

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

"Este exemplar corresponde a redação final devidamente
corrigida e Aprovada pela Comissão Julgadora da tese".
concedido Nelson Durán

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

ESTUDO ESPECTROFOTOMÉTRICO EM
HIPERBILIRRUBINEMIA: ANÁLISE DE
BILIRRUBINA E ENZIMAS RELACIONADAS

Clara Megumi Abe

Tese de Mestrado

CAMPINAS

1984

BIBLIOTECA CENTRAL

Antes a Mãe e o Pai.

Aloísio Marchi.

Nelson Duóu

A meus pais pelo exemplo de vida, a meus irmãos pelo apoio e compreensão. Em especial ao Aloísio pelo incentivo e carinho.

A G R A D E C I M E N T O S

Em especial ao Prof. Nelson Duran pela orientação durante a realização deste trabalho.

A Direção e aos funcionários do Instituto de Química.

A CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

Ao Hospital das Clínicas (UNICAMP) pelo fornecimento das amostras de soro.

Ao Departamento de Bioquímica da Unicamp por permitir o uso de sua aparelhagem.

Ao Dr. Anibal do Departamento de Bioquímica pelo fornecimento do material na obtenção da enzima.

À Regina do Departamento de Bioquímica pela colaboração na separação da enzima microsomal.

Ao Caetano pela obtenção do espectro da lâmpada fluorescente.

A Neuza M. Barbosa com a qual muito aprendi.

A Maricilda pelo apoio constante e interesse na correção e redação desta tese.

A Maria Aparecida de Souza pela sua colaboração e incentivo.

A Lúcia, Cristina e Edgardo que sempre me ouviram.

Aos colegas do laboratório

Ao Antonio e Siani pela valiosa colaboração.

A Cida e Reni pelo muito que fizeram por mim, durante todos esses anos de convivência principalmente nesta fase, grandes amigas.

A Elza pelo apoio incentivo e amizade.

A Ana e Regina pelo carinho.

A Eliane pelos desenhos.

Enfim a todos os amigos que, de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

I N D I C E

	pag.
RESUMO	
ABSTRACT	
ABREVIACOES UTILIZADAS	
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
I.1 - Bilirrubina	1
1.1 - Formação.....	1
1.2 - Metabolismo	1
1.3 - Hiperbilirrubinemia ,,,.....	3
1.4 - Estrutura e Propriedades da Bilirrubina	5
1.4.1 - Estrutura	5
1.4.2 - Propriedades Físico-Químicas	7
1.4.2.1 - Ligações de hidrogênio intramolecular.	8
1.4.3 - Propriedades Luminescentes	11
1.4.4.- Reação com Reagente Diazo	12
I.2 - Uridinadifosfo-glucuroniltransferase.....	14
1.2.1 - Reação Geral	14
1.2.2 - Propriedades Físico Químicas	15
I.3 - Fototerapia	17
I.4 - Fotorreativação	22
I.5 - Objetivos	23
CAPÍTULO II - PARTE EXPERIMENTAL	24
II.1 - Drogas	24
II.2 - Equipamentos	26
II.3 - Métodos	27
II.3.1 - Soluções	27
II.3.2 - Separação de soro e plasma sanguíneo	28
II.3.3 - Dosagem de soro de albumina humana	

	Pág.
II.3.3 - Dosagem de albumina em soro humano. Pelo Método Verde de Bromo Cresol	30
II.3.4 - Dosagem de Proteína Total Pelo Método Biureto.....	31
II.3.5 - Titulação Fluorescente de Albumina com Bilirrubina	32
II.3.5.1 - Sem Detergente	32
II.3.5.2 - Com Detergente Óxido de dodecildimetilamina.....	33
II.3.5.3 - Titulação Fluorescente de Soro e Plasma com Bilirrubina	33
II.3.6 - Determinação Fluorimétrica da Constante de Associação do Complexo Bilirrubina - Albumina	33
II.3.6.1 - Método de Supressão Fluorescente da Fluorescência intrínseca da Proteína.....	33
II.3.6.2 - Método do Aumento de Fluorescência da Bilirrubina	34
II.3.7 - Obtenção da Enzima Microsomal UDP-Glucuroniltransferase de fígado de ratos.....	34
II.3.8 - Medida da atividade de UDP-Glucuroniltransferase (UDP-GT)	35
II.3.8.1 - Método p-Nitrofenol	35
II.3.8.2 - Método Bilirrubina	36
II.3.9 - Irradiações	37
II.3.9.1 - Irradiação com Lâmpada de Vapor de Mercúrio	37
II.3.9.2 - Irradiação com Lâmpada Fluorescente	37
II.3.9.3 - Irradiação do Complexo BR-HSA ,.....	37

	Pág.
CAPÍTULO III. - RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
III.1 - Espectro de Fluorescência de Bilirrubina	41
III.2 - Efeito do Comprimento de Onda de EXcitação em amostras de soros normais	42
III.3 - Efeito da Concentração do Complexo BR-HSA na Intensidade	42
III.4 - Ligação de BR à HSA	45
III.5 - Efeito do Detergente DDAO na Titulação Fluores cente do Complexo BR-HSA	54
III.6 - Fluorescência do Complexo BR-HSA em soro e, Plasma Sanguíneo	55
III.7 - Curva padrão para BR-T e BR-HSA	56
III.8 - Análise Fluorimétrica de BR-T e BR-HSA Comparada com o Método Diazo em Amostras de Adultos e Crianças	58
III.9 - Efeito da Fototerapia na Análise Fluorimétrica de BR	65
III.10 - Fotorreativação da Enzima UDP-Glucuroniltrans- ferase	65
10.1 - Efeito da Irradiação na Atividade da Enzima Comercial e Microssomal, frente a p-nitrofenol	65
10.2 - Medida da Enzima Microssomal UDP-GT Frente à BR	71
CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO	76
IV.1 - Análise de BR	76
IV.2 - Fotorreativação	79
IV.3 - Aspectos Relevantes e Projeções	81
APÊNDICE I	83
APÊNDICE II	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

RESUMO

Desenvolveu-se um método fluorimétrico rápido e simples para a determinação de bilirrubina total (BR-T) e bilirrubina ligada à albumina (BR-HSA) em soros.

Nesse método utiliza-se cela com geometria de ângulo reto e as análises são realizadas em amostras de soro com alto nível de BR, mantendo-se sempre constante a concentração de HSA. Os valores de BR-HSA são lidos diretamente no fluorímetro com amostras de soro diluído. Os valores de BR-T são lidos após a adição de 0,3% do detergente óxido de dodecildimetilamina (DDAO).

Os resultados das análises de amostras de soro de adultos (10 casos) e de amostras de soro de crianças (20 casos) foram comparado com o método diazo. O coeficiente de correlação entre os níveis de BR-T determinado pelo método fluorimétrico e pelo método diazo para adultos foi de 0,98 e para crianças 0,99. O coeficiente de correlação entre BR-HSA determinada fluorimetricamente e BR-T determinada pelo método diazo foi de 0,97 para adultos e 0,93 para crianças. O valor de $(BR-T) - (BR-HSA) / (BR-T)$ calculado para crianças com e sem fototerapia, mostrou diferenças para ambos os casos. Comparando o nível de BR-T determinado fluorimetricamente em amostras de soro de adultos e crianças, observou-se uma diferença na força da ligação BR-HSA sendo que as amostras de adultos apresentaram maior afinidade.

Nos estudos do efeito da irradiação da enzima microsomal do fígado de ratos, encontrou-se um aumento na atividade frente ao p-nitrofenol e uma inibição frente á BR. Na irradiação de BR-HSA observou-se um aumento na velocidade de conjugação com ácido glucurônico.

ABSTRACT

A rapid and simple fluorimetric method has been developed for determinations of total bilirubin (BR-T) and bilirubin bound to albumin (BR-HSA) sera.

Right angle geometry cells in this method were used and the analyses were performed in samples with high bilirubin levels and constant concentration of albumin. The BR-HSA values were determined directly on a fluorimeter in samples of diluted serum. The BR-T values were determined after addition of 0,3% dodecyldimethylamine oxide detergent (DDAO).

The results of the analysis of adult serum samples (10 cases) and of serum samples from children (20 cases) were compared with the diazo method. The correlation coefficient between the BR-T level determined by the fluorimetric method and that determined by the diazo method for adults was 0,98 and for children 0,99. The correlation coefficient between BR-HSA determined fluorimetrically and the BR-T determined by diazo method was 0,97 for adults and 0,93 for children. The value $(BR-T)-(BR-HSA)/(BR-T)$ for children with or without phototherapy showed differences in both cases. Comparing the BR-T level determined fluorimetrically in samples from adults and children, a difference in the BR-HSA binding strength was observed. The adult sample has higher affinity.

An increase of activity of rat liver microsomal enzyme using p-nitrophenol as substrate was found in photochemical studies. Nevertheless, an inhibition was observed using BR as substrate. In the irradiation of BR-HSA, an increase of glucuronic acid conjugation rate was observed.

ABREVIACOES UTILIZADAS

BR	Bilirrubina
BR-D	Bilirrubina Direta
BR-I	Bilirrubina Indireta
BR-HSA	Complexo Bilirrubina-Albumina
BR-T	Bilirrubina Total
BCG	Verde de Bromo Cresol
BSA	Albumina Bovina
DDAO	Óxido de dodecildimetilamina
G-6-PD	Glucose-6-fosfato desidrogenase
HSA	Albumina Humana
PBS	Tampão fosfato de Sódio 0,01M pH 7,4 0,9% NaCl
TCA	Ácido Tricloroacético
UDP-GA	Uridina-5'-difosfo ácido glucurônico
UDP-GT	Uridina-5'-difosfo-glucuronil transferase.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

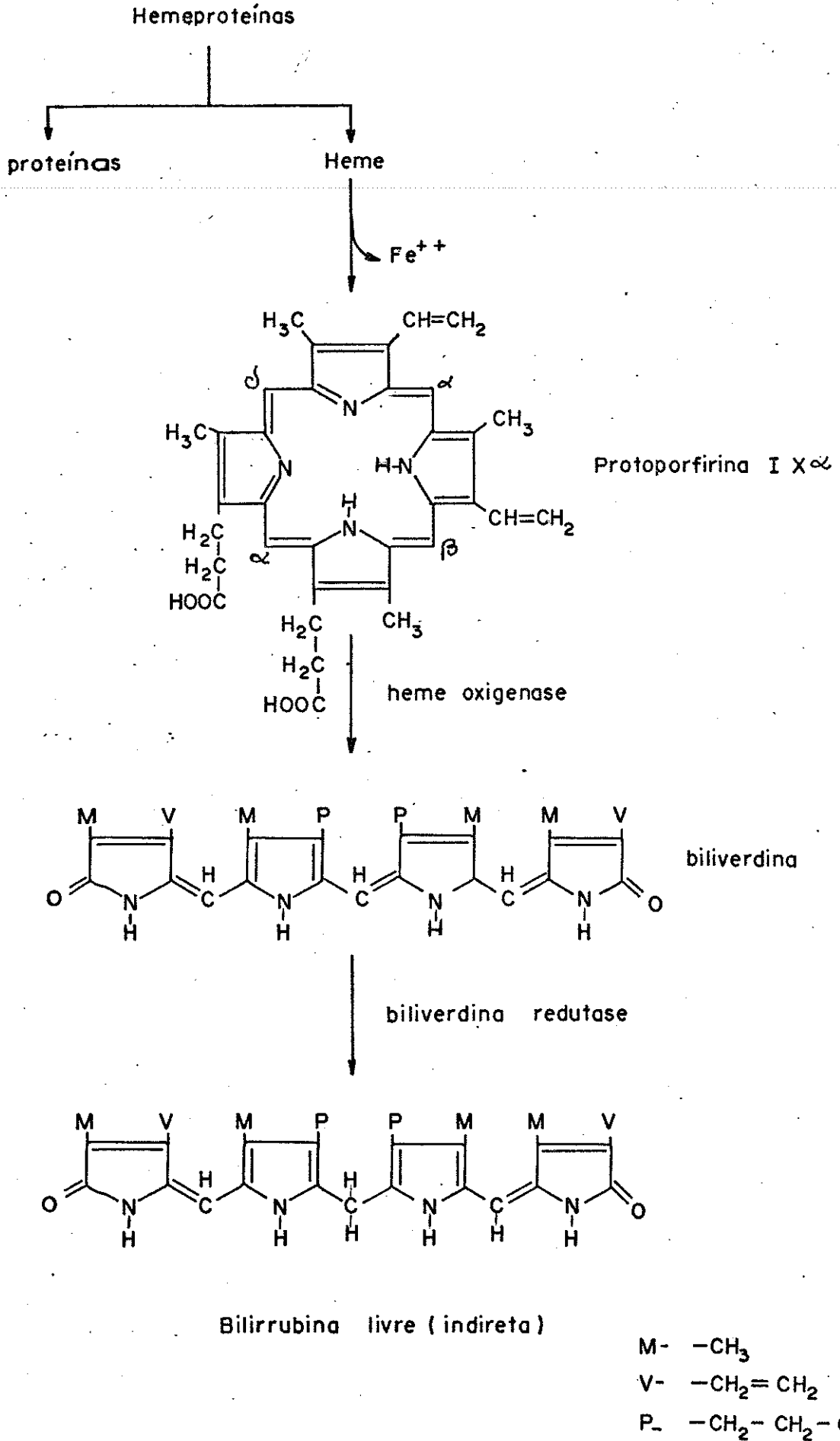
I.1 Bilirrubina

1.1. Formação

A bilirrubina é formada no organismo, principalmente pela degradação da hemoglobina liberada no plasma sanguíneo pela decomposição de eritrócitos. A hemoglobina é captada pelo sistema retículo endotelial onde o ferro e a proteína são liberados, e, reaproveitados. O grupo heme é metabolizado à bilirrubina. A conversão do heme em bilirrubina se processa pela cisão da ponte α meteno do anel porfirínico. A enzima heme oxigenase catalisa aerobicamente a conversão do heme em biliverdina e, a biliverdina converte-se em bilirrubina, pela ação de biliverdina redutase (esquema I). A BR não é reaproveitada pelo organismo, podendo exercer efeitos tóxicos. Portanto, a eliminação deste composto torna-se um importante processo fisiológico.

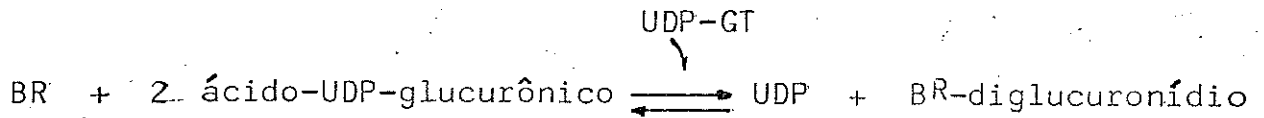
1.2. Metabolismo

O pigmento amarelo BR, é praticamente insolúvel em meio aquoso (1,2), solúvel em lipídios e, com grande tendência a produzir soluções supersaturadas ou colóides (2). No entanto, sua hidrossolubilidade é aumentada pela ligação com a albumina. Ligada à albumina a BR é transportada através do sangue até o fígado. No fígado, a BR é conjugada com o ácido-UDP-glucurônico pela ação da enzima UDP-glucuroniltransferase formando-se um diglucu-



ESQUEMA I.

ronídeo de BR solúvel em água. Conforme equação(1.)

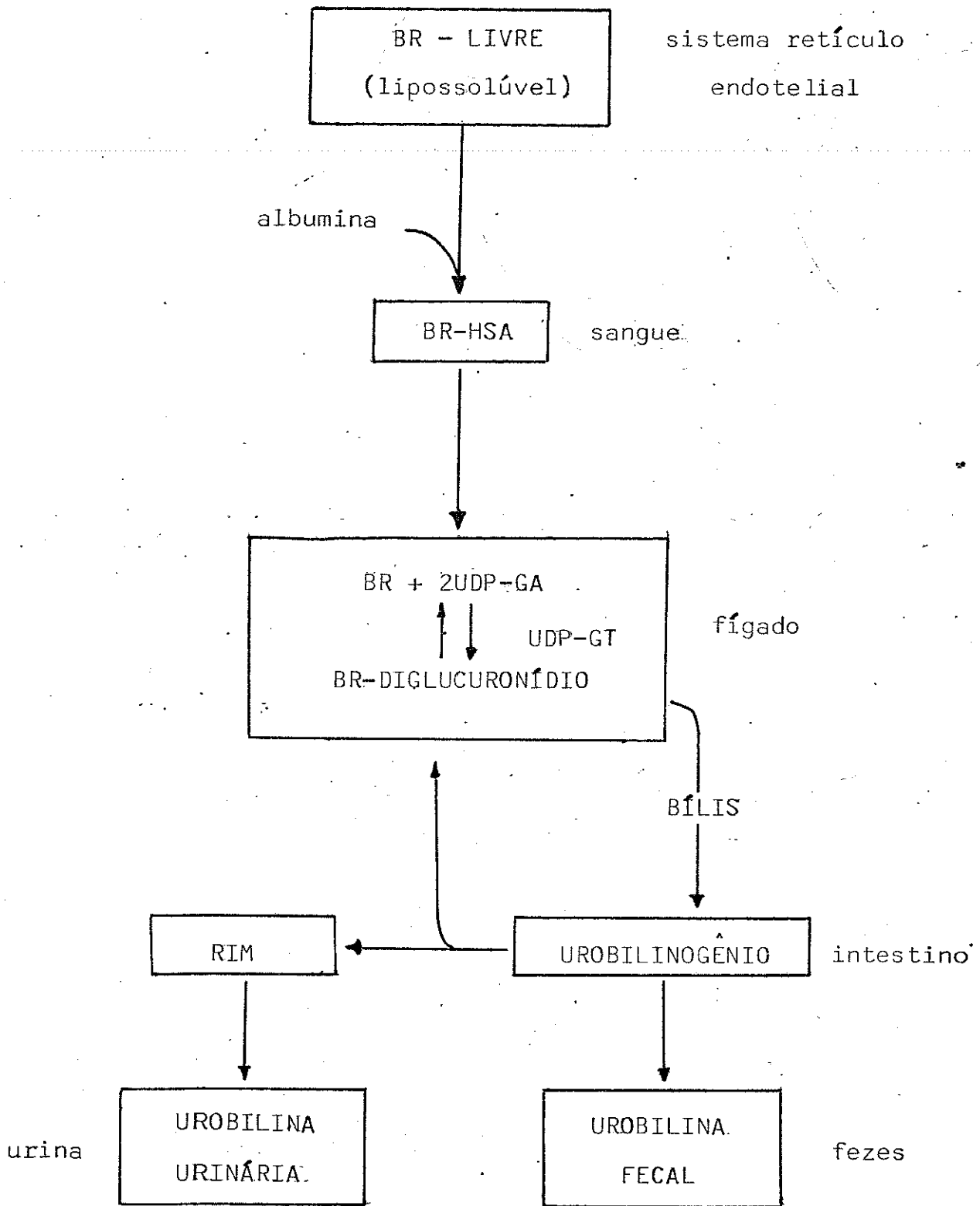


(eq. 1)

O diglucuronídeo de BR solúvel é secretado pelo fígado na bile. No intestino, a flora bacteriana reduz a BR conjugada a urobilinogênio, a qual é excretada como urobilina fecal. Uma parte do urobilinogênio é removido do intestino para o fígado e rins através da corrente sanguínea de onde são excretados na bile e na urina na forma de urobilina urinária. Todas estas vias se encontram, resumidas no esquema II.

1.3. Hiperbilirrubinemia

Hiperbilirrubinemia pré-natal, também conhecida como icterícia do recém-nascido, é o aumento da BR na corrente sanguínea no período compreendido entre os dois últimos dias de vida intra-uterina e os primeiros dias posteriores ao parto. Acredita-se que isto ocorra devido à inabilidade da criança para conjugar e excretar a BR na mesma velocidade em que é produzida. Isto leva a um acúmulo do pigmento amarelo BR, na pele, gordura e órgãos do corpo elevando a sua concentração no plasma sanguíneo. O grau mais significativo de hiperbilirrubinemia é causado por doenças hemolíticas no recém-nascido devido à incompatibilidade do grupo sanguíneo da mãe e do feto. Causas menos comuns de hiperbilirrubinemia são também conhecidas como deficiência congênita da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD) e deficiência congênita



ESQUEMA II . Metabolismo de BR

da enzima do fígado uridina-difosfoglucuronil transferase (UDP-GT):

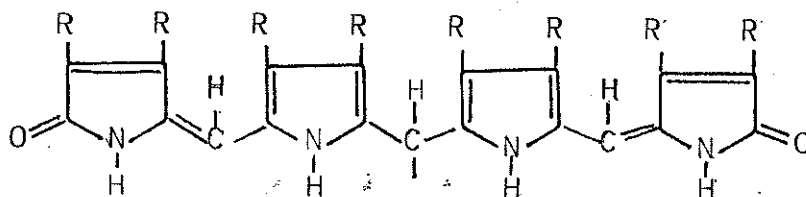
Seja qual for a causa de hiperbilirrubinemia, o efeito de níveis de BR acima de 9 mg/dl de soro em crianças imaturas (3,4) e acima de 15 mg/dl de soro em crianças maduras (5) são potencialmente danificantes, pois o pigmento é capaz de transpor a barreira cerebral desencadeando uma lesão irreversível do sistema nervoso central com conseqüências sumamente graves. Resulta-se então, uma síndrome chamada "Kernicterus", caracterizada por alta mortalidade ou grave déficit mental e paralisia nos que sobrevivem.

Este tipo de enfermidade, obriga o neonatólogo a seguir a evolução do paciente icterico mediante controles laboratoriais e, baseando-se nos resultados, adotar medidas preventivas adequadas como a fototerapia, quimioterapia ou transfusão sanguínea como medida mais enérgica.

1.4. Estruturas e Propriedades da Bilirrubina

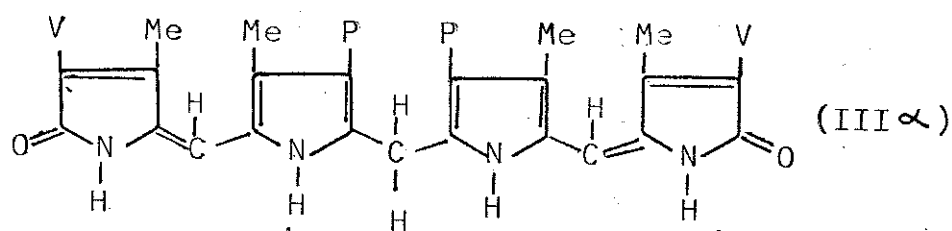
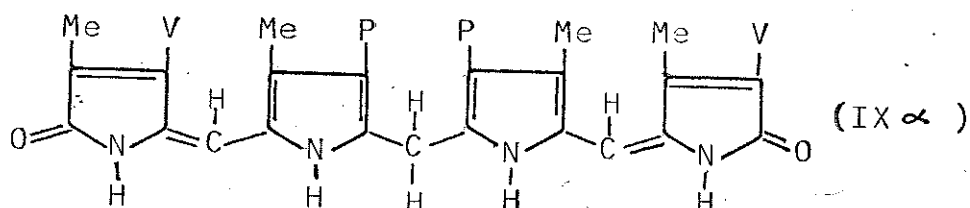
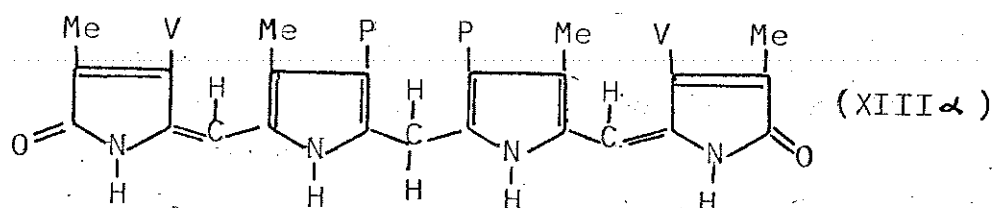
1.4.1 Estrutura

A BR é constituída de uma série de isômeros estruturais tetrapirrólicos de cadeia aberta com várias duplas ligações conjugadas, as quais explicam sua hidrossolubilidade e seu caracter cromóforo. Sua fórmula geral é:



onde R pode ser: Metil (Me); Vinil (V); ou
ácido propiônico (P)

Isômeros



Considera-se que somente o isômero IX α é formado no organismo. No entanto, todos esses isômeros são generalizados como BR nos meios biológicos, médicos e químicos. Contudo, Janser e col. (6) mostraram que o soro sanguíneo de crianças com icterícia contém somente 62 a 70% de BR IX α , 10 a 19% de BR III α e 16 a 20% de XIII α .

1.4.2 Propriedades físico químicas

Conforme visto, a BR possui dois grupos carbonílicos amida e, dois grupos carboxilas portanto, o pH do meio é importante para sua solubilidade no meio aquoso como pode ser visto pelos dados de Brodersen (7) (fig.I.1).

Hidróxido de sódio 0,1M, hidróxido de potássio, carbonato de sódio são ótimos para dissolver a BR. Quando soluções de BR são neutralizados, ocorre formação de colóides. Em soluções ácidas BR é quase insolúvel.

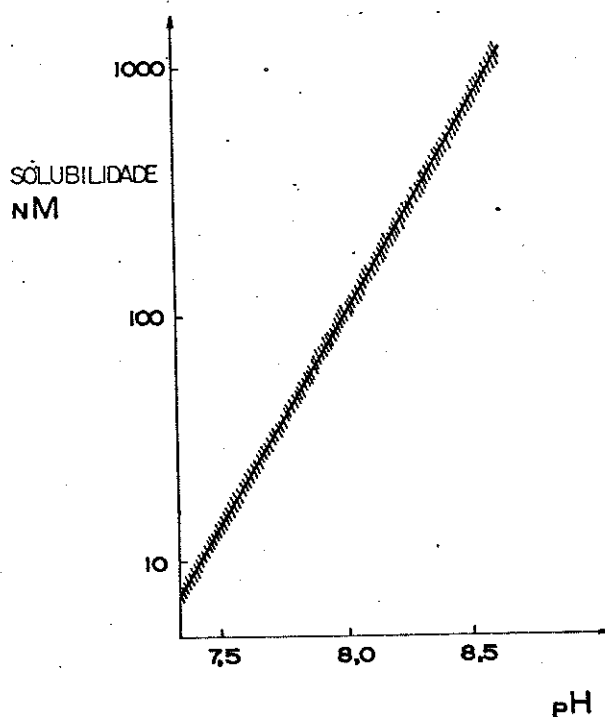


Fig.I.1 Solubilidade de BR com variação do pH, 37°C, força iônica 0,15M (7).

