

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Frações de membranas - Na⁺, K⁺ - ATPase

Para o estudo das membranas e da proteína Na⁺, K⁺-ATPase, foram utilizadas frações de membranas ricas em Na⁺, K⁺ - ATPase obtida de rim de porco (cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Fontes do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ). Esta proteína Na⁺, K⁺-ATPase tem uma massa molecular de aproximadamente 150 kDa. A atividade aproximada das amostras era de 4 unidades / mg⁻¹ (μM Pi / mg⁻¹.min⁻¹). As suspensões de membranas possuíam concentrações de proteína de 4,2 mg/ ml.

Também foram utilizadas frações de membranas ricas em Na⁺, K⁺ - ATPase de crustáceo de água doce (espécie normal) e adaptada em água salgada (espécie adaptada). As suspensões de membranas tinham concentrações de proteína de 0,68 mg/ml para a espécie normal e 0,78 mg/ml para a espécie adaptada.

A relação em massa entre os lipídios e a proteína nas frações de membranas foi considerada como 1.5, conforme determinações feitas em várias membranas purificadas em Na⁺, K⁺ - ATPase. As alíquotas contendo as frações de membranas eram armazenadas a -15°C e descongeladas no mesmo dia do experimento para preparar as amostras.

4.1.2. Reagentes

Os derivados de fenotiazinas clorpromazina, flufenazina e trifluoperazina foram adquiridos da Sigma. Prepararam-se estoques de 5 mM de fenotiazinas em

etanol. As soluções eram cobertas com papel metálico para evitar alguma fotodegradação durante o armazenamento.

Foram utilizados os tampões fosfato pH 7,4 e citrato - fosfato em diferentes valores de pH. Nos experimentos usando a sonda FITC utilizou-se o tampão Tris 50 mM, pH 9,0 no processo de marcação. O tampão Tris 10 mM a pH 7,4 foi utilizado no experimento com DPH. Foi utilizada água milli-Q em todas as preparações.

4.1.3. Sondas fluorescentes

Todas as sondas fluorescentes utilizadas neste trabalho foram adquiridas de Sigma:

- **FITC** (Fluoresceína isotiocianato – isômero I): marcador de proteínas via grupo amina (especialmente lisina). Em Na^+ , K^+ - ATPase marca especialmente a lisina perto do sítio de ligação do ATP, onde se produz a fosforilação. Preparou estoque de 5 mM de FITC (Sigma) em solvente de DMSO e utilizou-se no mesmo dia.

- **DPH** (1,6 – diphenyl - 1,3,5 - hexatriene): muito utilizado como sonda do interior de membranas. A intercalação de DPH em membranas é acompanhada de forte aumento da fluorescência. A polarização da fluorescência é alta na ausência de movimento rotacional e é muito sensível à reorientação, o que permite sua utilização em medidas de fluidez de membranas. Preparou-se estoque de 1 mM de DPH (Sigma) em tetrahydrofurano (THF). Para as medidas de anisotropia da fluorescência estacionária foram utilizadas concentrações da ordem de 2,4 μM a 4,0 μM .

- **1,8-ANS** (1 – anilinonaphthalene – 8 - sulfonic acid): o rendimento quântico de fluorescência do ANS é dependente das vizinhanças e particularmente sensível à presença de água (perto de 0.4 em EtOH, 0.2 em MeOH e 0.004 em água).

4.1.4. Instrumentação

Espectrofotômetro, espectrofluorímetro estacionário e resolvido no tempo

As medidas de absorção óptica foram realizadas na faixa de 200-800 nm à temperatura ambiente no espectrofotômetro com detecção por arranjo de diodos e resolução de 2 nm, modelo HP 8452^a. Os espectros foram medidos utilizando-se um tempo de integração igual a 1 s.

As medidas de fluorescência foram feitas utilizando o sistema de fluorescência no estado estacionário PTI – QMI, sob agitação magnética.

Medidas de tempo de vida e tempo de correlação rotacional (anisotropia de fluorescência) foram realizadas no sistema de fluorescência resolvida no tempo Horiba-Jobin Ivon-IBH, que utiliza o método de contagem de fóton único (Laboratório multiusuário FLIRT, Departamento de Física da PUC–Rio). A fonte de luz usada para a excitação foi um nanoLED N-16, com taxa de repetição máxima de 1 MHz, emitindo em 330 nm com uma duração de pulso nominal de 1,0 ns.

Para as medidas de absorção e fluorescência foram utilizadas cubetas de quartzo de seção transversal 10 × 10 mm ou 10 × 4 mm, capacidade volumétrica de 3 ml ou 1 ml, respectivamente.

As medições de pH foram feitas usando o pH metro Cole-Parmer Chemcadet 5986-25 com um eletrodo combinado semimicro Ag/AgCl.

Espectrômetro de massa

Os espectros de massa foram obtidos no modo refletivo de um espectrômetro de massa BRUKER/BIFLEX-III (Departamento de Física, PUC – RIO), equipado com um laser de nitrogênio UV em 337 nm, Laser Science Inc. (FWHM 3 ns, 200 µJ de energia média por pulso). As amostras foram analisadas usando o método de dessorção e ionização por laser (LDI).

4.2. Procedimentos Experimentais

4.2.1. Absorção óptica

As medidas de absorção dos sistemas moleculares em estudo são realizadas medindo-se primeiramente o “branco” que é automaticamente subtraído dos espectros de absorção das amostras. Para obter as concentrações adequadas assim como comprimentos de onda adequados à excitação da fluorescência de uma amostra, analisam-se os comprimentos de onda dos picos de absorção e seus coeficientes de absorção molar. Para evitar efeitos de filtro interno a absorbância no comprimento de onda de excitação não deve ser maior do que 0,1.

4.2.2. Fluorescência estacionária

Os espectros de fluorescência são obtidos depois de selecionar o intervalo de varredura e o comprimento de onda de excitação para certa amostra, os espectros de fluorescência foram registrados com taxa de varredura de 1 nm/s. Procurou-se trabalhar com concentrações e comprimentos de onda de excitação onde o valor da absorbância era menor que 0,1.

Os dados dos espectros obtidos foram analisados com o programa Origin, Microcal. Para obter gráficos de fluorescência, em dado comprimento de onda λ , em função do parâmetro variável, escolhia-se no espectro um pequeno intervalo de comprimentos de onda centrado em λ e tomava-se a média das intensidades de fluorescência nesse intervalo. O tamanho do intervalo escolhido dependia do ruído associado ao espectro e da variação da fluorescência em torno do λ escolhido para análise. A intensidade de fluorescência foi corrigida pela diluição, quando necessário. A correção do filtro interno para a intensidade de fluorescência é feita para absorbâncias maiores do que 0.1 utilizando para o fator de correção f_{fi} a seguinte expressão (Lakowicz, 2006):

$$f_{fi} = 10^{(A_{exc} \ell_{exc} + A_{em} \ell_{em}) / 2}$$

onde A_{exc} , ℓ_{exc} e A_{em} , ℓ_{em} são as absorvâncias e caminhos óticos nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente. A intensidade nos espectros de excitação foi corrigida também pela variação da potência da lâmpada nos diferentes comprimentos de onda (Fig. 4.1). Depois de ajustar mediante uma curva teórica, como na região entre 190-400 nm (varredura dos espectros de excitação nas fenotiazinas), o fator de correção foi obtido pela razão $Pot(400\text{ nm})/Pot(190\text{ nm} < \lambda < 400\text{ nm})$.

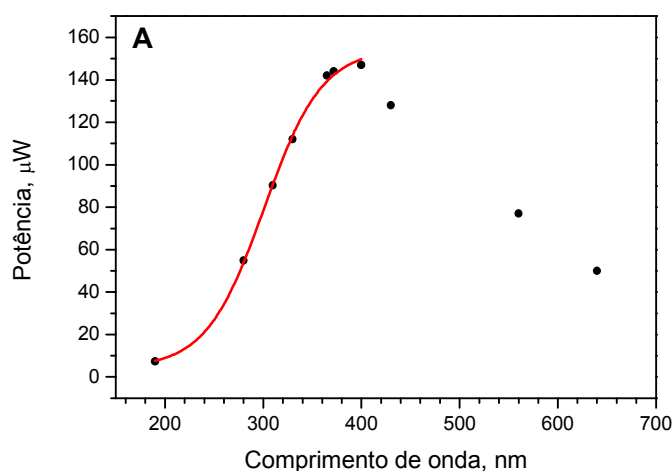


Figura 4.1. Potência da lâmpada de xenônio do espectrofluorímetro para diferentes comprimentos de onda.

