



Elmer Augusto Cueva Guevara

**EFEITOS DE UM ANTIPSICÓTICO E UM ANTIDEPRESSIVO
TRICÍCLICO SOBRE A BOMBA DE SÓDIO E POTÁSSIO,
 Na^+, K^+ -ATPase: ESTUDO ATRAVÉS DE FLUORESCÊNCIA**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Física do Departamento de Física da
PUC-Rio.

Orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro

Rio de Janeiro
Setembro de 2005



Elmer Augusto Cueva Guevara

**EFEITOS DE UM ANTIPSICÓTICO E UM ANTIDEPRESSIVO
TRICÍCLICO SOBRE A BOMBA DE SÓDIO E POTÁSSIO,
 Na^+, K^+ -ATPase: ESTUDO ATRAVÉS DE FLUORESCÊNCIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Física pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Centro Técnico Científico da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Sônia Renaux Wanderley Louro
Orientadora
Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. Carlos Frederico Leite Fontes
Instituto de Bioquímica – UFRJ

Prof. Celia Beatriz Anteneodo
Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. Marco Cremona
Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal
Coordenador Setorial de Pós-Graduação
Centro Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 16 de setembro de 2005

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e da orientadora.

Elmer Augusto Cueva Guevara

Graduou-se em Física na UNPRG (Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque - Perú) em 1998 com ênfase em Biofísica, Física Experimental e Ensino de Física. Iniciou o mestrado em Física na PUC em 2003 na área de Espectroscopia de Biomoléculas.

Ficha Catalográfica

Guevara, Elmer Augusto Cueva

Efeitos de um antipsicótico e um antidepressivo tricíclico sobre a bomba de sódio e potássio, Na,K-ATPase: estudo através de fluorescência / Elmer Augusto Cueva Guevara; orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro. – Rio de Janeiro PUC, Departamento de Física, 2005.

100 f. : il. ; 29,7 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física.

Inclui referências bibliográficas.

1. Física – Teses. 2. Biofísica. 3. Fluorescência. 4. Antidepressivos. 5. Na,K-ATPase. I. Louro, Sônia Renaux Wanderley. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física. III. Título.

CDD: 530

A meus pais Augusto e Julieta,
A meus irmãos Sabani, Billy, Hilderbrando, Henry e,
Ao povo do Brasil.

Agradecimentos

A Deus.

A minha orientadora, professora Sônia Renaux Wanderley Louro, por ter me aceitado e acreditado em minha pessoa. Sua competência e dedicação pelo projeto sempre me motivaram e inspiraram ainda mais.

Ao professor M. Cremona do Depto. de Física pelo seu ensino e amizade.

A todo o pessoal do Departamento de Física da Universidade Pontifícia Católica de Rio de Janeiro.

Às instituições CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

E a todos que me acompanharam: Lourdes, Fernando, Luiz, Tiago, Robert, Rafael, etc. que de uma forma indireta colaboraram neste trabalho, mediante sua amizade, fazendo minha estadia no Brasil mais confortável.

Resumo

Guevara, Elmer Augusto Cueva; Louro, Sônia Renaux Wanderley. **Efeitos de um antipsicótico e um antidepressivo tricíclico sobre a bomba de sódio e potássio, Na^+,K^+ -ATPase: estudo através de fluorescência.** Rio de Janeiro, 2005. 100p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A bomba de sódio e potássio Na^+,K^+ -ATPase é uma enzima que oscila entre duas conformações principais E_1 e E_2 durante o ciclo de transporte dos íons Na^+ e K^+ através de membranas. O esteróide cardiotônico ouabaína é um inibidor específico que se liga à enzima na conformação E_2 . A sonda fluorescente antroil-ouabaína (AO) apresenta incremento de fluorescência ao associar-se ao sítio de ouabaína da Na^+,K^+ -ATPase. Várias drogas tricíclicas, incluindo o antipsicótico clorpromazina (CPZ) e o antidepressivo nortriptilina (NOR), inibem a atividade da Na^+,K^+ -ATPase em concentrações clinicamente relevantes. No presente trabalho estudaram-se os efeitos de NOR e de CPZ sobre a fluorescência de AO associada a Na^+,K^+ -ATPase. A nortriptilina aumentou a fluorescência de AO, tendo sido esse efeito dependente da concentração de droga e da conformação da enzima. Os resultados permitiram a obter a constante de associação NOR- Na^+,K^+ -ATPase e sugeriram que essa associação tende a estabilizar a conformação E_2 . Já a clorpromazina em concentrações abaixo de $10\text{ }\mu\text{M}$ teve efeito desprezível sobre a fluorescência de AO. Irradiação com luz ultravioleta, no entanto, provocou reações foto-induzidas de CPZ com Na^+,K^+ -ATPase que modificaram a cinética de formação dos produtos de fotodegradação de CPZ, como demonstrado através da fluorescência desses produtos. A foto-associação de CPZ com Na^+,K^+ -ATPase alterou também a estrutura local do sítio de ouabaína, provocando aumento considerável do rendimento quântico e deslocamento do pico de fluorescência de AO. A fototoxicidade associada à CPZ indicou potencial para sua utilização em fotoquimioterapia.

Palavras-chaves

Biofísica, antidepressivo, antipsicótico, Na,K -ATPase, espectroscopia, fluorescência, clorpromazina, nortriptilina.

Abstract

Guevara, Elmer Augusto Cueva; Louro, Sônia Renaux Wanderley. **Effects of an antipsychotic and a tricyclic antidepressant on the sodium and potassium pump, Na^+,K^+ -ATPase: a fluorescence study.** Rio de Janeiro, 2005. 100p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The sodium and potassium pump Na^+,K^+ -ATPase is an enzyme that oscillates between two major conformations E_1 and E_2 during the ion transport cycle across membranes. The cardiotonic steroid ouabain specifically inhibits this enzyme by binding to the E_2 conformation. The fluorescent label anthroylouabain (AO) presents increased fluorescence when binding to the ouabain site of Na^+,K^+ -ATPase. Tricyclic drugs such as the antipsychotic chlorpromazine (CPZ) and the antidepressant nortriptyline (NOR) inhibit Na^+,K^+ -ATPase activity at clinically relevant concentrations. In the present work the effects of NOR and CPZ on the fluorescence properties of AO-bound Na^+,K^+ -ATPase of electrocyte membranes from *E. electricus* were studied. Nortriptyline was found to increase the AO fluorescence in a concentration and conformation-dependent manner. The association constant between NOR and Na^+,K^+ -ATPase was obtained. The results suggested that the binding of NOR shifts the conformation equilibrium of the enzyme towards E_2 . CPZ, on the other hand, induced negligible fluorescence change up to 10 μM . Ultraviolet irradiation, however, provoked photo-induced reactions of CPZ with Na^+,K^+ -ATPase, which modified the kinetics of CPZ-photodegradation, as demonstrated by the fluorescent products. The photolabeling of Na^+,K^+ -ATPase with CPZ also modified the local structure of the ouabain site inducing a blue shift and a considerable increase of the AO quantum yield. The results suggest that CPZ binds to Na^+,K^+ -ATPase and photolabels amino-acid residues near the ouabain binding site. The CPZ-associated phototoxicity pointed to its potential use in photochemotherapy.

Keywords

Biophysics, antidepressant, antipsychotic, Na,K -ATPase, spectroscopy, fluorescence, chlorpromazine, nortriptyline.

Sumário

1. Introdução	
1.1 Introdução	13
1.2 Objetivos	14
1.3 Estrutura dos capítulos	15
2. O sistema biológico	
2.1 Membrana Biológica	16
2.2 A Enzima Na^+ , K^+ -ATPase	20
2.3 Ouabaína e a sonda fluorescente antroil-ouabaína	30
2.4 Fármacos heterocíclicos derivados de amina	32
3. Técnicas Experimentais	
3.1 Conceitos básicos	36
3.2 Espectroscopia de Absorção	39
3.3 Espectroscopia de Emissão	46
3.4 Associação de ligantes a macromoléculas	51
4. Materiais e Métodos	
4.1 Materiais	54
4.2 Procedimentos Experimentais	55
5 Resultados e Discussão	
5.1 Fluorescência da antroil-ouabaína: efeito da ligação à Na^+ , K^+ ATPase	60
5.2 Interação de Nortriptilina (NOR) com Na^+ , K^+ -ATPase	64
5.3 Estudo da fotodegradação de CPZ: influência de Na^+ , K^+ -ATPase	72
5.4 Interação de clorpromazina (CPZ) com Na^+ , K^+ -ATPase	83
6. Conclusão	
6.1 Conclusões	93
6.2 Perspectivas	94
Referências Bibliográficas	96

Índice de Figuras

- Figura 2.1 Esquema da estrutura de uma membrana biológica. Modelo de mosaico fluido (www.biof.ufrj.br/fisbio/Aula_membranas_1.pdf). 17
- Figura 2.2 Esquema de níveis de estrutura das proteínas. 19
- 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 membranar (M) (Werner Kühlbrandt, 2004). 22
- 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). 22
- 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). 23
- 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). 25
- 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). 26
- Figura 2.8 Esquema da estrutura de um heterodímero (α - β) da Na^+ , K^+ -ATPase. 27
- Figura 2.9 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. 28
- 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). 30
- Figura 2.11 Estrutura química da antroil-ouabaína (Fortes, 1977). 32
- Figura 2.12 Estrutura química da Nortriptilina (Carfagna et al., 1993). 33
- Figura 2.13 Desenho da estrutura molecular da Clorpromazina (3-[(2-cloro-10H-fenotiazin-10-il)]-N,N-dimetil-propan-1-amine) determinada por cristalografia de raios X (Horn, 1971). 34
- Figure 3.1 Esquemas para as probabilidades de transição de uma molécula envolvendo os estados vibracionais de dois estados eletrônicos, sendo R a distância internuclear. O mínimo de energia corresponde à distância de equilíbrio em cada estado eletrônico (www.chemkeys.com). 37
- Figure 3.2 Níveis vibracionais (v) e rotacionais (J) de dois estados eletrônicos de uma molécula denotados por I e II. As três setas indicam (da esquerda para a direita) transições rotacional, vibracional e eletrônica da molécula (Alcantara Jr., 2002). 38
- Figura 3.3 Esquema de energias correspondentes a transições eletrônicas (SHU - School of Science and Mathematics: www.shu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials/). 40

Figura 3.4 Esquema óptico de um espectrofotômetro de duplo feixe (www.chemkeys.com). 44

Figura 3.5 Diagrama de Jablonski para o sistema de níveis de energia para a molécula de benzeno (www.chemkeys.com). 46

Figura 3.6 Esquema óptico de um espectrofluorímetro modelo SLM-500 Aminco (www.chemkeys.com). 48

Figura 5.1 Espectro de absorção da AO (0,5 μM) em tampão T_2 . 60

Figura 5.2 Espectros de fluorescência da AO excitada em 365 nm (A) em tampão T_2 (cubeta 1 ml); (B) em presença de Na^+ , K^+ - ATPase. 61

Figura 5.3 Fluorescência da AO em função da concentração em tampão T_2 , na ausência (\circ) e na presença (\bullet) de Na^+ , K^+ - ATPase. Para diminuir as flutuações, tomou-se a média em 4 comprimentos de onda em torno do máximo. 62

Figura 5.4 Decaimento da fluorescência de AO / Na^+ , K^+ -ATPase em função do tempo após adição de ouabaína (200 μM). $[\text{AO}] = 1,5 \mu\text{M}$; $[\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}] = 100 \mu\text{g.ml}^{-1}$. A curva contínua é o resultado do ajuste por mínimos quadrados usando um decaimento exponencial com constante de tempo de 50 min. 63

Figura 5.5 Espectro de absorção ótica da nortriptilina em tampão Tris pH 7,4. 65

Figura 5.6 A. Espectros de fluorescência da AO (1,5 μM) – Na^+ , K^+ -ATPase (0,25 mg.ml^{-1}) em tampão T_2 , com ATP 0,5 mM, tratada com diferentes concentrações de NOR (exc. 365 nm; cubeta 1 ml); B. Mesmos espectros, subtraídos do espectro em ausência de NOR (espectro inferior de A); C. Gráfico do aumento de fluorescência em 470 nm da AO em função da concentração de NOR. (Para diminuir a flutuação foi utilizada a média de 5 pontos em torno de 470 nm) 66

Figura 5.7 A. Espectros de fluorescência da AO (1,5 μM) – Na^+ , K^+ -ATPase (0,25 mg/ml) em tampão T_1 , tratada com diferentes concentrações de NOR (exc. 365 nm; cubeta 1 ml); B. Mesmos espectros, subtraídos do espectro em ausência de NOR (espectro inferior de A) e subtraídos do espalhamento; C. Gráfico do aumento de fluorescência em 470 nm da AO em função da concentração de NOR. (Para diminuir a flutuação foi utilizada a média de 9 pontos em torno de 470 nm) 68

Figura 5.8 Influência de nortriptilina nos espectros de fluorescência da AO (A) em tampão T_2 e (B) em tampão T_1 (Exc. 365 nm; cubeta 1 ml). Os espectros apresentados estão subtraídos do espectro inicial, em ausência de nortriptilina. 70

Figura 5.9 Espectros de absorção ótica da CPZ em tampão T_1 sem exposição a radiação (—) e após exposição à radiação ultravioleta do espectrofluorímetro ($\lambda = 306 \text{ nm}$) durante 1,5 h (.....). O gráfico inserido mostra o pico em 254 nm. 72

Figura 5.10 Espectros de fluorescência da CPZ (20 μM ; exc. 306 nm; cubeta 1 ml) em tampão T_1 , em diferentes tempos de irradiação com a luz de excitação. (A) Espectro inicial (preto) e em 6 e 12 min (cinza escuro e claro, respectivamente). (B) Espectros em 18, 36, 48, 60, 72, 90, 108, 138, 156, 174, 192 e 216 min, nos sentidos indicados pelas setas. 74

