

5 Resultados e Discussão

5.1 Fluorescência da antroil-ouabaína: efeito da ligação à Na^+, K^+ ATPase

Inicialmente obteve-se o espectro de absorção da antroil-ouabaína para verificar o melhor comprimento de onda para excitação da fluorescência e para utilizar concentrações que não implicassem em correção de efeito de filtro interno.

O espectro de absorção da AO é apresentado na Fig. 5.1. Na região entre 300 e 400 nm o espectro consiste de cinco linhas. Foi calculado um coeficiente de absorção molar para o pico mais intenso, em 364 nm, de $\epsilon_{364} = 3,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Além desse máximo, os dois picos de absorção vizinhos, em 346 nm e 382 nm, são bastante intensos.

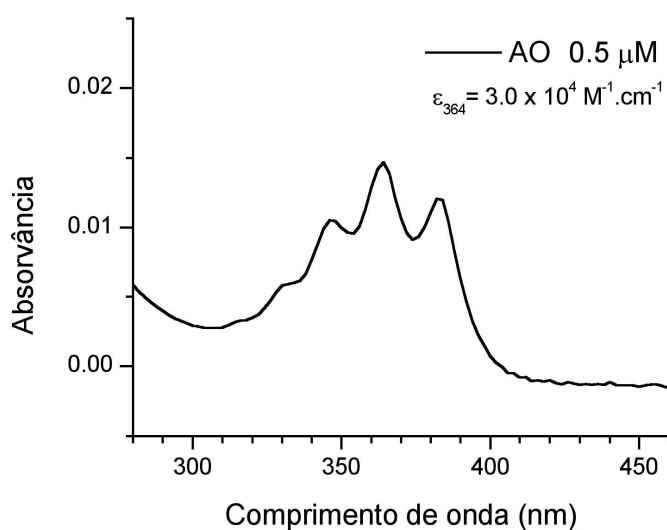


Figura 5.1 Espectro de absorção da AO (0,5 µM) em tampão T₂.

Em seguida foram obtidos os espectros de fluorescência de antroil-ouabaína, excitada sempre em 365 nm.

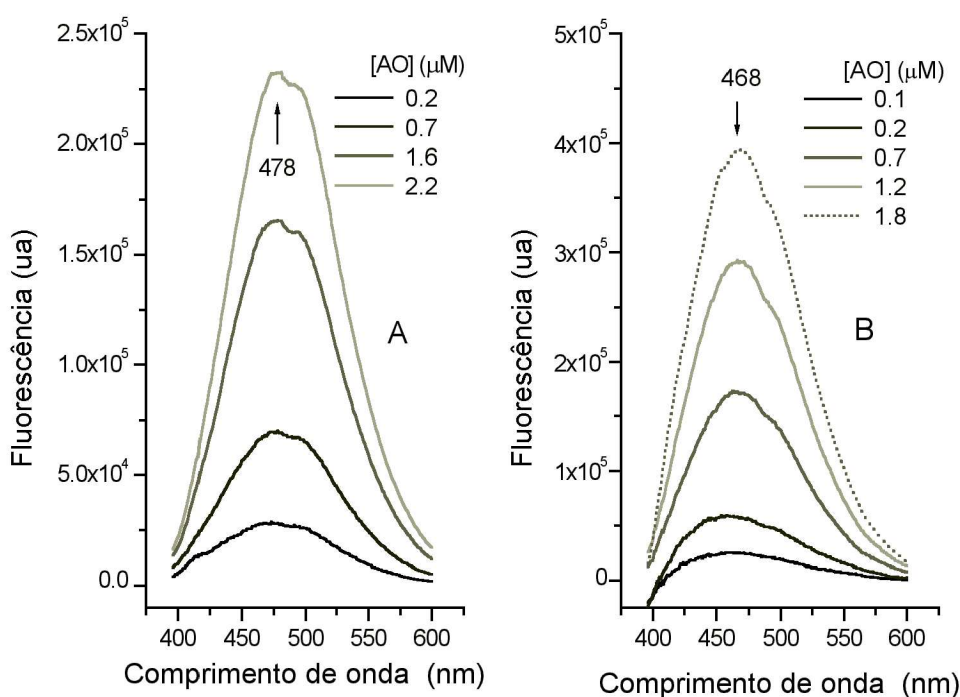


Figura 5.2 Espectros de fluorescência da AO excitada em 365 nm (A) em tampão T_2 (cubeta 1 ml); (B) em presença de Na^+ , K^+ - ATPase.

A Figura 5.2 A mostra os espectros de fluorescência de AO em diferentes concentrações, em tampão T_2 . À medida que a concentração de AO aumenta, a intensidade de fluorescência também vai aumentando linearmente. Observa-se que em cada espectro dois picos são visíveis, o mais intenso em 478 nm e o outro em 495 nm. Não se observa espalhamento relevante da AO no tampão T_2 .

A Figura 5.2 B mostra os espectros de AO também em tampão T_2 , porém em presença da Na^+ , K^+ - ATPase. O espectro controle, de Na^+ , K^+ - ATPase em tampão T_2 , que apresentou bastante espalhamento devido aos fragmentos de membrana, já foi subtraído dos espectros apresentados na Figura 5.2 B. Observa-se que, na presença de Na^+ , K^+ - ATPase, o pico mais intenso de fluorescência da AO sofre um deslocamento para o azul (de 478 nm para 468 nm) e o seu rendimento quântico aumenta; por exemplo para a concentração de 0,7 μM , tanto para A e B, o aumento foi de 1,4 vezes. O pico em 495 nm da Figura 5.2.B quase não aparece.

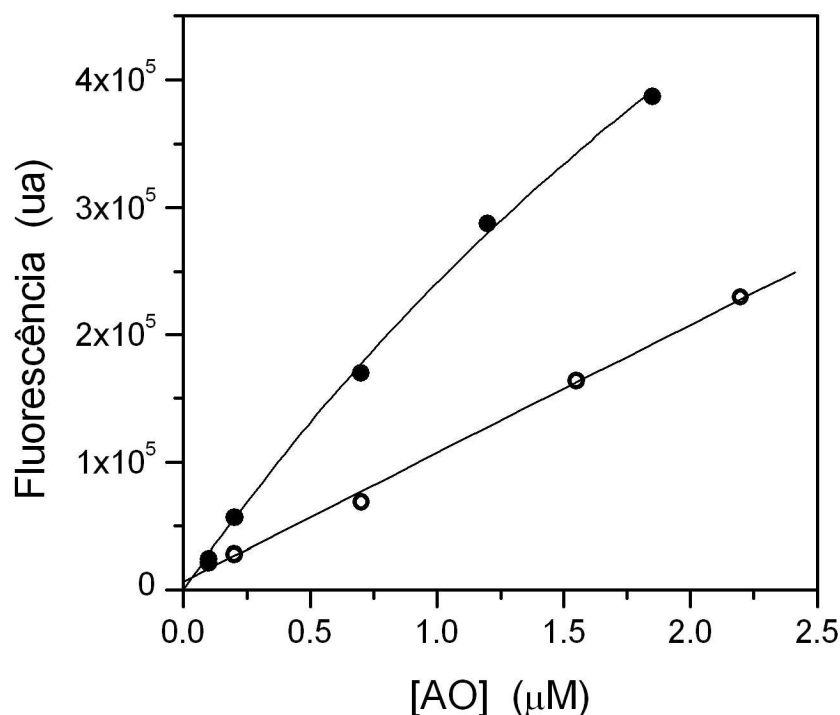


Figura 5.3 Fluorescência da AO em função da concentração em tampão T₂, na ausência (○) e na presença (●) de Na⁺, K⁺ - ATPase. Para diminuir as flutuações, tomou-se a média em 4 comprimentos de onda em torno do máximo.

A Fig. 5.3 mostra o gráfico da intensidade do pico de fluorescência em função da concentração de AO na ausência e na presença de Na⁺, K⁺-ATPase. Observa-se que, em concentrações baixas de AO, o coeficiente angular da curva (●) é maior que o da curva (○). Nessas concentrações suficientemente baixas os sítios de ouabaína ainda não foram totalmente preenchidos por AO. Em concentrações mais altas o coeficiente angular tende ao valor em tampão, indicando que, após a saturação, moléculas adicionais de AO vão se localizar na fase aquosa.

O aumento do rendimento quântico de fluorescência se dá quando a AO se liga ao sítio de ouabaína. Para isso é necessário que a enzima esteja na conformação E₂, pois a ouabaína não se associa à enzima na conformação E₁.

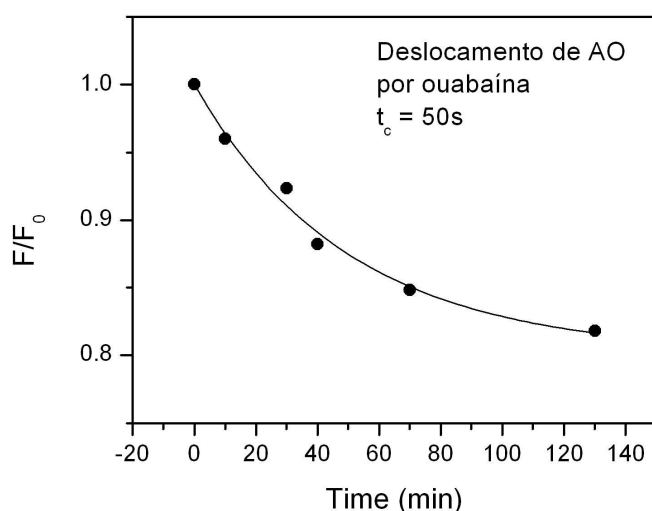


Figura 5.4 Decaimento da fluorescência de AO / Na⁺, K⁺-ATPase em função do tempo após adição de ouabaína (200 μM). [AO] = 1,5 μM; [Na⁺, K⁺-ATPase] = 100 μg.ml⁻¹. A curva contínua é o resultado do ajuste por mínimos quadrados usando um decaimento exponencial com constante de tempo de 50 min.

Para verificar se o aumento de fluorescência da AO em presença de Na⁺, K⁺-ATPase está realmente relacionado à ligação ao sítio de ouabaína, e não a algum sítio inespecífico da proteína ou da bicamada lipídica, adicionamos ouabaína em excesso (200 μM) à amostra previamente tratada com AO e observamos a variação do espectro de fluorescência em função do tempo. O resultado aparece na Fig. 5.4, onde se observa o decréscimo da fluorescência. Esse decréscimo é interpretado como o deslocamento de AO, ligada ao sítio específico, pela ouabaína. Ao desligar-se, a AO volta a apresentar menor fluorescência. A constante de tempo para essa reação de retro-titulação com ouabaína foi de 50 min, obtida a partir de ajuste com exponencial decrescente.

Com o experimento descrito acima, demonstramos que o aumento de fluorescência de AO está realmente associado à sua ligação ao sítio de ouabaína. É importante mencionar que, adicionando-se ATP ao tampão T₂, obtivemos um acréscimo ainda maior na fluorescência, o que indica que ATP leva a maior estabilização da conformação E₂ e, portanto, maior número de moléculas de AO ligadas.

5.2

Interação de Nortriptilina (NOR) com Na^+, K^+ -ATPase

A doses de NOR utilizada em pacientes com depressão associada à dor, inapetência ou insônia é de 50 – 100 mg diários (Revista de Psiquiatria Clínica). Considerando um volume de sangue de 7 litros, calculam-se concentrações de NOR entre 24 e 48 μM para essas doses. A nortriptilina inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase numa faixa de concentração de 10 – 100 μM , com IC_{50} igual a 60 μM (Carfagna e Muhoberac, 1993). Para verificar a existência de proximidade ou interferência do sítio de interação de NOR com o sítio de ouabaína em Na^+, K^+ -ATPase, titulamos com NOR a enzima marcada com AO e observamos as variações no espectro de fluorescência. Antes, no entanto, obtivemos o espectro de absorção ótica da NOR, para verificar se alguma banda de absorção poderia interferir com a fluorescência do marcador.