Solventes apolares, tais como hexano ou ciclohexano, não dissolvem BR. Geralmente, sua solubilidade aumenta com a polaridade do solvente, como no caso da formamida e dimetilformamida. Na tabela I.1 temos a solubilidade aproximada de BR em vários solventes a 25°C (8).

A solubilidade de BR em soluções aquosas de proteínas, particularmente soro de HSA, é de grande importância, pois a BR ligada à HSA forma complexo bastante estável. No entanto, proteína por si só não solubiliza a BR em soluções aquosas, devido à incapacidade de romper ligações intramoleculares da molécula de BR. Por outro lado, proteínas formam complexos estáveis com BR após a ruptura da ligação intramolecular (9).

1.4.2.1 Ligações de hidrogênio intramolecular

Devido à estrutura polar da molécula de BR, existem alguns grupos capazes de formar pontes hidrogênio, os quais a tornam solúveis em água. No entanto, a BR IX α ácida (fig. I.2) é praticamente insolúvel em água. Esta discrepância é explicada pela

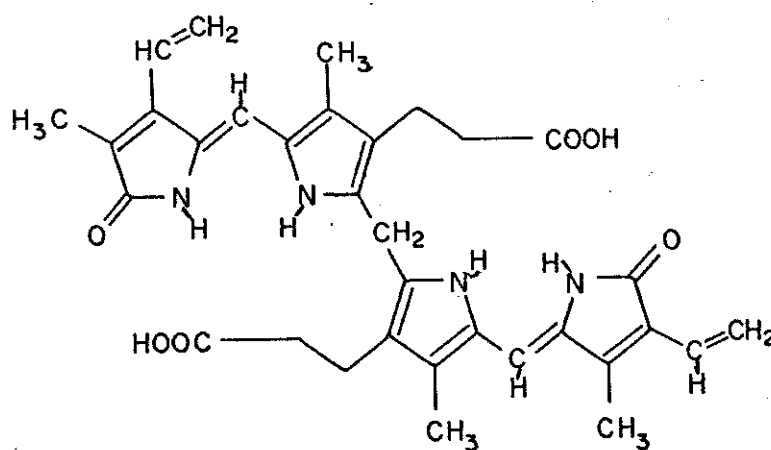
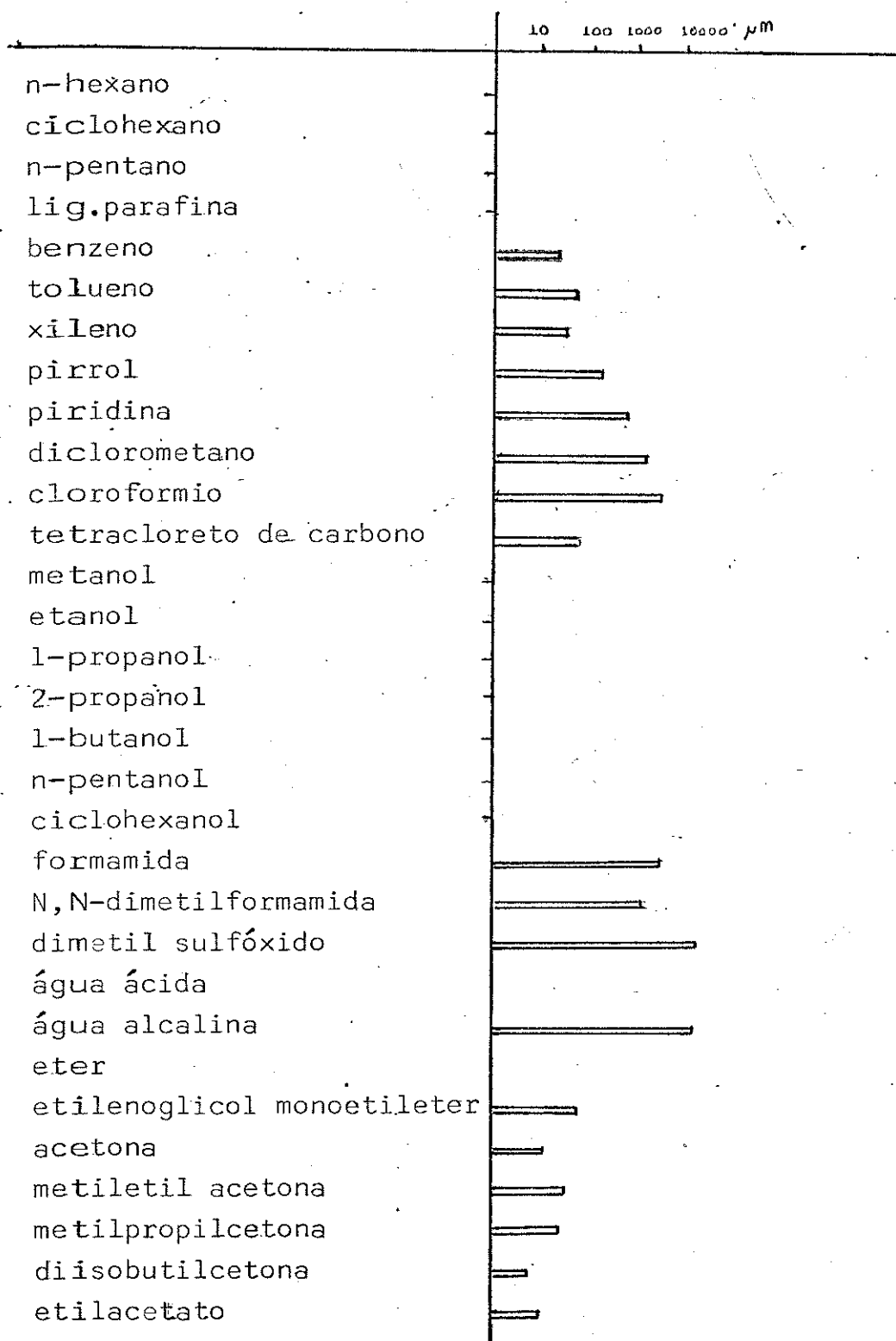


Fig. I.2 BR IX α ácida

Tabela I.1 Solubilidade de BR em vários solventes.
a 25°C (8)



ligação de hidrogênio intramolecular da molécula de BR ácida como mostra a fig. I.3. Em meio alcalino, os dois prótons carboxílicos

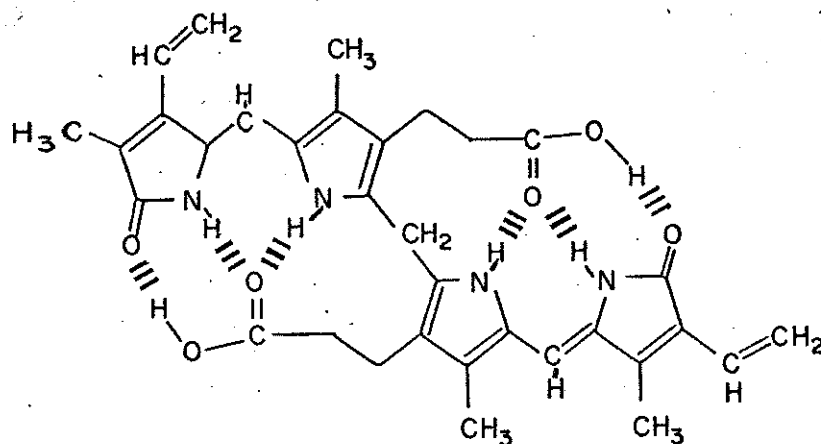


Fig. I.3 BR IX α Ligações de hidrogênio intramolecular

são liberados, e a estrutura é aberta expondo os grupos responsáveis pela ponte de hidrogênio (fig. I.4). A molécula pode, então, formar sais solúveis de sódio ou potássio.

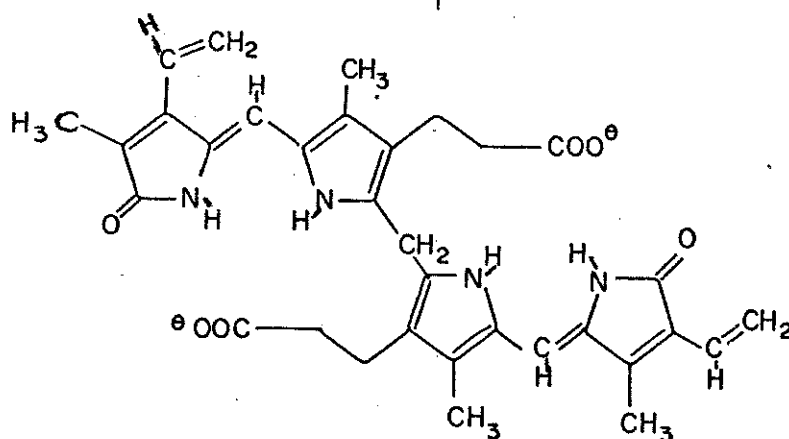


Fig. I.4 BR IX α diânion

A elucidação da estrutura de ligações de hidrogênio intramolecular como uma explicação da insolubilidade de BR ácida, tem contribuído enormemente no entendimento do mecanismo da neurotoxicidade e, também como base para o entendimento do efeito da fototerapia, sobre o qual discutiremos mais adiante.

1.4.3 Propriedades Luminescentes

Um método bastante difundido atualmente no tratamento de hiperbilirrubinemia é a fototerapia. Assim, o conhecimento das propriedades luminescentes de BR torna-se de grande valor para o entendimento da sua fotoquímica e problemas associados com a fototerapia. A BR não apresenta luminescência em solução, a temperatura ambiente. Porém, em 1975 Bonnett e col. (10) observaram uma emissão aproximadamente em 525nm em vários solventes polares a 77K. No mesmo ano, Matheson e col. (11) determinaram o rendimento quântico de fluorescência em etanol a 77K, obtendo o valor de 0,13. Um outro grupo de Bonnett e col. (12), estudando a influência da temperatura na faixa de 215 a 293K sobre a absorção de BR em dicloroetano e dimetilformamida a 450nm, observaram variações espectrais somente para soluções em dimetilformamida, contudo a fluorescência não foi observada para dicloroetano, a mesma temperatura. Foi, então, sugerido que a forma fluorescente de BR é reversível em certos solventes polares, particularmente dimetilformamida, a baixa temperaturas.

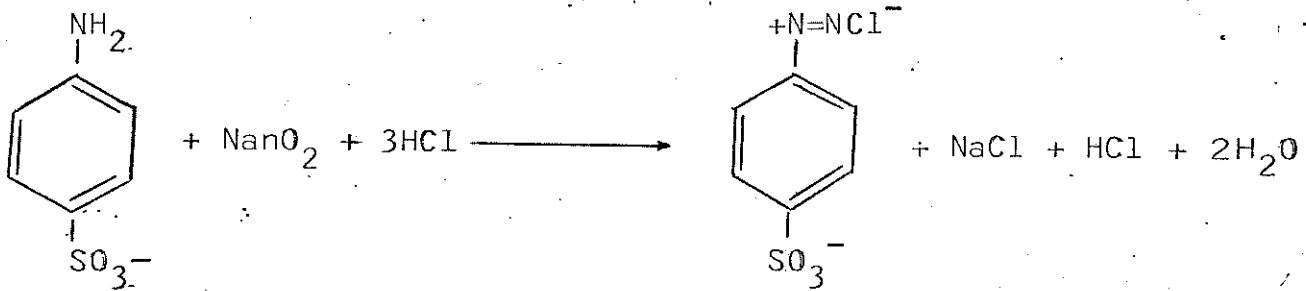
Chen em 1973 (13) observou que quando BR se liga à HSA fluoresce a temperatura ambiente, e, dependendo da origem da albumina, tanto o máximo de emissão como o rendimento quântico de fluorescência variam. Por exemplo, no caso de albumina humana, esses parâmetros são 527nm e 0,0012 e para albumina bovina 546nm e

0,00085.

I.4.4 Reações com reagente diazo

Uma propriedade importante de bilirrubina é a de combinar-se com ácido sulfanílico diazotado (equação 2).

Embora descrita por Ehrlich em 1883 (14) para BR na urina, esta reação é conhecida como reação de Van den Bergh.



ácido sulfanílico

ac. p-diazobenzosulfônico

(equação 2)

O mecanismo da reação postulado produz duas moléculas cromóforas e uma de metanal (15) (fig. I.5).

Van den Bergh (16) aplicando o reativo diazo em plasma icterícos, descobriu que, em meio aquoso ácido, se produziam dois tipos diferentes de reações: com plasma de pacientes com icterícia obstrutiva, a coloração se produzia rapidamente (reação direta) e com plasma de pacientes com icterícia hemolítica a reação ocorria muito lentamente em meio aquoso, mas acelerava ao

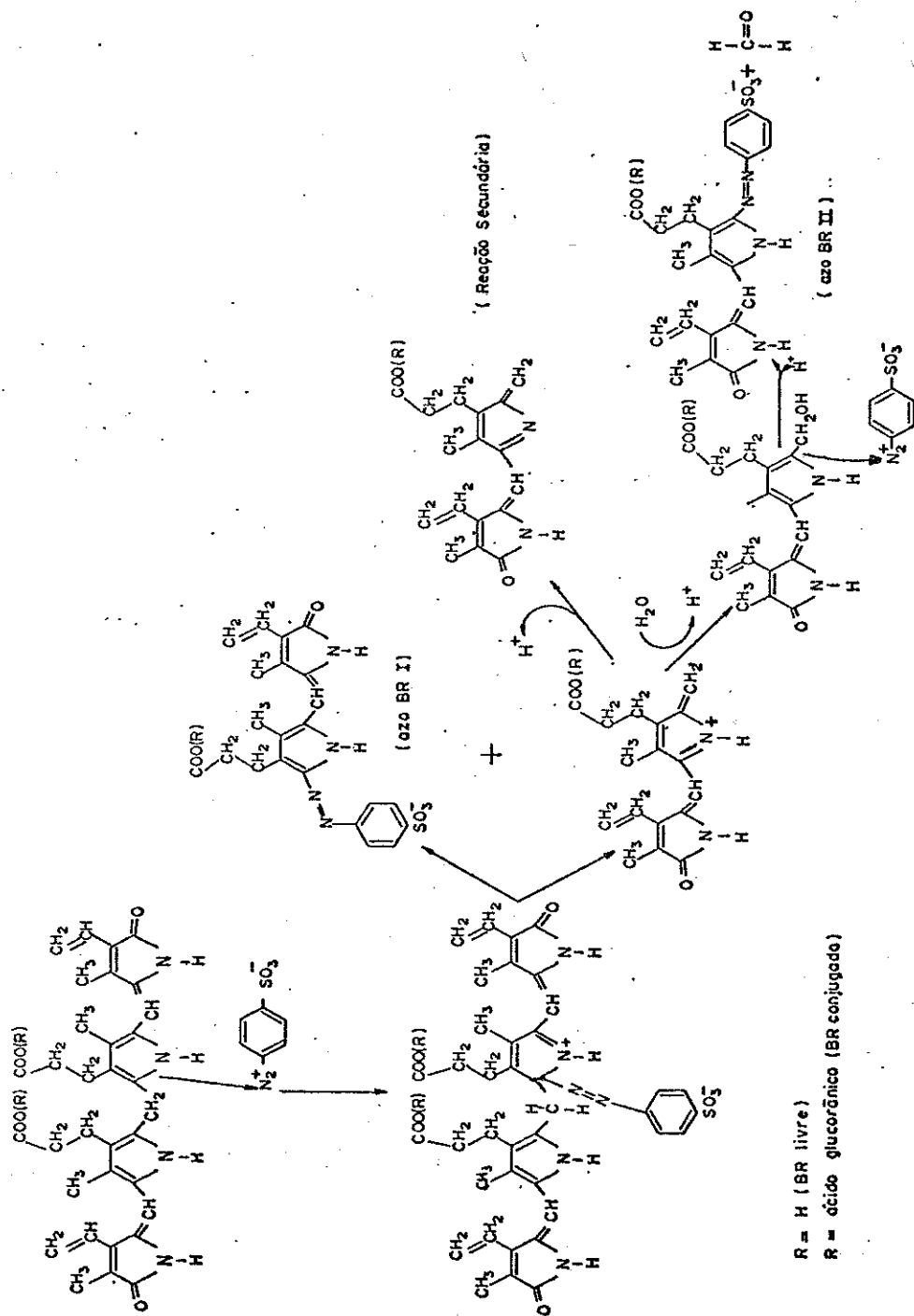


Fig.I.5 Mecanismo de reação de Van den Bergh

adicionar etanol (reação indireta).

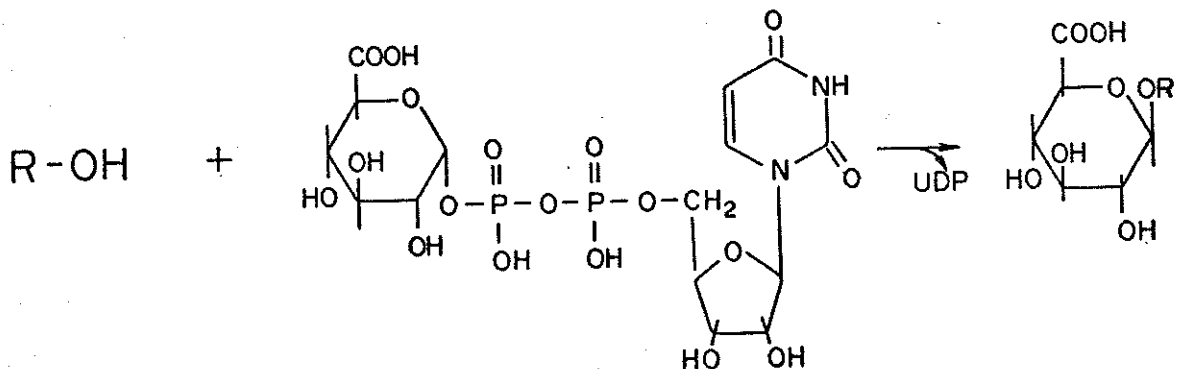
Mais tarde (17,18), descobriram a presença de ácido glucurônico na BR de reação direta. Assim, postula-se que a reação de BR direta é produzida por BR conjugada com ácido glucurônico e a reação indireta por BR não conjugada ou livre.

Este tipo de reação foi rapidamente, utilizada para diagnóstico clínico de níveis de BR.

1.2 Uridinadifosfo-glucuronil transferase (UDP-GT)

Voltando ao esquema II, podemos observar que a enzima UDP-GT, é a chave catalítica na formação de glucuronídeo de BR, transformando-o num composto polar de fácil excreção. Esse processo de conjugação e excreção representa um dos mais importantes mecanismos de desintoxicação humana e da maioria dos mamíferos.

1.2.1 Reação Geral



Apesar do desconhecimento do mecanismo molecular exato, na formação de glucuronídios, a configuração do produto sugere um mecanismo de substituição nucleofílica SN_2 , do grupo UDP resultando na inversão de configuração. Átomos como O, S, e C, sendo nucleofílicos, podem formar ligações glicosídicas. Alguns exemplos são apresentados na tabela I.2. A introdução de resíduos glucuronil, aumenta a polaridade da molécula facilitando assim, sua excreção na bile ou urina. (19)

Na tabela I.2, podemos observar uma diversidade de estruturas do substrato bem como de diferentes compostos glucuronídios. Isto sugere que a enzima transferase é capaz de se ligar seletivamente a uma variedade de moléculas com diferentes formas geométricas e tamanhos, isto é, a enzima é polimórfica, ou seja existe mais do que uma transferase. No entanto, a questão da heterogeneidade das transferases permanece ainda incerta. Em 1970 Mulder (20) sugeriu que essa heterogeneidade aparente da enzima deva ser devido, em parte, a sua localização microssomal.

1.2.2. Propriedades físico-químicas

A UDP-GT foi purificada por Groski e col. (21) na forma de um complexo proteína-fosfolipídio consistindo de uma cadeia polipeptídica simples com peso molecular mínimo de 59000. A composição de aminoácidos indicou que dos 531 resíduos de aminoácidos 48% são polares e 52% são apolares.

Diversos estudos realizados para a purificação de UDP-GT têm demonstrado que a utilização de diferentes detergentes no fracionamento da enzima apresenta diferentes quantidades de fosfolipídios.

Outra propriedade interessante da transferase é a sua

instabilidade em soluções diluídas de proteína. (22)

A especificidade da enzima purificada é absoluta para o ácido UDP-glucurônico. (23)

Tabela I.2' Glucuronídeos representativos em fluídos fisiológicos.

Tipos de glucuronídeos	Aceptores.	
	Grupo funcional	Exemplos
<u>O-Glucuronídeos</u>		
$\begin{array}{c} \\ -\text{C} - \text{O} - \text{C}_1 \\ \end{array}$	fenólicos	p-nitrofenol
$\begin{array}{c} \\ -\text{C} - \text{O} - \text{C}_1 \\ \end{array}$	ác. carboxílico	bilirrubina
<u>N-Glucuronídeos</u>		
$\begin{array}{c} - \text{O} - \text{C} - \text{N} - \text{C}_1 \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{H} \end{array}$	carbamato	meprobamato
$\begin{array}{c} \text{Ar} - \text{N} - \text{C}_1 \\ \\ \text{H} \end{array}$	arilamina	2 naftilamina
<u>S-Glucuronídeos</u>		
$\text{Ar} - \text{S} - \text{C}_1$	arilmercaptano	tiofenol
<u>C-Glucuronídeos</u>		
$\begin{array}{c} \\ -\text{C} - \text{C}_1 \\ \end{array}$	sistema	
	1,3 dicarbonil	fenilbutazona

I.3. Fototerapia

A fototerapia é um método bastante utilizado no tratamento de hiperbilirrubinemia apesar do desconhecimento exato do mecanismo molecular e efeitos colaterais no organismo. A BR é somente um dos muitos compostos no sangue e tecidos do organismo que podem ser afetados por irradiação da luz visível.

O interesse pela fototerapia surgiu em 1958 pelas observações de Cremer e col. (24) o qual registrou que BR em soro de crianças ictericas decompõe-se com luz. Desde então, numerosos estudos foram realizados neste campo (25-31). No entanto, esse, novo-velho tratamento fototerápico ganhou dimensões em meio clínico com a publicação em 1968 por Lucey e col. (31) o qual descreve a eficácia da fototerapia na prevenção de hiperbilirrubinemia em crianças pré maturas. Assim, numerosas unidades fototerápicas foram construídas.

Infelizmente muitas crianças foram irradiadas com unidades fototerápicas de construção inadequada, além disso, na época, pouco conhecimento se tinha do tipo e quantidade de luz e tempo de irradiações ideais.

Na pratica, a fototerapia consiste em um banho de luz na criança com um banco ótico de 8 a 10 lâmpadas fluorescentes , cuja emissão de luz situa-se na faixa do espectro visível de 400 a 490nm e fluência aproximadamente $0,9 \text{ W/cm}^2$ (32). Esta irradiação causa o deslocamento do pigmento amarelo na pele num período de 2 a 3 horas e em casos mais graves no período de 6 horas ou mais.

A eficácia da fototerapia difere dependendo do tipo

de icterícia tratado e, de fatores tais como: comprimento de onda, intensidade da luz, área superficial exposta, e velocidade na qual o produto BR é removido da pele e do sangue.

Diversos mecanismos foram propostos na redução da BR associada com a fototerapia, como por exemplo o mecanismo da destruição oxidativa do pigmento, onde McDonagh (33) apresentou evidência de que a fotooxidação de BR envolve adição autossensibilizada de oxigênio singlete à ligação meteno da BR não conjugada (fig.I.6).

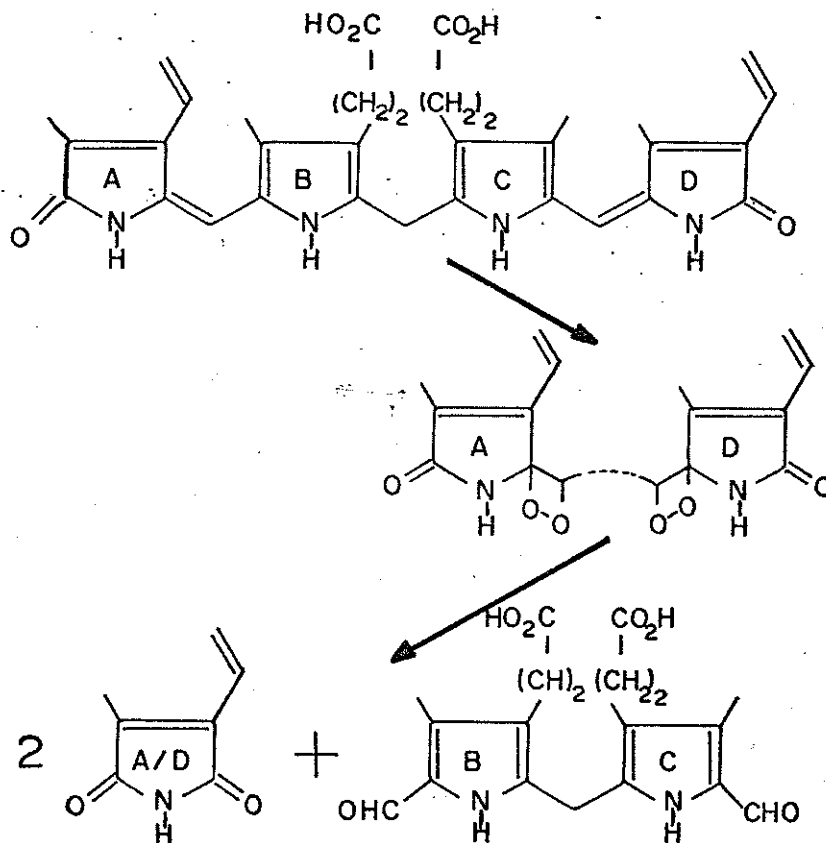


Fig.I.6 Fotooxidação de BR.

Ostrow (34), em seus estudos de fotocatabolismo de BR marcada em ratos Gunn com icterícia congênita, e estudos de Lund e col. (35), na influência da fototerapia no modelo excreção biliar da BR em crianças com hiperbilirrubinemia têm demonstrado quantidades substanciais de BR não conjugada na bile. Este fato e o malogro em encontrar produtos de fotooxidação em excreções de crianças e animais em experimentos após fototerapia, levou-os a abandonar a idéia de que a fôto-degradação é o mecanismo mais importante (36,37). Na ausência da luz, a excreção de BR é insignificante. O segundo mecanismo proposto é a fotoisomerização da BR a um composto polar, solúvel em água e de fácil excreção. Assim, os trabalhos de Ostrow e col. (34, 38-39) e Lightner, McDonagh e col. (40-43) fornecem evidências conclusivas que BR IX α (o isômero Z,Z), sofre fotoisomerização em uma das duplas ligações meso ou em ambas (fig.I.7) para uma conformação menos lipofílica e com menos ligações intramoleculares de hidrogênio produzindo os isômeros: 5E,15E; 5Z,15E; 5E,15Z (fig.I.8).

