v) TFA), aplicados em triplicata em uma placa MALDI do tipo "Anchorship" 600 μm (384 poços) e deixadas secar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 min. As massas monoisotópicas dos peptídeos foram obtidas em modo refletido, utilizando-se um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlexII (Bruker Daltonics, Billerica, MA) equipado com laser SmartBeam™ e controlado pelo software FlexControl 2.4, com calibração externa utilizando-se o *Peptide Calibration Standard Mixture* (Bruker Daltonics).

4.11.2. Análise da proteína nativa e desnaturada

As massas monoisotópicas da proteína nativa e desnaturada e após tratamentos de deglicosilação e desfosforilação foram obtidas em modo positivo linear utilizando espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF Bruker Ultraflex extreme (Bruker Daltonics) com calibração externa utilizando-se o *Protein Calibration Standard Kit I* (Bruker Daltonics).

4.11.3. Sequenciamento *de novo*

A banda correspondente à proteína Lv-ranaspumina foi excisada de géis SDS-PAGE (Laemmli, 1970), descoradas, reduzidas com DTT, alquiladas com Iodoacetamida e secadas em *Speedvac* para posteriores digestões enzimáticas. Digestões *in gel* com Tripsina (Promega), Asp-N (Roche), Quimotripsina (Roche), Glu-C (New England BioLabs Inc.) e Lys-C (Promega) foram realizadas seguindo os protocolos recomendados pelos fabricantes. As amostras foram deixadas *overnight*, para digestão completa, ou 40 min, para digestão parcial. Os peptídeos obtidos com a digestão enzimática foram extraídos com 25 mM NH_4HCO_3 por 15 min a 37 °C sob agitação (550 rpm), com um segundo passo de desidratação com Acetonitrila por 15 min, seguido de um terceiro passo com 5 % de Ácido Fórmico por 15 min e, em seguida, Acetonitrila por 15 min; após cada passo, retirou-se o sobrenadante contendo os peptídeos da digestão e este foi seco em *Speedvac*. Os peptídeos da digestão enzimática foram ressuspensos na fase móvel e submetidos a nano cromatografia líquida de fase reversa (nano LC) equipada com coluna Zorbax 300SB-C18 (3,5 μm , 1500 mm x 75 μm ; Agilent Technologies, Alemanha). A fase móvel foi um gradiente de acetonitrila contendo 0,1 % (v/v) de Ácido Trifluoroacético (TFA) e água também contendo 0,1% (v/v) TFA. A nano LC estava acoplada a um MALDI *spotter* (SunChrom, Alemanha), onde as frações foram misturadas à solução da matriz de α -Ciano-4-Hidroxicinâmico (HCCA) e aplicadas a uma placa do tipo AnchorChip (Bruker Daltonics). As massas monoisotópicas foram obtidas em modo refletido utilizando espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF Bruker Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) com calibração externa, utilizando *Peptide Calibration Standard Mixture* (Bruker Daltonics). Os espectros de MS/MS foram obtidos por fragmentação em modo LIFTTM/CID. Sequências primárias dos peptídeos foram manualmente interpretadas utilizando-se o programa FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonica) (Gogichaeva *et al.*, 2007; Williams e Alterman, 2007) e as sequências obtidas submetidas a alinhamento realizado por NCBI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) e analisadas no programa BioTools (Bruker Daltonics) para validação. Os aminoácidos isoméricos isoleucina e leucina não puderam ser diferenciados, bem como os aminoácidos de mesma massa, lisina e glutamina.

4.12. CRISTALOGRAFIA DA PROTEÍNA LV-RANASPUMINA

4.12.1. Cristalização

Um total de 384 condições iniciais de cristalização foram testadas, utilizando-se vários kits de cristalização disponíveis comercialmente: Index (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA), Morpheus (Molecular Dimension, Newmarket, Reino Unido), JCSG+ Suite (Qiagen, Germantown, MD, USA), PEG/Ion (Hampton Research). Os cristais mais promissores cresceram no kit PEG/Ion a 20 °C pelo método de difusão de vapor com gota-sentada, onde as gotas foram preparadas pelo robô OryxNano (Douglas Instruments LTD). A gota consistiu de 0,7 µl da solução de proteína (14,8 mg/ml) misturada a 0,7 µl da solução do reservatório, sendo o volume do reservatório 70 µl. As gotas foram monitoradas por estereomicroscopia. Os períodos de crescimento dos cristais variaram bastante dependendo da condição, demorando entre três semanas para o aparecimento dos primeiros cristais se estendendo até nove meses para aparecimento de outros. Os cristais possuindo melhor qualidade de difração foram escolhidos para continuidade dos experimentos.

4.12.2. *Screening* de incorporação de metais pesados para MAD e SAD

Devido à inexistência de uma estrutura de proteína com alta similaridade à Lv-ranaspumina nos bancos de dados de proteínas, não foi possível resolver o problema de endereçamento das fases por substituição molecular. Desse modo, optou-se pelos métodos de substituição isomórfica (SAD) e dispersão anômala a múltiplos comprimentos de onda (MAD) a partir da incorporação com átomos pesados. Para a escolha do átomo pesado ideal, realizaram-se testes seguindo a metodologia de Joyce *et al.* (2010) com adaptações, nos quais alguns compostos mais utilizados foram testados: HgCl₂, K₂PtCl₄, KAu(CN)₂ e Pb(CH₃COO)₂.3H₂O, sendo a proteína (1 mg/ml) posta em contato (2 h) com um grão do átomo pesado e, em seguida, a mistura foi analisada por espectrometria de massa em MALDI TOF. As misturas a serem testadas foram dissolvidas na solução de matriz constituída e analisadas por espectrometria de massa (MS), seguindo-se o mesmo protocolo do utilizado para análise por MS do cristal que será descrita mais adiante.

4.12.3. Programas para coleta de dados, processamento e determinação da estrutura

Os dados de difração obtidos foram indexados e integrados utilizando-se o programa XDS (Kabsch, 2010) e o programa MOSFLM (Leslie, 2006; Batty *et al.*, 2011), e as intensidades reduzidas pelo SCALA (Evans, 2006). O programa POINTLESS foi utilizado para confirmar a atribuição do grupo espacial (Evans, 2006), *Phenix.Xtriage* (Adams *et al.*, 2010) para verificar a qualidade dos dados, e o Mathews-Coefficient disponível no pacote CCP4 para o cálculo do coeficiente de Mathews (Kantardjieff e Rupp, 2003) e, conseqüentemente, obtenção do percentual de solvente, SHELXC/D/E (Sheldrick, 2010) para processamento de MAD e SAD.

Devido ao indício de uma predominância de α -hélices determinado por CD e ao fato do cristal ter difratado a uma boa resolução, testou-se também o programa de solução de fases por *ab initio*, ARCIMBOLDO (Rodríguez *et al.*, 2012). Concomitantemente, utilizou-se o programa de busca, WSMR (*Wide search molecular replacement*) para resolver o problema das fases, sendo a substituição molecular realizada pelo PHASER (McCoy *et al.*, 2007).

O modelo inicial foi refinado utilizando-se os programas REFMAC, PHENIX e COOT (Murshudov *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2010; Emsley e Cowtan, 2004). Os valores de R_{free} foram computados com 5% de reflexões escolhidas aleatoriamente e omitidas do processo de refinamento. Após obtenção do modelo utilizou-se o programa MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010) para validação da estrutura. As imagens das estruturas foram montadas com o programa PyMOL (DeLano Scientific, <http://www.pymol.org/citing>). O programa VASCO foi utilizado para definição da polaridade da superfície da proteína (Steinkellner *et al.*, 2009). Os programas SPIDER (Porollo e Meller, 2007) e cons-PPI (Chen e Zhou, 2005) foram utilizados para predição de regiões de interação com outras proteínas.

Visando-se comparar a estrutura da Lv-ranaspumina com outras ranaspuminas, utilizaram-se estruturas conhecidas e depositadas em bancos de estruturas de proteínas (PDB). Também se modelou uma estrutura para a ranaspumina de *L. fuscus* a partir de sua sequência de aminoácidos que se encontra disponível no NCBI (número de acesso GenBank: AAT66300.1), utilizando-se o programa de modelagem molecular YASARA (Krieger *et al.*, 2002).

4.12.4. Análise do cristal por Espectrometria de Massa

Um cristal de Lv-ranaspumina foi colhido da condição No. 8 do kit PEG/Ion (0,2 M KCl, 20% (m/v) e PEG 3350 pH 7,0) e lavado duas vezes com a solução do reservatório (0,2 M KCl, 20% (m/v) e PEG 3350 pH 7,0). O cristal foi esmagado e 1,0 µl foi misturado com 1,0 µl de 2% TFA e 1,0 µl de solução da matriz (15,2 mg/ml 2,5-Dihidroxiacetofenona e 20 mM de Citrato de Amônio Dibásico em 75% (v/v) de Etanol) e 1,0 µl desta mistura foi aplicada em placa de MALDI do tipo Anchorship 600 µm e deixada secar a temperatura ambiente, na ausência de luz. A amostra foi analisada por espectrometria de massa, MALDI-TOF (UltrafleXtreme) operando em modo positivo linear com aquisição de espectros na faixa de m/z 6000 a 100000. A calibração externa foi realizada utilizando-se o kit *Protein Standard II* (Bruker Daltonics).

4.13. ENSAIOS DE ATIVIDADE EMULSIFICANTE

A atividade emulsificante da proteína purificada foi testada em condições nativa e desnaturada, seguindo-se metodologia de Iqbal, Khalid e Malik (1995) com adaptações. O volume de 0,9 mL da proteína nativa ou desnaturada (0,1 mg/mL) foi transferido para um tubo de 10 mL contendo 0,9 mL de querosene. Os tubos foram homogeneizados em *vortex* por 2 min e deixados em repouso por 24 h, à temperatura ambiente, para medição do índice de emulsificação após 24 h (E24%). O E24% foi calculado através da equação $E24 = (\text{altura da camada emulsificada} / \text{altura da camada total}) \times 100$.

4.14. ENSAIO DE REDUÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL DA ÁGUA

Para o ensaio de redução da tensão superficial da água, Lv-ranaspumina foi testada na faixa de concentração de 0,015 µg/mL a 1500 µg/ml e o fluido bruto do ninho de espuma, 0,01 µg/ml a 1500 µg/ml). Como controle positivo foi usado a proteína Albumina sérica bovina (BSA, Sigma), na faixa de concentração 0,01 µg/ml a 3300 µg/ml e como controle negativo, Lisozima (Fluka) nas concentrações de 0,01 µg/ml a 2000 µg/ml. Todas as amostras foram diluídas em água ultrapura.

As medidas de tensão superficial foram realizadas pelo método da gota pendente em que a gota formada é iluminada por um feixe de luz uniforme, utilizando-se um sistema

de ângulo de contato (DataPhysics, OCA-Alemanha) e seu perfil é acompanhado por uma câmera CCD. O tamanho e a forma da gota formada na ponta de uma agulha em uma seringa foram analisados pelo *software* SCA20 (DataPhysics, Figura 10), utilizando-se a equação de Laplace:

$$\frac{2}{R_0} - \frac{\Delta\rho g}{\sigma} y = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} = 2\mathcal{H}$$

Onde R_0 é o raio da curvatura da gota quando $y=0$, R_1 é o raio da curvatura quando $y=1$, R_2 é o raio da curvatura quando $y=2$, $\Delta\rho = \rho f1 - \rho f2$ é a diferença na densidade de dois fluidos, σ é a tensão superficial e \mathcal{H} é a média da curvatura da superfície livre.

O diâmetro interno da agulha $\phi = 1,36$ mm e o volume da gota ~ 20 μ l. A temperatura foi mantida constante a 20 ± 1 °C. O erro experimental foi estimado pelo desvio padrão da média das triplicatas.

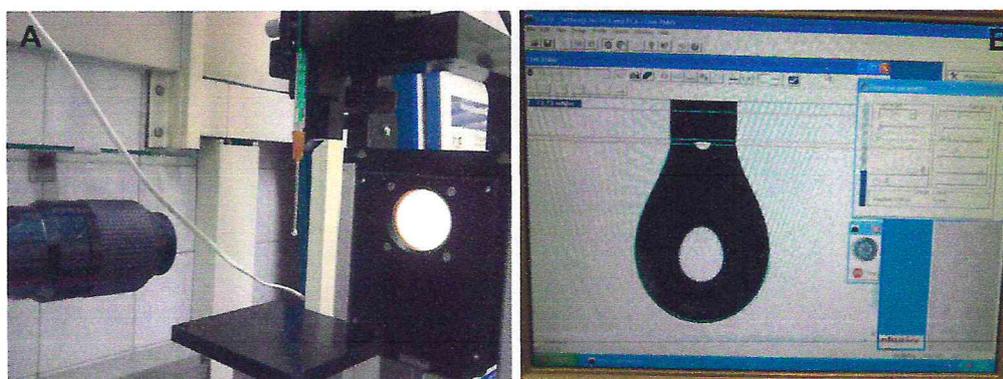


Figura 10. Experimento da gota pendente. A) A gota é iluminada e acompanhada por câmera CCD. B) Imagem da gota formada digitalizada pelo programa SCA20 para cálculo da tensão superficial usando a equação de Laplace.

5. RESULTADOS

5.1. IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA LV-RANASPUMINA NA RÃ *L. VASTUS*

O anticorpo policlonal anti-Lv-ranaspumina detectou a presença de Lv-ranaspumina nas regiões anterior e posterior (região glandular do oviduto) do oviduto. O anticorpo também reconheceu Lv-ranaspumina no fluido total do ninho de espuma. Lv-ranaspumina não foi detectada no ovário e também nos órgãos do macho, testículo e cloaca. A Figura 11 mostra os órgãos analisados, ressaltando o alargamento da região posterior do oviduto. A Figura 12 mostra a composição de proteínas extraídas de cada órgão e a detecção de Lv-

ranaspumina, revelada pela reação com seu anticorpo. Interessante destacar que por se tratar de um anticorpo policlonal, ele reagiu com outras proteínas das regiões anterior e posterior do oviduto, demonstrando que essas proteínas e Lv-ranaspumina compartilham similaridades antigênicas.

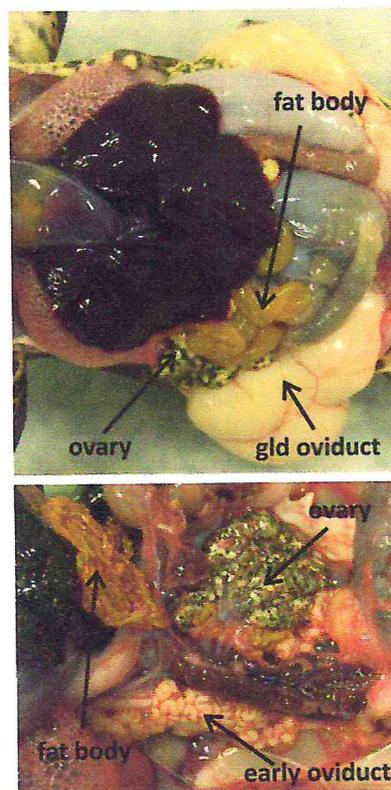


Figura 11. Sistema urogenital da fêmea de *Leptodactylus vastus*, onde *gld oviduct* é uma abreviação para a região glandular do oviduto, também chamada região posterior do oviduto e *early oviduct*, equivale à região anterior do oviduto, locais onde Lv-ranaspumina foi detectada.

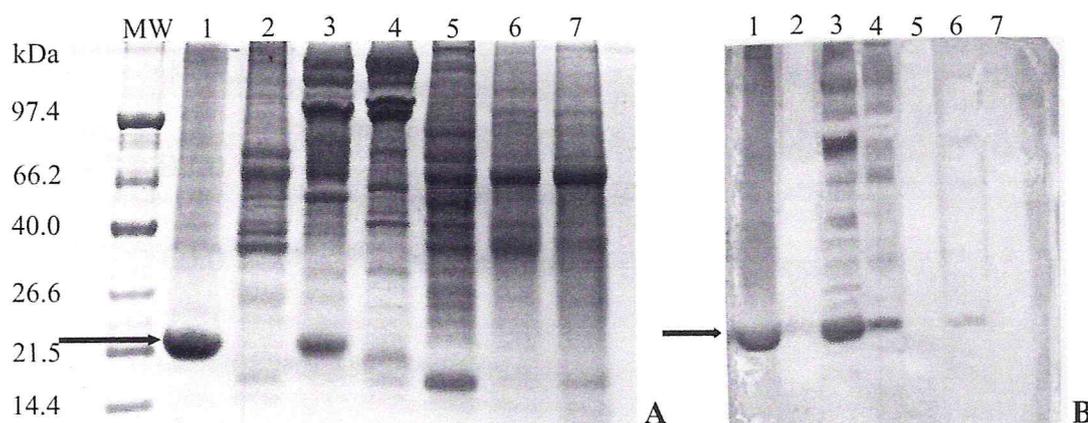


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE; gel 12,5%) do ninho de espuma e extratos brutos de órgãos reprodutores de *L. vastus*, aplicados 10 µg de proteínas totais/raia A) MW - Marcadores de massa molecular. 1- Fluido da espuma; 2- ovário, 3- região posterior (glandular) do oviduto, 4- região anterior do oviduto, 5- testículo, 6- cloaca da fêmea e 7- cloaca do macho. B) *Western blotting* das proteínas presentes no gel da Figura A reconhecidas pelo anticorpo anti-Lv-ranaspumina. A seta indica a proteína Lv-ranaspumina.

5.2. PERFIL DOS GÉIS 2D DO FLUIDO DO NINHO DE ESPUMA DE *L. VASTUS*

Uma rica diversidade de proteínas, com massas moleculares variando de 103,0 kDa a 7,0 kDa foram visualizadas no gel na faixa de pH 3,0 – 10,0 da primeira dimensão. Os *spots* correspondentes a cada proteína foram discriminados usando o programa Image Master 2D Platinum (GeHealthcare). Lv-ranaspumina apareceu como uma banda larga, com massa molecular de 23 kDa (Figura 13.A) e pI 5,0, correspondendo aproximadamente a 45% de todas as bandas de proteínas reveladas no gel. Na faixa de pH entre 4,0 e 7,0 a banda larga referente à ranaspumina foi dividida em 5,0 *spots*, que juntos perfazem 60,6 % das proteínas totais no gel (Figura 13.B). Essas 5,0 isoformas apresentaram massas moleculares variando entre 23,8 e 24,1 kDa e valores de pIs de 4,6 a 5,1. Três dos *spots* mais proeminentes (a, b, c) foram selecionados para proteólise com tripsina e análise por espectrometria de massa.

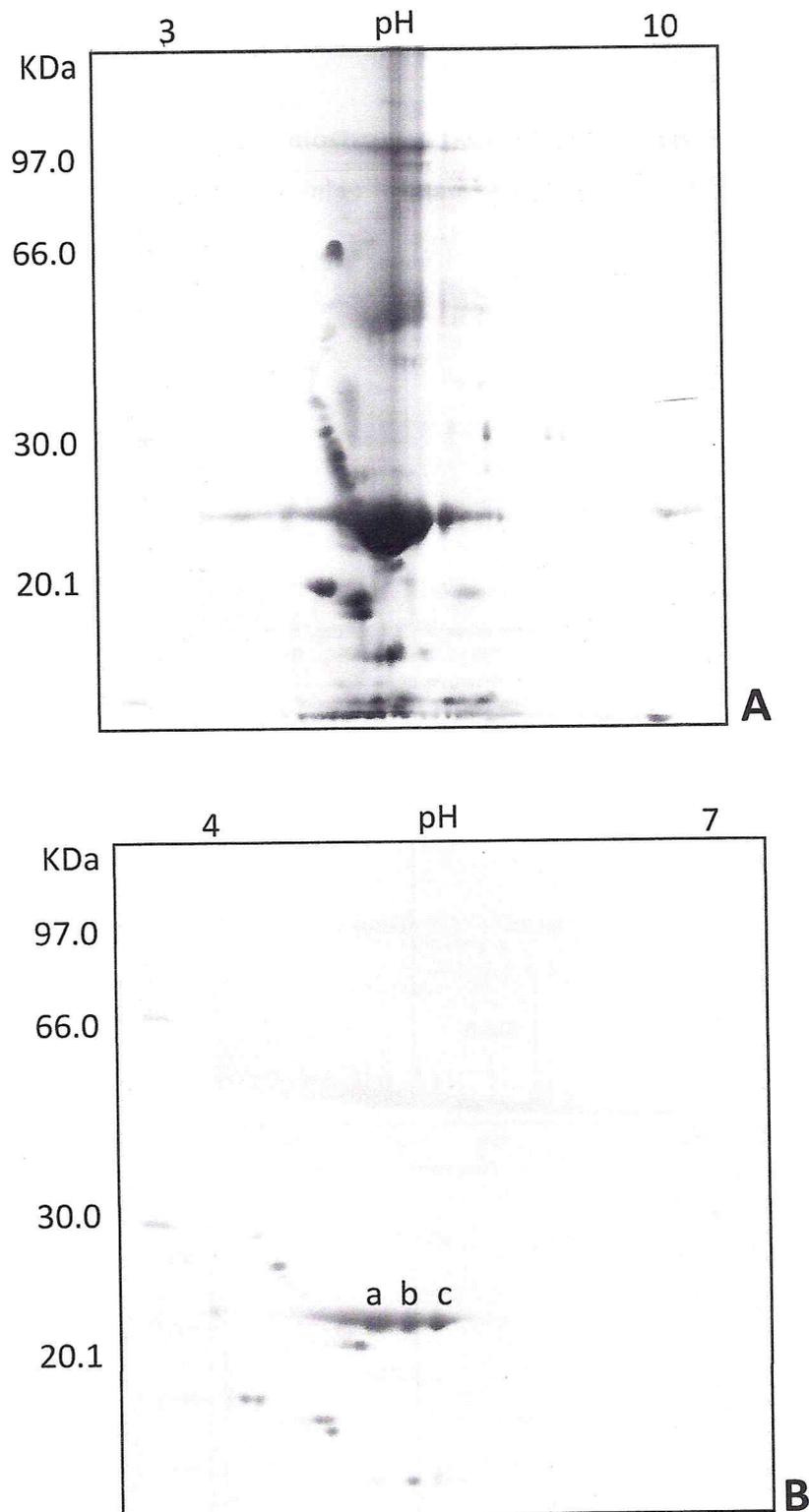
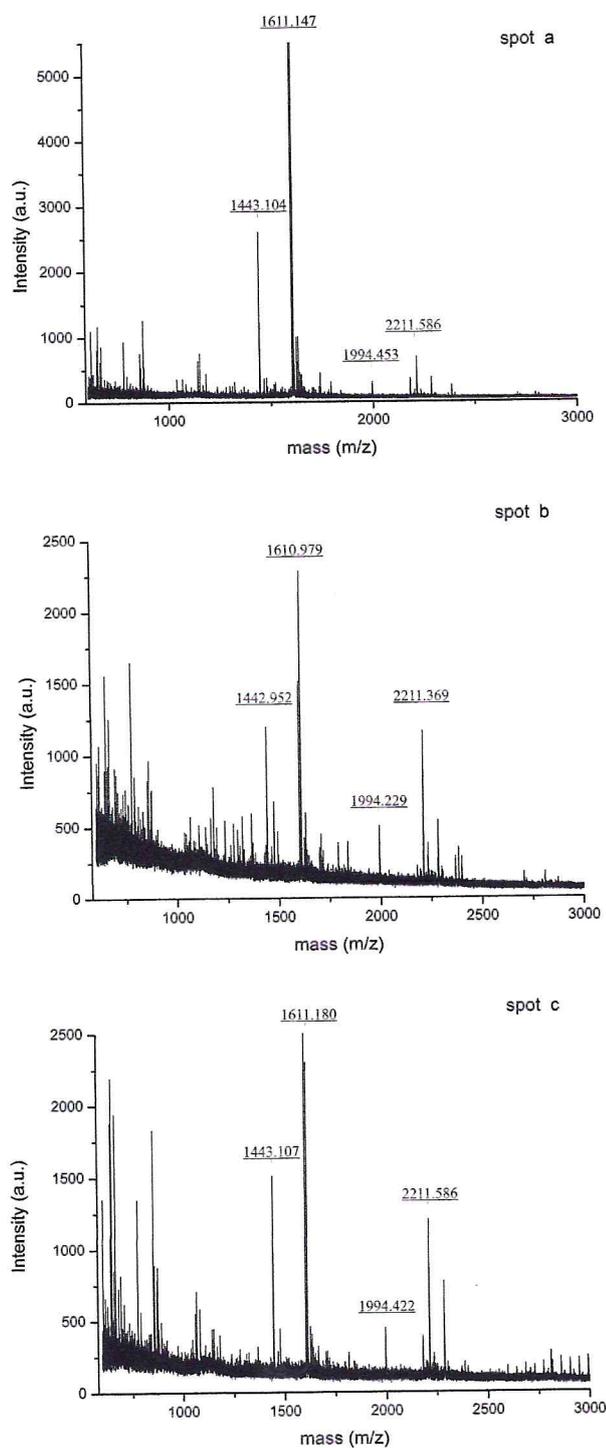


Figura 13. Eletroforese bidimensional (Géis 2D-SDS-PAGE 12,5%) das proteínas do fluido do ninho de espuma de *L. vastus* corados com azul brilhante de Coomassie G-250. Isofocalização dos géis na faixa de pH de 3,0 - 10,0 (A) e 4,0 - 7,0 (B). Foram aplicados 370 µg de proteínas em A e 92 µg de proteínas em B. As bandas a, b e c foram excisadas e analisadas por espectrometria de massa.

5.3. ESPECTRO DE MS

Os espectros de massas (MS) mostraram perfis similares para as isoformas a, b e c de Lv-ranaspumina sugerindo que elas devam possuir seqüências de aminoácidos



similares (Figura 14).

Figura 14. Perfis dos espectros gerados a partir da análise por MALDI-TOF (modo refletido) dos três spots (a, b, c) excisados dos géis de 2D correspondendo à Lv-ranaspumina e digeridos com tripsina.

5.4. ESTUDO DA PROTEÍNA LV-RANASPUMINA

5.4.1. Purificação por RP-HPLC

Lv-ranaspumina foi purificada em coluna de DEAE-celulose seguido de RP-HPLC. Todos os picos foram analisados por tricina-SDS-PAGE e o pico majoritário, eluído com 78% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA, correspondeu à Lv-ranaspumina (Figura 15.). Esse resultado revelou o caráter hidrofóbico da proteína. A estratégia de purificação rendeu uma proteína livre de impurezas, como mostrado na Figura 16.

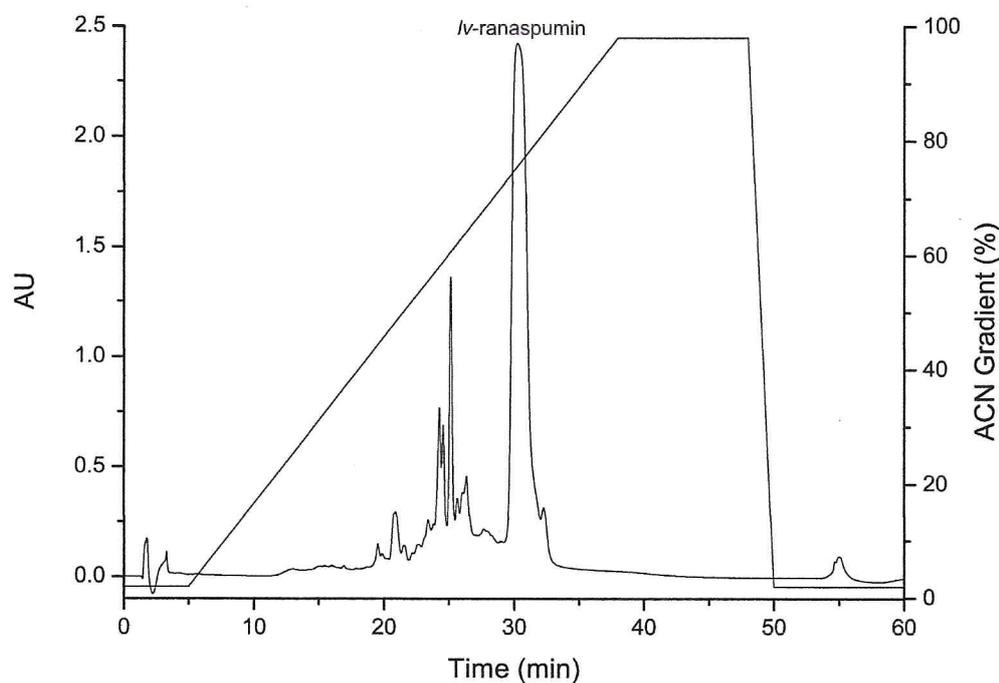


Figura 15. Purificação da proteína Lv-ranaspumina por RP-HPLC, coluna Source 15RPC ST 4.6/100 (GE Healthcare). A proteína foi eluída com acetonitrila 78% contendo TFA 0,1%.

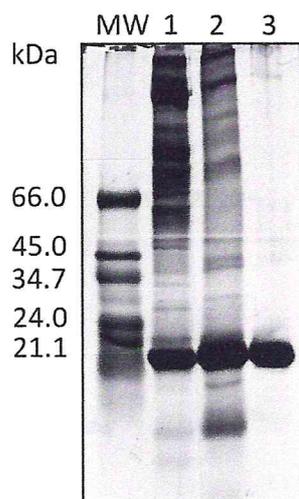


Figura 16. Eletroforese em gel desnaturante Tricina-SDS-PAGE revelado com nitrato de prata mostrando as etapas de purificação da proteína Lv-ranaspumina. MW - Marcadores de massa molecular (Sigma), 1- Amostra bruta do ninho de espuma da rã Lv-ranaspumina (3 μ g), 2- Proteínas do ninho de espuma retidas na cromatografia com DEAE-celulose (3 μ g) e 3- Lv-ranaspumina purificada por RP-HPLC (3 μ g).

A massa molecular de Lv-ranaspumina observada por Tricina-SDS-PAGE foi confirmada por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 26/60, calibrada com marcadores de massas moleculares, provando tratar-se de uma proteína monomérica de 23,5 kDa (Figura 17.A). Todavia, foram verificados picos remanescentes de baixa e alta massas moleculares (Figura 17.B), que foram coletados e usados em ensaios de redução da tensão superficial para confirmar se tratavam-se de contaminantes com atividade surfactante.

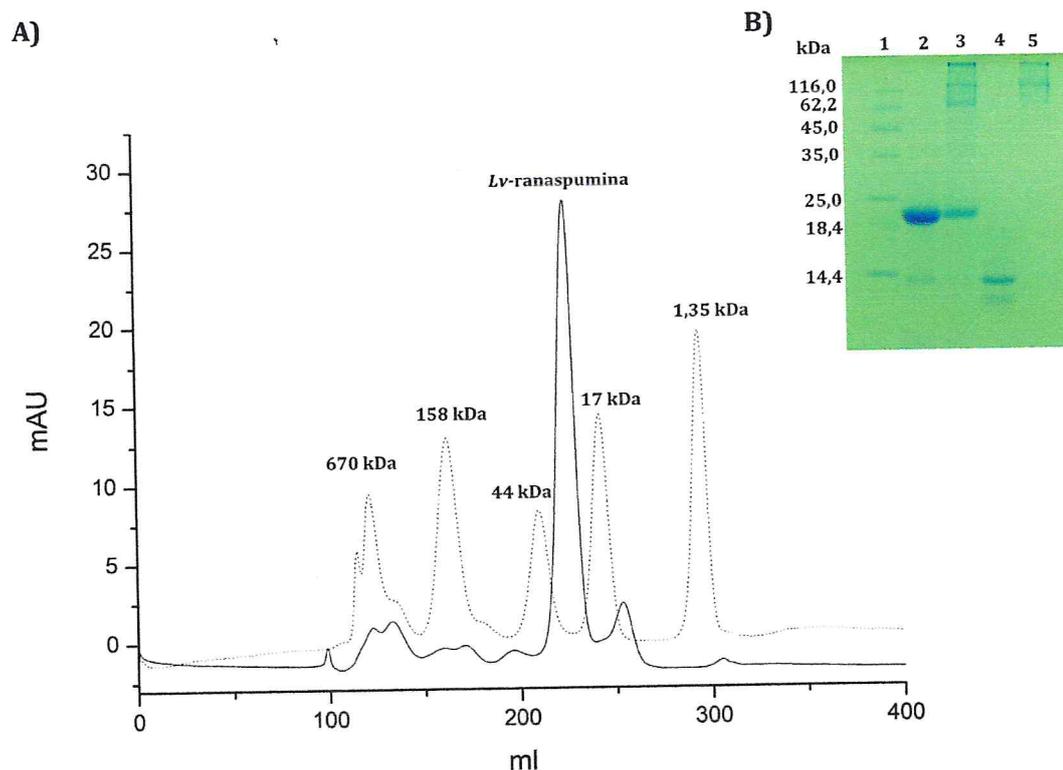


Figura 17. A) Cromatograma da Lv-ranaspumina em coluna Superdex 200 26/60 (linha contínua) e padrões de massas moleculares (linha descontinua). B) Eletroforese em gel de poli-acrilamida-SDS em condições redutoras: 1- Marcadores de massa molecular, 2- Pico majoritário da cromatografia em Superdex 200 (5 µg), 3- Fluido total do ninho de espuma (5 µg), 4- Proteínas de baixa massa molecular separadas na coluna de Superdex 200 (5 µg) e 5- Proteínas de alta massa molecular separadas na coluna de Superdex 200 (5 µg).

5.4.2. Espectrometria de massa

Os espectros de massa da proteína nativa (Figura 18.A) mostraram picos de m/z 23106 e 23551. Quando desnaturada com carbamidometilação (Figura 18.B) houve uma alteração na m/z dos picos para 23565 e 24010, respectivamente. A diferença de massa obtida após redução com DTT e alquilação com IAA de $\sim 474 m/z$ ao ser dividida por 57 kDa (massa de cada carbamidometilação) mostra a presença de, pelo menos, 8 cisteínas, que podem formar até 4 pontes dissulfeto.