Para as medidas de fotodegradação, as amostras de fenotiazinas foram iluminadas com a fonte de luz do espectrofluorímetro (lâmpada de Xe) em 310 nm. Ajustando as larguras das fendas de excitação e os intervalos de tempo (em média 6 min) podemos dosar a energia incidente nas amostras. Teve-se precaução de que as fenotiazinas não fossem iluminadas, a não ser que se estivesse medindo um espectro ou irradiando com a lâmpada. Isto evita um tempo não contabilizado de fotodegradação. Além do mais, todas as amostras foram agitadas magneticamente misturando as regiões irradiadas com as não irradiadas, uniformizando em todo momento a solução aquosa.

A potência de irradiação na posição da amostra é obtida das curvas de calibração da Fig. 4.2, para as excitações em 310 nm e em 365 nm ($P = \alpha f_1 \times f_2$). Por exemplo, se colocamos as fendas de entrada e de saída (f_1 e f_2) do monocromador de excitação a 8 e 10 nm, respectivamente, podemos encontrar a

potência de irradiação em 310 nm. Utilizando $\alpha = 5,66 \mu\text{W}/(\text{nm})^2$, tem-se $P = 0,45 \text{ mW}$.

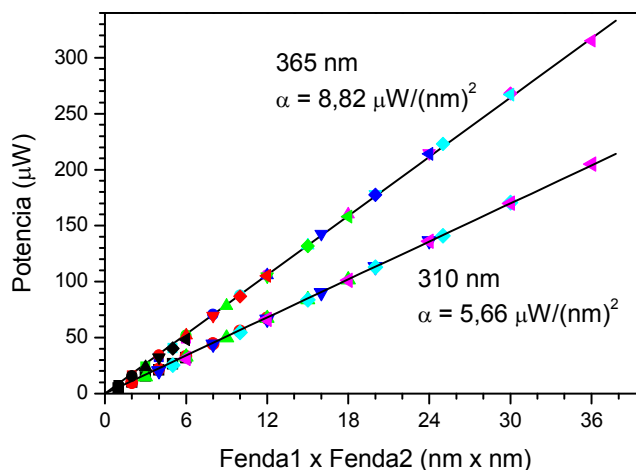


Figura 4.2. Potência de irradiação sobre o porta-amostra do fluorímetro em função do produto das larguras das fendas do monocromador de excitação. Os diferentes símbolos representam medidas realizadas com diferentes larguras de fendas. A fonte de irradiação é uma lâmpada de Xe de 45 W de potência. O parâmetro α representa o coeficiente angular das retas.

A variação dos espectros de absorção e de fluorescência com a irradiação das fenotiazinas é analisada da seguinte maneira: observa-se o deslocamento nos máximos e o aparecimento de picos característicos de alguma espécie de fenotiazina; a formação de pontos isobésticos nos informa se ocorre transição entre duas espécies.

Nas medidas de fluorescência de amostras contendo suspensões de membranas- Na^+ , K^+ -ATPase, em que todas as titulações foram realizadas a concentração constante de membrana, observou-se espalhamento considerável nos espectros. O espectro referência obtido na ausência de fluoróforo era subtraído posteriormente das outras medidas.

Anisotropia de fluorescência estacionária

Membranas- Na^+ , K^+ -ATPase foram marcadas com DPH em condições ambientais, incubadas entre 2 e 3 horas para conseguir que DPH se inserisse completamente entre os lipídios. Medições de anisotropia de fluorescência da DPH foram realizadas em dois tipos diferentes de Na^+ , K^+ -ATPase, de rim porco e

de crustáceo. Manteve-se a relação entre as concentrações de DPH e lipídios a 1/50, que é suficientemente pequena para perturbar pouco a membrana.

Para as medidas de fluorescência, as moléculas de DPH são excitadas em seu pico de absorção em 352 nm. Sabendo que as fenotiazinas absorvem em comprimentos de onda menores de 352 nm, evitamos que estas se fotodegradem.

Polarizadores de excitação e emissão foram usados para medir a anisotropia do DPH. As amostras são excitadas com luz polarizada verticalmente. As intensidades de fluorescência polarizadas verticalmente e horizontalmente são medidas para calcular a anisotropia usando a seguinte equação:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (4.1)$$

onde G é o fator de correção instrumental dado por $G = I_{HV}/I_{HH}$. G foi determinado medindo-se as intensidades de fluorescência I_{HV} e I_{HH} usando luz de excitação polarizada horizontalmente.