5.2.1

Absorção ótica da Nortriptilina

O espectro de absorção ótica do antidepressivo nortriptilina é mostrado na Figura 5.5. Observa-se um pico em 238 nm, com coeficiente de absorção molar da ordem de $1,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Abaixo de 230 nm a absorbância cresce muito, mas não há banda acima de 300 nm. Isso indica que não precisamos nos preocupar com efeito de filtro interno ao titular com NOR as amostras contendo o marcador AO. Também não há possibilidade de transferência de energia de AO para NOR.

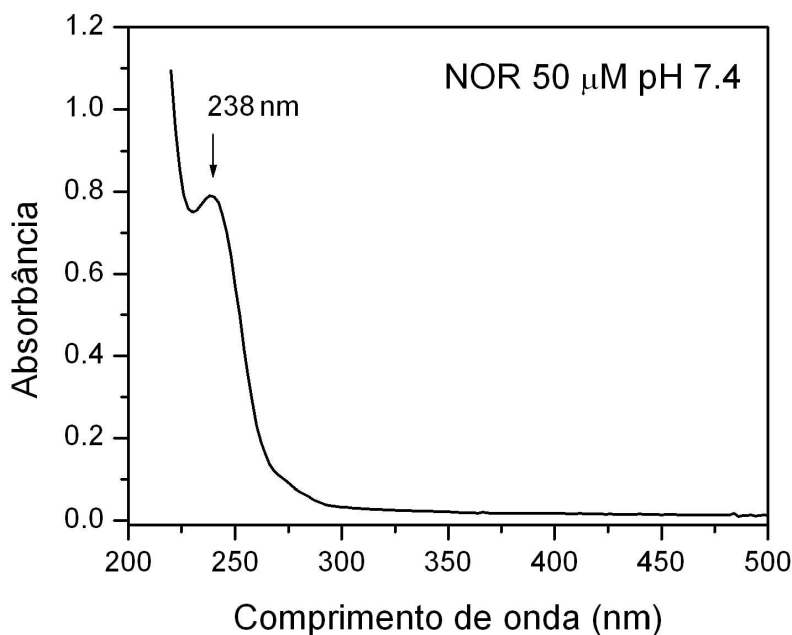


Figura 5.5 Espectro de absorção ótica da nortriptilina em tampão Tris pH 7,4.

5.2.2

Efeito da NOR sobre a fluorescência de AO - Na^+, K^+ ATPase

A AO, assim como a ouabaína, liga-se apenas à conformação E_2 da Na^+, K^+ -ATPase (Jorgensen et al., 2003). Para avaliar os efeitos do antidepressivo NOR dependentes de conformação E_2 ou E_1 , titulamos com NOR as amostras de AO - Na^+, K^+ -ATPase tanto em tampão T_2 quanto em tampão T_1 .

Resultados em conformação E_2

Tomamos amostras de Na^+, K^+ -ATPase em tampão T_2 e adicionamos AO, registrando espectros de fluorescência até que a fluorescência parasse de crescer. Em seguida acrescentamos ATP 0,5 mM e observamos novo crescimento da fluorescência. Observamos que 15 min era um tempo suficiente para obter o equilíbrio.

Em seguida titulamos essa amostra com concentrações crescentes de NOR. Se houvesse competição entre o antidepressivo e a AO pelo sítio de ligação de ouabaína, deveríamos observar uma diminuição da fluorescência.

Os resultados da titulação com NOR são apresentados na Figura 5.6 A.

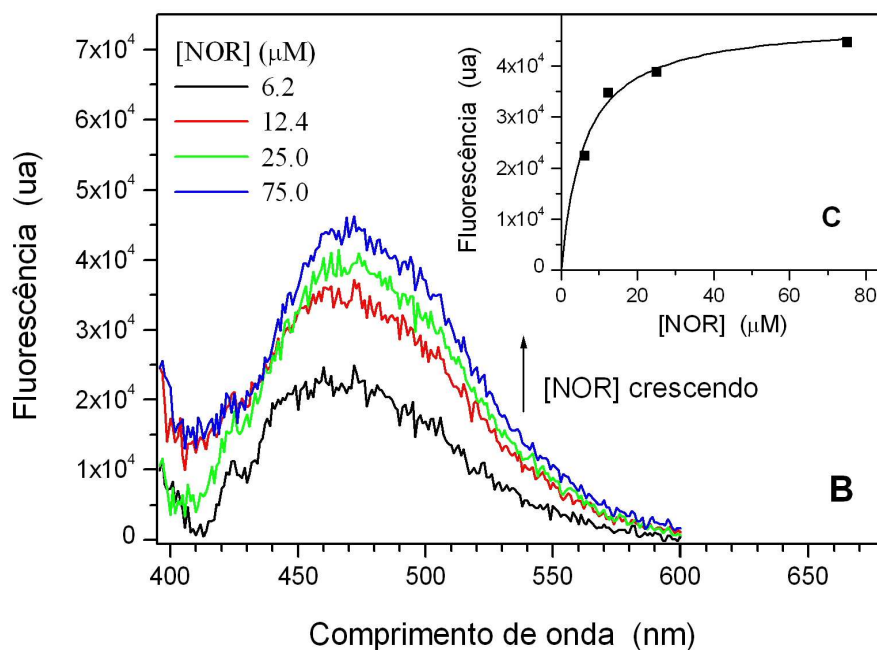
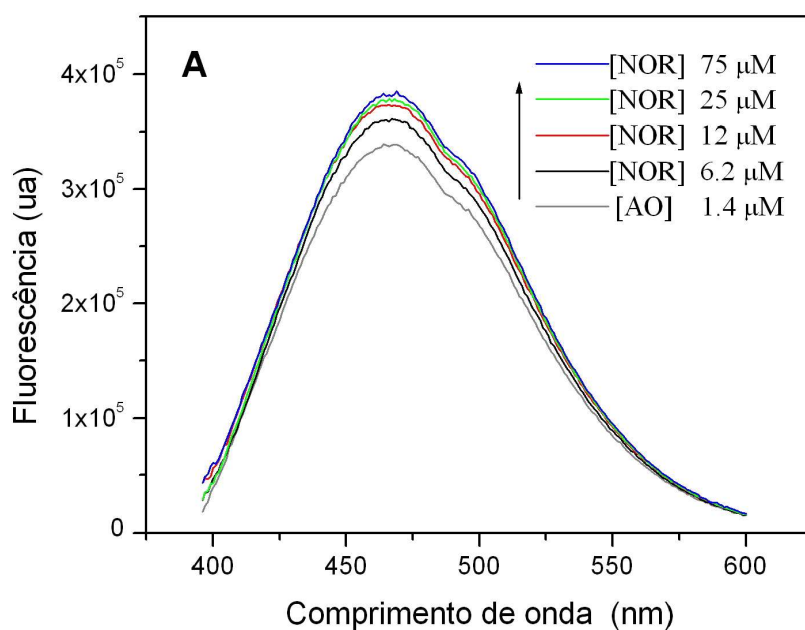


Figura 5.6 A. Espectros de fluorescência da AO ($1,5 \mu\text{M}$) – Na^+, K^+ -ATPase ($0,25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) em tampão T_2 , com ATP $0,5 \text{ mM}$, tratada com diferentes concentrações de NOR (exc. 365 nm ; cubeta 1 ml); B. Mesmos espectros, subtraídos do espectro em ausência de NOR (espectro inferior de A); C. Gráfico do aumento de fluorescência em 470 nm da AO em função da concentração de NOR. (Para diminuir a flutuação foi utilizada a média de 5 pontos em torno de 470 nm)

Nota-se que o tratamento com NOR faz a fluorescência crescer ainda mais. Esse fato sugere que o sítio de ligação do antidepressivo não é o de ouabaína. A ligação de NOR não deslocou a AO, mas alterou sua vizinhança.

A Figura 5.6 B mostra os espectros das amostras tratadas com NOR subtraídos do espectro no início da titulação. O gráfico inserido nessa Figura (Figura 5.6 C) mostra a intensidade de fluorescência em 470 nm em função da concentração de NOR. Nesse gráfico, utilizou-se a expressão para ligação a um só sítio:

$$\Delta F = \Delta F_M [NOR] / (K_d + [NOR])$$

para ajustar os dados experimentais. O melhor ajuste está mostrado mediante a linha contínua, onde a constante de dissociação é $K_d = 6,0 \mu M$ e a intensidade de fluorescência máxima, de saturação, é 14% maior do que em ausência de NOR ($\Delta F_M = 4,9 \cdot 10^4$ ua).

Segundo a constante de ligação ($1/K_d = 1,7 \cdot 10^5 M^{-1}$), a NOR está se ligando de maneira significativa à enzima, em seu estado conformacional E_2 . Essa ligação, em sítio próximo ou afastado do sítio de AO, provoca em qualquer dos casos o aumento da fluorescência da AO.

Resultados em conformação E_1

Tomamos amostras de Na^+, K^+ -ATPase em tampão T_1 e adicionamos AO, registrando espectros de fluorescência. Ao contrário do que acontece em tampão T_2 , a fluorescência não cresce tanto, indicando que AO não se está associando à enzima. Em seguida titulamos essa amostra com concentrações crescentes de NOR. Os resultados são apresentados na Figura 5.7.

Observa-se que, nos espectros originais em tampão T_1 , o espalhamento aumenta à medida que incrementávamos a concentração de NOR. Posteriormente observamos que esse espalhamento é característico da NOR em puro tampão T_1 . Para corrigir esse espalhamento ajustamos ao espalhamento em puro tampão T_1 uma exponencial decrescente centrada no comprimento de onda de excitação e subtraímos essa função ajustada de modo a anular o espectro em 400 nm. Obtivemos então os espectros da Figura 5.7 B. Essa figura mostra que o aumento de fluorescência da AO provocado pela NOR é bem menor quando a enzima se apresenta na conformação E_1 do que na conformação E_2 .

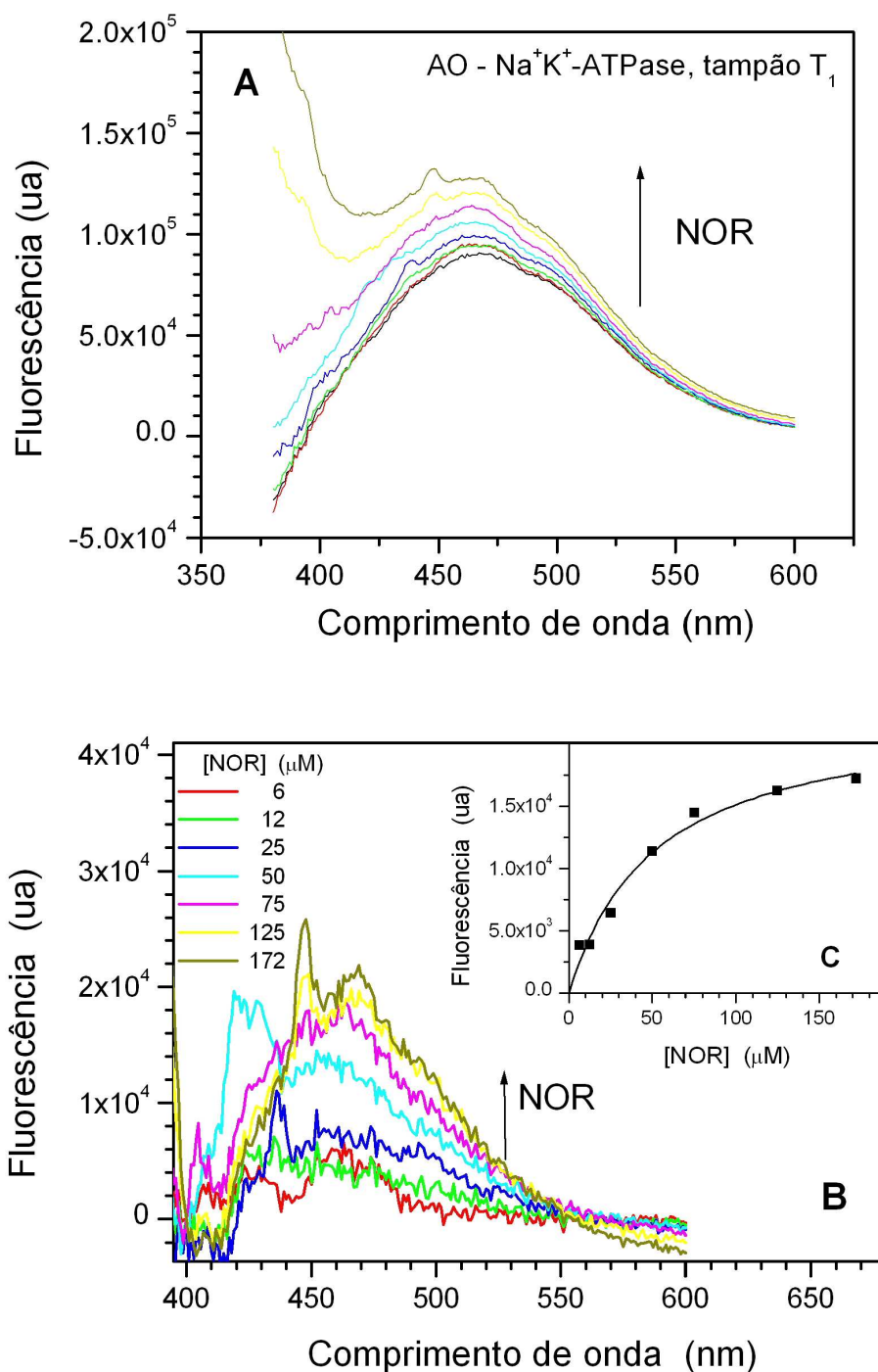


Figura 5.7 A. Espectros de fluorescência da AO ($1,5 \mu\text{M}$) – Na^+, K^+ -ATPase ($0,25 \text{ mg/ml}$) em tampão T_1 , tratada com diferentes concentrações de NOR (exc. 365 nm ; cubeta 1 ml); B. Mesmos espectros, subtraídos do espectro em ausência de NOR (espectro inferior de A) e subtraídos do espalhamento; C. Gráfico do aumento de fluorescência em 470 nm da AO em função da concentração de NOR. (Para diminuir a flutuação foi utilizada a média de 9 pontos em torno de 470 nm)

A Figura 5.7 C mostra o gráfico da fluorescência em 470 nm em função da concentração de NOR. Utilizando a expressão para ligação a um só sítio, descrita acima, obtivemos a constante de dissociação $K_d = 52 \mu\text{M}$ e a variação máxima da intensidade de fluorescência $\Delta F_M = 2,3 \cdot 10^4$ ua. Esta constante K_d é 9 vezes maior do que a constante de dissociação calculada para a enzima na conformação E_2 .

Nesse tampão T_1 , a intensidade de fluorescência da AO não aumenta significativamente, em comparação com T_2 , embora se tenha incrementado a faixa de concentração da NOR; podemos ver isto comparando ΔF_M , que é para T_2 duas vezes maior que para T_1 . Como, em tampão T_1 , a probabilidade de encontrar a enzima no estado E_2 é pequena mas não nula, podemos sugerir que a NOR só está fazendo efeito na fluorescência de AO quando a enzima se encontra no estado E_2 .

Resultados em ausência de Na^+, K^+ -ATPase

Foi feito um controle que consistiu em saber se a NOR modifica, de algum modo, a fluorescência de antroil-ouabaína em solução, em T_1 ou T_2 . A Figura 5.8 mostra o efeito da NOR na fluorescência de AO em tampão T_2 (A) e em T_1 (B). Nos dois casos não houve variação significativa na intensidade de fluorescência da AO, mas se observa que o espalhamento cresce, especialmente no tampão T_1 (comparar as escalas de intensidade de fluorescência). Então, podemos dizer que a NOR não está se ligando à AO em nenhum dos dois tampões, mas provavelmente está sofrendo alguma aglomeração, principalmente em T_1 , que faz aumentar o espalhamento.

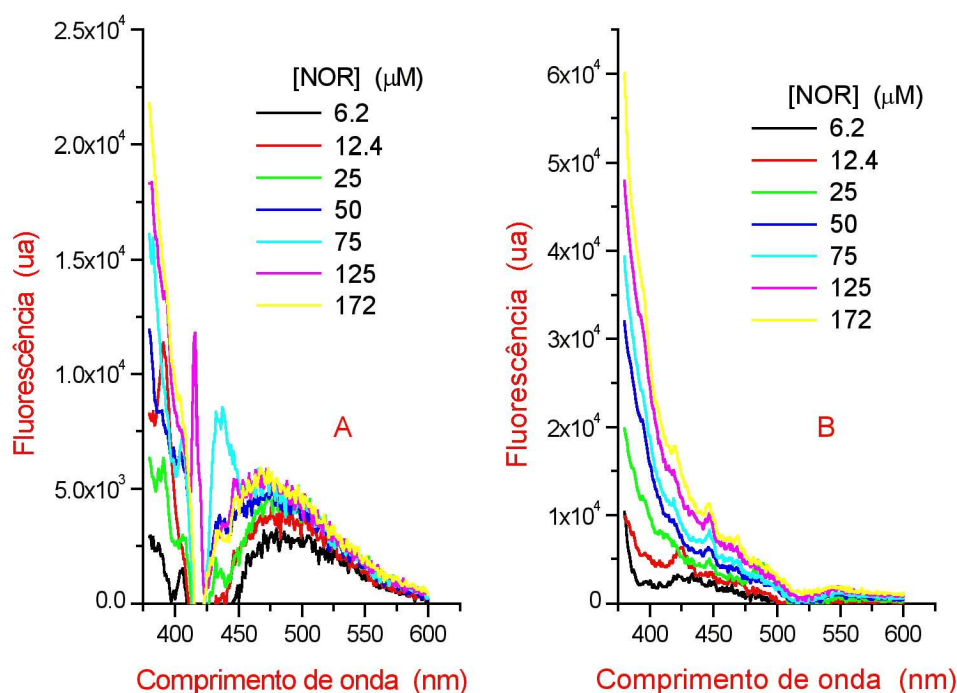


Figura 5.8 Influência de nortriptilina nos espectros de fluorescência da AO (A) em tampão T_2 e (B) em tampão T_1 (Exc. 365 nm; cubeta 1 ml). Os espectros apresentados estão subtraídos do espectro inicial, em ausência de nortriptilina.

5.2.3 Discussão do Efeito de Nortriptilina

Carfagna e Muhoherac (1993) encontraram que nortriptilina inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase neuronal (de membranas sinápticas extraídas do córtex cerebral de ratos) numa faixa de concentração de 10 – 100 μM , com IC_{50} igual a 60 μM . Barriviera (2005, comunicação pessoal) encontrou IC_{50} análogo para o efeito de NOR sobre a Na^+, K^+ -ATPase de eletrócitos do *E. electricus* (L.).

O tratamento com NOR, especialmente em tampão T_2 , provocou o aumento da fluorescência de AO (Figuras 5.6), que pode estar relacionado com um efeito direto de interação com NOR, caso o sítio de ligação de NOR em Na^+, K^+ -ATPase seja próximo ao de AO, ou pode ser consequência de efeito indireto, via mudança conformacional induzida por NOR na enzima. Nesse último caso o aumento de fluorescência sugere que a ligação do antidepressivo à enzima estabilize ainda

mais a conformação E_2 ou aumente a afinidade de E_2 por AO, fazendo aumentar o número de moléculas de AO ligadas.

A concentração IC_{50} ($60 \mu M$) para a NOR obtida por Carfagna e Muhoberac (1993) é semelhante à constante de dissociação em tampão T_1 ($K_d = 52 \mu M$) e muito maior do que a obtida em tampão T_2 . Esse resultado sugere que a ligação de NOR à conformação E_1 da enzima está associada à perda de função. Sugere também que o fato do sítio de ouabaína estar ocupado provoca associação maior de NOR à enzima.

5.3

Estudo da fotodegradação de CPZ: influência de Na^+, K^+ -ATPase

5.3.1

Absorção da CPZ em tampão T_1

O espectro de absorção ótica da clorpromazina em tampão T_1 é mostrado na Figura 5.9, linhas contínuas. Em A, observa-se um pico em 306 nm, com coeficiente de absorção molar da ordem de $\epsilon_{306} = 4,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Em B, observa-se o espectro na faixa de 230 a 500 nm, onde aparece o pico em 254 nm com $\epsilon_{254} = 3,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

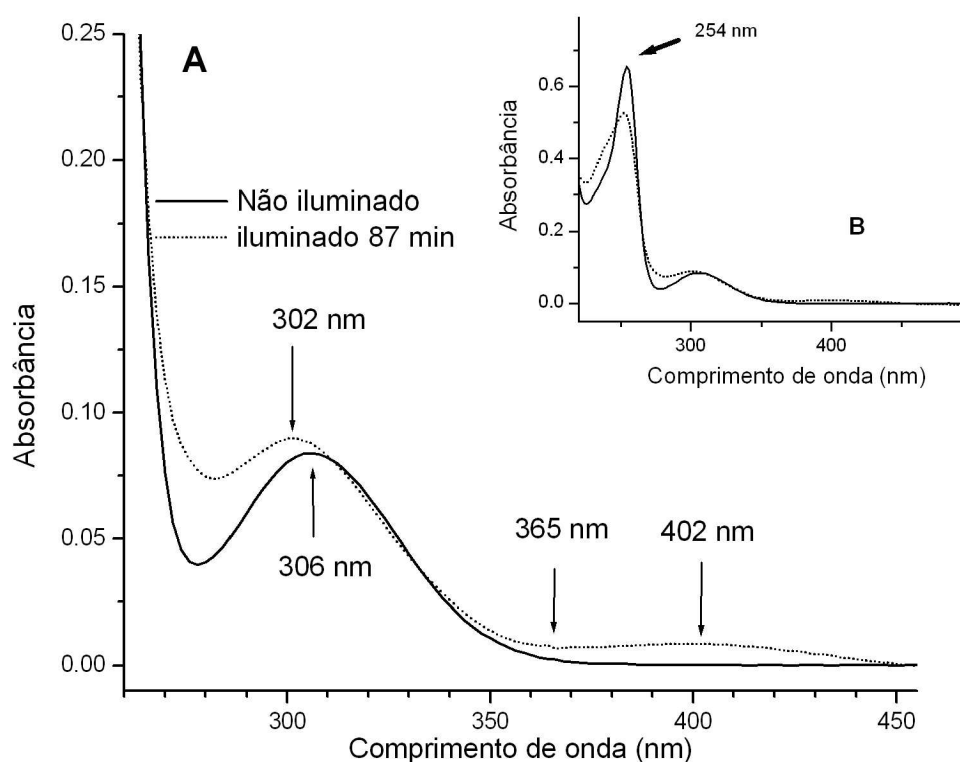


Figura 5.9 Espectros de absorção ótica da CPZ em tampão T_1 sem exposição a radiação (—) e após exposição à radiação ultravioleta do espectrofluorímetro ($\lambda = 306 \text{ nm}$) durante 1,5 h (.....). O gráfico inserido mostra o pico em 254 nm.