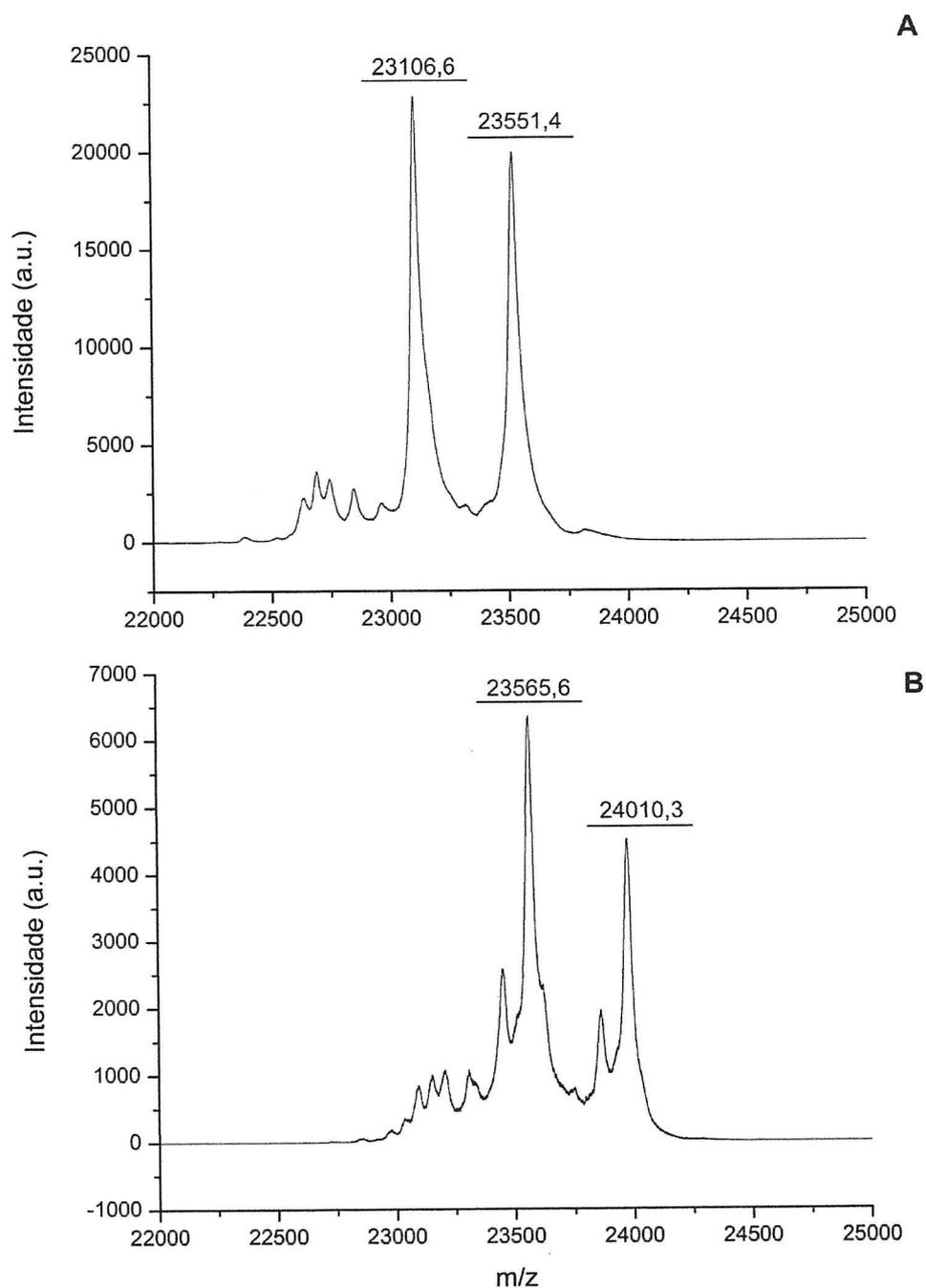


Figura 18. Espectrometria de massa da proteína Lv-ranaspumina nativa (A) e da proteína após redução com ditiotreitol e alquilação com iodoacetamida (B), mostrando mudança de massa devido à incorporação de grupos carbamidometilas nos resíduos de cisteínas.

5.4.3. Modificações pós-traducionais

Os resultados da análise das modificações pós-traducionais podem ser visualizados na Figura 19. Como mostrado no gel, Lv-ranaspumina não sofreu alteração da sua massa após sofrer desfosforilação e desglicosilação. As outras bandas proteicas que aparecem nas raiais da proteína tratada e que não estão presente na raia referente à proteína sem tratamento, correspondem às enzimas utilizadas. As diferenças de massas devidas à desfosforilação e desglicosilação podem ser percebidas nos controles, fosfitina e fetuína, respectivamente. Importante ressaltar que a raia referente à fetuína tratada possui também as enzimas de desglicosilações e a fosfitina tratada possui também a espessa banda correspondente à fosfatase, quando comparada com a fosfitina não tratada.

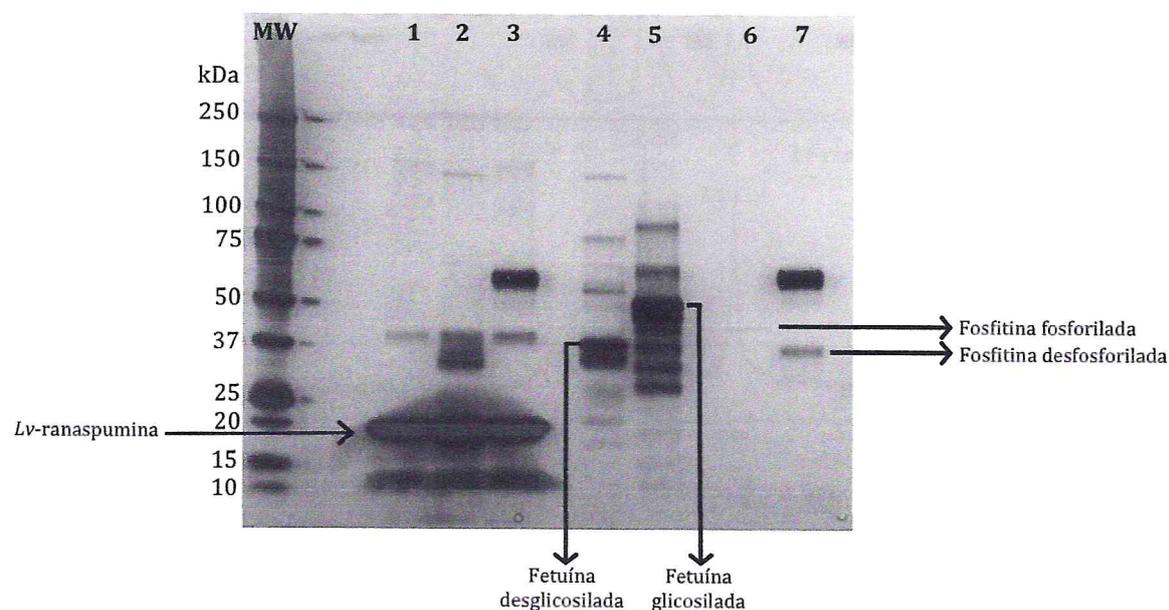


Figura 19. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE 12,5%) da proteína Lv-ranaspumina nativa e após tratamento para desfosforilação e desglicosilação. MW- Marcadores de massa molecular, 1- Lv-ranaspumina nativa, 2- Lv-ranaspumina após tratamento de desglicosilação, 3- Lv-ranaspumina após tratamento de desfosforilação, 4- Fetuína desglicosilada, 5- Fetuína nativa, 6- Fosfitina nativa e 7- Fosfitina desfosforilada.

A ausência de fosforilação ou N-glicosilação também pode ser observada pelos espectros de massa. A Figura 20 mostra os espectros de massa da proteína em uma faixa de m/z entre 21 a 25 kDa, onde não se observa uma diminuição da massa após tratamentos enzimáticos. Os espectros também mostram a existência de duas principais espécies, com uma diferença de massa por volta de 400 Da, referente à presença de duas isoformas

principais. Resultados prévios da eletroforese 2D em faixa de pH 4,0– 7,0 já apontavam a existência de isoformas para a proteína em estudo.

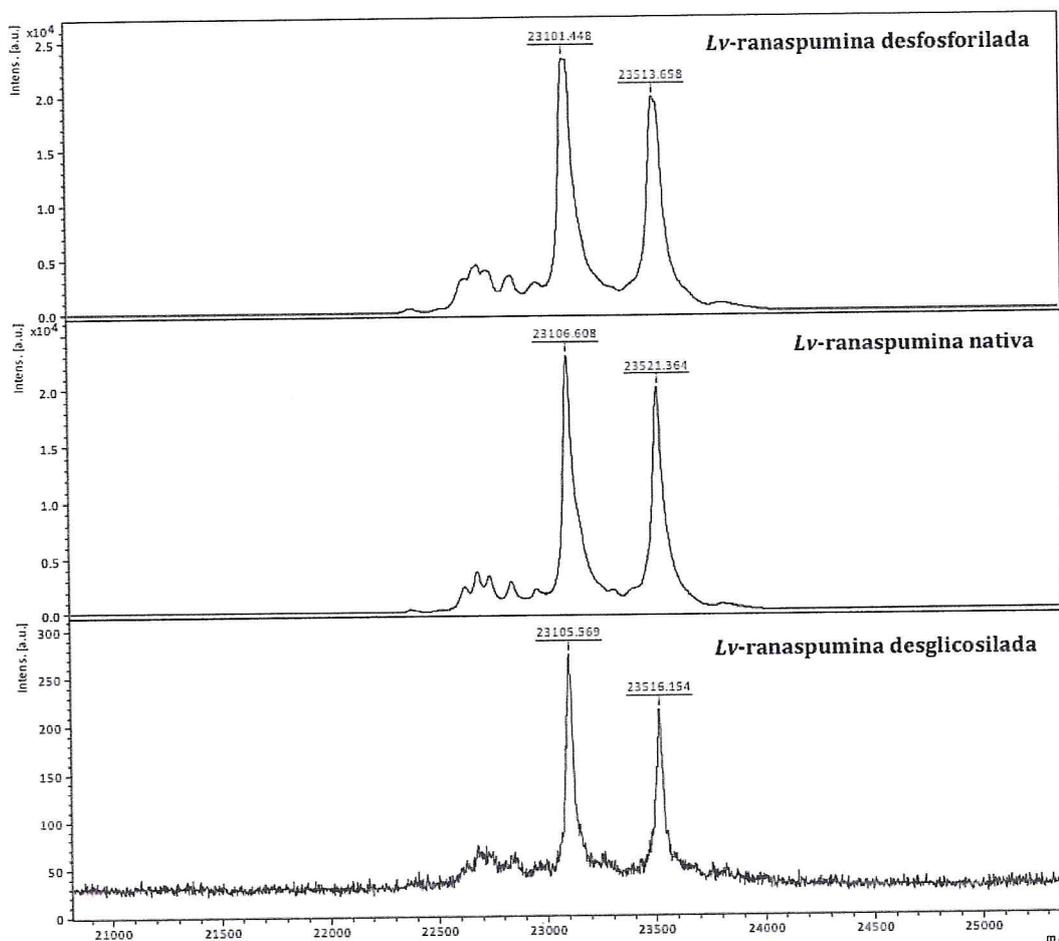


Figura 20. Espectros de massa da proteína Lv-ranaspumina após tratamentos enzimáticos de desfosforilação e desglicosilação, comparados com a da proteína nativa.

5.4.4. Dicroísmo circular (CD)

Para determinar o conteúdo de estrutura secundária entre as formas nativa e desnaturada, espectros de CD foram obtidos e os resultados podem ser vistos na Figura 21. O espectro de CD da proteína nativa é caracterizado pela presença de dois mínimos a 222 e 207 nm e uma máxima a 193 nm, típico de uma proteína rica em α -hélice. A desconvolução do espectro de CD da proteína nativa indica constituição de 85% de α -hélices, 1% de folha- β , 1% de alças e 13% de estrutura desordenada. O espectro de CD da proteína após processo de desnaturação, redução e alquilação mostra que há uma redução do conteúdo de estrutura secundária quando comparada com a forma nativa.

Sabendo-se que o monitoramento de sinais em CD por aumento da temperatura pode fornecer informações da estabilidade de proteínas (Kelly *et al.*, 2005), foi realizado também a análise do espectro de CD e o acompanhamento da intensidade em comprimento de onda 208 nm, em uma faixa de temperatura de 20 °C a 95 °C. Os resultados podem ser vistos na Figura 22 e Figura 23 em que o espectro de CD e a intensidade da absorbância no comprimento de onda 208 nm permaneceram estáveis frente ao aumento de temperatura, indicando que a faixa de temperatura testada não influenciou de forma significativa o conteúdo de elementos da estrutura secundária da proteína.

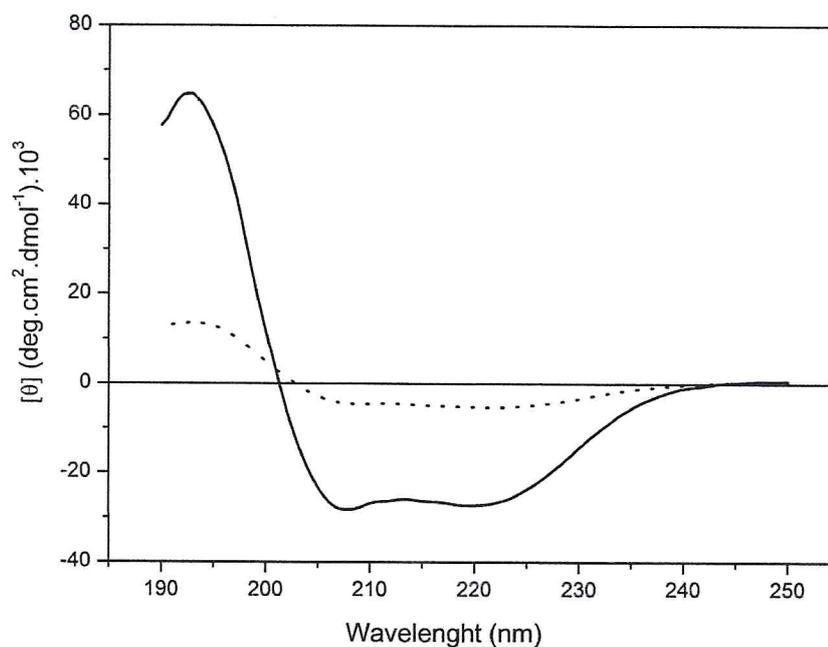


Figura 21. Espectro de dicroísmo circular da proteína Lv-ranaspumina nativa em água (0,2 mg/mL) (linha contínua) e desnaturada por carbamidometilação (linha descontinua).

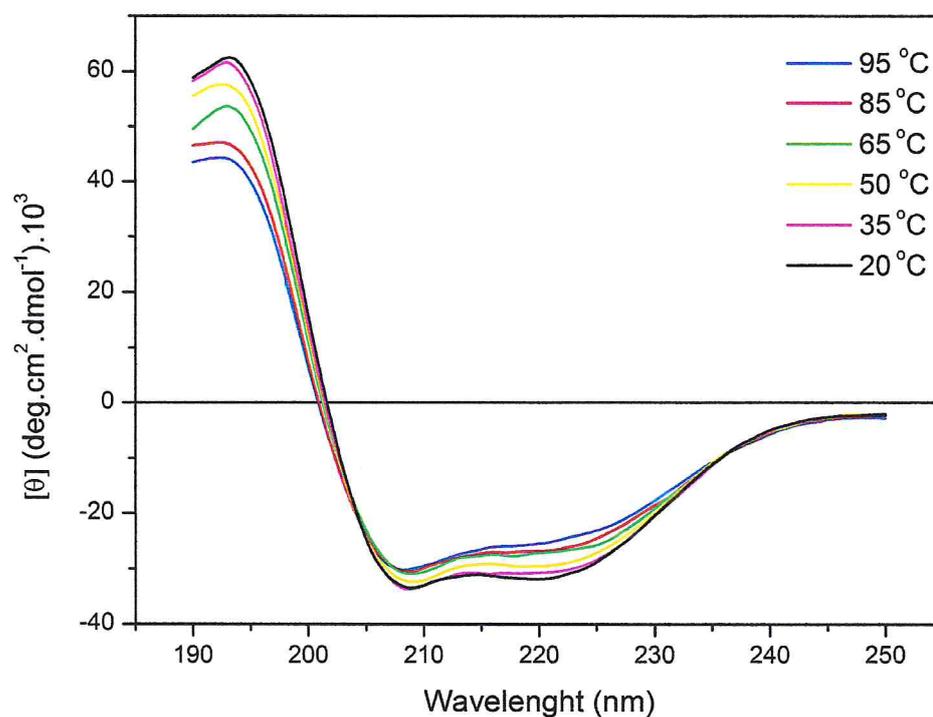


Figura 22. Espectros de dicroísmo circular da proteína Lv-ranaspumina submetida a diferentes tratamentos térmicos.

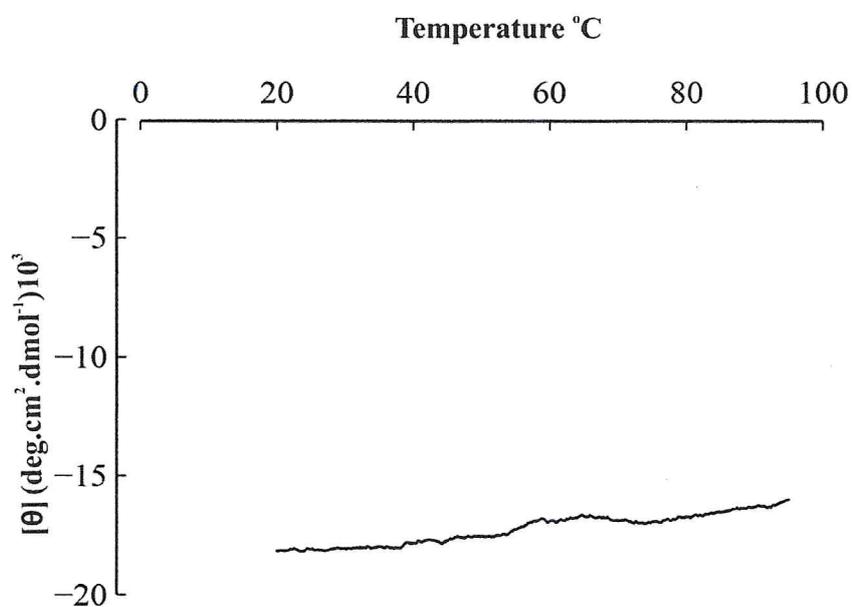


Figura 23. ThermoScan da proteína Lv-ranaspumina monitorado no comprimento de onda 208 nm entre a faixa de temperatura de 20 a 95 °C.

5.5. ATIVIDADE SURFACTANTE

5.5.1. Atividade emulsificante

Subsequentemente à purificação por troca iônica e RP-HPLC, a fração de interesse foi testada quanto à atividade surfactante. A proteína na concentração 0,1 mg/mL produziu um emulsão estável do querosene em água. Essa emulsão permaneceu inalterada por mais 30 dias de observação. Entretanto, ao sofrer desnaturação por tratamento com uréia/tiouréia e redução das pontes dissulfeto por reação de carbamidometilação dos resíduos de cisteínas, a proteína perdeu esta atividade (Figura 24), indicando que a atividade depende do correto dobramento da proteína.

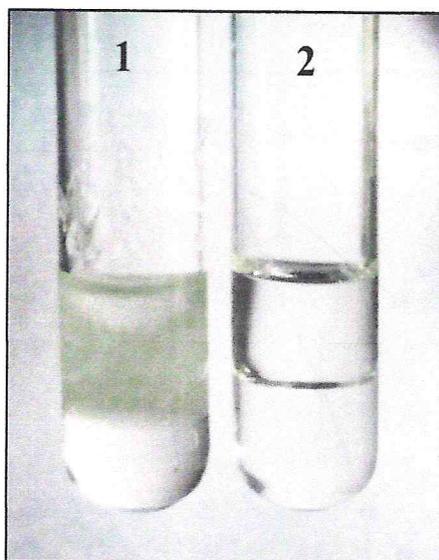


Figura 24. Atividade emulsificante da Lv-ranaspumina (0,1 mg/mL) em condições nativa (1) e após desnaturação por tratamento com solução de uréia/tioureia e redução das pontes dissulfeto por reação de carbamidometilação dos resíduos de cisteínas (2).

5.5.2. Redução da tensão superficial da água

A atividade surfactante da proteína Lv-ranaspumina foi mensurada pela estratégia da gota pendente, estimando-se a redução através da equação de Laplace. A 15 $\mu\text{g/ml}$ Lv-ranaspumina reduziu a tensão superficial da água de $73 \pm 0,4$ mN/m para $61,7 \pm 2,2$ mN/m. Quando a concentração foi aumentada para 1500 $\mu\text{g/ml}$, a redução foi ainda mais significativa, passando de $73 \pm 0,4$ mN/m para $48 \pm 0,2$ mN/m (Figura 25). A Lisozima foi utilizada como controle negativo, não mostrando redução na tensão superficial da água. Em

contraste, a proteína BSA, conhecida como uma proteína com atividade surfactante moderada, reduziu a tensão superficial da água para $59 \pm 0,2$ mN/m a uma concentração de 700 $\mu\text{g/ml}$. Acima desta concentração, BSA não promoveu aumento na redução da tensão.

O fluido bruto do ninho de espuma também reduziu a tensão superficial da água para aproximadamente $54 \pm 0,4$ mN/m, a uma concentração de proteínas totais de 1000 $\mu\text{g/ml}$, julgada pela absorbância a 280 nm. As frações da cromatografia de exclusão molecular correspondentes às outras proteínas existentes no fluido da espuma, de maiores e menores massas moleculares do que Lv-ranaspumina, não exibiram atividade de redução da tensão superficial. Este resultado sugere que Lv-ranaspumina é o único surfactante do ninho de espuma de *L. vastus*.

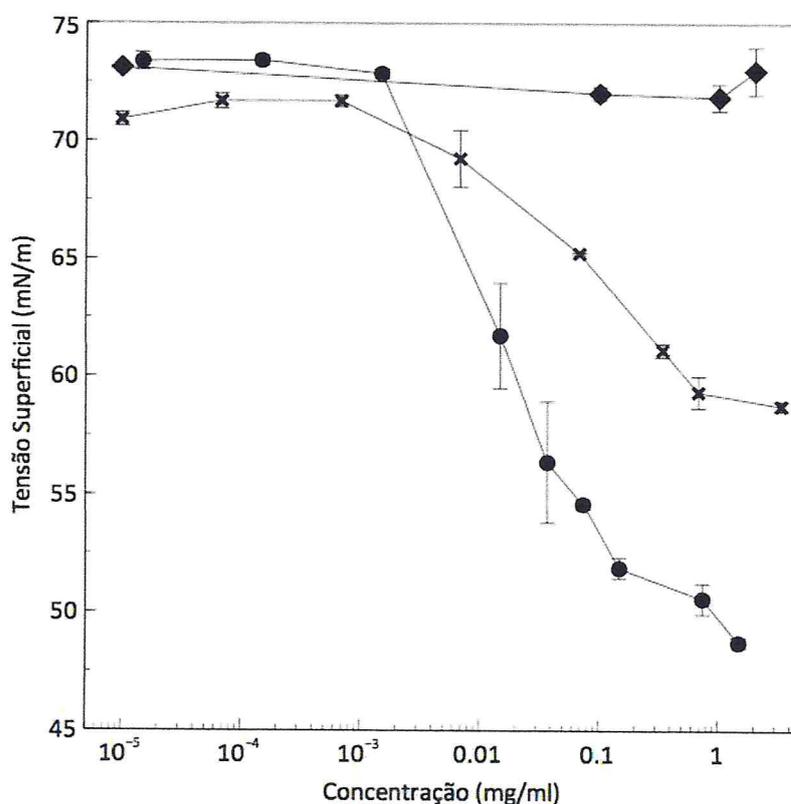


Figura 25. Atividade de redução da tensão superficial da água das proteínas Lisozima (◆), Albumina sérica bovina (✕) e Lv-ranaspumina (●).

5.6. SEQUENCIAMENTO *DE NOVO*

A estratégia utilizada neste estudo para o sequenciamento da proteína Lv-ranaspumina atingiu uma cobertura de 97% de resíduos, os últimos 6 aminoácidos da região C-terminal foram deduzidos somente com base no mapa de densidade eletrônica. Foi utilizada espectrometria de massa para sequenciar, manualmente, *de novo*, 36 fragmentos iniciais (Tabela 2), gerados pela digestão com tripsina, quimotripsina, Lys-C, Asp-N ou Glu-C. Alguns destes fragmentos demonstraram sobreposições, resultando em um número final de 6 peptídeos contendo entre 17 e 57 aminoácidos (Figura 26). A exata ordem destes fragmentos em uma sequência final só foi conseguida utilizando-se o mapa de densidade eletrônica a partir de cristalografia de raio-X.

A técnica possibilitou a detecção de 4 peptídeos com isoformas: **V**PGPGTACLT**K**ALK (1412.8 Asp-N) e **V**HGPGTACLT**K** (1140.7 Tripsina), **D**LQEQDF**K** (1022.6 Tripsina) e **D**LQEQDGFK (1079.6 Tripsina), **D**QKCLPKILQGD**L**V**K**FLK (2143.3 Quimotripsina) e **D**QKCLPLILQ**G** (1284.7 Asp-N), **L**PCVLGGVGLDD**L**FK (1602.9 Tripsina) e **L**PCVLGGVGLDEL**F**K (1617 Tripsina).

Três resíduos sequenciados *de novo* (42ASP, 120TRE, 123GLN) corresponderam a um resíduo diferente no mapa de densidade eletrônica (42ASN, 120 MET, 123ASN). A partir desse resultado optou-se como sequência final da Lv-ranaspumina (Lv-RSN-1) àquela desvendada a partir da estrutura tridimensional.

Ao utilizar a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para procurar proteínas com sequências similares a Lv-RSN-1, foi encontrada uma proteína sequenciada a partir do ninho de espuma da espécie *L. fuscus* (Lf-RSN-1; GenBank: AAT66300) (Fleming *et al.*, 2009), cuja sequência compartilha 40% de identidade com Lv-RSN-1. Outro resultado exibido pelo BLAST foi de uma proteína desconhecida (resultado não publicado) (GenBank:ABD75372) do sapo asiático *Bufo gargarizans* que mostrou 34% de identidade com Lv-RSN-1. Estes foram os únicos exemplos encontrados de similaridades com Lv-RSN-1 com relevância estatística, já que outras proteínas mostraram similaridade muito baixa, considerando os *E-value* muito alto, baixo *score* e baixa cobertura.

Devido a esta similaridade entre Lf-RSN-1 e Lv-RSN-1, utilizou-se o programa de modelagem-molecular Yasara (Krieger *et al.*, 2002) para deduzir o modelo de Lf-RSN-1, utilizando a estrutura de Lv-RSN-1 como molde.

Tabela 2. Sequenciamento manual *de novo* dos peptídeos obtidos após digestão em gel da Lv-RSN-1. *Score* foi calculado utilizando o programa BioTools (Bruker Daltonics). Legenda: ND - Não determinada, SI - sequência incompleta, * - constituem isoformas. Aminoácidos sublinhados discordaram com o mapa de densidade eletrônica.

Ordem	Massa (MH+)	Enzima	Sequencia	Score
1	2043.3	Tripsina	LLEGFLVGGVPGGTACLTK	2228239
2	1412.8	Asp-N	*VPGPGTACLTKALK	4190
3	1140.7	Tripsina	*VHGPGTACLTK	2119
4	2182.1	Glu-C	GPGTACLTKALKDSDLLVE	1291
5	2179.2	Tripsina	DSGDLVELAVIICAYQDGK	33831
6	2292.2	Quimotripsina	SGDLVELAVIICAY	(SI) 89
7	2674.4	Quimotripsina	QDGKDLQEQDFKELKELLERTL	2097203
8	2033.1	Tripsina	DLQEQDFKELLER	65856
9	1022.6	Tripsina	*DLQEQDFK	325
10	1079.6	Tripsina	*DLQEQDGFK	693
11	659.4	Tripsina	ELLER	115
12	1158.7	Lys-C	ELLERTLER	868
13	3475.9	Tripsina	AGCALDDIVADLGLEELLGSIGVSTGDIIQGLYK	10e10
14	3632.9	Quimotripsina	ALDDIVADLGLEELG	(SI) ND
15	1351.2	Tripsina	GDSTGDIIQGLYK	811
16	1195.1	Tripsina	STGDIIQGLYK	2388
17	1303.7	Asp-N	DIIQGLYKLLK	2122
18	2463.3	Tripsina	LLKELKIDETVFNACDVTKK	1572869
19	1610.8	Tripsina	IDETVFNACDVTK	16654
20	1230.6	Quimotripsina	VCDVTKKTL	ND
21	2143.3	Asp-N	*DQKCLPKILQGDVLFK	66117
22	1284.7	Asp-N	*DQKCLPLILQG	622
23	862.5	Asp-N	DLVKFLK	163
24	2090.1	Asp-N	DLKYKVCIEGGPELIK	294921
25	2090.1	Tripsina	DLKYKVCIEGGPELIK	294913
26	1442.8	Tripsina	VCIIEGGPELIK	8223
27	2080.1	Asp-N	DLKIILER (LPCVLGGVGLD)	420
28	643.4	Tripsina	IILER	79
29	1141.7	Quimotripsina	KIILERLPC	919
30	1602.9	Tripsina	*LPCVLGGVGLDDLFK	49410
31	1617	Tripsina	*LPCVLGGVGLDELFK	41038
32	1238.7	Asp-N	DDLKFNIFVK	1139
33	1123.7	Asp-N	DLFKNLFV	699
34	620.4	Tripsina	NLFVK	68
35	1149.7	Tripsina	DGILSFEGIAK	2465
36	2793.6	Tripsina	DGILSFEGIAKPLGDLILVLCPNVK	2344

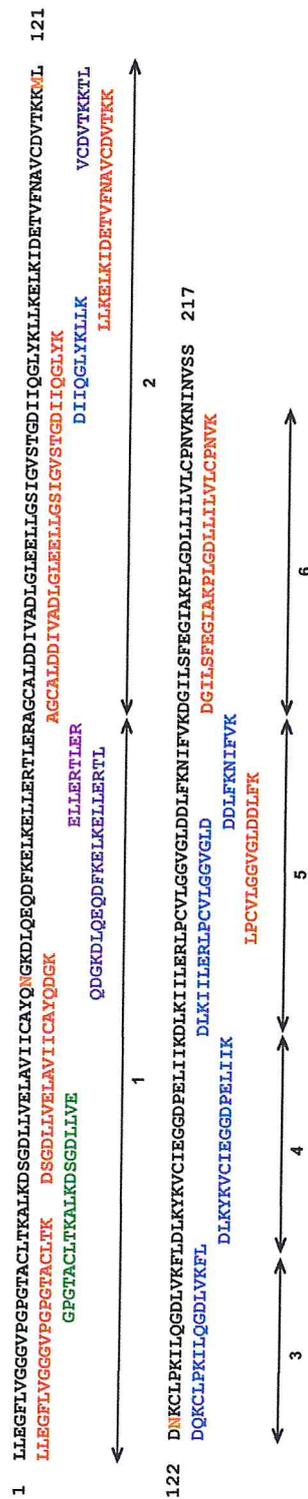


Figura 26. Principais fragmentos obtidos pelo sequenciamento manual *de novo* (MALDI-TOF/TOF) construindo a sequência final de Lv-RSN-1. Lv-RSN-1 foi digerida em gel com diferentes enzimas e os peptídeos gerados foram fracionados com nanoLC acoplado a um MALDI *spotter*. Em preto, a sequência final de aminoácidos da Lv-RSN-1 obtida pela sobreposição dos fragmentos com ajuda do mapa de densidade eletrônica. As sequências coloridas são de alguns dos peptídeos sequenciados *de novo* obtidos pela digestão com tripsina em vermelho; Glu-C em verde; quimotripsina em cinza; Lys-C em magenta; e Asp-N em azul. Em laranja estão os aminoácidos que não discordaram entre o sequenciamento *de novo* e o mapa de densidade eletrônica. As setas indicam os 6 fragmentos finais após sobreposição do fragmentos obtidos.

5.7. CARACTERIZAÇÃO POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ

A Tabela 3 e a Figura 27 mostram os parâmetros obtidos por espalhamento dinâmico da luz da proteína Lv-RSN-1 após processo de purificação, mostrando uma solução monodispersa e sem agregados. Ainda, pode-se concluir que a proteína se encontra na forma monomérica. Acredita-se que amostras monodispersas em solução, com um valor percentual de polidispersividade abaixo de 10, como é o caso da proteína em estudo, possuem maior probabilidade de cristalizar (Zulauf e D'Arcy, 1992).

A Tabela 3 mostra o resultado do espalhamento dinâmico da luz da proteína Lv-RSN-1. O Pico 1 correspondente a Lv-RSN-1 e o Pico 2 a algum contaminante ou artefato insignificante.

Tabela 3. Espalhamento dinâmico da luz da proteína Lv-RSN-1 (1 mg/ml) em água.

