

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

A enzima Na^+, K^+ -ATPase.

Como fonte da Na^+, K^+ -ATPase utilizou-se fração de membranas ricas em Na^+, K^+ -ATPase do órgão elétrico do peixe elétrico *Electrophorus electricus* (L.). O órgão elétrico do *E. electricus* (L.) apresenta-se como um sistema apropriado para o estudo bioquímico, biofísico e eletrofisiológico de membranas, já que expressa proteínas homólogas a outros tecidos excitáveis. A semelhança do órgão elétrico com o tecido muscular possibilita estudar sistemas enzimáticos que participam da transmissão neuromuscular (Gotter et al., 1998).

Os peixes elétricos foram obtidos do Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém (PA). A fração P₃, preparada segundo o método de Somló et al. (1987) no Laboratório de Físico-Química Biológica do IBCCF, UFRJ, foi cedida pela Prof. Dra. Aída Hassón-Voloch.

A suspensão estoque de membranas, de 25 mg.ml⁻¹ em proteína e atividade de aproximadamente 2,5 unidades.mg⁻¹ ($\mu\text{M Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), foi separada em alíquotas, armazenadas em nitrogênio líquido. A partir de alíquotas descongeladas no mesmo dia do experimento, preparavam-se amostras com concentrações de 0,20 mg.ml⁻¹ ou 0,25 mg.ml⁻¹ de proteína ($\sim 0,6 \mu\text{M Pi.min}^{-1}$) utilizadas em cubetas de 1 ml.

Tampões

Dois tampões foram utilizados nas experiências, denominados T₁ e T₂. O tampão T₂ consta de Tris 30 mM, Tris-fosfato 5 mM; EDTA 1 mM e MgCl₂ 5 mM, pH 7,4. A ligação de AO à Na^+, K^+ -ATPase requer Mg^{2+} e é ótima na presença de Mg + Pi ou MgATP + Na (Fortes, 1977).

O tampão T_1 consiste em Tris 30mM, EDTA 0,2 mM, pH 7,4. O estado conformacional E_1 predomina em meios livres de Na^+ e K^+ e o estado E_1 . Na predomina em meios enriquecidos de Na^+ contendo pouco ou nada de K^+ (Karlsh S.J.D et al, 1978). No entanto, Tribuzy et al. (2002) encontraram através de digestão triptica, além do fragmento característico de E_1 (76 kD), fragmentos indicativos da presença de E_2 , embora em pequena quantidade.

Reagentes

O marcador fluorescente antroil-ouabaína, o ATP, a clorpromazina e a nortriptilina foram adquiridos da Sigma. Água Milli-Q foi utilizada em todas as preparações.

Espectrofluorímetro e Espectrofotômetro

As medidas de espectroscopia de fluorescência foram feitas utilizando-se o sistema de fluorescência no estado estacionário PTI – QMI, do Departamento de Física, PUC-Rio.

As medidas de absorção óptica foram realizadas no espectrofotômetro Hewlett Packard, modelo HP-8452A, com sistema de detecção por arranjos de diodos e resolução de 2 nm, do Departamento de Física, PUC-Rio. Os espectros foram medidos utilizando-se um tempo de integração igual a 1 s. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e capacidade de 1 ml ou 3 ml.

4.2

Procedimentos Experimentais

4.2.1

Medição e Análise dos Espectros de Absorção Óptica

As medidas de absorção óptica foram feitas no espectrofotômetro HP-8452A. Para começar obter os espectros de absorção, mede-se inicialmente a absorvância do branco, que pode ser o tampão T_1 ou T_2 . Depois se faz a medida da absorção das amostras que contêm os sistemas moleculares em estudo. A subtração é feita automaticamente pelo software do espectrofotômetro.

Para obter as concentrações adequadas assim como comprimentos de onda adequados à excitação da fluorescência de uma amostra, analisam-se os λ_{MAX} de seu espectro de absorção.

4.2.2

Medição e Análise dos Espectros de Emissão de Fluorescência

As medidas de fluorescência foram feitas no sistema de Fluorescência PTI QM-I, operando majoritariamente com todas as fendas em 4 nm e potência da lâmpada em 40 W. Depois de selecionar o intervalo de varredura e o comprimento de onda de excitação para certa amostra os espectros de fluorescência eram registrados com taxa de varredura de 1 nm.s^{-1} .

Procurou-se trabalhar com concentrações e comprimentos de onda onde o valor da absorbância era menor que 0,1; isto é por causa do efeito de filtro interno, já que este efeito pode decrescer a intensidade da excitação no ponto de observação ou decrescer a fluorescência observada pela absorção desta fluorescência. A importância relativa de cada processo depende da densidade óptica da amostra nos comprimentos de onda de excitação e emissão (Lakowicz, Joseph R, 1983).

Depois de obtidos os espectros, os dados eram transferidos para o programa Origin 6.0, da Microcal, para análise.

Como o espalhamento das amostras contendo suspensão de membranas é considerável, todas as titulações seguidas de medidas de fluorescência foram realizadas em concentração constante de membrana. O espectro referência era obtido na ausência de fluoróforo e subtraído posteriormente.

Os dados de fluorescência foram corrigidos para a diluição de volume, quando necessário.