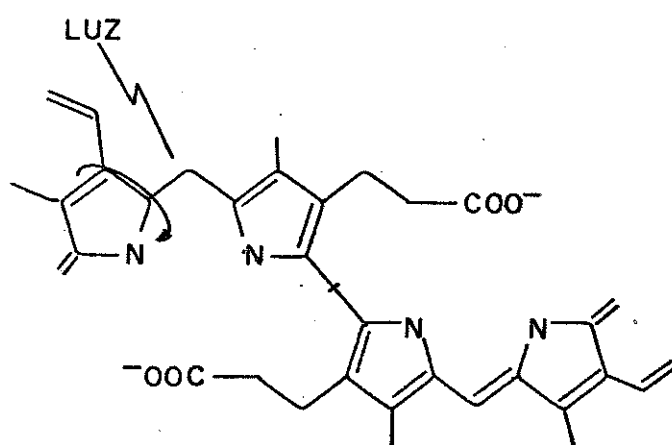


Fig.I.7 Conversão de BR IX α a PBR IX α

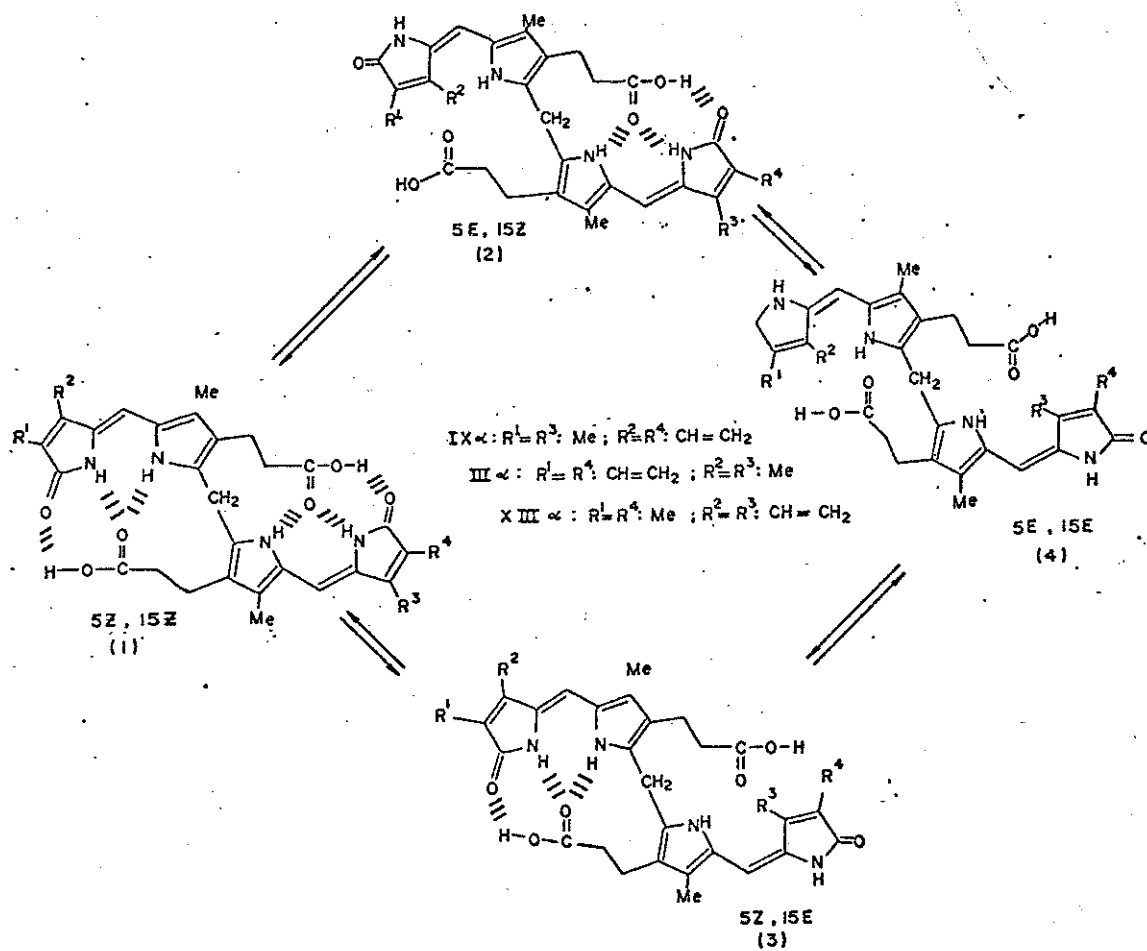


Fig.I.8 Fotoisomerização configuracional de BR IX α e seus isômeros.

Segundo McDonagh e col. (36), um provável mecanismo na excreção de BR durante a fototerapia é a incidência da luz na superfície da pele onde se encontra a BR, produzindo uma excitação fotoquímica de BR, produzindo fotobilirrubina (PBR). Esta substância pode migrar através da membrana plasmática para o sangue, onde se liga com a albumina e levada para o hepatócito. Quando o sistema de conjugação não funciona, somente a molécula mais polar (PBR), a qual não requer conjugação para excreção devido a suas características polares, passa para dentro da bile, fig.I.9

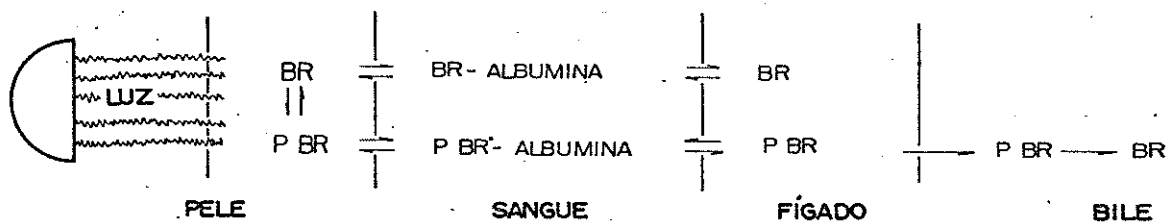


Fig.I.9 Mecanismo da excreção de BR durante fototerapia de um recém-nascido icterico (BR= 5Z,15Z bilirrubina IX α ; PBR= fotobilirrubina) (36)

Um outro efeito da luz possível é a fotorreativação da enzima UDP-GT, que se encontra em baixa atividade no recém-nascido e que está impossibilitada de conjugar BR a diglucuronídeo de BR (44-46), que é excretado via urina -fezes.

Year e col. (47), demonstraram, preliminarmente que a exposição de microsomas hepáticos de ratos ictericos e não ictericos à lâmpada fluorescente (luz azul) aumentou signifi

cativamente a atividade da enzima UDP-GT, Sisson e col. (48) , demonstraram também o efeito da luz na atividade das enzimas do fígado de ratos perfusados.

I.4 Fotorreativação

Com a descoberta da radiação ultravioleta UV, no início do século passado e com progressivas aplicações da ciência física à biologia, tornou-se evidente que radiação UV pode produzir danos nos componentes celulares. No entanto, com o trabalho pioneiro de Kelner (49) e Dubbeco (50), foi comprovado que esses efeitos podem ser parcialmente revertidos por subsequente irradiações com maiores comprimento de onda (FOTORRETIVAÇÃO). Assim a fotorretivação seria uma recuperação, como definido por Jagger (51) de um cromóforo na molécula, ou parte dessa, que absorve a radiação efetiva num dado processo.

Os efeitos da fotorreativação são usualmente obtidos com comprimento de onda que variam de 310-490nm ("luz fotorreativante). A eficácia relativa a diferentes comprimento de onda pode variar de organismo para organismo.

I.5 Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo, desenvolver um método fluorimétrico para a análise de BR-T e BR-HSA o qual utilizaria pequenas alíquotas de sangue como amostra, pois, há uma grande dificuldade em se obter amostras de sangue de recém-nascidos com hiperbilirrubinemia. O método desenvolvido neste trabalho é uma adaptação do método de Lamola e col. (52), explorando-se a propriedade fluorescente de BR ligada à HSA ou em micelas do detergente óxido de dodecildimetilamina (DDAO). Além disso, pretende-se comparar os valores obtidos com os do método convencional.

A BR não é o único composto afetado por fototerapia. Outros componentes do organismo podem ser alterados por luz visível (32). Considerando as observações de Years (47) e Sisson e col. (48) no efeito da fotorreativação da enzima UDP-Glucuroniltransferase do fígado de ratos no qual se usa p-nitrofênol como substrato, torna-se importante verificar, também, o efeito da irradiação sobre a enzima microssomal do fígado de ratos frente a sua afinidade com a BR, uma vez que BR é o substrato endógeno mais importante para a enzima. Além disso, verifica-se o efeito do fotoisômero BR/HSA na atividade enzimática.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

II.1. Drogas

Nome	Procedência
Acetato de etila	Carlo Erba
Ácido acético	CAQ
Ácido clorídrico	Queel
Ácido etilenodiaminotetracético	Merck
Ácido láctico	Carlo Erba
Ácido succínico	Carlo Erba
Ácido sulfanílico	Carlo Erba
Ácido tricloroacético	Carlo Erba
Albumina bovina	Sigma
Albumina humana fração V	Sigma
Bilirrubina	Sigma
Brij-35	Sigma
Cloreto de magnésio	Reagen
Cloreto de sódio	Carlo Erba
Clorofórmio	Merck
Fosfato monobásico de sódio	Carlo Erba
Fosfato bibásico de sódio	Carlo Erba
Hidróxido de amônia	Merck
Hidróxido de sódio	Carlo Erba
Hidróxido de potássio	Merck
Iodeto de potássio	Merck
Lubrol PX	Sigma
Nitrito de potássio	Merck

Nitrito de sódio	Queel
Óxido de dodecildimetilamina	Klingler S.A.
p-Nitrofenol	Merck
Sulfato de cobre	Carlo Erba
Tartarato de sódio e potássio	Ecibra
Trietanolamina	Carlo Erba
Tris hidroximetil aminometano	Carlo Erba
Uridina-5'-difosfo ácido glucurônico- sais de sódio e amônia	Sigma
Uridina-5'-difosfo-glucuronil transferase tipo III	Sigma

II.2. Equipamentos

As leituras de pH das soluções tampão foram determinadas no potenciômetro METROHAM HERISAU modelo E 512.

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica METTLER H 54 AR.

Os valores de absorbância, em comprimento de onda fixo, foram determinados no espectrofotômetro ZEISS PMQ II.

Os espectros de absorção foram registrados em um espectrofotômetro ZEISS DMR 21.

Os espectros de fluorescência foram registrados em um espectrofluorímetro MPF-44B, da HITACHI-PERKIN ELMER, a 25°C.

As irradiações foram efetuadas utilizando-se como fonte de luz dois tipos de lâmpadas:

- 1) lâmpada de vapor de mercúrio, 125 Watts (OSRAM HQ-L), selecionando-se a emissão na região de 400-500 nm através de um sistema de filtro ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}(\text{NH}_4\text{OH}) : \text{KNO}_2$) (fig. II-1) (53);
- 2) lâmpada fluorescente, 15 Watts (OSRAM KHU).

As medidas da velocidade de fluência foram determinadas com Radiometer YSI-KETLERING modelo 65A.

A separação do soro foi efetuada em uma centrífuga ECELSA 2, modelo 205N.

A precipitação de proteínas foi efetuada em uma centrífuga BECKMAN TMB.

A separação da fração microssomal foi efetuada com ultracentrífuga da IEC modelo 20A, rotor tipo D 185 e ultracentrífuga da BECKMAN modelo LS 65, em um rotor tipo TY 40 a temperatura de 0°C-4°C.

II.3. Métodos

II.3.1. Soluções

Tampão

Na preparação de soluções tampão foram utilizadas as tabelas de Gomori (54).

Bilirrubina (PM = 584,65)

Usou-se este composto sem posterior purificação. A solução de bilirrubina foi preparada pela diluição da solução estoque (0,6 mg/ml em 0,2M NaOH e 0,1M EDTA) em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M pH 7,4 e NaCl 0,9%, corrigindo-se sua concentração espectrofotometricamente ($\epsilon = 47200$ a λ 438nm) (52).

A solução foi preparada e mantida no escuro para evitar sua fotooxidação à biliverdina. A solução foi renovada a cada experiência, utilizando-se no limite de três horas.

Albumina

O peso molecular da albumina humana é considerado como 69000 e da albumina bovina como 67000. Preparou-se cuidadosamente uma solução estoque cuja concentração foi determinada espectrofotometricamente seguindo a seguinte equação:

$$\text{concentração (mg/ml de proteína)} = 1,55(DO_{280}) - 0,760(DO_{260}) \quad (55).$$

Esta equação se baseia no princípio de que a maioria das proteínas apresenta um máximo de absorção característico, a 260 nm, devido principalmente a tirosina, triptofano e fenilamina. A diferença de absorção é utilizada para minimizar os erros resultantes de compostos não protéicos existentes na solução, como no caso de preparações parcialmente purificadas conter ácidos nucleicos

que apresentam um máximo de absorção a 260nm.

UDP-ácido glucurônico (PM = 580,3)

A solução estoque foi preparada pela dissolução de uma massa adequada em água. Sua concentração foi calculada espectroscopicamente usando-se $\epsilon = 8,1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 261nm (56), e diluiu-se em tampão tris-acetato 0,25M pH 7,5 a um volume adequado, para dar uma concentração de 50 mM.

UDP-glucuroniltransferase

A solução estoque da enzima comercial foi preparada em tampão tris-acetato 50mM pH 7,5. Sua concentração em mg/ml de proteína foi calculada pelo método biureto descrito no item II.3.4.

p-Nitrofenol (PM = 139,11)

A solução estoque foi de 3mM, sendo preparada pela dissolução de uma massa adequada em água. A concentração foi determinada espectrofotometricamente usando-se $\epsilon = 1,81 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ a 400nm e em pH maior que 10 (57). Devido a sua sensibilidade à luz, a solução estoque foi conservada no escuro.

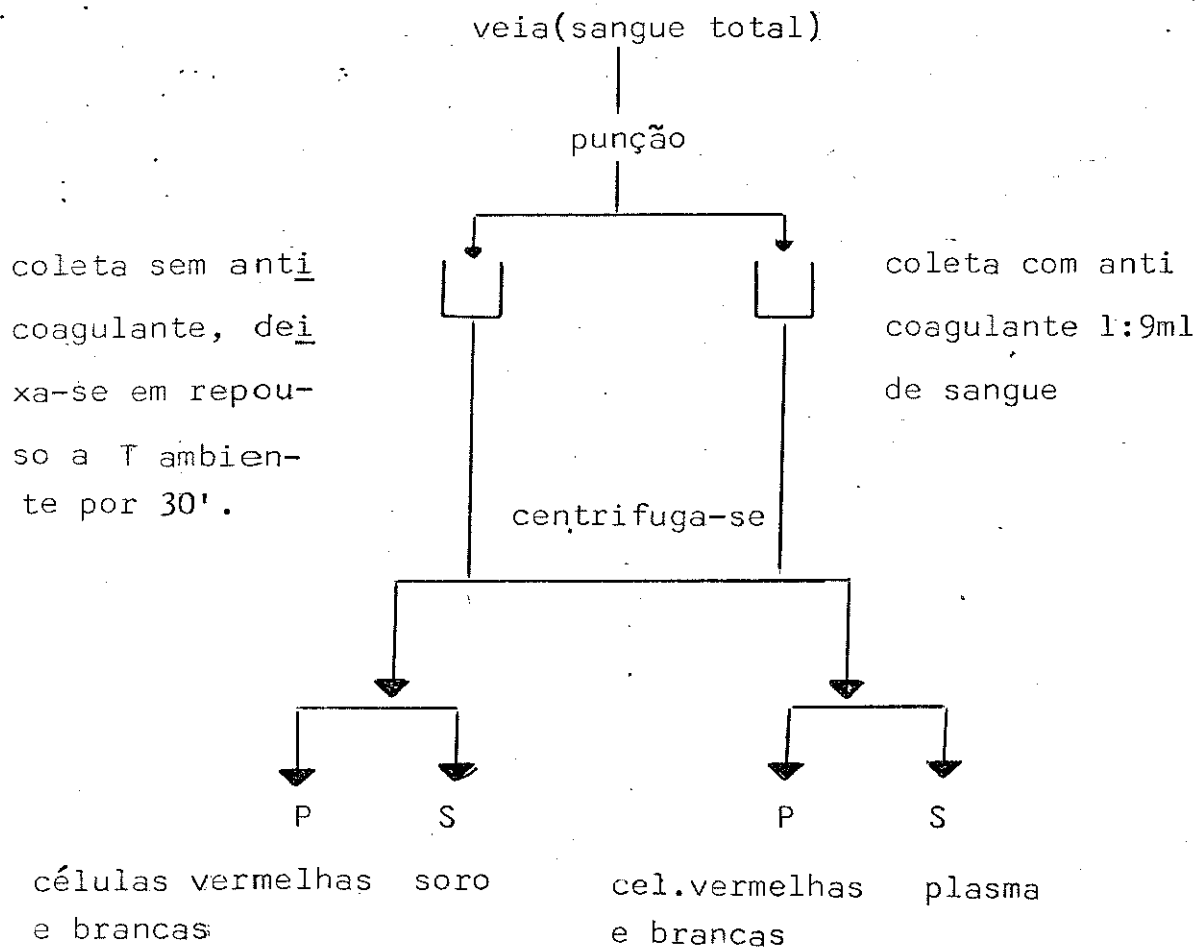
Verde de bromo cresol (BCG) (PM = 680,9)

A solução estoque de 0,60mM foi preparada pela dissolução da massa adequada em hidróxido de sódio 0,01N. Para preparar o corante BCG diluiu-se um volume da solução estoque de BCG com 3 volumes de tampão succinato 7,5mM pH 4,2, adicionou-se 5 ml de brij(35) 30% por litro, e ajustou-se cuidadosamente a pH 4,2 com ácido clorídrico 1N.

II.3.2. Separação de Soro e Plasma Sanguíneo

O sangue é constituído de: elementos sólidos ou elementos figurados e plasma. Os elementos figurados constituem-se de: glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas. O plasma é o componente líquido do sangue, podendo ser obtido por centrifugação do sangue, cuja coagulação foi impedida pela adição de anticoagulante. Quando o sangue se coagula, o líquido que se origina depois de separar o coágulo, se denomina soro. A diferença fundamental entre o soro e o plasma consiste em que este último perde o fibrinógeno proteico, que se converte em filamentos insolúveis de fibrina no curso da coagulação.

Seguiu-se portanto o seguinte esquema na separação de plasma e soro:



A concentração de albumina no soro e plasma sanguíneo foi determinada pelo método BCG, conforme descrito em seguida.

II.3.3. Dosagem de albumina em soro humano pelo método Verde de Bromo Cresol

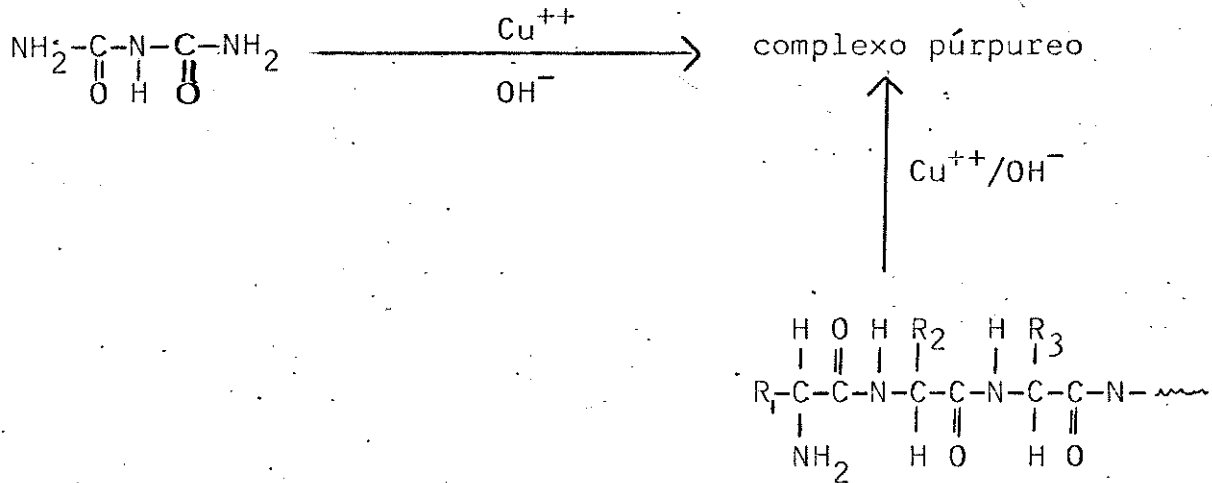
Verde de bromo cresol é um corante específico para albumina. A adição de albumina em soro à solução de BCG em tampão succinato 7,5mM pH 4,2, resulta no aumento da absorção em 628nm. Usou-se detergente não iônico Brij para reduzir a absorbância do branco, evitando a turbidez da solução e aumentando a linearidade da curva padrão. O procedimento segundo Doumas e col. (58) é o seguinte:

Adiciona-se 25 μ l de soro a 2,5ml da solução corante BCG. Mistura-se rapidamente e deixa-se em repouso por 10 minutos a 37°C. Mede-se a absorbância a 620nm ajustando-se o zero com solução corante BCG. A concentração de albumina no soro é obtido a partir do gráfico absorbância versus concentração (curva padrão). Utilizou-se como solução padrão albumina V (HSA V) (20 g/dl). O procedimento para a construção da curva padrão é dado conforme o quadro abaixo:

Tubos	branco	1	2	3	4	5
HSA-V(20g/dl)						
vol. (μ l)	10	20	25	30	40	50
corante BCG(ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,4	2,5
H ₂ O (μ l)	90	80	75	70	60	50
A 620nm	0,24	0,44	0,51	0,59	0,76	0,88
HSA g/dl	2	4	5	6	8	1,0

II.3.4. Dosagem de Proteína total pelo método Biureto

O princípio deste método se baseia na reação de Cu^{++} com compostos contendo duas ou mais ligações peptídicas em um meio alcalino, fornecendo complexos púrpúreos com um máximo de absorção a 540nm.



O reagente biureto foi preparado segundo Layne (55) da seguinte maneira: dissolveu-se 1,5g de sulfato de cobre (PM = 159,5), 6g de tartarato de sódio e potássio (PM = 282,23), e 0,1% de iodeto de potássio em 0,5l de água destilada. Adicionou-se sob agitação constante 300ml de hidróxido de sódio 10% (PM = 40) recém preparado. A seguir completou-se o volume para 1 litro com água destilada e guardou-se num frasco parafinado ao abrigo da luz.

A solução de albumina humana fração V (10mg/ml) foi utilizada como solução padrão.

Para a construção da curva padrão procedeu-se conforme o quadro abaixo:

Tubos	branco	1	2	3	4	5
mg/dl de prot.	0	1	2	3	4	5
V.HSA (ml)	0	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
sol.biureto (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
H ₂ O (ml)	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0

Em seguida, deixou-se em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente, e leu-se a absorvância a 540nm, contra o branco. Projetou-se os resultados graficamente, colocando as concentrações no eixo das abcissas e as absorvâncias no eixo das ordenadas, obtendo-se então uma reta. Para se determinar a concentração de uma solução desconhecida, mede-se a absorvância e verifica-se na curva padrão qual a concentração correspondente à absorvância encontrada.

II.3.5. Titulação Fluorescente de Albumina com Bilirrubina

II.3.5.1. Sem detergente

0,6ml da solução de albumina $2,6 \times 10^{-5}M$ foi colocado em uma cela triangular de quartzo de 0,5cm de caminho ótico. Alíquotas de 20 μ l de BR variando a concentração efetiva de $3,4 \times 10^{-6}M$ a $8,5 \times 10^{-5}M$, foram adicionadas com microseringa a cada titulação. Após 2 minutos, o espectro de emissão a 530nm com excitação em 455nm foram registrados.

Considerando que a titulação fluorescente envolve múltiplas leituras em uma amostra, a fotodecomposição torna-se um grande problema. Isto foi evitado preparando-se amostras individuais com concentrações crescentes do titulante BR. Todo experimento envolvendo BR foi efetuado em ambiente escuro.

II.3.5.2. Com o detergente óxido de dodecildimetilamino

Após proceder da mesma maneira como citado acima na preparação da amostra, adicionou-se $6\mu\text{l}$ do detergente DDAO 30%. Agitou-se bem e deixou-se em repouso durante 5 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Registrou-se, então, o espectro de emissão nas mesmas condições.

II.3.5.3. Titulação Fluorescente de Soro e Plasma com bilirrubina

Determinada a concentração de albumina no soro e no plasma pelo método BCG, diluiu-se em tampão PBS para obter a concentração de $2,6 \times 10^{-5}\text{M}$. Em seguida, realizou-se a titulação fluorescente da mesma maneira como descrito acima com e sem o detergente...

II.3.6. Determinação Fluorimétrica da Constante de Associação do Complexo Bilirrubina-Albumina

II.3.6.1. Método de supressão fluorescente da fluorescência intrínseca da proteína

Utilizou-se o método de Chen (13). A ligação de BR é acompanhada pela perda da fluorescência intrínseca da proteína. Assim, titulações fluorescentes foram realizadas em três diferentes concentrações de HSA: $3,7 \times 10^{-7}\text{M}$, $1,3 \times 10^{-6}\text{M}$ e $2,6 \times 10^{-5}\text{M}$. Variou-se também a concentração de BR da ordem de $2,6 \times 10^{-7}$ a $4,0 \times 10^{-6}\text{M}$; $4,2 \times 10^{-6}$ a $8,5 \times 10^{-5}\text{M}$ e de $1,4 \times 10^{-5}$ a $1,4 \times 10^{-4}\text{M}$. As amostras foram preparadas individualmente para cada medida. O espectro de emissão foi obtido a 340nm com excitação a 290nm.

II.3.6.2. Método do aumento de fluorescência da bilirrubina

Este método é utilizado, considerando que a albumina possui mais do que um sítio de ligação para BR. Assim, procedeu-se segundo o método descrito por Chignell (59), realizando-se duas titulações:

- a) fixou-se a concentração de BR ($1,5 \times 10^{-5}M$) e titulou-se aumentando a concentração de albumina ($2,7 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-5}M$), até não observar mais o aumento na intensidade de fluorescência (λ ex 455nm, λ em 520nm);
- b) a segunda titulação fluorescente, foi realizada fixando-se a concentração de albumina ($1,5 \times 10^{-5}M$) e variando a concentração de BR ($8,5 \times 10^{-5}$ a $2,1 \times 10^{-5}M$).

