

2. **O sistema biológico**

2.1 **Membrana Biológica**

Toda célula é caracterizada por uma membrana plasmática, que encapsula o citoplasma e cria compartimentos internos. Além de seu papel como barreira física que mantém a integridade da célula, a membrana plasmática fornece funções necessárias para a sobrevivência da célula, incluindo exclusão de substâncias em desuso ou tóxicas, aquisição de nutrientes e fontes de energia, reprodução, locomoção e interações com componentes no ambiente. A membrana biológica é seletivamente permeável, o que permite que substâncias específicas a atravessem. Tipicamente a membrana biológica contém lipídios, proteína e carboidratos em razões que variam com o tipo de membrana. Quase sempre o carboidrato está covalentemente associado com a proteína (glicoproteína) ou com o lipídio (glicolipídio e lipo-polissacarídeos). Assim, a membrana pode ser pensada como uma matriz lipídio-protéica na qual funções específicas são levadas a cabo pelas proteínas, enquanto os lipídios são responsáveis pela barreira de permeabilidade e integridade estrutural da membrana (MIT Biology Hipertextbook, 2001).

2.1.1 **Modelo de mosaico fluido**

O modelo de membranas biológicas conhecido como mosaico fluido (mosaico porque inclui proteínas, colesterol e outros tipos de moléculas além dos fosfolipídios), proposto inicialmente por Singer e Nicolson em 1972, é o aceito atualmente. As bicamadas de lipídios são fluidos cujos fosfolipídios individuais se difundem rapidamente por toda a superfície bidimensional da membrana. Os fosfolipídios, numa membrana de célula bacteriana, podem mover-se lateralmente percorrendo-a em poucos minutos à temperatura ambiente. O tamanho da célula é

milhares de vezes maior do que o tamanho do fosfolípido. Proteínas de membranas se difundem pela membrana da mesma forma, mas em um ritmo mais lento por causa de seu grande tamanho (um fosfolípido pode ter 650 Da e uma proteína de tamanho médio pode ter 100.000 Da). De vez em quando um fosfolípido faz um "flip-flop" atravessando a membrana para o lado oposto, mas isto não é comum. Isto requer que a cabeça hidrofílica do fosfolípido passe inteiramente através do interior altamente hidrofóbico da membrana e que as caudas hidrofóbicas estejam expostas ao ambiente aquoso.

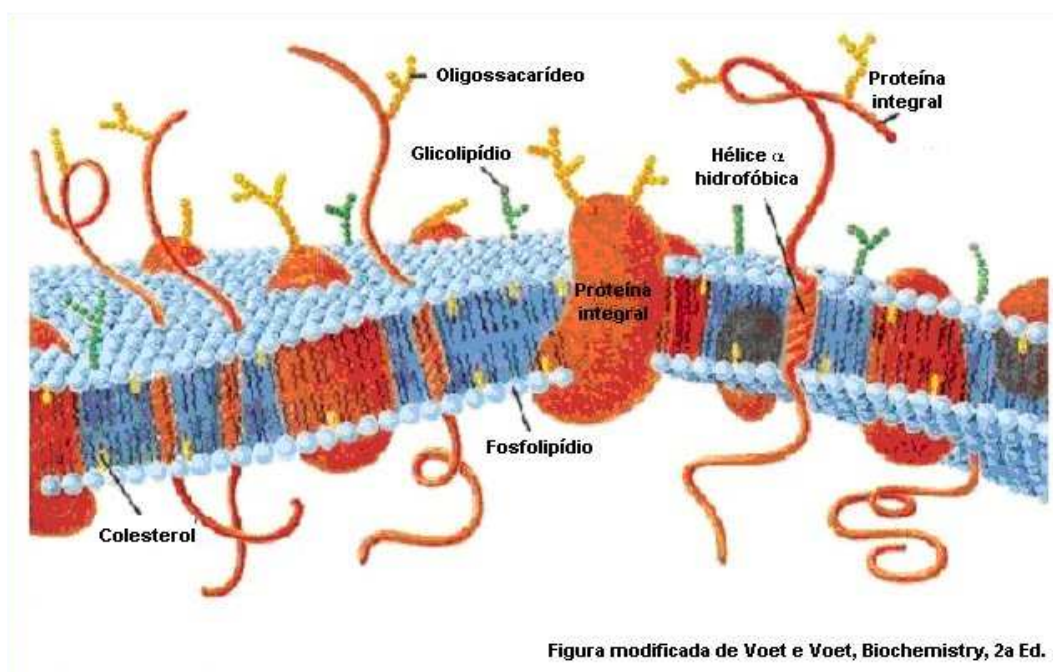


Figura 2.1 Esquema da estrutura de uma membrana biológica. Modelo de mosaico fluido (www.biof.ufrj.br/fisbio/Aula_membranas_I.pdf).

O colesterol é um componente importante das membranas biológicas. O colesterol quebra as interações de Van der Waals e diminui o empacotamento das caudas dos fosfolípidios. Este rompimento torna a membrana mais fluida. Conseqüentemente, um modo de a célula controlar a fluidez de sua membrana é regulando seu nível de colesterol. Uma outra maneira para a célula controlar a fluidez de sua membrana é regular o grau de saturação das cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolípidios. Os hidrocarbonetos saturados são cadeias retas somente com ligações simples ("saturadas" com hidrogênio), e os hidrocarbonetos insaturados têm uma ou mais ligações duplas e não são retos (não "saturadas" com

hidrogênio). Fosfolipídios com hidrocarbonetos saturados se podem compactar muito juntos e formar numerosas ligações de Van der Waals, que prendem os fosfolipídios. As cadeias de fosfolipídios insaturados impedem que os fosfolipídios consigam estar muitos juntos, diminuindo as ligações de Van der Waals.

Em membranas celulares são encontrados dois tipos gerais de proteínas: as proteínas periféricas e as proteínas integrais.

Proteínas periféricas, estão inteiramente fora da membrana, mas são ligadas a ela por forças moleculares fracas (ligações iônicas, pontes de hidrogênio ou forças de Van der Waals) e podem ser dissociadas da membrana por agentes que rompem estas ligações (altas concentrações de sais, EDTA ou uréia).

Proteínas integrais, são encaixadas na bicamada lipídica. Muitas delas estão estendidas dum lado ao outro da membrana e são chamadas proteínas transmembranares. Elas, freqüentemente, têm três domínios diferentes, dois hidrofílicos e um hidrofóbico. O domínio hidrofóbico, transmembrantar, insere-se confortavelmente na bicamada lipídica porque é feito de aminoácidos com cadeia lateral hidrofóbica. Por causa da interação dos lipídios com estes domínios transmembranares, as proteínas integrais não podem ser isoladas e purificadas bioquimicamente sem prévia dissolução com detergentes, que afastam os lipídios (MIT Biology Hipertextbook, 2001).

As proteínas têm quatro níveis de estrutura: primária, secundária, terciária e quaternária.

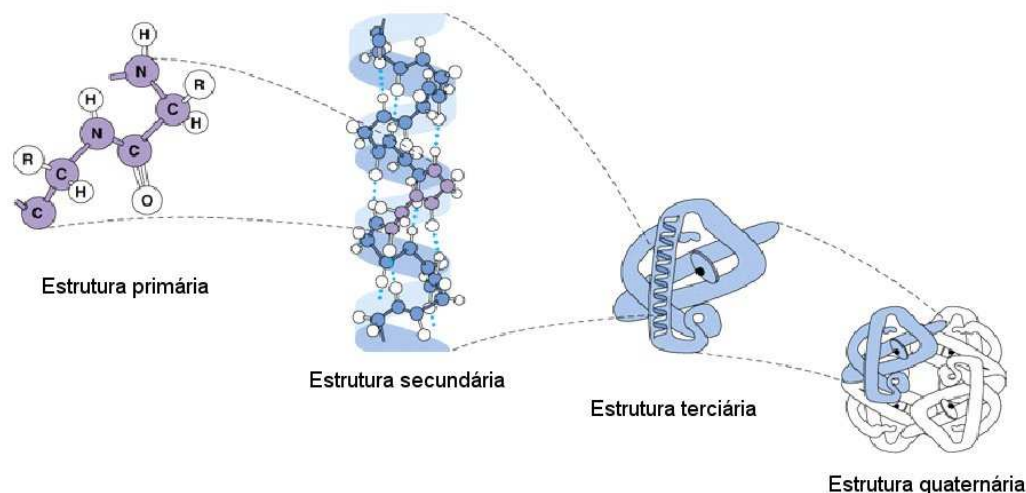


Figura 2.2 Esquema de níveis de estrutura das proteínas.

A estrutura primária é dada pela seqüência de aminoácidos e ligações peptídicas do esqueleto covalente da molécula

A estrutura secundária consiste de regiões de estruturas ordenadas examinadas pela cadeia de proteína: a alfa-hélice, que consiste de bobinar a cadeia de proteína tal que as ligações peptídicas que fazem o esqueleto são capazes de formar ligações de hidrogênio entre elas. Essas ligações de hidrogênio estão dirigidas ao longo do eixo da hélice. Os resíduos dos aminoácidos se projetam para o exterior em ângulos retos da hélice; a folha beta pregueada, é uma extensão de camada de cadeias de proteínas, uma sobre a outra. Aqui também, a estrutura é estabilizada por pontes de hidrogênio entre as cadeias peptídicas. Os resíduos estão situados em ângulos retos às folhas.

A estrutura terciária é a forma tridimensional total duma proteína. As proteínas que contêm mais de uma cadeia polipeptídica exibem mais de um nível de organização estrutural. Cada cadeia polipeptídica em tal proteína é chamada de uma subunidade.

Uma estrutura quaternária se refere ao arranjo espacial de subunidades e a natureza de seus contatos.

Nas proteínas os resíduos dos aminoácidos ao longo do comprimento da cadeia podem interagir com outros, atraindo-se ou repelindo-se. Assim a proteína torcerá e girará para minimizar as interações desfavoráveis e maximizar as favoráveis até encontrar a forma mais favorável. As principais interações a

considerar são: ligações covalentes, são as mais fortes forças de ligações disponíveis: a força de ligação de dois átomos de enxofre (S-S) é igual a 250 kJ/mol; ligações iônicas, são fortes forças de ligação entre grupos que tem cargas elétricas opostas: 20 kJ/mol; ligações de hidrogênio são formadas entre átomos eletronegativos, tal como o oxigênio, e prótons unidos a átomos eletronegativos: 4 a 7 kJ/mol; interações de Van der Waals, toma lugar entre moléculas hidrofóbicas: 1,9 kJ/mol (Graham, 2001).

2.2

A Enzima Na^+ , K^+ -ATPase

A bomba de sódio e potássio, Na^+ , K^+ -ATPase é um membro da família de enzimas denominadas ATPases tipo P, que apresentam um estado intermediário fosforilado. O estado atual do conhecimento sobre sua estrutura e mecanismos relacionados à sua função aparece bem descrito em alguns artigos de revisão recentes (Jorgensen et al., 2003; Kühlbrandt, 2004). ATPases tipo P são bombas de íons que realizam muitos processos fundamentais na biologia e na medicina, variando desde a geração de potencial de membrana até a contração muscular e a remoção de íons tóxicos das células. Fazendo uso da energia armazenada em ATP, elas transportam íons específicos através da membrana da célula contra um gradiente de concentração.

Todas as ATPases tipo P são proteínas integrais de membrana, de múltiplos domínios transmembranares, com massas moleculares de 70-150 kDa. Tanto o terminal carboxila como o terminal amina estão no lado citoplasmático da membrana, assim todas elas têm um número igual de segmentos transmembranares. Com base na homologia de seqüências, a família de ATPases tipo P pode ser dividida em cinco membros, referidos como tipos I a V.

Dentre os membros mais investigados da família de ATPases tipo P, estão as enzimas que criam e mantêm o potencial de membrana nas células animais e vegetais, resultante das diferentes concentrações iônicas em cada lado da membrana. Este gradiente de concentração iônica é um dos atributos mais indispensáveis de células vivas e aciona o transporte secundário de açúcar e aminoácidos, assim como de outras pequenas moléculas e íons. O membro II da família de ATPases tipo P tais como as enzimas Ca^{2+} -ATPase, que bombeia

cálcio, e a Na^+ , K^+ -ATPase, responsável pelo transporte ativo de Na^+ e K^+ em quase todas as células eucarióticas superiores, são maiormente investigados (Werner Kühlbrandt, 2004; Jorgensen, 1982; Sweadner e Donnert, 2001; Rice et al., 2001).

Em um trabalho clássico, a Na^+ , K^+ -ATPase foi descrita por Skou em 1957, onde se estudou uma ATPase que era estimulada pela presença simultânea de Na^+ e K^+ em uma fração de membrana de nervos de pata de caranguejo. Normalmente a enzima é isolada em forma associada à membrana de tecidos ricos nesta proteína, como órgãos de peixe elétrico (Brotherus et al., 1980; Blum et al., 1990), rim de mamíferos (Jorgensen et al., 1971; Kyte, 1981; Kunihiro et al., 1993), como também de glândula salina de tubarão (Esmann et al., 1985).

2.2.1

Características Estruturais da Na^+ , K^+ -ATPase

A estrutura oligomérica da enzima consiste de duas subunidades de proteínas " α ", " β " ligadas não-covalentemente (Cornelius, 1991). Além dessas duas subunidades existe uma pequena subunidade " γ ".

Subunidade " α ": a subunidade catalítica " α " é um polipeptídeo grande com uma sequência de aminoácidos conhecida (1020 resíduos) e tem um peso molecular em torno de 100 kDa. Ela é uma proteína integral com 10 domínios transmembranares (M1-M10) e contém os sítios de ligação para Na^+ e K^+ , Mg^{+2} , ATP e para um inibidor específico, ouabaina (Kawakami et al., 1985; S.R. Guynn, M.A. Scofield, D.H. Petzel et al., 2002; Pedersen et al., 1987). Esta subunidade contém ainda os domínios citoplasmáticos N (de ligação do nucleotídeo), P (de fosforilação) e A (atuador) (Figura 2.3).

Na Ca-ATPase e Na,K-ATPase, o domínio "A" consiste da porção N-terminal da cadeia polipeptídica e uma inserção entre os segmentos transmembranares M2 e M3, enquanto os domínios P e N estão localizados entre os segmentos transmembranares M4 e M5. Sabe-se que os sítios catalíticos da Na^+ , K^+ -ATPase encontram-se em domínios citoplasmáticos e os sítios de ligação dos íons Na^+ e K^+ , na região transmembranar (Jorgensen P. L. et al., 2003).

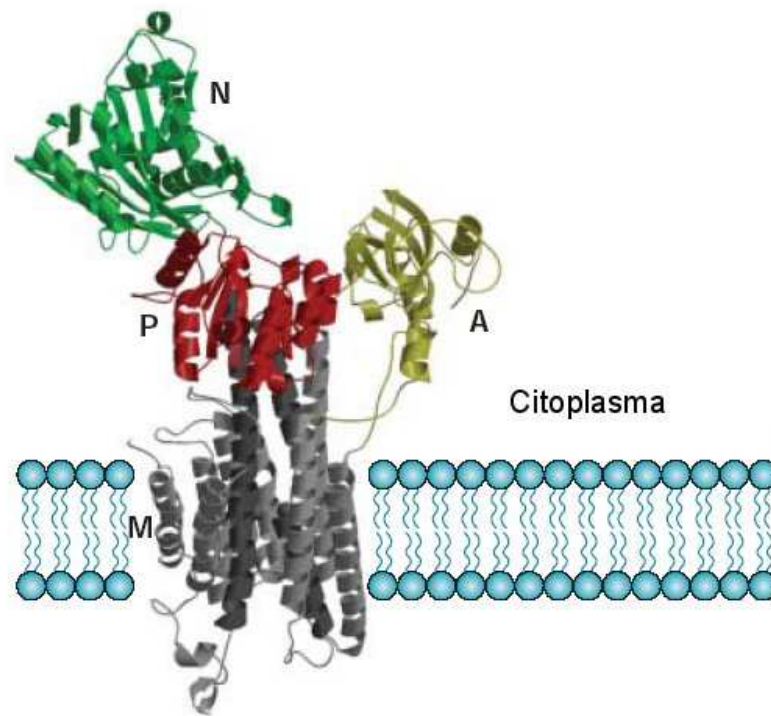


Figura 2.3 Modelo da subunidade α de ATPase tipo P, mostrando os domínios citoplasmáticos N (de ligação do nucleotídeo), P (de fosforilação) e A (atuador), bem como o domínio membrana (M) (Werner Kühlbrandt, 2004).

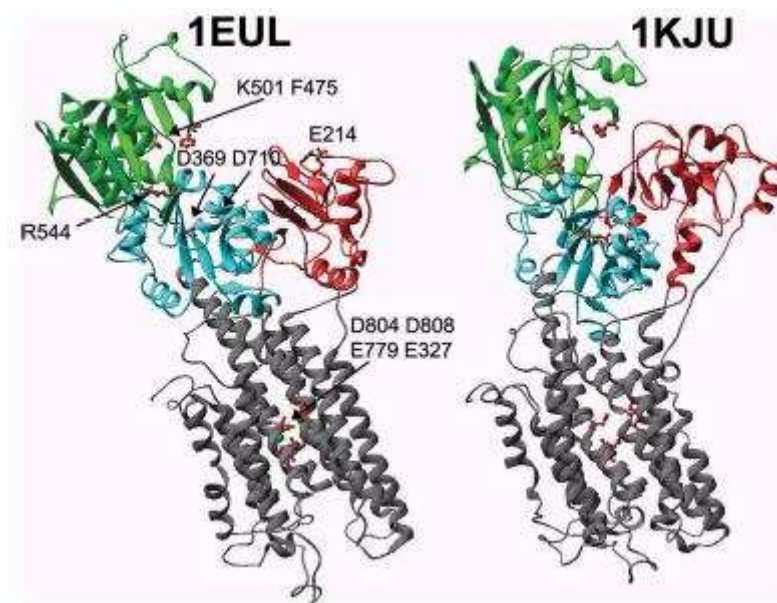


Figura 2.4 Modelos das formas E_1 e E_2 da subunidade α da Na^+ , K^+ -ATPase, baseado na estrutura de alta resolução da Ca-ATPase (1EUL) na forma E_1 (2Ca) e um modelo de estrutura (1KJU) baseado na estrutura por microscopia eletrônica de 6 Å da forma E_2 da Ca-ATPase (Jorgensen et al., 2003).

Subunidade “ β ”, é um glicoproteína com um peso molecular de $\sim 35\text{kDa}$ que, juntamente com os açúcares, pode atingir a $\sim 55\text{kDa}$. Ela é uma proteína integral que possui um único segmento transmembranar. A subunidade “ β ” é importante na biogênese da enzima, parecendo desempenhar um papel na formação e maturação da holoenzima, na translocação e incorporação à membrana plasmática, na regulação da estabilidade conformacional e na atividade da subunidade “ α ”. Além disso, ela pode estar envolvida na modulação da afinidade da enzima por Na^+ e K^+ (Shan Ping Yu et al., 2003; Kawakami e Nagano, 1988; Kawakami et al., 1985; Pedersen et al., 1987; S.R. Guynn, M.A. Scofield, D.H. Petzel, 2002).

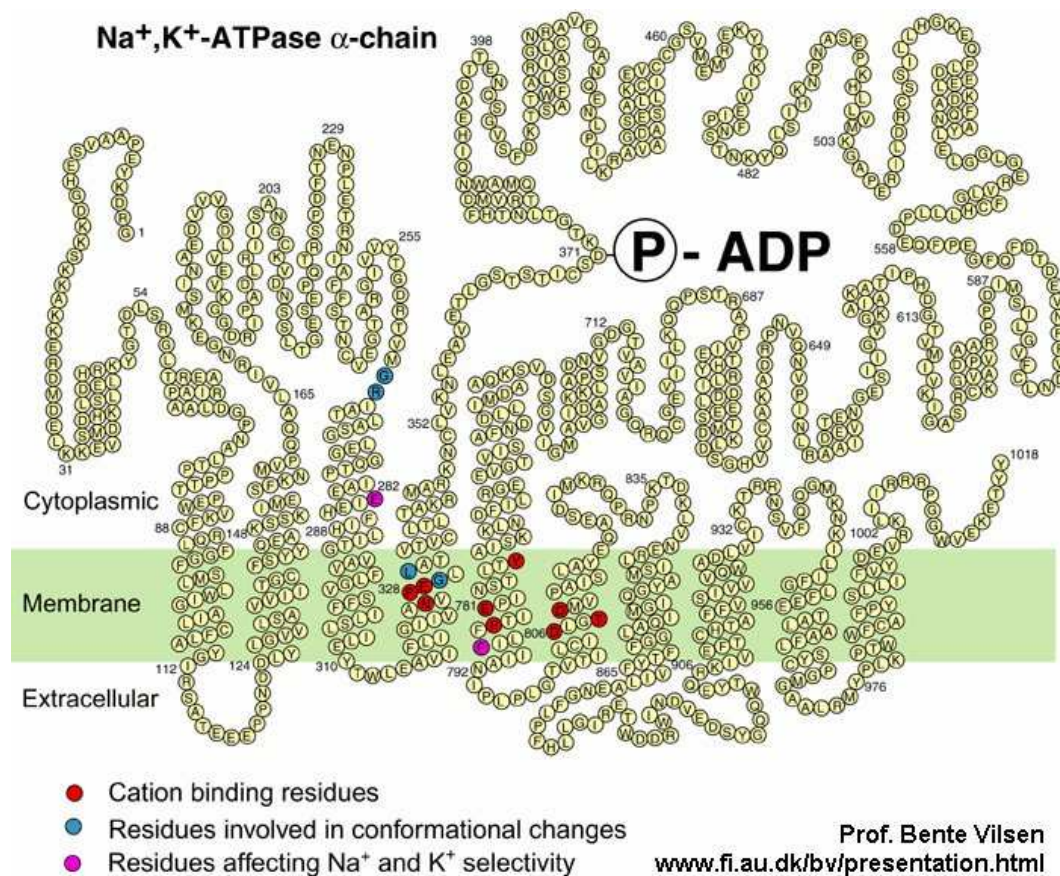


Figura 2.5 Diagrama esquemático da subunidade α do complexo enzimático Na^+ , K^+ - ATPase, mostrando os sítios de ligações dos cátions, os resíduos envolvidos nas mudanças conformacionais e os resíduos que afetam a seletividade de Na^+ e K^+ (Vilsen, B., www.fi.au.dk/bv/presentation.html).

Subunidade “ γ ”, forma parte da família de proteínas FXYD, que é uma pequena família de proteínas baixo peso molecular, com um domínio transmembranar que contém a sequência FXYD. Algumas proteínas FXYD conhecidas regulam a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em tecidos como o do coração, do músculo esquelético; a subunidade γ , outra proteína FXYD, regula a Na^+, K^+ -ATPase do rim (Kühlbrandt, 2004). Esta subunidade pode inclusive estar envolvida no sítio de ligação da ouabaína. Possivelmente pode estar associada à subunidade α via interações com o domínio terminal-C (Scheiner-Bobis, 2002). A subunidade γ é um pequeno polipeptídeo ($\sim 10\text{kDa}$) denominado primeiramente como “componente proteolipídico”, e foi identificada em algumas preparações purificadas da enzima. Este componente parece não ser essencial para a maturação estrutural ou funcional da Na^+, K^+ -ATPase (Lowndes et al., 1984; Béguin et al., 1997), mas outras evidências sugerem que pode alterar a afinidade da Na^+, K^+ -ATPase por o ATP e modular também a afinidade pelos íons de Na^+ ou K^+ (Béguin et al., 1997; Therien et al., 1997; Scheiner-Bobis, 2002).

Domínios da subunidade “ α ”

Os quatro domínios bem definidos da subunidade α , mencionados anteriormente como P, N, A e M, são conservados em toda família de ATPases tipo P (Kühlbrandt, 2004).

O **Domínio “P”** é o de fosforilação: contém o resíduo invariante de aspartato que durante a hidrólise do ATP se torna fosforilado por transferência do fosfato- γ do ATP (Fig. 2.3). O **Domínio “N”** é o de ligação do nucleotídeo (Fig. 2.3): contém os sítios de ligação de ATP e se estende desde o sítio de fosforilação Asp369 à dobra do terminal carboxílico 586-DPPR. O sítio de ligação para base adenina do ATP encontra-se num bolso hidrofóbico.

O **Domínio “A”**, domínio atuador, é o domínio citoplasmático menor da subunidade “ α ” da Na, K -ATPase, consistindo no segmento terminal-N (Gly1-Gln88) mais o laço entre os segmentos M2 e M3 (Lys205-Glu312). Na Lys30 encontra-se um sítio de ruptura tríptica bem definido. Esta parte do domínio “A” interage com o domínio “N” na forma E_2 [2K]. Apesar de não conter sítios de ligação para íons ou cofatores, a sua sequência invariante TGE põe-se em contato com o sítio de fosforilação na conformação $\text{E}_2\text{-P}$, confirmando seu importante papel no mecanismo molecular.

O Domínio “M”, membranar, consiste de 10 hélices “ α ” transmembranares (M1-M10) ou 5 pares de hélices inseridas do lado citoplasmático (Fig. 2.7), que cercam os sítios de ligação iônica na membrana, assim como curtos laços conectivos na superfície membranar exterior. Três destes pares helicoidais (M3-M4, M5-M6, M7-M8) contribuem à ligação do cátion através dos resíduos em M4, M5, M6, e M8 (Figura 2.6 e 2.7). As hélices M2, M4, e M5 são estendidas, com várias voltas no lado citoplasmático, onde elas se conectam com os domínios citoplasmáticos. O par M9-M10 não contribui diretamente para a ancoragem dos domínios ou ligação dos cátions, e suas duas hélices não são empacotadas conjuntamente, mas envoltas ao redor de M8.

As regiões transmembranares de ATPases tipo P diferem das de canais iônicos pela ausência de um trajeto óbvio de transporte, na forma de canal aberto preenchido por água. Presumivelmente, isto reflete a diferença entre os mecanismos de transporte ativo e passivo e a necessidade de oclusão dos cátions nas bombas de íons.

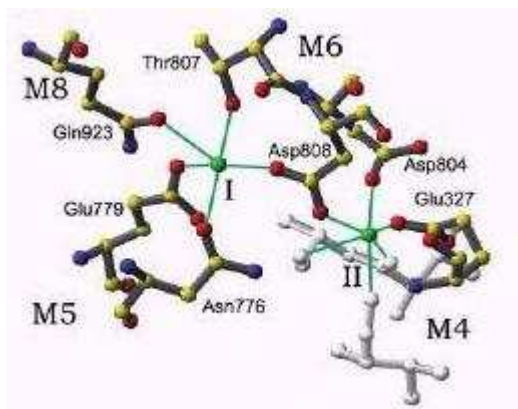


Figura 2.6 Representação em esfera e bastão dos sítios de ligação ao Na^+ I e II; modelo de homologia das cadeias laterais da bomba de Na,K-ATPase sobre o esqueleto da estrutura de alta resolução da Ca-ATPase SR (1EUL). (Jorgensen et al., 2003).

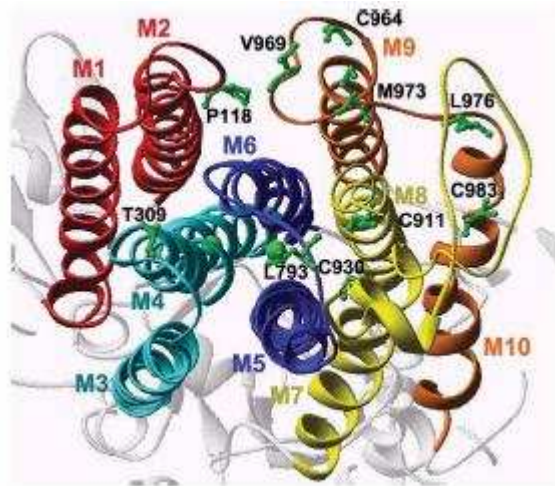


Figura 2.7 Um modelo de homologia da Na,K-ATPase com hélices transmembranares, visto do lado extracelular. Observam-se os resíduos destacados nos laços extracelulares, particularmente L9/10. (Jorgensen et al., 2003).

2.2.2 Características Funcionais

Destacam-se como importantes funções fisiológicas da enzima a sua influência sobre (Skou, 1988):

- o potencial de membrana: a enzima é responsável pela manutenção do gradiente transmembranar de Na^+ e K^+ que gera o potencial de repouso ou fornece energia para o potencial de ação de células excitáveis;
- a manutenção de altas concentrações intracelulares de íons K^+ : altas concentrações intracelulares de K^+ são de importância para que aconteça um número de reações enzimáticas dentro das células, por exemplo glicólise;
- a regulação osmótica: com um potencial de membrana negativo a concentração intracelular de ânions difusíveis é menor que a extracelular. Isto compensa o efeito osmótico de ânions intracelulares que não podem passar através da membrana;
- o transporte ativo: o gradiente de Na^+ é usado como energia livre para o co-transporte de outras substâncias como açúcares, aminoácidos, Cl^- e para conter o transporte de Ca^{2+} ou H^+ contra gradiente através da membrana celular.

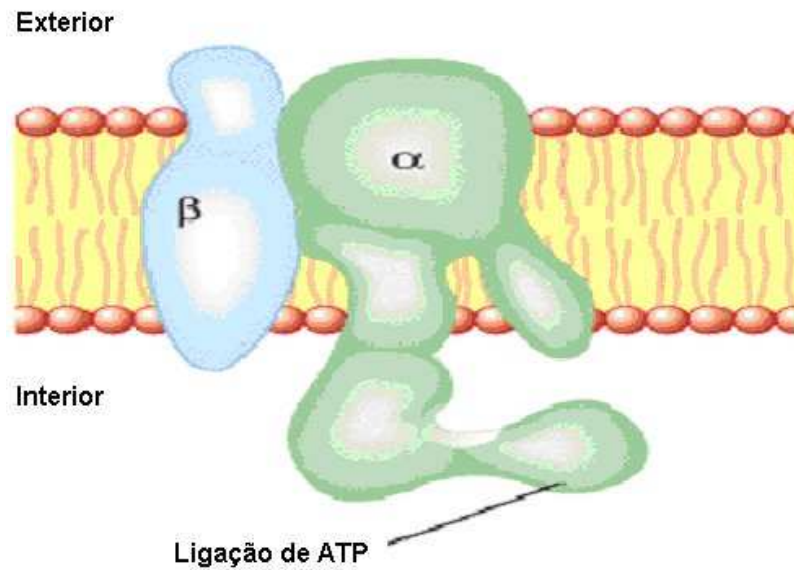


Figura 2.8 Esquema da estrutura de um heterodímero (α - β) da Na^+,K^+ -ATPase.

Múltiplos mecanismos podem regular a atividade da Na^+,K^+ -ATPase, influenciando os papéis funcionais da enzima em diferentes condições, tornando a proteína vulnerável a ataques patológicos. Esses mecanismos reguladores também tornam a enzima alvo potencial para tratamentos terapêuticos. Além de sua dependência em ATP, a atividade da Na^+,K^+ -ATPase é regulada pelo estado de fosforilação, por substâncias endógenas como a oubaína, por neurotransmissores como a dopamina (inibidor) e norepinefrina (estimulador), e por hormônios como a insulina (Yu S. P., 2003).

O heterodímero de subunidades protéicas α e β (Figura 2.8), ligadas não covalentemente, constitui a unidade funcional mínima capaz de hidrolisar ATP e sustentar a transição entre os estados conformacionais E_1 e E_2 que ocorrem durante o ciclo catalítico.

As mudanças conformacionais E_1/E_2 , apresentando estados intermediários, é o que caracteriza as ATPases do tipo P (Horisberger et al., 1991; Chow e Forte, 1995). Segundo o mecanismo de reação de Albert-Post para a hidrólise de ATP pela enzima (Figura 2.9), a proteína de membrana possui dois estados conformacionais E_1 e E_2 durante cada ciclo catalítico.

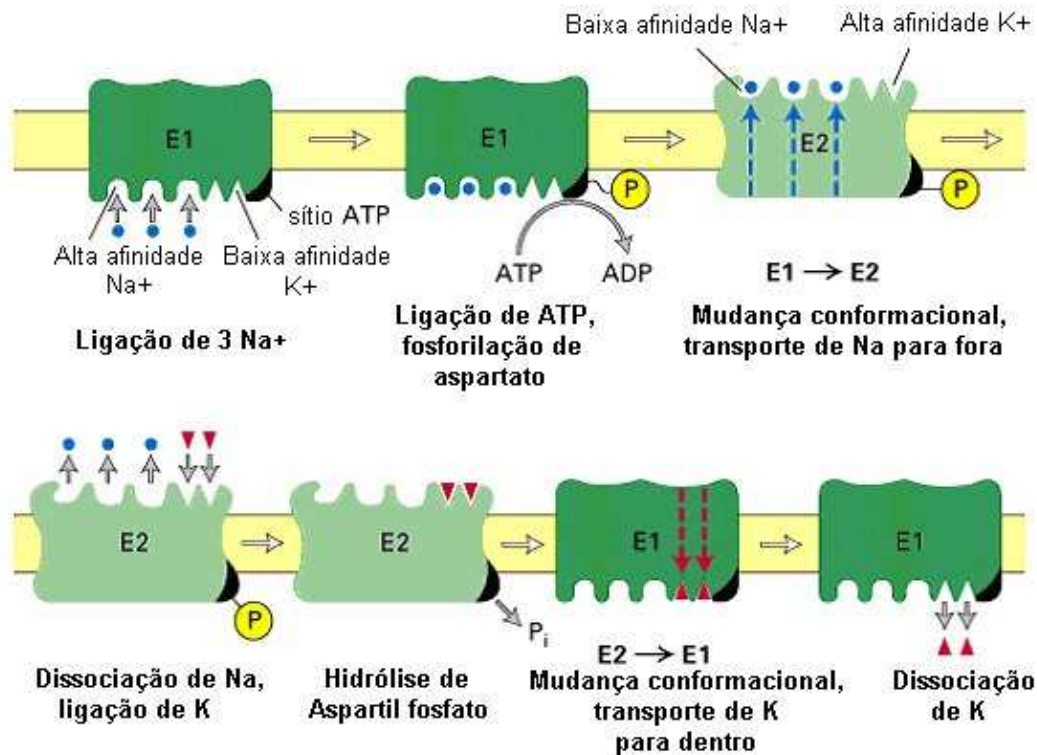


Figura 2.9 Esquema simplificado de Post-Albers (1969) do ciclo da bomba de sódio. E₁ e E₂ são as conformações da enzima com os sítios de ligação.

Os passos do mecanismo de transporte iônico são (Jorgensen P. L. et al., 2003):

- Ligação de três íons Na⁺ em sítios orientados para o citoplasma.

$$\text{ATP.E}_1 + 3\text{Na}^+_{\text{cit}} \leftrightarrow \text{E}_1\text{ATP.3Na}^+$$
- Fosforilação dependente de Na⁺ citoplasmático, a partir do ATP, e oclusão de três íons Na⁺.

$$\text{E}_1\text{ATP.3Na}^+ \leftrightarrow \text{E}_1\text{-P[3Na]} + \text{ADP}$$
- O transporte de três íons Na⁺ para a região extracelular, acoplado à transição conformacional E₁-P ↔ E₂-P.

$$\text{E}_1\text{-P[3Na]} \leftrightarrow \text{E}_2\text{-P[2Na]} + \text{Na}^+_{\text{exc}}$$
- Ligação de dois íons de K⁺ aos sítios orientados para a região extracelular.

$$\text{E}_2\text{-P[2Na]} + 2\text{K}^+_{\text{exc}} \leftrightarrow \text{E}_2\text{-P.2K}^+ + 2\text{Na}^+_{\text{exc}}$$
- Desfosforilação ativada por K⁺ extracelular e oclusão de dois íons K⁺.

$$\text{E}_2\text{-P[2K]} \leftrightarrow \text{E}_2[2\text{K}] + \text{P}_i$$

- f. ATP agindo com baixa afinidade acelera o transporte para o interior de dois íons K^+ , acoplado à transição conformacional $E_2[2K] \leftrightarrow E_1$.



Nos esquemas acima, cit e exc referem-se a citoplasma e a região extracelular, respectivamente. A enzima no estado E_1 tem alta afinidade por Na^+ e ATP, porém baixa afinidade por K^+ . Este estado intermediário muda para E_2 , formando E_2P . No estado E_2 a enzima tem alta afinidade para K^+ , mas baixa afinidade para Na^+ e ATP. Desse jeito, as mudanças conformacionais permitem que os íons Na^+ escapem para o meio externo e íons K^+ se liguem à enzima e passem para o interior da célula. Na Na^+,K^+ -ATPase de rim de porco, o equilíbrio $E_1-P \leftrightarrow E_2-P$ é fortemente inclinado a favor da forma E_2-P .

A Figura 2.10 mostra um diagrama esquemático das interações entre domínios N, P e A e sítios de ligação de Mg^{+2} nos diferentes estados do ciclo catalítico da Na^+,K^+ -ATPase. Uma característica das transições E_1 - E_2 é que o sítio ativo altera seu tamanho, devido à associação e dissociação de domínios e à inclinação destes, através de torção ou rotação do domínio P. A relação entre os domínios P e N não muda muito durante a transição, mas associação e dissociação do domínio A é um fato marcante (Jorgensen P. L. et al., 2003).