Marcação da Na^+ , K^+ - ATPase com FITC

Para estudar as interações das fenotiazinas com o sítio de ligação do ATP da Na^+K^+ -ATPase, marcou-se a enzima com FITC, 120 μl da solução de membranas ($\sim 0,5$ mg de proteína ≈ 3 nmol) em TRIS 50 mM (a pH 9.0) contendo FITC (7,5 nmol). A solução foi agitada por 1h 30min em ambiente escuro. Em seguida, dialisou-se a amostra por um tempo de 12 horas, com a finalidade de separar as moléculas de FITC que não se ligaram à proteína. O meio externo da membrana foi o mesmo tampão TRIS. Todo o sistema foi agitado durante o processo. A Fig. 4.3 mostra esquematicamente o processo de separação ou diálise realizada nesse trabalho.

A Fig. 4.4 mostra a localização da FITC na proteína, que seria o sítio de maior afinidade de ATP na subunidade α e conformação E_1 da proteína (αE_1) (Linnertz et al., 1998). A distância do sítio da AO e da ErITC (eritrosina isotiocianato) para a FITC é de 7,2 nm e 6,5 nm, respectivamente. A ErITC se encontra localizada no sítio de menor afinidade do ATP no estado αE_2 da proteína. As distâncias foram medidas pelo método de transferência de energia de Förster entre estes marcadores fluorescentes.

Depois de finalizada a diálise, a solução contendo a FITC - Na^+ , K^+ -ATPase foi colocada na cubeta de fluorescência, medindo-se os espectros de excitação e

emissão da FITC como controle. Avaliou-se em seguida a fluorescência da FITC - Na^+ , K^+ -ATPase tratada com diferentes alíquotas de fenotiazinas.

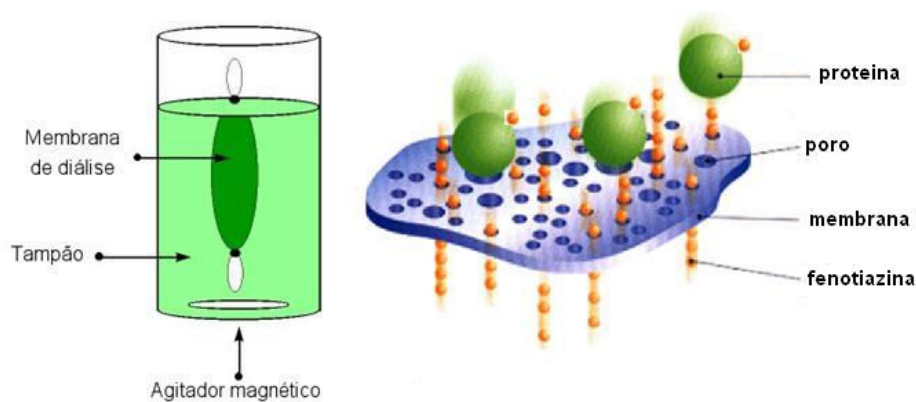


Figura 4.3. Esquema do processo de diálises para separar as moléculas de FITC que não ligaram à Na^+ , K^+ -ATPase.

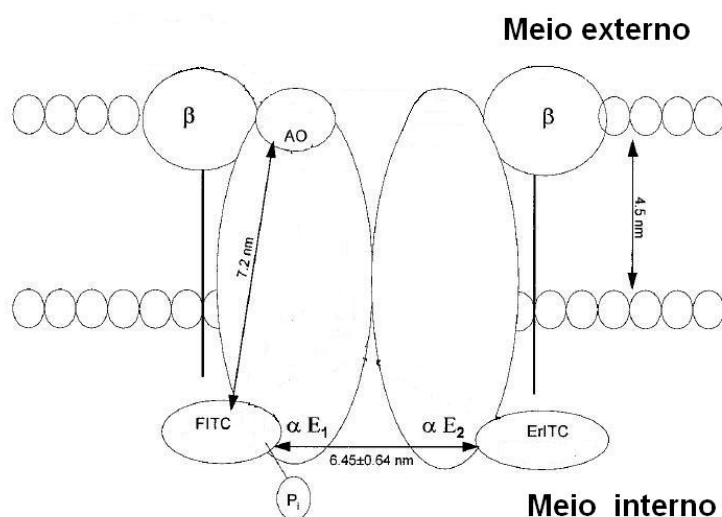


Figura 4.4. Esquema do dímero $(\alpha\beta)_2$ da Na^+ , K^+ -ATPase e localizações dos sítios de alta(conformação αE_1) e baixa afinidade (conformação αE_2) do ATP. As medidas das distâncias relativas dos marcadores fluorescentes (AO, FITC e ErITC) são obtidas por transferência de energia de Föster (Linnertz et al., 1998).

