



Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**ESTUDO DAS PROPRIEDADES CINÉTICAS DAS ISOFORMAS $\alpha 1$ E $\alpha 2-3$ Na^+ ,
 K^+ - ATPase EM CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATOS**

Dissertação de Mestrado

Igor Leal Brito

Campo Grande, MS, Brasil,

2022.

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES CINÉTICAS DAS ISOFORMAS α 1 e α 2-3 Na⁺,
K⁺ - ATPase EM CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATOS**

Igor Leal Brito

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa em marcadores moleculares estudos epidemiológicos e pré-clínicos, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

Co-orientador: Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena

Campo Grande, MS, Brasil,

2022

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES CINÉTICAS DAS ISOFORMAS α 1 e α 2-3 Na⁺,
K⁺ - ATPase EM CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATOS**

Elaborada por

Igor Leal Brito

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques (Orientador)

Profa. Dra. Vanessa Faria Cortes - Membro titular (Universidade Federal de São
João Del-Rei)

Prof. Dr. Douglas Chodi Masui - Membro titular (UFMS)

Prof. Dra. Giovana Cristina Giannesi - Membro Suplente (UFMS)

Campo Grande, 11 de fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

José Mario de Brito e Deusélia Leal da Silva Brito, eu os agradeço pela vida, pela educação e por me apoiarem tanto a seguir meus sonhos. Com o amadurecimento, posso enxergar melhor o trabalho e a dedicação que tiveram para meu crescimento. Me lembro que quando criança, e quando muito questionador, vocês me incentivaram a buscar respostas. Na adolescência, um pouco menos motivado, vocês me lembraram que o mundo era muito maior. E agora, no início da vida adulta vocês ainda se fazem presentes cotidianamente, com as mesmas preocupações e manias. A verdade é que esse cuidado se reflete na pessoa que sou e nas nossas conquistas. Após uma sequência de anos tão difíceis que passamos dada a pandemia, eu sou muito grato por tê-los, por poder ouvir seus conselhos e nos amar. Eu não poderia iniciar esses agradecimentos de outra forma, então muito obrigado, muito obrigado mesmo. Espero um dia conseguir corresponder tudo isso.

Professor **Dr. Jeandre**, agradeço pelos anos de aprendizado, pelo crescimento que me proporcionou e pela amizade que construímos. Professor, sob sua orientação eu aprendi muitas coisas, são hábitos e atitudes que tomo como exemplo de homem justo e humano. Para além da orientação, nesses últimos anos passei por várias experiências e pude contar com seu apoio sempre que precisei. Então eu o agradeço pela oportunidade, pela experiência sem igual e por acreditar em mim!

Ademar, por esses dias eu li em algum lugar sobre ser clichê agradecer ao companheiro em trabalhos acadêmicos. Mas o que posso fazer? Você esteve presente desde o início deste trabalho, me ajudou e mesmo agora está aqui comigo me lembrando o que importa. Então só posso agradecer pelo companheirismo, pela amizade e pelo amor. Aproveito para agradecer aqui esses 7 anos de parceria e reafirmar meu desejo de que possamos crescer muito mais juntos nos anos que virão.

Agradeço também às minhas amigas **Carla, Camila, Amanda, Ana Karine, Andriele, Anna Resende, Nathália e Jhonatan**. Meninas, quando iniciamos a faculdade era improvável dizermos que nos tornaríamos amigos de longa data. Pois é, aqui estamos. Eu agradeço pela amizade, pelos conselhos, pelo cuidado e acolhimento que recebi. É uma honra dizer que pudemos chorar, sorrir juntas e enfrentar os momentos mais difíceis. Desejo todo sucesso para vocês.

Amigas, **Andreza e Flávia**, eu preciso dedicar um momento para agradecer a vocês. Durante o mestrado alguns momentos são de muita alegria e descoberta, alguns são de frustrações e pressão. Eu não posso dizer que passei por essas coisas só, desde o início tinha a Flávia para rir de nossas desventuras e logo a Andreza chegou para completar a trupe e somar. Meninas, obrigado pela ajuda quando precisei e pelo aprendizado coletivo.

Agradeço à **Ana** que trabalha na conservação e limpeza no INBIO e no Laboratório de Bioquímica. Aproveito o momento para agradecer a todas as moças e rapazes que ajudam na conservação do espaço ali na UFMS. Todos têm histórias

fantásticas e sonhos para conquistar. Eu rezo pelo sucesso de vocês, por oportunidades e mudanças no nosso país.

Agradeço aos colegas do laboratório pelas experiências vivenciadas: **Amanda, Nelciele, Aline, Daniel, Bruna, Carol, Romário, Telma, Henrique e Rodrigo.**

Agradeço ao professor **Dr. Malson Neilson**. Se um dia eu for professor (e quero!), desejo ensinar com a paixão que um dia eu o vi professando, quando fui seu aluno. Seu cuidado ao ensinar, a didática, suas observações primorosas e conhecimento profundo me inspiram. Obrigado pela orientação e pelo aprendizado.

Agradeço à professora **Dra. Giovana Giannesi** pelos momentos de aprendizado, pelos conselhos e pelo acolhimento. A senhora é uma pessoa especial, pro. Sempre foi muito carinhosa e atenciosa quando precisei, inclusive tornava alguns dias mais especiais. Obrigado pelos mimos e pelo café diário.

Agradeço à professora **Dra. Maria Rita**. Desde a graduação carrego um carinho imenso pela senhora. Nossos momentos conversando na bioquímica, sua preocupação com meu estado pessoal, todas essas memórias e experiências estão gravadas em mim. Levo muita estima e respeito pela sua pessoa e trabalho.

Agradeço ao Professor **Dr. Jean Pierre** pelos ensinamentos, pelas conversas e por auxiliar com algumas dicas para melhorar os resultados.

Agradeço à Profa. **Dra. Vanessa Faria Cortes** pelas contribuições ricas geradas em nosso primeiro contato em uma matéria do mestrado. E agradeço também por aceitar esse convite e agora ver a realização deste trabalho.

Agradeço ao **Prof. Dr. Douglas Chodi Masui** pelos ensinamentos que ajudou a construir no campo na enzimologia, pelas dicas metodológicas e por aceitar o convite para banca de avaliação deste trabalho.

Agradeço Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGFARM) e a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Mesmo em meio a uma onda de ignorância, essas instituições seguem lutando para que exista uma ciência nacional e de qualidade.

Por fim, agradeço aos meus amigos e parentes que mesmo distante acreditam e querem meu sucesso.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha 1\text{NKA}$	Isoformas 1 da subunidade α da enzima Na^+ , K^+ -ATPase
$\alpha 2\text{-3NKA}$	Isoformas 2 e 3 da subunidade α da enzima Na^+ , K^+ -ATPase
ADP	Adenosina difosfato
ASP	Resíduo de aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
ATV	Atividade enzimática
Ca^{2+}	Íon cálcio
Cl^-	Íon cloreto
CX	Córtex cerebral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DomA	Domínio atuador
DomN	Domínio N ou domínio de ligação do nucleotídeo
DomP	Domínio P ou domínio de fosforilação
DomS	Domínio de suporte da subunidade α da enzima Na^+ , K^+ -ATPase
DomT	Domínio transmembranar da Na^+ , K^+ -ATPase
E1	Conformação E1 da enzima Na^+ , K^+ -ATPase
E2	Conformação E2 enzima Na^+ , K^+ -ATPase
EDTA	Solução de ácido etilenodiamino tetra-acético
HP	Hipocampo
INBIO	Instituto de Biociências da UFMS
K^+	Íon potássio
$K_{0,5}$	Constante de dissociação aparente
KCl	Cloreto de potássio
K_m	Constante de Michaelis–Menten
Mg_2^+	Magnésio
MgCl_2	Cloreto de magnésio
Na^+	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
nH	Coeficiente de Hill
NH_4^+	Íon Amônio
NH_4Cl	Cloreto de amônio
NKA	Na^+ , K^+ -ATPase

NKAT	Atividade enzimática total da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase
OUA	Ouabaína
P	Probabilidade de significância
r ²	Coeficiente de determinação
S1	Sobrenadante da primeira centrifugação
S2	Sobrenadante da segunda centrifugação
TCA	Solução de ácido tricloroacético
TM	Segmentos transmembranares da subunidade α da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase
V _{máx}	Velocidade máxima

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - A Na^+ , K^+ - ATPase e a regulação de íons através da membrana.....	04
Figura 2 - Representações da estrutura da Na^+ , K^+ -ATPase.....	07
Figura 3 - Esquema do mecanismo catalítico da Na^+ , K^+ -ATPase.....	12
Figura 4 - Interações da ouabaína com a Na^+ , K^+ -ATPase.....	14
Figura 5 - Mecanismo de transmissão sinais através de potenciais de ação no neurônio	16

MANUSCRITO

Graphical abstract.....	33
Figura 1. A atividade das isoformas 1 e 2- 3 e NKA total em função da concentração de proteínas em CX e HP.....	40
Figura 2. Estimulação da atividade da $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -3 NKA por ATP (0-4mM) no CX e HP.....	41
Figura 3. Estimulação da atividade da $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -3 NKA por NaCl (0-130mM) no CX e HP.....	43
Figura 4. Estimulação da atividade da $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -3 NKA por KCl (0-7mM) no CX e HP.....	45
Figura 5. Estimulação da atividade da $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -3 NKA por MgCl_2 (0-7mM) no CX e HP.....	46
Figura 6. O efeito de NH_4Cl (de 0-10 mM) na atividade da $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -3 NKA de CX e HP.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema para obtenção da atividade das isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -3 NKA.....	38
Tabela 2. Valores de $K_{0,5}$, $V_{\text{máx}}$ e nH definidos para a curva com ATP.....	42
Tabela 3. Valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ definidos com a curva com NaCl.....	43
Tabela 4. Valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ definidos para a curva com KCl.....	45
Tabela 5. Valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ definidos para a curva com MgCl_2	47

SUMÁRIO

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 A Na⁺, K⁺-ATPase.....	04
2.1.1 Características estruturais da Na⁺, K⁺-ATPase	06
2.1.2 As propriedades cinéticas da Na⁺, K⁺-ATPase	09
2.2 Mecanismo catalítico da Na⁺, K⁺-ATPase.....	11
2.3 Mecanismos de regulação.....	13
2.4 A Na⁺, K⁺-ATPase no encéfalo	16
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
REFERÊNCIAS.....	22

CAPÍTULO II

MANUSCRITO	32
GRAPHICAL ABSTRACT	23
ABSTRACT.....	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
Animais	36
Ensaio e procedimentos experimentais.....	36
Preparação de homogenatos de HP e CX.....	36
Quantificação do teor de proteína.....	37

Condições para a incubação da enzima Na ⁺ , K ⁺ -ATPase.	37
Cálculo para a determinação da atividade da α 1 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase (α 1NKA) e α 2-3 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase (α 2-3 NKA)	38
Caracterização da atividade enzimática.....	38
Análise estatística.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
Curva da determinação da concentração ideal de proteína.....	39
Efeito do aumento da concentração de ATP na atividade da NKA.....	40
Efeito do aumento da concentração de sódio na atividade da NKA.....	42
Efeito do aumento da concentração de potássio na atividade da NKA.....	44
Efeito do aumento da concentração de magnésio na atividade da NKA.....	46
Efeito de NH ₄ Cl na atividade da α1NKA, α2-3NKA e NKA total.....	47
CONCLUSÃO.....	48
AGRADECIMENTOS.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

RESUMO

ESTUDO DAS PROPRIEDADES CINÉTICAS DAS ISOFORMAS $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ Na^+ , K^+ - ATPase EM CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATOS

Autor: Igor Leal Brito

Orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

Co-orientador: Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena

A Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) é uma bomba eletrogênica que mantém a homeostase celular ao transportar íons Na^+ e K^+ através da bicamada lipídica. Nas células do sistema nervoso, a NKA preserva a integridade do neurônio e a transmissão do impulso nervoso. A deficiência na atividade catalítica dessa bomba iônica no encéfalo está correlacionada ao desenvolvimento de diferentes neuropatias funcionais e cognitivas. Regiões do cérebro que regulam funções motoras, memória e aprendizado, são o alvo para entender o funcionamento desses processos neurais. No entanto, não há estudos sobre as propriedades catalíticas das isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ NKA em diferentes regiões do encéfalo. Assim, este estudo traz a caracterização das atividades cinéticas das $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ NKA em homogenatos de córtex cerebral (CX) e hipocampo (HP). As atividades das $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ NKA foram quantificadas em ambas regiões e em crescentes concentrações de ATP, NaCl, KCl, MgCl_2 e NH_4Cl . As constantes cinéticas para as isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ NKA (K_m ou $K_{0,5}$, nH e $V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas para HP e CX. Os resultados deste estudo demonstram que a afinidade da NKA aos íons Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e ao ATP difere entre as isoformas α da NKA e entre as regiões encefálicas CX e HP. Além disso, nossos dados mostram que em baixas e altas concentrações o NH_4 pode afetar a atividade da NKA no CX, mas parece exercer pouco efeito sobre a atividade no HP.

Palavras chave: Caracterização cinética, α Na^+ , K^+ -ATPase, Hipocampo, Córtex cerebral e Atividade enzimática.

ABSTRACT

Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences

Federal University of Mato Grosso do Sul, MS, Brazil

KINETIC PROPERTIES STUDY OF α 1-2 and α 3 ISOFORMS of Na^+ , K^+ - ATPase IN RAT CEREBRAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS

Author: Igor Leal Brito

Advisor: Prof. Jeandre Augusto dos Santos Jaques, PhD.

Co-advisor: Prof. Malson Neilson de Lucena, PhD.

Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) is an electrogenic pump that maintains cellular homeostasis by transporting Na^+ and K^+ ions through the lipid bilayer. In the cells of the nervous system, NKA preserves the integrity of the neuron and the transmission of the nerve impulse. The deficiency in the catalytic activity of this ion pump in the brain is correlated with the development of different functional and cognitive neuropathies. Regions of the brain that regulate motor functions, memory and learning are the target for understanding the functioning of these neural processes. However, there are no studies on the catalytic properties of α 1, 2 and α 3 NKA isoforms in different regions of the brain. Thus, this study brings the characterization of the kinetic activity of α 1 and α 2-3 NKA in homogenates from cerebral cortex (CX) and hippocampus (HP). The activities of α 1 and α 2-3 NKA were quantified in HP and CX and in increasing concentrations of ATP, NaCl, KCl, MgCl_2 and NH_4Cl . The kinetic constants for α 1 and α 2-3 and total NKA (K_m or $K_{0.5}$, nH and V_{max}) were determined for HP and CX. The results of this study demonstrate that the affinity of NKA to ions Na^+ , K^+ , Mg_2^+ and to ATP differs among the α isoforms of NKA and between the CX and HP brain regions. Furthermore, our data show that at low and high concentrations NH_4^+ can affect NKA activity in the CX, but appears to have little effect on the activity in the HP.

Keywords: Kinetic characterization, α Na^+ , K^+ -ATPase, Hippocampus, Cerebral cortex and enzymatic activity.

“Eu agia como um boto que salta na superfície da água só deixando um vestígio provisório de espuma e que deixa que acreditem, faz acreditar, quer acreditar ou acredita efetivamente que lá embaixo, onde não é percebido ou controlado por ninguém, segue uma trajetória profunda, coerente e refletida”.

(Michel Foucault)

1. INTRODUÇÃO

A Na^+ , K^+ -ATPase (EC 3.6.3.9 ou NKA) é uma enzima transmembranar da família das ATPases do Tipo P (subfamília P2-C) (Palmgren & Nissen 2011; Dyla, M et al., 2019). Na membrana plasmática das células animais, a NKA atua no transporte de três íons sódio e dois íons potássio através da bicamada, assim a enzima cria uma diferença de cargas dentro e fora da célula. Esta diferença de polos gera um gradiente eletroquímico transmembranar importante para uma variedade de funções celulares especializadas, como a captação ativa de moléculas como neurotransmissores, aminoácidos, açúcares e nucleosídeos (Mobasheri et al., 2000; Krishnan et al., 2015). Esta bomba eletrogênica transporta os íons Na^+ e K^+ contra o gradiente de concentração, para o transporte ativo entre a bicamada lipídica é necessária a energia gerada pela hidrólise de uma molécula de ATP em ADP e P_i . (Skou, 1957; Mobasheri et al., 2000; Kaplan, J. H., 2002 & Pivarov et al., 2018).

Estruturalmente a NKA possui três subunidades que atuam juntas na atividade catalítica e função sinalizadora da enzima. Estas são: a subunidade catalítica (subunidade α) a subunidade reguladora (subunidade β) e uma terceira proteína pertencente à família FXYD (subunidade γ) (Horisberger, J. D. 2004). Nos mamíferos, diferentes isoformas das subunidades α e β são expressas em tecidos e células específicos. A combinação das isoformas da NKA (por exemplo $\alpha 1\beta 1$ ou $\alpha 1\beta 2$) conferem a enzima propriedades catalíticas distintas no tecido alvo. (Cui & Xie, 2017; Shrivastava et al., 2018). Na membrana plasmática das células do sistema nervoso são encontradas $\alpha 3$ (especificamente em neurônios), $\alpha 2$ (especificamente em células da glia) e $\alpha 1$ NKA (Larsen et al., 2016; Murata et al., 2020). As Isoformas da NKA são expressas de forma heterogênea entre as regiões do cérebro (Murata et al., 2020) e exibem propriedade distintas quanto a afinidade aos íons Na^+ , K^+ e ao ATP, e além disso também exibem sensibilidade específica ao inibidor ouabaína (OUA) (Blanco & Mercer, 1998; Therien & Blostein, 2000). Essas características conferem a enzima a capacidade regular o potencial de ação em diferentes células do sistema nervoso (Blanco & Mercer, 1998; Larsen et al., 2016; Clausen et al., 2017).

Os mecanismos envolvidos na propagação de um impulso nervoso são eletroquímicos (Südhof & Malenka, 2008). No caso, envolvendo a NKA, o impulso nervoso é transmitido por um potencial elétrico gerado pela diferença de cargas na membrana plasmática. Esse potencial é dinâmico e existe devido às diferentes

concentrações intra e extracelulares de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), cálcio (Ca^{2+}), entre outros (Rakowski et al., 1997; Mobasheri et al., 2000; Horisberger, J. D. 2004). Para a transmissão do impulso nervoso, é necessário que um estímulo inicial crie um rápido desequilíbrio na composição iônica da célula. Neste momento, há um *feedback* positivo para a entrada de Na^+ . Como consequência, a alta concentração de Na^+ dentro da célula a leva a um estado de despolarização nas fibras nervosas. A NKA responde ao aumento da concentração de Na^+ intracelular e ajuda a restaurar o potencial de repouso da membrana (Guyton & Hall, 2017).

Neste sentido, a NKA é alvo de estudo em condições neuropáticas. Vários trabalhos demonstram que alterações na atividade das NKA levam ao desequilíbrio iônico e distúrbios neurais, afetando as capacidades motoras e de aprendizado (Moseley et al., 2007; Zhang et al., 2012; Holm et al., 2016; Shrivastava et al., 2018; Lichtstein et al., 2018; Ray et al., 2019). Assim, a atividade enzimática da NKA pode ser usada como marcador para diferentes diagnósticos e alvo para modulação com finalidade de tratar distúrbios cardíacos e neurais (Clausen et al., 2017; Shrivastava et al., 2018)

O estudo das propriedades cinéticas da NKA é uma ferramenta que ajuda a compreender aspectos que afetam a enzima em sua função catalítica. Por exemplo, estudos prévios revelam diferenças marcantes nas propriedades cinéticas e na expressão da NKA no hipocampo (HP), e em lobos que compreendem o córtex cerebral (CX) (Naidu & Katyare, 1992; Kumosani, 2002). Além disso, Murata e colaboradores (2020) demonstraram uma heterogeneidade na expressão das isoformas α e β entre diferentes regiões cerebrais. Por outro lado, os resultados encontrados para as constantes cinéticas na literatura estão distribuídos em diferentes publicações por região encefálica. Além disso, não há resultados quanto a caracterização nas diferentes isoformas α NKA, com as constantes cinéticas de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para íons Na^+ e K^+ e ao substrato.

Por fim, o estudo das propriedades cinéticas da α NKA no encéfalo fornece bases biológicas para a compreensão de aspectos dos processos mentais que nos garantem perceber, transmitir, e responder aos estímulos. O presente estudo apresenta uma revisão acerca dos temas centrais associados à atividade da NKA no encéfalo e os dados da caracterização cinética da NKA no CX e HP. O objetivo deste

estudo é descrever e comparar os parâmetros cinéticos das isoformas α 1NKA e α 2-3 e NKA no CX e HP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Na^+K^+ -ATPase

A bomba de sódio e potássio (bomba de sódio, Na^+K^+ -ATPase ou NKA) é uma enzima presente na membrana plasmática de células animais, sua descoberta é dada primeiramente por Jean Christian Skou em 1957 quando este pesquisador estudou a influência de cátions na manutenção de potenciais em nervos periféricos de caranguejos (Skou, 1957). A NKA catalisa o transporte de três íons sódio e dois íons potássio através da bicamada lipídica e contra o gradiente de concentração (Geering, 1997; Mobasheri et al., 2000; Kaplan, J. H., 2002; Horisberger, J. D. 2004) (Figura 1).

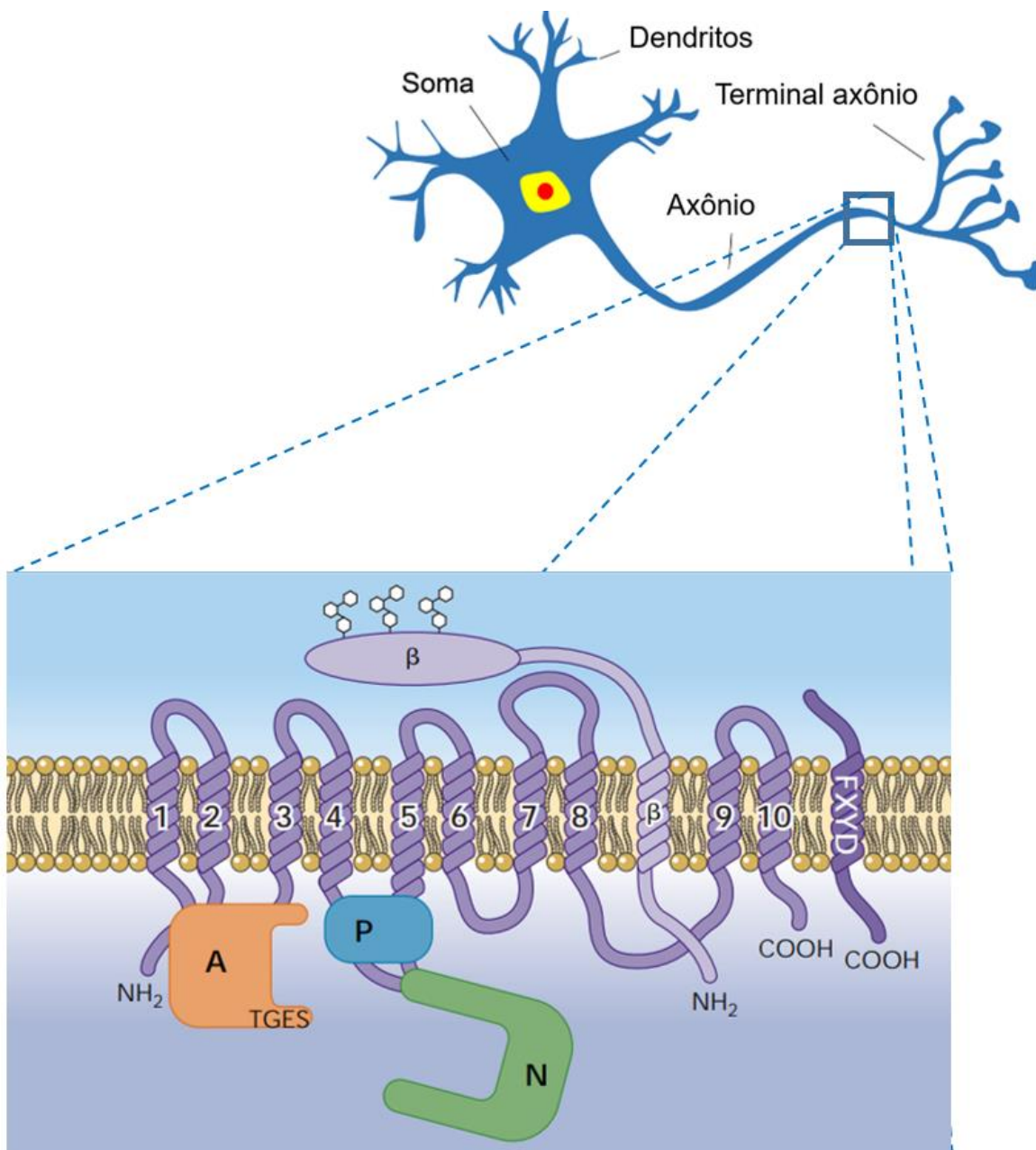


Figura 1. A Na^+ , K^+ - ATPase na membrana do neurônio. Esquema de um neurônio com as regiões do corpo celular. Destaque com aproximação para a região da membrana plasmática, onde se encontra a NKA. Em laranja - domínio A, em azul – domínio P e em verde – domínio N. Na membrana plasmática (lipídios em amarelo) é possível observar o domínio transmembranar e suporte (roxo claro). Em roxo escuro a subunidade γ e em lilás a subunidade β (adaptado de Horisberger, J.D. 2004 e Hwang, S., et al 2020).

Esta troca iônica gera um gradiente eletroquímico que é fundamental para a polarização da membrana plasmática, balanço osmótico, regulação do volume celular e potencial de repouso da membrana celular (Geering, 1997; Mobasheri et al., 2000). Além disso, a NKA está associada a múltiplos complexos proteicos que transmitem sinais para os compartimentos intracelulares (Reinhard et al., 2012). Além do transporte de Na^+ e K^+ , o gradiente de cargas gerado pelo acúmulo de Na^+ é um sinal para os transportadores acoplados a membrana. Desta forma a NKA também dá suporte ao transporte de íons Cl^- , Ca^{2+} e H^+ , glicose e neurotransmissores pela bicamada, estes componentes são importantes na função fisiológica de diferentes organismos (Kaplan, J. H., 2002; Sáez et al., 2009). De uma perspectiva evolutiva, a Na^+K^+ -ATPase é uma ferramenta essencial à membrana para a homeostase de íons dentro e fora de uma célula, sendo pré requisito para a atividade neural (Sáez et al., 2009; Murata et al., 2020) e, por este motivo, atualmente é estudada como marcador em diferentes contextos de distúrbios celulares (Clausen et al., 2017; Shrivastava et al., 2018).

Para troca de Na^+ e K^+ através da bicamada lipídica, a NKA utiliza a energia da hidrólise de uma molécula de ATP (Skou, 1957). Durante o ciclo catalítico há a formação de um intermediário fosforilado com um resíduo de aspartato no domínio catalítico da enzima. Esta é uma característica similar a todas enzimas da família das ATPases como ATPases do tipo V, F e P. Em todas, um intermediário é fosforilado durante o ciclo catalítico. As ATPases do tipo P (P-ATPases) são uma grande família de bombas iônicas e lipídicas que são dispostas por toda membrana celular. São proteínas integrais de membrana que atravessam entre 8-10 vezes em um único polipeptídeo (Palmgren & Nissen 2011; Dyla, M et al., 2019). Essas bombas são divididas em 5 subfamílias e são encontradas em todas formas de vida, atuando na conversão de energia metabólica em gradientes eletroquímicos, mediando a

sinalização celular ou iniciando a secreção de vesículas em compartimentos eucarióticos (Palmgren & Nissen 2011; Dyla, M., et al., 2019). A NKA está dentro da família das P-ATPases, mais precisamente na família P do tipo 2C-ATPase (Palmgren & Nissen 2011; Dyla, M et al., 2019).

As enzimas da subfamília P2C-ATPases compartilham uma região conservada na subunidade α das suas estruturas (Palmgren & Nissen 2011; Dyla, M et al., 2019). Assim como outras proteínas da sua família, a NKA possui uma subunidade α mas também subunidades β e γ (figura 1), no entanto esta última subunidade não é presente em todas as NKA, ela é restrita aos organismos vertebrados, e está presente em tipos celulares e tecidos específicos (Blanco & Mercer, 1998; Clausen et al., 2017). Diferentes genes codificam as isoformas da NKA ($\alpha 1\beta 2$ ou $\alpha 2\beta 1$ por exemplo), em mamíferos são transcritas as isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$, β (1-4) e γ (1-5) (Blanco & Mercer, 1998; Clausen et al., 2017). A combinação das várias subunidades da enzima podem transmitir propriedades funcionais específicas, importantes na regulação e modificação da atividade enzimática (Therien & Blostein, 2000; Kaplan, J. H., 2002; Crambert & Geering 2003; Matchkov & Krivoi, 2016).

2.1.1. Características estruturais

A estrutura da NKA é constituída pelas por três subunidades heterogêneas, com tamanho, composição e função distintas. A subunidade α da NKA é a maior dentre as 3, tendo aproximadamente 1000 aminoácidos e um peso de aproximadamente 110 kDa. Esta proteína atravessa a membrana 10 vezes (TM1-TM10), e sua estrutura é dividida em domínios transmembranares e catalíticos (Blanco & Mercer, 1998; Mobasheri et al., 2000; Dyla, M et al., 2019) (Figura 2).

Os segmentos transmembranares (TM1 à TM10) formam o que é chamado de domínio transmembranar e suporte (DomT e S respectivamente) nesta estrutura estão as porções N-terminal (TM1) e COO-terminal (TM10), ambas são dispostas para o citoplasma. Além disso, o DomT é altamente flexível, um fator que auxilia no transporte de íons através da membrana. O DomS é uma unidade auxiliar do DomT, sua estrutura é rígida, pouco conservada e sua função é na coordenação dos íons durante o transporte (Palmgren & Nissen 2011; Dyla, M et al., 2019).

Na porção citosólica, entre os segmentos TM2 e TM3 do DomT, estende-se uma alça que forma o domínio atuador (DomA). Este último, está ligado ao DomT por alças flexíveis que asseguram a mudança conformacional da enzima durante a catálise, além disso o DomA atua como uma fosfatase globular (Palmgren & Nissen 2011; Dyla, M et al., 2019) (Figura 2.a e b).

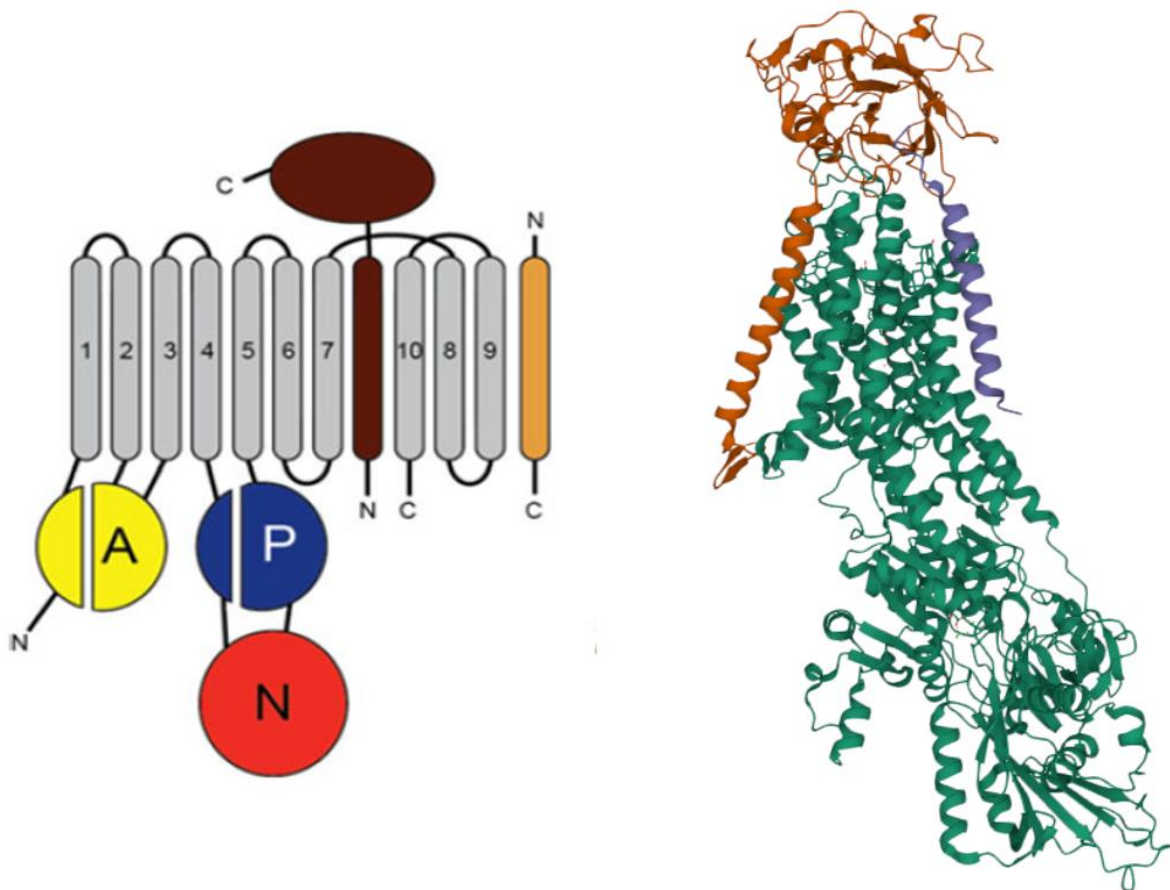


Figura 2. Representações da estrutura da Na⁺, K⁺-ATPase: a esquerda um esquema da estrutura da Na⁺, K⁺-ATPase, destaque para os domínios transmembranares 1-10 da subunidade α e os domínios citosólicos, como o domínio atuador (amarelo), domínio de ligação do nucleotídeo (vermelho) e domínio de fosforilação do ATP (azul). Há também a subunidade β , que aparece entre os segmentos 7 e 8 (Marrom) e possui uma grande porção extracelular. E a subunidade γ , com apenas um segmento transmembrana (laranja). A direita estrutura tridimensional da Na⁺, K⁺-ATPase, com destaque para as três subunidades: α em verde, β em laranja e γ em azul. Adaptado de Reinhard et al., 2012 e PDB 2021).

Outro domínio citosólico se forma de uma alça saindo entre TM4 e TM5, o domínio P (DomP) ou o domínio de fosforilação. Este nome se dá pois no DomP é onde o resíduo de aspartato (ASP) sofre fosforilação em uma região da enzima altamente conservada (Asp-Lys-Thr-Gly) (Palmgren & Nissen 2011; Dyla, M et al., 2019). Uma inserção modular no DomP forma o domínio de ligação do nucleotídeo (DomN). O DomN é pouco conservado, esta é uma característica que ajuda na distinção das famílias de P-ATPases. Cada domínio forma uma estrutura tridimensional e compacta e muitas vezes pode ser dobrado para expor sítios de ligação para outras proteínas servindo diferentes funções (de Horisberger, J.D. 2004; Palmgren & Nissen 2011; Cui & Xie, 2017; Shrivastava et al., 2018; Dyla, M et al., 2019).

Entre todas P-ATPases a subunidade α da NKA é a mais conservada, sendo que compartilha de uma homologia de até 70% de genes entre outros membros da mesma família (Palmgren & Nissen 2011). No entanto, diferentemente das outras ATPases, a NKA somente é funcional na formação do complexo heterodimérico das subunidades $\alpha\beta$ (Mobasheri et al., 2000; Kaplan, J. H., 2002). Estas subunidades são transcritas numa razão de 1:1 e no caso da transcrição ser desbalanceada, uma via de proteases é ativada para a degradação da unidade defeituosa. Isto porque, a subunidade β participa na maturação da α NKA, da inserção na bicamada e proteção contra proteases, tem função de chaperona auxiliando nas torções que ocorrem na subunidade α da NKA. Não obstante, a subunidade β da NKA auxilia na adesão célula-célula (Geering, 2008; Reinhard et al., 2012; Hilbers et al., 2016).

A subunidade β é uma proteína de membrana que está associada a subunidade α nos segmentos transmembranares TM7-TM8 (Figura 2). Esta subunidade é menor, possui 370 aminoácidos (Figura 2) e aproximadamente 55 KDa (Mobasheri et al., 2000; Kaplan, J. H., 2002). A porção N-terminal é exposta no citoplasma e diferentemente da subunidade α o terminal carboxílico é extracelular. A maior parte da proteína está no espaço exoplasmático, em torno de 300 aminoácidos que formam 3 sequências glicosiladas, (Mobasheri et al., 2000; Kaplan, J. H., 2002).

Durante a expressão da NKA, a associação $\alpha\beta$ é marcada por modificações pós traducionais em ambas subunidades, como exemplo a inserção da subunidade β

entre os segmentos transmembranares da subunidade α . Para tanto a subunidade α é modulada por fosforilação de uma serina/treonina kinase, e no caso das isoformas α 1 e 2, cinco resíduos são removidos por modificações pós traducionais (Reinhard et al., 2012). Além de proteger a NKA contra a ação de proteases, a subunidade β também auxilia na oclusão de íons potássio e nas alterações entre os estágios conformacionais na enzima durante o mecanismo catalítico (Geering, 2008; Hilbers et al., 2016).

A subunidade γ da NKA é uma proteína da família FXYD, ela contém em torno de 60 resíduos de aminoácidos e ~7kDa. Esta subunidade é um único segmento que atravessa a bicamada, sua secção N-terminal é exposta no citoplasma, enquanto que a C-terminal na parte externa da membrana (Mobasher et al., 2000; Kaplan, J. H., 2002; Crambert & Geering 2003; Geering, 2008).

Em diferentes organismos, proteínas da família FXYD estão associadas à sinalização e regulação de transporte de íons (Crambert & Geering 2003; Geering, 2008). No caso da NKA, esta subunidade somente é encontrada em vertebrados, 5 isoformas distintas da subunidade γ são associadas a NKA em tecidos e células específicos. