

2. O sistema biológico

2.1. Moléculas Biológicas

Os organismos vivos são constituídos por entidades químicas, que podem ou não formar estruturas poliméricas. No entanto, é sob a forma de polímeros que o seu papel é mais significativo na dinâmica da vida. Entre os polímeros que caracterizam um organismo salientam-se os polissacarídeos, as proteínas e os ácidos nucleicos. Além destas macromoléculas, encontramos outros compostos, igualmente responsáveis pela construção dos organismos biológicos. Trata-se dos lípidios, por exemplo, os fosfolípidios (Fig. 2.1 A), componentes essenciais das membranas biológicas, e dos nucleotídeos, como o transportador principal da energia química na célula, a adenosina-5'-trifosfato (ATP) (Fig. 2.1 B). (Ricardo e Teixeira, 1983)

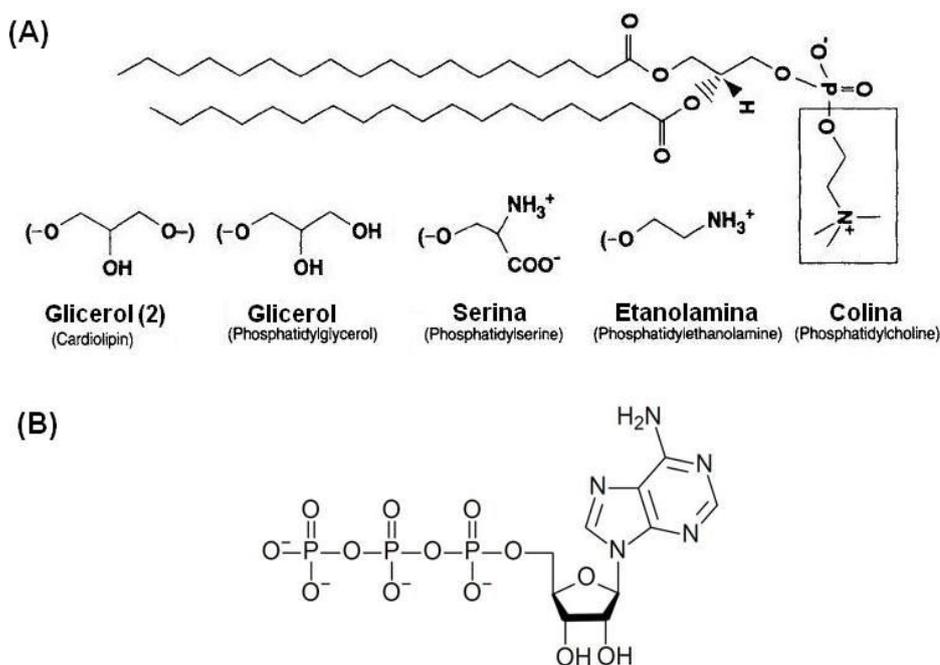


Figura 2.1. Estrutura química de fosfolípidios (A) e da molécula de ATP (B) (modificado de Dowhan et al., 2008).

Os lipídios são moléculas insolúveis ou de reduzida solubilidade em água em virtude da sua natureza não polar, apresentando, no entanto, grande solubilidade nos solventes orgânicos. Os lipídios polares são chamados anfipáticos porque contêm domínios hidrofóbicos, que não interagem com a água, e domínios hidrofílicos, que interagem com a água. Quando misturados com a água, formam espontaneamente agregados lipídicos microscópicos em uma fase separada de sua vizinhança aquosa, agrupando-se com suas porções hidrofóbicas adjacentes e seus grupos hidrofílicos interagindo com o meio aquoso ao redor. Interações hidrofóbicas entre moléculas de lipídios são direcionadoras da formação e a manutenção desses agregados. Dependendo das condições e da natureza dos lipídios, vários tipos de agregados lipídicos podem-se formar, dentre eles, micelas, bicamadas lipídicas e lipossomos (Fig. 2.2). A formação de micelas é favorecida quando a área transversal dos grupos carregados é maior do que a da(s) cadeia(s) de acila(s) lateral(is). A formação da bicamada lipídica ocorre mais facilmente quando as áreas transversais dos grupos cabeça e das cadeias acilas laterais são semelhantes. (Dowhan et al., 2008; Nelson et al., 2002).

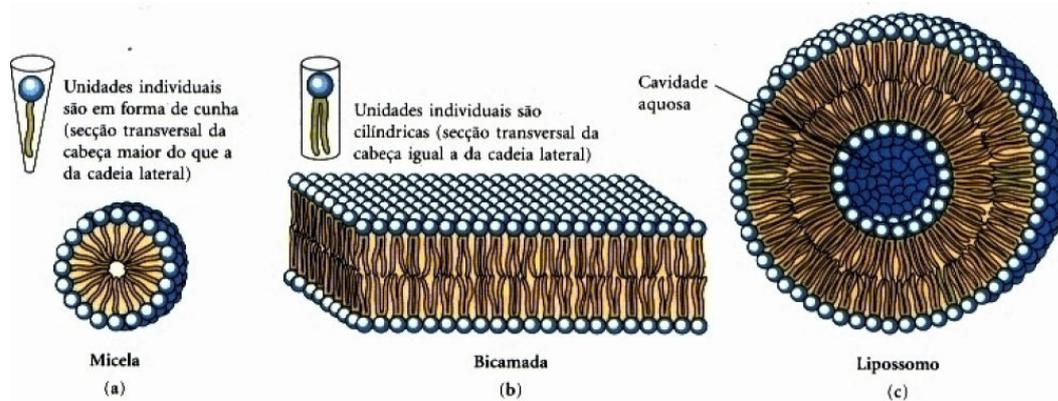


Figura 2.2. Agregados lipídicos anfipáticos que se formam na água (Nelson et al., 2002).

As proteínas desempenham um papel crucial na estrutura e função dos seres vivos. Apesar das suas múltiplas funções, as proteínas apresentam uma estrutura básica comum: são constituídas por longas cadeias poliméricas de subunidades ligadas entre si (aminoácidos). Estes aminoácidos estão associados entre si através de ligações covalentes (ligações peptídicas) entre o grupo carboxila (COOH) de um aminoácido e o grupo amina (NH₂) de outro. A sequência de aminoácidos que constitui uma cadeia polipeptídica tem a designação de **estrutura primária**.