4.2.3. Fluorescência com resolução temporal

Medidas do decaimento da fluorescência e do decaimento da anisotropia foram feitas em um espectrofluorímetro com resolução temporal, baseado no método de contagem de fótons únicos correlacionada no tempo: *time-correlated single-photon counting* (TCSPC). O método baseia-se na excitação da amostra com pulsos de luz, onde os fótons de excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. TCSPC é uma técnica digital que conta fótons correlacionados temporalmente em relação ao pulso de excitação.

Em cada experimento, os dados foram adquiridos até alcançar um máximo de 10 000 contagens no canal do pico. Para cada curva de decaimento de fluorescência da amostra, um correspondente perfil de lâmpada (LED) usando uma solução espalhadora foi medido. O decaimento da intensidade de fluorescência é representado por uma soma de exponenciais:

$$I(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad 4.2$$

onde $I(t)$ é a intensidade de fluorescência, α_i é o fator pre-exponencial, e τ_i é o tempo de vida de fluorescência da componente i . O bom ajuste foi avaliado por χ^2 e resíduos. Para um bom ajuste o valor de χ^2 deve ser perto de 1, mas valores entre 0,8 e 1,2 são considerados adequados. A Fig. 4.6 mostra os resultados de uma medida experimental (pontos) e seu ajuste (curva contínua). A intensidade fracionária ou amplitude relativa, f_i , de cada componente do decaimento foi determinada por $f_i = \alpha_i \tau_i / \sum \alpha_j \tau_j$ e o tempo de vida médio é definido como $\langle \tau \rangle = \sum f_i \tau_i$.