Para os experimentos de fluorescência, que serão descritos no decorrer desse trabalho, escolhemos o comprimento de onda de excitação da fluorescência de CPZ em 306 nm. Este valor foi escolhido para evitar o efeito de filtro interno, ao fazermos experimentos na presença da enzima.

Com exposição à luz a clorpromazina sofre fotodegradação. O espectro de absorção da CPZ muda ao se irradiar a amostra com luz ultravioleta. Na Figura 5.9, linhas pontilhadas, observa-se o espectro da mesma amostra irradiada durante um tempo de aproximadamente 1,5 h ($\lambda = 306$ nm). Os novos picos de absorção originados indicam que novas espécies estão surgindo. O pico em 254 nm sofre redução, apresentando pontos isobésticos em 244 e 266 nm. Aparece uma banda larga e pouco intensa em torno de 402 nm. O pico em 306 nm desloca-se para 302 nm e aumenta, quase não havendo variação de absorção em 306 nm.

É importante dizer que, quando a amostra de CPZ foi irradiada com luz de 365 nm (excitação do marcador fluorescente AO) durante 2 h, não foi observada qualquer variação no espectro de absorção ótica.

5.3.2 Fluorescência e fotodegradação da CPZ em tampão T₁

A CPZ é fracamente fluorescente. O espectro de fluorescência da CPZ em tampão T₁, excitado em 306 nm, aparece na Figura 5.10 A, em linha preta. Há um pico em 455 nm. Não é claro se a intensidade em λ abaixo de 400 nm é devido a espalhamento. Registrando-se o espectro seis e doze minutos após o início da varredura do primeiro espectro, obtêm-se os espectros em cinza e cinza claro, respectivamente. A fluorescência aumenta e o pico se desloca para 450 nm.

Em seguida, foram registrados de seis em seis minutos os espectros da mesma amostra. Alguns desses espectros aparecem na Figura 5.10 B. Observa-se um decréscimo do pico em 450 nm, com deslocamento para o azul, e um aumento da fluorescência entre 350 e 400 nm. Parece haver pontos isobésticos em 338 e 422 nm. Observa-se também que, abaixo de 338 nm, a fluorescência diminui, sugerindo que os fótons detectados nessa região não eram provenientes de espalhamento, mas de fluorescência da CPZ.

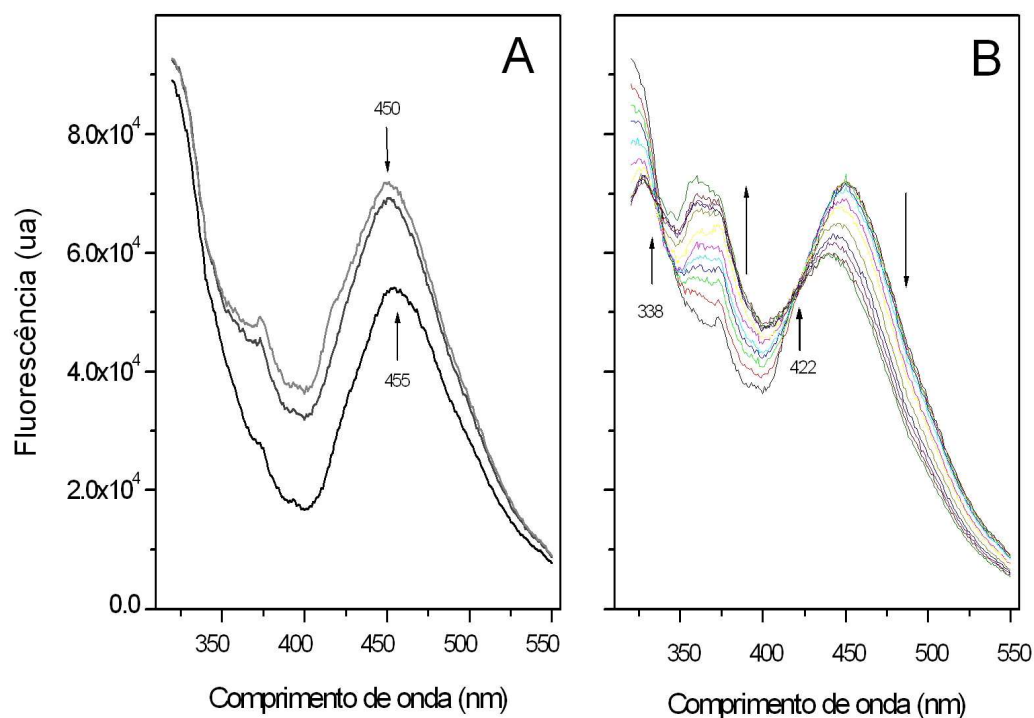


Figura 5.10 Espectros de fluorescência da CPZ (20 μ M; exc. 306 nm; cubeta 1 ml) em tampão T_1 , em diferentes tempos de irradiação com a luz de excitação. (A) Espectro inicial (preto) e em 6 e 12 min (cinza escuro e claro, respectivamente). (B) Espectros em 18, 36, 48, 60, 72, 90, 108, 138, 156, 174, 192 e 216 min, nos sentidos indicados pelas setas.

Pode-se observar, a partir desses espectros, como a fluorescência de espécies moleculares, resultantes da fotodegradação da CPZ, estão surgindo. A primeira etapa (Fig. 5.10 A), mais rápida, indicaria que uma nova espécie molecular derivada da CPZ está-se criando, devido à irradiação ultravioleta, provavelmente um radical de CPZ. Numa segunda etapa (Fig. 5.10 B), mais lenta, a espécie formada poderia estar gerando uma terceira espécie, com fluorescência entre 350 e 400 nm.

Na Fig. 5.11, observa-se melhor a variação de fluorescência nas duas fases da fotodegradação. Na figura à esquerda observa-se que, na fase inicial (1 e 2), duas espécies de fotodegradação se formam, com pico em 440 e em 375 nm (o pico intermediário, em 412 nm, parece estar acoplado ao de 375 nm). Na fase mais lenta (3) a espécie com pico em ~ 375 nm cresce às custas da primeira, em

~440 nm. A Fig. 5.10 B mostra claramente que uma espécie se transforma na outra, devido aos pontos isobésticos, que aparecem também na Fig. 5.11, à esquerda.

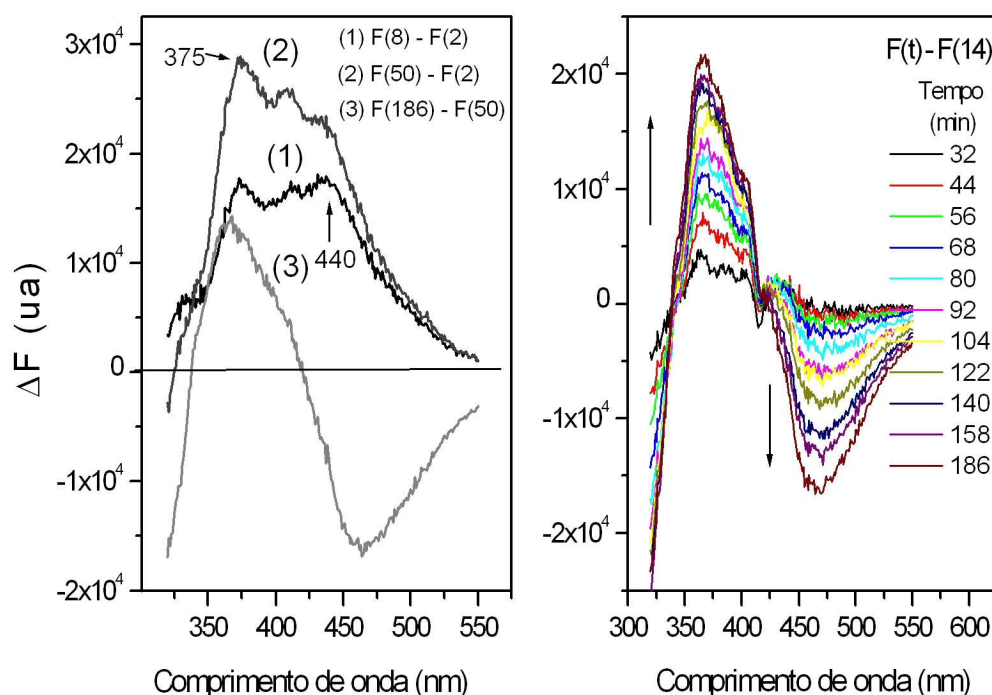


Figura 5.11 Diferença entre espectros de fluorescência da CPZ (20 μ M) em tampão T₁ (exc. 306 nm; cubeta 1 ml) entre vários tempos de irradiação. À esquerda, espectro em 8 e em 50 min subtraídos do espectro inicial (preto, cinza); espectro em 3h subtraído do espectro em 50 min (cinza claro). À direita, espectros em tempos indicados na figura subtraídos do espectro em 14 min.

A Figura 5.12 mostra a variação temporal da fluorescência em 375 nm e em 440 nm. Ajustando-se uma curva do tipo

$$\Delta F = \Delta F_m [1 - \exp(t/t_1)]$$

aos resultados em 440 nm, em tempos até 50 min, obtém-se que esta espécie cresceu com um tempo característico t_1 de 9 min, conforme se irradiou a amostra com UV de 306 nm. Podemos dizer que esta espécie tem sua origem em uma das primeiras classes de radicais da CPZ. Na fase mais lenta (a partir de ~ 30 min) observa-se o decréscimo da fluorescência em 440 nm e aumento em 375 nm,

mostrando a transformação da primeira espécie na outra, provavelmente mais estável (o pico em 375 nm está crescendo sem mudar de forma até saturar-se).

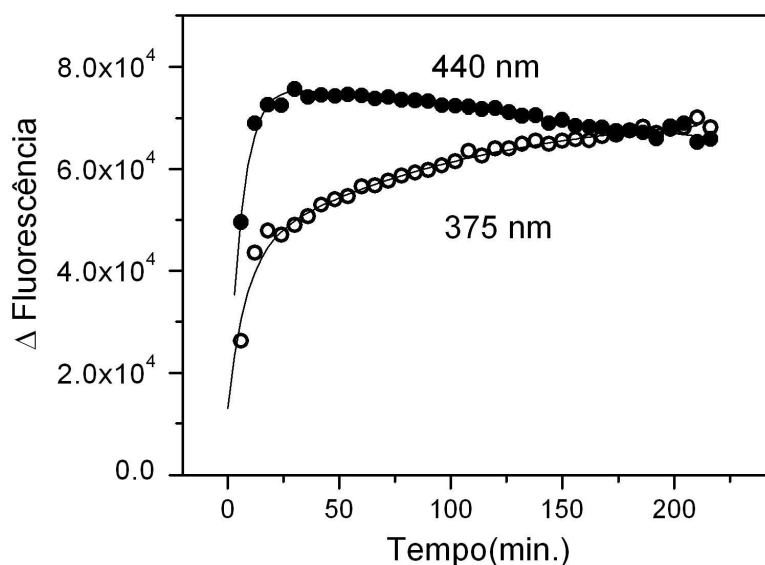


Figura 5.12 Variação da fluorescência em função do tempo de irradiação em 306 nm.