Item	Raio (nm)	Percentual de polidispersividade	Percentual de intensidade	Percentual de massa
Pico1	1.7	0.0	5.4	99.4
Pico 2	12.1	0.0	11.1	0.6

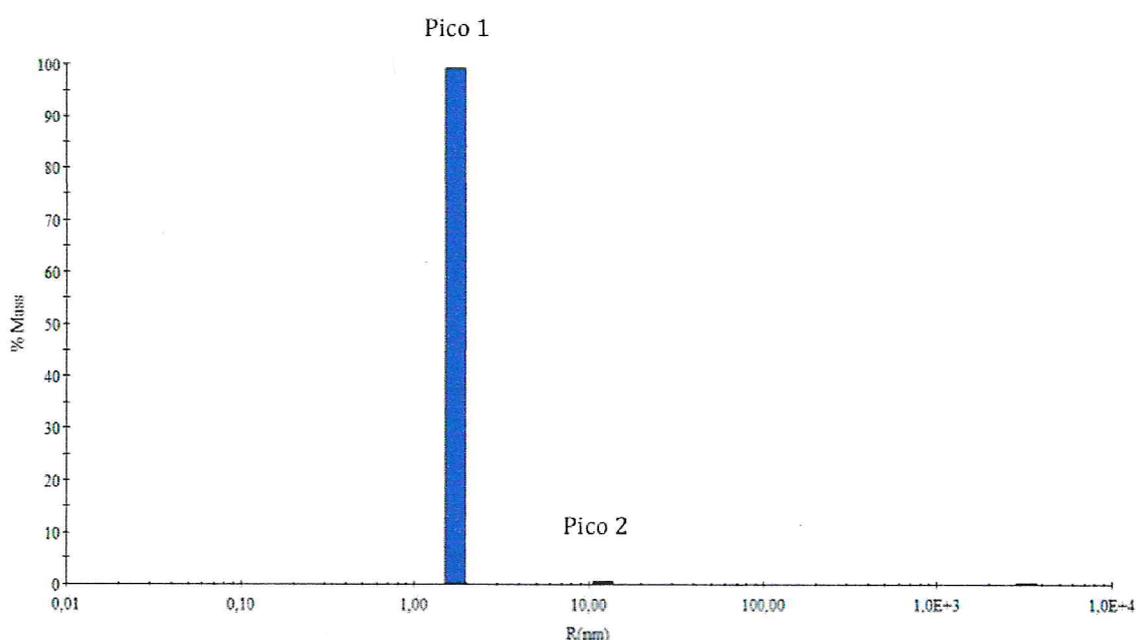


Figura 27. Espalhamento dinâmico da luz da proteína Lv-RSN-1(1 mg/ml) em água mostrando uma solução homogênea com apenas uma espécie de molécula.

5.8. CRISTALOGRAFIA DA PROTEÍNA LV-RSN-1

5.8.1. Cristalização

Neste estudo foi obtido o cristal da proteína Lv-ranaspumina sob várias condições, sendo o *kit* PEG/Ion o de maior sucesso. Após três semanas das preparações das gotas, um grande número de agulhas largas apareceram na condição N. 8 (0,2 M KCl, 20% (m/v) e PEG 3350, pH 7,0). Cristais foram coletados e congelados em nitrogênio líquido, sem presença de crioprotetor. Esses cristais foram levados ao Síncrotron *European Synchrotron Radiation Facility* – ESRF (Grenoble, França) onde 180 imagens foram coletadas a 100 K a uma máxima resolução de 3,0 Å (Figura 28), porém com base no R_{merge} e razão sinal/ruído ($I/\sigma(I)$) o conjunto de dados foi processado a 3,5 Å (Hissa *et al.*, 2012).

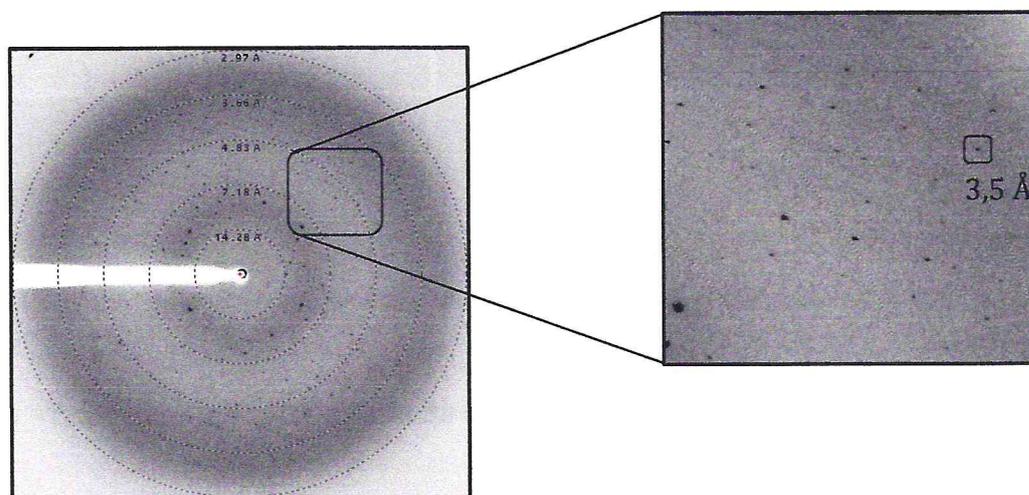


Figura 28. Padrão de difração do cristal de Lv-RSN-1 crescido após três semanas na condição N. 8 do *kit* de cristalização PEG/Ion.

Imagens de difração foram integradas no grupo espacial primitivo ortorrômbico $P2_12_12_1$ como confirmado pelo programa POINTLESS (Evans, 2006). Cálculos do coeficiente de Matthews ($2,69 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, correspondendo a um conteúdo de solvente de 54%) sugere a presença de duas moléculas na unidade assimétrica como o arranjo mais provável ($P_{\text{tot}} = 0,92$) (Kantardjieff e Rupp, 2003; Matthews, 1968).

A análise do conjunto de dados utilizando o módulo *phenix.xtriage* do PHENIX (Adams *et al.*, 2010) indicou a presença de pseudosimetria translacional. A baixa resolução do cristal e a falta de um modelo de substituição molecular impossibilitaram a resolução das fases, e, conseqüentemente, a resolução da estrutura tridimensional. Desde modo,

prosseguiu-se com a otimização da qualidade do cristal para obtenção de um cristal de alta resolução e tentativas para resolver as fases por difração anômala a múltiplos comprimentos de onda (MAD) e difração anômala a um único comprimento de onda (SAD) com a incorporação de átomos pesados (Hissa *et al.*, 2012).

Após obtenção deste primeiro cristal, outros cristais cresceram em diferentes períodos de tempo e condições. Um número de 14 cristais cresceram nas condições iniciais de cristalização e um número aproximado de 8 cristais cresceram em condições otimizadas, como concentração de proteína, concentração de precipitante e concentração dos íons da solução. Os cristais mais promissores foram levados aos síncrotrons para coleta de conjunto de difração na tentativa de resolver as fases. A Figura 29 mostra alguns dos cristais obtidos no decorrer deste estudo.

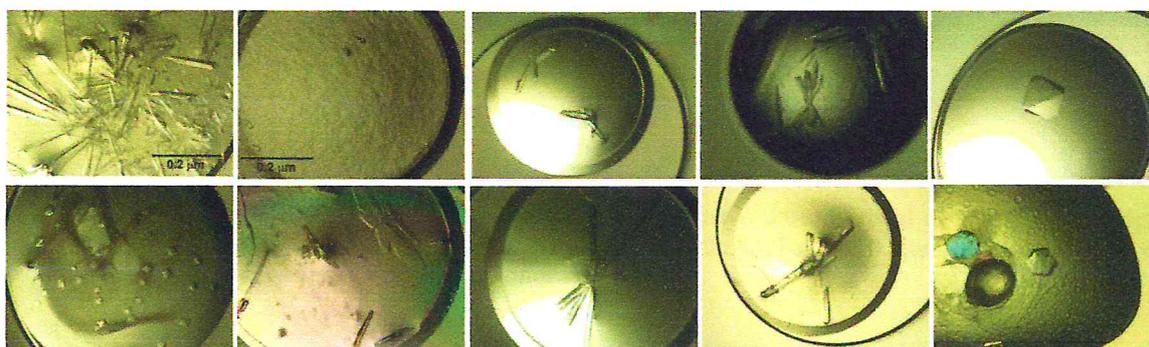


Figura 29. Cristais de Lv-RSN-1 obtidos sob diferentes condições de cristalização.

5.8.2. Espectrometria de massa do cristal

Os cristais de Lv-RSN-1 foram analisados por espectrometria de massa e os sinais de m/z obtidos foram consistentes com espécies da proteína monocarregada $[MH]^+$, duplamente carregada $[MH]^{2+}$ e triplamente $[MH]^{3+}$ carregada positivamente (Figura 30). Uma inspeção mais próxima na faixa de m/z entre 22000 e 24000 indicou a presença de seis espécies majoritárias. Entretanto, quando se comparou este espectro de massa (Figura 30) ao espectro da proteína nativa (Figura 18), observou-se uma redução na massa molecular das isoformas. Assim, é possível que a proteína tenha perdido resíduos terminais de aminoácidos durante o processo de cristalização.

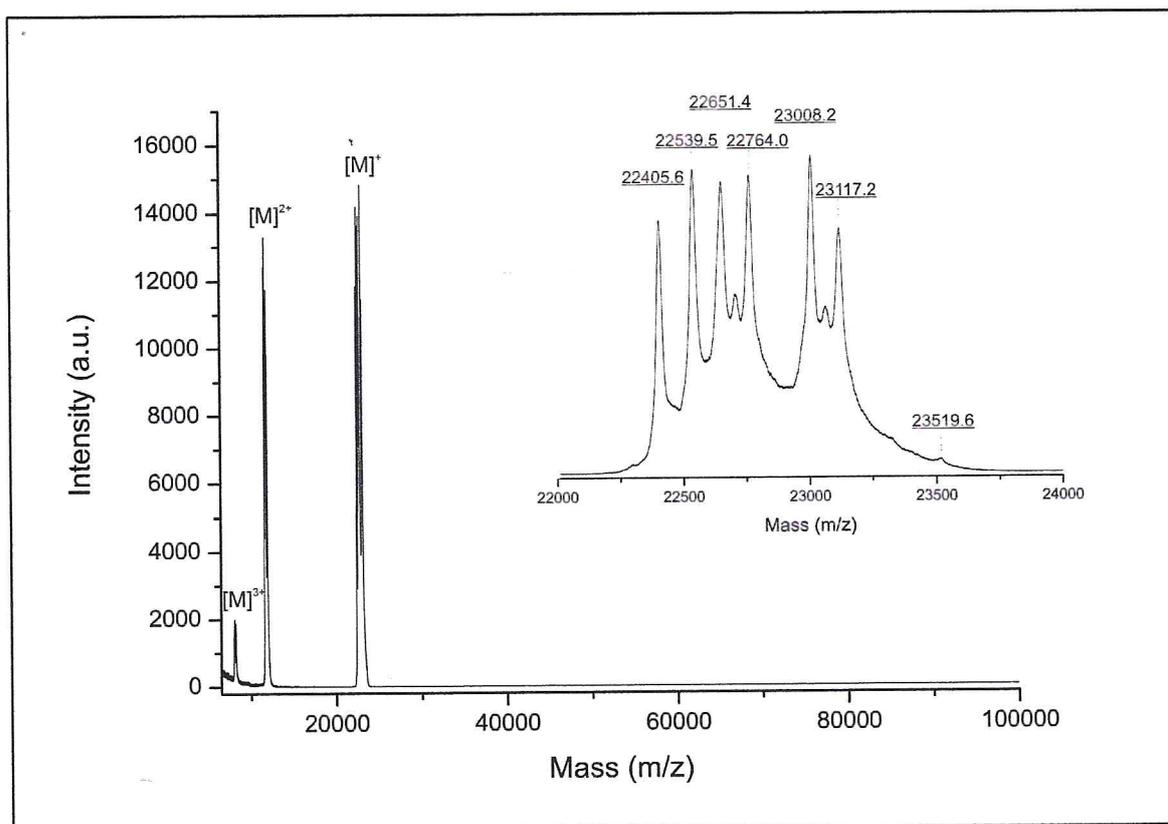


Figura 30. Espectro de MALDI-TOF obtido em modo linear positivo de um cristal de Lv-RSN-1. Moléculas mono, duplamente e triplamente carregadas positivamente estão indicadas. O quadro mostra uma vista expandida do pico correspondente à proteína monocarregada.

5.8.3. Endereçamento das fases por MAD e SAD

Com relação ao endereçamento de fases por MAD e SAD com incorporação de átomos pesados aos cristais, o composto acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) mostrou-se o mais promissor. O composto se ligou à proteína em pelo menos três sítios, confirmando uma interação forte entre eles. Assim, o composto foi utilizado para se tentar sua incorporação no cristal. A Figura 31 mostra a massa da proteína Lv-RSN-1 após contato com alguns átomos pesados.

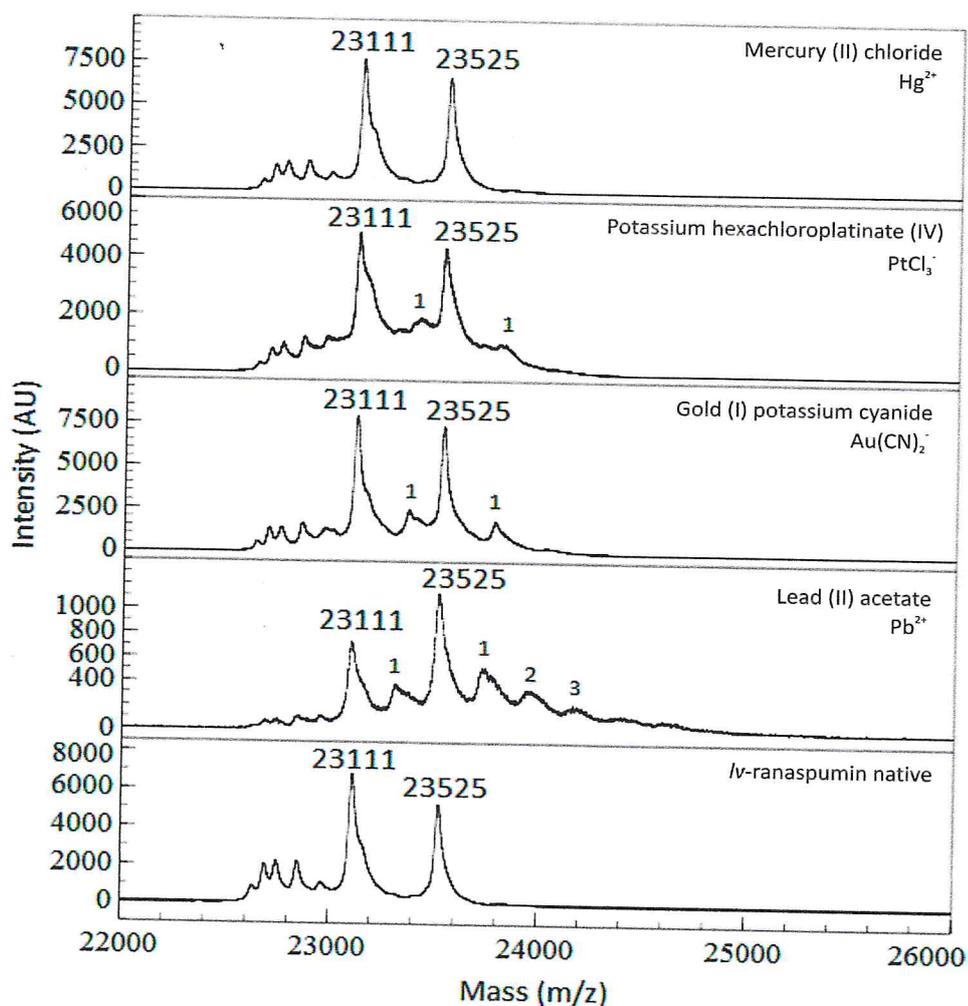


Figura 31. Espectrometria de massa da proteína Lv-RSN-1 após 2 h de reação com HgCl_2 , K_2PtCl_6 , $\text{KAu}(\text{CN})_2$ e $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Os picos residuais da proteína nativa estão marcados em cada gráfico e os picos derivados da incorporação do átomo estão marcados em ordem numérica.

A otimização do processo de obtenção de cristais na condição 0,25 M Acetato de sódio e 28% PEG 3350 (lv4d6_Pb) e na condição 0,35 M Sulfato de lítio, 35% PEG 400 e 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 (lv3c6) geraram cristais de boa qualidade, escolhidos para imersão em acetato de chumbo por 24 h, seguido de suas análises em Síncrotron, *Swiss Light Source* – SLS. Para o primeiro, seguiu-se a estratégia de MAD, nos comprimentos de onda $\lambda = 0,949700$, referente ao pico; $\lambda = 0,950470$, referente à inflexão; e $\lambda = 0,942470$, referente a uma região a ser usada como referência (remoto). Para cada comprimento de onda foram obtidas 2880 imagens e $0,25^\circ$ de oscilação, com uma resolução de $2,5 \text{ \AA}$, grupo espacial $\text{P}2_12_12_1$ e uma molécula na unidade assimétrica. Para o segundo, seguiu-se com SAD no comprimento de onda $\lambda = 0,94970$ com a coleta de 2880 imagens em cinco regiões do

cristal com ângulo de oscilação $0,25^\circ$ e com resolução $3,5 \text{ \AA}$, grupo espacial $P6_122$ ou seu grupo espacial enantiomérico $P6_322$ e duas moléculas na unidade assimétrica.

A metodologia de MAD e SAD não geraram boas soluções. Desse modo, testou-se o programa WSMR (Stokes-Rees e Sliz, 2010) com dois conjuntos de dados de dois cristais ($P2_12_12_1$, $3,5 \text{ \AA}$ e $P2_12_12_1$, $2,5 \text{ \AA}$). Todavia, as soluções geradas pelo programa também não foram promissoras.

5.8.4. Coleta de dados, processamento e determinação da estrutura

Neste estudo, dois cristais foram utilizados para determinação da estrutura da proteína Lv-RSN-1. Um cristal monoclinico, em formato de placa, crescido após nove meses na condição No. 22 do kit PEG/Ion [0,2 M de formato de potássio, 20% (m/v) PEG 3350, pH 7,3]. O outro cristal, ortorrômbico, em formato de agulha, cresceu com duas semanas na condição otimizada 0,25M de acetato de sódio e 28% PEG 3350 utilizando-se a técnica de difusão de vapor com gota pendente em placas do tipo Linbro com $1,0 \mu\text{l}$ da solução de proteína na concentração de $18,5 \text{ mg/ml}$ e $1,0 \mu\text{l}$ da solução do reservatório, sendo o volume do reservatório de $250 \mu\text{l}$. Esta condição foi otimizada a partir da condição original No. 27 do PEG/Ion (0,2 M de acetado de sódio tri hidratado, 20% (m/v) PEG 3350, pH 8,0).

Um primeiro conjunto de difração, a partir do cristal monoclinico, foi coletado na linha PXI da Fonte de Luz Suíça (SLS) no instituto Paul Scherrer (PSI) em Villingen, Suíça. Esta linha estava equipada com um detector CCD CHESS e 270 imagens foram coletadas com 1° de oscilação e uma distância de 150 mm do cristal até o detector. Os dados foram processados no grupo espacial $P2_1$ a $1,6 \text{ \AA}$ de resolução, sendo o conjunto de dados indexados e integrados utilizando-se o programa XDS (Leslie, 2006; Kabsch, 2010) e as intensidades reduzidas pelo SCALA (Evans, 2006). O programa POINTLESS (Evans, 2006) foi utilizado para confirmar a atribuição do grupo espacial. Devido ao indício de predominância de α -hélices determinado por CD e ao fato do cristal ter difratado a uma boa resolução ($1,6 \text{ \AA}$), testou-se um programa de solução de fases por *ab initio* ARCIMBOLDO (Rodríguez *et al.*, 2012). A solução encontrada pelo programa foi bastante promissora e com isso seguiu-se com os estudos cristalográficos da proteína, obtendo-se um mapa inicial de densidade eletrônica. Porções da densidade eletrônica foram interpretadas utilizando-se os fragmentos obtidos pelo sequenciamento *de novo* da proteína. Com a obtenção do

mapa de densidade eletrônica foi possível ordenar os 6 fragmentos finais obtidos com o sequenciamento *de novo* montando-se uma sequência final de aminoácidos.

Os 6 resíduos finais, na porção C-terminal, foram interpretados somente com base na densidade eletrônica (Figura 32 e Figura 33). O modelo inicial foi refinado utilizando-se os programas REFMAC, PHENIX e COOT (Murshudov *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2010; Emsley e Cowtan, 2004). Os valores de R_{free} foram computados com 5% de reflexões escolhidas aleatoriamente e omitidas do processo de refinamento.

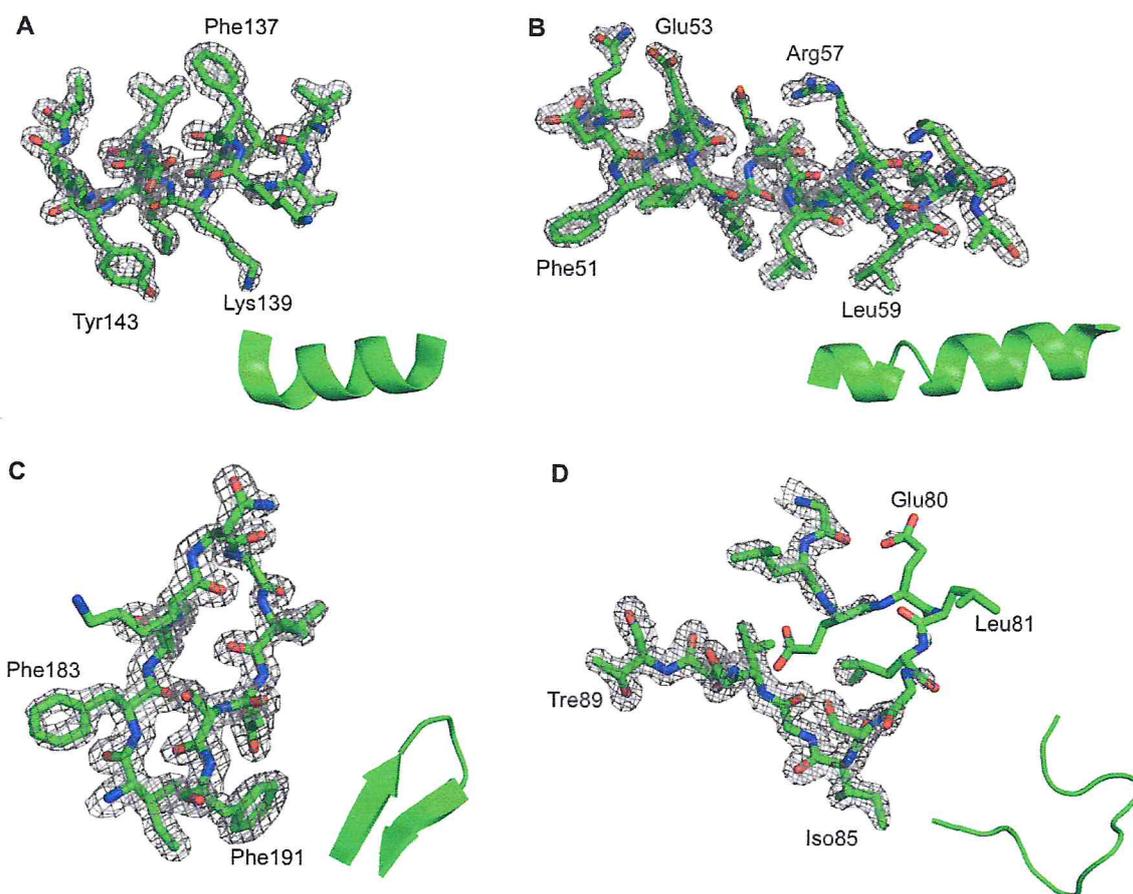


Figura 32. Mapa de densidade eletrônica para algumas regiões da proteína Lv-RSN-1 obtido após resolução das fases do conjunto de dados equivalente ao cristal monoclinico. A alta resolução da estrutura permitiu a formação de um mapa robusto para a maior parte da proteína, sendo possível deduzir os aminoácidos com precisão para construção manual do esqueleto de aminoácidos com base nos fragmentos obtidos com o sequenciamento *de novo*. A) hélice formada pelos resíduos 134 - 144, LVKFLKDLKYK; B) hélice formada pelos resíduos 49 - 62, QDFKELLERVLQKA; C) *harpin* formado pelos resíduos 182 - 191, IFVKNIGDSF e D) alça formada pelos resíduos 77 - 89, GLEELLGSIGVST. Em A, B e C observa-se um mapa de densidade eletrônica bem definido, enquanto que em D, por ser uma região flexível, observa-se a ausência do mapa para alguns resíduos.

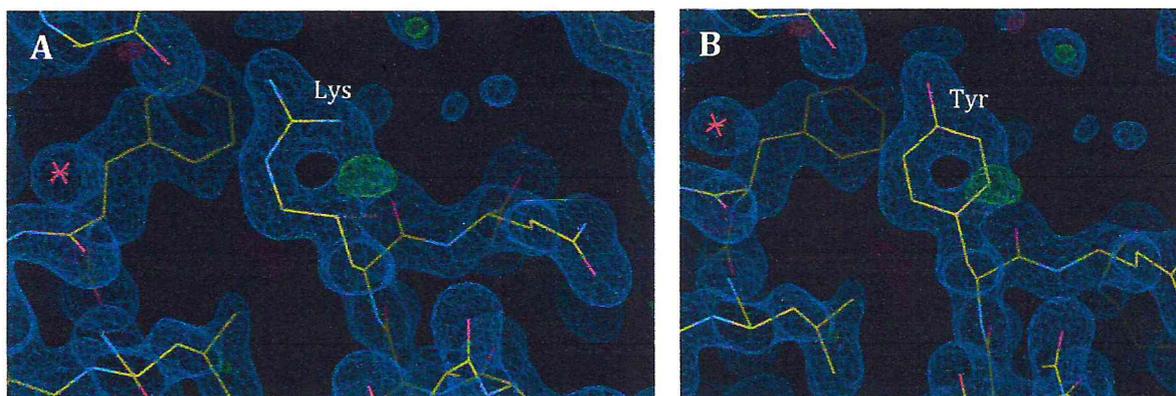


Figura 33. Construção manual das sequencias obtidas por sequenciamento *de novo* no mapa de densidade eletrônica. Em A) observa-se uma lisina que após alguns passos de refinamento mostrou-se ser de fato uma tirosina (B).

O segundo conjunto de dados, correspondente ao cristal de forma ortorrômbica, foi coletado na linha PXIII (SLS) equipado com o detector Pilatus 2M. 2880 imagens foram coletadas com $0,25^\circ$ de oscilação e a distância do cristal ao detector foi 220 mm. Dados foram processados no grupo espacial $P2_12_12_1$ a $1,75 \text{ \AA}$. A estrutura foi resolvida por substituição molecular utilizando-se o programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007), tendo como molde o modelo parcialmente refinado obtido do primeiro conjunto de dados.

Nas duas estruturas somente uma região de alça por volta do aminoácido 80 foi de difícil determinação, com pobre densidade eletrônica. Portanto, o mapa de densidade eletrônica para os resíduos 79-82 está faltando na estrutura monoclínica e 79-81 na ortorrômbica (Figura 32.D).

A sequência de aminoácidos dos últimos 6 resíduos no C-terminal não foi elucidada pelo sequenciamento *de novo*, sendo deduzida somente com base no mapa de densidade eletrônica. As estruturas finais contêm aminoácidos 13-217, devido ao fato de os 12 primeiros aminoácidos terem sido, aparentemente, clivados naturalmente durante a produção da espuma, purificação ou processo de cristalização (Figura 30).

A estereoquímica das estruturas foi avaliada utilizando-se o MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010), mostrando que somente um resíduo para cada estrutura (80GLU na monoclínica e 78LEU na ortorrômbica, Figura 34) ficou fora da área delimitada pela análise de Ramachandran (Lovell *et al.*, 2003). Os dois resíduos estão localizados nas regiões da proteína que exibiram fraca densidade eletrônica (Figura 34).

Detalhes dos dados de coleta, processamento e refinamento estão sumarizados na Tabela 4.

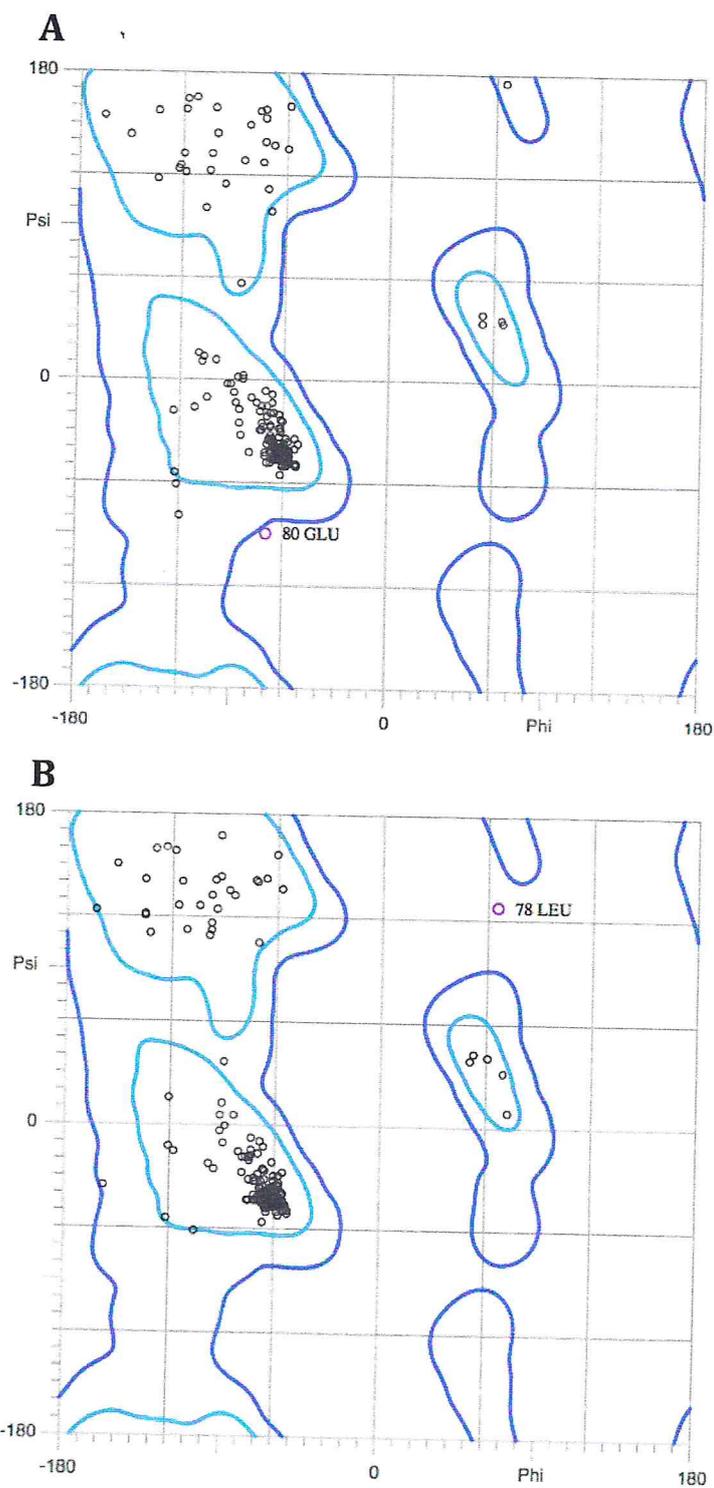


Figura 34. Gráficos de Ramachandran (Lovell *et al.*, 2003) das estruturas resolvidas a partir dos cristais de Lv-RSN-1 obtidos neste estudo. A) refere-se ao cristal monoclinico e B) refere-se ao cristal ortorrômbico.

Tabela 4. Dados estatísticos referentes à coleta, processamento e refinamento das estruturas de Lv-ranaspumina referentes ao cristal monoclínico e ortorrômbico. Valores em parênteses referem-se à camada de resolução mais alta. Para calcular R_{free} , 5% das reflexões foram excluídas do refinamento. $^{\dagger}R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$.

	Monoclínica (PDB 8K82)	Ortorrômbica (PDB 8K83)
Coleta de dados		
Linha	SLS PXI	SLS PXIII
Comprimento de onda (Å)	0,9999	0,9497
	$a = 51,87 \text{ \AA}$ $b = 25,85 \text{ \AA}$	$a = 36,66 \text{ \AA}$ $b = 52,90 \text{ \AA}$
	$c = 66,08 \text{ \AA}$	$c = 102,72 \text{ \AA}$
Unidade da Célula	$\alpha = \gamma = 90,00 \text{ \AA}$ $\beta = 103,98$	$\alpha = \beta = \gamma = 90,00 \text{ \AA}$
	Å	
Grupo espacial	$P2_1$	$P2_12_12_1$
Faixa de resolução (Å)	45,26-1,60 (1,69-1,60)	47,03-1,75 (1,84-1,75)
Completeza (%)	99,9 (100,0)	99,5 (98,7)
Multiplicidade	5,5 (5,5)	25,4 (26,2)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0,086 (0,781)	0,044 (0,500)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	9,8 (2,0)	43,6 (7,8)
Reflexões	125814 (18307)	526255 (76555)
Reflexões únicas	22985 (3311)	20733 (2923)
Refinamento		
No de átomos da proteína	1606	1574
No de moléculas do solvente	220	217
R_{cryst}	18,70%	20,10%
R_{free}	23,70%	25,30%
Geometria do modelo		
RMSD das ligações (Å)	0,006	0,007
RMSD dos ângulos (°)	1,033	1,096
Distribuição de Ramachandran		
Em regiões favoráveis (%)	96,65%	98,05%
Em regiões permitidas (%)	2,87%	1,46%
Regiões não permitidas (%)	0,48%	0,49%

5.8.5. Estrutura de Lv-RSN-1

Para estudo da estrutura de Lv-RSN-1 dois arranjos de cristais foram utilizados. O cristal monoclinico (grupo espacial $P2_1$) difratando a 1,6 Å e com uma molécula na unidade assimétrica correspondendo a um conteúdo de solvente de 37%, de acordo com o coeficiente de Matthews (Matthews, 1968; Kantardjieff e Rupp, 2003), e o cristal ortorrômbico (grupo espacial $P2_12_12_1$), também com uma única molécula na unidade assimétrica e conteúdo de solvente de 46%, difratando a 1,75 Å. Apesar das diferenças no empacotamento dos cristais, as duas estruturas são muito similares com um RMSD (*Root-Mean-Square-Deviation*) de 1,23 Å para 199 (de um total de 204) átomos de C α sobrepostos. A estrutura de maior resolução monoclinica foi escolhida para as análises posteriores.