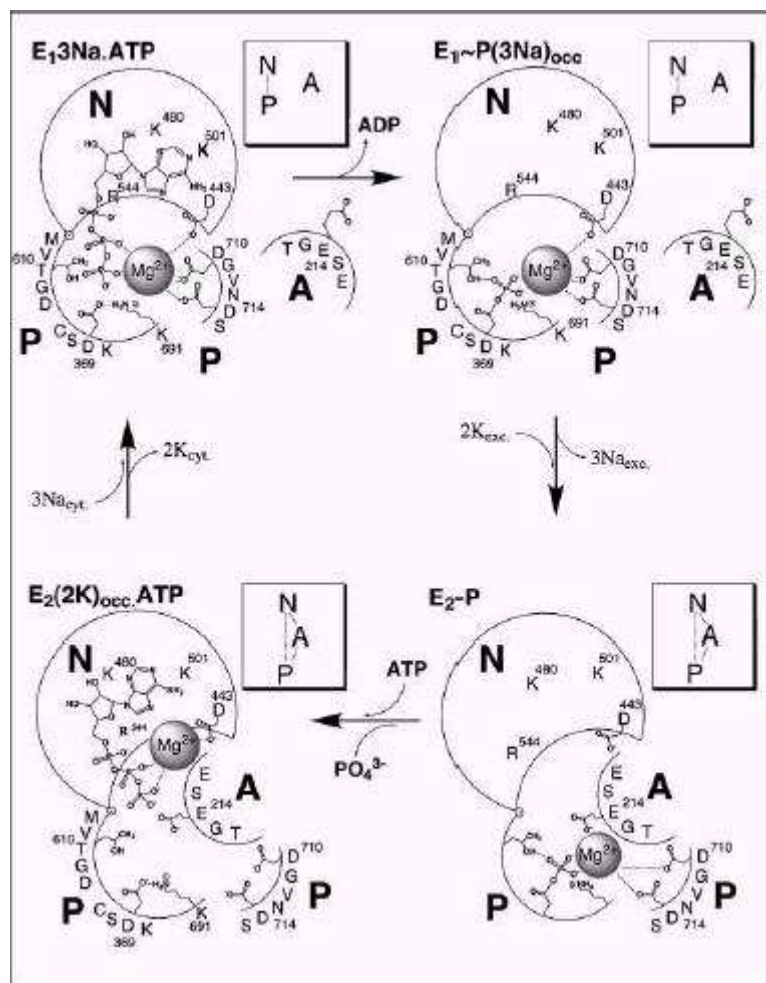


Figura 2.10 Diagrama esquemático das interações entre domínios N, P e A e sítios de ligação de Mg^{2+} nos diferentes estados do ciclo catalítico (Jorgensen et al., 2003).

2.3

Ouabaína e a sonda fluorescente antroil-ouabaína

A ouabaína pertence a uma classe de fármacos, os glicosídeos cardíacos, que são encontrados em certas plantas e animais. A ouabaína, esteróide cardiotônico, é inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase que, por sua vez, é o único receptor fisiológico conhecido para a ouabaína. Seu sítio de ação está localizado na subunidade “ α ”, do lado extracelular da proteína integral. Fármacos deste tipo possuem ação específica e poderosa sobre o miocárdio, por isso são muito utilizados em tratamentos de insuficiência cardíaca congestiva (Rang e Dale, 1993). A ouabaína tem alta afinidade pelo complexo $\text{MgE}_2\text{-P}$ da Na, K -ATPase,

portanto é necessária a presença de Mg^{+2} no solvente para iniciar a conversão E_1 -P a E_2 -P (Jorgensen et al. 2003)

A antroil-ouabaína (AO) é um derivado fluorescente da ouabaína, tendo como fluoróforo o antraceno ligado ao açúcar, para minimizar a perturbação à alta afinidade, que depende principalmente da parte esteróide do glicosídeo. Esta sonda fluorescente tem uma constante de dissociação à Na^+,K^+ -ATPase igual a $2,3 \cdot 10^{-7}$ M e inibe a atividade desta enzima numa faixa de concentração de 0,01 – 100 μ M com $IC_{50} = 1 \mu$ M (Fortes, 1977) (Figura 2.11). Esta sonda é usada em vários estudos de Na^+,K^+ -ATPase, como em cinética de ligação dos glicosídeos cardíacos, em estrutura e mudanças conformacionais (Lee e Fortes, 1986; Amler et al., 1992; Amler et al., 1996), assim como para detecção de estados intermediários fosforilados da enzima (Fortes e Lee, 1984).

A especificidade da AO pela Na^+,K^+ -ATPase e a sensibilidade da técnica de fluorescência fazem desse marcador uma importante ferramenta para estudo da enzima. A especificidade do marcador faz com que a purificação da enzima não seja um fator primordial para obtenção de resultados confiáveis. A alta afinidade pelo sítio específico e a sensibilidade permite utilização de concentrações baixas, semelhantes às fisiologicamente relevantes.

Hellen et al. (1998), mediram as constantes cinéticas de associação e dissociação da AO à Na^+,K^+ -ATPase fosforilada. A cinética de interação da ouabaína com a Na^+,K^+ -ATPase é relativamente lenta e a da AO é semelhante. Isso permite que estudos de cinética sejam realizados a partir de fluorescência no estado estacionário.

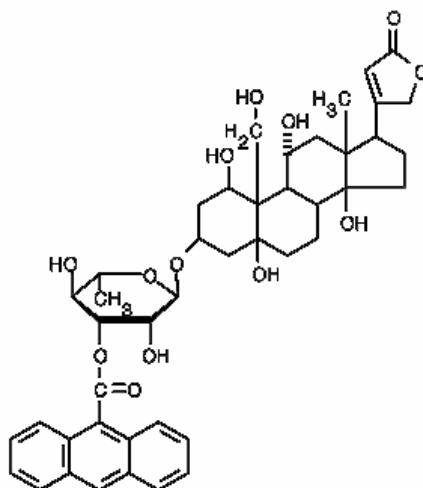


Figura 2.11 Estrutura química da antróil-ouabaína (Fortes, 1977).

2.4 Fármacos heterocíclicos derivados de amina

2.4.1 Antidepressivos Tricíclicos

Os antidepressivos são drogas que aumentam o tônus psíquico melhorando o humor e, conseqüentemente, melhorando a performance psíquica de maneira global. A ação terapêutica das drogas antidepressivas tem lugar no sistema límbico, parte do cérebro responsável principalmente pelas emoções. O sistema límbico coordena os neurotransmissores: a serotonina, a noradrenalina (geradora das crises de enxaqueca), a acetilcolina, a prostaglandina e a dopamina, entre outros. O efeito terapêutico dos antidepressivos é conseqüência de um aumento funcional dos neurotransmissores na fenda sináptica, principalmente norepinefrina, serotonina e dopamina, bem como da alteração no número e sensibilidade dos neuro-receptores. O aumento de neurotransmissores na fenda sináptica pode se dar através do bloqueio de re-captção desses neurotransmissores no neurônio pré-sináptico ou ainda através da inibição da enzima responsável pela inativação destes neurotransmissores, a monoaminaoxidase (MAO) (Psiqweb psiquiatria geral, 2003).

Os antidepressivos têm uma forte tendência em ligar-se às proteínas plasmáticas, embora a fração livre tenha também uma grande importância na ação terapêutica. Possuem, portanto, importantes efeitos colaterais associados principalmente ao sistema cardio-circulatório e ao sistema nervoso central.

Drogas como nortriptilina, amitriptilina, imipramina, clomipramina, e maprotilina pertencem a esta classe. A doses de NOR utilizada em pacientes com depressão associada à dor, inapetência ou insônia é de 50 – 100 mg diários (Revista de Psiquiatria Clínica)



Figura 2.12 Estrutura química da Nortriptilina (Carfagna et al., 1993).

2.4.2 Anti-Psicóticos derivados de fenotiazina

Os antipsicóticos ou neurolépticos são medicamentos inibidores das funções psicomotoras, como é o caso da excitação e da agitação. Paralelamente, eles atenuam também os distúrbios neuropsíquicos ditos psicóticos, tais como os delírios e as alucinações. Antipsicótico é um termo genérico aplicado de maneira ampla a diversas classes químicas de drogas empregadas no manejo sintomático de várias condições psicóticas, especialmente a esquizofrenia e estados de excitação. As substâncias incluem, entre outras, as fenotiazinas, grupo da qual fazem parte a clorpromazina e a trifluoperazina (Psiqweb psiquiatria geral, 2003).

Clorpromazina

A clorpromazina é um anti-psicótico do grupo das fenotiazinas. Sua principal finalidade é o tratamento dos sintomas psicóticos, podendo também ser usado para evitar vômitos e mesmo como anti-hipertensivo quando administrado

pela veia. Para o tratamento dos distúrbios psicóticos é utilizada uma dose usual para adultos: 10 a 50 mg, de 2 a 6 vezes por dia (Farmácia On-line).

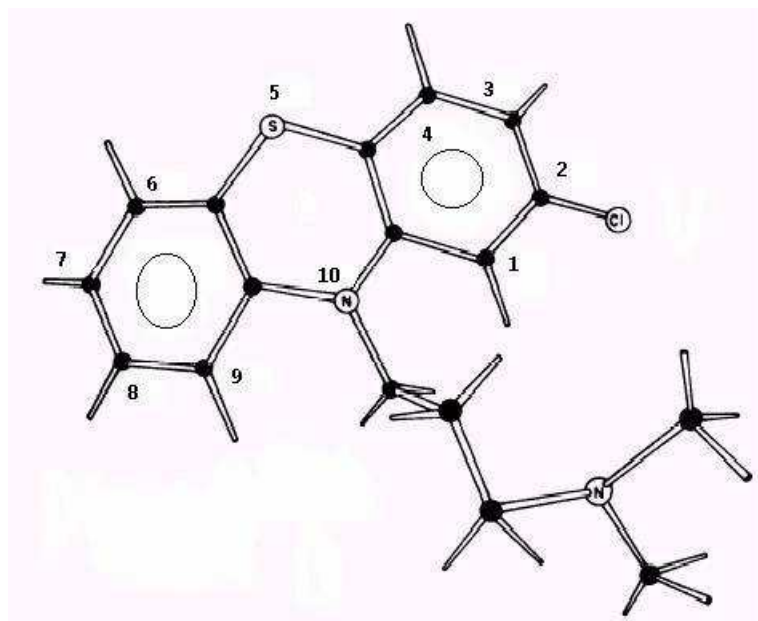


Figura 2.13 Desenho da estrutura molecular da Clorpromazina (3-[(2-cloro-10H-fenotiazin-10-il)]-N,N-dimetil-propan-1-amina) determinada por cristalografia de raios X (Horn, 1971).

Os derivados fenotiazínicos apresentam estrutura de triplo anel, na qual 2 anéis benzênicos estão ligados por um átomo de enxofre e um de nitrogênio. A clorpromazina é um derivado aromático de cadeia lateral alifática. A natureza do radical na posição 10 tem influência na atividade farmacológica do fenotiazínico e a presença de agrupamentos capazes de retirar elétrons na posição 2 aumenta a eficácia do neuroléptico (Silva, 2001).

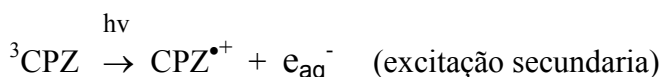
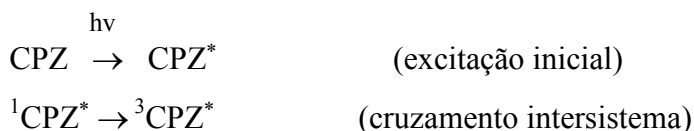
A clorpromazina é uma molécula que sofre fotodegradação quando é irradiada com luz ultravioleta produzindo outras espécies moleculares. As diferentes espécies encontradas na solução dependem muito da interação da CPZ com outras moléculas no tampão.

A luz ultravioleta rompe ligações na molécula da CPZ permitindo desse modo formar diferentes classes de radicais livres. Os radicais livres são espécies com um ou mais elétrons não emparelhados. O elétron desemparelhado dá como resultado frequentemente a espécies altamente instáveis. Estes, por serem muito instáveis, começam a se ligar rapidamente a outras moléculas que se encontram muito perto, para assim alcançar o equilíbrio químico formando novas espécies

mais estáveis. Os radicais livres podem ser classificados como redutores (doando um elétron a um aceptor) e oxidantes (aceitando um elétron de um doador) (Buettner et al, 2000).

As reações foto-alérgicas e fototóxicas de CPZ em humanos, assim como sua capacidade de induzir fotomutagênese em bactérias, têm sido atribuídas à formação de radicais livres. Sob irradiação ultravioleta a CPZ produz uma variedade de radicais tais como o radical cátion (via foto-ionização), o radical promazinil neutro e um átomo de cloro ($\text{Cl}^\bullet$) (via uma ruptura homolítica), e um radical peroxil com enxofre centrado.

O radical cátion é formado por meio de um mecanismo bi-fotônico por etapas para a foto-ionização da CPZ via um estado excitado triplete da CPZ (Banulescu, 2001).



A hidrólise do radical cátion conduz a fenotiazina sulfóxido.



A CPZ-SO é um metabólito principal da CPZ, no entanto para sua formação, há que se ter em conta que o radical cátion somente pode ocorrer quando a clorpromazina é excitada a comprimentos de ondas de irradiação menores que 280 nm.

O radical promazinil é um muito provável candidato para as espécies fototóxicas *in vivo* e *in vitro*. Além este radical pode reagir covalentemente com proteínas e macromoléculas para produzir antígenos que poderiam ser responsáveis pela resposta foto-alérgica á clorpromazina (Chignell et al, 1985). O radical promazinil é capaz de extrair um átomo de hidrogênio duma variedade de doadores tais como o etanol para produzir promazina PZ, que é um conhecido fotoproduto da CPZ. O radical promazinil pode reagir com outro radical promazinil ou com a CPZ para formar dímeros ou polímeros muito grandes (Banulescu, 2001).