5.3.3

Fluorescência e fotodegradação da CPZ em tampão T_2

A Figura 5.13 mostra os espectros de fluorescência da CPZ em tampão T_2 , em diferentes tempos de irradiação ultravioleta. Em T_2 aparece, de forma mais clara do que em T_1 , os picos em 355 e 373 nm da nova espécie de CPZ fotodegradada. Há também um pico em 341 nm. Este é o comprimento de onda do espalhamento Raman por moléculas de água, para excitação em 306 nm, mas mesmo assim podemos atribuir um pico nessa região à fotodegradação de CPZ. Analogamente ao que ocorre em T_1 , numa primeira etapa, o pico em maior comprimento de onda, agora em 448 nm, desloca-se para comprimentos de onda menores (435 nm), ao mesmo tempo, aumentando sua intensidade. Ao contrário do que ocorre em T_1 não se observam pontos isobésticos na segunda etapa, na qual o pico mais ao vermelho (agora em 335 nm) começa a decrescer, enquanto os outros continuam crescendo (Fig. 5.13 B).

A Figura 5.14 mostra a variação temporal da fluorescência em alguns comprimentos de onda (picos). No gráfico à esquerda (448 e 435 nm) observa-se a

primeira fase de crescimento com tempo característico da ordem de 10 min, seguida da fase de queda do sinal, muito mais lenta.

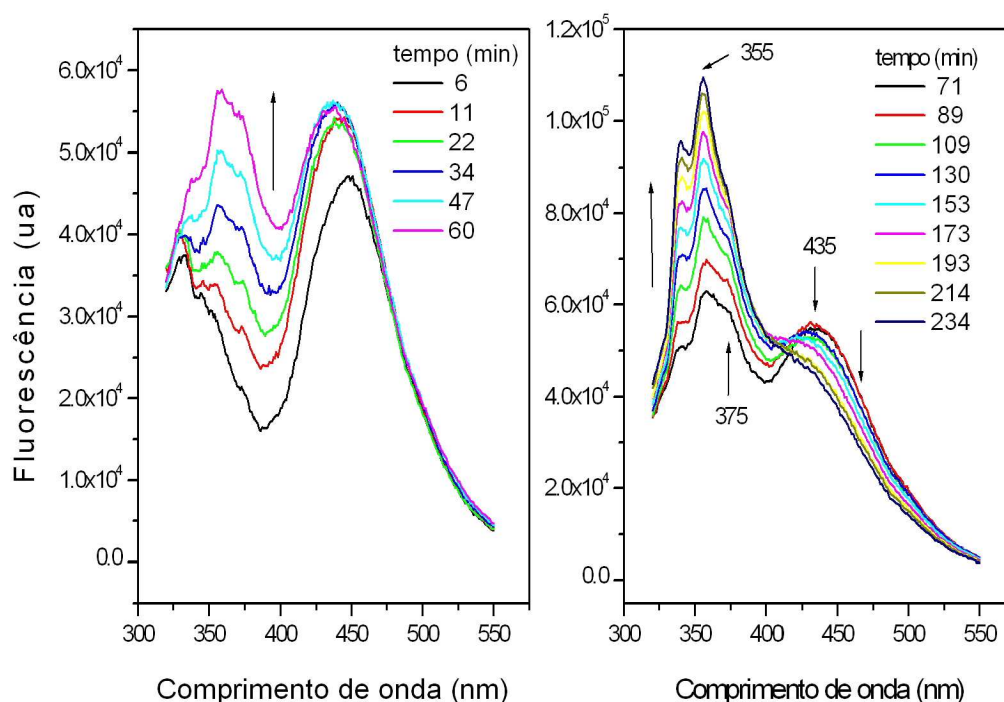


Figura 5.13 Espectros de fluorescência da CPZ em tampão T_2 ($20 \mu\text{M}$; exc. 306 nm; cubeta 1 ml) em diferentes tempos de irradiação com a luz de excitação.

Uma diferença marcante em T_2 em relação a T_1 , foi o crescimento dos picos da(s) espécie(s) fotodegradadas, especialmente em 373 nm (Figura 5.14), que se mostrou muito maior (comparar com Fig. 5.12, em 375 nm). Observa-se que ambos os picos em 355 nm e em 373 nm crescem, ao início, quase da mesma forma mas depois o pico em 373 nm começa a saturar e aquele em 355 nm ainda segue crescendo. Pode ser, portanto, que estes picos estejam associados a espécies diferentes.

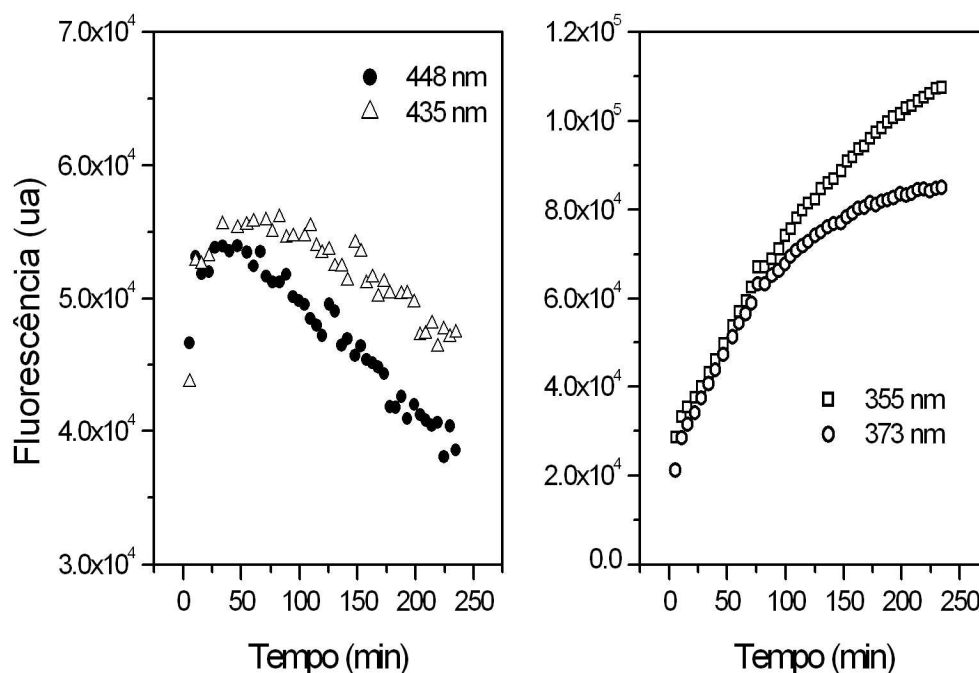


Figura 5.14 Variação da fluorescência em função do tempo de irradiação em 306 nm. O comprimento de onda referente a cada símbolo aparece na figura.

5.3.4

Fluorescência e fotodegradação da CPZ em presença de Na^+, K^+ -ATPase

A CPZ é fracamente fluorescente. A fluorescência de CPZ, excitada em 306 nm, foi estudada em presença de Na^+, K^+ -ATPase tanto em tampão T_1 como em T_2 , em função do tempo de irradiação. Os resultados são comparados com os obtidos acima, na ausência da enzima.

Resultados em tampão T_1

A Figura 5.15 mostra os espectros de fluorescência da CPZ em presença de Na^+, K^+ -ATPase em tampão T_1 , em diferentes tempos de irradiação ultravioleta. Observa-se o pico em 450 nm bem mais intenso do que em tampão, que cresce com o tempo de irradiação, com constante de tempo em torno de 1 h, tendendo à saturação (inserção da Fig. 5.15). Em presença da enzima, não se observa a fase de decréscimo da fluorescência nessa região, como foi observada nos dois tampões utilizados (Fig. 5.12, 440 nm e Fig. 5.14 A). Já a espécie fotodegradada, com fluorescência na região entre 350 e 400 nm e pico único em 375 nm,

apresenta crescimento quase linear nas primeiras duas horas de irradiação e continua crescendo mesmo depois de três horas (Inserção da Fig. 5.15).

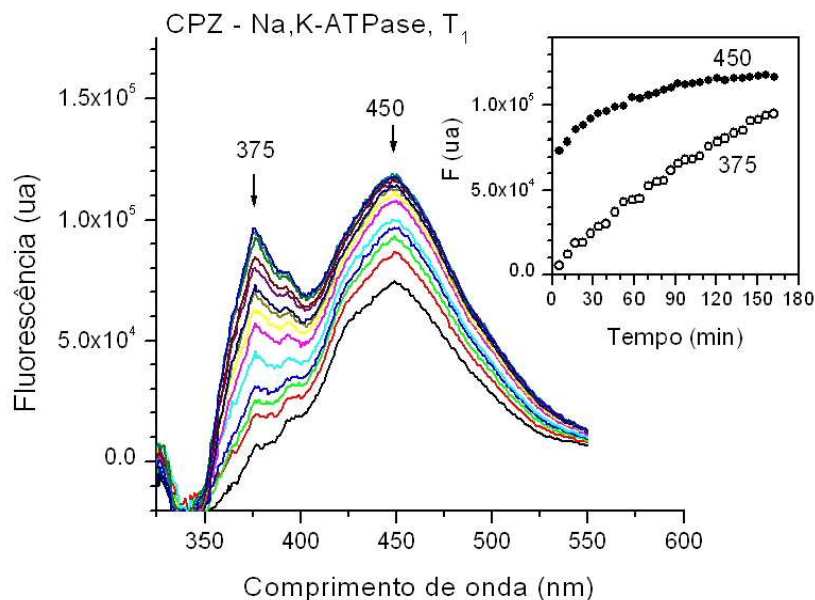


Figura 5.15 Espectros de fluorescência da CPZ (20 μ M, Exc. 306 nm) em presença de Na⁺,K⁺-ATPase no tampão T₁. As medidas foram feitas em diferentes tempos de irradiação ultravioleta (306 nm). Inserção. Gráfico da fluorescência da CPZ em 375 nm e em 450 nm, em função do tempo de irradiação.

Resultados em tampão T₂

Em presença de Na⁺,K⁺-ATPase em tampão T₂, os resultados de fluorescência de CPZ submetida a irradiação em 306 nm são apresentados na Fig. 5.16. Observa-se que esses resultados são similares aos obtidos em tampão T₁ (Fig. 5.15).

Nota-se também que, em ambos tampões, a posição do pico de emissão em 450 nm em presença da enzima não são afetados, o que nos indica que esta espécie é muito estável no intervalo de tempo de fotodegradação. Associamos o incremento na intensidade do pico em 450 nm a uma reação fotoinduzida com a enzima, justamente porque em presença de enzima ele sofre maior aumento e satura sem decair com a continuação da irradiação.