A partir da sua estrutura, concluiu-se que Lv-RSN-1 é um monômero com predominância de α -hélices. A proteína é composta por 13 hélices e por duas pequenas folhas- β anti-paralelas (Figura 35). Seu enovelamento é estabilizado por 4 pontes dissulfeto (Cys18 – Cys67, Cys38 – Cys114, Cys125 – Cys168, Cys146 – Cys207).

A Figura 35 (A e B) mostra o diagrama da estrutura da Lv-RSN-1. A distribuição do Fator-B (Fator de Temperatura ou Fator de Debye-Waller) mostrado na Figura 37.C é uma medida de quanto à densidade eletrônica está espalhada, mostrando a flutuação (flexibilidade) dos átomos ao redor de suas posições médias.

A Figura 36 mostra o diagrama topológico de Lv-RSN-1 para melhor compreensão da estrutura obtida.

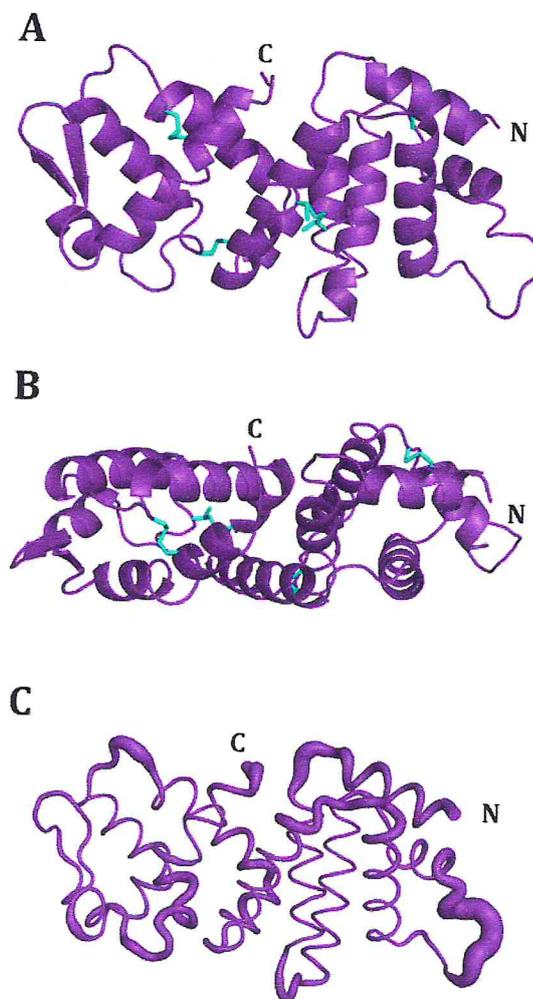


Figura 35. Estrutura geral da Lv-RSN-1. A) Representação em *cartoon*; pontes dissulfeto em ciano; letras N e C representam as extremidades N e C-terminais da proteína. B) Figura A após rotação de 65° ao longo do eixo X. C) Representação em tubo da Lv-RSN-1 na mesma orientação de (A) flexibilidade com base no fator B de cada aminoácido individual. As figuras foram geradas com o programa PyMol (DeLano Scientific, em <http://www.pymol.org/citing>).

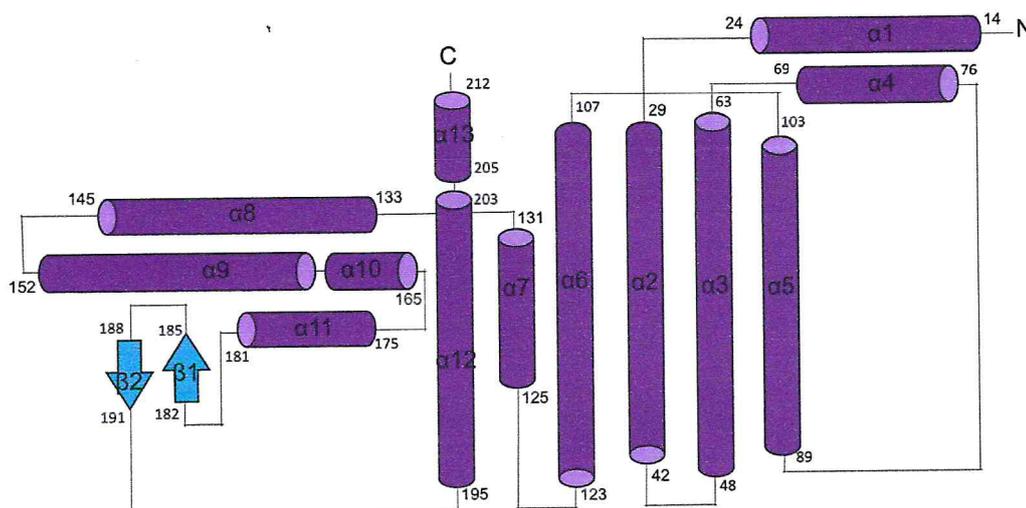


Figura 36. Diagrama topológico de LV-RSN-1. Elementos de estrutura secundária foram determinados com base no algoritmo do servidor Dali (Holm e Rosenström, 2010).

Com relação à estrutura *versus* função, o potencial lipofílico da superfície da estrutura de Lv-RSN-1 determinada com o programa VASCO (Steinkellner *et al.*, 2009) não mostrou uma indicação óbvia de domínios hidrofílicos e hidrofóbicos bem delimitados. Entretanto, encontrou-se uma cavidade lipofílica (Figura 37), que especulamos ter relação com as propriedades tensoativas da proteína.

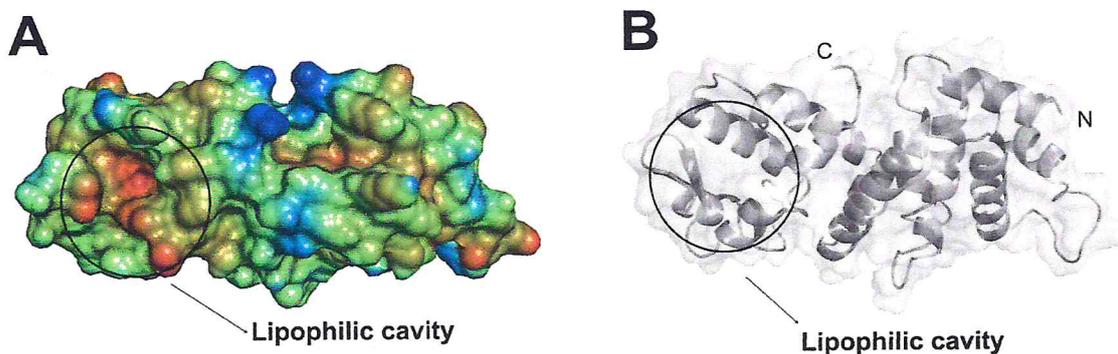


Figura 37. A) Representação da superfície da proteína Lv-RSN-1 mostrando a cavidade hidrofóbica proposta. A coloração está de acordo com o potencial lipofílico, onde regiões representadas em vermelho são hidrofóbicas e em azul são hidrofílicas. Os cálculos foram realizados pelo programa VASCO (Steinkellner *et al.*, 2009). B) Representação em *cartoon* da proteína para uma melhor visualização da cavidade lipofílica; N e C representam as extremidades N e C-terminais da proteína, respectivamente. As figuras foram geradas usando o programa PyMol (DeLano Scientific, <http://www.pymol.org/citing>).

A estrutura de Lv-RSN-1 foi submetida a dois programas de predição de possíveis locais de interação com outras proteínas, SPIDER (Porollo e Meller, 2007) e cons-PPI (Chen

e Zhou, 2005). Os resultados obtidos pelos dois programas, como podem ser visualizados na

Figura 38, foi consensual para a região de grampo (*hairpin*) das folhas- β como sendo uma região com potencial de formar interações com outras proteínas.

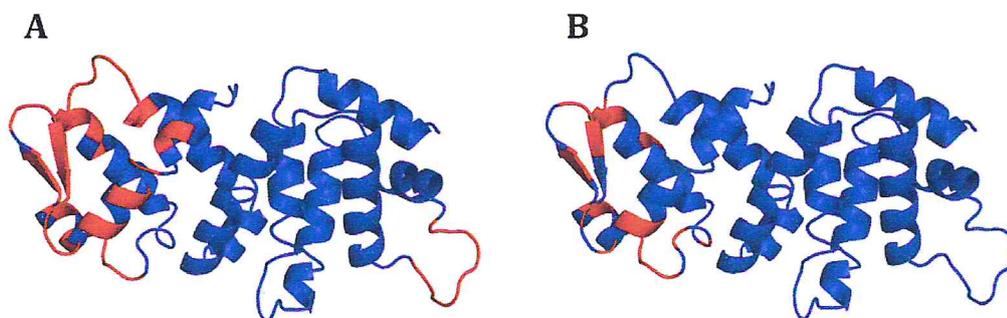


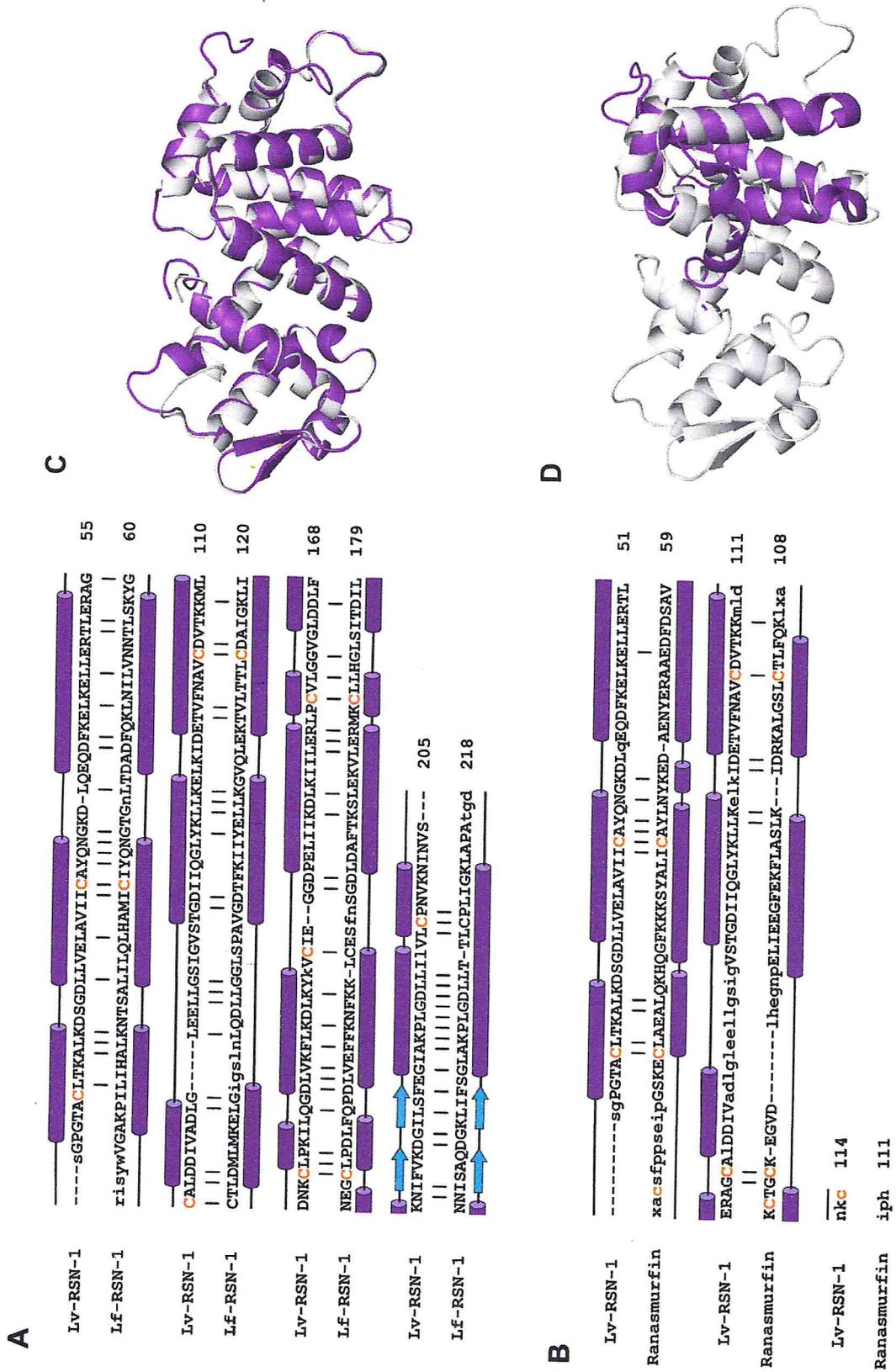
Figura 38. Predição de interações proteína-proteína com base na estrutura de Lv-RSN-1 obtida com o programa SPIDER (Porollo e Meller, 2007)(A) e utilizando o programa cons-PPI (Chen e Zhou, 2005) (B). Em vermelho, estão as regiões preditas de participarem de interações proteína-proteína.

Quando foi utilizado o servidor Dali (Holm e Rosenström, 2010) para comparação da estrutura Lv-RSN-1 com proteínas no banco de dados de proteínas *Protein Data Bank* (PDB), encontrou-se uma similaridade estrutural com a cadeia A da proteína ranasmurfina (PDB ID: 2vh3 - A), com um significativo *Z-score* de 4,9. Um *Z-score* abaixo de 2,0 corresponde a uma similaridade não confiável e não homóloga (Holm e Rosenström, 2010). A sobreposição das duas moléculas exibiu um RMSD de 2,97 Å para 74 átomos C α (PDBeFold, <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) (Figura 39). De fato, ranasmurfina possui uma topologia estrutural semelhante a uma porção da Lv-RSN-1. Quando foi considerada somente a sequência de aminoácidos das duas proteínas o alinhamento (Altschul *et al.*, 1997) mostrou 27% de similaridade entre elas. Ainda assim, as proteínas mostram muitas diferenças bioquímicas. Ranasmurfina é composta por duas cadeias 2x13 kDa, possui um cromóforo Zn de cor azul e possui uma ligação atípica lisina-tirosina-quinona (LTQ), como uma de suas modificações pós-traducionais.

Realizou-se, também, a comparação estrutural da Lv-RSN-1 com a estrutura da proteína Lf-RSN-1 gerada neste estudo pelo programa Yasara (Krieger *et al.*, 2002) com base na sequência aminoácidos da proteína. Os resultados mostraram que as proteínas são

homólogas com um *Zscore* de 29 e RMSD igual a 1,00 para 203 átomos C α sobrepostos do total de 218.

Figura 39. Comparação estrutural entre Lv-RSN-1 de *Leptodactylus vastus*, Lf-RSN-1 de *L. fuscus* (GenBank:AAT66300) e ranasmurfina (PDB id:2vh3-A) de *Polypedates leucomystax*. A e B) Alinhamentos estruturais baseados na sequência de aminoácidos utilizando Dali (Holm and Rosenström, 2010). Elementos de estrutura secundária são mostrados acima da sequência de aminoácidos. α -hélices e folhas- β são representadas por cilindros violetas e setas azuis, respectivamente. Resíduos estruturalmente equivalentes estão em caixa alta e resíduos não-estruturalmente equivalentes estão em caixa baixa. Aminoácidos de mesma identidade estão marcados com barras verticais. Cisteínas formadores de pontes dissulfeto estão em laranja. A) Alinhamento entre Lv-RSN-1 e Lf-RSN-1. A estrutura de Lf-RSN-1 de *L. fuscus* foi obtida por modelagem molecular utilizando o programa Yasara (Krieger *et al.*, 2002), tendo a estrutura de Lv-RSN-1 como molde. B) Alinhamento entre Lv-RSN-1 e ranasmurfina. C) Superposição estrutural de Lv-RSN-1 (cinza) e Lf-RSN-1 (violeta). D) Superposição estrutural entre Lv-RSN-1 (cinza) e ranasmurfina (violeta, PDB id: 2vh3-A).



6. DISCUSSÃO

6.1. LOCAL DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA LV-RANASPUMINA

Uma curiosa característica das espécies pertencentes ao gênero neotropical *Leptodactylus* é a postura de seus ovos em ninhos de espuma, o que lhes garante um modo reprodutivo terrestre ou parcialmente terrestre. Este modo de reprodução possui muitas vantagens sobre a reprodução inteiramente aquática incluindo diminuição do número de predadores de seus ovos e girinos, redução da competição por alimentos e menor dependência de uma poça de água permanente (Heyer 1969).

Muitas são as observações detalhadas descrevendo como o ninho de espuma é construído. Prado *et al.* (2005) descreveram como esta produção ocorre em *L. labyrinthicus*. Segundo os autores, logo após o amplexo em uma depressão perto de um corpo d'água, a fêmea arqueia seu corpo para baixo e libera uma secreção gelatinosa. O macho começa a bater essa secreção vigorosamente com suas patas traseiras levando à produção da espuma. Em seguida, a fêmea deposita os ovos e o macho libera o esperma para que ocorra a fecundação. Entretanto, poucos estudos consideram onde a secreção gelatinosa é produzida e se a morfologia do trato reprodutivo da fêmea é modificada para tal propósito (Furness *et al.*, 2010).

Os primeiros estudos com esse enfoque relatam um alargamento no oviduto em espécies produtoras de ninhos (Cope, 1889; Bhaduri, 1953; Coe, 1974), relacionando esta modificação histológica como responsável pela produção dos ninhos de espuma, surgindo mais tarde o termo "glândula de espuma" (Karbish *et al.*, 1998).

Hödl (1990), por meio de observações em campo e em laboratório, e trabalhando com a reprodução da rã pertencente à família Leptodactylidae *Physalaemus ephippifer*, também sugeriu que os ninhos de espuma seriam, provavelmente, originados de um fluido proveniente do oviduto.

Recentemente, Furness e colaboradores (2010) analisaram detalhadamente as modificações do oviduto de 13 espécies do gênero *Leptodactylus* e de outros gêneros produtores de ninhos de espuma e, também, relataram um alargamento na região posterior do oviduto (correspondente ao oviduto glandular, *pars convoluta dilata*) como característica de todas as espécies produtoras de ninhos de espuma.

Utilizando-se de técnicas moleculares, Fleming *et al.* (2009) mostraram por análise transcriptômica a presença de RNAm codificador de ranaspuminas em diferentes tecidos da rã *Engystomops pustulosus*: oviduto, ovário, fígado, rim, esôfago, intestino delgado, intestino grosso, língua, olho coração, músculo da perna, testículo e pulmão. Entretanto, o conjunto completo de seis ranaspuminas isoladas do ninho de espuma foi encontrado somente no oviduto.

No presente estudo, corroborando com Furness *et al.* (2010), as fêmeas de *L. vastus* exibiram o alargamento na região posterior do oviduto (também chamada região glandular do oviduto). Este alargamento foi visualmente observado ocupando grande parte da cavidade peritoneal (Figura 11). Esta região específica foi fortemente reconhecida pelo anticorpo policlonal anti-Lv-ranaspumina, embora sua porção anterior também tenha sido reconhecida, sugerindo ser o oviduto o local primário de produção do ninho de espuma. Proteínas da cloaca também foram fracamente reconhecidas pelo anticorpo, reação essa provavelmente atribuída à contaminação com proteínas provenientes do oviduto no momento da dissecação do animal.

Os machos analisados não exibiram qualquer modificação no sistema reprodutor e seus órgãos testados também não reagiram com o anticorpo anti-Lv-ranaspumina. Conclui-se que a participação do macho na produção de ninhos de espuma se restringe à agitação da secreção liberada pela fêmea e à liberação dos espermatozoides, não influenciando na composição bioquímica da espuma.

O presente estudo é o primeiro a utilizar anticorpos anti-ranaspumina com o intuito de detectar o local de produção do ninho de espuma. É importante ressaltar que a imunodeteção revela a ocorrência da proteína de interesse, diferentemente da pesquisa de RNAm feita por Fleming *et al.* (2009), que mostra apenas que o gene responsável pela proteína está sendo transcrito, mas não necessariamente que a proteína está sendo sintetizada naquele local.

6.2. CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA LV-RSN-1

A análise de 2D-SDS-PAGE mostrou uma grande diversidade de proteínas no ninho de espuma de *L. vastus*, com massas moleculares variando de 7 - 103 KDa. Presumivelmente essas proteínas devem ter um papel no ninho de espuma, entretanto uma banda majoritária de 23,5 kDa se destaca, por perfazer cerca de 45% das proteínas totais.

Sua presença marcante sugere uma função essencial na formação do ninho de espuma, desencadeando o interesse na sua purificação e caracterização.

A análise do gel 2D-SDS-PAGE do fluido do ninho de espuma da rã *E. pustulosus* realizada por Fleming *et al.* (2009), mostrou a presença de 6 ranaspuminas majoritárias; diferentemente dos resultados mostrados neste estudo para ninho de *L. vastus*.

Duas das proteínas de Ep-RSN apresentaram sequências de aminoácidos diferentes de qualquer proteína já depositada no banco de dados; as outras 4 apresentaram similaridade parcial a outras proteínas já reportadas. As seis ranaspuminas foram divididas em três categorias funcionais: ligação a carboidratos (Ep-RSN3-6), atividade surfactante (Ep-RSN-2) e inibição de proteinases (Ep-RSN-1). Ep-RSN-2 mostrou uma forte atividade surfactante, porém instável. Com base na composição de ranaspuminas, Fleming *et al.* (2009) hipotetizaram um modelo para o ninho de espuma de *E. pustulosus*. O modelo mostrado na Figura 40 é composto por uma camada de proteínas surfactantes, uma camada de lectinas, que atuam na estabilização da espuma e fazem ligação com a matriz de polissacarídeos (Fleming *et al.*, 2009).

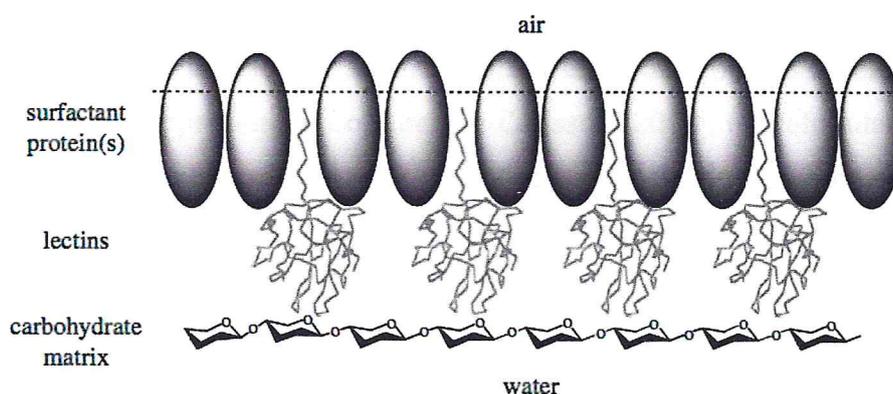


Figura 40. Representação esquemática do arranjo das ranaspuminas e carboidratos na interface ar-água do ninho de espuma de *Engystomops pustulosus*. Proteínas surfactantes (predominantemente Rsn-2) realizam o papel primário na redução da tensão superficial, permitindo a inicial formação de espuma. Esta camada é posteriormente estabilizada pela incorporação de lectinas (Rsn-3- Rsn-5, através de suas caudas hidrofóbicas) que se ligam a matriz de polissacarídeos (Fonte: Fleming *et al.* 2009).

Devido ao fato do presente estudo não ter analisado as outras proteínas constituintes do fluido da espuma de *L. vastus*, além da Lv-RSN-1, não é possível afirmar se o modelo proposto por Fleming *et al.* (2009) representa outros ninhos de espuma.

A análise dos géis 2D-SDS-PAGE na faixa de pH 4 – 7, uma faixa de pH mais restrita, resultou em uma melhor resolução das proteínas do ninho de *L. vastus*. Na realidade, a

banda majoritária vista na faixa de pH 3 – 10 é composta de pelo menos 3 isoformas da proteína Lv-RSN-1. A espectrometria de massa da proteína intacta e carbamidometilada mostrou a presença de mais de uma espécie de proteína onde mais de duas formas principais foram visualizadas corroborando com o gel 2D-SDS-PAGE na faixa de pH 4-7.

Ao analisar os espectros de massa obtidos a partir da proteólise com tripsina, verificou-se que os três principais *spots* possuíam espectros de massa muito similares, sugerindo que estes possuem sequências de aminoácidos semelhantes, sendo, portanto, isoformas da mesma proteína.

A presença de variações nas cargas referente à isoformas já foi relatada por muitos autores, sendo atribuídas a pequenas micro-heterogeneidades (Montiel *et al.*, 1992; Arámburo *et al.*, 1990). Estas micro-heterogeneidades podem ser de diferentes tipos, sendo as mais comuns resultantes da variação de grupos de carboidratos, para glicoproteínas; mudanças nos grupos funcionais das cadeias laterais de um ou mais aminoácidos; decorrência de proteínas multi-gênicas; ou devido à falta de aminoácidos no N ou C terminal resultante de processo de degradação ocorrido *in natura* (Lonnberg e Carlsson, 2000).

A hipótese de mudanças no grupo funcional na cadeia lateral de alguns aminoácidos por modificações pós-traducionais, resultando em diferentes pontos isoelétricos para as diferentes espécies de proteínas (Lonnberg e Carlsson, 2000) foi refutada pelos ensaios realizados para detectar a presença de N-glicosilações e fosforilações. Somando-se a isto, a obtenção da estrutura 3D da proteína indica a ausência de qualquer modificação pós-traducional.

Tendo conhecimento de que modificações pós-traducionais controlam muitos processos biológicos, foram realizados ensaios para melhor caracterizar a proteína em estudo. Modificações pós-traducionais são processamentos covalentes que mudam as propriedades de uma proteína, seja por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo em um ou mais aminoácidos, podendo determinar seu estado ativo, sua localização e/ou interações com outras proteínas (Mann e Jensen, 2003). Glicosilações e fosforilações são modificações pós-traducionais frequentes em proteínas eucarióticas, onde N-glicosilações são funcionalmente encontradas em proteínas excretadas ou para reconhecimento/sinalização célula-célula. Já as fosforilações são comumente reversíveis, responsáveis por modular interações moleculares e sinalizações (Mann e Jensen, 2003). O ensaio realizado para verificar a presença de fosforilações e N-glicosilações mostrou a

ausência destas modificações na Lv-RSN-1. A estrutura da proteína obtida indica a inexistência de outros grupos, além de aminoácidos, na composição da proteína.

Vale enfatizar que, muitas vezes, glicosilações dificultam o processo de cristalização, pois os grupos de oligossacarídeos, largos e flexíveis, causam complicações na formação dos contatos dos cristais reduzindo sua entropia superficial (Bergfors, 2009), sendo a análise de glicosilações essencial para o melhor entendimento da proteína em estudo. A ausência das modificações pós-traducionais além de aumentar as chances de obtenção de cristais, ainda constitui uma vantagem para sua expressão heteróloga, o que possibilitaria sua futura produção recombinante em *Escherichia coli*.

O sequenciamento *de novo* detectou peptídeos com substituições de aminoácidos, entre os fragmentos: VPGPGTACLTKALK (1412.8 Asp-N) e VHGPGTACLTK (1140.7 Tripsina), DLQEQDFK (1022.6 Tripsina) e DLQEQDGFK (1079.6 Tripsina), DQKCLPKILQGDLVKFLK (2143.3 Quimotripsina) e DQKCLPLILQG (1284.7 Asp-N), LPCVLGGVGLDDLFLK (1602.9 Tripsina) e LPCVLGGVGLDELFLK (1617 Tripsina) (Tabela 2); sendo a presença destas uma provável explicação para a heterogeneidade nos pIs e nas massas moleculares das isoformas. Estudos revelam que os mecanismos moleculares responsáveis por gerar diversidades nas sequências de isoformas podem ser categorizados em dois tipos: as isoformas serem codificadas por mais de um gene membro de uma família multi-gênica, ou as diferentes proteínas são geradas a partir de um único gene que sofre rearranjo no DNA ou *splicing* alternativo do RNAm para possibilitar suas variadas formas (Breitbart *et al.*, 1987).

A espectrometria de massa do cristal, além de confirmar a presença de isoformas, mostrou-se bastante intrigante, devido ao fato de as proteínas presentes no cristal apresentarem massas moleculares menores quando comparadas as proteínas analisadas previamente, corroborando com ausência de densidade dos 12 primeiros aminoácidos da região N-terminal de Lv-RSN-1. O motivo dessa perda de massa não foi elucidado e somente sugere-se que a proteína sofreu um processo de degradação durante a formação do cristal, considerando que esse processo de perda de massa já foi relatado para amostras *in natura* (Lonnberg e Carlsson, 2000).

Para melhor caracterizar a proteína majoritária do ninho de espuma de *L. vastus*, procedeu-se com sua purificação, sendo esta realizada por cromatografia de troca iônica e RP-HPLC. O fato de a proteína ter sido eluída da coluna de fase reversa com acetonitrila na concentração de 78% mostra um caráter bastante hidrofóbico. Com este resultado, passou-

se a visualizar uma dualidade da proteína, ao mesmo tempo em que esta é bastante solúvel em solução aquosa, com presença de cargas negativas quando em seu ambiente natural, devido ao $pI \sim 5$; a mesma adsorve fortemente na fase estacionária de uma matriz hidrofóbica de poliestireno-divinil-benzeno.

Além de confirmar a presença de isoformas e ainda quantificar o número de cisteínas presente em Lv-RSN-1, a espectrometria de massa também mostrou a homogeneidade da amostra purificada por RP-HPLC, não detectando outras massas, além da correspondente à Lv-RSN-1.

Purificações com RP-HPLC podem desfazer a estrutura terciária de muitas proteínas, levando a perda ou diminuição de sua atividade biológica, causado pelo uso dos solventes hidrofóbicos ou pela sua interação com a fase estacionária. Alguns solventes são menos danosos que outros; isopropanol, por exemplo, é o mais indicado para manter a atividade biológica de proteínas, enquanto acetonitrila pode levar a maiores danos (GE Healthcare, 2006). Sabendo-se dos efeitos negativos da acetotnitrila na preservação da estrutura terciária de proteínas, realizou-se análise da atividade biológica da proteína purificada e seu espectro de CD. Como veremos mais adiante, a atividade emulsificante manteve-se e sua conformação secundária também, já mostrando indícios da estabilidade da proteína frente a solventes orgânicos.

A estrutura secundária da Lv-RSN-1, de acordo com os resultados do CD, possui uma predominância de α -hélices ($\sim 85\%$). Outras proteínas anfipáticas já foram reportadas na literatura por possuírem espectros de CD similares, como, por exemplo, hidrofobina SC3, de fungo (De Vocht *et al.*, 2000) e a proteína pulmonar surfactante-B (SP-B) (Dieudonne *et al.*, 2001). Na verdade, hélices são as mais abundantes formas ($\sim 35\%$) de estrutura secundária presentes na natureza e seu tamanho varia de um mínimo de 4 a mais de 50 resíduos. Hélices frequentemente se agrupam em feixes de hélices e existe uma variedade de proteínas na natureza constituídas somente por α -hélices e *turns* interligando-as (Rupp, 2010).

Por outro lado, o espectro de CD e a estrutura tridimensional de outra proteína de ninho de espuma, Ep-RSN-2, mostraram predominância de folhas- β (35%) (Mackenzie *et al.*, 2009). Sendo esta uma evidência de que Ep-RSN-2 e Lv-RSN-1, apesar de serem isoladas de ninhos de espuma de rã e possuírem atividade surfactante, são estruturalmente bem diferentes.

A técnica de dicroísmo circular tem outras utilidades além de estimar a composição dos elementos de estrutura secundária de uma proteína. Os dados de CD também podem ser utilizados para confirmar a integridade de uma proteína quando em contato com um agente desnaturante (Kelly *et al.*, 2005). Após contato da proteína Lv-RSN-1 com solução desnaturante (uréia/tiouréia) e posterior análise de seu espectro de CD, verificou-se perda parcial da conformação da proteína. A proteína desnaturada também deixou de exibir atividade emulsificante, indicando que Lv-RSN-1 precisa ter o conteúdo de estrutura secundária conservado para que atue como surfactante.

Algumas proteínas quando desnaturadas se tornam bons formadores de espumas sendo estas denominadas espumas não-específicas, sendo bastante exploradas na indústria de alimentos. Para que espumas não-específicas ocorram são normalmente requeridas concentrações elevadas de proteínas (~ 10 mg/ml) e um tratamento físico vigoroso. Este é um processo que está relacionado ao aumento da hidrofobicidade (as proteínas passam a expor seus grupos hidrofóbicos) e/ou viscosidade da proteína desnaturada que passa a realizar a imobilização física de bolhas de ar, caracterizando uma espuma (McClements, 2004).

O correto dobramento da proteína Lv-RSN-1 como requisito da atividade emulsificante e sua atividade em baixas concentrações (0,1 mg/ml) é bastante interessante e reforça seu papel biológico intrínseco na formação de espumas.

