

1. Introdução

1.1 Introdução

A Na^+, K^+ -ATPase, presente em quase todas células eucarióticas superiores, é uma enzima que utiliza a energia liberada pela hidrólise de ATP, em presença de Mg^{2+} , para transportar Na^+ e K^+ . A enzima é uma bomba de cátions que converte energia química da hidrólise do ATP em trabalho mecânico e por meio de seus dois estados conformacionais principais E_1 e E_2 transportam sódio (3Na^+) e potássio (2K^+) através da membrana plasmática, criando dessa maneira seus respectivos gradientes eletroquímicos que são tão importantes para as funções vitais da célula. A Na^+, K^+ -ATPase é composta de duas importantes subunidades protéicas " α " e " β ", ligadas não covalentemente e inseridas na membrana; mas é na subunidade " α " onde se encontram os sítios importantes para a atividade enzimática como o de fosforilação, de ligação do ATP e de ligação da ouabaína.

A ouabaína pertence a uma classe especial de drogas (glicosídeos cardíacos) capaz de inibir especificamente a Na^+, K^+ -ATPase, que também é o único receptor fisiológico conhecido da ouabaína. A ouabaína é um cardiotônico que consta de um açúcar e um esteróide unidos por uma ligação glicosídica. A ouabaína tem como derivado fluorescente a antroil-ouabaína (AO), a qual tem como fluoróforo o antraceno, que ligado ao açúcar da ouabaína é utilizado como sonda. A especificidade da AO pela Na^+, K^+ -ATPase e a sensibilidade da técnica de fluorescência fazem deste marcador uma importante ferramenta para o estudo da enzima, incluindo a investigação de interações com substâncias que interferem na atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

Duas propriedades importantes fazem da AO uma sonda adequada. Uma resulta do fato de que a AO, assim como a própria ouabaína, liga-se à Na^+, K^+ -ATPase apenas no estado E_2 , impedindo a volta ao estado E_1 e inibindo a função enzimática. Com essa ligação, incrementa-se a fluorescência da AO, permitindo

monitorar a enzima em seu estado conformacional E_2 . A outra propriedade é que sua cinética de ligação com a enzima é relativamente lenta, permitindo realizar estudos de cinética a partir de medidas de fluorescência no estado estacionário.

Neste trabalho, a AO ligada à Na^+, K^+ -ATPase é utilizada como sonda fluorescente na investigação dos efeitos estruturais de duas substâncias que afetam a atividade enzimática: nortriptilina, um antidepressivo tricíclico, e clorpromazina, um antipsicótico. A nortriptilina (NOR) e a clorpromazina (CPZ) são drogas usadas como agentes terapêuticos para o tratamento de distúrbios afetivos, mas o preciso mecanismo de ação e seus efeitos na função neuronal ainda não são claros. Tem sido observado que ambas as drogas inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, porém de forma diferente.

A espectroscopia de absorção e de fluorescência são duas ferramentas de investigação das propriedades de sistemas biológicos em solução. No presente trabalho utilizamos um espectrofotômetro e um espectrofluorímetro fotoestacionário, no qual as espécies são excitadas de modo contínuo por uma fonte que emite de modo contínuo, para sondar a interação de NOR e CPZ com a Na^+, K^+ -ATPase.

Do ponto de vista da foto-sensibilidade, a CPZ se diferencia da NOR por sofrer fotodegradação pela luz ultravioleta (UV). A luz ultravioleta incidente em CPZ cria espécies reativas que se ligam a aminoácidos de proteínas. A fotomarcagem de uma enzima essencial com CPZ pode servir como um dos mecanismos de fototoxicidade levando assim à morte celular.

1.2 Objetivos

Essa dissertação tem os objetivos principais seguintes:

- i. Mediante a técnica de fluorescência determinar as condições experimentais adequadas da sonda fluorescente antróil-ouabaína (AO) para determinar e monitorar os padrões de fluorescência da AO- Na^+, K^+ -ATPase nos estados conformacionais E_1 e E_2 da enzima.

- ii. Verificar os efeitos estruturais de nortriptilina sobre a Na^+, K^+ -ATPase através de fluorescência do marcador AO.
- iii. Analisar a fotodegradação da clorpromazina (CPZ) quando exposta à luz UV e o efeito da interação com Na^+, K^+ -ATPase sobre essa fotodegradação através da fluorescência da própria CPZ.
- iv. Analisar os efeitos estruturais da fotodegradação de CPZ associada à Na^+, K^+ -ATPase através da fluorescência do marcador AO.

1.3

Estrutura dos capítulos

No capítulo 2 se apresenta uma descrição das estruturas moleculares e funcionais dos sistemas biológicos como a membrana celular, a proteína Na^+, K^+ -ATPase, do glicosídeo cardíaco ouabaína e seu derivado fluorescente AO e dos fármacos como o antidepressivo tricíclico nortriptilina e o antipsicótico clorpromazina.

No capítulo 3 se apresenta uma breve descrição do fundamento teórico e experimental das técnicas de espectroscopia de absorção e emissão. No capítulo 4 se identificam os métodos e materiais empregados nas medidas experimentais e na análise dos espectros. No capítulo 5 se mostram os resultados e discussões dos efeitos de NOR e CPZ sobre a fluorescência da AO- Na^+, K^+ -ATPase e um estudo da fotodegradação da CPZ. No capítulo 6 se apresentam as conclusões do trabalho e perspectivas para novas investigações.