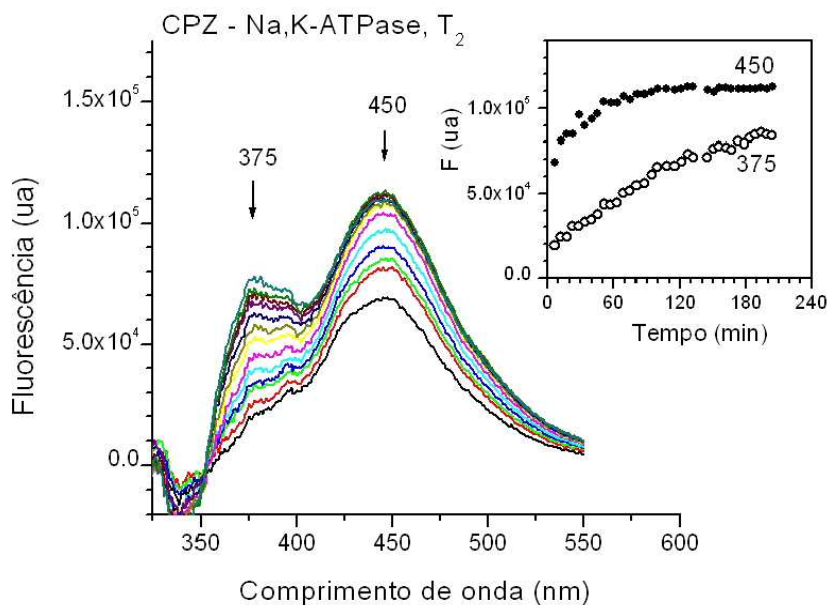


Figura 5.16 Espectros de fluorescência da CPZ (20 μ M, Exc. 306 nm) em presença da enzima no tampão T₂. As medidas foram feitas a diferentes tempos de irradiação ultravioleta (306 nm). Inserção. Gráfico da fluorescência da CPZ, em 375 nm e em 450 nm, em função do tempo de irradiação.

5.3.5

Discussão sobre fluorescência e fotodegradação de CPZ

A luz ultravioleta produz em moléculas fotosensíveis, como a CPZ, a formação de radicais livres. Sob irradiação, a CPZ produz uma variedade de radicais livres incluindo o radical cátion de CPZ (via foto-ionização), CPZ^{•+}, o radical promazinil neutro e um átomo de cloro (Cl[•]) (via cisão homolítica), e um radical peroxi centrado no enxofre.

Radicais livres produzidos em água são altamente reativos, e interagem rapidamente com uma ampla variedade de moléculas diferentes (Smith e Hanawalt, 1969). Por exemplo, se um certo tipo de radical livre origina-se da fotodegradação de CPZ, tenderá a ligar-se imediatamente a outras moléculas próximas, para atingir assim sua estabilidade química. Este radical dará origem a uma nova espécie, que deve ser uma molécula mais estável.

A quantidade de novas espécies criadas por reação foto-induzida aumenta com o tempo de irradiação e depende também das outras espécies vizinhas à molécula foto-sensível.

Dos experimentos realizados em tampão (Figuras 5.10 e 5.13) concluímos que tanto os espectros de emissão dos produtos de fotodegradação de CPZ bem como as taxas de formação desses produtos foram diferentes para T_1 e T_2 . Concluímos que cada tampão oferece uma vizinhança diferente para o radical livre de CPZ criado pela luz UV. É bom lembrar que as moléculas de CPZ têm tendência a formar agregados mesmo em concentrações baixas e que o estado de agregação não só depende fortemente do pH e da força iônica, mas pode depender também da composição do tampão. Isso explicaria a diferença de resultados nos dois tampões.

Em nossas experiências, parece improvável que o radical cátion de CPZ se esteja originando, já que a foto-ionização somente ocorre quando a CPZ é excitada a comprimentos de onda menores que 280 nm (Chignell et al., 1985). O radical promazinil é um candidato mais provável para as espécies fototóxicas *in vivo* e *in vitro*. Além disso, esse radical pode reagir covalentemente com proteínas e outras macromoléculas e produzir antígenos que podem ser responsáveis pela resposta foto-alérgica a CPZ. Outros estudos em sistemas vivos (Schoonderwoerd et al., 1989) irradiados com luz UV-A (320 a 340 nm) mostram que parece estar se formado promazina (PZ) e 2-hidroxi-promazina (2-OH-PZ) nestes sistemas, mostrando que a fotodegradação da CPZ *in vivo* se processa melhor via radical promazinil que via radical cátion.

Como nos resultados apresentados tanto nas Figuras 5.10, 5.13, referentes a CPZ em tampão, como nas Figuras 5.15 e 5.16, referentes a CPZ em presença da enzima, as amostras foram irradiadas com luz de 306 nm, é provável que o radical promazinil se esteja formando. Caso a vizinhança de CPZ seja algum resíduo de aminoácido, como na situação em que se localize num sítio de interação com a enzima, é provável que esse radical se ligue covalentemente à proteína (foto-marcação). Em tampão puro, onde não há sítios de ligação para CPZ, o radical PZ deve ter maior probabilidade de reagir com a própria CPZ formando dímeros ou complexos maiores.

Das Figuras 5.15 e 5.16, para CPZ em presença de Na^+, K^+ -ATPase, podemos dizer que a CPZ se está ligando à enzima, já que os espectros de

fluorescência gerados por fotodegradação foram diferentes dos obtidos ambos os tampões. Além disso, os espectros de emissão da CPZ em presença da enzima foram similares em ambos tampões, sugerindo que o complexo formado por CPZ- Na^+,K^+ -ATPase tem estrutura local independente da conformação E_1 ou E_2 . Na verdade, Adhikary *et al.* (1994) sugeriram que a CPZ favorece a conformação E_2 da enzima. Então parece que a CPZ, ao se ligar à enzima mesmo em tampão T_1 , desloca o equilíbrio químico para a conformação E_2 fazendo com que mais AO se associe, especialmente após fotodegradação. A vizinhança da CPZ fotoassociada à Na^+,K^+ -ATPase é a mesma, independentemente do tampão utilizado.

Bhattacharyya e Sem (1999) encontraram resultados sugerindo que a CPZ inibe a atividade Na^+,K^+ -ATPase associando-se a dois sítios de ligação: um de alta afinidade e outro de baixa afinidade, cujas constantes de dissociação foram encontradas como $22,5 \cdot 10^{-6}$ M e $112 \cdot 10^{-6}$ M. Como a concentração de CPZ utilizada em nossos experimentos foi de $20\mu\text{M}$, apenas o sítio de alta afinidade está sendo preenchido.

Duas espécies estáveis, com picos de emissão em 375 nm e em 450 nm formaram-se em presença da enzima em ambos tampões. Sugerimos que a promazina formada por irradiação está se ligando covalentemente ao sítio de alta afinidade ($\lambda_{\text{MAX}} = 450$ nm nas Figuras 5.15 e 5.16). Sugerimos também que a espécie em 375 nm está se formando a partir de radicais de CPZ que se encontram em solução, pois esta espécie também foi criada em puro tampão e teve sua taxa de produção bastante diminuída pela presença da enzima.

5.4

Interação de clorpromazina (CPZ) com Na^+, K^+ -ATPase

A clorpromazina inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase numa faixa de concentração de 1 – 20 μM , com IC_{50} igual a 10 μM (Carfagna e Muhoberac, 1993). Para verificar a existência de proximidade ou interferência do sítio de interação de CPZ com o sítio de ouabaína em Na^+, K^+ -ATPase, titulamos com CPZ a enzima marcada com AO ($\text{AO}-\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) e observamos as variações no espectro de fluorescência de AO, excitando em 365 nm, onde a CPZ não absorve.

Em seguida, observamos a fluorescência da CPZ, excitando em 306 nm, já que com esse comprimento de onda de excitação a fluorescência de AO mostrou-se desprezível.

5.4.1

Efeito de CPZ sobre a fluorescência de AO – Na^+, K^+ -ATPase.

Analogamente ao experimento de titulação com NOR, tomamos amostras de Na^+, K^+ -ATPase em tampão T_2 , adicionamos AO e ATP 0,5 mM, registrando espectros de fluorescência até que a fluorescência parasse de crescer, indicando o estabelecimento do equilíbrio para ligação de AO.

A Figura 5.17 mostra os espectros de fluorescência da $\text{AO}-\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em tampão T_2 antes (curva inferior) e após adição de ATP 0,5 mM (segunda curva, de baixo para cima). Como era esperado, houve um aumento na intensidade da fluorescência da AO depois de adicionar ATP à cubeta. O aumento foi de 40% em relação à intensidade de fluorescência sem ATP.

Em seguida titulamos essa amostra com concentrações crescentes de CPZ. Os resultados são também apresentados na Figura 5.17. Nota-se que o tratamento com CPZ faz a fluorescência crescer levemente. Aparentemente a CPZ, como a NOR, estaria de alguma maneira estabilizando ainda mais a conformação E_2 , fazendo aumentar a fluorescência de AO. Podemos dizer que a CPZ se liga em algum sítio do complexo formado pela antroil-ouabaína e a enzima, não competindo pelo sítio de ouabaína.

No entanto, ao se atingir a concentração de CPZ 21 μM , notou-se um processo de aumento considerável da intensidade de fluorescência de AO à medida que a amostra permanecia iluminada com a luz de excitação de 365 nm (ver espectro mais intenso da Fig. 5.17). O pico de fluorescência também se deslocou para comprimentos de onda menores. Como a foto-sensibilidade da CPZ é conhecida, associamos o crescimento da fluorescência de AO a um efeito indireto da fotodegradação da CPZ.

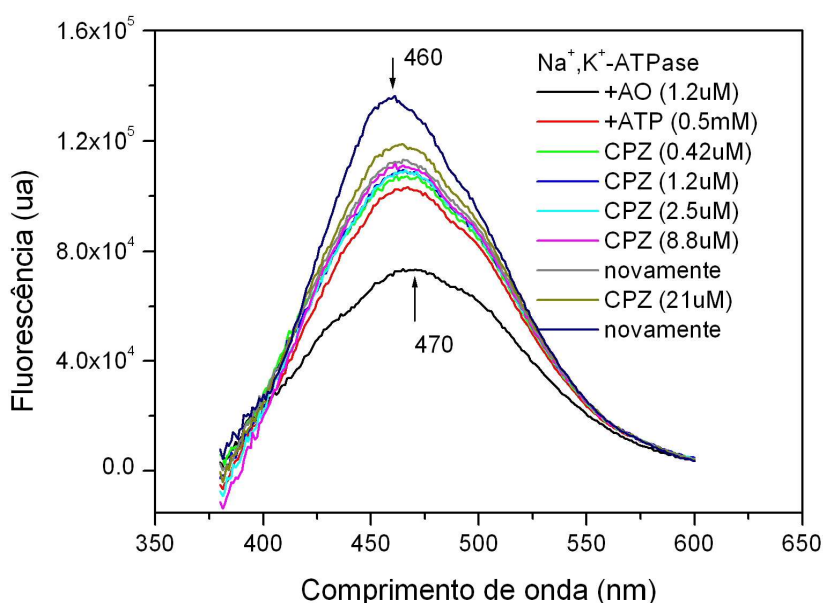


Figura 5.17 Espectros de fluorescência da AO – Na^+, K^+ -ATPase (exc. 365 nm; cubeta 1 ml) em tampão T_2 pH 7,4, em diferentes concentrações de CPZ. Desses espectros já foi subtraído o branco, obtido com a Na^+, K^+ -ATPase em tampão T_2 .

Para verificar se o efeito de crescimento da fluorescência estava realmente relacionado com a incidência de luz na amostra, continuamos a obter espectros, ora agitando a amostra, ora sem agitar. Os resultados são apresentados na Figura 5.18. O gráfico inserido nessa figura mostra a intensidade de fluorescência (em 451 nm) em função do tempo (a cada 4 min). As setas indicam os instantes em que houve agitação da amostra imediatamente antes de medir.