6.3. ENDEREÇAMENTO DAS FASES DO CRISTAL E RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA E DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS

A cristalização de proteínas é um passo crucial na determinação de sua estrutura tridimensional. Entretanto, proteínas, de um modo geral, não são fáceis de cristalizar. Esta propriedade tem sido atribuída há anos de evolução com pressão negativa, pois, na natureza, a formação de cristais/agregados é maléfica para a viabilidade das células. Doenças como, por exemplo, Alzheimer's e doença Creutzfeldt-Jakob (doença da vaca louca) estão associadas a um enovelamento errôneo, levando a formação de agregados de proteínas. Desse modo, a dificuldade de uma dada proteína formar cristais está relacionada a uma maior vantagem evolutiva (Doye *et al.*, 2004).

Para facilitar a cristalização, diversos kits com as mais diversas condições de cristalização foram desenvolvidos e estão disponíveis comercialmente. Devido à variedade

de possibilidades existentes, uma estratégia mais racional deve ser utilizada. Sabe-se que certos íons atuam estabilizando a conformação de macromoléculas flexíveis, aumentando suas chances de cristalizar (McPherson e Cudney, 2006). Por acreditar-se que proteínas surfactantes possuem maior flexibilidade estrutural, escolheu-se o *screen* comercial PEG/Ion, que se confirmou realmente como o mais promissor para o crescimento de cristais iniciais da proteína Lv-RSN-1. Cristais da proteína ranasmurfina, de *P. leucomystax*, também cresceram no mesmo *screen* comercial PEG/Ion (McMahon *et al.*, 2006), bem como a proteína surfactante hidrofobina, que necessitou de altas concentrações de íons para cristalizar (Hakanpaa *et al.*, 2003).

A partir de uma perspectiva cristalográfica, o perfil de uma proteína pelo espalhamento dinâmico da luz (DLS) é de grande interesse, pois este está estritamente relacionado com a probabilidade de uma proteína cristalizar (Bergfors, 2009). A técnica de DLS é bastante utilizada para se determinar o tamanho, a homogeneidade e o estado oligomérico de uma proteína. Apesar de esta informação poder ser obtida por outros métodos, como géis de eletroforese nativos de poliacrilamida, ultracentrifugação analítica ou cromatografia de exclusão molecular, esta última também utilizada neste estudo, o DLS é uma técnica rápida e sensível que não necessita de muito material (Bergfors, 2009).

O ensaio de DLS da proteína Lv-RSN-1, seja em água ou no tampão utilizado para purificação e cristalização, exibiu uma dispersão monomodal da luz, sendo considerado um aspecto positivo para os ensaios de cristalização. Estima-se entre 70 a 80% de probabilidade para uma proteína com tal distribuição produzir cristais (Bergfors, 2009).

Cristais são disposições ordenadas de átomos e os átomos têm a propriedade de dispersar ondas de raios X através de seus elétrons. Quando incidida sob um cristal, apesar de estas ondas se cancelarem na maior parte das direções, elas se adicionam construtivamente em algumas direções, que aparecem como pontos ao incidirem sob o detector, chamados de reflexões. Os padrões de difração de raios-X (padrão das reflexões) não produzem uma imagem direta da estrutura molecular; a densidade eletrônica deve ser reconstruída pela técnica de transformação de Fourier que, para tanto, necessita de duas informações: os fatores de amplitude e o ângulo relativo de fase de cada reflexão gerada pela difração (Rupp, 2010).

Enquanto os fatores de amplitude são facilmente acessíveis durante a coleta de dados, sendo diretamente proporcional a intensidade de cada reflexão, os ângulos relativos

de fase são perdidos e devem ser supridos por experimentos adicionais, constituindo o problema de endereçamento das fases em cristalografia de macromoléculas (Rupp, 2010).

O método atualmente mais utilizado para obtenção de fases é a substituição molecular (MR), onde se necessita do conhecimento prévio da estrutura tridimensional de uma proteína relacionada por homologia à proteína de interesse, utilizando-se as fases da estrutura disponível para endereçamento das fases da estrutura a ser elucidada. A escolha de uma proteína para servir como molde na MR é normalmente guiada por uma similaridade de pelo menos 30% na sequência de aminoácidos (Rupp, 2010). Apesar de ser a estratégia menos dispendiosa, a MR não pôde ser utilizada no atual estudo já que, até o momento da obtenção do conjunto de difração, não se conhecia a sequência completa de aminoácidos da Lv-RSN-1, impedindo, portanto, a busca por uma estrutura já existente que fosse relacionada por homologia à mesma. Além disso, os fragmentos obtidos por sequenciamento *de novo* não apontaram a presença de proteínas similares no banco de dados, ao realizar-se a busca com a ferramenta BLAST.

Outros métodos utilizados para endereçamento das fases de um cristal são a substituição isomorfa múltipla (MIR), difração anômala a múltiplos comprimentos de onda (MAD), difração anômala de um único comprimento de onda (SAD) ou combinações dos métodos (SIRAS, MIRAS), em que se faz necessário a incorporação de átomos pesados no cristal. Ou, ainda, endereçamento das fases por *ab initio*, que explora o fato de relações de fases existirem entre certos conjuntos de fatores estruturais. Para tanto é necessário uma alta resolução (pelo menos 1,2 Å) e que, até momento, só obteve sucesso para proteínas relativamente pequenas (Rupp, 2010).

Desse modo, optou-se pela incorporação de átomos pesados na resolução do problema de endereçamento das fases. A decisão de qual átomo pesado escolher não é trivial, pois existe uma grande variedade de possibilidades. Neste trabalho, partiu-se para a estratégia de testar se os átomos pesados mais utilizados atualmente se ligariam a proteína em estudo, com uma prévia triagem de compostos que tinham afinidade com o pH e condições existentes na solução de crescimento dos cristais (Joyce *et al.*, 2010). A aplicação de espectrometria de massa permitiu analisar se os átomos pesados se ligaram a proteína, mostrando afinidade pela mesma. Dentre os compostos testados, o acetato de chumbo mostrou maior afinidade com três possíveis sítios de ligação na proteína.

Entretanto, muitos são os problemas encontrados na incorporação de átomos pesados em cristais de proteínas. Muitos cristais se deformam após imersão com a solução

do composto, sendo o tempo de contato decisivo para o sucesso. Um maior período de tempo aumenta as chances de um dado composto percorrer os canais de solventes existentes no cristal e se ligar a um maior número de moléculas de proteínas que o compõe. Por outro lado, um maior tempo de incubação também pode levar à destruição do cristal (Joyce *et al.*, 2010). Outro grande problema na derivatização com átomos pesados é que sua incorporação, muitas vezes, muda as dimensões da célula unitária do cristal, levando ao não isomorfismo entre o cristal nativo e o derivatizado, impedindo o endereçamento das fases. Se o átomo pesado se incorporou ao cristal, se houve mudança na orientação do mesmo ou se este foi internamente desordenado, são características que só poderão ser observadas no momento da coleta de dados de difração no Síncrotron, já que não podem ser analisadas com confiabilidade por simples microscopia de campo claro ou contraste de fase (Garman e Murray, 2003; Rupp, 2010).

Após a imersão dos cristais em acetato de chumbo, estes foram levados ao Síncrotron (Suíça). Os cristais mantiveram-se ordenados e com a mesma célula unitária do cristal nativo, realizando-se a coleta de seus dados. Entretanto, não foi possível a resolução de endereçamento das fases por esta técnica, pois não se verificou a presença de átomos de chumbo nos dados de difração, indicando que estes não se ligaram ao cristal, provavelmente devido ao curto período de incubação.

Outra tentativa mal sucedida foi a estratégia de *Wide search molecular replacement* (WSMR), em que o programa faz uma extensiva busca em todas as estruturas depositadas no banco de dados de proteínas (PDB) com o objetivo de se achar uma estrutura homóloga que possa ser utilizada para obtenção das fases por substituição molecular. O programa é adequado quando se tem um conjunto de dados de qualidade, quando não se tem uma conformação esperada ou quando a proteína não foi sequenciada, como foi o caso da Lv-RSN-1 (Stokes-Rees e Sliz, 2010). A ausência de uma estrutura no PDB para substituição molecular indicou que Lv-RSN-1 teria uma conformação diferente de qualquer uma das estruturas já determinadas e depositadas, podendo ser considerada uma nova conformação.

Finalmente, o programa Arcimboldo possibilitou a obtenção das fases por *ab initio* (Rodríguez *et al.*, 2012). Este é um programa recente que independe do fornecimento de uma sequência de aminoácidos para resolver as fases, diferentemente de outros programas de *ab initio phasing* como rosetta (Rohl e Baker, 2002) ou *arp-wrap* (Langer *et al.*, 2008). O programa testa muitas possibilidades utilizando fragmentos de estrutura secundária,

principalmente hélices de polialanina, como molde na localização destes no conjunto de difração (arquivo .mtz contendo fatores estruturais). Usando o Arcimboldo foi possível obter-se as fases, pois Lv-RSN-1 é constituída principalmente por hélices, tem relativa baixa massa molecular e seu conjunto de dados tinha uma alta resolução.

Com a obtenção das fases, pode-se seguir com os passos seguintes para determinação da estrutura: transformação de Fourier e obtenção do mapa de densidade eletrônica (Rupp, 2010). Com o mapa de densidade eletrônica, foi possível construir manualmente a sequência de aminoácidos, onde cada ciclo de refinamento diminuiu os valores de R_{free} e R_{work} e melhorou a densidade eletrônica. Devido ao fato de o sequenciamento *de novo* ter alcançado uma cobertura de 97% da sequência em 6 fragmentos, foi possível ordená-los tendo como base o mapa de densidade eletrônica, (Figura 32 e Figura 33). Ao final, foi possível obter tanto a estrutura tridimensional da proteína como também sua sequência de aminoácidos.

Corroborando com o perfil obtido em CD, a estrutura terciária da proteína Lv-RSN-1 apresentou predominância de α -hélices, sendo sua conformação composta por 13 feixes de α -hélices e duas folhas- β anti-paralelas constituindo um grampo. Como já sugerido por análises de espectrometria de massa, a estrutura mostrou a presença de 4 pontes dissulfeto.

A sequência reportada neste estudo mostrou 40% de identidade com a sequência de ranaspumina-1 de *Leptodactylus fuscus* (Lf-RSN-1, GenBank AATT66300). Os autores que reportaram esta sequência não desprezaram o papel biológico desta proteína. Sendo assim, a predição da estrutura secundária de Lf-RSN-1 foi determinada nesse estudo utilizando o programa PSIPRED (Buchan *et al.*, 2010; Jones, 1999) e o modelo de estrutura tridimensional construído pelo programa YASARA (Krieger *et al.*, 2002). Os resultados mostraram uma estrutura com predominância de α -hélices, similar a obtida neste estudo para Lv-RSN-1, permitindo a conclusão de que as duas proteínas, provavelmente, possuem uma função biológica similar. O programa YASARA modelou duas pontes dissulfeto para Lf-RSN-1 que são conservadas quando comparadas com Lv-RSN-1 (Figura 39). Uma função e estrutura similares não seriam uma surpresa, devido às duas espécies de rãs serem próximas filogeneticamente e, portanto, as duas proteínas devem ter um ancestral comum próximo.

Com relação às proteínas encontradas em ninhos de espuma de rãs, somente duas estruturas estão disponíveis atualmente, Ep-RSN-2 de *Engyostomops pustulosus* e

ranasmurfina de *Polypedates leucomystax*, sendo as duas bastante diferentes quanto à sequência e estrutura. A estrutura da proteína Ep-RSN-2, resolvida por ressonância magnética nuclear (NMR), é composta por quatro folhas- β antiparalelas com uma α -hélice circundando perpendicularmente uma de suas faces (PDB id: 2wgo) (Mackenzie *et al.*, 2009). Ranasmurfina é um dímero (2 x 13 kDa), onde as duas cadeias são covalentemente ligadas, e sua estrutura revela um novo motivo em que cada subunidade exibe três pontes dissulfeto e uma ligação atípica lisina-tirosina-quinona (LTQ). A estrutura também possui um cromóforo zinco em seu centro, o que confere a cor azul esverdeada do ninho de espuma (Figura 4). Até o momento, os autores não descreveram a função biológica da ranasmurfina nos ninhos de espuma (PDB id: 2vh3) (Oke *et al.*, 2008).

Muitos processos são realizados ou regulados pelas interações proteínas-proteínas. Desse modo, resíduos nas interfaces proteínas-proteínas são essenciais no funcionamento das proteínas. A identificação dos resíduos que atuam na interface pode contribuir para um melhor entendimento das proteínas. Muitos são os programas que predizem sítios de interação proteína-proteína, com base em complexos já conhecidos (Porollo e Meller, 2007; Chen e Zhou, 2005; Bradford e Westhead, 2005).

O conhecimento da estrutura de uma proteína permite, também, o entendimento de possíveis sítios de interações com outras proteínas e, a partir de então, muitas especulações podem surgir. Os dois programas de predição destas interações, SPIDER (Porollo e Meller, 2007) e cons-PPI (Chen e Zhou, 2005) (Figura 38), concordaram com a região de grampo das folhas- β como sendo uma região com potencial de formar interações com outras proteínas. Entretanto, esta região coincidiu com a da cavidade lipofílica da proteína (Figura 37), levantando o questionamento se a região de grampo das folhas- β além de responder pelas propriedades tensoativas da proteína, também participaria de interações proteína-proteína, que explicariam a estabilidade e consistência da espuma.

Mais estudos são necessários para confirmar “se” e “quais” proteínas do ninho interagem com Lv-RSN-1. Esse conhecimento é essencial para construir um modelo de arquitetura dos ninhos de espuma de *L. vastus* e permitir novas aplicações para essas proteínas.

6.4. ESTRUTURA *VERSUS* FUNÇÃO BIOLÓGICA (AÇÃO SURFACTANTE)

Espumas são fisicamente instáveis, sendo o excesso de pressão dentro de uma bolha inversamente proporcional ao seu raio. Para uma bolha esférica o excesso de pressão (ΔP) é dado por: $\Delta P = 2\gamma/r$; onde " γ " é a tensão superficial de um líquido e " r " é o raio (Cooper e Kennedy, 2010).

Ainda, devido a uma alta razão superficial (área : volume), a energia livre de moléculas de água expostas na interface com o ar é maior para bolhas pequenas quando comparado com bolhas grandes. Conseqüentemente, bolhas tendem a colapsar quando na superfície de espumas e bolhas menores tendem a se mesclarem para formarem bolhas maiores (Cooper e Kennedy, 2010). Portanto, a estabilidade física de espumas depende de numerosos fatores cinéticos, como viscosidade, tensão superficial, difusão, dentre outros. Sendo a formação inicial de espumas ou bolhas somente possível pela redução da tensão superficial (Cooper e Kennedy, 2010).

Sabe-se que a água é um líquido incomum em muitos aspectos quando comparado com a maioria dos outros fluidos, sendo a principal diferença sua alta tensão superficial, que está relacionada com sua estrutura tetraédrica, devido às suas pontes de hidrogênio. Sabões, detergente, lipídeos e outras estruturas anfipáticas podem reduzir a alta tensão superficial da água por formar uma camada na sua interface com o ar (Cooper e Kennedy, 2010).

Desse modo, o primeiro requerimento para qualquer processo de formação de espumas em soluções aquosas é ultrapassar a alta tensão superficial da água, facilitando a formação de bolhas. Convencionalmente, este processo envolve o uso de pequenas moléculas de detergentes lipídicos que, em sua maioria, são danosos para membranas biológicas (Fleming *et al.*, 2009).

Um exemplo disso é a liberação de ácidos biliares, moléculas anfipáticas geradas a partir do metabolismo do colesterol, no intestino. Os ácidos biliares são potencialmente tóxicos para as células, sendo sua homeostase estritamente monitorada pelo organismo, pois estes "detergentes", quando em elevada exposição, causam desde diarreia crônica ao desenvolvimento de tumores no fígado (Kim, Ahn, *et al.*, 2007; Kim, Morimura, *et al.*, 2007).

A redução da tensão superficial e, conseqüente, atividade surfactante, nos ninhos de espumas independe da presença de lipídeos, não sendo estes detectados nos mesmos. A ausência de uma porção lipídica é vantajosa, já que muitos surfactantes lipídicos são

danosos por causarem alterações na membrana plasmática. E a ausência de toxicidade para bactérias, fungos ou larvas de insetos, assim como a ausência de atividade hemolítica do fluido da espuma de *L. vastus*, relatados por Hissa *et al.* (2008), pode estar relacionada com a inexistência de um conteúdo lipídico.

Ao longo da evolução, as rãs produtoras de ninhos de espumas conseguiram desenvolver uma fascinante espuma biológica que por não ser constituída de lipídeos, mas sim de proteínas, não causa danos aos ovos ou espermatozoides da rã.

Lv-RSN-1 é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 73 mN/m para 62 mN/m na concentração de 15 µg/ml (Figura 25). De forma similar, Ep-RSN-2, ranaspumina de *E. pustulosus*, também foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 52 mN/m na concentração de 10 µg/ml (Fleming *et al.*, 2009). Outra proteína animal surfactante, a laterina, isolada de equinos, demonstra atividade surfactante somente a partir de 100 µg/ml, sendo sua atividade máxima atingida a 1000 µg/ml, quando reduz a tensão superficial da água para 56 mN/m (McDonald *et al.*, 2009). A atividade surfactante de Lv-RSN-1 foi mais forte, em concentração mais alta, por exemplo, 1500 µg/ml, reduzindo a tensão superficial da água para 48 mN/m.

Existem muitos relatos de que espumas podem sim ser formadas por agitação mecânica de soluções proteicas altamente viscosas. Para tanto, demandam concentrações de proteínas bem mais elevadas (muitas vezes desnaturadas). Por exemplo, a agitação da clara de ovo (ovalbuminas) pode formar espumas visualmente similares às dos ninhos de rã, porém as albuminas para formar espumas necessitam de concentrações bem maiores quando comparadas às dos ninhos de espuma (Cooper *et al.* 2005). Tipicamente entre 10 – 30 mg/ml de proteínas são utilizadas para estabilizar emulsões, sendo usadas principalmente na indústria de alimentos (Damodaran, 2006).

Entretanto, este não é o caso de Lv-RSN-1, que é capaz de formar emulsões de água em querosene na concentração tão baixa quanto 100 µg/ml e reduzir a tensão superficial da água a partir de valores de concentração de 15 µg/ml. Proteínas com intrínseca atividade de redução da tensão superficial da água são raras na natureza (Cooper e Kennedy, 2010).

É importante notar que todas as proteínas possuem grupos hidrofóbicos e exibem variada flexibilidade, conseqüentemente possuindo até certo ponto propriedades de atividade interfacial. Resultados de diversos estudos mostram que para uma proteína ser um bom surfactante deve possuir os seguintes atributos: (1) ser capaz de rapidamente

adsorver em interfaces, (2) ser capaz de rapidamente alterar sua conformação em interfaces e (3) ser capaz de formar um filme coesivo na interface por interações intermoleculares (Damodaran, 2006).

Vale ressaltar que, normalmente, uma desnaturação parcial ou conformação incorreta aumenta a propriedade de superfície de proteínas, por tornar os grupos hidrofóbicos mais expostos (Bouyer *et al.*, 2012; Mitidieri e Wagner, 2002; Demetriades *et al.*, 1997). Entretanto, este não foi o caso da proteína em estudo em que sua atividade estava diretamente relacionada à sua correta conformação.

A proteína purificada Lv-RSN-1 exibiu uma atividade surfactante estável (Figura 24), mantendo-se a emulsão inalterada por mais de um mês. Além disso, sua atividade persistiu mesmo após ser aquecida a 100 °C por 10 min, bem como seu espectro de CD permaneceu igual ao da proteína nativa frente ao aumento de temperatura. Desse modo, o aumento de temperatura não danificou sua atividade biológica e nem seu conteúdo de estrutura secundária.

Estudos de espectrometria de massa mostraram a presença de oito cisteínas na composição de aminoácidos da proteína em estudo, com possibilidade de formação de quatro pontes dissulfeto. Pontes dissulfeto são comuns na natureza, possuindo um impacto significativo na estabilização da conformação de proteínas, estando fortemente relacionadas com a estrutura, função e termo-estabilidade de proteínas (Van Vlijmen *et al.*, 2004). Lv-RSN-1 mostrou-se bastante estável frente a solventes orgânicos e ao aumento de temperatura, acreditando-se que esta extraordinária estabilidade ocorra, pelo menos em parte, pela presença das suas pontes dissulfeto.

Vale ressaltar que sua resistência térmica é, não somente, muito importante para seu papel biológico na formação da espuma, pois encontra-se exposta ao ambiente externo, necessitando, portanto, resistir às intempéries ambientais, como também destaca seu potencial biotecnológico para atuar em processos que demandem altas temperaturas.

A proteína surfactante animal laterina, encontrada no suor e saliva de cavalos, também mostrou comportamento termoestável, sem desnaturação, até temperatura de 85 °C (McDonald *et al.*, 2009). Outra proteína surfactante, a hidrofobina SC3, já mencionada nesse estudo, é bastante termoestável e também possui 4 pontes dissulfeto (De Vocht *et al.*, 2000). Ressalta-se que, ambas são proteínas excretadas no ambiente, podendo ser esta a razão biológica de sua termoresistência.

Ep-RSN-2 também foi descrita como uma proteína globular termicamente estável. Porém, esta possui somente uma ponte dissulfeto para sua massa molecular de 11 kDa e sua espuma colapsa após poucos minutos, indicando uma atividade surfactante de curta duração (Fleming *et al.* 2009; Mackenzie *et al.*, 2009).

É interessante ressaltar que além de ser um tensoativo, por sua atividade de redução da tensão superficial da água, Lv-RSN-1 pode atuar como emulsificante, sendo capaz gerar emulsões de água em querosene. Estudos anteriores com o fluido de espuma de *L. vastus* mostraram não somente a emulsão da água em querosene por suas proteínas totais (~1 mg/ml), como também a emulsão em outros hidrocarbonetos incluindo N-hexadecano, tolueno, óleo de máquina usado, N-hexano e gasolina. Sendo todas as emulsões estáveis por mais de um mês de duração e com índices de emulsificação superiores a 40% (Hissa, 2008).

A emulsão é um sistema heterogêneo que consiste em um líquido imiscível, completamente difuso em outro, na forma de gotículas. As gotículas constituem a fase dispersa que é emulsionada em uma fase contínua. Várias classes de emulsões podem ser distinguidas, nomeadas óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) e óleo em óleo (O/O) (Tadros, 2009).

A fim de dispersar dois líquidos imiscíveis, energia é requerida, sendo, na maioria das vezes, proveniente de agitação ou sonicação e interfere no tamanho das gotículas na emulsão. A formação da emulsão é não-espontânea e a energia é requerida para expandir a área interfacial e produzir gotículas (Tadros, 2004). Além destes três componentes (água, óleo e energia), um quarto componente é essencial na formação de micro-emulsões ou nano-emulsões: o agente emulsificante (ou surfactante). A escolha do emulsificante é crucial também para a estabilidade em longo prazo (Tadros, 2009).

A formação de uma emulsão ocorre em três importantes etapas: adesão de surfactantes, deformação de gotículas e coalescência de gotículas. Cada um destes processos ocorre numerosas vezes, sendo a emulsão um processo contínuo, onde a produção de gotículas menores requer uma maior quantidade de energia, quando comparado com gotículas maiores. A redução da tensão interfacial entre dois líquidos por um surfactante tem um papel crucial na redução do tamanho da gotícula (Tadros, 2004).

Os surfactantes também atuam na deformação e coalescência de gotículas, pois ao permitirem a existência de um gradiente de tensão interfacial, estes permitem um fluxo de líquidos entre as micelas que tendem a fluir de uma região de menor tensão para uma

região de maior tensão e, conseqüentemente, novas moléculas de surfactantes a partir da fase contínua tendem a alimentar esse fluxo, estabilizando-o, constituindo o efeito Gibbs-Marangoni (Tadros, 2004).

Surfactantes, quando de origem microbiana, podem ser grosseiramente divididos em duas classes principais (Banat *et al.*, 2010; Neu, 1996): os compostos de baixa massa molecular, chamados biosurfactantes, como lipopeptídeos, glicolipídeos, peptídeos e proteínas; e os compostos de alta massa molecular, como os polímeros de polissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou moléculas complexas com mais de um destes componentes que são coletivamente chamados de bioemulsificantes (Zheng *et al.*, 2012; Banat *et al.*, 2010). Enquanto o primeiro grupo inclui moléculas que eficientemente reduzem a tensão superficial e interfacial e realizam, muitas vezes, emulsões água em óleo, o segundo grupo é comumente mais efetivo na estabilização de emulsões óleo em água e não são tão eficientes na redução da tensão superficial (Banat *et al.*, 2010; Rosenberg e Ron, 1997).

No caso de surfactantes naturais de origem animal, estes ainda não possuem uma classificação relacionada às suas estruturas químicas. Com relação à proteína em estudo, esta reduziu a tensão superficial da água e foi capaz de realizar emulsão assim como os surfactantes microbianos de baixa massa molecular. Entretanto, Lv-RSN-1 tem uma massa bem maior quando comparado a outros surfactantes desta classe, como por exemplo, a surfactina, um lipopeptídeo de sete aminoácidos ligados a um ácido graxo C13 - C16, com massa de 1 kDa (Song *et al.*, 2008). Levando-se em consideração somente seu tamanho, a proteína em estudo poderia ser enquadrada como bioemulsificantes de elevada massa molecular, porém, além de reduzir a tensão superficial, o que não é comum aos bioemulsificantes, sua emulsão foi do tipo água em óleo (A/O) e não óleo em água (O/A). Desse modo, Lv-RSN-1 é bastante peculiar e não pode ser agrupada com base na classificação de outros surfactantes biológicos, como os de origem microbiana.

A preparação de emulsões do tipo A/O ou O/A depende dos volumes relativos das duas fases e da natureza do agente emulsificante, sendo, na maioria das vezes, empiricamente determinada. Seguindo-se a generalização conhecida como regra de Bancroft (1913), a fase que está em maior volume, tem maior probabilidade de se tornar a fase contínua. Além disso, também explicado pelo efeito de Gibbs-Marangoni, a fase em que o agente emulsificante é mais solúvel tende a ser a fase contínua na emulsão (Tadros, 2009).

Existe uma escala semi-empírica para prever o tipo de emulsão a ser formada, e que é também utilizada para caracterizar surfactantes, chamada Balanço Hidrofílico-Lipofílico (HLB). O HLB se baseia no percentual relativo de grupos hidrofílicos e lipofílicos (hidrofóbicos), onde quanto maior seu número HLB, maior o grau hidrofílico da molécula. Para uma emulsão O/A, a porção hidrofóbica reside nas gotículas de óleo (fase dispersa), enquanto que a porção hidrofílica se volta para a fase aquosa (fase contínua). Nas emulsões do tipo A/O os grupos hidrofílicos residem nas gotículas de água (fase dispersa), enquanto que os grupos hidrofóbicos se voltam para a fase do óleo (fase contínua). Quanto maior seu número HLB, ou seja, quanto maior for sua porção hidrofílica, maior a probabilidade de o surfactante gerar emulsões do tipo O/A. Os valores de HLB de um surfactante são utilizados para prever que tipo de emulsão será formada: 3-6, emulsão A/O; 7-9, molhabilidade; 8-18, emulsão O/A; 3-15, detergência e 15-18, solubilização (Tadros, 2009). De um modo geral, surfactantes com um $HLB > 7$ tendem a formar O/A e $HLB < 7$ tendem a formar A/O. O HLB é calculado seguindo a fórmula: $HLB = 7 + \Sigma(\text{números de grupos hidrofílicos}) - \Sigma(\text{números de grupos hidrofóbicos})$ (Tadros, 2009).

Desse modo, no caso da emulsão água em óleo (A/O), como foi a ocorrida no atual estudo, é necessário que o surfactante tenha um HLB abaixo de 7 e, portanto, tenha uma predominância de grupos hidrofóbicos. De acordo com o efeito de Gibbs-Marangoni para a formação de uma emulsão A/O é necessário uma maior solubilidade da molécula em óleo que em água, onde as partículas de água são dispersadas para a camada de óleo (Tadros, 2009).

Com relação à proteína surfactante Lv-RSN-1, além de mostrar-se facilmente solúvel em água (Figura 27), mesmo quando em elevadas concentrações, a análise de sua estrutura mostra a presença de muitos resíduos polares em sua superfície, explicando esta solubilidade. Analisando-se o HLB da Lv-RSN-1, com base nos aminoácidos presentes em sua superfície e, conseqüentemente, expostos ao ambiente, verifica-se uma predominância de grupos hidrofílicos, sendo a região hidrofóbica minoritária e restrita a existência de uma cavidade lipofílica (Figura 37). A estrutura de Lv-RSN-1, por si só, não explica sua peculiar atividade tensoativa e muito menos sua capacidade de formar emulsões A/O, embora se especule nesse estudo que sua cavidade lipofílica esteja relacionada a estas propriedades.

Além da cavidade lipofílica, possivelmente, a proteína pode, ainda, sofrer alterações em sua conformação quando em contato com uma fase apolar (seja o ar ou óleo), a fim de potencializar sua hidrofobicidade. Essas alterações aumentariam a exposição de grupos

hidrofóbicos que, normalmente, se encontrariam no interior da molécula. Supõe-se que uma mudança conformacional a tornaria solúvel em óleo, o que explicaria sua emulsão do tipo A/O.

É importante destacar que, quando em contato com uma matriz hidrofóbica (coluna de fase reversa), Lv-RSN-1 mostrou-se bastante aderida a esta, sendo somente eluída por um alto percentual de acetonitrila (fase hidrofóbica). Este dado comprova sua capacidade de ser solúvel também numa fase hidrofóbica.

Mudanças conformacionais como uma explicação para propriedades surfactantes foram previamente sugeridas por De Vocht *et al.* (2000), quando trabalharam com hidrofobinas e por McDonald *et al.* (2009) com a proteína laterina, acreditando-se que esta se apresenta globular em solução, mas com habilidade de se desdobrar para expor grupos apolares na interface com o ar. Quando se analisa a estrutura de Ep-RSN-2 uma mudança conformacional similar é sugerida (Figura 41, Mackenzie *et al.*, 2009).

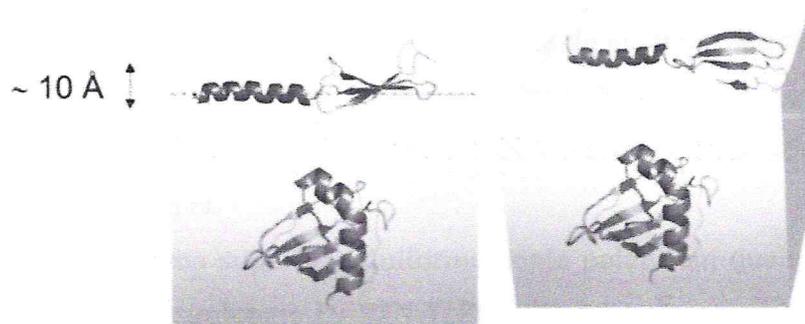


Figura 41. Modelo proposto para explicar a atividade surfactante de Ep-RSN-2 de *Engystomops pustulosus*. A proteína adota uma conformação estendida na interface ar-água comparada com uma conformação compactada quando em solução. Essa mudança conformacional expõe as fases apolares da hélice e dos segmentos de folhas- β para o ar, mantendo as fases polares em contato com a água (Mackenzie *et al.*, 2009).

A auto-organização em micelas é uma propriedade bastante comum das moléculas surfactantes, em que a porção hidrofóbica fica voltada para um núcleo interno, enquanto a porção hidrofílica fica em contato com a solução aquosa. Hidrofobinas, por exemplo, são conhecidas por se auto-organizarem em micelas, porém estas proteínas possuem uma região hidrofóbica que compreende 20% de sua área superficial, mostrando sua característica anfipática (Zhang *et al.*, 2011), não observada na estrutura da Lv-RSN-1.

Espalhamento dinâmico da luz (DLS) é uma das ferramentas utilizadas para estudo de formação de micelas (Zhang *et al.*, 2012), pois o termo micelas é normalmente utilizado

para agregados de moléculas anfipáticas relativamente pequenas. Tais micelas podem rapidamente se dissociar reversivelmente em monômeros dependendo de sua concentração ou condições do ambiente em que está inserida. Lv-RSN-1, mesmo na concentração tão alta quanto 6,7 mg/ml, não se agrupou em micelas, como confirmado por DLS (Figura 27). Análises de Lv-RSN-1 por cromatografia de exclusão molecular também mostraram que esta proteína não forma agregados em solução aquosa, seja na concentração de 1,0 mg/ml ou a 6,7 mg/ml.

Muitos são os métodos para se estudar a concentração micelar crítica (CMC), dentre eles estão à redução da tensão superficial, calorimetria de titulação isotérmica (ITC), DLS e condutividade (Zhang *et al.*, 2012; Waters *et al.*, 2012). A tensão superficial é o método clássico para estudar a CMC de surfactantes. A redução da tensão superficial aumenta à medida que a concentração do surfactante aumenta, entretanto, em um dado momento a concentração do surfactante torna-se saturada e, por mais que se aumente sua concentração, não se observa uma redução da tensão superficial. Esta concentração, ponto em que o gráfico se estabiliza, é considerada a CMC do surfactante (Zhang *et al.*, 2012). Até a concentração de 1500 µg/ml, Lv-RSN-1 não foi capaz de estabilizar a redução da tensão superficial (sendo esta estabilização observada para BSA). Esse resultado levou a proposição da seguinte hipótese; ou a CMC da Lv-RSN-1 é maior do que 1500 µg/ml ou esse surfactante não forma micelas.