II.3.7. Obtenção da Enzima Microsossomal UDP-glucuronil transferase' de Fígado de Ratos

Esta enzima microsossomal foi obtida pelo método de Burchell e col. (60) modificado da seguinte maneira: três ratos de dois meses foram deixados em jejum por uma noite. Após sacrificar os animais, retirou-se os fígados que foram picados, lavados em três volumes de sacarose 0,25M. Homogeneizou-se 12 vezes por 2 minutos cada, com homogeneizador teflon/glass. A homogeneização e todos os passos subsequentes foram realizados entre 0-4°C. Este homogenato foi centrifugado por 5 minutos a 5000g, o precipitado P₁ foi resuspenso em tampão e centrifugado novamente por 5 minutos a 5000xg. Reuniu-se os dois sobrenadantes S₁ e S₂ e centrifugou-se por 10 minutos a 10000xg. O sobrenadante S₂ foi centrifugado por 60 minutos a 105000xg. O "pellet" microsossomal foi resuspenso em tampão tris-acetato 0,05M pH 7,5, homogeneizado. Para uma purificação parcial da

da enzima solubilizou-se em 1% de lubrol PX e centrifugou-se a 105.000xg por 60 min, o precipitado foi descartado.

II.3.8. Medida da Atividade de UDP-glucuronil transferase (UDP-GT)

II.3.8.1. Método p-nitrofenol

O p-nitrofenol em pH alcalino tem um máximo de absorção a 400nm, o qual é perdido na formação de glucuronídeos; o ensaio com o substrato para UDP-GT baseia-se no desaparecimento do p-nitrofenol, medindo-se o decréscimo na densidade ótica a 400nm. Este procedimento fundamenta-se no método de Zakin e col. (57). Num volume final de 0,5ml adicionou-se substrato e enzima na seguinte ordem:

	vol(ml)	conc. efetiva
Tampão tris-acetato 0,25M pH 7,5	0,1	50mM
p-nitrofenol 3mM	0,05	0,3mM
UDP-GA 20mM	0,1	4mM
H ₂ O	0,15	
UDP-GT	0,1	

A mistura foi incubada a 37°C por sete minutos e a reação iniciada pela adição de 0,1ml de enzima. Após rápida homogeneização, uma alíquota de 0,1ml da mistura de reação é removida e desproteïnizada com 0,9ml ácido tricloroacético (TCA) 0,1M. Esta constitui o branco que é obtido a cada determinação. Alíquotas de 0,1ml são removidas a cada 15 e 30 minutos após a adição de enzima e, similarmente desproteïnizadas pela adição de 0,9ml de TCA. Após breve centrifugação para remover a proteína desnaturada, o sobrenadante foi alcalinizado com 0,2ml de KOH 5N, e a densidade ótica

foi determinada a 400nm em uma cela de quartzo de 0,5cm de caminho ótico. O coeficiente de extinção para o p-nitrofenol a pH maior que 10 é $1,81 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$

II.3.8.2. Método bilirrubina

O método baseia-se na conversão de BR conjugada a azoderivados coloridos. O procedimento foi realizado segundo o método de Bellet e col. (61), descrito abaixo.

Preparação do reagente diazo: adiciona-se 10ml da solução de 1% de ácido sulfanílico em HCl 0,25M, a 0,3ml de solução aquosa de 1,5% de nitrito de sódio.

Uma mistura de reação preparada no escuro contendo 0,1ml de tampão trietanolamina 0,2M pH 7,4 (concentração final $4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$), 0,02ml de MgCl_2 $1,25 \times 10^{-2} \text{ M}$ (concentração final $5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$); 0,1ml da solução de BR-HSA 2:1 (concentração final de bilirrubina $8,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ e albumina $4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$), 0,16ml de água e 0,02ml de UDP-GA $8,6 \times 10^{-3} \text{ M}$ (concentração final $3,4 \times 10^{-3} \text{ M}$) é incubada por 3 minutos a 37°C . A reação inicia-se pela adição de 0,1ml da enzima microssomal (2,0mg/ml de proteína por ensaio). Prepara-se o branco substituindo-se UDP-GA por 0,08ml de EDTA $1,25 \times 10^{-2} \text{ M}$ pH 7,4. Após a incubação por 30 minutos a 37°C , interrompe-se a reação pela adição de 3,6ml de ácido láctico-acetato de etila (8:5)(v/v). Extrai-se a BR livre com 1ml de clorofórmio. Imediatamente após a extração, adiciona-se 0,3ml de reagente diazo. Centrifuga-se a 3000 rpm por 10 minutos, retira-se a fase aquosa (azul) e guarda no escuro por 1 hora. Em seguida, lê-se a absorbância contra o branco a 555nm.

O coeficiente de extinção do pigmento azo a 555nm é 61400.

II.3.9. Irradiações

II.3.9.1. Irradiação com lâmpada de vapor de mercúrio

Irradiou-se 2ml da solução de enzima comercial (9mg/ml de proteína) em tampão tris-acetato 50mM pH 7,4 a 4°C, sob agitação constante a uma distância de 15cm. A velocidade de fluência foi de 60W/m²s, utilizando-se o filtro citado no item II.2. Uma outra mistura protegida com papel alumínio foi irradiada similarmente como controle. Possíveis modificações na atividade enzimática foram acompanhadas após cada irradiação pelo método de p-nitrofenol citado no item II.3.8.1. Variou-se também o tempo de irradiação.

II.3.9.2. Irradiação com lâmpada fluorescente

A irradiação da enzima UDP-GT comercial (9mg/ml de proteína) em tampão tris-acetato 50mM pH 7,4 foi realizada com lâmpada disposta 15cm acima da solução, a várias fluências, sob agitação constante, com velocidade de fluência 9,5W/m²s a 4°C. O espectro da lâmpada fluorescente é apresentado na figura II.2. Um controle foi feito da mesma maneira que a anterior.

A enzima microssomal homogeneizada (13 e 20 mg/ml de proteína) foi irradiada similarmente, acompanhando-se as modificações da atividade enzimática pelo método p-nitrofenol e bilirrubina.

II.3.9.3. Irradiação do complexo BR-HSA

1ml do complexo BR-HSA (2:1) (concentração de BR $4,3 \times 10^{-4}$ M e albumina 2×10^{-4} M, foi irradiado no fluorímetro com

velocidade de fluência $8,4\text{W/m}^2\text{s}$ e comprimento de onda de excitação centrado a 430nm . A formação do fotoisômero PBR-HSA foi acompanhada pelo decréscimo da intensidade de fluorescência com o tempo de irradiação, como descrito por Lamola e col. (62). Imediatamente após 0, 7, 14 e 30 minutos de irradiação, uma alíquota de $0,1\text{ml}$ foi retirada e medida a atividade enzimática pelo método bilirrubina conforme descrito no item II.3.8.2., iniciando-se a reação pela adição de complexo PBR-HSA no lugar da enzima microsomal.

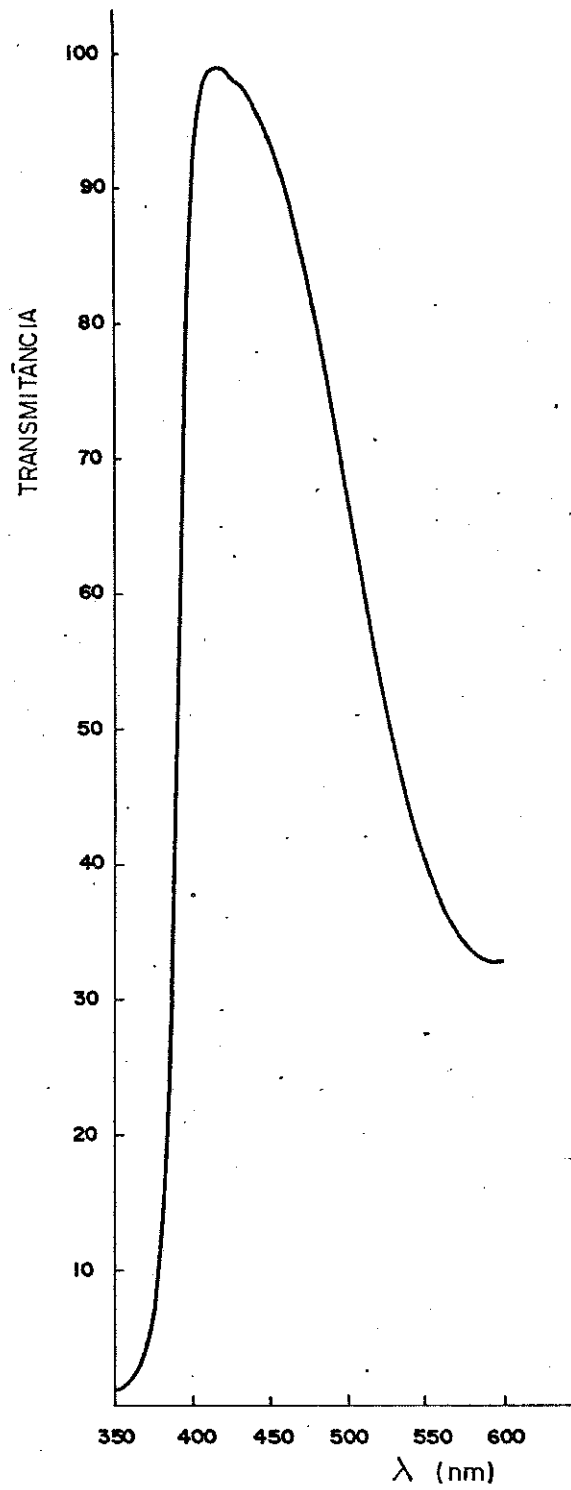


Fig.II.1 Espectro do filtro $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}(\text{NH}_4\text{OH})$:
 KNO_2 .

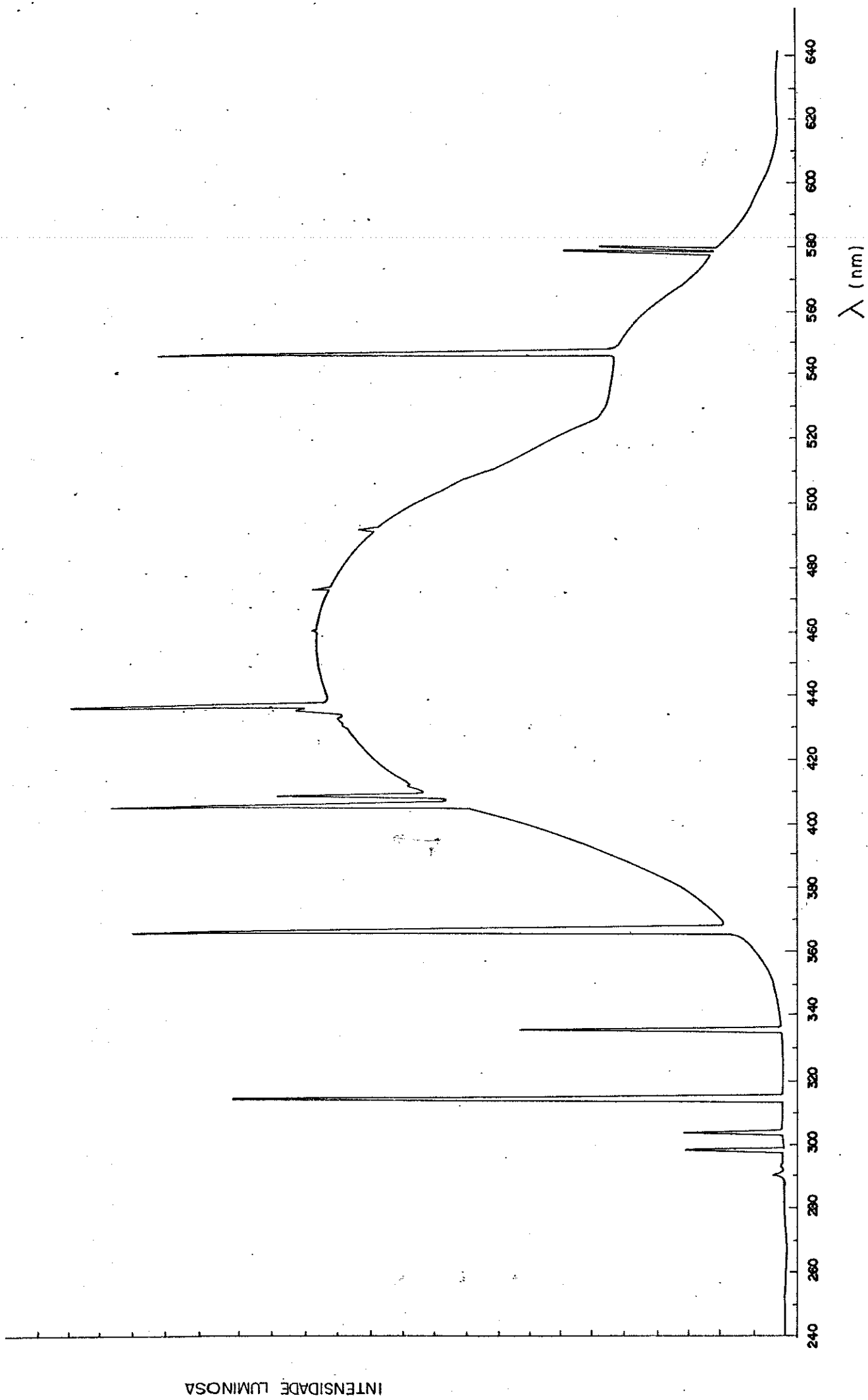


Fig.II.2 Espectro da lâmpada fluorescente

INTENSIDADE LUMINOSA

CAPÍTULO III.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme os dados de Lamola e col. (52), a BR no sangue ligada ao sítio principal da albumina fluoresce eficientemente, enquanto que ligada aos sítios secundários fluoresce com menor eficiência. Assim, torna-se possível medir concentrações de BR ligada ao sítio principal da HSA no sangue total utilizando-se a técnica de "face-frontal" (63) (apêndice II pag. 86). O detergente não iônico DDAO retira toda a BR ligada aos sítios sanguíneos, e então, esta fluoresce em micelas de DDAO. Desta forma a quantidade de BR em sangue pode ser determinada fluorimetricamente após a adição de DDAO às amostras. Estes dois métodos fluorimétricos para a análise de BR total e ligada são simples e rápidos além de utilizarem pequeno volume de sangue como amostra.

Na aplicação desses métodos Lamola e col. (52) utilizaram um hematofluorímetro (64) com sistema óptico adequado com reflexão do feixe em 45°, conforme o apêndice II pag. 86). No nosso caso, não foi possível realizar tais determinações com o sangue e sim com soros e/ou plasmas, pois o aparelho por nós utilizado apresenta geometria de ângulo reto a qual nos permite apenas medidas quantitativas em soluções diluídas.

III.1 Espectro de fluorescência de bilirrubina

Verificou-se que a BR em tampão PBS praticamente não fluoresce, ao passo que a BR ligada à HSA fluoresce eficientemente. Quando 3% de DDAO foi adicionado à solução de BR em tampão

PBS observou-se um aumento acentuado na intensidade de fluorescência. O rendimento de fluorescência de BR em DDAO é de aproximadamente 1/3 daquele do complexo BR-HSA (52). O espectro de fluorescência com excitação a 430 nm de BR em 4 tipos de soluções diferentes, a saber: tampão PBS, solução de HSA, HSA/3% de DDAO e, tampão PBS/3% de DDAO, é mostrado na fig. III.1.

III.2 Efeito do comprimento de onda de excitação em amostras de soros normais

Uma vez que o trabalho seria realizado com soro e plasma, tornou-se necessário verificar a fluorescência de BR em soro e plasma de doadores saudáveis. Estudos preliminares não mostram interferência de outras proteínas. Na sensibilidade utilizada, observou-se que o tampão PBS apresentava emissão exatamente na região da BR quando excitado em 430nm. Com intuito de eliminar este efeito, utilizaram-se os seguintes comprimentos de onda de excitação: 450, 455 e 465 nm. Como o comprimento de onda de excitação a 455nm forneceu menor interferência (fig.III.2), todas as titulações subsequentes foram realizadas neste comprimento de onda.

III.3 Efeito da concentração do complexo BR-HSA na intensidade de fluorescência.

Têm-se estabelecido que BR se liga ao sítio principal de HSA na proporção de 1:1, apresentando um rendimento quântico de fluorescência de 0,002. Moléculas adicionais de BR não causam um aumento observável no rendimento quântico de fluorescência

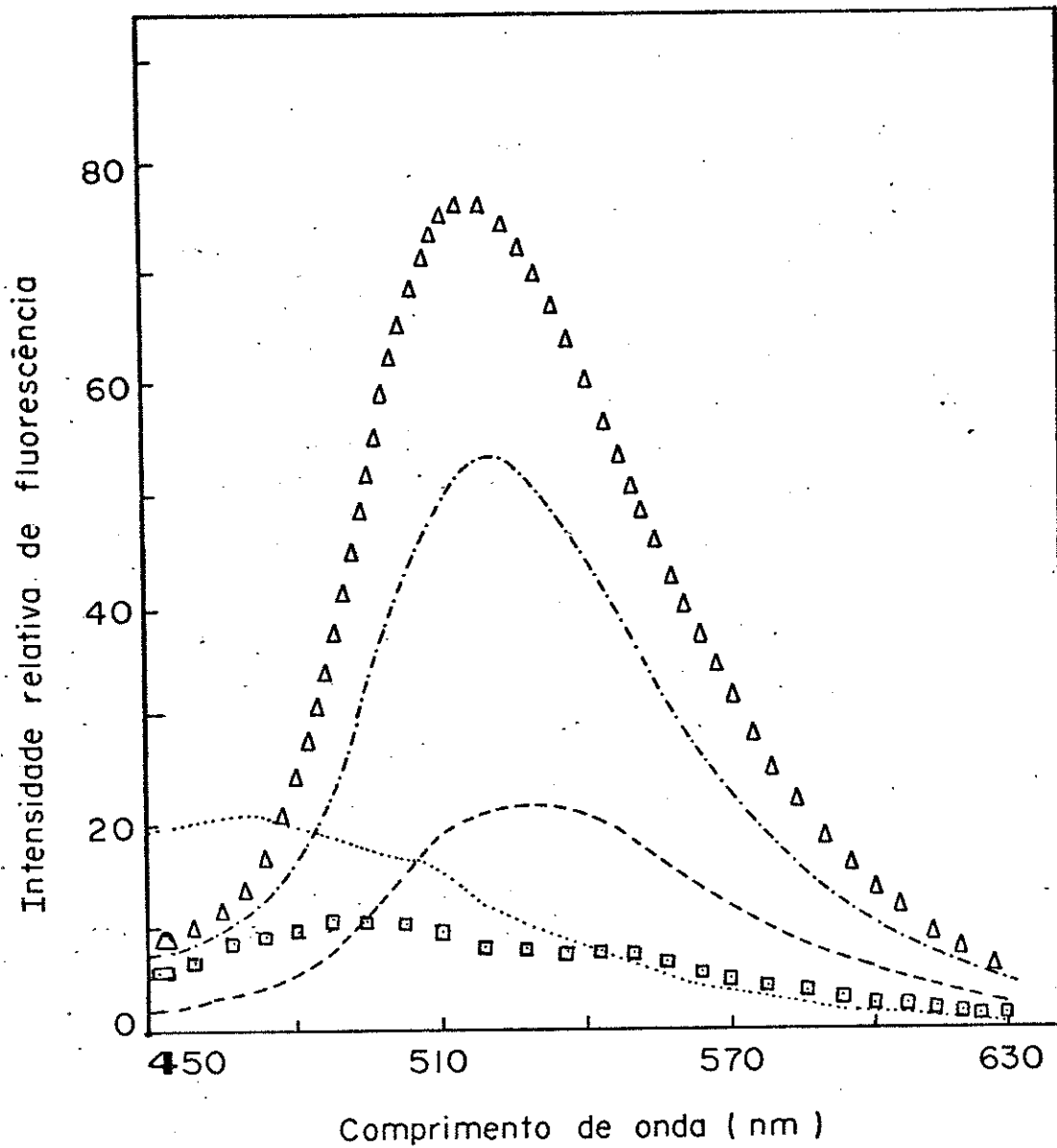


Fig.III.1 Espectro de Fluorescência de BR $1,7 \times 10^{-5} \text{ M}$ em diversas soluções: (□-□-□) em tampão PBS 0,01M pH 7,4 0,9% NaCl, (---) em tampão PBS/3% de DDAO; (◀---▶) em solução de HSA $2,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; (-.-.-) em solução de HSA/3% de DDAO. $\lambda_{\text{ex}} 430 \text{ nm}$.

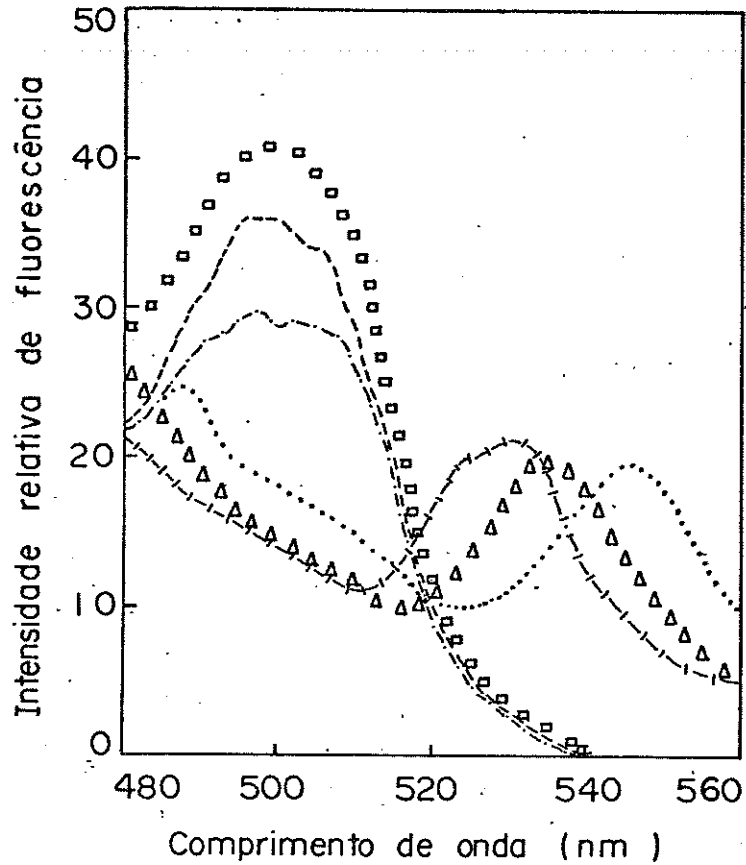


Fig.III.2 Espectro de emissão de fluorescência de soro diluído 1:10 em tampão PBS 0,01M pH 7,4 0,9% NaCl a vários comprimento de onda de excitação. λ_{ex} 450 nm (—) tampão PBS, (---) soro; λ_{ex} 455nm (▷▷▷) tampão PBS, (---) soro; λ_{ex} 465nm (···) tampão PBS, (□-□-□) soro.

(<5%). Sabendo que a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração somente em soluções diluídas, procurou-se estabelecer uma faixa de concentração ótima para as determinações, levando em consideração o fato de que na fluorimetria temos o efeito do "filtro interno", isto é, uma redução na intensidade de fluorescência devido à absorção da amostra. Isto foi efetuado medindo-se a fluorescência do complexo BR-HSA na proporção de 1:1 a diversas concentrações. Observou-se, conforme fig. III.3, que se obtém uma reta até uma concentração de $5 \times 10^{-5} \text{M}$. Assim, em todo o transcorrer da experiência foi utilizada uma concentração de HSA de $2,6 \times 10^{-5} \text{M}$, quando não especificado.

III.4 Ligação de BR à HSA

Após determinar-se a concentração de HSA e o comprimento de onda de excitação ideal para as determinações, acompanhou-se a ligação de BR-HSA por titulação fluorescente. Inicialmente, realizou-se a titulação de uma solução de HSA $2,6 \times 10^{-5} \text{M}$ preparada em tampão PBS com concentrações crescentes de BR. Obteve-se uma curva bem característica, inicialmente linear devido à alta afinidade de HSA por BR, curvando-se na faixa de concentração de BR de 2,5 a 3,8 mg/dl, tornando-se constante para valores de concentração superiores a 3,8 mg/dl (fig. III.4), o que indica uma saturação dos sítios de HSA para ligação com BR.

A linearidade inicial da curva corresponde à fluorescência esperada de BR ligada a um sítio de HSA (proporção 1:1). Considerando que a constante de ligação BR-HSA 1:1 é bastante alta $7,0 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ (13), esperava-se obter uma curvatura mais aguda. No entanto, a curva obtida é típica para um modelo de dois sítios de ligação, sendo o primeiro sítio de mais forte do que segundo o

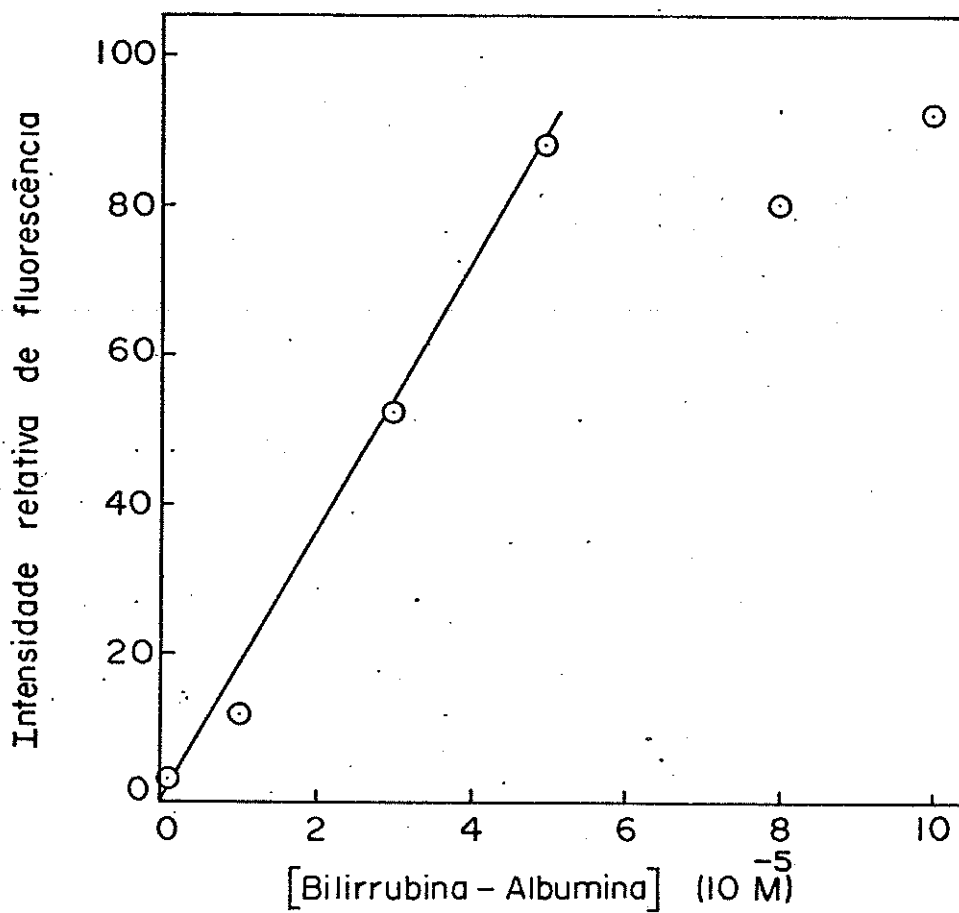


Fig.III.3 Intensidade relativa de fluorescência do complexo BR-HSA em tampão PBS 0,01M pH 7,4 0,9% NaCl , na proporção de 1:1 a várias concentrações.