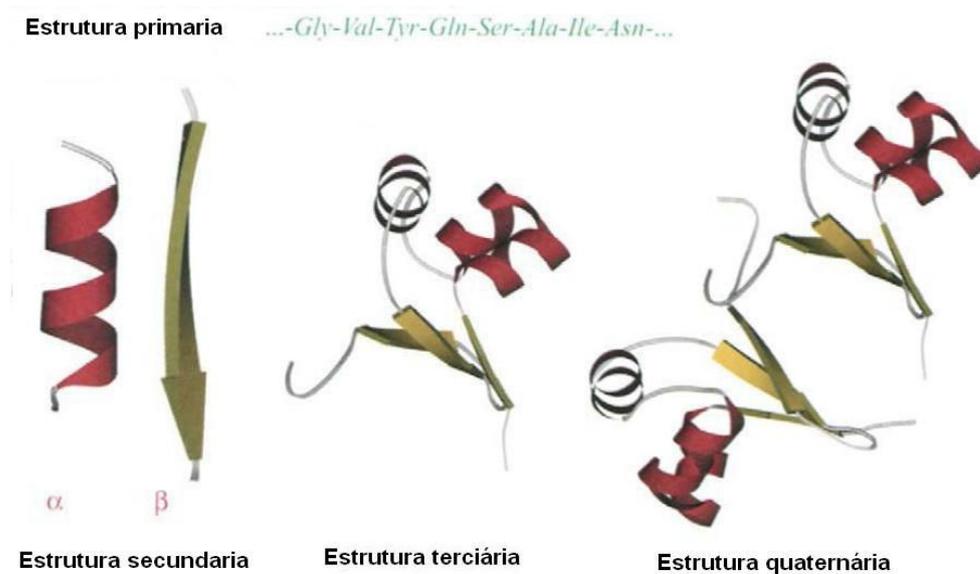


Figura 2.3. Níveis de organização estrutural da proteína: estrutura primária (sequência de aminoácidos), estrutura secundária (hélice- α e folha- β), estrutura terciária de uma proteína globular, e estrutura quaternária de uma proteína oligomérica formada, nesse exemplo, por duas cadeias (modificado de Finkelstein et al., 2002).

A configuração desenovelada das proteínas é pouco comum *in vivo*, sendo as configurações globulares ou alongadas, resultantes de processos de enovelamento ou torção, as mais comuns. Cada um dos radicais dos polipeptídios interage com os radicais vizinhos, formando pontes de hidrogênio. Devido a estas interações, as cadeias polipeptídicas tendem a dobrar-se espontaneamente em forma de folha ou em espiral, originando configurações particularmente estáveis em determinadas regiões da cadeia polipeptídica, formando a **estrutura secundária**.

Uma das características das proteínas é a sua interação com as moléculas de água. A tendência é que as regiões não polares da cadeia polipeptídica se agreguem, minimizando a ruptura das pontes de hidrogênio com as moléculas de água. Esta agregação provoca uma alteração da estrutura secundária da cadeia polipeptídica, originando configurações complexas e compactas do tipo globular, constituindo o que habitualmente se designa por **estrutura terciária** da proteína.

Freqüentemente as proteínas mais complexas são formadas por diferentes subunidades, as quais, associadas, constituem uma unidade funcional com propriedades específicas. Proteínas de maiores dimensões podem ser constituídas por duas ou três subunidades tomando, então, a designação de dímeros ou trímeros. A estas proteínas que apresentam uma estrutura particular, formada por

várias subunidades, convencionou-se designar **estrutura quaternária**. A Fig. 2.3 mostra os quatro níveis de organização estrutural das proteínas.

Dentro do grupo das proteínas encontramos uma classe especial de moléculas, as enzimas, que facilitam certas reações químicas. A energia química necessária para que estas moléculas desenvolvam a sua ação catalítica específica é fornecida através da hidrólise das moléculas de ATP (Finkelstein et al., 2002; Mathews et al., 1990).

2.2. Antipsicóticos derivados de fenotiazina

Antipsicóticos do grupo das fenotiazinas são uma classe de fármacos heterocíclicos derivados de amina que, como muitos outros com essas características, apresentam importante ação contra várias disfunções. Os antipsicóticos ou neurolépticos fenotiazínicos se caracterizam por sua ação psicotrópica, com efeitos sedativos e psicomotores. Além de se constituírem como fármacos preferencialmente usados no tratamento sintomático das psicoses, principalmente a esquizofrenia, também são utilizados em outros distúrbios psíquicos e mesmo como anestésicos. Atualmente existem diferentes derivados de fenotiazina que apresentam atividade neuroléptica.

As fenotiazinas possuem uma estrutura química formada por três anéis onde dois anéis benzênicos estão unidos por um átomo de nitrogênio e um de enxofre como se mostra na Fig. 2.4.

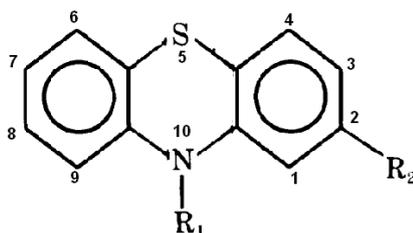


Figura 2.4. Estrutura química de um derivado da fenotiazina.

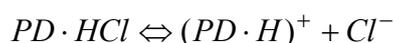
A cadeia lateral R_1 , localizada na posição 10, ligada ao nitrogênio do anel tiazina (médio) e o grupo substituinte na posição 2, R_2 , explicam as variações entre os compostos de fenotiazinas. Em termos da estrutura da cadeia lateral, as fenotiazinas são geralmente sub-classificadas da seguinte forma:

- **compostos aminoalquílicos**, como a clorpromazina;

- **compostos piperazínicos**, como a trifluoperazina e a flufenazina.
- **compostos piperidínicos**, como a tioridazina.

Os derivados de fenotiazinas existem na forma de bases e sais livres. Os sais livres como as fenotiazinas hidrocloradas são substâncias cristalinas de cor branca, que são muito solúveis em água e solventes orgânicos. Esta propriedade depende do tipo de substituintes.

