

6. Conclusão

6.1 Conclusões

Ao analisar a fluorescência do marcador antroil-ouabaína em presença de membranas de eletrócitos de *E. electricus* contendo Na^+, K^+ -ATPase observaram-se aumento de rendimento quântico e deslocamento para o azul característicos de associação ao sítio de ouabaína. A confirmação de que essas modificações espectrais estavam relacionadas ao sítio de ouabaína foi obtida a partir de retro-titulação com ouabaína.

Experimentos de titulação de AO- Na^+, K^+ -ATPase com o antidepressivo tricíclico nortriptilina permitiram verificar que NOR não compete com AO pelo sítio de ouabaína. Observou-se que os efeitos de NOR sobre a fluorescência de AO são dependentes de conformação. Obtiveram-se constantes de dissociação entre NOR e Na^+, K^+ -ATPase de $6,0 \mu\text{M}$ para a conformação E_2 e de $52 \mu\text{M}$ para a conformação E_1 . As mudanças no espectro de AO sugeriram que NOR desloca o equilíbrio conformacional da enzima em direção a E_2 .

Com respeito ao antipsicótico clorpromazina, foram obtidas espécies fluorescentes derivadas de produtos da fotodegradação de CPZ. Já era conhecido que fármacos derivados da fenotiazina sofrem fotodegradação ao serem iluminados com luz ultravioleta. A evolução dos espectros de fluorescência com o tempo de iluminação demonstrou que os fotoprodutos em tampão são diferentes daqueles obtidos em presença de Na^+, K^+ -ATPase, sugerindo reação foto-induzida entre CPZ e a enzima. As espécies formadas em presença de Na^+, K^+ -ATPase apresentaram espectros de fluorescência independentes de conformação E_1 ou E_2 , indicando mesma estrutura local da CPZ nas duas situações. Esse resultado não contradiz a sugestão de Adhikary et al. (1994), de que a CPZ favorece a conformação E_2 da enzima. Nesse caso o(s) fotoproduto(s) seria(m) formado(s) entre CPZ e a conformação E_2 , independente da conformação inicial da enzima.

Excitando seletivamente a fluorescência de AO (em 365 nm) avaliou-se a influência de CPZ sobre o sítio de ouabaína. Observou-se que a formação do produto de fotodegradação de CPZ com a Na^+, K^+ -ATPase faz incrementar a fluorescência de AO, com deslocamento para o azul, sugerindo que o sítio torna-se mais hidrofóbico. Esse efeito ocorre em ambos tampões, mas é mais pronunciado no tampão que estabiliza a conformação E_2 . Considerando que, na concentração utilizada nesse trabalho, a CPZ se associa apenas ao sítio de alta afinidade sugerido por Bhattacharyya e Sem (1999), conclui-se que este se encontra próximo ao sítio de ligação de ouabaína interferindo na fluorescência da AO.

6.2 Perspectivas

Em continuação a esse trabalho, seria importante verificar se Na^+, K^+ -ATPase é covalentemente modificada por CPZ após irradiação, submetendo as amostras à diálise e investigando a estabilidade da fluorescência do composto formado. No caso de se obter um composto estável, este poderia servir como marcador fluorescente da enzima.

Em bicamadas lipídicas, devido a seu caráter anfifílico a CPZ intercala-se entre os lipídios de bicamadas e associa-se preferencialmente a grupos negativos localizados na superfície da membrana. A localização mais precisa da CPZ nas membranas biológicas pode ser investigada por transferência de energia. Sabendo de antemão, que grande parte de resíduos de triptofano da Na^+, K^+ -ATPase é acessível à CPZ e que existe transferência de energia de triptofano à CPZ (Adhikary et al., 1994), pode-se realizar o estudo da transferência de energia entre os resíduos de triptofano da enzima e a CPZ.

Outras sondas fluorescentes, que tenham diferentes sítios de ligação conhecidos na proteína integral ou que se intercalem na bicamada lipídica, podem ser utilizadas para localizar o sítio de ligação da CPZ na Na^+, K^+ -ATPase e verificar seu efeito em diferentes partes da enzima.

Medições do tempo de vida de fluorescência, tanto de AO ou de outras sondas em presença dos fármacos, assim como dos produtos fluorescentes da

reação foto-induzida de CPZ com a Na^+,K^+ -ATPase, podem fornecer mais detalhes sobre a interação. Modificações no tempo de vida de fluorescência revelam frequências de choques com agentes supressores colisionais, taxas de transferência de energia e taxas de reações no estado excitado.

No caso da CPZ, a fototoxicidade provoca efeitos colaterais indesejáveis. No entanto, os efeitos fototóxicos podem ser avaliados utilização terapia fotodinâmica. A correlação entre perda de atividade de importantes enzimas e os produtos da reação foto-induzida pode sugerir procedimentos para utilização de CPZ nesse tipo de terapia.