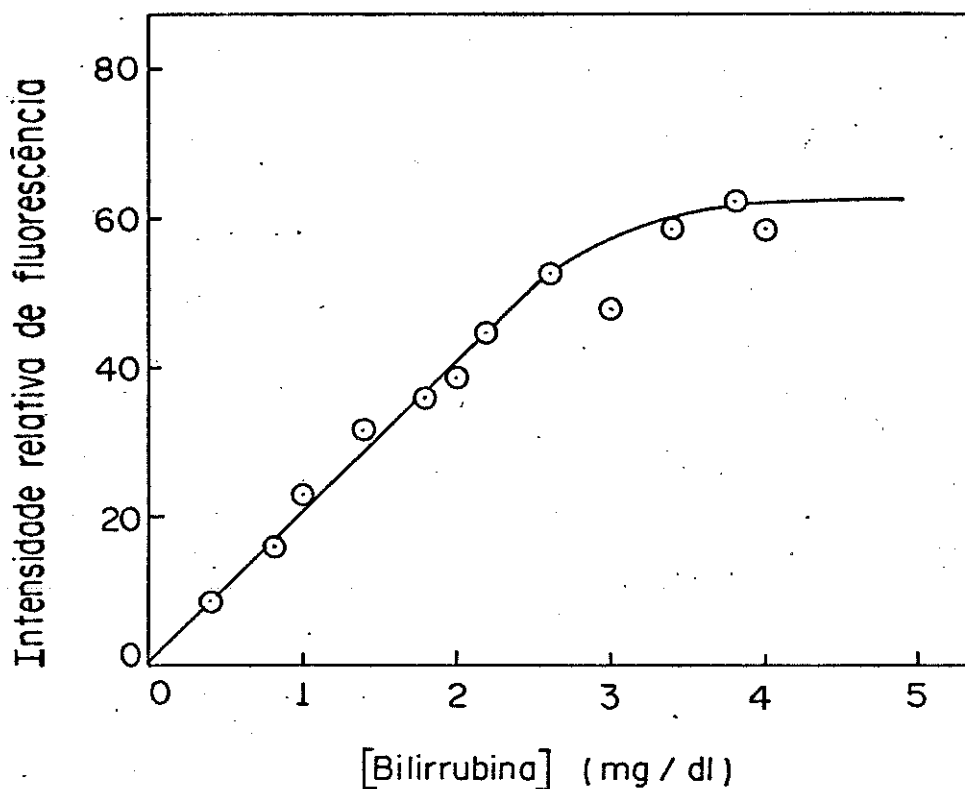


Fig.III.4 Titulação fluorescente de HSA $2,6 \times 10^{-5}$ M com BR em tampão PBS 0,01M pH 7,4 0,9% NaCl. λ_{ex} 455nm e λ_{em} 530nm..

qual pouco afeta a fluorescência do primeiro (52). Procurou-se, então, calcular a constante de associação lançando mão da propriedade fluorescente do complexo BR-HSA.

Segundo Chignell (59), quando drogas se ligam à macromoléculas, a fluorescência intrínseca da droga aumenta e a fluorescência intrínseca da macromolécula diminui sendo, assim, possível calcular, a partir dos dados de titulação fluorescente, a constante de associação para essa interação.

Empregando-se este método, realizaram-se titulações a diferentes concentrações de HSA como macromolécula e BR como supressor. Sabe-se que HSA apresenta uma fluorescência a 340nm quando excitada a 290nm devido aos grupos triptofano presentes na ma-

cromolécula (59). Assim, pode-se seguir a supressão desta fluorescência pela adição de BR que ocorre pela transferência de energia do triptofano para esse corante.

As figuras III.5a e 5b mostram a supressão da fluorescência de HSA e BSA por BR, respectivamente. Para $3,7 \times 10^{-7} M$ de HSA e $4,0 \times 10^{-7} M$ de BSA obteve-se a curva (a); para $1,3 \times 10^{-6} M$ de HSA e $2,0 \times 10^{-6} M$ de BSA obteve-se a curva (b); e, para $2,6 \times 10^{-5} M$ de HSA e $2,0 \times 10^{-5} M$ de BSA obteve-se a curva (c). Concentrações de proteína acima destes dois últimos valores mostram um perfil de supressão idêntico ao das curvas (c). Estes resultados indicam que a curva (c) representa um limite de supressão onde toda BR presente está ligada à proteína. Para valores abaixo deste limite (curvas (a) e (b)) ocorre considerável dissociação do complexo BR-proteína apresentando menor supressão, como descrito por Chen (13). A quantidade de BR ligada à HSA e/ou de BSA abaixo da concentração limite pode ser calculada comparando-se as curvas (c) e (a) como descrito no apêndice I. pag.83. Os resultados obtidos nesta comparação são colocados num gráfico do tipo Scatchard para o cálculo da constante de associação (59), o qual é mostrado nas figs. III.6a e 6b para HSA e BSA, respectivamente. Este método é mais eficiente para o cálculo da constante de associação do primeiro sítio, do que para ligações adicionais. Os valores de K_1 são dados pela inclinação da reta normalizada pelo método dos mínimos quadrados. Obteve-se para BR-HSA, $1,0 \times 10^6 M^{-1}$ e, para BSA-HSA $1,7 \times 10^6 M^{-1}$.

Para se constatar a existência da ligação de BR a um segundo sítio de HSA, realizou-se um outro tipo de titulações fluorescente. Neste caso, efetuaram-se dois experimentos distintos: num deles fixou-se a concentração de BR, variando-se a concentração de HSA, no outro procedeu-se de maneira inversa, como descrito no capítulo II pag.34. Os resultados obtidos foram graficados

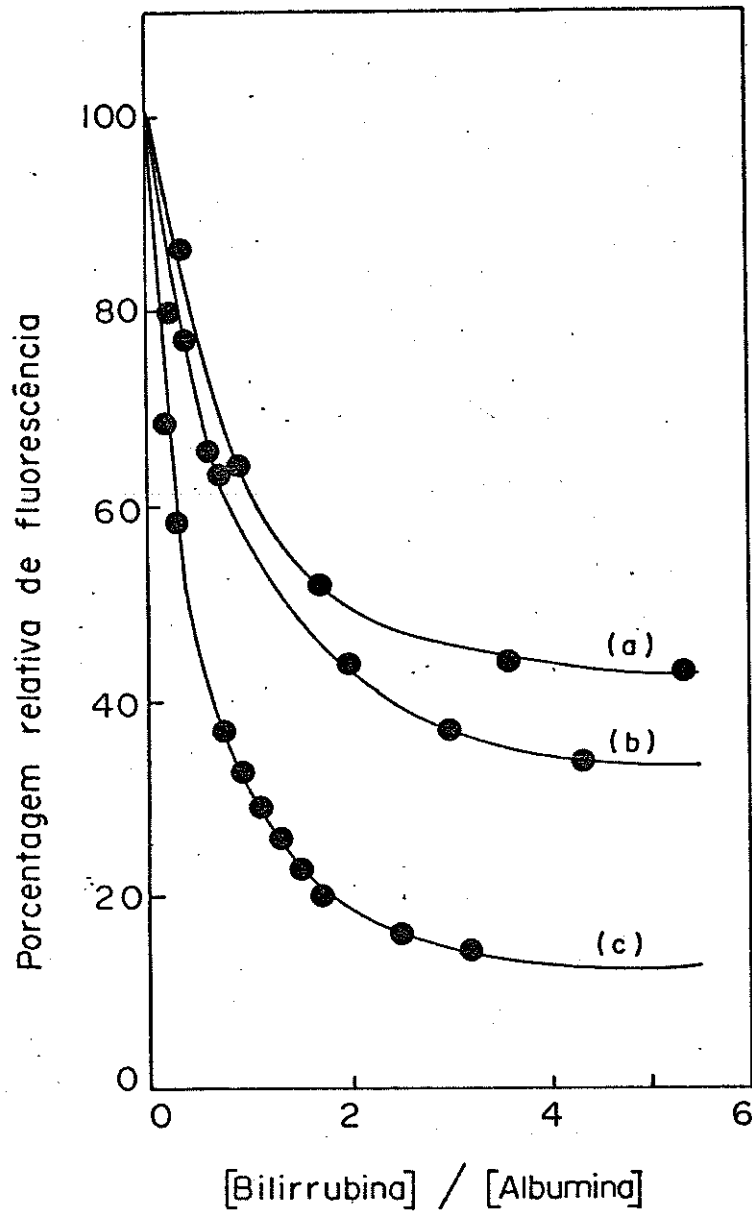


Fig.III.5a: Supressão da fluorescência de HSA por BR. Porcentagem relativa de fluorescência com λ ex 290nm e λ em 340nm, graficado versus a razão da concentração de BR total e HSA. (a) $3,7 \times 10^{-7}$ M de HSA; (b) $1,3 \times 10^{-6}$ M de HSA; (c) $2,6 \times 10^{-5}$ M de HSA.

5668/BC

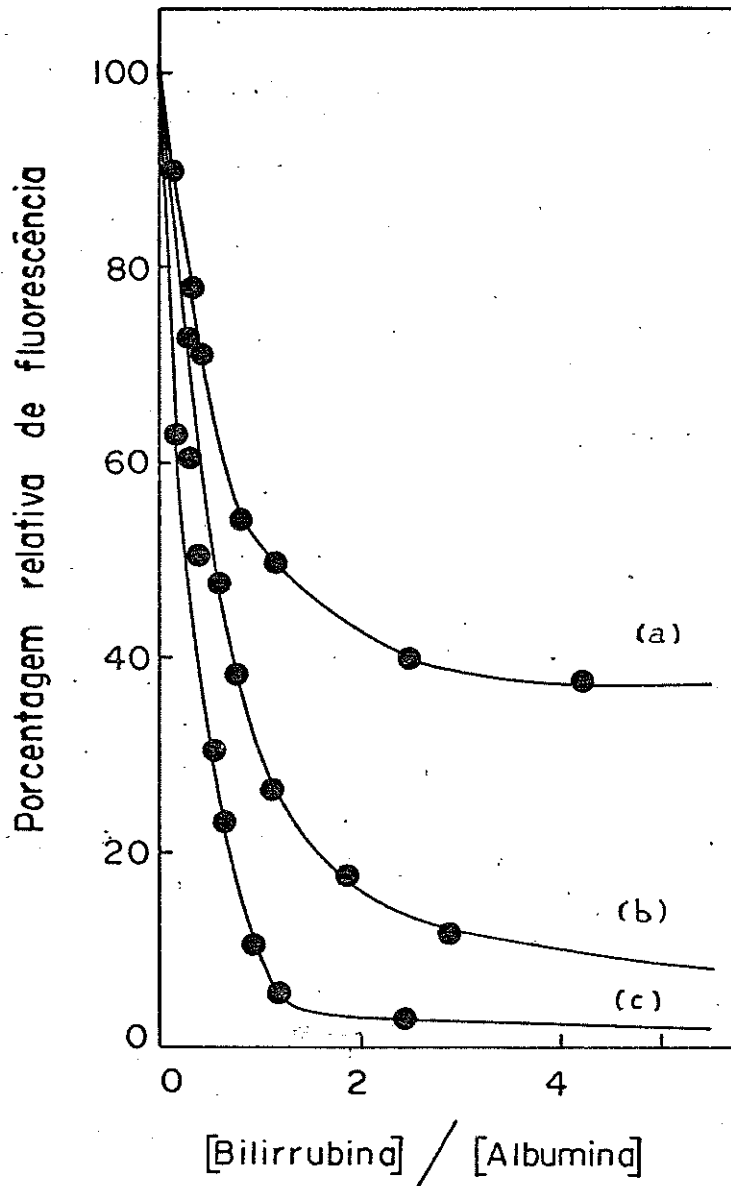


Fig.III.5b Supressão da fluorescência da albumina bovina (BSA) por BR. Porcentagem relativa de fluorescência com λ ex 290nm e λ em 340nm, graficado contra a razão da concentração de BR total e BSA. (a) $4,0 \times 10^{-7}$ M de BSA (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M de BSA: (c) $2,0 \times 10^{-5}$ M de BSA.

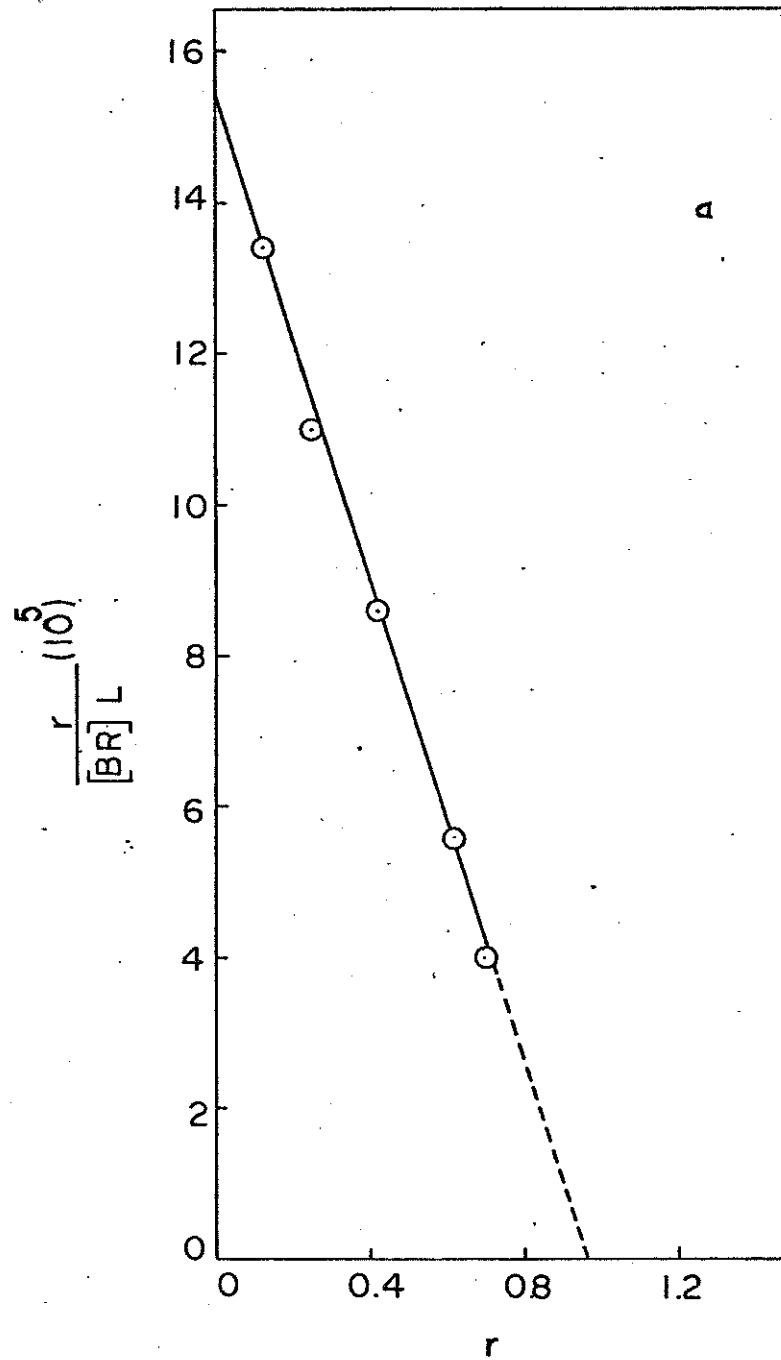
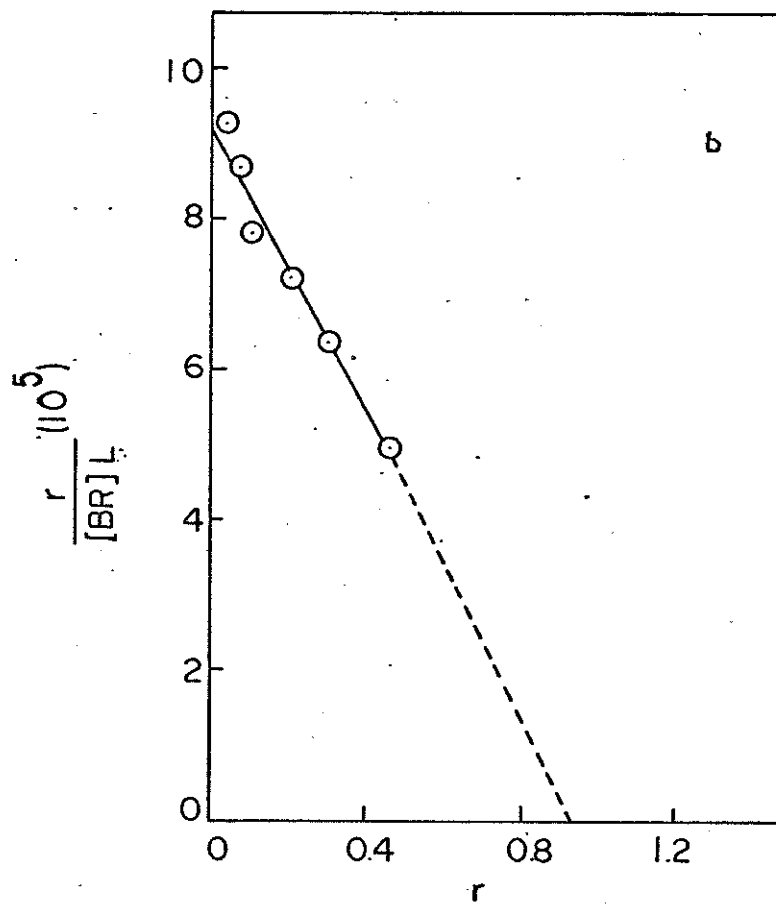


Fig.III.6 Gráfico Scatchard de ligação. r = número de moles de BR ligada por mol de HSA, $[BR]L$ = concentração de BR livre. (a) HSA, (b) BSA.



na curva de Scatchard fig.III.7. Das projeções das retas obtidas pelo método dos mínimos quadrados sobre o eixo das abcissas, pode-se dizer que existem dois sítios de ligação para BR na HSA. O cálculo da constante de ligação BR-HSA para o sítio principal através deste método forneceu um valor de $7,4 \times 10^6 \text{M}^{-1}$.

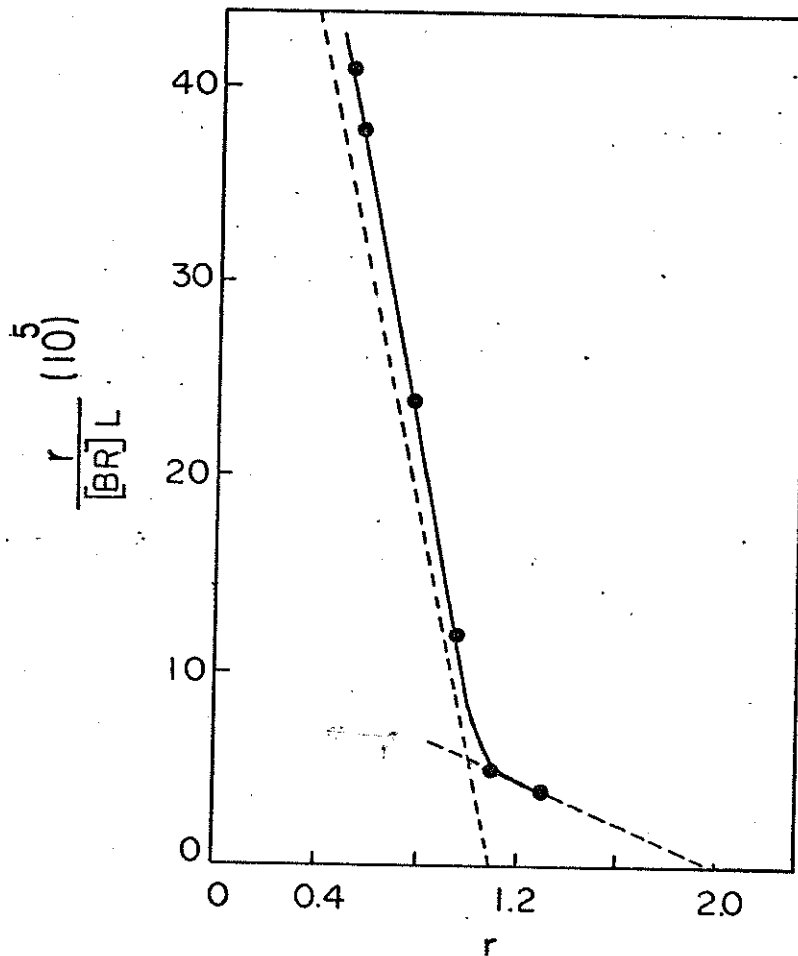


Fig.III.7 Gráfico de Scatchard para constante de associação de BR-HSA. Onde r é o número de moles de BR ligada por mol de HSA e $[BR]L$ é a concentração de BR livre determinado pelo método do aumento fluorescente da BR.

III.5. Efeito do detergente DDAO na titulação fluorescente do complexo BR-HSA

A fig.III.8 mostra a titulação fluorescente da solução de BR-HSA na presença de 3% e 0,3% do detergente DDAO. Este experimento forneceu um modelo para o cálculo de BR_{total}. Como a curva obtida com 0,3% de DDAO apresentou maior linearidade, utilizou-se esta concentração para os cálculos de BR_{total} nas determinações subsequentes.

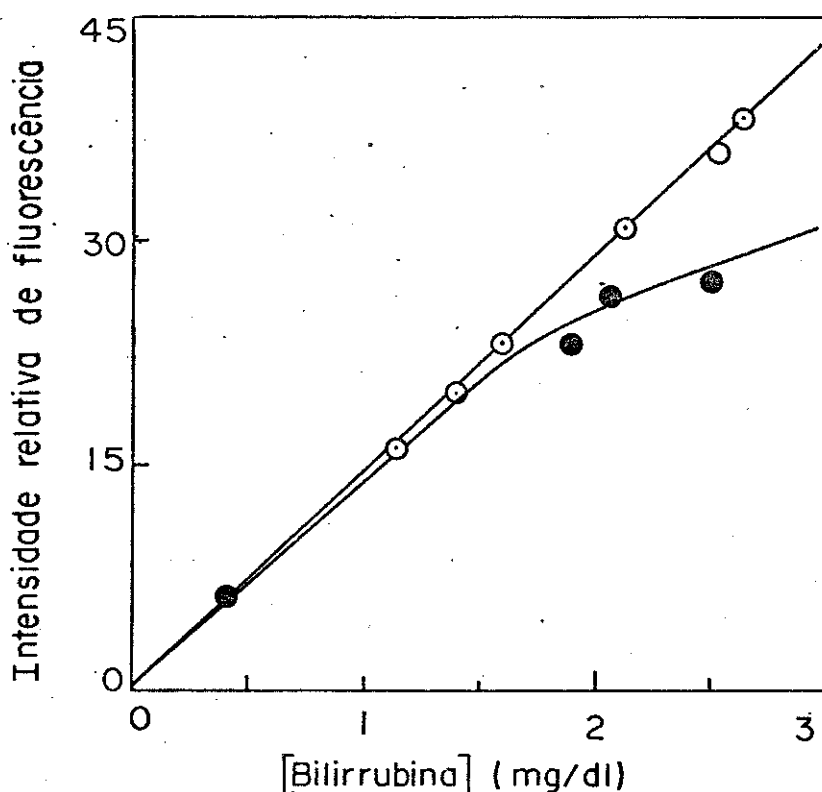


Fig.III.8 Titulação fluorescente do complexo BR-HSA em tampão PBS 0,01M pH 7,4 0,9% NaCl na presença de DDAO (o-o-o) 0,3%; (•-•-•) 3%. . Concentração de HSA $2,6 \times 10^{-5} M$.

III.6 Fluorescência do complexo BR-HSA em soro e plasma sanguíneo

Após padronizar os resultados com HSA e BR isolados, procurou-se verificar a reprodutibilidade dos mesmos em soro e plasmas.