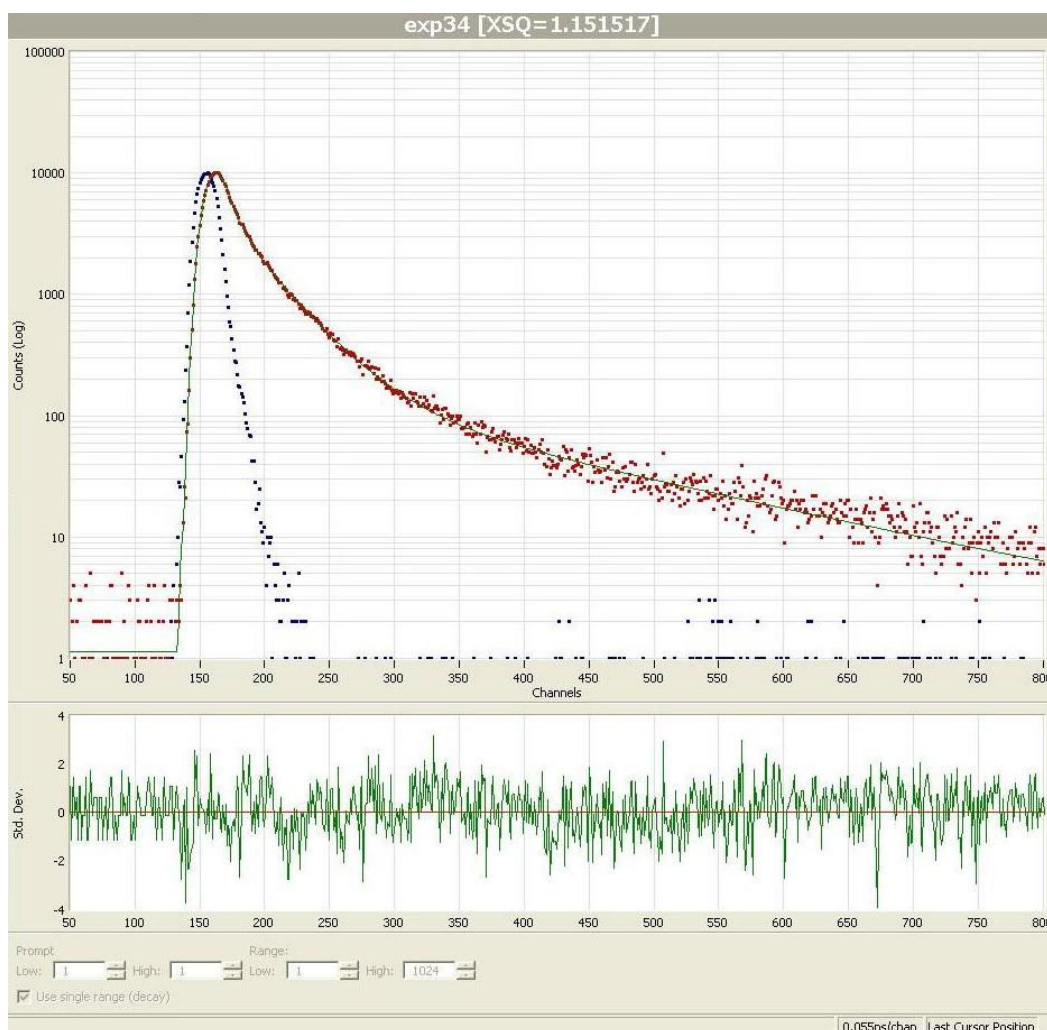


Figura 4.5. Ajuste do decaimento da intensidade da fluorescência de uma medida usando o programa de análise de decaimentos de fluorescência fornecido por HORIBA Jobin Yvon IBH. A parte superior mostra o perfil do LED (pontos não ajustados) e os pontos experimentais ajustados com 3 exponenciais (curva contínua) originando os seguintes tempos: 0,38 ns (41%), 1,8 ns (50%), 9,7 ns (9 %). A parte inferior mostra os resíduos do ajuste. A amostra usada foi a CPZ previamente irradiada (excitação em 330 nm e emissão em 450 nm).

Decaimento da Anisotropia

O decaimento de anisotropia de fluorescência foi medido incorporando-se polarizadores nos monocromadores de excitação e emissão. O decaimento da anisotropia foi gerado da medição do decaimento das intensidades de fluorescência I_{VV} , I_{VH} , I_{HV} e I_{HH} usando a equação 4.1, onde $G = I_{HV}/I_{HH}$. Para analisar os dados a fim de obter os parâmetros de decaimento de anisotropia, utilizaram-se dois métodos: o método direto de análise e o método com

reconvolução. No método direto, os decaimentos são analisados usando um modelo exponencial, em termos de um número de componentes, superposto a uma anisotropia residual (r_∞). Este método é muito popular porque é muito rápido, direto, e dá uma excelente inspeção visual. A Fig. 4.6 mostra uma análise direta de decaimento de anisotropia. No segundo método, a análise (reconvolução) é dividida em duas partes: análise da soma $I_S = (I_{VV} + 2 G I_{VH})$ seguida de análise da diferença $I_D = (I_{VV} - G I_{VH})$. Para obter os parâmetros de decaimento de anisotropia, devemos ajustar I_D com o resultado da reconvolução de I_S . Para a análise de nossas medidas empregamos ambos os métodos.

Para explicar o decaimento da anisotropia nas membranas se utilizou o modelo de movimento dentro de um cone. De acordo com este modelo, o fluoróforo é considerado estar num ambiente limitado e seu movimento orientacional na membrana é descrito como confinado dentro de um cone ao redor da normal à superfície da membrana. O decaimento da anisotropia de fluorescência do fluoróforo na membrana é representado por

$$r(t) = (r_0 - r_\infty)e^{-t/\tau_c} + r_\infty \quad 4.3$$

onde r_0 é a anisotropia em $t=0$, r_∞ é a anisotropia residual e τ_c é o tempo de correlação rotacional para a difusão do fluoróforo dentro do cone. A relação entre o ângulo do cone, θ_c , e a anisotropia residual é dada por

$$r_0 / r_\infty = \frac{1}{4} [\cos \theta_c (1 + \cos \theta_c)]^2 \quad 4.4$$

A taxa $1/\tau_c$ e a amplitude dos movimentos rotacionais θ_c nos dão informação dinâmica e estática, respectivamente, sobre a sonda.