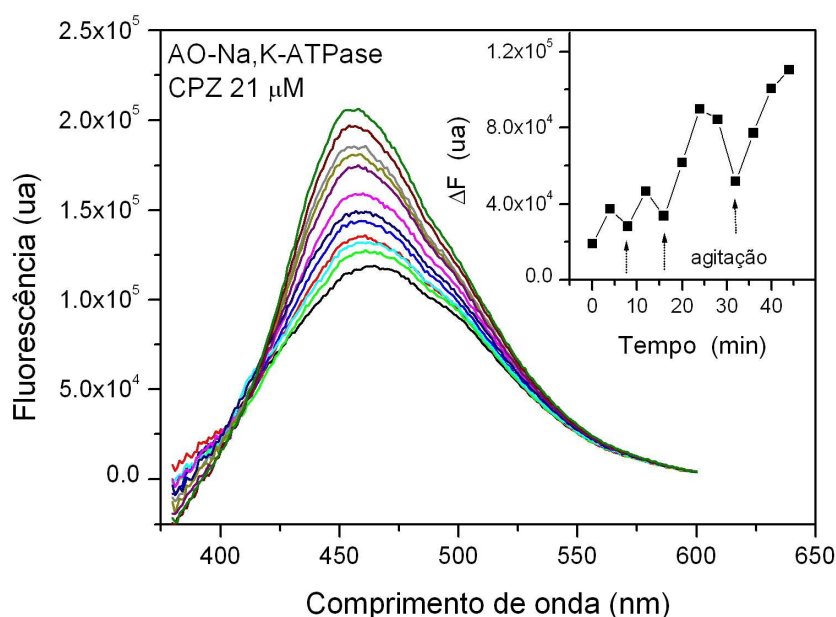


Figura 5.18 Espectros de fluorescência de AO – Na^+, K^+ -ATPase (exc. 365 nm; cubeta 1 ml) em tampão T_2 pH 7,4, $[\text{CPZ}] = 21 \mu\text{M}$, em diferentes tempos de iluminação de amostra. Desses espectros já foi subtraído o branco, obtido com a Na^+, K^+ -ATPase em tampão T_2 . Inserção: Variação da fluorescência da AO (em 451 nm) em função do tempo de iluminação, as setas indicam os instantes em que a amostra foi agitada antes da medida do espectro.

A CPZ é uma molécula foto-sensível, degradando-se com o tempo de exposição à luz ultravioleta. Observa-se que, quando se deixa de agitar a amostra, a intensidade de fluorescência da AO aumenta com o tempo. Mas, ao se agitar, a intensidade de fluorescência da AO diminui. Isto é devido a que, ao se agitar a amostra, a parte que não foi iluminada pelo feixe de luz do espectrofluorímetro mistura-se à que já sofreu fotodegradação. Então a fluorescência volta a cair, indicando que o crescimento da fluorescência nesse experimento foi realmente devido à incidência da luz de 365 nm.

Fluorescência de AO em tampão T_2 , em presença de CPZ

Para controle, obtivemos espectros de fluorescência de AO em presença de CPZ, deixando a amostra submetida à luz de excitação, como no experimento anterior, para verificar se o efeito observado, de CPZ sobre a fluorescência de AO, era realmente devido à proximidade do sítio de ligação de AO e CPZ na enzima.

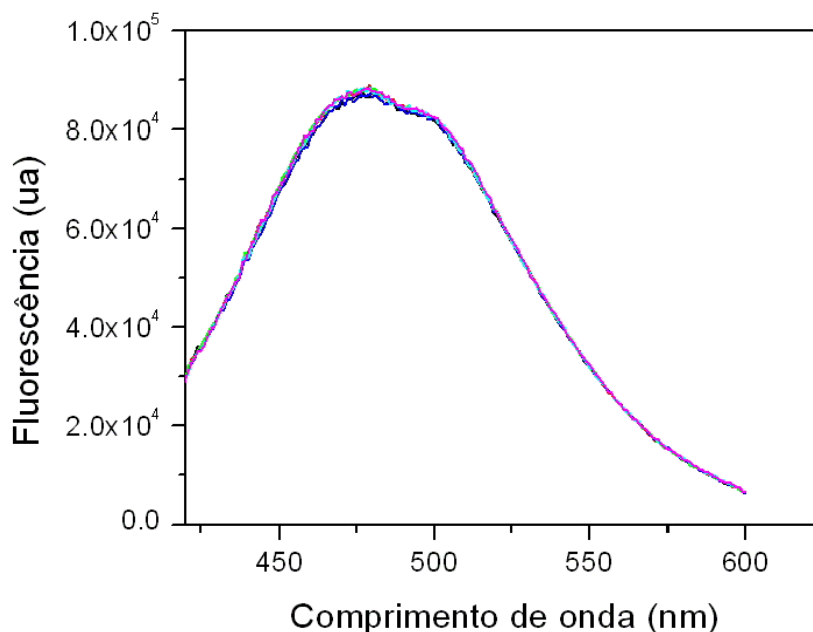


Figura 5.19 Espectros de fluorescência da antroil-ouabaína ($1,25 \mu\text{M}$; exc. 365 nm ; cubeta 1 ml) em tampão T_2 em presença da CPZ ($21 \mu\text{M}$) em diferentes tempos de iluminação da luz ultravioleta (6 espectros obtidos em intervalos de tempo de 5 minutos).

A Figura 5.19 mostra o espectro de fluorescência de AO em tampão depois da adição de $21 \mu\text{M}$ de CPZ, bem como outros cinco espectros tomados com diferentes tempos de iluminação da amostra (de cinco em 5 minutos a 365 nm). Observa-se que o pico de fluorescência de AO, em 470 nm , não sofre mudança significativa. Aqui, a fotodegradação de CPZ, pela luz ultravioleta em 365 nm do espectrofluorímetro, não modifica a fluorescência de AO. Isso indicou que os resultados descritos acima só acontecem na presença de Na^+ , K^+ -ATPase.

Variação temporal da fluorescência de AO – Na^+ , K^+ -ATPase induzida por CPZ: dependência da conformação (E_1 , E_2)

Para verificar se o efeito da fotodegradação da CPZ sobre a fluorescência de AO – Na^+ , K^+ -ATPase é dependente da conformação da enzima, observou-se a variação temporal da fluorescência do sistema, excitada em 365 nm , em tampão T_1 e T_2 . Durante todo o experimento a amostra foi mantida sob agitação, com agitador magnético. Os resultados aparecem na Figura 5.20.

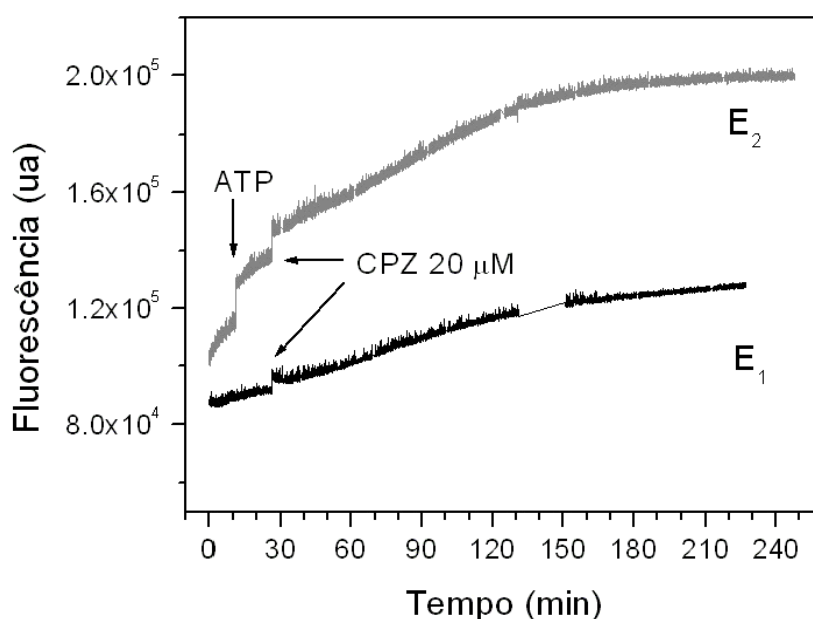


Figura 5.20 Intensidade de fluorescência de AO – Na⁺,K⁺-ATPase (1,25 μM; cubeta 3 ml; exc. 365 nm; em. 450 nm) em função do tempo em presença de CPZ (20 μM). A curva inferior refere-se ao tampão T₁ e a superior ao tampão T₂.

As curvas da Figura 5.20 representam a variação da intensidade de fluorescência de AO com o tempo, sob iluminação contínua em 365 nm. Na curva superior, em tampão T₂, a primeira subida repentina refere-se à pausa para adição de ATP e a segunda, para adição de CPZ. Nota-se que a intensidade de fluorescência de AO devida ao ATP satura-se num tempo relativamente curto, devido a que o ATP faz com que a AO se ligue mais à Na⁺,K⁺-ATPase. Ao contrário, depois do ingresso de CPZ a saturação do sinal de fluorescência da AO foi muito mais prolongada, já que depende da fotodegradação da CPZ que foi ainda mais lenta do que no experimento anterior por termos utilizado a cubeta de 3 ml. A curva inferior, que corresponde ao tampão T₁, não apresenta a fase inicial de crescimento da fluorescência devido à ligação de AO ao sítio de ouabaína. Há um incremento após adição de CPZ, mas este é duas vezes menor do que o que ocorreu em tampão T₂-ATP.

No intervalo entre 30 e 120 min, a taxa de crescimento da intensidade de fluorescência de AO devido à CPZ foi quase duas vezes maior para E₂ (420 ua / min) do que para E₁ (270 ua / min).

Se, na ausência de enzima (Figura 5.19), observa-se que a fluorescência de AO em presença de CPZ não muda com o tempo de irradiação, então o resultado das Figuras 5.18 e 5.20, em presença de Na^+, K^+ -ATPase, nos permite sugerir que a molécula de CPZ se liga à enzima e que a reação foto-induzida modifica, de alguma maneira, o sítio de ligação de AO, provocando um aumento de fluorescência e deslocamento para o azul. Isto se dá principalmente no estado E_2 (curva cinza da Fig 5.20), mas ocorre também, com menor intensidade, para o estado E_1 (curva preta).

O fato de CPZ ligar-se indistintamente a Na^+, K^+ -ATPase já era sugerido pelos resultados da Seção 5.3.4, já que as variações de fluorescência de CPZ em presença da enzima foram semelhantes em ambos tampões.

5.4.2

Fotodegradação de CPZ em Na^+, K^+ -ATPase: fluorescência de CPZ e de AO

Em seguida, estudamos o efeito de iluminação tanto no espectro de fluorescência de CPZ quanto no de AO. Com o sistema Na^+, K^+ -ATPase (membranas a $0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$ em proteína), $1,25 \text{ }\mu\text{M}$ de AO e $20 \text{ }\mu\text{M}$ de CPZ, registramos sucessivamente os espectros de fluorescência ora excitando em 365 nm, ora em 306 nm, para observar a fluorescência de AO e de CPZ, respectivamente. Após o registro de cada espectro a amostra era uniformizada por inversão. O intervalo de tempo entre espectros com mesma excitação foi de 6 min. É importante notar que nesse experimento a amostra era irradiada sucessivamente com luz de 365 nm e 306 nm. Certamente a fotodegradação da CPZ depende do comprimento de onda da radiação incidente e, desse modo, a comparação com as taxas de crescimento de fluorescência das seções 5.12 (CPZ) e 5.17 (AO) não pode ser feita diretamente.

A Figura 5.21 (A) mostra os espectros de fluorescência de AO, excitada em 365 nm, no sistema AO- Na^+, K^+ -ATPase antes da adição de CPZ (espectro inferior) e em diferentes tempos de irradiação após adição de CPZ. Nessa figura, observa-se que conforme se irradia a amostra com luz ultravioleta (ora em 365 nm, ora em 306 nm) a fluorescência de AO ligada à enzima vai aumentando e se deslocando um pouco para maiores energias, conforme já descrito acima (Fig. 5.18).