Os derivados de fenotiazinas (PD) dissociam-se em soluções aquosas como segue:



Eles reagem como ácidos muito fracos. Os valores de pK_a para a protonação da fenotiazina no nitrogênio (posição 10, Fig. 2.4) varia de 4.5 a 7.8 dependendo principalmente do substituinte nessa posição. Os grupos aminos terciários em R_1 (Fig. 2.4) têm valores de pK_a acima do pH fisiológico, mas não muito, e conseqüentemente nesse pH há espécies carregadas e não carregadas. Lin et al. (2003) encontraram dois valores de pK_a para CPZ (para N do anel e para a amina de R_1) e três para TFP e FPZ (para N do anel e para os dois Ns da piperazina em R_1), mas a técnica utilizada por eles dá, em geral, valores de pK acima dos encontrados por outros autores.

Os anéis aromáticos são responsáveis pela absorção significativa e, em muitos casos, pelas propriedades de fluorescência que, variando seu estado de protonação e o ambiente local da droga podem ser usados como sondas fluorescentes na interação com membranas. A biodistribuição seletiva de uma droga iônica em tecidos e membranas depende de suas propriedades de agregação e de interações complexas com seu entorno molecular, já que a formação de agregados influencia as propriedades fotofísicas das fenotiazinas (Karpinska et al., 1996; Caetano et al., 2000).

A atividade farmacológica das fenotiazinas é em geral dependente da sua concentração, e os efeitos sobre as propriedades físicas das membranas diferem em concentrações baixas e altas (Welti et al., 1984). Mudanças na estrutura das fenotiazinas não somente mudam sua atividade neuroléptica, mas também mudam o espectro e a intensidade dos efeitos colaterais. A exigência estrutural para a atividade neuroléptica das fenotiazinas inclui uma substituição na posição 2 (R_2 na Fig. 2.4) (Garcia et. al., 2005).

Os derivados de fenotiazinas têm sido foco de estudos biológicos, químicos, físico-químicos e fotoquímicos, devido a suas propriedades farmacêuticas e aplicações. Particularmente, o comportamento fotoquímico de fenotiazinas tem ganhado interesse, já que causa efeitos fotossensíveis em pacientes submetidos a terapia com estas drogas (Rodrigues et. al., 2006). A fotossensibilização pode ser através de fototoxicidade ou fotoalergia. A resposta fototóxica é essencialmente uma reação exagerada à queimadura do sol, enquanto a fotoalergia é uma reação de hipersensibilidade atrasada. Tanto na pele como nos olhos foram encontrados efeitos colaterais fototóxicos e fotoalérgicos nos pacientes que ingeriram estas drogas. Entre as fenotiazinas, a CPZ tem sido amplamente estudada para poder esclarecer os mecanismos associados aos seus efeitos fototóxicos. Além disso, é bem conhecido que a fototoxicidade de uma droga é frequentemente devida à ação simultânea de moléculas intactas, espécies intermediárias reativas e fotoprodutos estáveis formados durante a irradiação; por isso é muito importante avaliar qual é o papel que estas espécies têm na fototoxicidade (Robert, 1984; Miolo et al., 2006; Chignell et al., 1985).

Sob irradiação, as fenotiazinas passam ao primeiro estado excitado singlete S_1 ou a S_n , dependendo da energia de excitação e do solvente. O decaimento dos estados excitados acontece via conversão interna ($S_n \rightarrow S_1$ e $S_1 \rightarrow S_0$ e liberação de calor), fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$ com emissão de luz), e cruzamento intersistema ($S_1 \rightarrow T_1$ ou $S_2 \rightarrow T_2$ e $T_2 \rightarrow T_1$, via conversão interna). O decaimento do primeiro estado tripleto T_1 pode ocorrer com emissão de luz, via fosforescência. Derivados de fenotiazinas mostram valores baixos de rendimento quântico de fluorescência, mas seus rendimentos quânticos de fosforescência são sempre mais altos. Além da fosforescência, dois mecanismos podem desativar o estado tripleto: a transferência de energia para o oxigênio molecular, que conduz à geração de 1O_2 (oxigênio molecular singlete), e os processos de foto-ionização (Rodrigues et al., 2006).

2.2.1. Clorpromazina (CPZ)

A clorpromazina (Fig. 2.5) é principalmente um agente antipsicótico, mas também era usado para evitar vômitos e como anti-hipertensivo quando administrado por meio intravenoso.

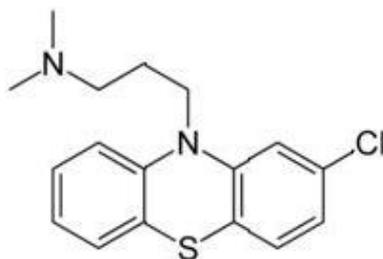


Figura 2.5. Estrutura molecular da clorpromazina (CPZ).

A clorpromazina é um derivado aromático de cadeia lateral alifática. A natureza do radical na posição 10 (N) tem influência na atividade farmacológica do fenotiazínico e a presença de grupos capazes de retirar elétrons na posição 2 aumenta a eficácia do neuroléptico (Silva, 2001). A CPZ em pH fisiológico está protonada no nitrogênio da cadeia lateral, já que possui um pK_a de 9.3 (Lee, 1978).

A clorpromazina é uma molécula que se fotodegrada em outras espécies moleculares quando é irradiada com luz UV. A luz UV rompe ligações na molécula da CPZ permitindo formar diferentes classes de radicais livres. Os radicais livres são espécies com um ou mais elétrons desemparelhados. O elétron desemparelhado frequentemente dá como resultado 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 fotoalérgicas e fototóxicas de CPZ em humanos, assim como sua capacidade de induzir danos cromossômicos em células mamárias que foram irradiadas com luz UV, são atribuídas à formação de radicais livres (Miolo et al., 2006). Na literatura encontra-se que a CPZ se liga fotoquimicamente a proteínas e inibe enzimas fotossensíveis. Irradiação UVB sobre a CPZ em presença da proteína Na^+ , K^+ -ATPase deram como resultado a ligação covalente de CPZ a um sítio perto do sítio principal de inibição da atividade da proteína (Kochevar et al., 1983; Guevara et al., 2007).