A fig.III.9 mostra as curvas correspondentes à titulação fluorescente de soro e plasma sanguíneos. Pode-se observar que a forma destas curvas é semelhante à obtida com HSA (fig.III.4). Como não se observou diferenças significativas entre os dois sistemas, optou-se em construir uma curva padrão para BR ligada à HSA usando-se somente o soro como amostra. Para análise

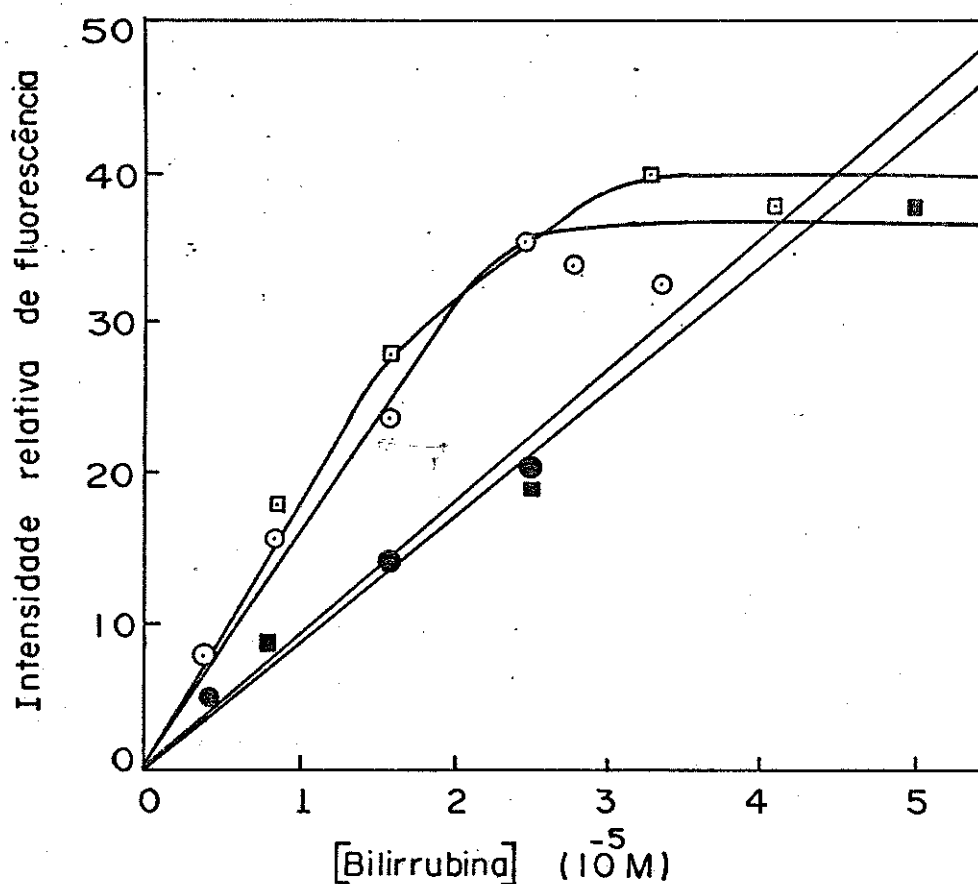


Fig.III.9 Curvas de titulação de plasma (○-○-○), plasma/0,3% de DDAO (●-●-●) e soro (□-□-□), soro/0,3% DDAO (■-■-■) diluídos em tampão PBS 0,01M pH 7,4 0,9% NaCl, a uma concentração de HSA de $5,0 \times 10^{-5}$ M com BR. λ_{ex} 455nm e λ_{em} 530nm.

de BR-T usou-se como padrão, soro na presença de 0,3% de DDAO como citado na secção anterior.

III.7 Curva padrão para BR-T e BR-HSA

A fig.III.10 mostra uma média de 5 titulações fluorescentes de BR em soro diluído em tampão PBS a uma concentração de HSA $2,6 \times 10^{-5} M$, a temperatura ambiente. Sem a adição de BR observa-se um pequeno aumento na intensidade de fluorescência, devido a quantidade de BR já existente em soro normal a qual foi subtraída a cada leitura. A curva obtida foi semelhante à de HSA em PBS (fig.III.4, pag.47). O valor de saturação observado foi de 2,2mg de BR por dl de soro, o qual corresponde a 0,158mg de HSA, ao passo que a concentração de HSA na solução era de 0,17 mg/dl ($2,6 \times 10^{-5} M$).

Os valores de BR em soro foram determinados fluorimetricamente em mg/dl, a partir da curva padrão, (fig.III.10) da seguinte maneira:

- 1- a intensidade relativa de fluorescência igual a 17 na curva com 0,3% de DDAO, corresponde a 1 mg de BR-T.
- 2- a intensidade relativa de fluorescência igual a 23 na curva sem DDAO, corresponde a 1 mg/dl de BR ligada ao sítio principal de HSA.

Estabelecidos esses parâmetros, o próximo passo foi verificar a aplicabilidade deste método em amostras de soros com alto nível de BR. Assim, os resultados subsequentes são os obtidos com amostras de adultos e crianças ictericas e comparadas com os do método convencional diazo.

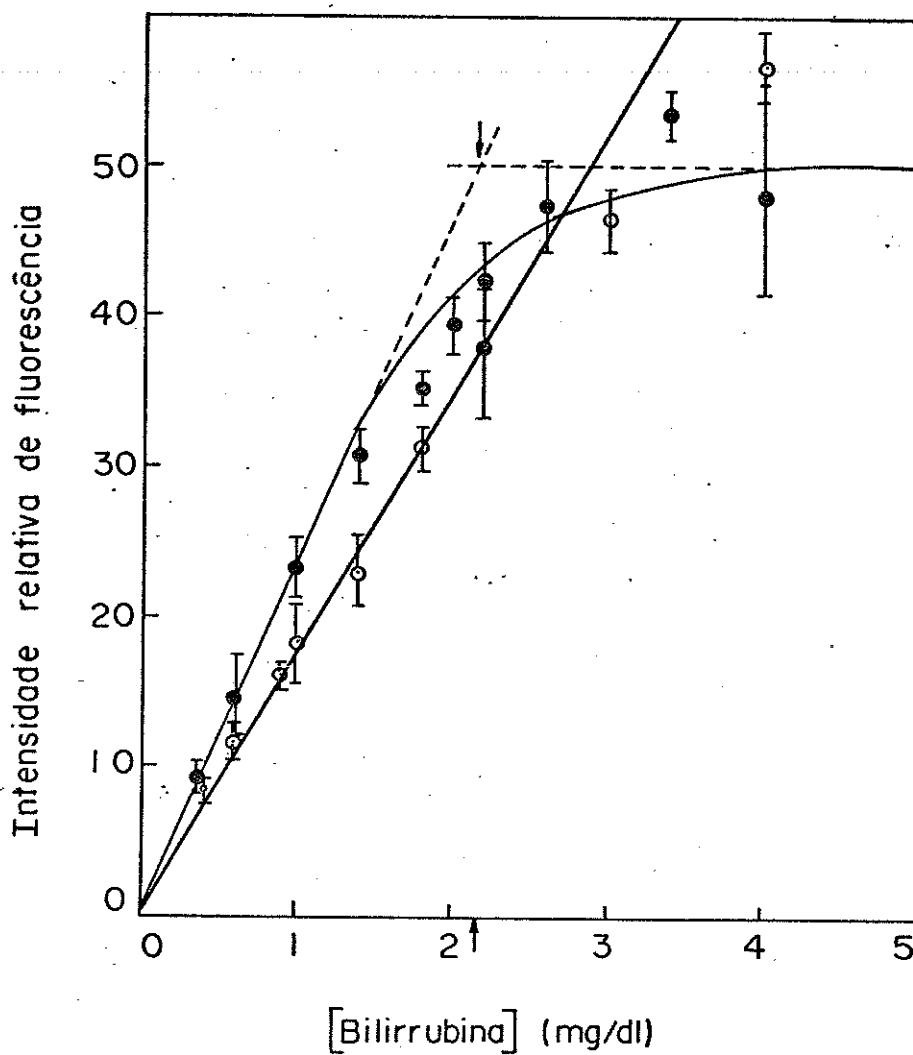


Fig.III.10 Titulação fluorescente de soro diluído em tampão PBS 0,01M pH 7,4 0,9% NaCl com BR (●-●-●); a mesma mesma amostra na presença de 0,3% de DDAO (○-○-○). λ_{ex} 455nm e λ_{em} 530nm.

III.8 Análise fluorimétrica de BR-T e BR-HSA comparada com o método diazo em amostras de adultos e crianças

Devido à dificuldade de se obter amostras de soro de recém-nascidos com icterícia, procurou-se inicialmente, trabalhar com amostras de adultos com alto nível de BR. A concentração de HSA em todas as amostras foi corrigida para uma concentração de $2,6 \times 10^{-5} M$, diluindo-se apropriadamente com tampão PBS 0,01M pH 7,4 0,9% NaCl. Assim sendo, em todas as determinações fluorimétricas não se utilizou mais do que 63 μ l de soro.

Os valores de BR-total (BR-T), BR direta (BR-D) e BR indireta (BR-I), do método diazo foram cedidos pelo laboratório de análises clínicas do Hospital das Clínicas da Unicamp.

A fig.III.11 mostra o gráfico de correlação entre BR-T determinada pelos métodos fluorimétrico e diazo. Foram analisadas 10 amostras de soro de adultos com alto nível de BR. Esta correlação forneceu uma reta com inclinação de 4,3, coeficiente linear de 1,40 e um coeficiente de correlação de 0,98. O valor de 4,32 para a inclinação da reta indica que o método fluorimétrico determina um valor 4 vezes maior de BR total que o método diazo. Deste modo, cada valor obtido pelo método fluorimétrico foi corrigido multiplicando-se por um fator de 0,23. Os resultados estão apresentados na tabela III.1, tendo como inclinação da reta 0,98, coeficiente linear 0,32 e coeficiente de correlação 0,98. Observou-se, também, uma correlação entre BR-HSA e BR-T determinado pelo método diazo com inclinação da reta 3,2, coeficiente linear 0,76 e coeficiente de correlação 0,97. Quando o valor de BR-T obtido pelo método fluorimétrico subtraído de BR indireta determinada pelo método diazo obtém-se também uma correlação com inclinação da curva 0,98, coeficiente linear 0,33 e coeficiente de correlação 0,98 (tabela III.1).

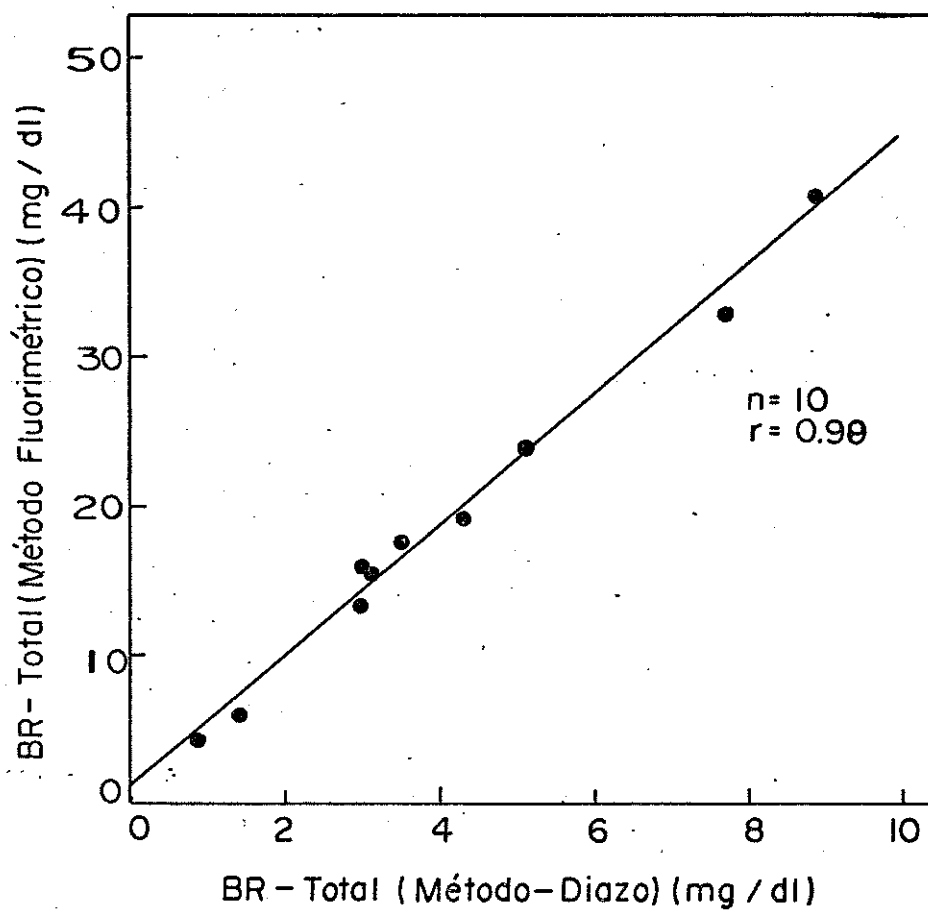


Fig. III.11 Comparação entre o método fluorimétrico e o método diazo do nível total de BR determinado em 10 amostras de soro de adultos.

Tabela.III.1 Valores de níveis de BR em mg/dl de soro determinado pelo método fluorimétrico com parada com o método diazo.

MÉTODOS FLUORIMÉTRICO				MÉTODOS DIAZO			BR-T	BR-HSA
BR-T		BR-HSA		BR-T	BR-D	BR-I	BR-I	BR-I
x0,23		x0,23						
4,77	1,09	3,24	0,74	0,9	0,2	0,7	0,39	0,04
7,05	1,62	4,11	0,94	1,4	0,5	0,9	0,72	0,04
13,44	3,10	10,85	2,36	3,0	1,9	1,1	2,00	1,28
15,12	3,48	9,14	2,1	3,1	0,7	2,4	1,08	0,3 (-)
16,60	3,82	11,43	2,63	3,1	1,9	1,2	2,62	1,43
17,80	4,09	13,20	3,04	3,5	2,0	1,5	2,59	1,54
19,25	4,43	13,09	3,01	4,3	2,8	1,5	2,93	1,51
24,1	5,54	18,80	4,32	5,3	3,4	1,9	3,64	2,42
32,9	7,57	28,8	6,62	7,7	6,0	1,7	5,87	4,92
41,1	9,45	25,2	5,79	8,9	6,7	2,2	7,25	3,59

BR-D Bilirrubina direta

BR-I Bilirrubina indireta

Nas análises de soros de recém-nascidos ictericos, observou-se também a necessidade de uma correção. Neste caso, o fator utilizado foi diferente daquele de soros de adultos isto é, empregou-se um fator multiplicativo de 0,46. A fig.III.12 mostra a curva de correlação com inclinação 2,1, coeficiente linear 1,1 e coeficiente de correlação 0,99.

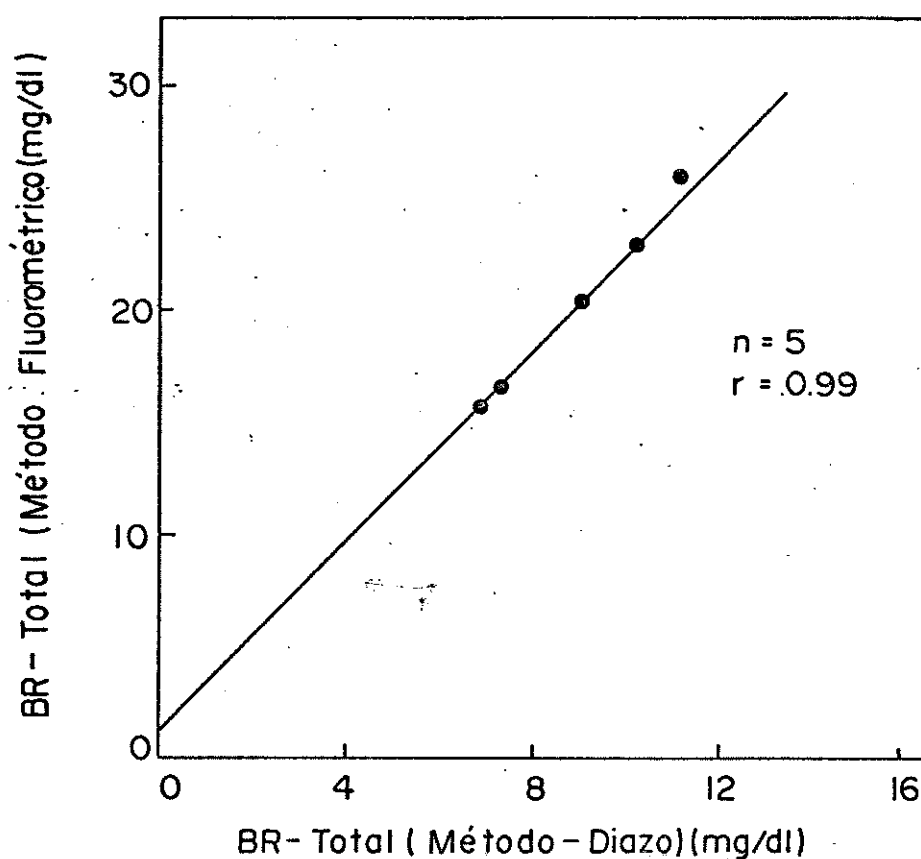


Fig.III-12 Comparação entre o método fluorimétrico e método diazo de níveis de BR-T em 5 amostras de recém-nascido ictericos.

A fig.III.13 mostra correlação de BR-T pelo método fluorimétrico e diazo em 20 amostras de crianças ictericas corrigida por um fator de 0,46 dando os valores de inclinação 0,86, coeficiente linear 1,74 e coeficiente de correlação 0,95.

Os valores de BR direta nessas amostras eram $\leq 0,75$ mg/dl, exceto em 3 casos com valores de 1,07, 8,50 e 9,29 mg/dl, nos quais não se observou nenhum comportamento diferente das outras 17 amostras.

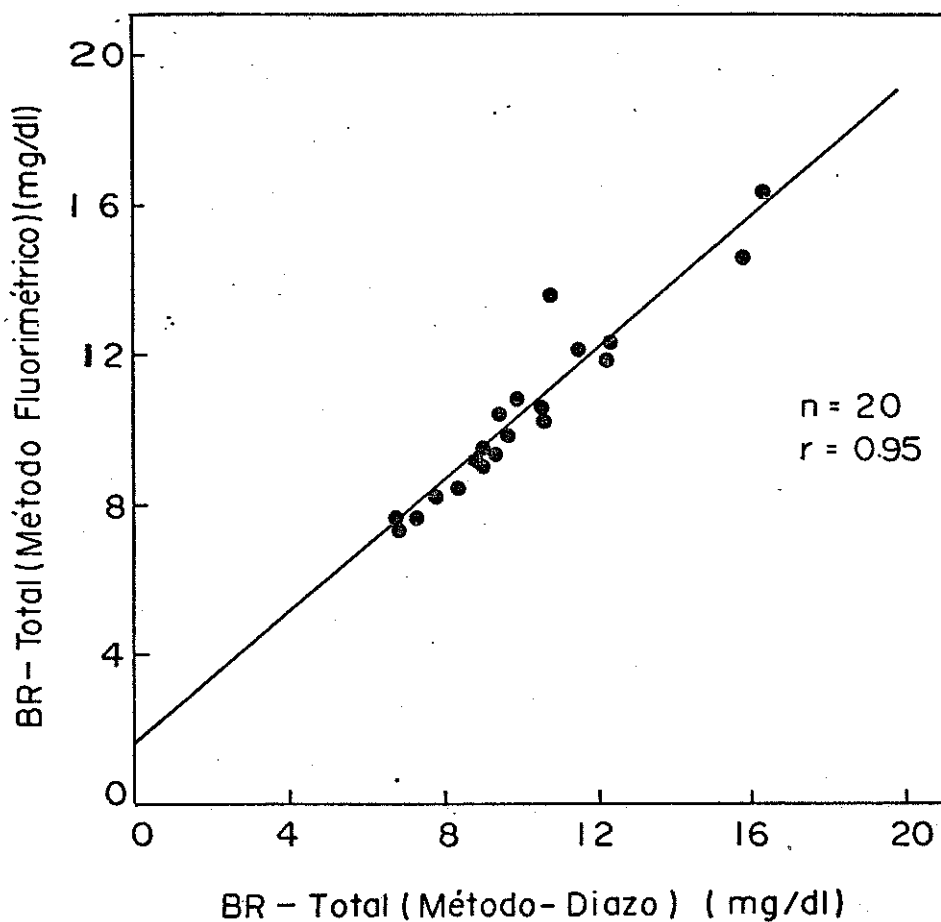


Fig.III.13 Comparação entre os valores de BR-T determinados pelos métodos fluorimétrico e diazo em 20 amostras de soro de recém-nascidos ictericos.

A. fig.III.14 mostra a correlação entre os valores de BR-T (método diazo) e BR ligada à HSA (método fluorimétrico) com inclinação de 0,76, coeficiente linear 1,18 e coeficiente de correlação 0,93.

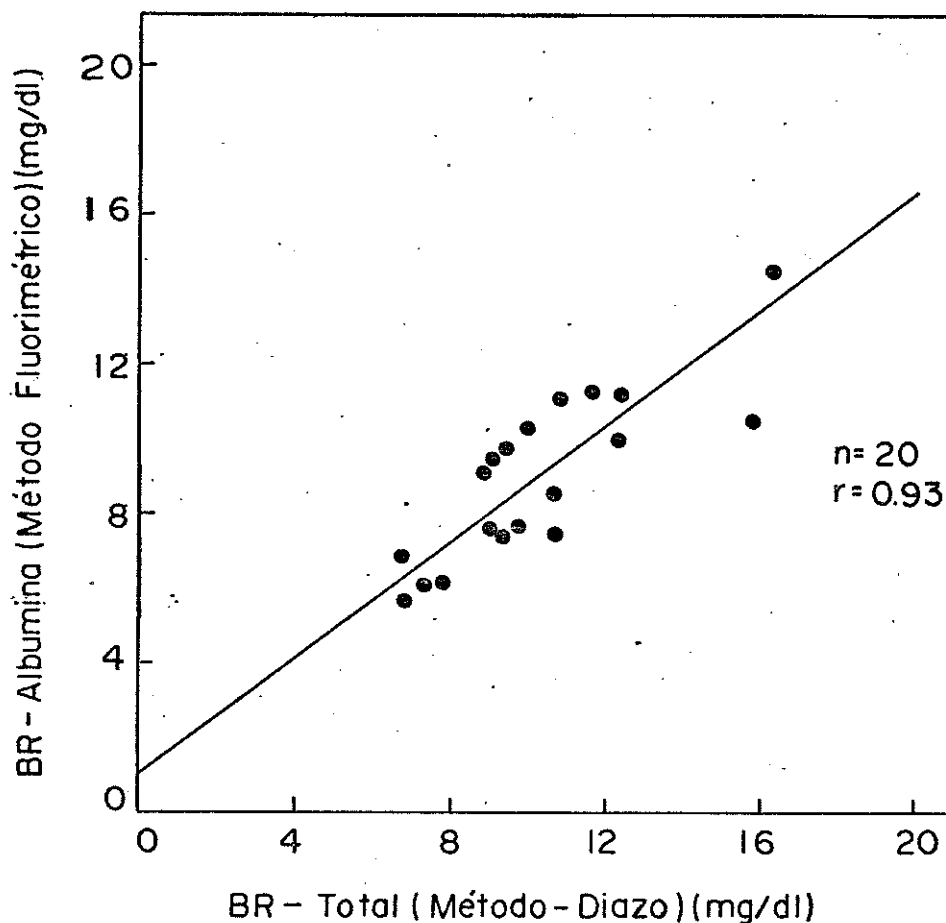


Fig.III.14 Comparação entre BR-T (método diazo) e BR-HSA (método fluorimétrico) em 20 amostras de crianças ictericas.

Da mesma forma como obtido para adultos o valor de BR-T. determinado pelo método fluorimétrico, foi subtraído de BR indireta determinado pelo método diazo. A fig.III.15 mostra a correlação deste valor com o de BR direta apresentando inclinação 1,03, coeficiente linear 0,28 e coeficiente de correlação 0,99.

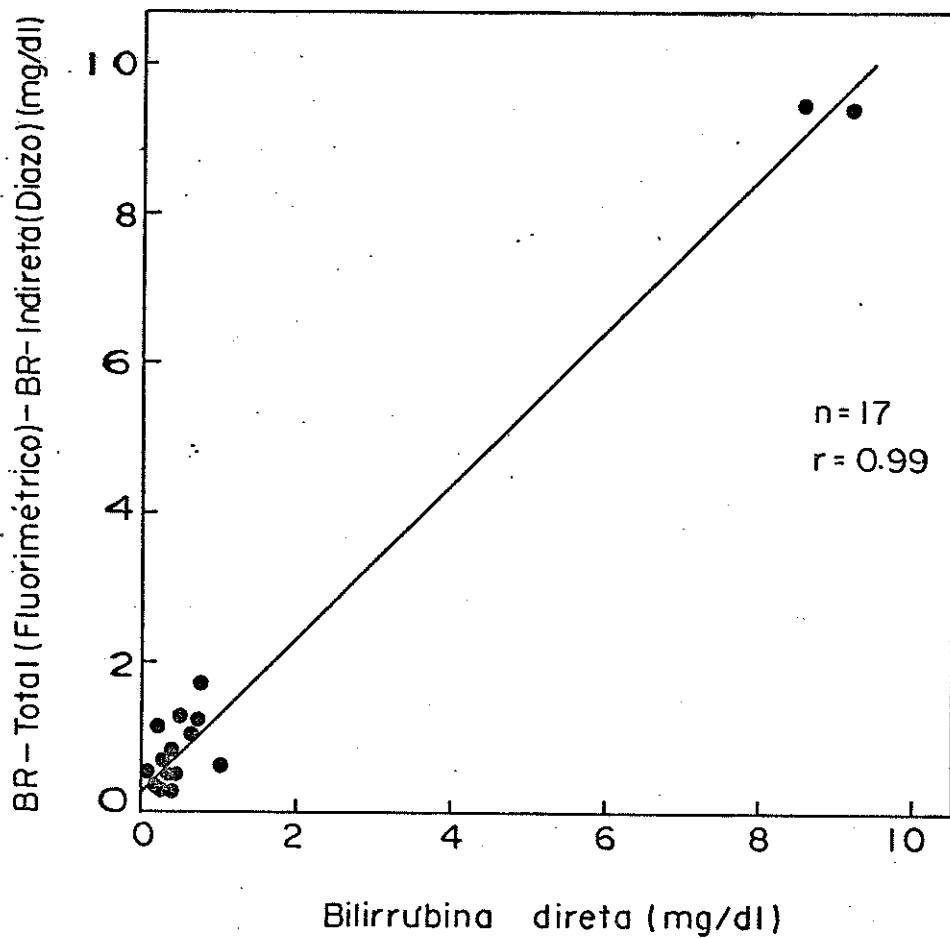


Fig.III.15. Comparação entre BR direta com a diferença entre BR-T (método fluorimétrico) e BR indireta (método diazo).

III.9 Efeito da fototerapia na análise fluorimétrica de BR

Sendo que altos valores de BR não ligada à HSA indicam o risco de BR encefálica (52, 65, 66), verificamos a fração de BR não ligada à HSA nos 20 casos de crianças ictericas a qual designa-se de $\Delta = (BR-T) - (BR-HSA) / (BR-T)$ (tabela III.2).

Dentre os casos listados na tabela III.2 os pacientes 1; 5, 7 8 e 19 haviam sido submetidos ao tratamento fototerápico e o 12 à luz solar. É interessante notar que o valor de Δ para estes casos foi maior que 0,20 e ao passo que os pacientes que não receberam nenhum tratamento apresentaram valores de Δ menores que 0,1. Os valores de Δ maiores que 0,20 são indícios de formação de fotoisômeros o que diminui a fluorescência do complexo BR-HSA (62).

III.10 Fotorreativação da enzima UDP-Glucuroniltransferase

10.1 Efeito da irradiação na atividade da enzima comercial e microssomal, frente a p-nitrofenol.

A enzima UDP-GT comercial tinha uma atividade inicial de 12,5% e 21,4% após 15 e 30 minutos de reação, respectivamente.