Figura 5.11 Diferença entre espectros de fluorescência da CPZ (20 μM) em tampão T_1 (exc. 306 nm; cubeta 1 ml) entre vários tempos de irradiação. À esquerda, espectro em 8 e em 50 min subtraídos do espectro inicial (preto, cinza); espectro em 3h subtraído do espectro em 50 min (cinza claro). À direita, espectros em tempos indicados na figura subtraídos do espectro em 14 min. 75

Figura 5.12 Variação da fluorescência em função do tempo de irradiação em 306 nm. 76

Figura 5.13 Espectros de fluorescência da CPZ em tampão T_2 (20 μ M; exc. 306 nm; cubeta 1 ml) em diferentes tempos de irradiação com a luz de excitação. 77

Figura 5.14 Variação da fluorescência em função do tempo de irradiação em 306 nm. O comprimento de onda referente a cada símbolo aparece na figura. 78

Figura 5.15 Espectros de fluorescência da CPZ (20 μ M, Exc. 306 nm) em presença de Na^+, K^+ -ATPase no tampão T_1 . As medidas foram feitas em diferentes tempos de irradiação ultravioleta (306 nm). Inserção. Gráfico da fluorescência da CPZ em 375 nm e em 450 nm, em função do tempo de irradiação. 79

Figura 5.16 Espectros de fluorescência da CPZ (20 μ M, Exc. 306 nm) em presença da enzima no tampão T_2 . As medidas foram feitas a diferentes tempos de irradiação ultravioleta (306 nm). Inserção. Gráfico da fluorescência da CPZ, em 375 nm e em 450 nm, em função do tempo de irradiação. 80

Figura 5.17 Espectros de fluorescência da AO – Na^+, K^+ -ATPase (exc. 365 nm; cubeta 1 ml) em tampão T_2 pH 7,4, em diferentes concentrações de CPZ. Desses espectros já foi subtraído o branco, obtido com a Na^+, K^+ -ATPase em tampão T_2 . 84

Figura 5.18 Espectros de fluorescência de AO – Na^+, K^+ -ATPase (exc. 365 nm; cubeta 1 ml) em tampão T_2 pH 7,4, [CPZ] = 21 μ M, em diferentes tempos de iluminação de amostra. Desses espectros já foi subtraído o branco, obtido com a Na^+, K^+ -ATPase em tampão T_2 . Inserção: Variação da fluorescência da AO (em 451 nm) em função do tempo de iluminação, as setas indicam os instantes em que a amostra foi agitada antes da medida do espectro. 85

Figura 5.19 Espectros de fluorescência da antracil-ouabaína (1,25 μ M; exc. 365 nm; cubeta 1 ml) em tampão T_2 em presença da CPZ (21 μ M) em diferentes tempos de iluminação da luz ultravioleta (6 espectros obtidos em intervalos de tempo de 5 minutos). 86

Figura 5.20 Intensidade de fluorescência de AO – Na^+, K^+ -ATPase (1,25 μ M; cubeta 3 ml; exc. 365 nm; em. 450 nm) em função do tempo em presença de CPZ (20 μ M). A curva inferior refere-se ao tampão T_1 e a superior ao tampão T_2 . 87

Figura 5.21 Espectros de fluorescência de (A) AO (exc. 365 nm; cubeta 1 ml), à esquerda, e de (B) CPZ (exc. 306 nm; cubeta 1 ml), à direita, no sistema CPZ-AO- Na^+, K^+ -ATPase em tampão T_2 , ATP. [CPZ] = 20 μ M; [AO] = 1,25 μ M. O espectro inferior, em cada gráfico, refere-se ao sistema antes da adição de CPZ. Os espectros, em ordem crescente, foram registrados, subsequente, ora com excitação em 365 nm, ora em 306 nm, de 6 em 6 minutos. 89

Figura 5.22 Fluorescência de AO (exc. 365 nm) e de CPZ (exc. 306 nm) em função do tempo. Os valores de fluorescência correspondem à média de 5 pontos em torno de $\lambda = 453$ nm (AO) e $\lambda = 450$ nm (CPZ). 90

Abreviaturas

AO	antroil-oubaína
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	adenosina trifosfatase
CPZ	clorpromazina
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
IC ₅₀	concentração da droga necessária para inibir 50 % da atividade da enzima
mM	milimol por litro
μM	micromol por litro
NOR	nortriptilina
Pi	fosfato inorgânico
PZ	promazina
UV	ultravioleta