Quando as moléculas de DPH incrustadas na bicamada de lipídios da membrana absorvem energia de luz polarizada verticalmente, elas retornam ao estado fundamental emitindo também luz polarizada. Quando as moléculas dos lipídios na membrana estão na fase gel, as moléculas de DPH permanecem orientadas e a luz emitida tem uma grande componente paralela à polarização da luz incidente (I_{VV}). Se as cadeias lipídicas movimentam-se, mudando de orientação, os eixos moleculares de DPH também mudam de direção aleatoriamente, e os fótons são emitidos com polarização aleatória. Este processo é chamado de despolarização de fluorescência ou decaimento da anisotropia.

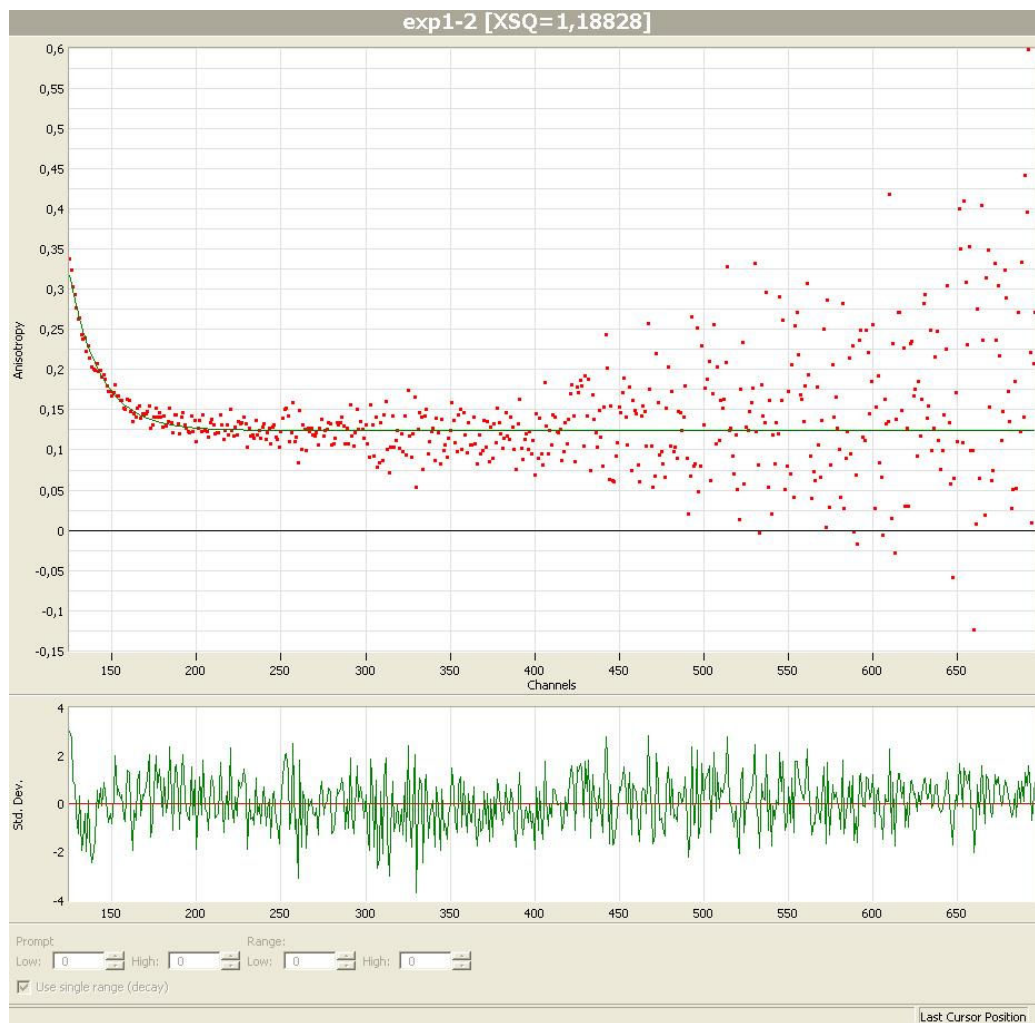


Figura 4.6. Exemplo de análise direta dos dados de decaimento de anisotropia da fluorescência de DPH em frações de membrana enriquecidas de Na^+, K^+ -ATPase, usando o programa de análise de decaimento de fluorescência fornecido por HORIBA-Jobin Yvon-IBH. Os pontos experimentais são ajustados a uma exponencial (curva contínua) originando os seguintes parâmetros: $\tau_c = 1,98$ ns, $r_0 = 0,32$, $r_\infty = 0,13$. A parte inferior mostra os resíduos do ajuste. A excitação em 372 nm e emissão em 427 nm.