

4. Materiais e Métodos

4.1

Materiais

As porfirinas FeTPPS₄ e FeTMPyP

Os derivados férricos das porfirinas sintéticas meso-tetrakis (p-sulfonato-fenil) porfirina (Fe-TPPS₄) e meso-tetrakis (4-N-metil- piridiniumil) porfirina (Fe-TMPyP), Midcentury, foram gentilmente cedidas pelo professor Marcel Tabak do Instituto de Química de São Carlos.

Detergentes

O detergente catiônico CTAB (brometo de cetiltrimetilamônia), o aniônico SDS (dodecil sulfato de sódio) foram adquiridos da Sigma. Água milli-Q foi usada em todas as preparações.

Proteínas

As proteínas liofilizadas foram adquiridas da Sigma: albumina de soro bovino (A-0281) livre de ácidos graxos, com grau de pureza $\geq 99\%$ (por eletroforese em gel de agarose), e mioglobina de músculo esquelético de cavalo (M-0630) com grau de pureza de 95-100%.

S-nitrosotiol

O S-nitrosotiol SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina), doador de óxido nítrico, foi obtido da Sigma, tendo a aparência de pó com cor verde.

O uso de SNAP requer alguns cuidados especiais, de modo a evitar iluminação excessiva bem como umidade desta maneira, pequenas quantidades de SNAP (0,2 a 0,5 mg) eram pesadas e armazenadas a -20° C em frascos desoxigenados e protegidos da luminosidade. Imediatamente antes da utilização,

soluções 20 mM eram preparadas injetando-se com micro-seringa (Hamilton, "gas tight") alíquotas adequadas de solução estoque de EDTA (ácido etilenodiaminatetracético) 10 mM, também desoxigenada.

A solução estoque para o tampão universal foi preparada, contendo ácido fosfórico 10 mM, ácido bórico 10 mM, ácido cítrico 6,6 mM, hidróxido de sódio, 66 mM. Os tampões de pH 5.0 e 8.0 foram obtidos com a adição de alíquotas de HCl à solução estoque de pH alto. Tampão universal 66 mM em sódio, ou diluído para 30 mM em sódio, foi utilizado ao longo de todo o trabalho. O ajuste dos valores de pH foi feito com auxílio do pH metro Cole Parmer Chemcadet 5986-25 com eletrodo de Ag/AgCl. As soluções tampão continham EDTA 1 mM. O EDTA tem como função complexar metais de transição cujos traços presentes nas soluções modificam aleatoriamente as reações envolvendo óxido nítrico.

4.2

Equipamentos

Os espectros de absorção ótica na faixa de 220 a 800 nm foram obtidos em temperatura ambiente (25⁰C) com o espectrômetro HP8452A Diode Array. O espectrofotômetro era programado para fazer medidas de espectros em espaços de tempo pré-determinados.

4.3

Procedimentos

4.3.1

Absorção ótica

Cubetas de quartzo (capacidade de 4 ml e caminho ótico de 1cm) com boca adequada para septo foram utilizadas em todos os experimentos. A medida do branco era realizada com tampão universal, pH 5,0 ou 8,0. As ferri-porfirinas eram colocadas em concentrações de aproximadamente 7 µM e a concentração era conferida a partir do espectro de absorção. A concentração de SNAP era conferida

utilizando a absorvância em 228 nm, que não varia mesmo depois da liberaçãõ de NO ($\epsilon_{228} = 6,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Em experimentos sob condições anaerõbicas, as alíquotas de soluções estoque de Fe-porfirinas, de SNAP e de detergentes, previamente desoxigenadas, eram injetadas com micro-seringa "gas tight" da Hamilton diretamente nas cubetas contendo tampãõ também previamente desoxigenado. As desoxigenações eram realizadas por fluxo contínuo de N₂ durante 5 a 20 min, dependendo do volume das soluções.