A irradiação ultravioleta na CPZ produz uma variedade de radicais, tais como o radical cátion (via foto ionização), o radical promazinil neutro e um átomo

de cloro (Cl^\bullet) (via ruptura homolítica), e um radical peroxil centrado no enxofre. A descloração seguida de fotorredução ou substituição, a última dependente do solvente, é o principal caminho para se obter fotoprodutos de fenotiazinas, no caso de Cl na posição 2 (Miolo et al., 2006).

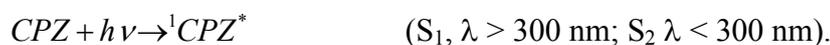
Chignell et al. (1985) descrevem a fissão homolítica da CPZ para obter o radical Cl^\bullet e o radical promazinil (PZ^\bullet), que em presença de água forma a PZ e 2-OH-PZ, como se segue:



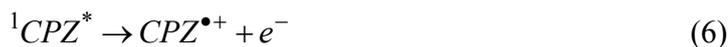
O radical promazinil é um provável candidato como espécie fototóxica *in vivo* e *in vitro*. Além disso, esse radical pode reagir covalentemente com proteínas e macromoléculas para produzir antígenos que poderiam ser responsáveis pela resposta fotoalérgica à clorpromazina (Chignell et al, 1985). Esse radical é capaz de reagir com outro radical promazinil ou com a própria CPZ para formar dímeros ou polímeros grandes. Esses produtos têm sido observados, particularmente em soluções mais concentradas (Motten et al., 1985).

O processo de fotoionização para obter o radical cátion foi descrito por Buettner et al. (1989), da seguinte forma:

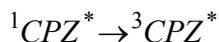
Depois da absorção inicial de um fóton,



Este estado singlete poderia se fotoionizar diretamente (monofotônico),

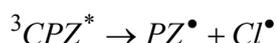


ou, relaxar para um estado tripleto,



O estado tripleto poderia:

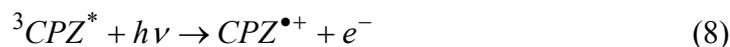
(a) desclorar,



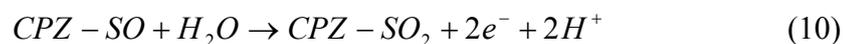
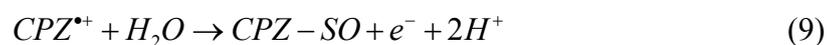
(b) foto ionizar diretamente,



ou, (c) foto ionizar pela absorção de outro fóton (bifotônico),



As fenotiazinas são também sensíveis à oxidação por mecanismos químicos, fotoquímicos e metabólicos. O processo de oxidação na CPZ poderia acontecer assim:



Tem-se reportado que mais da metade de CPZ encontrada no plasma humano está em forma de sulfóxido (Buettner et al., 1986).

2.2.2. Flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP)

A flufenazina (Fig. 3.6) tem ações antipsicóticas e neurolépticas e é 50-70 vezes mais potente que a CPZ na terapia de esquizofrenia. Sua cadeia lateral piperazínica, responsável pelas ações extrapiramidais, possui dois sítios de protonação, com valores de pK_a 7.2 e 3.4 (Tsakovska, 2003). Então, cerca de 40% das moléculas de TFP encontram-se protonadas na cadeia piperazínica em pH fisiológico (7.4).

Além das propriedades antipsicóticas, a FPZ é dotada de ações citotóxicas (produção de oxigênio singlete) e antimicrobianas (Elisei et al., 2002).

Estudos de fotólise com luz UVA em meio aquoso mostraram que derivados trifluorometil (CF_3), como a FPZ, em soluções irradiadas não formam radicais via fissão na posição 2. No entanto, encontraram-se dois fotoprodutos (F_1 e F_2 na Fig. 2.6) de FPZ formados por ataque nucleofílico ou por oxidação do nitrogênio na cadeia piperazínica (Miolo et al., 2006).

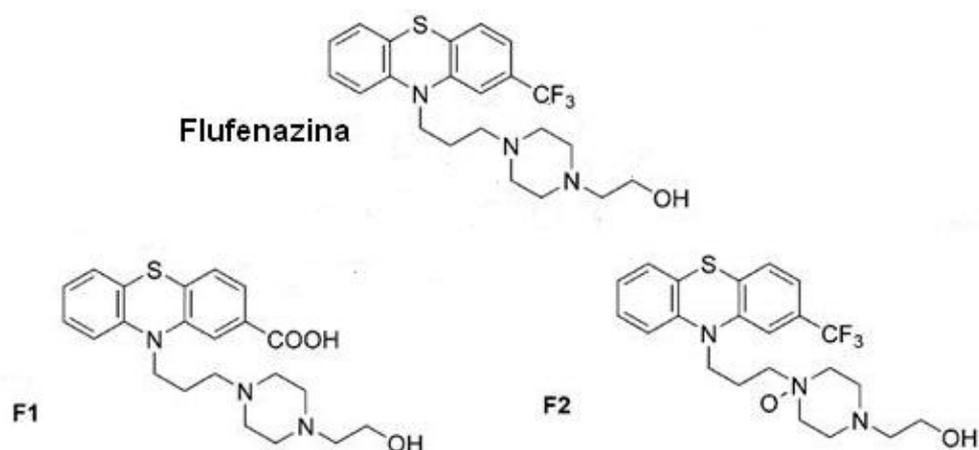


Figura 2.6. Estrutura molecular da flufenazina e dois possíveis foto produtos (F1 e F2) conseguidos sob irradiação UVA em meio aquoso por Miolo et al. (2006).

A TFP (Fig. 2.7) é conhecida por ser uma droga muito potente do ponto de vista terapêutico em psicoses, 20 vezes mais potente que a CPZ no tratamento da esquizofrenia. Foi largamente empregada como antipsicótico por via oral, nas fases aguda e crônica da esquizofrenia. A TFP possui dois valores de pK_a , 8.1 e 4.0, para os dois sítios de protonação na cadeia lateral piperazínica (Malheiros et al., 1998; Post, et al., 1980). Então, cerca de 83% das moléculas de TFP encontram-se protonadas na cadeia piperazínica em pH fisiológico (7.4).

Também para a TFP foram encontrados indícios de formação de fotoprodutos por irradiação UV. Rodrigues et al. (2006) concluíram que estados excitados tripleto de monômeros de TFP e FPZ formam radicais cátions que reagem com o oxigênio molecular, conduzindo à formação de fotoprodutos oxidados de TFP, como os derivados sulfóxidos.

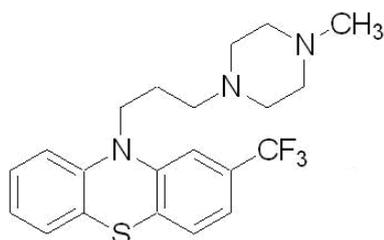


Figura 2.7. Estrutura química de trifluoperazina.

2.3. 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. 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 lipopolisacarídeos). Assim, a membrana pode ser considerada como uma matriz lipídio - protéica onde as proteínas realizam funções específicas, enquanto que os lipídios são responsáveis pela barreira de permeabilidade e integridade estrutural da membrana.

2.3.1. Modelo de mosaico fluido

O modelo de membrana biológico conhecido como mosaico fluido (mosaico porque incluem proteínas, colesterol e outros tipos de moléculas além dos fosfolipídios) é o aceito atualmente (Fig. 2.8). As bicamadas de lipídios são fluidas, onde fosfolipídios se difundem rapidamente por toda a superfície bidimensional da membrana. Os fosfolipídios podem mover-se lateralmente, numa membrana de célula bacteriana, em uns poucos minutos à temperatura ambiente. Proteínas de membranas se difundem pela membrana da mesma forma, mas em um ritmo mais lento devido a seu grande tamanho (um fosfolipídio pode ter cerca de 650 Da e uma proteína de tamanho médio pode ter cerca de 100.000 Da). De vez em quando um fosfolipídio faz um "flip-flop" atravessando a membrana para o lado oposto, mas isto não é comum. Isto requer que a cabeça hidrofílica do fosfolipídio passe inteiramente através do interior altamente hidrofóbico da membrana e que as caudas hidrofóbicas estejam expostas ao ambiente aquoso.

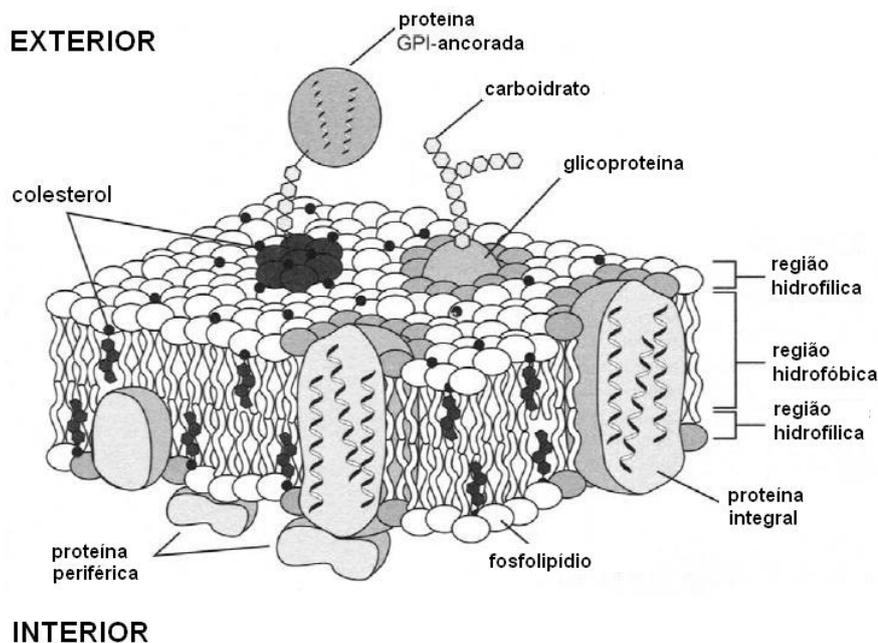


Figura 2.8. Modelo para a estrutura de uma membrana biológica: modelo de mosaico fluido (modificada de Dowhan et al., 2008).

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. 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 estendidas, somente com ligações simples ("saturadas" com hidrogênio), e os hidrocarbonetos insaturados têm uma ou mais ligações duplas (não "saturadas" com hidrogênio). Fosfolípidios com hidrocarbonetos saturados se compactam muito juntos aumentando as interações de Van der Waals, que prendem os fosfolípidios. As cadeias de fosfolípidios insaturados impedem que os fosfolípidios consigam se aproximar muito, diminuindo as interações de Van der Waals.

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

As **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).

As **proteínas integrais** são encaixadas na bicamada lipídica. Muitas delas estão estendidas dum lado ao outro da membrana e são chamadas proteínas transmembranares. Elas, frequentemente, têm três domínios diferentes, dois hidrofílicos e um hidrofóbico. O domínio hidrofóbico, transmembranar, insere-se 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 sem prévia dissolução com detergentes, que afastam os lipídios (Dowhan et al., 2008).

2.4.

A Enzima Na^+ , K^+ - ATPase

A enzima Na^+ , K^+ - ATPase é uma bomba de cátions de sódio e potássio que pertence à família de enzimas denominadas ATPases tipo P. O estado atual do conhecimento sobre sua estrutura e mecanismos relacionados à sua função aparece bem descrito em alguns artigos de revisão (Jorgensen et al., 2003; Kühlbrandt, 2004) e está descrito também na dissertação de mestrado (Guevara, 2005). As ATPases tipo P são uma grande família de mais de 50 proteínas de membranas, que são responsáveis pelo transporte ativo de uma variedade de cátions através da membrana. A translocação de cátions contra o gradiente de potencial eletroquímico é conseguido por utilizar a energia de hidrólise do ATP (Kühlbrandt et al., 2004).

Todas as ATPases tipo P são proteínas integrais de membrana, de múltiplos domínios transmembranares, com massas moleculares de 70-150 kDa. As enzimas desta classe de família 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 das células vivas e aciona o transporte secundário de açúcar e aminoácidos, assim como de outras pequenas moléculas e íons (Kühlbrandt et al., 2004; Jorgensen et al., 1982; Sweadner 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), rim de

mamíferos (Jorgensen et al., 1971; Kyte, 1981; Kunihiro et al., 1993), como também de glândula salina de tubarão (Esmann et al., 1985).

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

A estrutura oligomérica da enzima consiste de duas subunidades de proteínas α , β ligadas não-covalentemente (Fig. 2.9). Além dessas duas subunidades existe uma pequena subunidade γ (Cornelius et al., 1991; Andersen et al., 1996).

O heterodímero de subunidades protéicas α e β (Fig. 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.

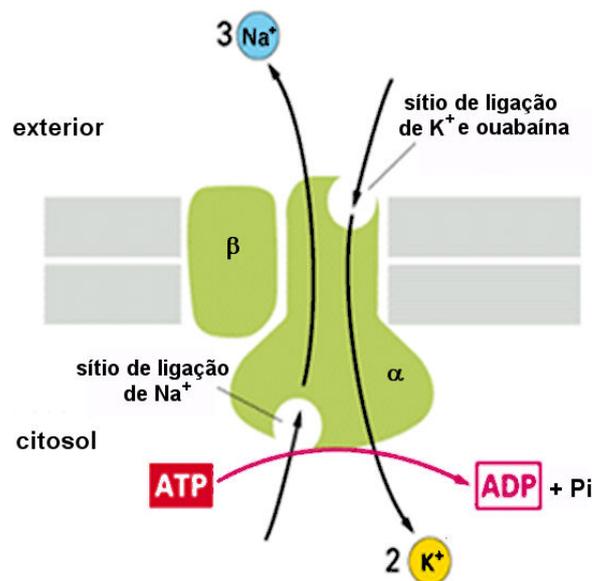


Figura 2. 9 Modelo da estrutura de um heterodímero (α - β) da Na^+, K^+ - ATPase.

Modificada de [http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail5.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail5.htm)

Subunidade α : a subunidade catalítica α é um polipeptídeo grande com uma sequência de aminoácidos conhecida (1020 resíduos) e tem um peso molecular de 110 kDa. Dados bioquímicos e espectroscópicos mostram que as transições entre as principais conformações, E_1 e E_2 , na subunidade α são importantes para as interações entre os domínios citoplasmáticos (A, N e P) e os sítios de cátions no domínio transmembranar (M), mostrados na Fig. 2.10. Esta subunidade contém os

sítios de ligação para um inibidor específico da enzima, a ouabaína (Jorgensen et al., 2003; Keenan et al., 2005).

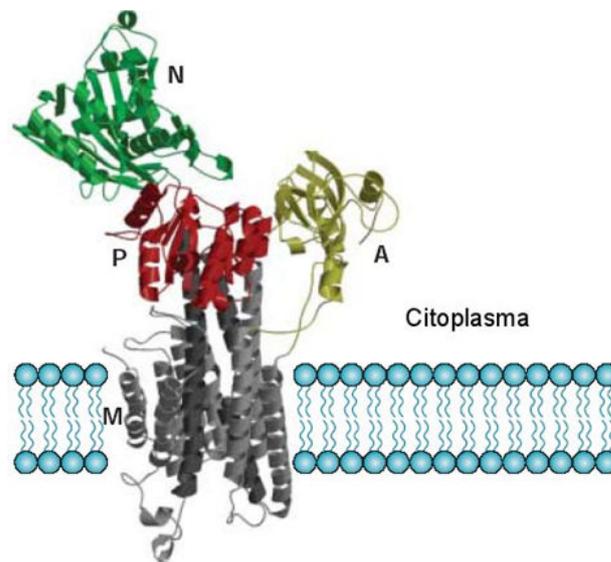


Figura 2. 10 Modelo da subunidade α de ATPase tipo P, mostrando os domínios citoplasmáticos N (de ligação do nucleotídeo), P (de fosforilação) e A (atuador), bem como o domínio membranar (M). (Kühlbrandt, 2004).

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 citoplasmático N contém o sítio de ligação do ATP; no domínio P estão os sítios para o fosfato e Mg^{+} ; o domínio A terminal-amino não contém sítios de ligação, mas sim sítios de ruptura tríptica e o domínio M, com 10 subdomínios transmembranares (hélices - α), contém os sítios dos cátions Na^{+} e K^{+} (Pedersen et al., 1998; Kühlbrandt, 2004).

O **Domínio "P"** é o sítio de fosforilação aproximadamente esférico. A inserção do domínio N expõe o sítio de ligação do Mg^{+2} e o resíduo invariante de aspartato que durante a hidrólise do ATP se torna fosforilado por transferência do fosfato- γ do ATP (Fig. 2.9).

O **Domínio "N"** é o sítio de ligação do nucleotídeo (Fig. 2.9), que 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 a base adenina do ATP encontra-se num bolso hidrofóbico de resíduos invariantes.

O Domínio “A”, domínio atuador, é o domínio citoplasmático menor da subunidade “ α ” da Na^+ , K^+ - ATPase, consistindo no segmento terminal-N e o laço entre os segmentos M2 e M3. Na Lys30 encontra-se um sítio de ruptura triptica bem definido. Esta parte do domínio “A” interage com o domínio “N” no estado conformacional $\text{E}_2[\text{K}]$. Apesar de não conter sítios de ligação para íons ou cofatores, há uma sequência invariante que se põe em contato com o sítio de fosforilação na conformação $\text{E}_2\text{-P}$, confirmando seu importante papel no mecanismo molecular (Fig. 2.9).

O Domínio “M”, membranar, consiste de 10 hélices “ α ” transmembranares (M1-M10) ou 5 pares de hélices inseridas do lado citoplasmático (Fig. 2.9), que cercam os sítios de ligação dos íons na membrana, assim como curtos laços conectivos na superfície membranar exterior. A Fig. 2.11 mostra um modelo de homologia (com a Ca^{2+} -ATPase) para essas hélices. As hélices M2, M4, e M5 são estendidas, com várias voltas no lado citoplasmático, onde elas se conectam com os domínios citoplasmáticos.

As regiões transmembranares de ATPases tipo P diferem das de canais iônicos pela ausência dum 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.

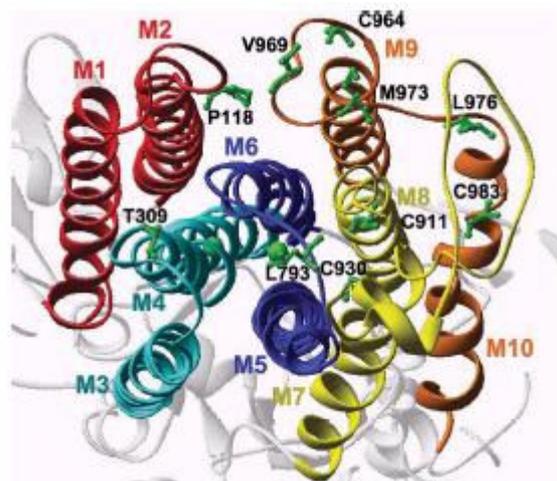


Figura 2. 11 Um modelo de homologia da Na^+ , K^+ - ATPase com hélices transmembranares, visto do lado extracelular. Observam-se os resíduos destacados nos laços extracelulares, particularmente L9/10. (Jorgensen et al., 2003).

Subunidade “ β ”: é uma glicoproteína com peso molecular ~ 35 kDa que, juntamente com os açúcares, pode atingir a ~ 55 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, 2003; Kawakami et al., 1988; Kawakami et al., 1985; Guynn et al, 2002).

Subunidade “ γ ”: forma parte da família de proteínas FXYD, que é uma pequena família de proteínas curtas, com um domínio transmembranar que contém a sequência FXYD (Kühlbrandt, 2004). Algumas proteínas FXYD conhecidas regulam a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase em tecidos como o de coração, músculo esquelético e rim. Esta subunidade é um pequeno polipeptídeo (~ 10 kDa), denominado primeiramente como “componente proteolípídica”, e foi identificada em algumas preparações purificadas da enzima. Esta 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 Na^+ (Béguin et al., 1997; Therien et al., 1997).

2.4.2.

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 de íon K^+ intracelular: altas concentrações de íon K^+ intracelular são de importância para que aconteça um número de reações enzimáticas dentro das células;
- A regulação osmótica: com um potencial de membrana negativo a concentração intracelular de ânions capazes de se difundir 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, e para conter o transporte de Ca^{2+} ou H^+ contra gradiente através da membrana celular.

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 ouabaína, por neurotransmissores como a dopamina (inibidor) e norepinefrina (estimulador), e por hormônios como a insulina (Yu, 2003).

Segundo o mecanismo de reação de Albert-Post para a hidrólise de ATP pela enzima (Fig. 2.12), a proteína de membrana possui dois estados conformacionais E_1 e E_2 durante cada ciclo catalítico.

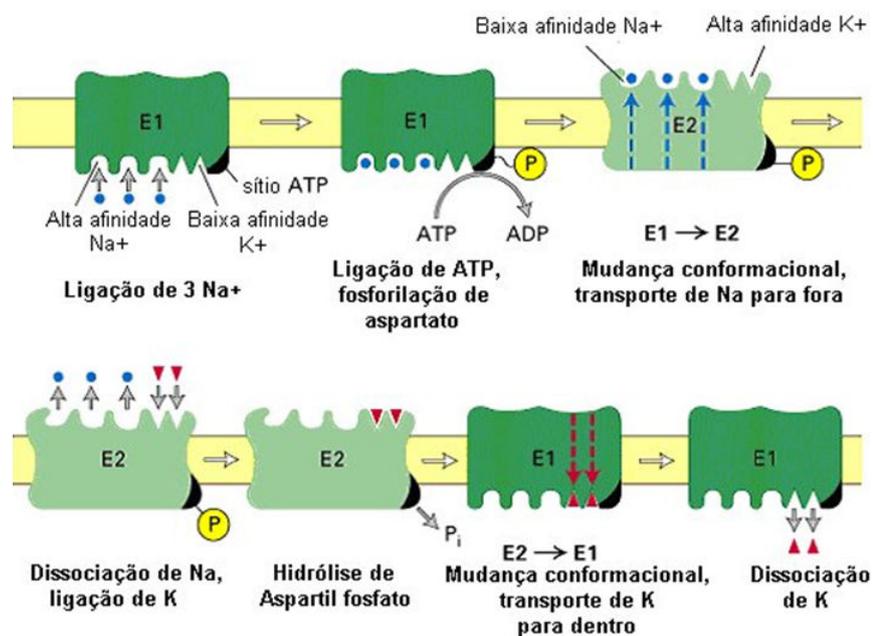
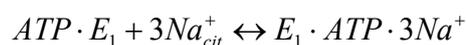


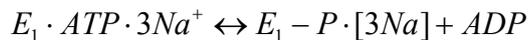
Figura 2. 12 Esquema simplificado de Post-Albers (1969) do ciclo da bomba de sódio. E_1 e E_2 são as conformações da enzima com os sítios de ligação.

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

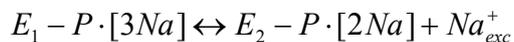
- a. Ligação de três íons Na^+ em sítios orientados para o citoplasma.



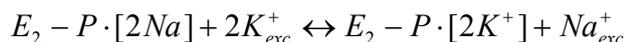
- b. Fosforilação dependente de Na^+ citoplasmático, a partir do ATP, e oclusão de três íons Na^+ .



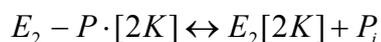
- c. O transporte de três íons Na^+ para a região extracelular, acoplado à transição conformacional $E_1\text{-P} \leftrightarrow E_2\text{-P}$.



- d. Ligação de dois íons de K^+ aos sítios orientados para a região extracelular.



- e. Desfosforilação ativada por K^+ extracelular e oclusão de dois íons K^+ .



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



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 $E_2\text{P}$. 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 $E_1\text{-P} \leftrightarrow E_2\text{-P}$ é fortemente inclinado a favor da forma $E_2\text{-P}$ (Jorgensen et. al. 2003)

2.5. Sondas fluorescentes

Uma sonda fluorescente é compreendida como um fluoróforo preparado para responder a um estímulo específico ou localizar-se em uma determinada região de uma espécie biológica.

As principais vantagens do emprego de sondas ligadas à técnica de fluorescência são: (a) a **sensibilidade**, pode-se estudar materiais fluorescentes em quantidades de picogramas, (b) **seletividade**, derivada em parte pelos

comprimentos de onda de excitação e de emissão de fluorescência que são característicos de cada composto e, (c) a **variedade de possibilidades** em que as amostras podem ser rapidamente estudadas, ou seja, em soluções diluídas ou concentradas, em suspensões (meio micelar) ou em superfícies de sólidos.

As sondas fluorescentes podem ser divididas dentro de 3 classes: (1) **sondas intrínsecas**, como o triptófano nas proteínas (absorve em torno de 295 nm e emite em 350 nm em água); (2) **sondas extrínsecas ligadas** covalentemente; e (3) **sondas extrínsecas associadas** (Valeur B., 2002).

Antroil-ouabaína e a 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 é muito utilizado em tratamentos de insuficiência cardíaca congestiva (Rang H. P. et al., 1993). A ouabaína tem alta afinidade pelo complexo $\text{MgE}_2\text{-P}$ da Na^+ , K^+ - ATPase, portanto é necessário a presença de Mg^{+2} no solvente para iniciar a conversão da conformação $\text{E}_1\text{-P}$ a $\text{E}_2\text{-P}$ (Jorgensen P. L. 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 inibitória, que depende principalmente da parte esteróide do glicosídeo (Fortes P. A., 1977) (Fig. 2.13). Esta sonda fluorescente é usada em vários estudos de Na^+ , K^+ - ATPase, como em cinética de ligação dos glicosídeos cardíacos, em estrutura e mudanças conformacionais (Lee J. A. et al., 1986; Amler et al., 1992; Amler et al., 1996), assim como para detecção de estados intermediários fosforilados da enzima (Fortes P. A. et al., 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, permitindo a utilização de concentrações baixas, semelhantes às fisiologicamente relevantes. A especificidade do marcador faz com que a

purificação da enzima não seja um fator primordial para obtenção de resultados confiáveis.

Hellen et al., (1997) 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.

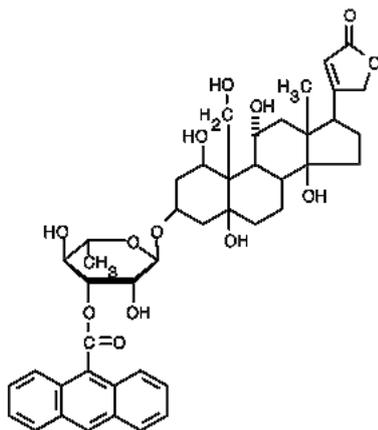


Figura 2. 13 Estrutura química da antrouil-ouabaína.

DPH (1,6 – difenil - 1,3,5 - hexatrieno)

DPH é uma sonda usada frequentemente para estudos de propriedades dinâmicas e estruturais das membranas e também para estimar a fluidez da membrana. Esta sonda fluorescente é ideal para tais experimentos visto que exibe um forte aumento de fluorescência quando em meio lipídico e responde à ordem de orientação dos fosfolipídios, já que sua emissão é muito sensível à anisotropia do ambiente local.

A DPH, mostrada na Fig. 2.14, é considerada uma molécula cilíndrica com seu dipolo de transição aproximadamente alinhado com seu eixo molecular. Conseqüentemente, a polarização de sua fluorescência é alta na ausência de movimento de rotação e é muito sensível à reorientação ao longo do eixo molecular, resultado das interações com os lipídios vizinhos na bicamada. A molécula de DPH dentro da bicamada de lipídios é geralmente orientada paralelamente ao eixo da cadeia do lipídio, mas pode também localizar-se no

centro da bicamada de lipídios paralela à superfície. Essas propriedades têm conduzido a seu uso extensivo para medições de fluidez em membranas.

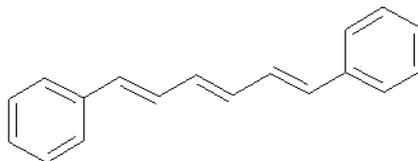


Figura 2. 14 Estrutura química da sonda DPH.

As medições de fluidez são feitas pelo processo despolarização da fluorescência. Quando as moléculas de DPH inseridas na bicamada de lipídios absorvem energia da luz polarizada verticalmente, por exemplo, emitem luz a partir do primeiro estado excitado singlete, depois de um tempo médio caracterizado pelo tempo de vida do estado excitado. Quando as moléculas dos lipídios da membrana estão em repouso, as moléculas de DPH permanecem orientadas verticalmente na bicamada e a luz emitida também é polarizada. Se as moléculas dos lipídios têm mobilidade grande, os eixos moleculares da DPH mudam de direção durante o tempo de vida do estado excitado, e a direção de polarização da luz emitida também muda aleatoriamente. Assim, é possível associar a perda de polarização com a mobilidade dos lipídios.

FITC (fluoresceína isotiocianato – isômero I)

A FITC (Fig. 2.15 B) é a molécula original de fluoresceína (Fig. 2.15 A) acrescida com um grupo funcional isotiocianato ($-N=C=S$). Este derivado de fluoresceína é capaz de unir-se a proteínas, reagindo com os grupos amina. A Na^+, K^+ -ATPase, na subunidade, α , é covalentemente marcada com a sonda FITC no aminoácido Lis 501 (lisina). Este aminoácido está localizado perto do sítio da ATP (ADP) em Lis 480 (Lis 492), e é utilizada para estudar efeitos estruturais locais nesse sítio (Amler et al., 1992; Jorgensen et al., 2003).

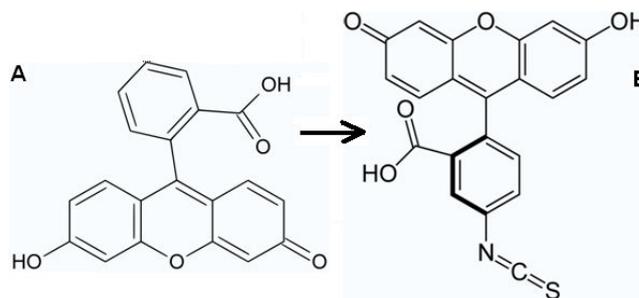


Figura 2. 15 Estrutura química da fluoresceína (A) e FITC (B).