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. Esse procedimento permitia diminuir o erro associado ao processo de medida, no caso de espectros muito ruidosos (baixa intensidade de fluorescência) ou variações pequenas. O tamanho do intervalo

escolhido dependia do ruído associado ao espectro e da variação da fluorescência em torno do λ escolhido para análise.

Para analisar aqueles espectros cujos picos sofriam deslocamento, procuravam-se pontos isobésticos para verificar se estava ocorrendo transição entre duas espécies.

4.2.3

Medição da constante de dissociação entre AO e Na^+, K^+ -ATPase

O espectro de fluorescência de antróil-ouabaína em presença de membranas contendo Na^+, K^+ -ATPase (AO- Na^+, K^+ -ATPase) foi medido e usado para obter a constante de dissociação entre AO e Na^+, K^+ -ATPase. A curva de titulação por AO, mantendo-se uma concentração fixa de membranas, foi analisada de acordo ao modelo de um só sítio de ligação:



$$K_D = \frac{[\text{AO}][\text{E}]}{[\text{AO-E}]} \quad (2)$$

K_D é a constante de dissociação da AO, $[\text{E}]$ é a concentração de enzima livre, $[\text{AO-E}]$ e $[\text{AO}]$ são as concentrações de AO ligada e livre, respectivamente. De (1) e (2) obtemos a equação:

$$\frac{[\text{AO-E}]}{[\text{E}]_T} = \frac{[\text{AO}]}{K_D + [\text{AO}]} \quad (3)$$

onde $[\text{E}]_T$ é a concentração total de enzima.

A equação (3) pode ser rescrita em termos da fração de AO ligada.

$$X_b = \frac{[\text{AO-E}]}{[\text{AO}]_T} \quad (4)$$

sendo $[\text{AO}]_T$ a concentração total de antróil-ouabaína, conduzindo a:

$$X_b = \frac{[\text{E}]_T(1 - X_b)}{K_D + (1 - X_b)[\text{AO}]_T} \quad (5)$$

A fluorescência F , num dado comprimento de onda, é devido a AO ligada e livre:

$$F = F_b X_b + F_f(1 - X_b) \quad (6)$$

onde F_b e F_f são a fluorescência devido à concentração total de AO $[AO]_T$ no estado ligado e em solução, respectivamente. Os valores de fluorescência por concentração de AO,

$$f_f = \frac{F_f}{[AO]_T} \quad \text{e} \quad f_b = \frac{F_b}{[AO]_T}$$

são experimentalmente obtidos dos coeficientes angulares das curvas F contra $[AO]_T$ para o tampão e para a solução com enzima (valor inicial), respectivamente. Substituindo-se F_b e F_f , a equação (6) será:

$$F = (f_b - f_f)X_b[AO]_T + f_f[AO]_T \quad (7)$$

A equação (7), com X_b satisfazendo a equação (5), é usada para ajustar a curva de F contra $[AO]_T$ e obter o parâmetro K_D e a concentração de enzima $[E]_T$ (Nunes-Tavares N. et al., 2002). No entanto, não utilizamos esse procedimento para análise dos resultados da Seção 5.1, pois o número de pontos experimentais foi pequeno para obter um K_D confiável.

4.2.4

Medição da constante de dissociação entre nortriptilina e AO- Na^+, K^+ -ATPase

Para utilizar o modelo de um sítio à ligação de NOR com o sistema AO- Na^+, K^+ -ATPase, este sistema será agora o "fluoróforo", cuja concentração é mantida constante $[AO-E]_T$ e a droga antidepressiva NOR terá sua concentração variada. Re-escrevendo a equação (4) como:

$$X_b = \frac{[(AO-E) - NOR]}{[AO-E]_T} = \frac{[NOR]}{K_D + [NOR]} \quad (8)$$

Onde X_b é a fração de AO- Na^+, K^+ -ATPase ligada a NOR e K_D é a constante de dissociação entre AO- Na^+, K^+ -ATPase e $[NOR]$.

A fluorescência F da AO- Na^+, K^+ -ATPase, num comprimento de onda, devido a seu estado livre e ligado à NOR é da mesma forma que a equação (6), rescrevendo-a dará:

$$F = (F_b - F_f) \frac{[NOR]}{K_D + [NOR]} + F_f \quad (9)$$

Onde F_b e F_f é a fluorescência devido à concentração de AO- Na^+, K^+ -ATPase ligada à NOR e sem ligar à NOR, respectivamente. Ajustando a equação

(9) aos dados de Fluorescência em função de [NOR] podemos obter a constante de dissociação K_D entre NOR e o sistema AO- Na^+ , K^+ -ATPase.

Os espectros de fluorescência são medidos excitando AO em 365 nm. Os antidepressivos tricíclicos não absorvem em 365 nm, enquanto o espectro de absorção de AO tem um pico de absorção em 365 nm e não varia com o tempo.

Para as drogas que sofrem fotodegradação, como a CPZ, o modelo anterior é inadequado. A dinâmica do processo de reação fotoinduzida de CPZ com a cadeia protéica depende da potência da lâmpada de excitação. Quando a fluorescência da própria CPZ é excitada, ela depende das diferentes classes de radicais que se formam quando a amostra é iluminada.