

# 1. Introdução

## 1.1 Introdução

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

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

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

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

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

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

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

## 1.2 Objetivos

Essa dissertação tem os objetivos principais seguintes:

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

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

### 1.3

#### Estrutura dos capítulos

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

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