Ep-RSN-2 mostra uma superfície uniformemente polar sem qualquer indicação de uma região hidrofóbica. Assim como Lv-RSN-1, Ep-RSN-2 é bastante solúvel e não mostra aglomeração ou formação de micelas quando em solução (Mackenzie *et al.*, 2009). Apesar da formação de micelas não ser uma característica obrigatória para que uma molécula seja considerada surfactante, é surpreendente que ranaspuminas atuem em superfície e formem espumas biológicas, mas não se organizem em solução. Pode-se apenas especular que, ranaspuminas precisam estar em contato com uma fase apolar, por exemplo, o ar ou um solvente orgânico, juntamente com alguma agitação, como requerimento para formação de micelas. Ou que estas atinjam a CMC apenas em elevadas concentrações.

Surfactantes são importantes em diversas aplicações ambientais e industriais. Sendo crescente a procura por surfactantes ambientalmente compatíveis (Banat *et al.*, 2010). Interessantemente, os autores Wendell *et al.* (2010) utilizaram a espuma produzida por Ep-RSN-2 como suporte para um sistema artificial de fotossíntese *in vitro*. Junto à espuma, os autores acrescentaram materiais biomiméticos dependentes de luz que

converteram a luz em ATP e, em seguida, o CO₂ em açúcar, utilizando os componentes necessários do ciclo de Calvin-Benson-Bassham.

Além da atividade surfactante/emulsificante o fluido do ninho de espuma de *L. vastus* foi bastante eficaz para dispersar nanotubos de carbonos do tipo SWCNTs – *single wall carbono nanotubes* (Ximenes *et al.*, 2012). Nanotubos de carbonos formam agregados insolúveis em todos os solventes, necessitando de surfactantes anfipáticos para sua suspensão e subsequente utilização. Nanotubos de carbonos são sistemas atrativos com possíveis aplicações em materiais eletrônicos, ópticos e mecânicos e também na área biológica.

Os resultados acumulados sobre o ninho de espuma de *L. vastus* ou sobre sua principal proteína, Lv-RSN-1, ressaltam o potencial biotecnológico da proteína Lv-RSN-1, particularmente suas propriedades de emulsificação da água em querosene e redução da tensão superficial. Lv-RSN-1 possui várias vantagens sobre muitos surfactantes sintéticos destacando-se a biodegradabilidade, ausência de toxicidade e estabilidade frente ao calor ou solventes orgânicos. Do ponto de vista da utilização comercial da Lv-RSN-1 é imprescindível o conhecimento de sua sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional visando sua produção em larga escala em sistema heterólogo de expressão.

6.5. CONSIDERAÇÕES EVOLUTIVAS

Um grande desafio na biologia evolucionária é explicar a diversidade de caracteres e organismos e o porquê destes caracteres evoluírem múltiplas vezes. A observação de que um dado caráter evoluiu múltiplas vezes por convergência é frequentemente utilizado como evidência de que este traço é fortemente favorecido pela seleção natural (Gomez-Mestre *et al.*, 2012).

Homologia, um conceito central em biologia, reflete a presença de um mesmo caráter em duas linhagens que possuem um ancestral comum. Já o termo convergência é utilizado quando caracteres similares evoluíram em organismos evolutivamente muito distantes (Hall, 2013).

Numerosas hipóteses foram criadas para explicar a evolução da extraordinária diversidade de modos reprodutivos em anuros, apesar de poucos terem sido os testes filogenéticos realizados para testar estas hipóteses (Gomez-Mestre *et al.*, 2012).

Interessantemente, por uma perspectiva filogenética, a hipótese mais aceita é a de que a deposição de ovos em anfíbios é um caso de convergência, acreditando-se ter múltiplas origens, evoluindo independentemente pelo menos sete vezes. De fato, polifilia do táxon *Leptodactylidae* tem sido suspeitada por muitos anos e em quais táxons o caráter de produção de ninhos de espuma seria uma sinapomorfia ainda é controverso (Faivovich *et al.*, 2012; Pyron e Wiens, 2011; Frost *et al.*, 2006).

O estudo da estrutura tridimensional de proteínas envolvidas nos modos reprodutivos de anuros pode ser usado como uma ferramenta para auxiliar estes estudos evolutivos, pois estruturas conservadas estão estritamente relacionadas com a realização de uma mesma função.

Desde 1990, Hödl usa a deposição de ovos em espumas como um extraordinário exemplo de convergência, que evoluiu independentemente nas rãs Ranoidea (*Rhachophoridae*) e Hyloidea (*Leptodactylidae*), chegando a esta hipótese com base em observação na postura dos ninhos, em que as rãs da família *Rhachophoridae*, como por exemplo, a espécie *P. leucomystax* deposita seu ninhos anexados a estruturas vegetais, em folhas e galhos, sendo o líquido liberado pela cloaca e agitado pelas patas traseiras das fêmeas para formação da espuma; enquanto as espécies pertencentes à família *Leptodactylidae*, como *L. vastus* e *L. fuscus* depositam suas espumas na água, depressões, bacias escavadas ou câmaras subterrâneas, sendo o líquido proveniente da cloaca da fêmea agitado pelas patas traseiras dos machos (Hödl, 1990).

Em recente estudo sobre padrões na evolução dos modos reprodutivos de rãs, Gomez-Mestre e colaboradores (2012) analisaram filogeneticamente 720 espécies pertencentes aos mais diversos modos reprodutivos. Uma de suas considerações aponta que a permanência, em longo prazo, do modo mais primitivo (reprodução aquática) seria um fator que explicaria as repetitivas origens, por convergência, dos modos derivados (ninhos de espuma, reprodução terrestre, cuidado parental), pois é intuitivamente óbvio que quando o estado primitivo se torna raro ou ausente em um determinado ponto no tempo evolutivo, reduz a probabilidade de um estado derivado evoluir com múltiplas origens. E, como o modo mais primitivo é atualmente bastante comum entre os anuros, à probabilidade de novos modos reprodutivos terem evoluído deste caráter primitivo aumenta. Vale ressaltar que os autores reforçaram a ideia de que a hipótese de convergência dos ninhos é ainda uma especulação que precisa ser quantitativamente testada.

As sequências das proteínas de *L. vastus* (Lv-RSN-1) e *L. fuscus* (Lf-RSN-1) mostraram 40% de similaridade e, ainda, a presença de duas pontes dissulfeto conservadas, dentre as quatro pontes dissulfeto presentes em Lv-RSN-1 (Figura 39). Similaridade entre sequências acima de 30% já sugere um dobramento estrutural muito similar (Rupp, 2010). Ainda, o modelo proposto pelo programa Yasara foi mais um indicativo de que as proteínas possuem uma estrutura similar e, provavelmente, mesma função biológica nos respectivos ninhos de espuma, não sendo uma surpresa, considerando que as espécies pertencem ao mesmo gênero e possuem um padrão similar de postura dos ninhos.

A proteína Ep-RSN-2 não mostrou qualquer similaridade relevante de estrutura ou sequência com Lv-RSN-1. E, apesar de serem relativamente próximas, pertencendo à mesma família Leptodactylidae, as duas proteínas não apresentam um ancestral comum.

Por outro lado, ao submeter a estrutura de Lv-RSN-1 a programas de busca por estruturas similares, uma parte da estrutura (~metade) de Lv-RSN-1, quando analisada pelo *PDBeFold* e *Dali Server*, mostrou relevante similaridade estrutural com RMSD 2,9 Å com ranasmurfina de *P. leucomystax* (Figura 39).

A similaridade estrutural entre as duas proteínas de ninhos de espuma, Lv-RSN-1 e ranasmurfina é certamente interessante e levanta muitos questionamentos. Essas duas proteínas evoluíram de um gene ancestral comum, sendo, portanto relacionadas por homologia? Essa similaridade estrutural é devido a uma evolução convergente, em que a necessidade de cumprir uma mesma função moldou, ao longo de anos, uma forma similar? Ou, ainda, se essa similaridade é meramente estocástica, ou seja, independe da existência de um gene ancestral e de uma relação estrutura *versus* função comum para ambas?

A existência não somente de uma similaridade estrutural, mas também de uma significativa similaridade de 27% na sequência de aminoácidos, bem como duas das três pontes dissulfeto existentes na ranasmurfina são conservadas na Lv-RSN-1, sugere que as duas proteínas evoluíram de um gene ancestral comum. Segue-se abaixo, alguns argumentos que apoiam este posicionamento.

De fato, na biologia estrutural, uma similaridade na sequência acima de 30%, na maioria dos casos, reflete em uma similaridade estrutural (Rost, 1999). A zona de similaridade entre 25% e 30% é considerada uma zona intermediária (zona de crepúsculo ou *twilight zone*), onde muitos métodos falham em alinhar os pares de proteína corretamente e onde nem sempre a similaridade na sequência implica em uma identidade

estrutural (Rost, 1999). Ainda assim, mesmo na ausência de uma similaridade evidente entre as sequências, estando esta em uma zona intermediária, vale ressaltar o argumento de que estruturas mantêm-se mais conservadas que as sequências (Rupp, 2010).

Outro argumento é o de que as pontes dissulfeto são fortemente conservadas entre proteínas com estrutura e função relacionadas. E, acredita-se que quando duas proteínas são provenientes de genes homólogos, suas pontes dissulfeto mostram-se conservadas (Van Vlijmen *et al.*, 2004). Existem muitas maneiras encontradas na natureza para estabilizar uma estrutura, e a presença de duas das três pontes dissulfeto na mesma posição apoia a ideia da existência de um gene ancestral comum.

Por outro lado, muitas são as diferenças bioquímicas encontradas entre as duas proteínas. Ranasmurfina é composta por duas cadeias de 13 kDa (2x 13 kDa), possui um cromóforo azul Zn e possui uma incomum ligação lisina-tirosil-quinona (LTQ *linkage*) ligando as duas cadeias (Oke *et al.*, 2008). Com relação à Lv-RSN-1, esta é composta por uma única cadeia de 23 kDa, não possui qualquer átomo de metal em sua estrutura e não possui modificações pós-traducionais.

A diferença de uma cadeia *versus* duas cadeias pode ser explicado como um resultado evolutivo pela duplicação de genes, que é um fenômeno bastante relatado na natureza (Taylor e Raes, 2004). Quando se compara as duas estruturas, especula-se que o LTQ *linkage* encontrado em ranasmurfina viria a se tornar desnecessário, já que a Lv-RSN-1 possui somente uma cadeia que teria sido formada pela duplicação gênica do ancestral comum primitivo.

Com relação à presença de zinco na estrutura da ranasmurfina, os autores desconhecem seu papel na estrutura (Oke *et al.*, 2008). E como o zinco não está presente em Lv-RSN-1, este questionamento permanece sem resposta.

As similaridades estruturais encontradas sugerem que as proteínas Lv-RSN-1 e ranasmurfina possuem uma relação de homologia, mesmo que bastante distante, indicando a presença de um gene ancestral comum. Sendo o primeiro estudo a sugerir contra argumentos a linha de pensamento mais aceita que acredita que os modos reprodutivos entre as espécies de Rhacophoridae e de Leptodactylidae evoluíram independentemente (Faivovich *et al.*, 2012; Pyron e Wiens, 2011; Frost *et al.*, 2006).

As Figura 42 e Figura 43 resumem as relações filogenéticas entre os gêneros *Leptodactylus*, *Engyostomops* e *Polypedates*, destacando-se que *Leptodactylus* é mais próximo de *Engyostomops* que *Polypedates*, estando os dois gêneros em um mesmo clado, a

família Leptodactylidae (Figura 42 e Figura 43). Entretanto, vale lembrar que a proteína Ep-RSN-2 não mostrou qualquer similaridade com Lv-RSN-1.

Se a relação estrutura-função foi mantida ao longo da evolução dos ninhos de espuma, é difícil afirmar. As similaridades estruturais entre ranaspumina de *L. vastus* e ranasmurfinina de *P. leucomystax* são bastante intrigantes e os resultados desse estudo fazem acreditar que estas evoluíram de um gene ancestral comum. Vale ressaltar que esta afirmação seria com base na similaridade estrutural entre as proteínas, o que contradiz as atuais hipóteses de evolução dos ninhos de espuma.

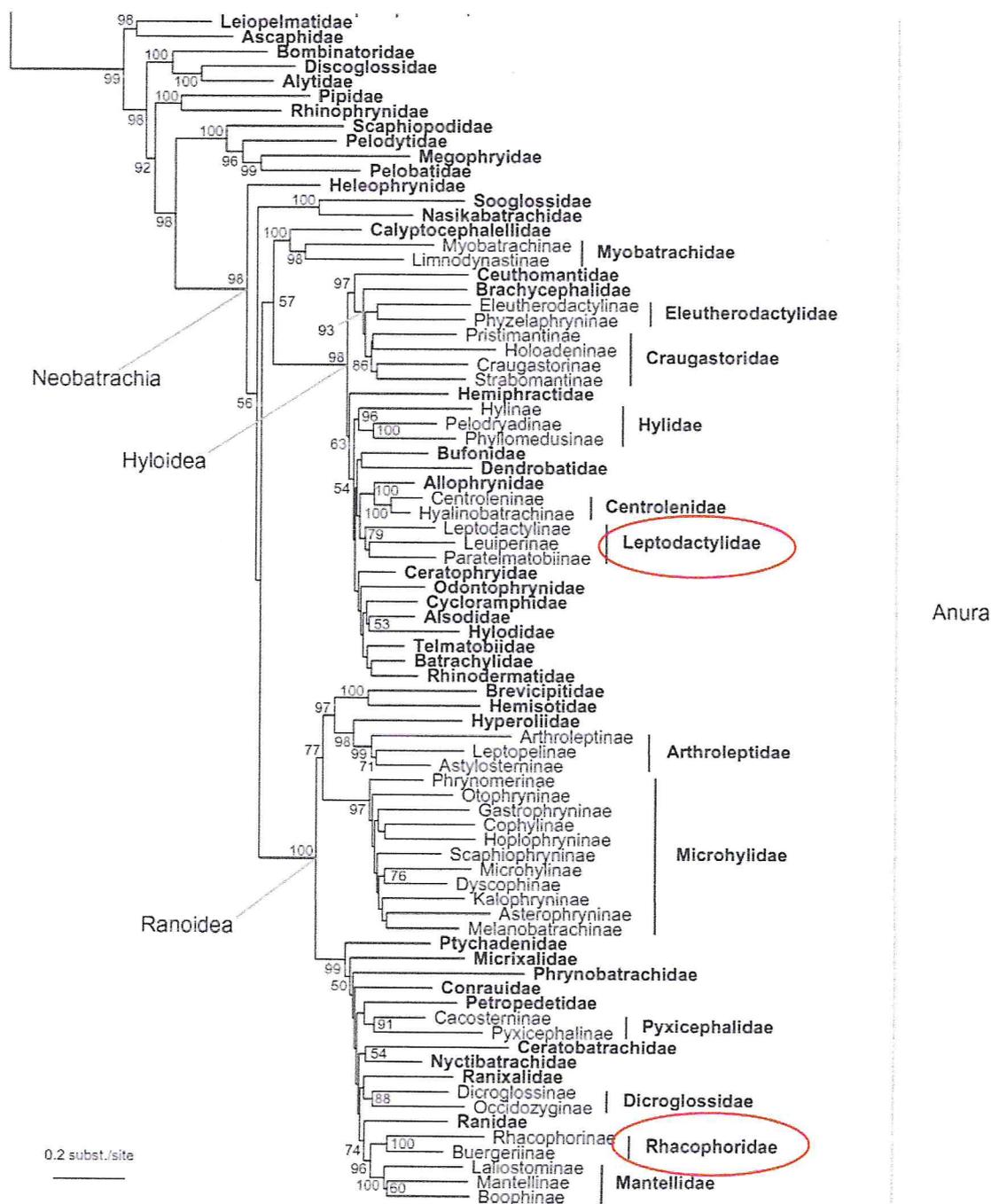


Figura 42. Filogenia das famílias e sub-famílias de anuros com base na revisão taxonômica de (Pyron e Wiens 2011) usando análises de *maximum likelihood*.

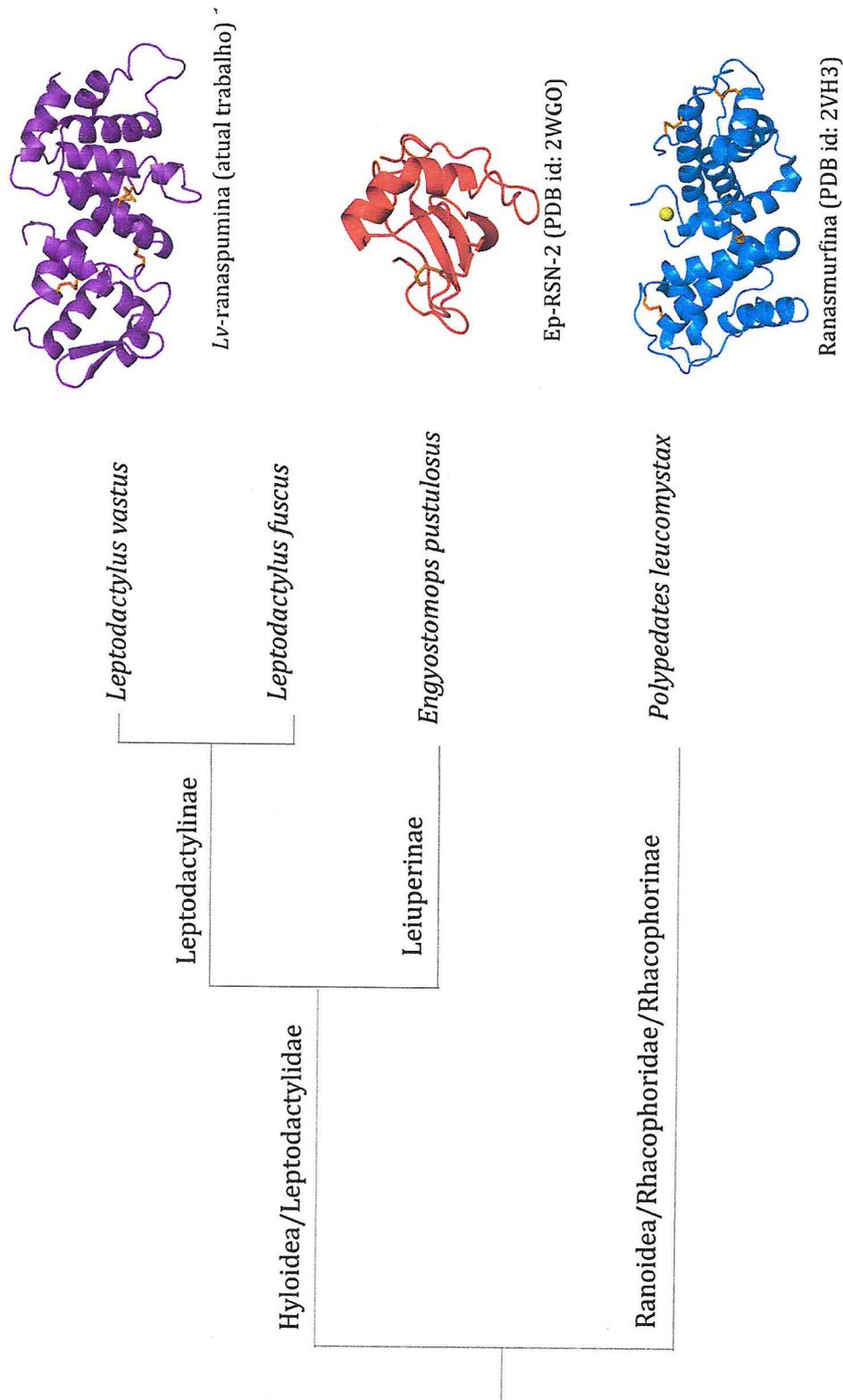


Figura 43. Representação esquemática das relações filogenéticas entre as espécies de rãs mencionadas neste estudo (Pyron e Wiens 2011) e as estruturas de proteínas encontradas em seus respectivos ninhos de espuma. Pontes dissulfeto estão em laranja e o cromóforo zinco representado por uma esfera amarela.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo trouxe contribuições ao conhecimento sobre os ninhos de espumas de anfíbios em geral e, em particular, sobre o ninho da rã *L. vastus*. Além de despertar grande curiosidade pelo modo de reprodução *per se* e sua relação com a evolução dos anfíbios, os ninhos de espuma são a tradução de uma espetacular e, ainda, não totalmente compreendida, complexa interação bioquímica envolvendo forma e função de proteínas na natureza.

Lv-RSN-1 representa aproximadamente 45% da abundância de proteínas existentes no ninho de espuma de *L. vastus*. Outro dado que merece destaque, foi que se confirmou que sua provável síntese ocorre no oviduto, provando que a única função do macho na produção do ninho é a agitação do fluido que dá origem à espuma.

Lv-RSN-1 compartilha com outras ranaspuminas a atividade surfactante, função essa essencial para a formação e estabilidade dos ninhos de espuma. Embora seja atualmente aceito que os ninhos de rãs teriam múltiplas origens entre as famílias Leptodactylidae e Rachophoridae, uma análise comparativa das ranaspuminas revelou características que permitem sugerir uma origem comum para elas, tendo por base que Lv-RSN-1 (Leptodactylidae) e Ranasmurfina (Rachophoridae) compartilham significativa similaridade estrutural. Interessantemente, cada uma dessas proteínas apresenta conformações diferentes daquelas de proteínas conhecidas, o que ressalta o pouco que ainda se sabe sobre essas novas proteínas.

Os resultados deste estudo não possibilitaram a proposição de um modelo para a arquitetura do ninho de espuma de *L. vastus*, embora possa se afirmar que esse modelo seria diferente daquele proposto para a espécie *E. pustulosus*, tendo em vista as diferenças entre as massas moleculares, estruturas conformacionais, estabilidade das proteínas surfactantes e contribuição das demais proteínas/peptídeos do ninho.

A expressão heteróloga da Lv-RSN-1 e sua produção em maior escala serão as estratégias utilizadas para se obter essa proteína em quantidade suficiente para os estudos da arquitetura do ninho e realização de testes de redução da tensão interfacial de óleos, visando explorar o potencial dessa proteína em atividades industriais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acmite Market Intelligence, 2010. World surfactant market: markets, products, applications, innovations, chances & risks, competition, prospects to 2018. Ratingen, Germany.
- Adams, P.D., Afonine, P. V, Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2010. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 66, 213–221.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402.
- AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [web application], 2013. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Diaponível: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessado: Apr 5, 2013).
- Andrade, D.V., Abe, A.S., 1997. Foam nest production in the armoured catfish. *Journal of Fish Biology* 50, 665–667.
- Arzabe, C., 1999. Reproductive activity patterns in two different altitudinal sites within Brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Zoologia*. 16, 851-864.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology* 87, 427–44.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology* 53, 495–508.
- Bancroft, W.D., 1913. The theory of emulsification. *Journal of Physical Chemistry* 17, 501–519.
- Battye, T.G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H.R., Leslie, A.G., 2011. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 67, 271–281.
- Bergfors, T.M., 2009. Protein Crystallization. International University Line. La Jolla, CA, USA. ISBN 978-0-9720774-4-6.
- Bhaduri, J.L., Rudra, J.N., 1944. Observations on the urogenital organs of *Microhyla ornate* (Dum. and Bibr.). *Proceedings of the Indian Academy of Science Section B* 10, 183–192.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93–99.

- Bogusz, S., Venable, R.M., Pastor, R.W., 2000. Molecular Dynamics Simulations of Octyl Glucoside Micelles: Structural Properties. *The Journal of Physical Chemistry B* 104, 5462–5470.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.-L., Agnely, F., 2012. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International journal of pharmaceutics* 436, 359–78.
- Bradford, J.R., Westhead, D.R., 2005. Improved prediction of protein-protein binding sites using a support vector machines approach. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, 1487–94.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Breitbart, R.E., Andreadis, A., Nadal-Ginard, B., 1987. Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annual review of biochemistry* 56, 467–95.
- Buchan, D.W.A., Ward, S.M., Lobley, A.E., Nugent, T.C.O., Bryson, K., Jones, D.T., 2010. Protein annotation and modelling servers at University College London. *Nucleic Acids Research* 38, W563–8.
- Cardoso, A.J., Arzabe, C., 1993. Corte e desenvolvimento larvario de *Pleurodema diplolistris* (Anura: Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 53, 561-570.
- Castilla, J.C., Manriquez, P.H., Delgado, A.P., Gargallo, L., Leiva, A., Radic, D., 2007. Bio-foam enhances larval retention in a free-spawning marine tunicate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 18120–18122.
- Chen, H., Zhou, H.-X., 2005. Prediction of interface residues in protein-protein complexes by a consensus neural network method: test against NMR data. *Proteins* 61, 21–35.
- Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica Section D -Biological crystallography* 66, 12–21.
- Coe, M., 1974. Observations on the ecology and breeding biology of the genus *Chiromantis* (Amphibia: Rhacophoridae). *Journal of Zoology* 172, 13-34.
- Cooper, A., Kennedy, M.W., 2010. Biofoams and natural protein surfactants. *Biophysical Chemistry* 151, 96–104.
- Cooper, A., Kennedy, M.W., Fleming, R.I., Wilson, E.H., Videler, H., Wokosin, D.L., Su, T.J., Green, R.J., Lu, J.R., 2005. Adsorption of frog foam nest proteins at the air-water interface. *Biophysical Journal* 88, 2114–2125.

- Cope, E.D., 1889. The Batrachia of North America. United States National Museum Bulletin 34, 1-525.
- Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P., Franks, N., 1998. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Structural Biology* 5, 827-35.
- Damodaran, S., 2006. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science* 70, R54-R66.
- De Vocht, M.L., Reviakine, I., Wosten, H.A., Brisson, A., Wessels, J.G., Robillard, G.T., 2000. Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 28428-28432.
- Demetriades, K., Coupland, J.N., McClements, D.J., 1997. Physicochemical Properties of Whey Protein-Stabilized Emulsions as affected by Heating and Ionic Strength. *Journal of Food Science* 62, 462-467.
- Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 61, 47-64.
- Dieudonne, D., Mendelsohn, R., Farid, R.S., Flach, C.R., 2001. Secondary structure in lung surfactant SP-B peptides: IR and CD studies of bulk and monolayer phases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1511, 99-112.
- Dobkin, D.S., Gettinger, R.D., 1985. Thermal aspects of anuran foam nest. *Jornal Herpetology* 19, 271-275.
- Downie, J.R., 1993. Functions of the foam in foam-nesting leptodactylids: the nest as a post-hatching refuge in *Physalaemus pustulosus*. *Journal Herpetology* 37, 107-115.
- Doye, J.P.K., Louis, A.A., Vendruscolo, M., 2004. Inhibition of protein crystallization by evolutionary negative design. *Physical biology* 1, P9-13.
- Duellman, W.E., Treub, L., 1986. *Biology of Amphibians*, p. 670. New York: McGraw-Hill.
- Emsley, P., Cowtan, K., 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D - Biological crystallography* 60, 2126-32.
- Evans, P., 2006. Scaling and assessment of data quality. *Acta crystallographica. Section D - Biological crystallography* 62, 72-82.
- Faivovich, J., Ferraro, D.P., Basso, N.G., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T., Wheeler, W.C., Lavilla, E.O., 2012. A phylogenetic analysis of *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with comments on the evolution of anuran foam nests. *Cladistics* 28, 460-482.

- Fleming, R.I., Mackenzie, C.D., Cooper, A., Kennedy, M.W., 2009. Foam nest components of the tungara frog: a cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276, 1787–1795.
- Foley, P., Kermanshahi pour, A., Beach, E.S., Zimmerman, J.B., 2012. Derivation and synthesis of renewable surfactants. *Chemical Society Reviews* 41, 1499–518.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., de Sá, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M., Wheeler, W.C., 2006. The Amphibian Tree of Life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297, 1–291.
- Furness, A.I., Mcdiarmid, R.W., Heyer, W.R., Zug, G.R., 2010. Oviduct modifications in foam-nesting frogs, with emphasis on the genus *Leptodactylus*. *South American Journal of Herpetology* 5, 13–29.
- Furnham, N., Laskowski, R.A., Thornton, J.M., 2013. Abstracting knowledge from the protein data bank. *Biopolymers* 99, 183–8.
- Garavito, R.M., Ferguson-Miller, S., 2001. Detergents as tools in membrane biochemistry. *The Journal of biological chemistry* 276, 32403–6.
- Garman, E., Murray, J.W., 2003. Heavy-atom derivatization. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 59, 1903–13.
- Ge, Z., Xie, D., Chen, D., Jiang, X., Zhang, Y., Liu, H., Liu, S., 2007. Stimuli-Responsive Double Hydrophilic Block Copolymer Micelles with Switchable Catalytic Activity. *Macromolecules* 40, 3538–3546.
- GE Healthcare Handbook, 2006. Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography. Principles and Methods, 11-0012-69.
- Gogichaeva, N. V., Williams, T., Alterman, M.A., 2007. MALDI TOF/TOF tandem mass spectrometry as a new tool for amino acid analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18, 279–284.
- Gomez-Mestre, I., Pyron, R.A., Wiens, J.J., 2012. Phylogenetic analyses reveal unexpected patterns in the evolution of reproductive modes in frogs. *Evolution; international journal of organic evolution* 66, 3687–700.
- Gorg, A., Postel, W., Domscheit, A., Gunther, S., 1988. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis* 9, 681–692.
- Gorzula, S., 1977. Foam nesting in *Leptodactylids*: a possible function. *Journal Herpetology* 5, 657–659.

- Haddad, C., Prado, C., 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience* 55, 207–217.
- Hakanpaa, J., Parkkinen, T., Hakulinen, N., Linder, M., Rouvinen, J., 2003. Crystallization and preliminary X-ray characterization of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBII. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 60, 163–165.
- Hall, B.K., 2013. Homology, homoplasy, novelty, and behavior. *Developmental Psychobiology* 55, 4–12.
- Heyer, W.R., 1969. The Adaptive Ecology of the Species Groups of the Genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Evolution* 23, 421–428.
- Heyer, W.R., 2005. Variation and taxonomic clarification of the large species of the *Leptodactylus pentadactylus* species group (Amphibia: Leptodactylidae) from Middle America, northern South America, and Amazonia. *Arquivos de Zoologia* 37, 269–348.
- Hissa, D.C., 2008. O ninho de espuma da rã *Leptodactylus vastus* A. Lutz 1930 e seu potencial como fonte de proteínas surfactantes. Monografia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Hissa, D.C., Bezerra, G.A., Obrist, B., Birner-Grünberger, R., Melo, V.M.M., Gruber, K., 2012. Crystallization and preliminary X-ray diffraction of the surfactant protein Lv-ranaspumin from the frog *Leptodactylus vastus*. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 68, 321–3.
- Hissa, D.C., Vasconcelos, I.M., Carvalho, A.F., Nogueira, V.L., Cascon, P., Antunes, A.S., De Macedo, G.R., Melo, V.M., 2008. Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. *The Journal of Experimental Biology* 211, 2707–2711.
- Hödl, W., 1990. An Analysis of Foam Nest Construction in the Neotropical Frog *Physalaemus ephippifer* (Leptodactylidae) *Copeia* 2, 547–554.
- Holm, L., Rosenström, P., 2010. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic acids Research* 38, W545–9.
- Hostache, G., Mol, J.H., 1998. Reproductive biology of the neotropical armoured catfish *Hoplosternum littorale* (Siluriformes-Callichthyidae): a synthesis stressing the role of the floating bubble nest. *Aquatic Living Resources* 11, 173–185.
- Iqbal, S., Khalid, Z.M., Malik, K.A., 1995. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology* 21, 176–179.
- Johnson, W.C., 1999. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* 35, 307–312.

- Jones, D.T., 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology* 292, 195–202.
- Joyce, M.G., Radaev, S., Sun, P.D., 2010. A rational approach to heavy-atom derivative screening. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 358–65.
- Kabisch, K., Herrmann, K.-J., Klossek, P., Lupp, H., Brauer, K., 1998. Foam gland and chemical analysis of the foam of *Polypedates leucomystax* (Gravenhorst 1829) (Anura:Rhacophoridae). *Russian Journal of Herpetology* 5, 10–14.
- Kabsch, W., 2010. XDS. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 125–32.
- Kantardjieff, K.A., Rupp, B., 2003. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Science* 12, 1865–1871.
- Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica Acta* 1751, 119–39.
- Kim, I., Ahn, S.-H., Inagaki, T., Choi, M., Ito, S., Guo, G.L., Kliewer, S.A., Gonzalez, F.J., 2007. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *Journal of lipid Research* 48, 2664–72.
- Kim, I., Morimura, K., Shah, Y., Yang, Q., Ward, J.M., Gonzalez, F.J., 2007. Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 28, 940–6.
- Krieger, E., Koraimann, G., Vriend, G., 2002. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field. *Proteins* 47, 393–402.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Langer, G., Cohen, S.X., Lamzin, V.S., Perrakis, A., 2008. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nature Protocols* 3, 1171–9.
- Leslie, A.G., 2006. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 62, 48–57.
- Li, Z., Ding, J., Day, M., Tao, Y., 2006. Molecularly Imprinted Polymeric Nanospheres by Diblock Copolymer Self-Assembly. *Macromolecules* 39, 2629–2636.
- Linder, M.B., Szilvay, G.R., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M.E., 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews* 29, 877–96.
- Lonnberg, M., Carlsson, J., 2000. Membrane assisted isoform immunoassay. A rapid method for the separation and determination of protein isoforms in an integrated immunoassay. *Journal of Immunological Methods* 246, 25–36.

- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B., De Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 2003. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins* 50, 437–50.
- Mackenzie, C.D., Smith, B.O., Meister, A., Blume, A., Zhao, X., Lu, J.R., Kennedy, M.W., Cooper, A., 2009. Ranaspumin-2: structure and function of a surfactant protein from the foam nests of a tropical frog. *Biophysical Journal* 96, 4984–4992.
- Mann, M., Jensen, O.N., 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology* 21, 255–61.
- Marsden, R.L., Lee, D., Maibaum, M., Yeats, C., Orengo, C.A., 2006. Comprehensive genome analysis of 203 genomes provides structural genomics with new insights into protein family space. *Nucleic Acids Research* 34, 1066–80.
- Matthews, B.W., 1968. Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology* 33, 491–497.
- McClements, D.J., 2004. Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 9, 305–313.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., 2007. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied crystallography* 40, 658–674.
- McDonald, R.E., Fleming, R.I., Beeley, J.G., Bovell, D.L., Lu, J.R., Zhao, X., Cooper, A., Kennedy, M.W., 2009. Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva. *PloS one* 4, e5726.
- McMahon, S.A., Walsh, M.A., Ching, R.T., Carter, L.G., Dorward, M., Johnson, K.A., Liu, H., Oke, M., Bloch Jr., C., Kennedy, M.W., Latiff, A.A., Cooper, A., Taylor, G.L., White, M.F., Naismith, J.H., 2006. Crystallization of Ranasmurfin, a blue-coloured protein from *Polypedates leucomystax*. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 62, 1124–1126.
- McPherson, A., Cudney, B., 2006. Searching for silver bullets: an alternative strategy for crystallizing macromolecules. *Journal of structural biology* 156, 387–406.
- Mitidieri, F.E., Wagner, J.R., 2002. Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. *Food Research International* 35, 547–557.
- Montiel, J., Berghman, L.R., Arámburo, C., 1992. Identification of growth hormone molecular variants in chicken serum. *General and Comparative Endocrinology* 88, 298–306.
- Mukherjee, S., Das, P., Sen, R., 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in biotechnology* 24, 509–15.
- Murshudov, G.N., Skubák, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F., Vagin, A.A., 2011. REFMAC5 for the refinement of macromolecular

- crystal structures. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 67, 355-67.
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., Sivachidambaram, P., 2008. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science* 94, 736-747.
- Neu, T.R., 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological reviews* 60, 151-66.
- Nitschke, M., Pastore, G.M., 2002. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova* 25, 772-776.
- Oke, M., Ching, R.T.Y., Carter, L.G., Johnson, K.A., Liu, H., McMahon, S.A., White, M.F., Bloch, C., Botting, C.H., Walsh, M.A., Latiff, A.A., Kennedy, M.W., Cooper, A., Naismith, J.H., 2008. Unusual chromophore and cross-links in ranasmurfin: a blue protein from the foam nests of a tropical frog. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 47, 7853-6.
- Patel, M., 2004. Surfactants Based on Renewable Raw Materials. *Journal of Industrial Ecology* 7, 47-62.
- Porollo, A., Meller, J., 2007. Prediction-based fingerprints of protein-protein interactions. *Proteins* 66, 630-45.
- Pough, F.H., Andrews, R.M., Cadle, J.E., Crump, M.L., Savitzky, A.H., Wells, K.D., 2001. *Herpetology* (2nd Edition). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 612 p.
- Prado, C.P. de A., Uetanabaro, M., Haddad, C.F.B., 2002. Description of a New Reproductive Mode in *Cope* 2002, 1128-1133.
- Prado, C.P.A., Toledo, L.F. Zina, J., Haddad, C.F.B., 2005. Trophic eggs in the foam nests of *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura, Leptodactylidae): An Experimental Approach. *Herpetological Journal* 15, 279-284.
- Protein Data Bank, 2013. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>(Acesso: Apr 11 2013).
- Provencher, S.W., Glockner, J., 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-37.
- Pyron, R.A., Wiens, J.J., 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular phylogenetics and evolution* 61, 543-83.
- Rios, R.M., Martin, J., Torres, A., Fedriani, C., 1992. Production and characterization of three polyclonal antibodies raised against cyst wall proteins of a hypotrichous ciliate. *Journal of Protozoology* 39, 584-588.

- Rodríguez, D., Sammito, M., Meindl, K., De Ilarduya, I.M., Potratz, M., Sheldrick, G.M., Usón, I., 2012. Practical structure solution with ARCIMBOLDO. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 68, 336–43.
- Rohl, C.A., Baker, D., 2002. De Novo Determination of Protein Backbone Structure from Residual Dipolar Couplings Using Rosetta. *Journal of the American Chemical Society* 124, 2723–2729.
- Rosenberg, E., Ron, E.Z., 1997. Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Current opinion in biotechnology* 8, 313–6.
- Rupp, B., 2010. *Biomolecular Crystallography*. Garland Science. New York, NY, USA.
- Rost, B., 1999. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein engineering* 12, 85–94.
- Salthe, S.N., Duellman, W.E., 1973. Quantitative constraints associated with reproductive mode in anurans. Páginas do Capítulo 6, *Evolutionary Biology of Anurans: Contemporary Research on Major Problems*. University of Missouri Press.
- Schägger, H., Von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368–379.
- Seymour, R.S., Loveridge, J.P., 1994. Embryonic and larval respiration in the arboreal foam nests of the african frog *Chiromantis xerampelina*. *The Journal of Experimental Biology* 197, 31–46.
- Sheldrick, G.M., 2010. Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 479–85.
- Song, C.-S., Ye, R.-Q., Mu, B.-Z., 2008. Aggregation behavior and surface morphology studies of surfactin in Langmuir–Blodgett films. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 330, 49–54.
- Sreerama, N., Woody, R.W., 1993. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Analytical Biochemistry* 209, 32–44.
- Steinkellner, G., Rader, R., Thallinger, G.G., Kratky, C., Gruber, K., 2009. VASCo: computation and visualization of annotated protein surface contacts. *BMC bioinformatics* 10, 32.
- Stokes-Rees, I., Sliz, P., 2010. Protein structure determination by exhaustive search of Protein Data Bank derived databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 21476–81.
- Tadros, T.F., 2009. *Emulsion Science Technology: A General Introduction*. Edited by Tharwat F. Tadros. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527-32525-2.

- Tadros, T, Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C., 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 108-109, 303-318
- Tanaka, S., Nishihira, M., 1987. A field study of seasonal, daily, and diel activity patterns of *Eublepharis kuroi*. *Herpetologica* 43, 482-489.
- Taylor, J.S., Raes, J., 2004. Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annual review of Genetics* 38, 615-43.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Van der Ven, C., Gruppen, H., De Bont, D.B., Voragen, A.G., 2001. Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5005-12.
- Van Vlijmen, H.W.T., Gupta, A., Narasimhan, L.S., Singh, J., 2004. A novel database of disulfide patterns and its application to the discovery of distantly related homologs. *Journal of Molecular Biology* 335, 1083-92.
- Vargo, K.B., Parthasarathy, R., Hammer, D.A., 2012. Self-assembly of tunable protein suprastructures from recombinant oleosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 11657-62.
- Viades-Trejo, J., Abascal-González, D.M., Gracia-Fadrique, J., 2012. Critical Micelle Concentration of Poly(Oxy-1,2-Ethanediy), α -Nonyl Phenol- ω -Hydroxy Ethers (C₉H₁₉C₆H₄E i=6,10.5,12,17.5) by Surface Equations of State. *Journal of Surfactants and Detergents* 15, 637-645.
- Waters, L.J., Hussain, T., Parkes, G.M.B., 2012. Titration calorimetry of surfactant-drug interactions: Micelle formation and saturation studies. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 53, 36-41.
- Wei, C., Guo, J., Wang, C., 2011. Dual stimuli-responsive polymeric micelles exhibiting "AND" logic gate for controlled release of adriamycin. *Macromolecular rapid Communications* 32, 451-5.
- Wendell, D., Todd, J., Montemagno, C., 2010. Artificial photosynthesis in ranaspumin-2 based foam. *Nano letters* 10, 3231-6.
- Williams, G.T., Alterman, A., 2007. MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry as a new tool for amino acids analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18, 279-284.

- Ximenes, J.C.M., Melo, G.C., Melo, V.M.M., Mendes Filho, J., Souza Filho, A.G., 2012. Optical properties of single wall carbon nanotubes dispersed in biopolymers. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 73, 232–236.
- Zhang, Q., Gao, Z., Xu, F., Tai, S., Liu, X., Mo, S., Niu, F., 2012. Surface tension and aggregation properties of novel cationic gemini surfactants with diethylammonium headgroups and a diamido spacer. *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids* 28, 11979–87.
- Zhang, X.L., Penfold, J., Thomas, R.K., Tucker, I.M., Petkov, J.T., Bent, J., Cox, A., Grillo, I., 2011. Self-assembly of hydrophobin and hydrophobin/surfactant mixtures in aqueous solution. *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids* 27, 10514–22.
- Zheng, C., Li, Z., Su, J., Zhang, R., Liu, C., Zhao, M., 2012. Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus* YM-1. *Journal of Applied Microbiology* 113, 44–51.
- Zulauf, M., D'Arcy, A., 1992. Light scattering of proteins as a criterion for crystallization. *Journal of Crystal Growth* 122, 102–106.

ANEXOS A – ARTIGO PUBLICADO CONTENDO ALGUNS DOS RESULTADOS OBTIDOS NESTE ESTUDO

electronic reprint

Acta Crystallographica Section F
**Structural Biology
and Crystallization
Communications**
ISSN 1744-3091
Editors: H. M. Einspahr and M. S. Weiss

Crystallization and preliminary X-ray diffraction of the surfactant protein *Lv-ranaspumin* from the frog *Leptodactylus vastus*

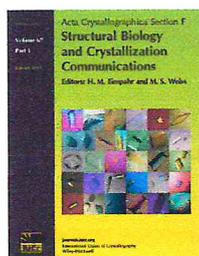
Denise Cavalcante Hissa, Gustavo Arruda Bezerra, Britta Obrist, Ruth
Birner-Grünberger, Vânia Maria Maciel Melo and Karl Gruber

Acta Cryst. (2012). F68, 321–323

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see <http://journals.iucr.org/services/authorrights.html>



Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications is a rapid all-electronic journal, which provides a home for short communications on the crystallization and structure of biological macromolecules. Structures determined through structural genomics initiatives or from iterative studies such as those used in the pharmaceutical industry are particularly welcomed. Articles are available online when ready, making publication as fast as possible, and include unlimited free colour illustrations, movies and other enhancements. The editorial process is completely electronic with respect to deposition, submission, refereeing and publication.

Crystallography Journals Online is available from journals.iucr.org

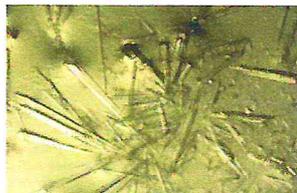
Denise Cavalcante Hissa,^a
Gustavo Arruda Bezerra,^b
Britta Obrist,^c Ruth Birner-
Grünberger,^c Vânia Maria
Maciel Melo^{a**‡} and Karl
Gruber^{b**‡}

^aLaboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBiotech), Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Avenida Humberto Monte 2977, Campus do Pici, Bloco 909, 60455-000 Fortaleza-CE, Brazil, ^bInstitute of Molecular Biosciences, University of Graz, Humboldtstrasse 50/3, A-8010 Graz, Austria, and ^cInstitute of Pathology, Medical University of Graz, Stiftingtalstrasse 24, A-8010 Graz, Austria

‡ These authors made equal contributions.

Correspondence e-mail: vmmelo@ufc.br, karl.gruber@uni-graz.at

Received 21 December 2011
Accepted 21 January 2012



© 2012 International Union of Crystallography
All rights reserved

Crystallization and preliminary X-ray diffraction of the surfactant protein *Lv-ranaspumin* from the frog *Leptodactylus vastus*

Lv-ranaspumin is a natural surfactant protein with a molecular mass of 23.5 kDa which was isolated from the foam nest of the frog *Leptodactylus vastus*. Only a partial amino-acid sequence is available for this protein and it shows it to be distinct from any protein sequence reported to date. The protein was purified from the natural source by ion-exchange and size-exclusion chromatography and was crystallized by sitting-drop vapour diffusion using the PEG/Ion screen at 293 K. A complete data set was collected to 3.5 Å resolution. The crystal belonged to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 51.96$, $b = 89.99$, $c = 106.00$ Å. Assuming the presence of two molecules in the asymmetric unit, the solvent content was estimated to be 54%.

1. Introduction

Some amphibian species have developed a breeding strategy in which they deposit their eggs in environmentally stable foams in order to protect the eggs and larval development (Heyer, 1969). Recent studies have reported a rich diversity of proteins in amphibian foam nests (Fleming *et al.*, 2009; Hissa *et al.*, 2008; Cooper *et al.*, 2005) and a new class of proteins has emerged termed ranaspumins (proteins from frog foam nests). When the foam nests of the túngara frog (*Engystomops pustulosus*) were studied, it became clear that foam formation is only possible owing to the presence of surfactant proteins together with other functional proteins and carbohydrates (Fleming *et al.*, 2009; Cooper *et al.*, 2005).

These surfactant proteins have distinct hydrophobic and hydrophilic structural domains that adsorb naturally at the air–water interface, thus allowing foam formation. Proteins with natural foam and/or surfactant activities are rare in nature, as conventional surfactants may harm the cell membranes of biological tissues. In addition, foam formation requires a high energy input to overcome water surface tension (Cooper & Kennedy, 2010).

Currently, it is still not well known how the structures of surfactant proteins behave at interfacial or superficial surfaces, although some evidence for unfolding or conformational changes has been obtained when studying the surfactant proteins hydrophobins (de Vocht *et al.*, 2002) and ranaspumin-2 (Mackenzie *et al.*, 2009). In this study, we describe the crystallization of *Lv-ranaspumin*, a surfactant protein isolated from the foam nest of the tropical frog *Leptodactylus vastus*. It is a 23.5 kDa protein that shows a high and stable surfactant activity. The N-terminal amino-acid sequence is distinct from any other currently known protein, suggesting that *Lv-ranaspumin* may adopt a novel unique structure (Hissa *et al.*, 2008).

2. Materials and methods

2.1. Purification

Foam nests were collected and foam fluid was obtained according to a previously published procedure (Hissa *et al.*, 2008). *Lv-ranaspumin* is the main protein in the nest and it was purified by ion-exchange chromatography (Mono Q 4.6/100, GE Healthcare; eluted with a linear gradient of 20 mM Tris–HCl, 1 M NaCl) followed by

crystallization communications

Table 1
Data-collection statistics.

Values in parentheses are for the outer resolution shell.

Beamline	BM14U, ESRF
Wavelength (Å)	0.9789
Unit-cell parameters (Å)	$a = 51.96, b = 89.99, c = 106.00$
Space group	$P2_12_12_1$
Resolution range (Å)	53.00–3.50 (3.69–3.50)
Completeness (%)	100.0 (100.0)
Multiplicity	6.8 (7.0)
R_{merge}^\dagger	0.10 (0.52)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	9.6 (3.5)
Total reflections	45699 (6790)
Unique reflections	6710 (965)

$$\dagger R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})}$$

size-exclusion chromatography (HiLoad 26/60 Superdex 200, GE Healthcare; equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl). The size-exclusion chromatography column was calibrated with molecular-mass standards purchased from Bio-Rad. The single protein fraction of 23.5 kDa was concentrated to about 10 mg ml⁻¹ (based on the absorbance at 280 nm) using Amicon centrifugal filter units (Millipore) with a 10 kDa cutoff membrane prior to crystallization trials. The homogeneity of the protein sample was determined by SDS-PAGE analysis (12% gel) under reducing conditions using molecular-mass markers purchased from Thermo Scientific.

2.2. Crystallization

A total of 384 initial crystallization conditions were tested utilizing various commercially available screens: Index (Hampton Research), Morpheus (Molecular Dimensions), JCSG+ Suite (Qiagen), PEG/Ion (Hampton Research) and PEG/Ion 2 (Hampton Research). The most promising crystal was grown at 293 K by the sitting-drop vapour-diffusion method in the PEG/Ion screen using an OryxNano robot (Douglas Instruments Ltd) to set up the drops. The drop consisted of 0.7 µl protein solution mixed with 0.7 µl reservoir solution and was allowed to equilibrate against 70 µl reservoir solution. The protein crystals grew within three weeks in condition No. 8 [0.2 M KCl, 20% (w/v) PEG 3350 pH 7.0]. These crystals were reproducible and

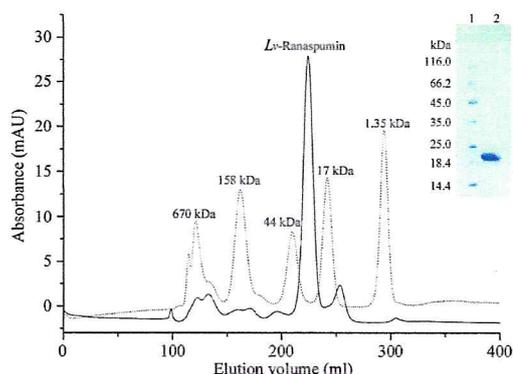


Figure 1
Size-exclusion chromatography and SDS-PAGE analysis of *Lv-ranaspumin*. A chromatogram from a Superdex 200 26/60 column of *Lv-ranaspumin* (solid line) and molecular-mass standards (dotted line) is shown. The inset shows an SDS-PAGE (run under reducing condition) of the major peak in the chromatogram.

the conditions are currently being optimized in order to obtain better diffracting crystals.

2.3. Data collection and processing

Diffraction data were collected on beamline BM14U at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble equipped with a MAR 225 CCD detector. The data were processed using the programs *MOSFLM* (Leslie, 2006; Battye *et al.*, 2011) and *SCALA* (Evans, 2006). Details of data collection and processing are summarized in Table 1.

2.4. Mass-spectrometric analysis of the crystal

A crystal of *Lv-ranaspumin* was harvested and washed twice by transferring it into a fresh drop (1 µl) of reservoir solution. In the third drop the crystal was broken up and the solution was used for mass-spectrometric (MS) analysis using an UltrafleXtreme (Bruker Daltonics) matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer operating in positive linear mode acquiring spectra in the mass range m/z 6000–100 000. 1 µl sample was mixed with 1 µl 2% trifluoroacetic acid (TFA) and 1 µl matrix solution [15.2 mg ml⁻¹ 2,5-dihydroxyacetophenone and 20 mM ammonium citrate dibasic in 75% (v/v) ethanol]. This mixture (1 µl) was spotted onto a MALDI target plate and left at room temperature (295 K) for drying. External mass calibration was performed using Protein Standard II (Bruker Daltonics).

3. Results and discussion

The protein *Lv-ranaspumin* was purified to apparent homogeneity by ion-exchange and size-exclusion chromatography as confirmed by SDS-PAGE (Fig. 1). The size-exclusion chromatogram indicated no tendency towards the formation of aggregates or oligomers. The elution volume of the most prominent peak is consistent with the protein being predominantly monomeric.

A large number of long needles appeared three weeks after crystallization setup (Fig. 2). In order to verify that the protein crystals consisted of *Lv-ranaspumin*, MS analyses of the obtained crystal were performed and showed the most prominent molecular mass signals to correspond to singly-, doubly- and triply-charged protein species. Therefore, we are confident that the crystals are indeed comprised of *Lv-ranaspumin* (Fig. 3). A closer inspection of the m/z range from 22 000 to 24 000 indicated the presence of six major protein species (inset in Fig. 3). The mass difference between the major proteins



Figure 2
Crystals of *Lv-ranaspumin* grown by the sitting-drop vapour-diffusion method at 293 K in 0.2 M KCl, 20% (w/v) PEG 3350 pH 7.0.

crystallization communications

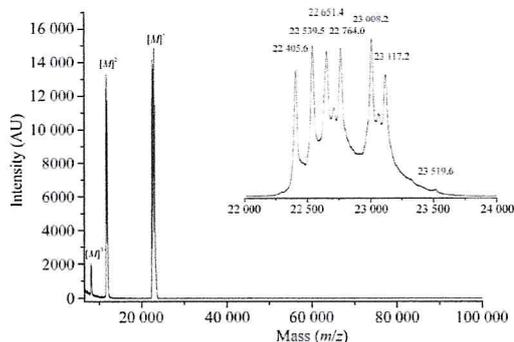


Figure 3 MALDI-TOF spectra (obtained in linear positive mode) of a dissolved *Lv*-ranaspumum crystal. Singly-, doubly- and triply-charged molecules are indicated. The inset shows an expanded view of the singly-charged peak.

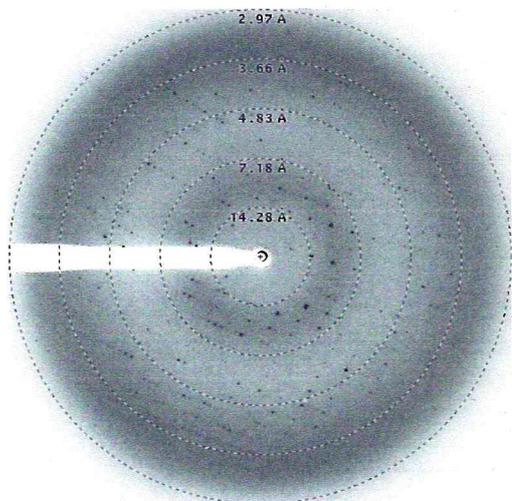


Figure 4 X-ray diffraction image of an *Lv*-ranaspumum crystal.

species led to the hypothesis that the protein may have lost amino-acid residues during the crystallization process.

Crystals were harvested and flash-cooled in liquid nitrogen without any cryoprotectant. 180 diffraction images were collected at 100 K to a maximum resolution of 3.0 Å (Fig. 4), but were scaled to 3.5 Å based on R_{merge} and signal-to-noise ratios $[I/\sigma(I)]$. Diffraction images

were integrated in the primitive orthorhombic space group $P2_12_12_1$ as confirmed by the program *POINTLESS* (Evans, 2006). Calculation of the Matthews coefficient ($2.69 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, corresponding to a solvent content of 54%) yielded two molecules in the asymmetric unit as the most probable arrangement [$P(\text{tot}) = 0.92$; Matthews, 1968; Kantardjieff & Rupp, 2003]. Analysis of the data set using the *phenix.xtriage* module of the *PHENIX* suite (Adams *et al.*, 2010) indicated the absence of twinning and the presence of translational pseudosymmetry. The latter may be produced by a noncrystallographic dyad more or less parallel to a crystallographic axis.

The lack of a complete amino-acid sequence hampered the search for a reliable molecular-replacement model and the phase problem still needs to be solved. Because *Lv*-ranaspumum must be purified from the natural source, selenomethionine incorporation is unattainable at present. Based on MS analysis of carboxymethylated protein samples it is anticipated that *Lv*-ranaspumum possesses eight cysteine residues (data not shown), which may just be enough to allow S-SAD phasing. The most promising approach, however, might still be MIR/MAD phasing by the incorporation of heavy atoms.

The behaviour of natural surfactant proteins is still not completely understood and structure elucidation of the protein *Lv*-ranaspumum will allow the correlation of its structure and its function, which could explain its long-term stability and its role in formation of the foam nest.

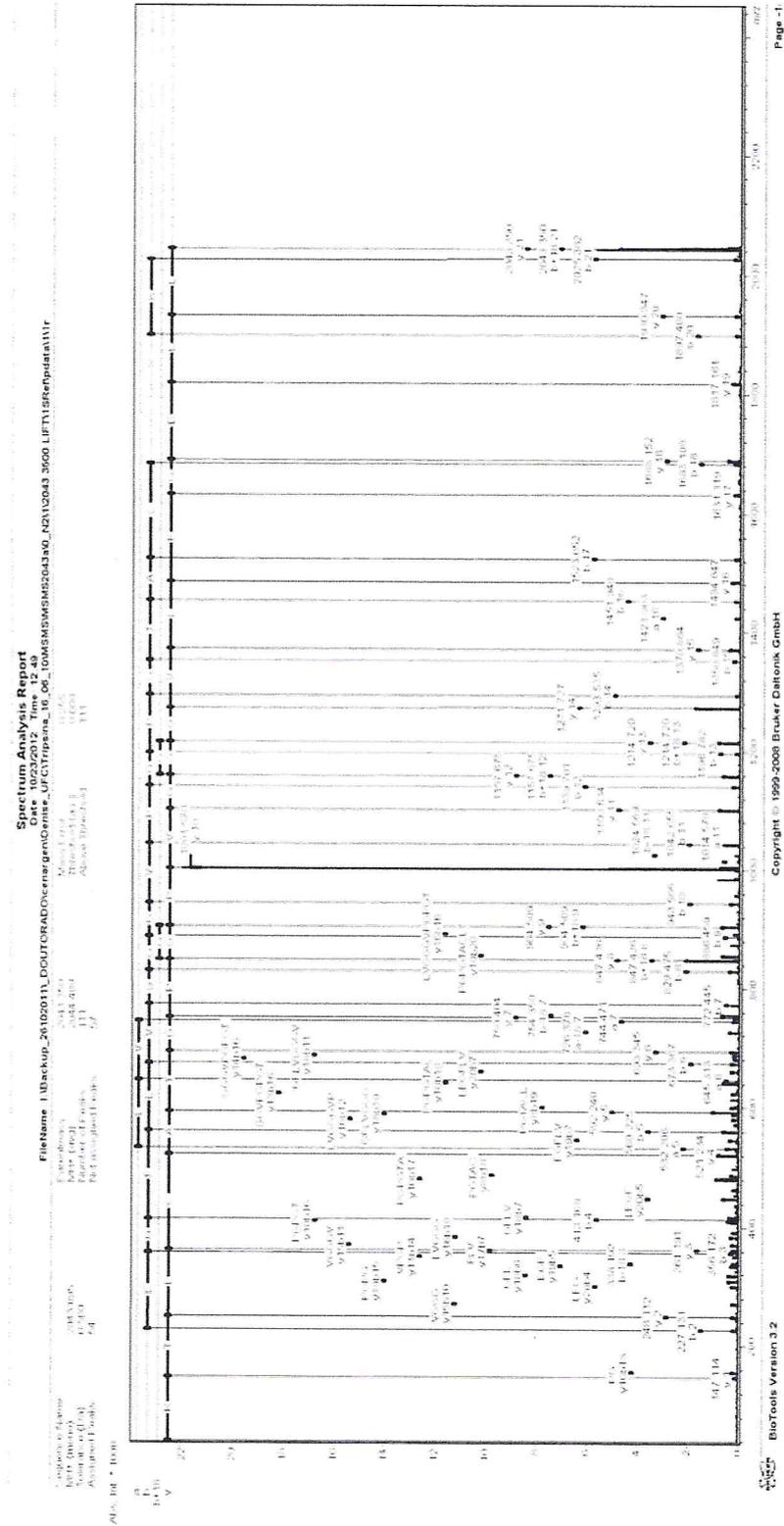
DCH is the recipient of a scholarship provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Process No. 201633/2010-8). This work was supported by Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) and CNPq.

References

- Adams, P. D. *et al.* (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 213–221.
 Batty, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. W. (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 271–281.
 Cooper, A. & Kennedy, M. W. (2010). *Biophys. Chem.* **151**, 96–104.
 Cooper, A., Kennedy, M. W., Fleming, R. L., Wilson, E. H., Videler, H., Wokosin, D. L., Su, T., Green, R. J. & Lu, J. R. (2005). *Biophys. J.* **88**, 2114–2125.
 Evans, P. (2006). *Acta Cryst.* **D62**, 72–82.
 Fleming, R. L., Mackenzie, C. D., Cooper, A. & Kennedy, M. W. (2009). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **276**, 1787–1795.
 Heyer, W. R. (1969). *Evolution*, **23**, 421–428.
 Hissa, D. C., Vasconcelos, I. M., Carvalho, A. F., Nogueira, V. L., Cascon, P., Antunes, A. S., de Macedo, G. R. & Melo, V. M. (2008). *J. Exp. Biol.* **211**, 2707–2711.
 Kantardjieff, K. A. & Rupp, B. (2003). *Protein Sci.* **12**, 1865–1871.
 Leslie, A. G. W. (2006). *Acta Cryst.* **D62**, 48–57.
 Mackenzie, C. D., Smith, B. O., Meister, A., Blume, A., Zhao, X., Lu, J. R., Kennedy, M. W. & Cooper, A. (2009). *Biophys. J.* **96**, 4984–4992.
 Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
 Vocht, M. L. de, Reviakine, I., Ulrich, W. P., Bergsma-Schutter, W., Wösten, H. A., Vogel, H., Brisson, A., Wessels, J. G. & Robillard, G. T. (2002). *Protein Sci.* **11**, 1199–1205.

ANEXO B - FIGURA DOS PRINCIPAIS ESPECTROS DE MASSA PARA SEQUENCIAMENTO DE
NOVO, FIGURA 26

(MH+)2043.3 Tripsina(N-terminal)LLEGFLVGGVPGPGTACLTKScore: 2228239



(MH+) 2182.1 Glu-CGPGTACLTKALKDSGDLLVE

Score: 1291

Spectrum Analysis Report

Date: 10/29/2012 Time: 11:17

File Name: D:\Data\Proteomics\Projects\Glu-HisatGluC_nanoC_Zug_0h_130812\GluC_Zug_0h_nanoC_HCCA_130812\01012182.1170_LIFTVSR\data\117

Mass Error: 137.058

Tolerance (Da): 0.500

Miss Error: 137.058

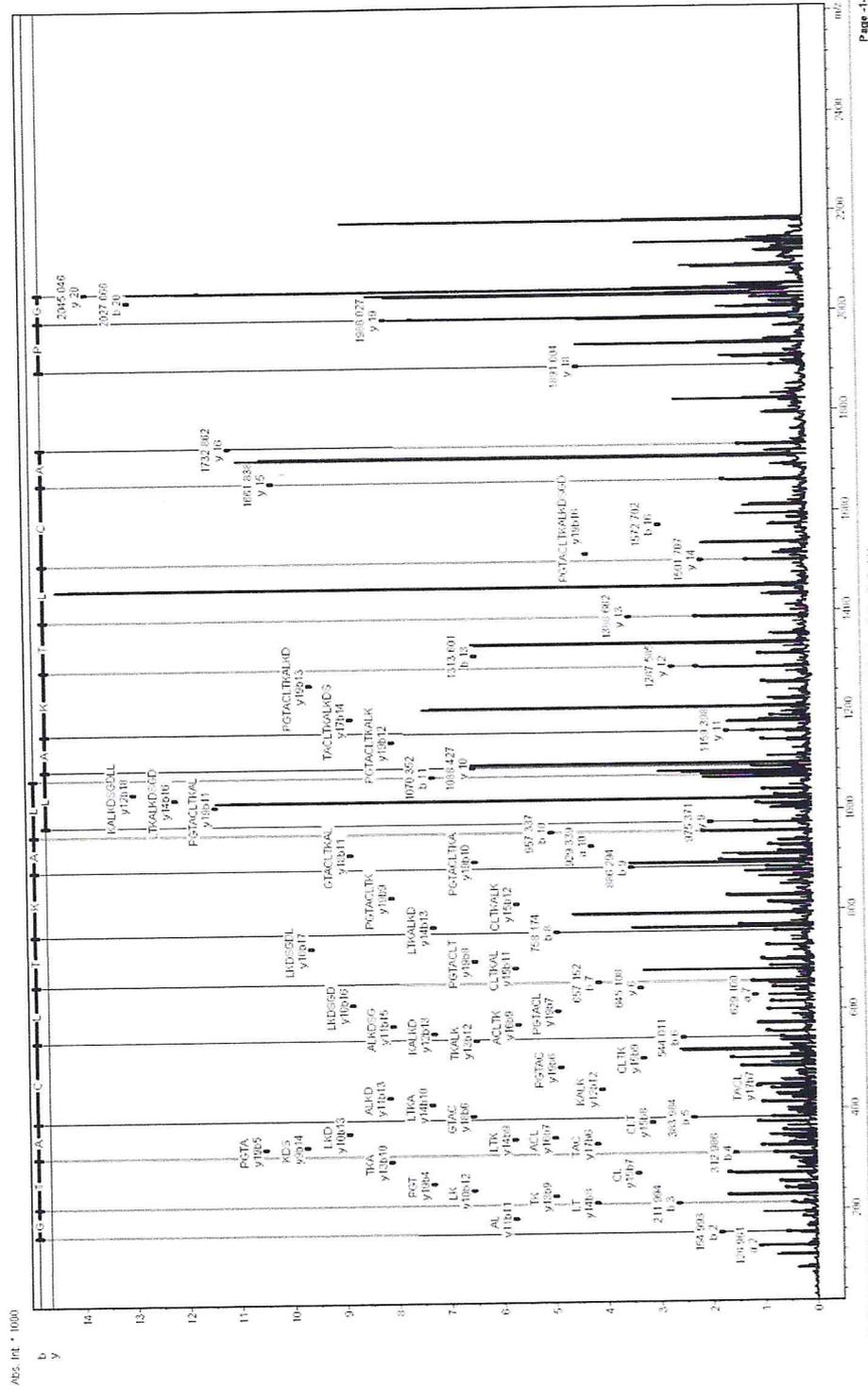
Number of Peaks: 167

Rel. assigned Peaks: 159

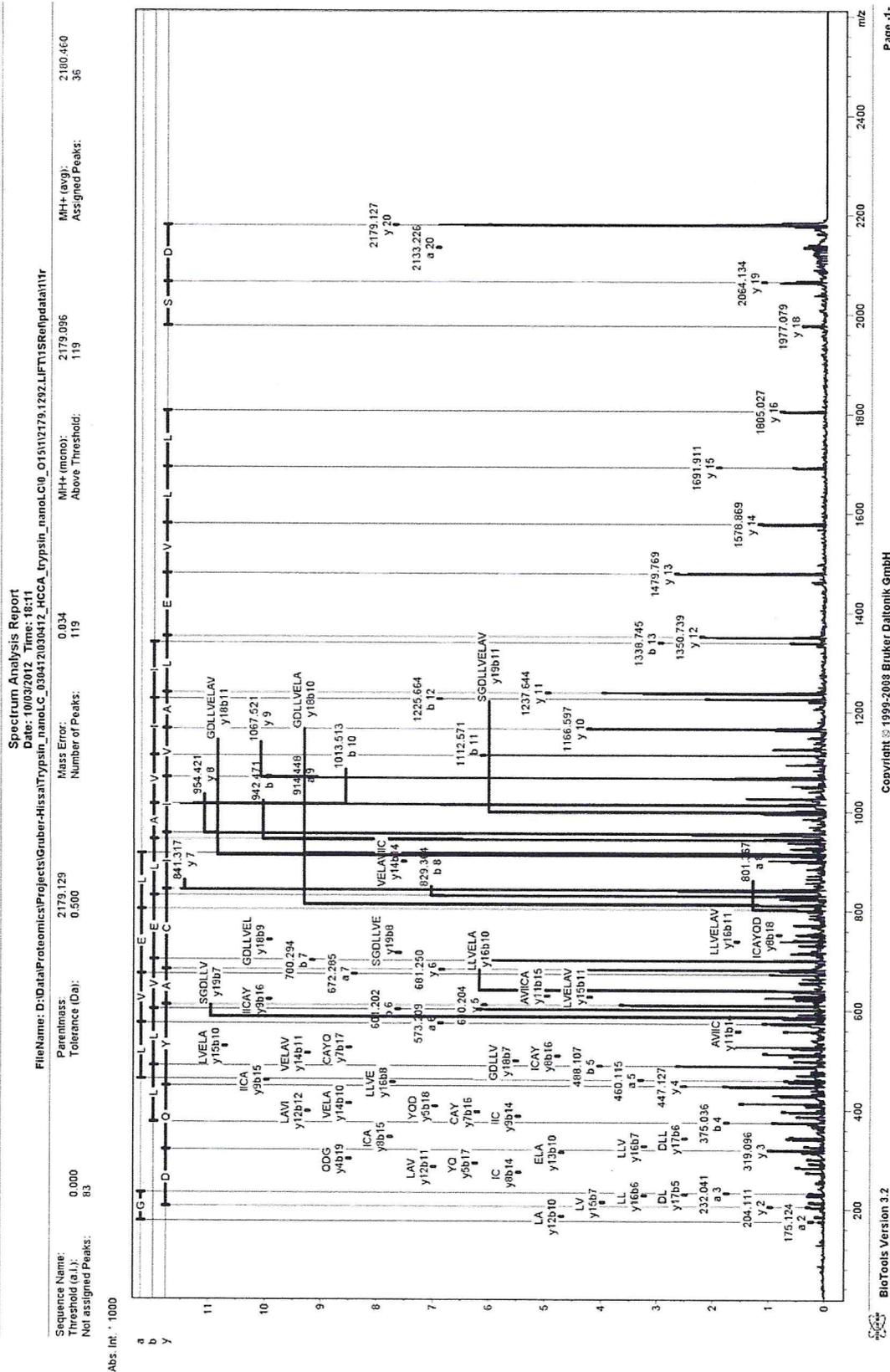
Expected Theoretical Assigned Peaks: 2183.117

Sequence Name: 2046.323

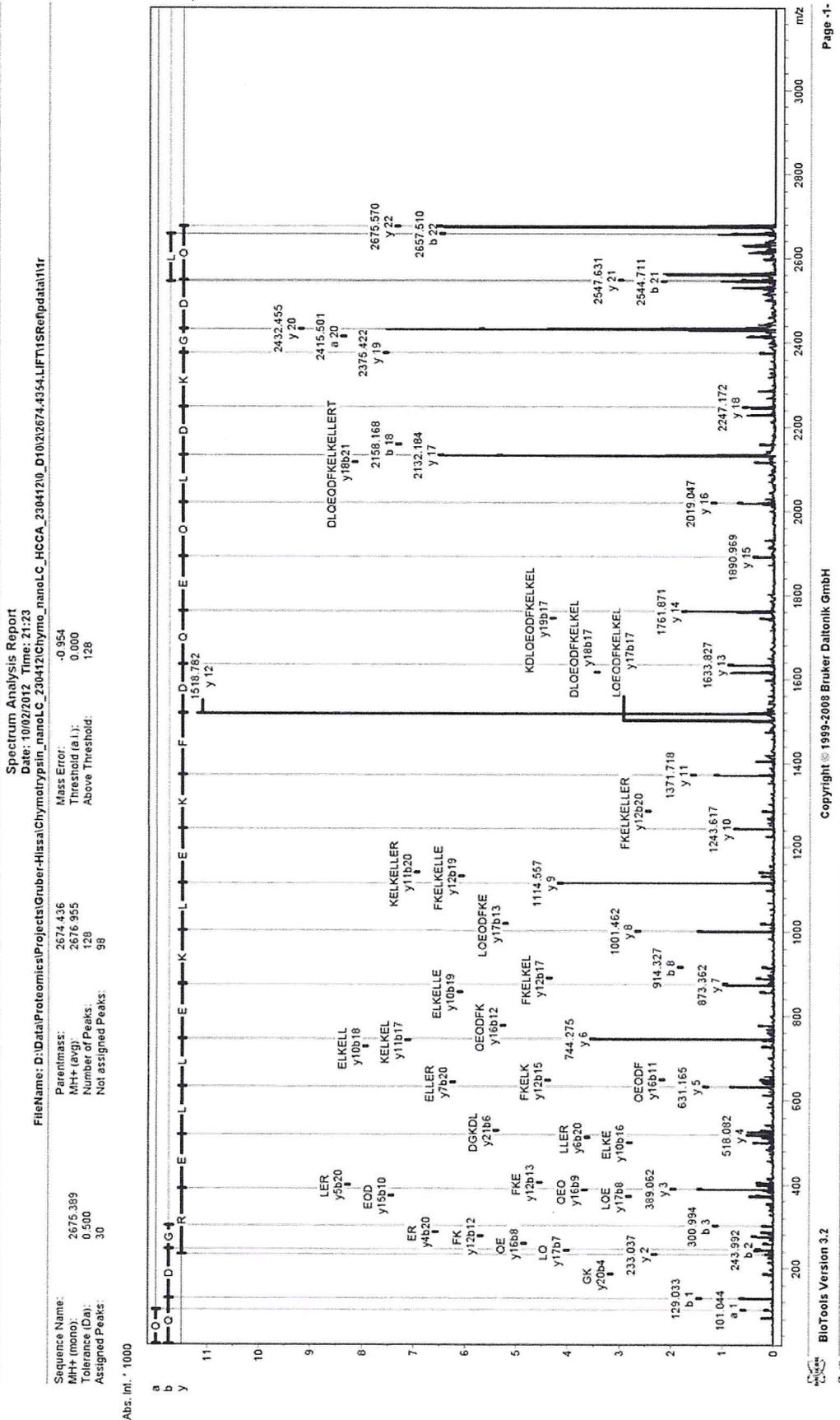
Score Threshold: 167



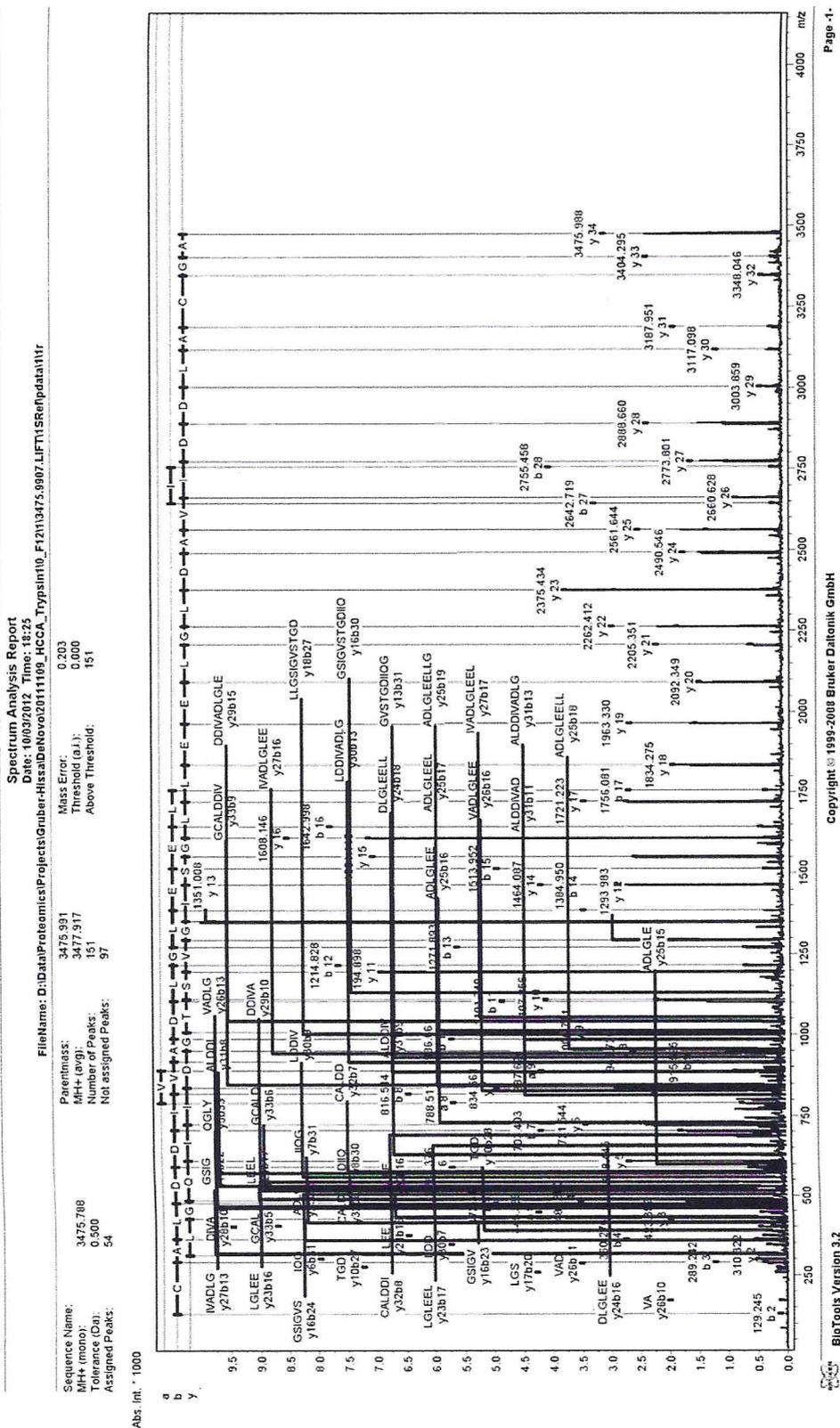
(MH+) 2179.2Tripsina DSGDLLVELAVIICAYQDGKScore: 33831



(MH+) 2674.4 QuimotripsinaQDGGKDLQEQDFKELKELLERTL Score: 2097203

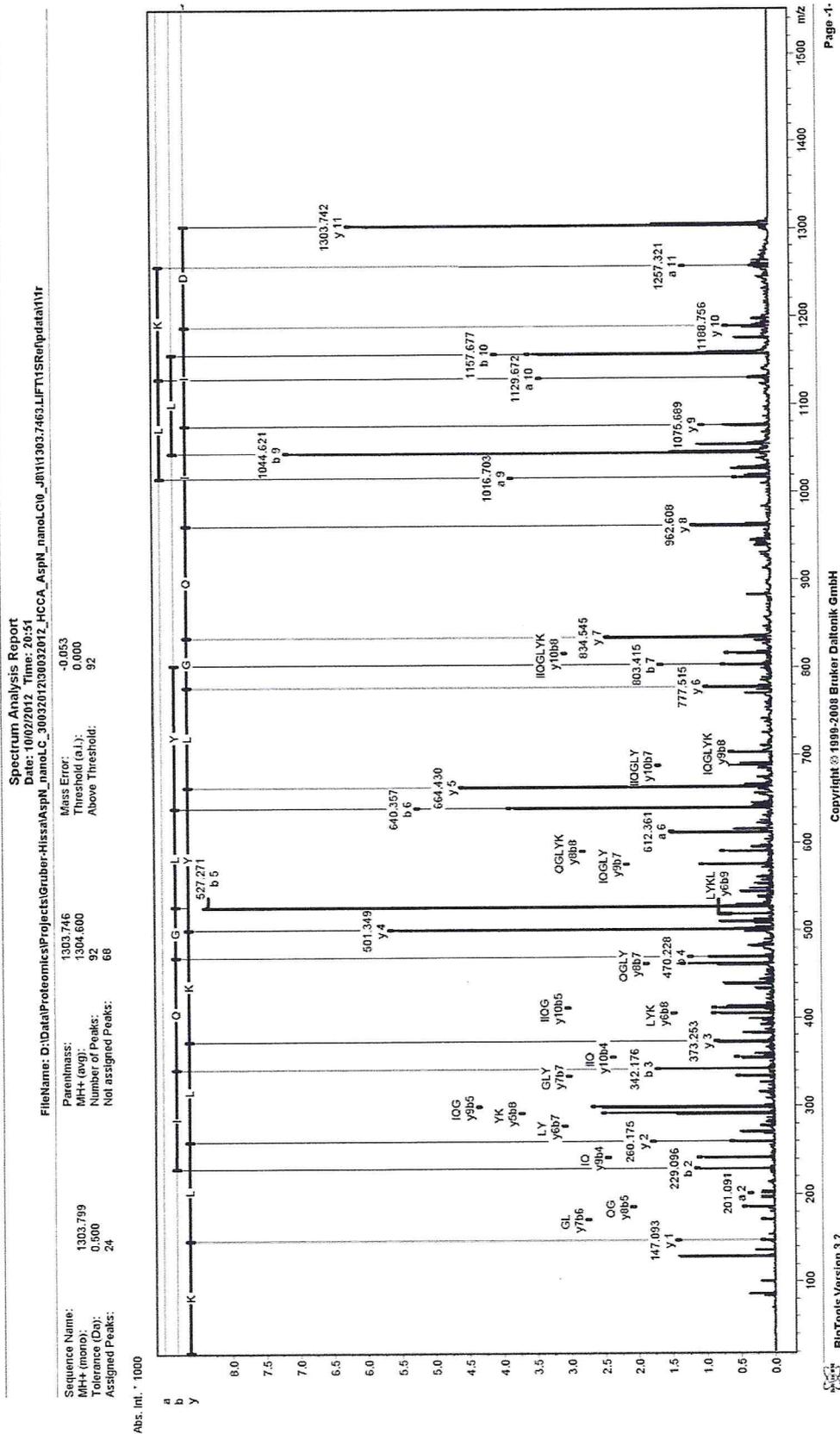


(MH+) 3475.9 TripsinaAGCALDDIVADLGLLELLGSIGVSTGDIIQGLYK Score:1073742007



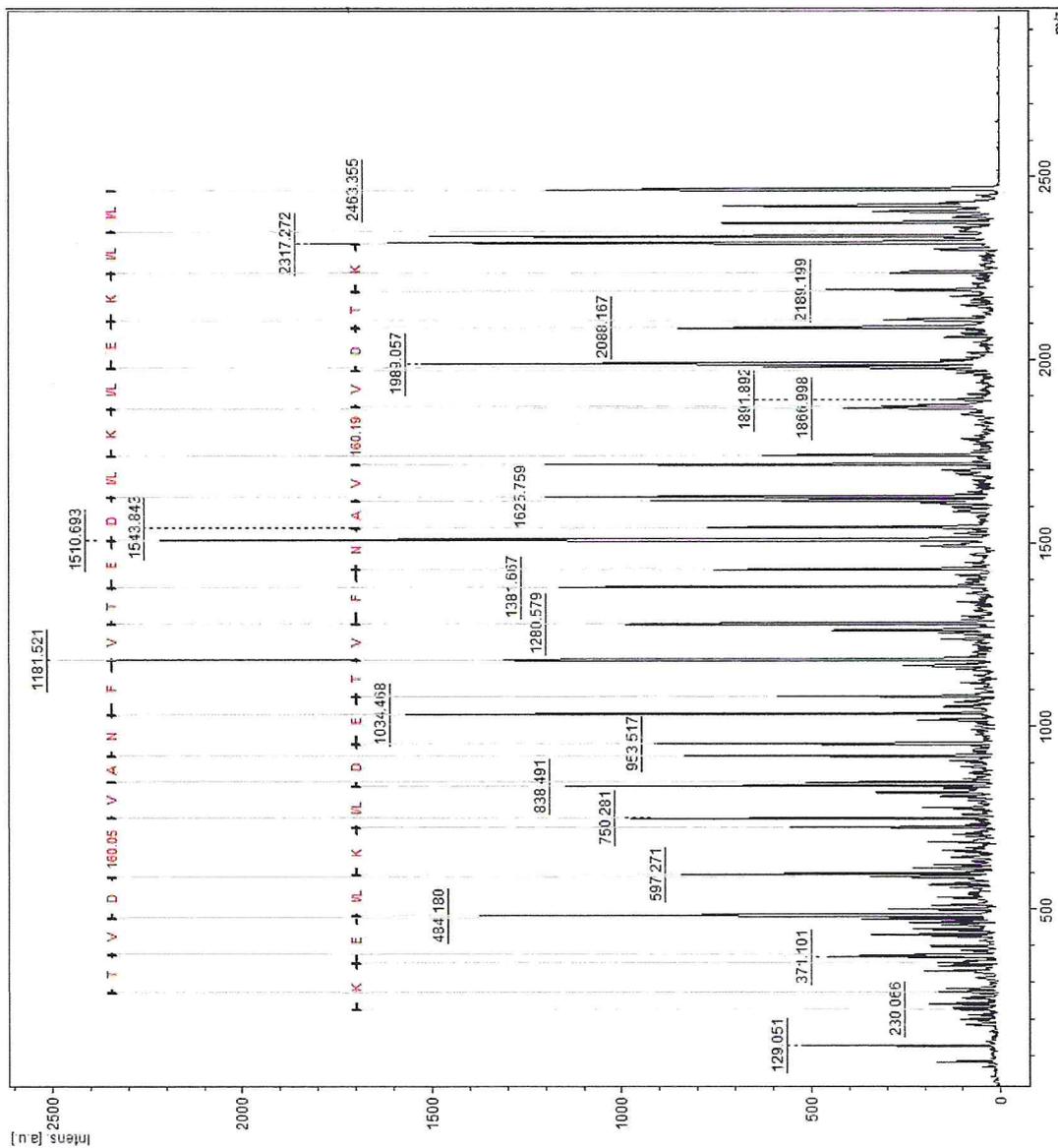
(MH+) 1303.7 Asp-NDIIQGLYKLLK

Score: 2122



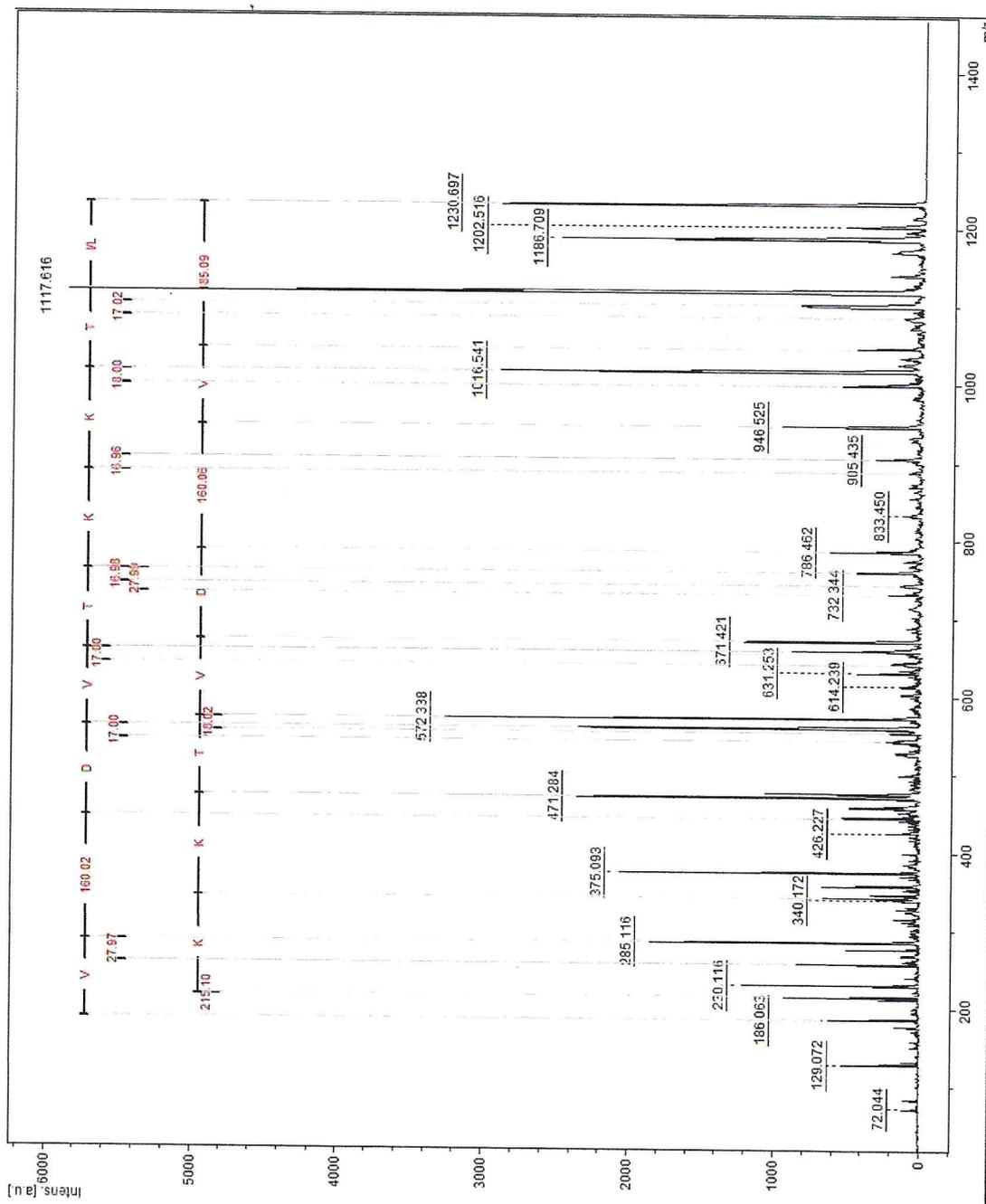
(MH+) 2463.3 TripsinaLLKELKIDETVFNACDVTKK

Score:1572869



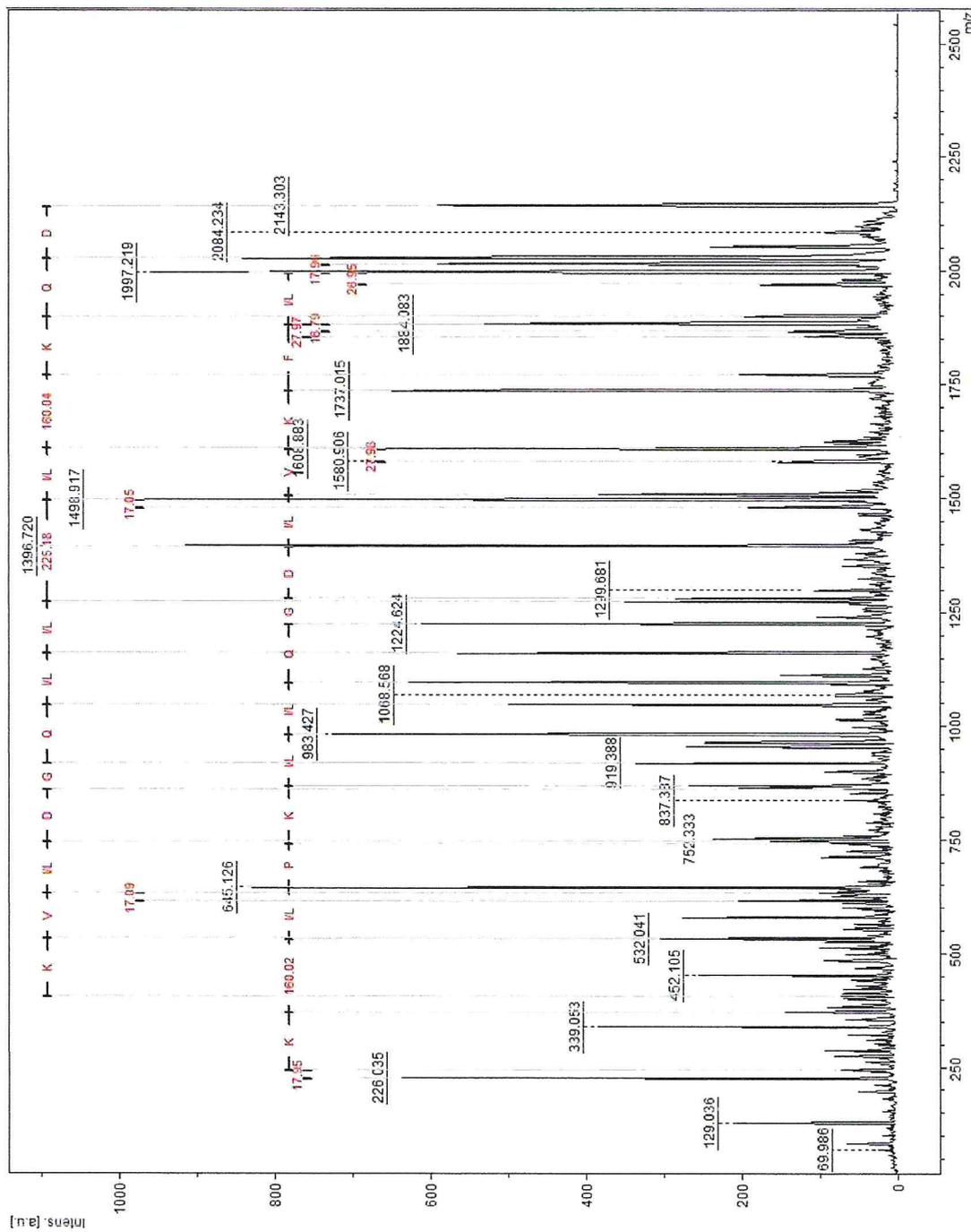
(MH+) 1230.6 QuimotripsinaVCDVTKKTL

Score: Não Determinado (ND)



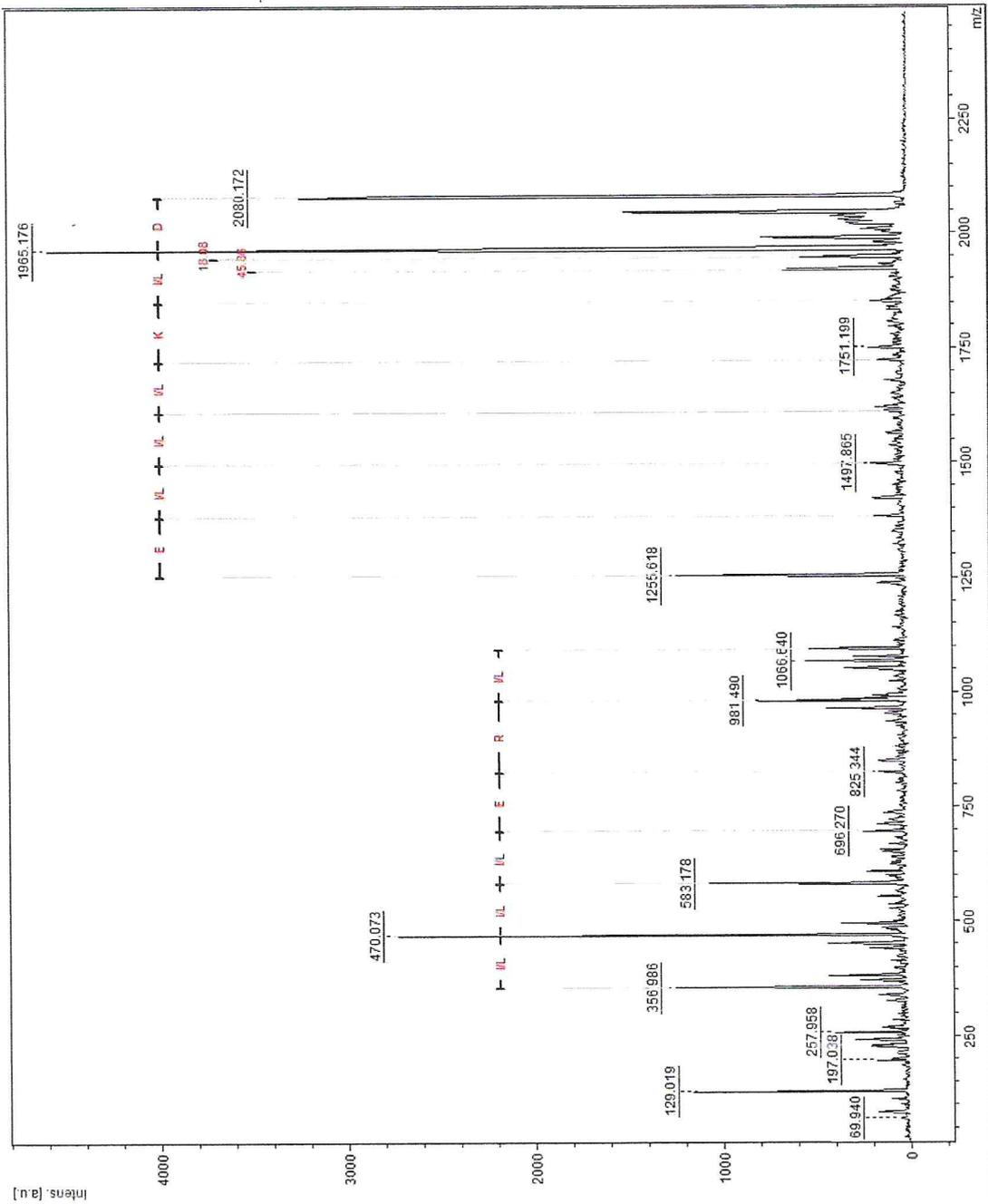
(MH+) 2143.3 Asp-N DQKCLPKILQGDLVKFLK

Score: 66117



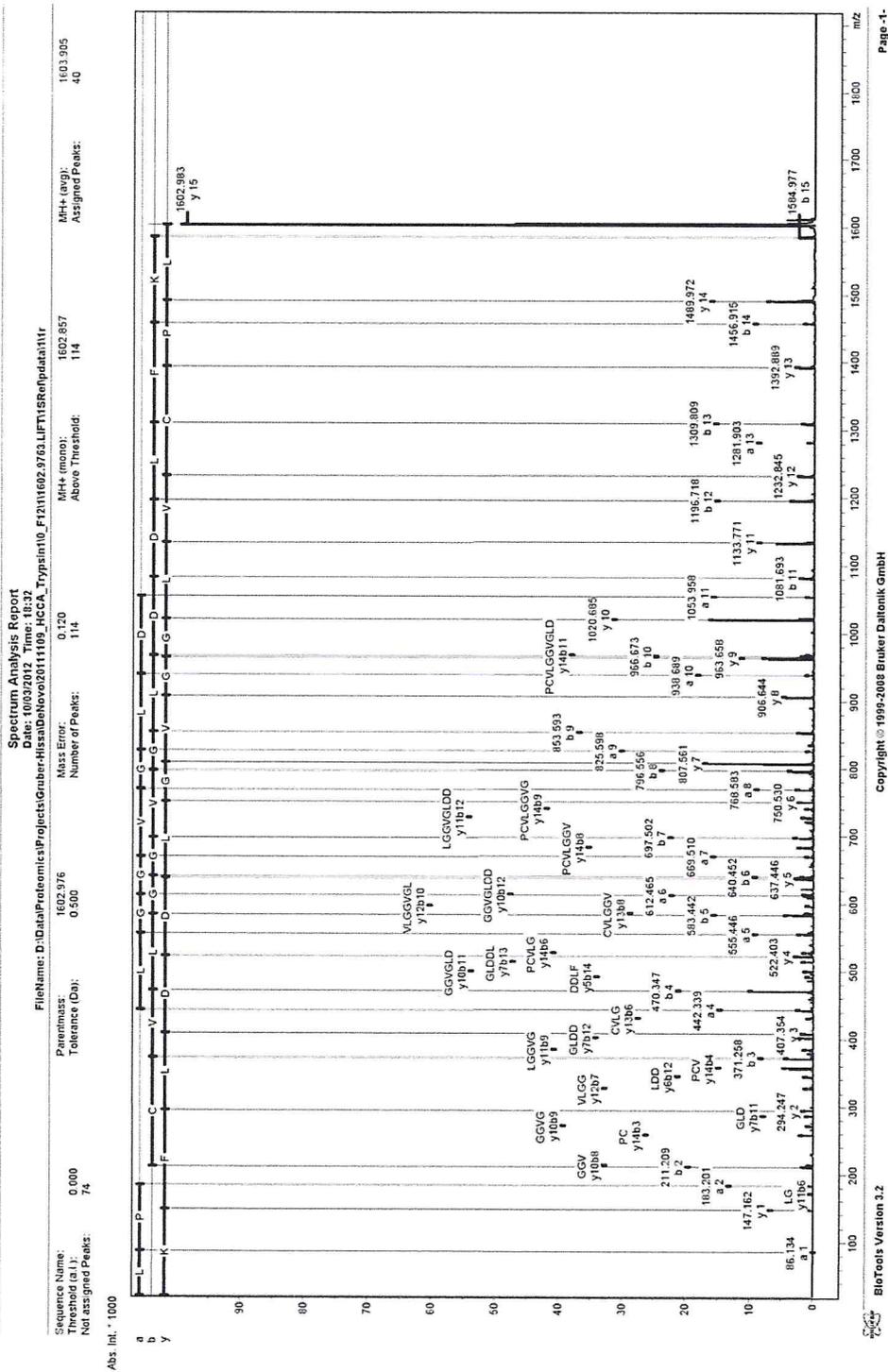
(MH+) 2080.1 AspNDLKIILERLPCVLGGVGLD

Score:420



(MH+) 1602.9 TripsinaLPCVLGGVGLDDLK

Score:49410



(MH+) 1238.7 AspNDDLFKNIFVK

Score:1139