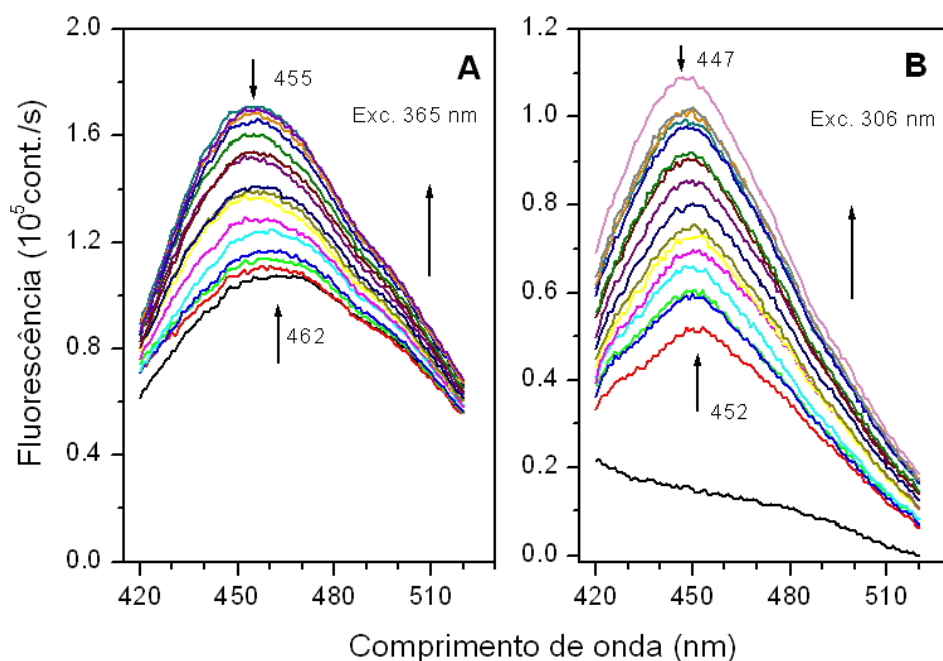


Figura 5.21 Espectros de fluorescência de (A) AO (exc. 365 nm; cubeta 1 ml), à esquerda, e de (B) CPZ (exc. 306 nm; cubeta 1 ml), à direita, no sistema CPZ-AO-Na⁺,K⁺-ATPase em tampão T₂, ATP. [CPZ] = 20 μM; [AO] = 1,25 μM. O espectro inferior, em cada gráfico, refere-se ao sistema antes da adição de CPZ. Os espectros, em ordem crescente, foram registrados, subsequentemente, ora com excitação em 365 nm, ora em 306 nm, de 6 em 6 minutos.

Os espectros da Figura 5.21 (B) se referem à fluorescência de CPZ, excitada em 306 nm. O espectro inferior, registrado antes da adição de CPZ, mostra que não há emissão de fluorescência de AO com excitação em 306 nm. De fato, AO apresenta um mínimo de absorção nesse comprimento de onda (Fig. 5.1).

A evolução temporal da fluorescência de AO e de CPZ é mostrada no gráfico da Fig. 5.22. Os dados experimentais foram ajustados utilizando-se a função

$$F = F_0 + \Delta F[1 - \exp(-t/\tau)]$$

em que $\tau \approx 120$ min foi a constante de tempo que melhor ajustou os dados experimentais tanto para AO quanto para CPZ.

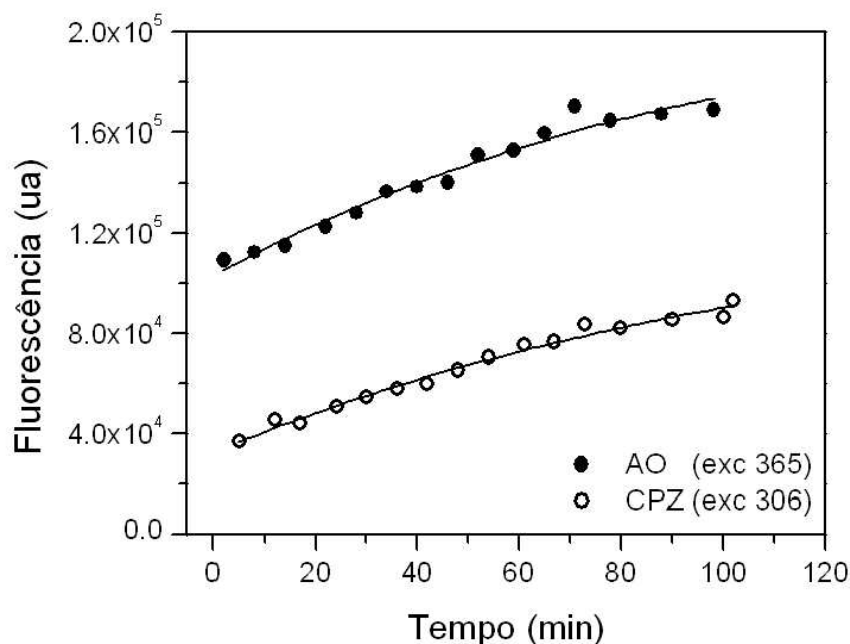


Figura 5.22 Fluorescência de AO (exc. 365 nm) e de CPZ (exc. 306 nm) em função do tempo. Os valores de fluorescência correspondem à média de 5 pontos em torno de $\lambda = 453$ nm (AO) e $\lambda = 450$ nm (CPZ).

A semelhança entre as constantes de tempo associadas às variações de fluorescência dos dois fluoróforos sugere que tanto CPZ quanto AO estão detectando o mesmo fenômeno.

5.4.3

Discussão do efeito de CPZ sobre o sítio de ouabáína

Dos resultados de titulação de AO- Na^+ , K^+ -ATPase com CPZ (Fig. 5.17), onde se observou apenas um pequeno incremento de fluorescência de AO até concentrações da ordem de 8 μM , conclui-se que, aparentemente, a CPZ quase não modifica o sítio de AO. No entanto, não foi possível analisar os resultados de fluorescência de AO em função de concentrações maiores de CPZ, como foi feito com NOR na Seção 5.2, já que a fluorescência passou a apresentar variação temporal associada a foto-sensibilidade da CPZ. Foram então explorados os efeitos das reações foto-induzidas de CPZ com a Na^+ , K^+ -ATPase sobre a fluorescência de AO.

Como sugerido por Bhattacharyya e Sem (1999) a CPZ deve estar se ligando ao sítio de alta afinidade na enzima. Podemos dizer que este sítio está tão próximo ao sítio de ligação da ouabaína como para interferir na fluorescência da AO, aumentando o rendimento quântico e deslocando o pico ao azul. No entanto esse efeito só foi muito significativo após as reações foto-induzidas pela luz ultravioleta utilizada para excitar a fluorescência. Fortes (1977) concluiu que o ambiente do sítio de ligação da ouabaína é mais hidrofóbico, devido ao incremento de fluorescência e ao deslocamento para o azul do pico de emissão da AO quando liga a Na^+, K^+ -ATPase. Em nossa experiência (Figura 5.17 e 5.18) encontramos que a CPZ, ao sofrer o efeito da luz UV, vai alterando da mesma forma a fluorescência. Podemos concluir então que a reação foto-induzida da CPZ com a enzima torna o ambiente do sítio de ligação da ouabaína ainda mais hidrofóbico.

O efeito ocorrido na Figura 5.18 ao agitar-se a amostra demonstrou que o aumento da fluorescência de AO estava relacionado à incidência de luz em presença de CPZ. Mas este efeito só aconteceu na presença de Na^+, K^+ -ATPase, como mostra a comparação entre as Figuras 5.18 e 5.19. Tendo em consideração os resultados em presença de Na^+, K^+ -ATPase, sugerimos que a molécula de CPZ se liga à enzima e que a reação foto-induzida provoca novas mudanças conformacionais que se propagam até o sítio de ligação de AO, como comentamos anteriormente. Isto se dá, principalmente, no estado E_2 (curva cinza da Fig 5.20), mas ocorre também, com menor intensidade, para o estado E_1 (curva preta). Sugere-se que o sítio de alta afinidade por CPZ na Na^+, K^+ -ATPase encontra-se bastante próximo ao sítio de ouabaína, e que a ligação de CPZ a esse sítio desloca o equilíbrio conformacional para o estado E_2 da enzima.

Para a conformação E_1 (Fig. 5.20 curva preta, tampão T_1), em que a enzima não deveria ligar AO, era esperado um resultado semelhante ao de AO-CPZ em tampão, ou seja, que a fotodegradação da CPZ não influenciasse a fluorescência de AO. No entanto, observou-se aumento de fluorescência de AO. Parece, então, que CPZ se liga também à enzima na conformação E_1 e, por meio de sua fotodegradação, exponha o sítio de ligação para AO. Isso fortalece a sugestão de que CPZ desloca o equilíbrio para o estado conformacional E_2 e concorda com Adhikary et al. (1994) que concluíram que a CPZ favorece a conformação E_2 da enzima. O fato de CPZ ligar-se a Na^+, K^+ -ATPase tanto em E_2 como em E_1 já era

sugerido pelos resultados da Seção 5.4.3, já que as variações de fluorescência de CPZ em presença da enzima foram semelhantes em ambos tampões.

Na Figura 5.21 (A), observa-se de novo o efeito que a ligação de CPZ à enzima causa ao sítio da ouabaína, sugerido acima. Em (B) detectamos o aparecimento da espécie fluorescente de CPZ que observamos surgir na Figura 5.16 da Seção 5.3, com pico em 450 nm, que sugerimos originar da espécie molecular promazina. Então, poderíamos dizer que esta espécie é a que faz aumentar e deslocar para o azul o espectro de fluorescência da AO na Fig. 5.21 (A).

Comparando o gráfico inserido na Fig. 5.16 (para $\lambda = 450$ nm) e com o gráfico da Fig. 5.22 (CPZ, símbolos vazados) observamos que as intensidades de saturação da fluorescência de CPZ, ΔF , são quase iguais para as duas curvas. O tempo característico τ aumentou (de 63 min a 120 min), mas isto é devido a que a amostra na Seção 5.4.2 não foi todo o tempo iluminada em 306 nm, senão que também foi iluminada de forma intercalada com 365 nm.

Desses experimentos conclui-se que a foto-sensibilidade de CPZ, tanto ao ultravioleta de 306 nm quanto ao ultravioleta próximo (365 nm), produz espécies ligadas à Na^+, K^+ -ATPase capazes de modificar o sítio de ouabaína, aumentando a fluorescência de AO e deslocando o pico para comprimentos de onda menores. A taxa com que essas modificações ocorrem depende do comprimento de onda da luz incidente. As modificações em AO sugerem que o sítio de associação de CPZ à Na^+, K^+ -ATPase situa-se próximo ao sítio de ouabaína.

Para obter a distância entre os sítios, poderíamos tentar utilizar transferência de energia entre os dois fluoróforos. Nota-se que o espectro de emissão de CPZ (Fig. 5.15 e 5.16) tem superposição com o espectro de absorção de AO (Fig. 5.1). No entanto, antes de realizar experimentos de transferência de energia seria conveniente estudar a fluorescência de CPZ após foto-associação com Na^+, K^+ -ATPase seguida de diálise, para eliminar as espécies que não se associaram covalentemente ao sistema.