Para construir os grãficos de variaçãõ temporal de absorvância foram escolhidos comprimentos de onda onde existiam variações significativas de absorvância com o decorrer da reaçãõ de nitrosilaçãõ. Para diminuir o erro experimental, a cada comprimento de onda escolhido eram utilizados também o comprimento de onda anterior e o posterior, sendo obtida a média das absorvâncias nestes comprimentos de onda.

Absorçãõ Ótica do SNAP

Como os objetivos do nosso trabalho se detêm na investigaçãõ da nitrosilaçãõ das Fe-porfirinas sintéticas catiônica FeTMPyP e aniônica FeTPPS₄, por doadores de óxido nítrico do tipo S-nitrosotiõis, em particular por SNAP, julgamos importante apresentar os espectros de absorçãõ ótica do SNAP.

Alíquotas foram retiradas da soluçãõ stock de SNAP, à concentraçãõ de 20 mM, e cuidadosamente (evitando a oxigenaçãõ da amostra) adicionadas diretamente nas cubetas previamente desoxigenadas contendo tampãõ universal 30 mM e EDTA 0.1 mM, resultando em uma concentraçãõ final de SNAP a 80 μM . A Fig. 5.1 mostra o espectro de absorçãõ ótica do SNAP na faixa de 220 a 720 nm. Não observamos quaisquer mudançãs espectrais decorrentes da diferençã de pH. Podemos notar que o SNAP em soluçãõ tampãõ, para ambos os valores de pH, possui dois picos de absorçãõ bem definidos no ultravioleta, em 228 e 338 nm. A absorvância no pico em 228 nm é 7,45 vezes maior do que no pico de 338 nm, e não decai quando o SNAP libera NO. Utilizando $\epsilon_{338} = 0,90 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Barriviera et al., 2005) calculamos $\epsilon_{228} = 6,70 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Há ainda uma banda na regiãõ visível porém sua absorvância é bem menor, sendo desprezível para concentrações de SNAP utilizadas ao longo do trabalho.

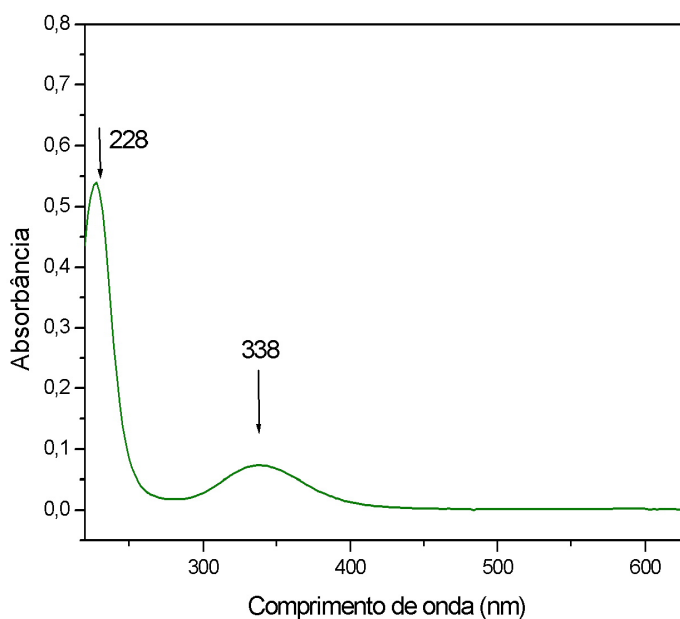


Figura 4.1

Espectro de absorção do SNAP 80 μM em tampão universal 30 mM, EDTA 0,1 mM, pH 5,0. Em pH 8,0 o espectro é igual.

Determinação da constante cinética de nitrosilação por SNAP

Para a realização de medidas espectrofotométricas visando determinar a fração de porfirina nitrosilada em solução como função da concentração de inicial de SNAP, bem como as constantes cinéticas da reação, as amostras FeTMPyP e FeTPPS₄ em tampão universal 60 mM, pH 5,0 contendo EDTA 0,1 mM, eram desoxigenadas e a adição de alíquotas eram realizada mantendo-se a atmosfera anaeróbica.

Para o estudo da evolução temporal da nitrosilação de FeTMPyP e de FeTPPS₄ em função da concentração de SNAP as alíquotas de solução de SNAP eram diretamente adicionadas à cubeta com solução de porfirina (7 μM) nas proporções molares de aproximadamente 1:1, 2:1 e 4:1 em relação à porfirina. As concentrações de porfirina e SNAP foram recalculadas a partir do espectro de absorção.

A medida do branco era realizada com a cubeta contendo o tampão. Após a adição das porfirinas o primeiro espectro óptico era obtido e, a partir deste, a alíquota de SNAP era adicionada e os espectros subsequentes obtidos em

intervalos regulares (de 30 em 30 segundos). A nitrosilação em função do tempo foi observada através da variação dos espectros ópticos.

Cinética em O₂.

Para as medidas de cinética em ambiente aeróbico, adicionava-se SNAP em concentração de ~ 14 μM (~ 2:1 em relação a porfirina) à cubeta, e acompanhavam-se as mudanças espectrais através do espectrofotômetro já pré-programado. Os experimentos foram também realizados em presença de micelas, para avaliar sua influência na estabilidade das nitrosil-Fe-porfirinas em presença de oxigênio.

Estabilidade das NO-porfirinas por micelas

Para investigar, através da técnica de absorção ótica, a influência de micelas catiônicas CTAB e aniônicas SDS na estabilidade de NO-FeTPPS₄ e NO-FeTMPyP, respectivamente, em valores altos e baixos de pH (pH 5,0 e 8,0), quando expostas a ambientes oxigenados, soluções de Fe-porfirinas 10 μM eram preparadas diretamente nas cubetas, partindo de soluções estoque de FeTMPyP ou FeTPPS₄ ~ 2 mM. Iniciava-se a reação de nitrosilação após adição de SNAP. As soluções estoque de SNAP 20mM eram preparadas imediatamente antes de cada experimento, e a adição era feita diretamente na cubeta, resultando em concentração molar de ~ 4:1 relativa à Fe-porfirina.

Em valores de pH 5.0 e 8.0, ambas as porfirinas eram nitrosiladas em ambiente anaeróbico por adição de alíquotas convenientes de SNAP, antes das medidas da evolução dos espectros como função do tempo, em presença de oxigênio.

Com intuito de estudar a influência de micelas na estabilidade das Fe-porfirinas nitrosiladas como função do tempo, os detergentes eram adicionados de soluções estoque 200 mM previamente desoxigenadas, de modo a alcançar concentrações finais de 20 mM. Condições de atmosfera anaeróbica foram alcançadas após fluxo contínuo de nitrogênio puro diretamente nas cubetas.

Após medidas iniciais dos espectros de absorção ótica das ferro-porfirinas nitrosiladas em soluções de detergentes iônicos, as cubetas foram expostas a oxigênio e sucessivas medidas como função do tempo de exposição foram realizadas. Estas sucessivas medidas serão confrontadas com os espectros das

ferro-porfirinas não nitrosiladas em soluções micelares também a valores altos e baixos de pH, e desta maneira determinaremos se realmente, em presença de oxigênio as micelas iônicas foram capazes de preservar as ferro-porfirinas nitrosiladas.

Nitrosilação de mioglobinas

Com intuito de analisar a nitrosilação de mioglobinas por SNAP, preparamos uma solução tampão universal a 60 mM em pH 5,0. Contando com a mesma cubeta de capacidade 4 ml, esta solução foi desoxigenada também por fluxo de N₂, o que rendeu o branco da nossa experiência. Com a ajuda da microseringa gas tight, adicionamos uma alíquota de mioglobina de forma que sua concentração final fosse de 7 μM, então, medimos o primeiro espectro ótico característico desta mioglobina. O acompanhamento da evolução temporal deste espectro, foi tomado em intervalos de tempo regulares após a cuidadosa adição de SNAP, que se fez também com o uso das microseringas de forma a ser mantida a mesma condição experimental de atmosfera anaeróbia. Realizamos a nitrosilação com SNAP a 7 μM e a 28 μM.

Nitrosilação das Ferro-porfirinas incorporadas em albumina bovina

Esta seção destina-se a descrever os procedimentos experimentais para a investigação por absorção ótica da influência da albumina bovina na nitrosilação por SNAP das ferro-porfirinas Fe-TPPS₄/TMpyP. Para estas experiências, trabalharemos com solução tampão tris (50 mM) a pH 7,4. Em atmosfera oxigenada, as ferro-porfirinas foram cuidadosamente adicionadas resultando em concentrações finais de 7 μM na cubeta. Os primeiros espectros óticos foram tomados. A partir daí, usando-se micro pipetas, alíquotas de albumina são adicionadas até que a concentração final na cubeta alcance 16 μM aproximadamente. Esta solução será desoxigenada aproximadamente por 10 minutos em fluxo contínuo de N₂. Com o cuidado de manter as mesmas condições anaeróbias, e com o auxílio da micro seringa "gas tight", colocamos SNAP em uma concentração de 14 μM na cubeta. Finalmente, com o espectrofotômetro pré programado, seguimos a nitrosilação da solução porfirina / albumina.

4.3.2

Ressonância Paramagnética Eletrônica

Cinética de nitrosilação

Uma vez que a caracterização pela técnica de espectrometria de absorção óptica é incompleta para estudar complexos paramagnéticos, a EPR será utilizada para caracterizar as diferentes estruturas formadas durante as etapas da cinética de ligação ao óxido nítrico da FeTMPyP e FeTPPS₄. Para investigar os complexos formados durante a nitrosilação das ferro-porfirinas diméricas e monoméricas, as amostras foram preparadas em valores de pH acima e abaixo da transição monômero-dímero em ambientes desoxigenados por fluxo contínuo de N₂. A partir daí, submetidas ao doador de óxido nítrico SNAP (S-nitroso-N-acetilpencilamina).

A adição de SNAP marca o início das reações de nitrosilação. Como as medidas de EPR são realizadas em temperatura de N₂ líquido, 77 K, pequenas alíquotas são retiradas do ensaio que comporta as soluções reagentes, com micro-seringa Hamilton, em intervalos de tempos regulares, são transferidas para porta-amostras e rapidamente congeladas em N₂ líquido. A retirada das alíquotas segue intervalos maiores para valores altos de pH devido à cinética mais lenta na reação com dímeros, como já observado dos resultados de absorção ótica. Usando como porta-amostra pequenos recipientes plásticos, com cerca de capacidade de 100 µM. Possuindo vedação na base inferior por uma tampa de teflon coberta por uma fina camada de óleo mineral (Nujol), depositaremos cuidadosamente as alíquotas na interface mantendo assim condições anaeróbicas. As amostras são submetidas a congelamento rápido em nitrogênio líquido. Com este procedimento interrompemos a reação de nitrosilação em diversas etapas.

Estabilidade das NO-porfirinas por micelas

Para determinar a influência de micelas catiônicas CTAB e aniônicas SDS na preservação das ferro-porfirinas TMPyP e TPPS₄ nitrosiladas por SNAP, mudanças conformacionais serão acompanhadas pela técnica de EPR após a oxigenação destes complexos nitrosilados em soluções micelares.

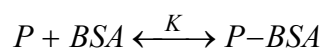
Finalizada a nitrosilação por adição de SNAP (como descrito acima para a técnica de absorção ótica), a adição de detergentes iônicos 20mM segue-se com o uso da micro-seringa garantindo que todas as etapas do processo ocorram em um ambiente realmente desoxigenado. Para que seja possível verificar a eficiência da blindagem micelar na preservação das NO-Fe⁺²Porfirinas, esta amostra passará por exposição ao oxigênio e então, alíquotas serão retiradas 3 minutos e uma hora após o início da exposição.

Uma vez que as medidas de EPR devem ser realizadas em temperatura de N₂ líquido, 77 K, após o início da exposição ao oxigênio, as pequenas alíquotas são também retiradas com micro-seringa Hamilton sendo transferidas para o porta-amostras que será rapidamente congelado em N₂ líquido.

4.3.3

Determinação da constante de ligação de Fe-porfirinas a albumina

Para determinar a constante de associação, vamos considerar que a ligação da ferro-porfirinas, P, à albumina BSA segue a equação de equilíbrio abaixo:



Onde K é a constante de associação. A constante de dissociação K_d é o inverso de K . A constante de dissociação K_d pode ser escrita como:

$$K_d = \frac{[P][BSA]}{[P-BSA]} \quad (4.1)$$

Como as concentrações totais de porfirina $[P_t]$ e albumina $[BSA_t]$ em solução são iguais às somas das concentrações livre e ligada então:

$$\begin{aligned} [P_t] &= [P] + [P-BSA] \\ [BSA_t] &= [BSA] + [P-BSA] \end{aligned} \quad (4.2)$$

Substituindo a equação para a concentração total de porfirina na equação (4.1) temos

$$K_d = \frac{([P_t] - [P-BSA])[BSA]}{[P-BSA]} \quad (4.3)$$

A Eq. 4.3 pode ser re-escrita como:

$$\frac{[P-BSA]}{[P_t]} = \frac{[BSA]}{K_d + [BSA]} \quad (4.4)$$

onde se pode observar que o primeiro termo é a fração de porfirina ligada, que denominaremos f_b . Nos casos em que $[BSA] \approx [BSA_t]$, a Eq. 4.4 é utilizada para ajustar os dados de titulação de P com BSA, onde $[BSA_t]$ é a quantidade conhecida. A equação OneSiteBind do programa Origin (Microcal) é equivalente à Eq. 4.4, sendo que multiplicada por uma constante ajustável B.

$$Y = \frac{BX}{K_d + X} \quad (4.5)$$

Uma equação mais geral envolvendo a fração de porfirina ligada e as concentrações totais de porfirina, $[P_t]$, e BSA, $[BSA_t]$, válida mesmo nos casos em que $[BSA] \neq [BSA_t]$ pode ser obtida como se segue. Substituindo a equação para a concentração total de albumina (4.2) na equação (4.1) temos:

$$K_d = \frac{[P]([BSA_t] - [P-BSA])}{[P-BSA]} \quad (4.6)$$

Pequenas manipulações matemáticas nos levam a uma relação entre a concentração de porfirinas ligadas a BSA ($[P-BSA]$) e a constante de dissociação K_d .

$$[P-BSA] = \frac{[P][BSA_t]}{K_d + [P]} \quad (4.7)$$

Sendo f_f a fração de porfirinas livres, é bem claro que $f_b + f_f = 1$. Logo

$$1 - f_b = \frac{[P]}{[P_t]} \quad (4.8)$$

Substituindo-se $[P]$ da Eq. 4.8 na Eq. 4.7 tem-se a expressão:

$$f_b = \frac{[BSA_t](1 - f_b)}{K_d + [P_t](1 - f_b)} \quad (4.9)$$

A solução para a equação de segundo grau em f_b , obtida a partir da Eq. 4.9, é:

$$f_b = \frac{[P_t] + K_d + [BSA_t] - \left(([P_t] + K_d + [BSA_t])^2 - 4[P_t][BSA_t] \right)^{1/2}}{2[P_t]} \quad (4.10)$$

Essa equação (4.10) pode ser utilizada para ajustar dados num modelo de um sítio de ligação para qualquer concentração de BSA e P.

As constantes de dissociação K_d foram obtidas a partir de ajustes dos dados experimentais de variação de absorvância, feitos em computador através do software Origin versão 6.0, usando a Eq. 4.5 ou a Eq. 4.10, conforme o caso.