As irradiações com lâmpada de vapor de mercúrio com filtro $CuSO_4 : KNO_2 / NH_4OH$, e vel. de fluência de $7,0 \times 10^{-3} W/cm^2 s$, não apresentou aumento na atividade até 60 minutos de irradiação, verificando-se inclusive uma inativação. Como pode ser observada na fig.III.16 esta inativação pode ter ocorrido devido à alta fluência na amostra ($25,2 W/cm^2$).

Para se verificar o efeito da fluência na irradiação

Tabela III.2. Efeito do Δ com a fototerapia

Paciente nº	BR-T	BR-HSA	$(BR-T)-(BR-HSA)/(BR-T)$
01	10,41	7,81	0,25 (fot.)
02	9,56	9,51	0,0052
03	9,91	9,11	0,081
04	16,23	14,53	0,10
05	9,81	7,70	0,21 (fot.)
06	13,61	11,15	0,18
07	7,74	6,16	0,20 (fot.)
08	9,44	7,45	0,21 (fot.)
09	11,81	10,04	0,15
10	12,18	11,35	0,068
11	12,34	11,20	0,092
12	10,69	8,61	0,19 (sol)
13	7,34	5,76	0,21
14	10,41	9,91	0,048
15	8,50	7,62	0,10
16	9,11	7,67	0,16
17	7,65	6,95	0,092
18	10,82	10,43	0,035
19	14,30	10,51	0,26 (fot.)
20	8,30	7,19	0,13

$$(BR-T)-(BR-HSA)/(BR-T) = \Delta$$

utilizou-se lâmpada fluorescente, a qual apresenta baixa velocidade de fluência.

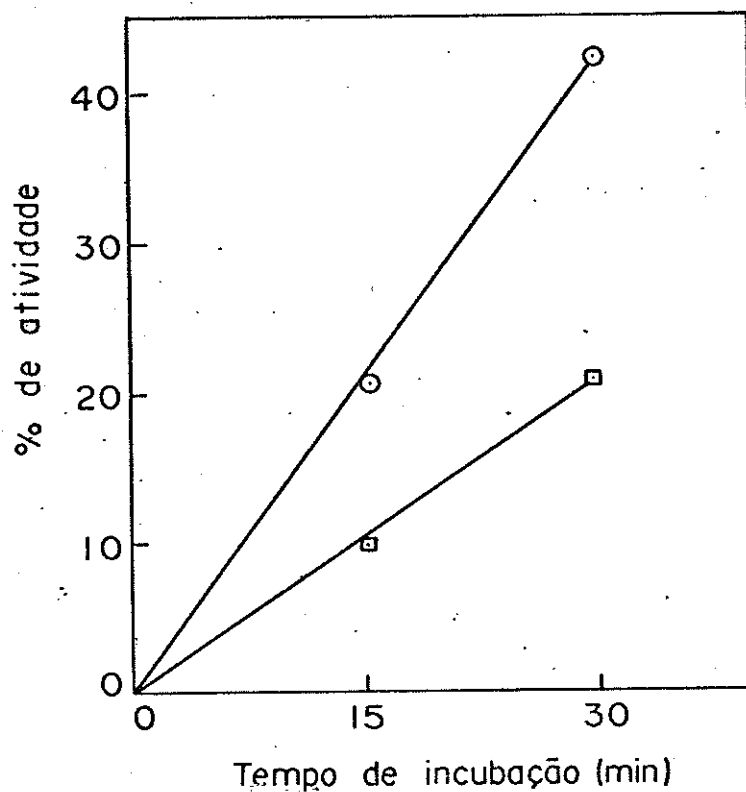


Fig. III.16 Gráfico da porcentagem da atividade da enzima comercial UDP-GT (0,9 mg/ml de proteína por ensaio) medido pela glucuronidação do p-nitrofenol, irradiado por 60 min., com lâmpada de vapor de mercúrio com filtro $\text{CuSO}_4 : \text{KNO}_2 / \text{NH}_4\text{OH}$ (λ 420-490nm), a fluência de $25,2 \text{ W/cm}^2$ (-o-o-) controle; (-□-□-) irradiado.

Ào irradiar a enzima com lâmpada fluorescente a diversas fluências, não se observou aumento significativo na atividade enzimática. Isto deve ter ocorrido, provavelmente, devido à utilização de uma enzima comercial, assim sendo não se tem controle de luz na sua preparação. A enzima deve ter recebido quantidade suficiente de luz, anulando efeitos de posteriores irradiações sobre sua atividade. Assim, decidiu-se preparar uma enzima microsomal a partir de fígado de ratos. Esta enzima microsomal, obtida conforme descrito no item II.3.7 apresentou uma atividade mostrada na fig. III.17, a qual foi considerada satisfatória.

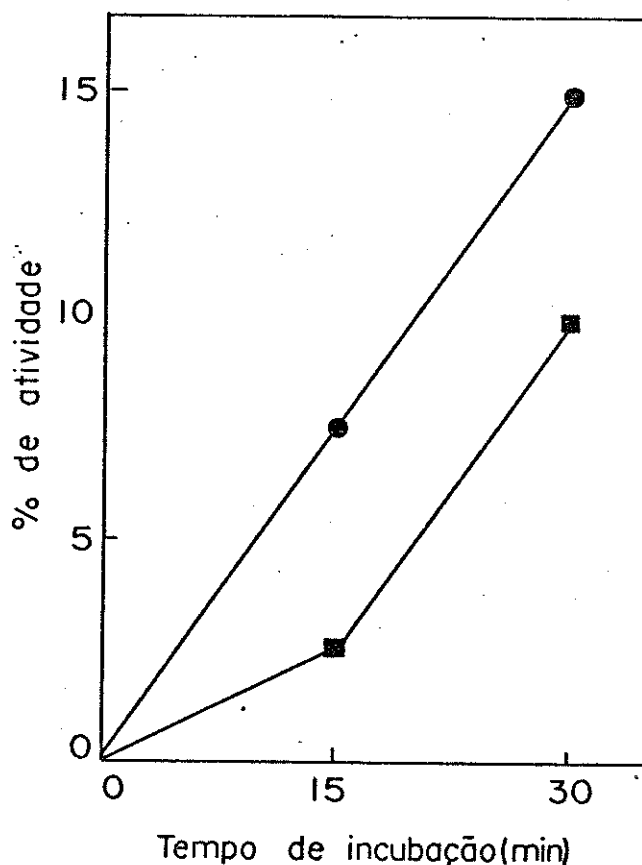


Fig. III.17 Gráfico da porcentagem da atividade da enzima microsomal do fígado de rato, logo após a sua obtenção (●—●) 2 mg/ml de proteína por ensaio; (■—■) 1 mg/ml de proteína por ensaio.

Verificou-se que ao estocar no congelador, a enzima microsomal apresentava um aumento na atividade com o tempo. Assim sendo, todos os resultados foram normalizados.

Antes de iniciar a irradiação com lâmpada fluorescente a diversas fluências, deixou-se a solução da enzima microsomal em constante agitação durante 20 min. em câmara fria para obter uma melhor homogeneização. Os resultados apresentados na fig. III.18a e 18b mostram um considerável aumento na atividade enzimática em 1 e 4 horas de irradiação, sendo este aumento independente do tempo de incubação.

Este aumento na atividade enzimática com irradiação pode não corresponder à realidade, pois verifica-se um aumento gradativo na atividade com o tempo de estocagem a 0°C, além disso deve-se levar em consideração que a agitação efetuada antes e durante a irradiação pode estar solubilizando melhor a enzima aumentando assim a sua atividade.

Como controle, fez-se um experimento medindo-se a atividade da enzima agitada por 18 horas a 4°C sendo, posteriormente, irradiada mantendo-se uma das amostras protegida da luz. Verificou-se, então, um aumento da atividade idêntica para os dois casos indicando que realmente a agitação interfere no experimento.

Para se superar o efeito da solubilização, utilizou-se 1% do lubrol PX para purificação parcial da enzima conforme item II.3.7.

A tabela III.4 mostra o efeito da exposição à luz por 4 horas a 4°C sob agitação suave com lâmpada fluorescente da enzima parcialmente purificada. Verificou-se que há um aumento na atividade da enzima irradiada em relação ao controle, confirmando a sua fotorreativação.

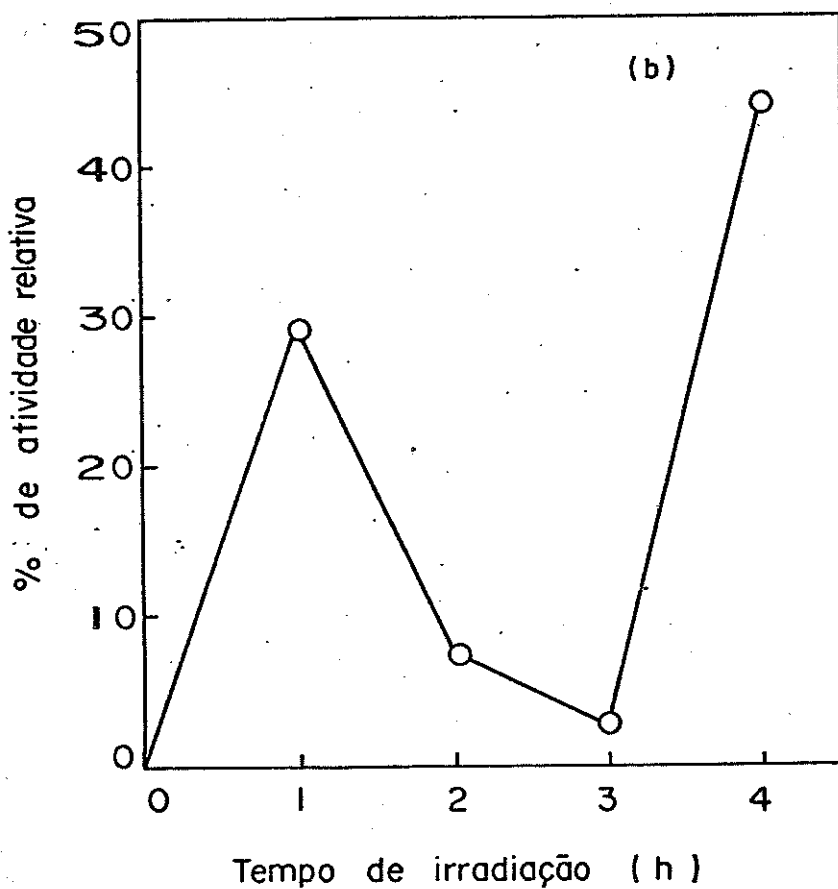
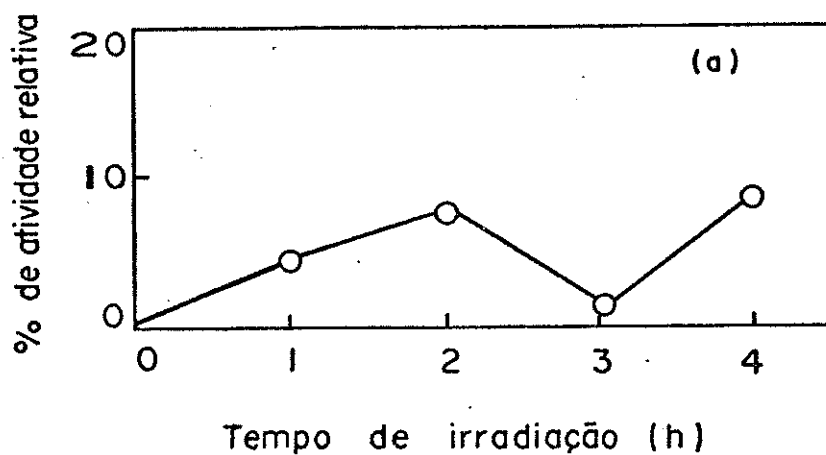


Fig. III.18 Gráfico da porcentagem de atividade relativa da enzima microssomal UDP-GE (1,3 mg/ml de proteína por ensaio) determinado pela glucuronidação do p-nitrofenol com o tempo de irradiação. Irradiado com lâmpada fluorescente, vel. fluência $9,5 \times 10^{-4}$ W/cm²s. (a) 15 min. de reação, (b) 30 min. de reação.

Tabela III.4 Efeito da luz sobre a enzima microsossomal solubilizada com 1% de lubrol PX

tempo de reação (min.)	% de atividade medida pela glu curonidação d p-nitrofenol	
	<u>irradiado</u>	<u>controle</u>
15	4,3	2,1
30	13,0	6,5

10.2. Medida da atividade da enzima microsossomal UDP-GT ir
radiada frente á BR.

Sendo a BR UDP-GT uma enzima de grande interessé nos meios clínicos e pediátricos, procurou-se utilizar a BR como sub
trato para determinação de sua atividade após ser fotorreativada.

Para testar o método de conjugação de BR com ácido glucurônico através da enzima UDP-GT microsossomal, mediu-se inici
almente a quantidade de BR conjugada para vários tempo de incuba
ção. A fig.III.19, mostra a curva obtida para essa interação acom
panhando através da formação do composto diazo conforme descrito
no item II.3.8.2. pag. 36

Em seguida, irradiou-se a enzima microsossomal (20mg/dl de proteína) por 4 horas a 4º C como descrito no item II.3.9.2 pag. 37, e mediu-se a atividade enzimática frente a BR em 30 min. de incubação a 37ºC. A fig. III.20 mostra uma inibição de 54% na conjugação de BR quando comparada com o controle.

Para aproximar-se mais do efeito da fototerapia re
alizou-se, "in vitro", o seguinte experimento: irradiou-se o sis
tema de reação BR/UDP-GA/UDP-GT por 30 min. com lâmpada fluores-

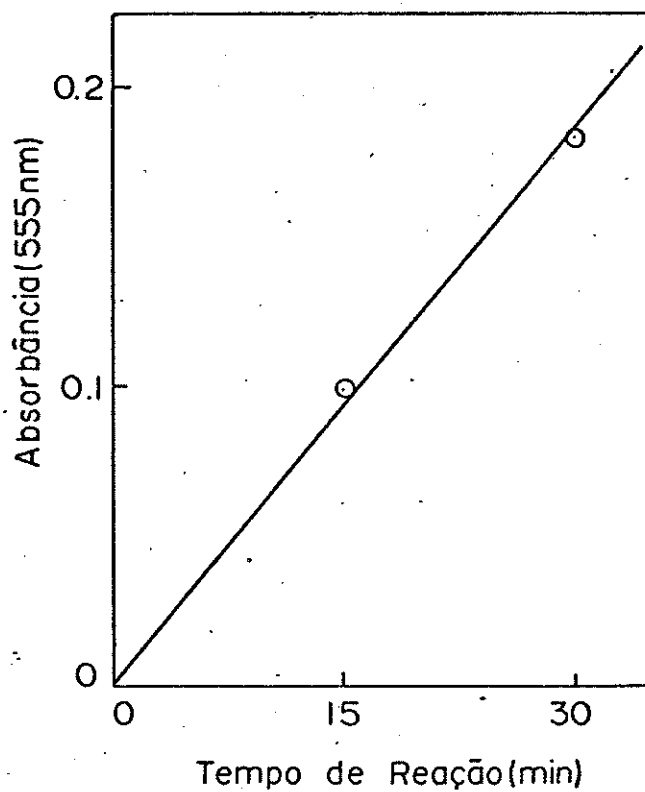


Fig.III.19 Cinética da conjugação de BR com UDP-GA, acompanhada pela formação do composto diazo medido a 555nm. Concentração da enzima 2,0 mg/ml de proteína por ensaio.

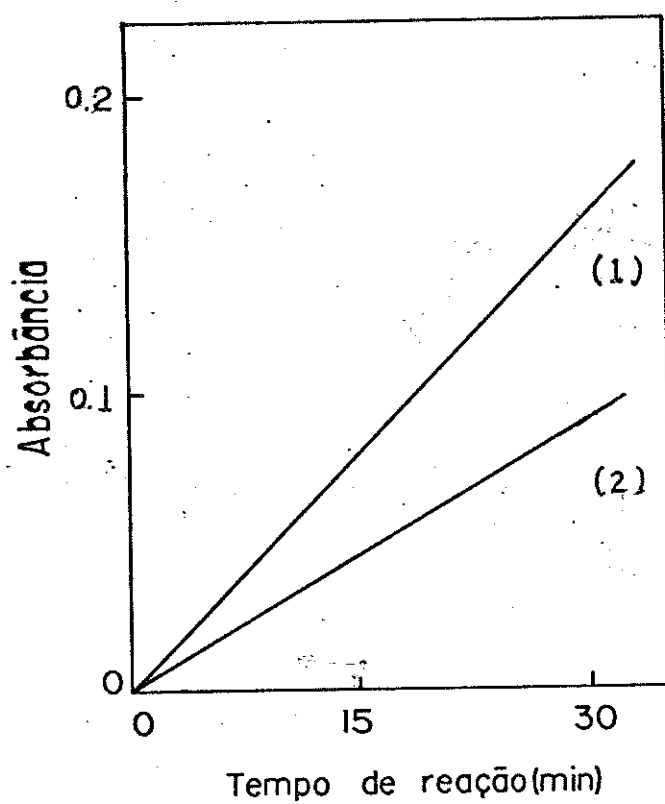


Fig.III.20 Inibição da conjugação de BR com ácido glucurônico pela ação da enzima UDP-GT, irradiada por 4h, acompanhada pela formação do composto diazo (1) controle; (2) irradiado.

cente e se observou uma inibição de 24% com relação ao controle. Isto indica que pode haver uma fotodegradação da BR impedindo sua conjugação com UDP-GA.

Com intuito de se verificar-se o fotoisômero PBR-HSA que se forma pela ação da luz sobre BR-HSA poderia influir na atividade enzimática, irradiou-se o complexo BR-HSA em 430 nm por 0, 7, 15 e 30 minutos. Observou-se então, uma inibição de 40% e 57% a 7 e 15 min. de irradiação, respectivamente e, indícios de um aumento de 35% na conjugação a 30 min. de irradiação. Estes resultados podem ser verificados na fig. III.21.

Esta inibição, provavelmente, pode ter ocorrido devido a formação de 13% de PBR a 7 min. e 21% de PBR a 15 min de irradiação. O aumento na conjugação aos 30 min. de irradiação pode ser devido à formação de um fotoequilíbrio entre BR-HSA e PBR-HSA. A porcentagem de PBR formada durante a irradiação é verificada pelo decréscimo na intensidade de fluorescência com o tempo, e o estado estacionário quando a intensidade de fluorescência torna-se constante, conforme descrito por Lamola e col. (62).

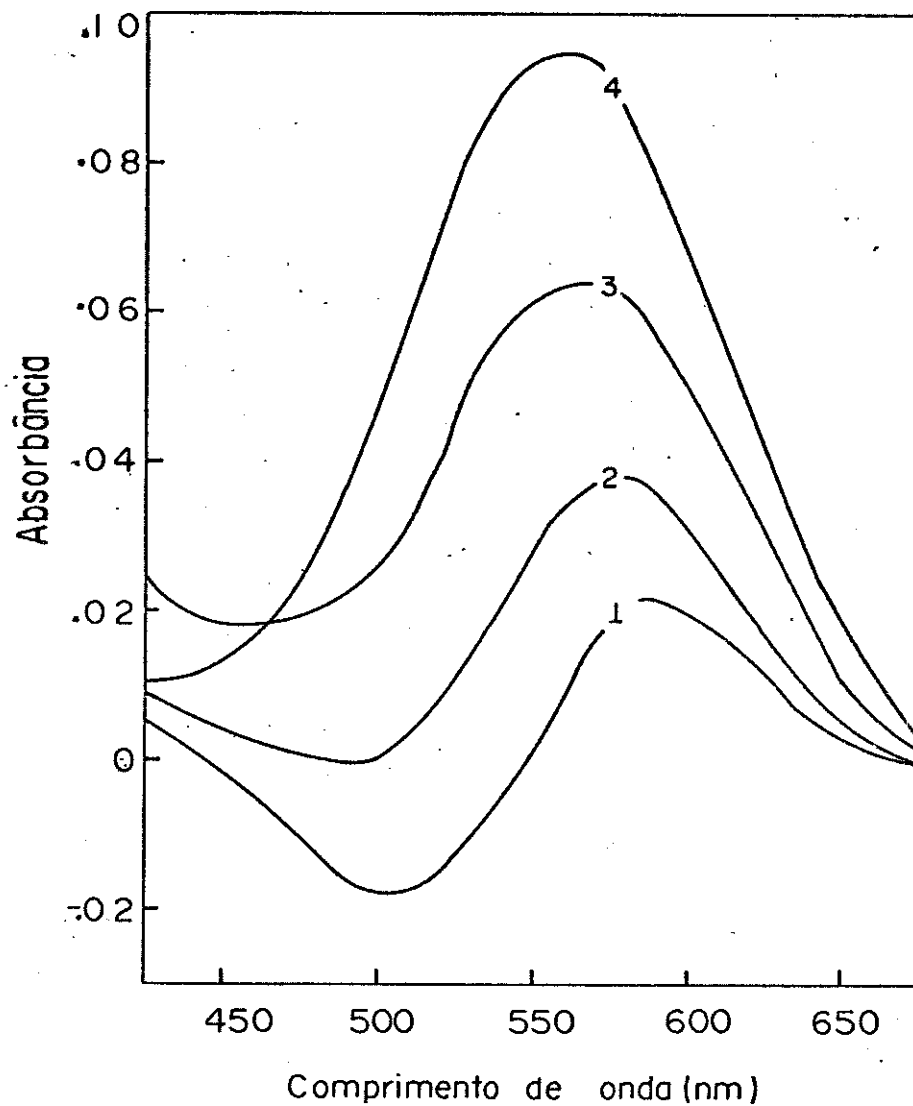


Fig. III.21 Espectro de absorbância do pigmento azo formado por BR conjugada a 30 min. de incubação. (3) BR-HSA (2:1) a 0 min; (2) a 7 min ; (1) a 15 min. e (4) 30 min. de irradiação.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO

IV.1 Análise de BR

Antes de entrarmos na conclusão direta dos resultados convém lembrar alguns conceitos básicos de BR total (BR-T), direta ou conjugada (BR-D) e indireta ou livre (BR-I), classificação esta baseada nas diferentes reatividades frente ao reagente diazo de Ehrlich.

A leitura fotocolorimétrica ou espectrofotométrica da reação direta é feita entre 10 a 30 minutos após a adição do reagente. Adicionando-se um acelerador (álcool, cafeína e outros), desenvolve-se uma coloração, proporcional à concentração de BR-T. A diferença entre as leituras de BR-T e BR-D equivale a quantidade de BR-I. Na prática clínica, interpreta-se as BR de reação direta e indireta como conjugada e não conjugada com ácido glucurônico, respectivamente.

BR-D portanto, é o diglucuronídeo de BR hidrossolúvel, transportado no plasma pela albumina e as 2α globulinas. Não é tóxica, e em casos de superprodução pode ser eliminada facilmente pelo rim. Seu valor normal aceito em meio clínico é de 0,4 mg/dl de plasma.

BR-I é todo pigmento que reage com reagente diazo em meio hidroalcolico, compreendendo, assim, a BR não conjugada nem ligada à HSA, isto é, totalmente livre. É altamente tóxica, e seus valores normais não ultrapassam a 1,0 mg/dl de plasma.

Assim, a determinação de BR baseada no método de reagentes diazo analisa toda a BR em soros, tanto ligada como a não

ligada. O método fluorimétrico por sua vez, determina a BR ligada ao sítio principal da HSA e, na presença do detergente DDAO a BR total a qual inclui BR ligada aos sítios secundários da albumina.

Sendo que em soro existe outras proteínas além de HSA, que podem ligar a BR, observa-se que a curva padrão obtida com soro é devida somente à ligação HSA-BR por comparação com a titulação fluorescente de HSA em tampão PBS (fig.III.4, pag. 47), na qual se verificou não haver diferença entre as duas curvas.

Verifica-se também, que após a saturação de todos os sítios, moléculas adicionais de BR não causam variações observáveis na sua fluorescência. O valor da saturação correspondeu também às ligações de BR-HSA na proporção de 1:1.

O fato de se ter encontrado valores de BR total mais altos com o método fluorimétrico do que com o método diazo, coincide com as observações de Brow e col. (65). Como o método fluorimétrico mede a BR-T, onde são incluídos a BR conjugada e a não conjugada, explica-se este aumento pela presença de uma maior quantidade de BR conjugada a qual apresenta um rendimento quântico de fluorescência de aproximadamente 2,5 vezes maior que a BR não conjugada. Assim eles observaram que em amostras com alto nível de BR-D, tanto BR-T como BR ligada à HSA apresentavam valores muito altos, isto é, 1 mg/dl de BR-D correspondia a 2,5 mg/dl no método hemato fluorimétrico.

Sendo que as amostras de soros de adultos obtidos para a análise apresentavam altos valores de BR-D (tabela III.1) exceto em duas amostras, poder-se-ia explicar os resultados obtidos usando-se o mesmo argumento de Brow e col. (65).

Ao se analisar amostras com baixo nível de BR direta ($\leq 0,7$ mg/dl) observou-se a mesma diferença entre os métodos fluorimétricos e diazo, sendo esta diferença menor do que a observada em soros de adultos (aproximadamente a metade). Este fato nos

levou a questionar a eficiência do método na determinação de BR conjugada e a não conjugada. Como as amostras de adultos utilizados tinham altos níveis de BR direta (BR conjugada) e as crianças baixos níveis de BR direta, há necessidade de se realizarem estudos mais detalhados para atribuir o efeito do aumento de fluorescência como sendo devido à alto nível de BR direta, como citado anteriormente.

Por outro lado, a diferença encontrada em amostras de adultos e crianças nos leva a pensar na existência de uma diferença na intensidade de ligação de BR-HSA nessas amostras. Jacobsen e col. (67) têm demonstrado que a ligação efetiva de BR à HSA em soros de crianças é menor do que em soros de adultos. Wennberg e col. (68) têm atribuído esta diferença a competidores de BR pela ligação.

A diferença na ligação de BR à HSA entre adultos e crianças pode ser verificada nas diferentes inclinações da curva de BR-T (método fluorimétrico) versus BR-T (método diazo) para as amostras de adultos e crianças (fig. III.11 e III.12). A inclinação da curva de adultos aproximadamente 2 vezes maior do que a de crianças é um indício de que a constante de ligação para crianças é 2 vezes menor.

A explicação para o alto valor de BR no método fluorimétrico, ainda é obscuro, uma vez que se utiliza o próprio soro nas determinações de ligação BR-HSA na curva padrão com a adição de BR comercial a qual contém somente BR não conjugada, ao passo que a BR em amostras de soros ictericos contém BR conjugada e BR não conjugada. Se somarmos este fato à diferença na ligação BR-HSA entre soros de adultos e crianças, podemos concluir, que realmente a BR direta contribui para a eficiência de fluorescência, tanto a baixos níveis como a altos níveis. No entanto, para uma explicação mais conclusiva há necessidade de realizar estudos

da propriedade fluorescente de BR conjugada-ligada e não ligada à HSA. Isto é, um estudo da formação do complexo BR-HSA, a diversos níveis de BR conjugada.

IV.2 Fotorreativação

Nos estudos da irradiação da enzima UDP-GT com lâmpada fluorescente por 4 horas a 4°C, observou-se uma fotorreativação da enzima frente a p-nitrofenol como substrato, mas não frente a BR. Isto, talvez, reflita a possível heterogeneidade da enzima UDP-GT (19). Mahu e col. (69) têm observado uma diferença na atividade de UDP-GT frente a esses dois substratos. No entanto, ainda não se tem resolvida essa questão.

A eficiência da fototerapia em crianças com hiperbilirrubinemia, é demonstrada pela excreção da BR na forma de seu fotoisômero PBR (fig. I 8, pag. 20) de conformação menos lipofílica revertendo-se rapidamente a BR dentro da bile. Estudos recentes (70), têm demonstrado que a fotoisomerização configuracional de BR-HSA é estereoespecífica e somente o isômero Z,E é formado. Assim sendo, podemos tentar explicar a inibição parcial na atividade enzimática verificada com PBR-HSA, levantando a hipótese de que na irradiação até os 15 min. tem-se uma mistura de isômeros Z,Z e Z,E dos quais a enzima é capaz de reconhecer somente as formas de isômeros Z,Z. No momento em que os isômeros atingem o estado estacionário, isto é, um fotoequilíbrio de $BR-HSA \rightleftharpoons PBR-HSA$, a enzima não é mais capaz de diferenciar um isômero do outro, favorecendo, assim, a conjugação.

É indubitável que o fotoisômero é excretado sem conjugação na bile, no entanto, nenhum estudo isolado tem sido realizado, "in vitro", para a verificação da afinidade de PBR com ácido

glucurônico através da ação da enzima UDP-GT.

V. Aspectos relevantes e projeções

O método fluorimétrico desenvolvido em nosso laboratório, utiliza cela de ângulo reto e fornece alto valor de BR-T e ligada à HSA quando comparada com o método diazo, sendo 4,3 vezes maior para adultos e 2,1 vezes maior para crianças. No entanto, esse valor foi proporcional a todos os níveis de BR direta analisadas em amostras de adultos e crianças, permitindo, então realizar correções. Assim sendo, apesar de não encontrarmos uma explicação plausível para esse fato, e convictos de que o número de amostras (10 casos de adultos e 20 casos de crianças) não pode ser considerada como dados estatísticos, e podemos citar alguns aspectos positivos e negativos:

1- Existe uma correlação no nível de BR-T determinada fluorimetricamente, com BR-T determinado pelo método diazo, nas amostras de adultos bem como de recém-nascidos.

2- Existe uma correlação no nível de BR-HSA determinada fluorimetricamente, com BR-T determinado pelo método pelo método diazo, sendo que o valor de BR-HSA é ligeiramente menor do que BR-T.

3- O método é rápido, não leva mais do que 5 min. e utiliza pequenas quantidades de soro, menores do que 63 μ l.

4- O método fornece maiores informações da BR no soro, conseqüentemente é promissor para estudos de pesquisa a nível médico e químico.

5- Existe um inconveniente devido a não permitir análises com amostras com níveis de BR total maiores que 17 mg/dl.

6- A enzima UDP-GT pode ser fotorreativada com irradiação com lâmpada fluorescente por 4 horas, tendo p-nitrofenol co-substrato, mas não com BR.

7 - BR-HSA e PBR-HSA comportam-se diferentemente como substratos da enzima UDP-GT "in vitro". Isto pode abrir novas perspectivas para estudos enzimáticos de UDP-GT frente a BR-HSA e PBR-HSA, uma vez que nos estudos da excreção de BR na bile sob a ação da luz azul, foram realizados somente com ratos Gunn os quais possuem deficiência congênita da enzima UDP-GT.

APENDICE I

1. Cálculo da constante de associação de BR-albumina

a- Método de supressão da fluorescência da albumina

O gráfico I mostra uma titulação fluorescente típica de albumina onde sua fluorescência intrínseca é suprimida por moléculas de BR. As curvas a, b e c representam os resultados experimentais com o aumento da concentração de albumina. A fração de BR ligada, no ponto "p" é dado por: $x/(x+y)$.

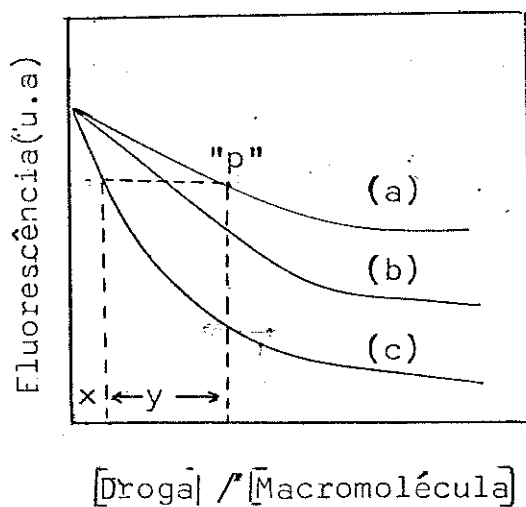


Gráfico I

Conhecendo-se a fração de BR ligada em qualquer ponto e a concentração de BR total (BR adicionada neste ponto) durante a titulação, obtém-se a concentração de BR ligada:

$$[\text{BR}] \text{ ligada} = \frac{x}{x+y} \cdot [\text{BR}] \text{ total}$$

como,

$$[\text{BR}] \text{ livre} = [\text{BR}] \text{ total} - [\text{BR}] \text{ ligada}$$

calcula-se a $[\text{BR}]$ livre. A constante de associação é, então, determinada no gráfico de Scatchard gráfico 2, conforme a relação

$$\frac{r}{D} = K_a n - K_a r$$

onde:

r = número de BR ligada por mol de albumina

D = concentração molar de BR livre

K_a = constante de associação (M^{-1}) para a interação

n = número de sítios de ligação por molécula de albumina.

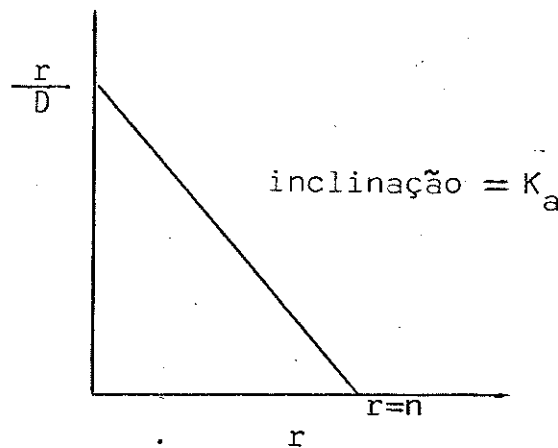


Gráfico 2

b- Método do aumento de fluorescência da BR.

Realiza-se titulação fluorescente com concentrações de BR fixas e com concentrações de albumina fixa.

Supondo-se que no primeiro caso, quando não se obser

va mais um aumento na intensidade de fluorescência, toda bilirrubina está ligada e que a fluorescência observada, f_b , está relacionada à concentração de BR ligada, tem-se a expressão:

$$[BR] = p \cdot f_b \quad \text{eq. 1}$$

onde p é uma constante de proporcionalidade. Conhecendo-se a concentração de BR pode-se calcular p .

Com os dados da segunda titulação, se o aumento no rendimento quântico de fluorescência de BR é o mesmo em todos os sítios de ligação, em qualquer ponto da titulação quando o complexo tem uma fluorescência f , a concentração de BR ligada será dada pela equação (1). Conhecendo-se a concentração de BR total (BR adicionada), calcula-se a concentração de BR livre pela expressão:

$$[BR] \text{ total} - [BR] \text{ ligada} = [BR] \text{ livre}$$

Calcula-se, então, a constante de associação por meio do gráfico de Scatchard. Onde a inclinação da reta = K_a

APENDICE II

1. Celas de Geometria de Angulo Reto (RA) e Face Frontal (FF)

A fluorescência característica de uma solução é normalmente estudada empregando-se dois tipos de geometria. A de uso mais comum, é a geometria de ângulo reto utilizada para soluções diluídas e a de geometria de face frontal utilizada para soluções concentradas.

A fig. 1 mostra uma comparação esquemática da forma das duas celas.

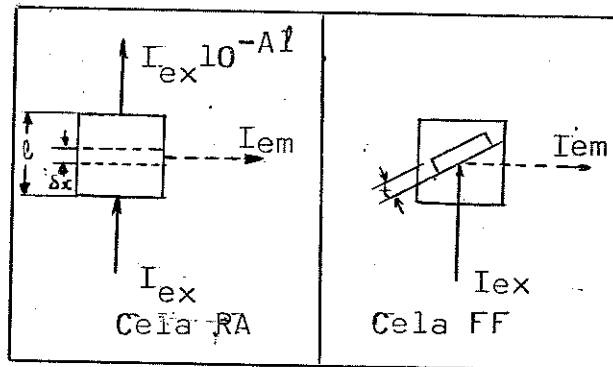


Fig.1 Celas de geometria de ângulo reto e face frontal.

Na cela de geometria de ângulo reto os raios óticos de emissão e excitação são perpendiculares e penetram pelo centro da face da cela. A intensidade de luz excitante na cela é de $I_{ex}^{-A l/2}$ onde A é a absorvância por cm da amostra no comprimento de onda de excitação. Ignorando artefatos, tais como espalhamento da luz, transferência de energia e absorção própria a intensidade

de fluorescência será:

$$I_{RA} = G \phi \frac{A_T}{A_F} \times \left[10^{-A_T(1-\delta x)/2} - 10^{-A_T(1+\delta x)/2} \right] I_{ex} \quad (1)$$

onde A_F e A_T são os fluoróforos e absorvância total da amostra respectivamente, ϕ é o rendimento quântico de fluorescência e G um fator característico do fluorímetro.

Quando a condição $1/2 A_T \delta x \ll 1$ é satisfeita, a expressão entre parenteses da equação (1) pode ser simplificada, permanecendo somente o termo linear em $A_T \delta x$ e escrevendo a razão A_T/A_F como R_A a eq. (1) torna-se :

$$I_{RA} = G \phi R_A [A_T (\delta x)] I_{ex} \quad (2)$$

$$= G \phi A_F (\delta x) I_{ex} \quad (3)$$

A_F é proporcional à concentração do fluoróforo e a linearidade entre a intensidade fluorescente e concentração são expressados na equação (3).

Na cela de geometria de face frontal, o máximo de fluorescência é emitido através da superfície da face. A cela de face frontal é inclinada em um ângulo maior que 45° . Esse ângulo pode ser 34° ou 56° dependendo de como o adaptador da cela de face frontal é colocado no compartimento da amostra.

A intensidade de emissão é

$$I_{FF} = G \phi R_A I_{ex} \quad (4)$$

onde G é o mesmo fator geométrico e R_A a mesma razão da eq.(2) e onde se supõe que toda a luz excitante é absorvida pela amostra quando a condição

$$A_T t \geq 1 \quad \text{é satisfeita}$$

Da equação (2) e (3) obtem-se a razão:

$$\frac{I_{FF}}{I_{RA}} = \frac{1}{A_T (\delta x)} \quad (5)$$

onde A_T refere-se à absorbância total da solução diluída na cela de ângulo reto e as condições $1/2 \cdot A_T \leq 1$ e $A_T t \geq 1$ são satisfeitas.

Nota-se que em absorbância suficientemente altos a I_{FF} depende somente da razão A_F / A_T e é independente de A_T .

No caso do uso de cela de ângulo reto, a intensidade de emissão é independente de A_F / A_T e é proporcional a A_F .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - R.C. Burstine e R. Schmid, "Solubility of bilirubin in aqueous solutions", Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 109, 356-358 (1962)
- 2 - R. Brodersen e J. Theilgaard, "Bilirubin colloid formation in neutral aqueous solutions", Scand. J. Clin. Lab. Invest. 24 , 395-398 (1969)
- 3 - L.M. Gartner, R.N. Snyder, R.S. Chabon e J. Bernstein, "Kernicterus, high incidence in premature infants with low serum bilirubin concentrations", Pediat. 45, 906-917 (1970)
- 4 - R.C. Harris, J.F. Lucey e J.R. Maclean, "Kernicterus in premature infants associated with low concentrations of bilirubin in the plasma" Pediat. 21, 875-884 (1958)
- 5 - T.R. Boggs, J.B. Hardy e J.M. Frazier, "Correlation of neonatal serum total bilirubin concentrations and developmental status at age eight months", J. Pediat. 71, 553-560 (1967)
- 6 - F.H. Jansen e Devriendt, "Structure and biological origins of isomeric (III-, IX- and XIII-) bilirubins", Arch. Int. Physiol. et. Biochem. 80, 969-970 (1972)
- 7 - R. Brodersen, "Bilirubin solubility and interaction with albumin and phospholipid", J. Biol. Chem. 354, 2364-2369 (1979)
- 8 - R. Brodersen, "Binding of bilirubin to albumin", CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 11 , 305-399 (1979)

- 9 - A. E. Myshkin e V.N. Sakharov, "The photochemistry of bilirubin", Russian Chem. Rev. 51, 40-50 (1982)
- 10 - R. Bonnett e J.C.M. Stewart, "Photo-oxidation of bilirubin in hydroxylic solvents", J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 224-231 (1975)
- 11 - I.B.C. Matheson, G.J. Faini e J. Lee, "Low-temperature absorption and fluorescence spectra and quantum yields of bilirubin", Photochem. Photobiol. 135-137 (1975)
- 12 - R. Bonnett, J. Dalton e D.E. Hamilton, "Luminescence of bilirubin" J. Chem. Comm., 639-640 (1975)
- 13 - R.E. Chen; "The fluorescence of bilirubin-albumin complexes;" em "Fluorescence Techniques in Cell Biology". (A.A. Thayer e M. Sernetz, eds.), Springer-Verlag; New York, p. 273-282, 1973
- 14 - P. Ehrlich, "Sulfodiazobenzol, ein reagens anf bilirubin" Centr. Klin. Med. 4, 721-723 (1883)
- 15 - G.G. Neyro, M.H. Vernengo Lima e C. Esquenazi, "Hiperbilirubinemia perinatal", Clin. Bioquim. Acta Biochem. Clin. Latinoam. 13, 215-242 (1979)
- 16 - A.A.H. Vander Bergh e J. Snapper, "Die Farbstoffe des blutserum" Deut. Arch. Klin. Med. 110, 540-561 (1913)
- 17 - P. G. Cole, G. Lathe e B. Billing, "Separation of the bile pigments of serum, bile, and urine" Biochem. J. 57, 514-518 (1954)

- 18 - B.H. Billing, P.G. Cole e G.H. Latehe, "Excretion of bilirubin as a diglucuronide giving the direct van den Bergh reaction". *Biochem. J.* 65, 774-784 (1957)
- 19 - C.B. Kasper e D. Henton, "Glucuronidation" em "Enzymatic Basis of Detoxication", (W.B. Jakoby, ed.), Academic Press New York, v.II, p. 4-27, 1980
- 20 - G.J. Mulder, "The effect of phenobarbital on the submicrosomal distribution of uridine diphosphate glucuronyltransferase from rat liver" *Biochem. J.* 117, 319-324 (1970)
- 21 - J.P. Gorski e C.B. Kasper, "Purification and properties of microsomal UDP-glucuronosyltransferase from rat liver" *J. Biol. Chem.* 252, 1336-1343 (1977)
- 22 - P.L.M. Jansen e I.M. Arias, "Delipidation and reactivation UDP-glucuronosyltransferase from rat liver". *Biochem. Biophys. Acta.* 391, 28-38 (1975)
- 23 - B. Burchell, "Substrate specificity and properties of uridine diphosphate glucuronyltransferase purified to apparent homogeneity from phenobarbital-treated rat liver", *Biochem. J.* 173, 749-757 (1978)
- 24 - R.J. Cremer, P.W. Perryman e D.H. Richards, "Influence of light on the hyperbilirubinemia of infants" *Lancet*, 1, 1094-1097 (1958)
- 25 - P.M.G. Broughton, E.J.R. Rossiter, C.B.M. Warren, G. Goulis e P.S. Lord, "Effect of blue light on hiperbilirubinemia." *Arch. Dis. Childh.* 40, 666-671 (1965)

- 26 - E. Croso, D. Delascio e A. Guariento, "La fototerapia nella cura della malattia emolitica del neonato" *Minerva Pediat.* 16, 131-134 (1964)
- 27 - H.C. Ferreira, A. Berezin, D. Barbieri e N.M.Larrubia, "A su per iluminação no tratamento das hiperbilirrubinemias do recém-nascido", *Rev. Ass. Med. Brasil*, 6, 201-209 (1960)
- 28 - P. Caredu e A. Marini, "Stimulating bilirubin conjugation", *Lancet* 1, 982-983 (1968)
- 29 - O. Mellone, "Tratamento da hiperbilirrubinemia do recém-nascido por foco de luz intensa", *Rev. Paul. Med.* 57, 47-54 (1960)
- 30 - E. Peluffo, J. C. Beltran, A. Malinger, W. Giguens, P.V. Vidigal, J. Lorenzo Y de Ibarreta e C. Goldaracena, "Luminoterapia en las ictericias del recién nacido", *Arch. Ped. Urug.* 33, 98-105 (1962)
- 31 - J. Lucey, M. Ferriero e J. Hewitt, "Prevention of hyperbilirubinemia of prematurity by phototherapy", *Pediat.* 41, 1047-1054 (1968)
- 32 - T.R.C. Sisson, "Visible light therapy of neonatal hyperbilirubinemia", em "Photochemical and Photobiological Reviews", (K.C.Smith, ed.), Plenum Press, New York, v. 1, p. 241-263, 1976
- 33 - A. F. McDonagh, "The role of singlet oxygen in bilirubin photo-oxidation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 1306 - 1311 (1971).

- 34 - J.D. Ostrow, "Photocatabolism of labelled bilirubin in the congenitally jaundiced (Gunn) rat.", J.Clin. Invest. 50 , 707-718 (1971)
- 35 - H.T. Lund e J. Jacobsen, "Influence of phototherapy on the biliary bilirubin excretion pattern infants with hyperbilirubinemia", J. Pediat. 85, 262-267 (1974)
- 36 - A.E. McDonagh, L.A. Palma e D.A. Lightner, "Blue light bilirubin excretion", Science 208, 145-151 (1980)
- 37 - A.N. Cohen e J.D. Ostrow, "New concepts in phototherapy: Photoisomerization of bilirubin IX and potencial toxic effect of light". Pediat. 65, 740-750 (1980)
- 38 - J.D. Ostrow e R.V. Branham, "Photodecomposition of bilirubin and biliverdin in vitro", Gastroenterology 58, 15-25 (1970)
- 39 - E.A. Zenone, M.S. Stoll e J.D. Ostrow, "Mechanism of excretion of unconjugated bilirubin during phototherapy", Gastroenterology 72, 1180 (1977)
- 40 - D.A. Lightner, " In vitro photooxydation products of bilirubin", em "Phototherapy the Newborn: An Overview", (G.B. Odell e R.S. Shaffer, A.P. Simopoulos, eds), National Academy of Sciences, Washington, p.34-55 , 1974.
- 41 - A.F. McDonagh, "Phototherapy and hyperbilirubinemia" Lancet 1, 339 (1975).

- 42 - A.F. Mc Donagh, D.A. Lightner, A. Wooldridge, "Geometric isomerization of bilirubin and its dimethyl ester" JCS Chem. Comm. 3, 110-112 (1979).
- 43 - D.A. Lightner, T.A. Wooldridge, A.F. McDonagh, "Configurational isomerization of bilirubin and the mechanism of jaundice phototherapy", Biochem. Biophys Res. Comm. 86, 235-243 (1979)
- 44 - A.K. Brown, W.W. Zuelzer, "Studies on the neonatal development of the glucuronide conjugating system", J. Clin. Invest. 37, 332-340 (1958)
- 45 - G.H. Lathe e M. Waler, "Synthesis of bilirubin glucuronide in animal and human liver". Biochem. J. 70, 705-712 (1958)
- 46 - B. Childs, J.B. Sidbury e C.J. Migeon, "Glucuronic acid conjugation by patients with familial nonhemolytic jaundice and their relatives", Pediatr. 23, 903-913 (1959)
- 47 - R.A. Yeary, K.J. Wise e D.K. Davis, "Activation of hepatic microsomal glucuronyltransferase from Gunn rats by exposure to light", Life Science 17, 1887-1890 (1975)
- 48-- T.R. Sisson, B. Granati, R. Sonawane, T. Fiorentino. "Effect of light on the perfused Gunn rat liver". Pediatr. Des. 12, 399 (1978)
- 49 - A. Kelner, "Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from ultra violet irradiation injury Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 35, 73-79 (1949)

- 50 - R. Dulbecco, "Experiments on photoreactivation of bacteriophages inactivated with ultraviolet radiation", *J. Bacteriol.* 59 329-347 (1950)
- 51 - J. Jagger, "Photoprotection from far ultraviolet effects in cells", *Advan. Chem. Phys.* 7, 584-601 (1964)
- 52 - A.A. Lamola, J. Einsinger, W.E. Blumberg, S.C. Patel e J. Flores, "Fluorometric study of the partition of bilirubin among blood components: Basis for rapid microassays of bilirubin and bilirubin binding capacity in whole blood", *Anal. Biochem.* 100, 25.42 (1979).
- 53 - J.G. Calvert, J.N. Pitts, em "Photochemistry", (J.G. Calvert e J.N. Pitts, eds), John Wiley e Sons, Inc. New York, p. 737-739, 1966
- 54 - G. Gomori, "Preparation of buffers for use in Enzyme studies" em "Methods in Enzymology", (S.P. Colowick e N.O. Kaplan, eds) Academic Press, New York, v.I, p. 138-146, 1955
- 55 - E. Layne, "Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins" em "Methods in Enzymology", (S.P. Colowick e Kaplan, eds), Academic Press, New York, v.III, p. 450-454, 1957
- 56 - F.P. Van Roy, e K.P.M. Heirwegh, "Determination of bilirubin glucuronide and assay of glucuronyltransferase with bilirubin as acceptor". *Biochem.J.* 107, 507-518 (1968)

- 57 - D. Zakim e A.D. Vessey, "Techniques for the characterization of UDP-gluconyltransferase, glucose-6-phosphatase, and other tightly-bound microsomal enzymes", em "Methods of Biochemical Analysis", (D.Glick, ed.), John Wiley e Sons, New York, v.21 p. 2-37, 1973
- 58 - T.B. Doumas, W.A. Watson e G. H. Biggs, "Albumin Standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green" Clin. Chim. Acta, 31, 87-96 (1971)
- 59 - F.C. Chignell, "Fluorescence spectroscopy-a tool for studying drug interactions with biological systems" em "Methods in Pharmacology. Physical Methods", (F.Chignell e A. Schwartz, eds), Meredith Corporation, New York, v. 2, p. 33-61, 1972
- 60 - B. Burchell e P. Weatherill, "4-nitrophenol UDP-glucuronyltransferase (rat liver)" em "Detoxication and drug metabolism: conjugation and related systems", (W.B.Jakoby, ed), Academic Press, v. 77, p. 169-176, 1981
- 61 - H. Bellet e A. Raynaud, "An assay of bilirubin UDP-glucuronyltransferase on needle-biopsies applied to gilbert's syndrome", Clin. Chim. Acta 53, 51-55 (1974)
- 62 - A.A. Lamola, W.E. Blumberg, R. McClead e A. Fanaroff, "Photoisomerized bilirubin in blood from infants receiving photo-therapy." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 1882-1886 (1981)
- 63 - J. Eisinger e J. Flores, "Front-face fluorometry of liquid samples", Anal. Biochem. 94, 15-21 (1979)

- 64 - W.E. Blumberg, J. Einsinger, A.A. Lamola e D.M. Zercherman, "Zinc protoporphyrin level in blood determined by a portable hematofluorometer: a screening device for lead poisoning," J. Lab. Clin. Med. 89, 712-723 (1977)
- 65 - A.K. Brow, J. Eisinger, W.E. Blumberg, J. Flores, G. Boyle e A.A. Lamola, "A rapid fluorometric method for determining bilirubin levels and binding in the blood of neonates: Comparisons with a diazo method and with 2-(4'-hydroxybenzene) azobenzoic acid dye binding. Pediatrics 65, 767-776 (1980)
- 66 - W.J. Cashore, W. Oh, W. E. Blumberg, J. Einsinger e A.A. Lamola, "Rapid fluorometric assay of bilirubin and bilirubin capacity in blood of jaundiced neonates: comparasions with other methods" Pediatrics 66, 411-416 (1980)
- 67 - J. Jacobsen e R.P. Wennberg, "Determination of unbound bilirubin in the serum of newborns", Clin. Chim. Acta, 20, 783-789 (1974)
- 68 - R.P. Wennberg, C.E. Ahlfors e L.F. Rasmussen, "The pathochemistry of kernicterus" Early Hum Devel. 314, 353-372 (1979)
- 69 - J.L. Mahu, A.M. Preaux, P. Mavier e P. Berthelot, "Characterization of microsomal bilirubin and p-nitrophenol uridine diphosphate glucuronosyltransferase activities in human liver: A comparison with rat liver". Enzyme 26, 93-102 (1981)
- 70 - A.A. Lamola, J. Flores e W.E. Blumberg, "Binding of Photobilirubin to human serum albumin estimate of the affinity constant", Eur. J. Biochem. 132, 165-169 (1983)

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

- 1- C. M. Abe, N. Durán, "Adaptação do Método Fluorescente para determinação de Bilirrubina no sangue durante Fototerapia", XI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril 1982, Caxambú-MG., Brasil.
- 2- C.M.Abe, N. M. Barbosa e N. Durán, "Fluorescência de BR em Plasma", 4º Encontro Regional de Química, Novembro 1982, São Carlos-SP, Brasil.
- 3- N. M. Barbosa, C. M. Abe, "Processos Fotoquímicos na Fototerapia de Hiperbilirrubinemia"; VII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Biofísica, Dezembro 1982, Rio de Janeiro R.J, Brasil.
- 4- C.M. Abe, N. Duran, "Determinação da Constante de Ligação do Complexo Bilirrubina-Albumina Humana por Fluorescência." XII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril 1983, Caxambú-MG, Brasil.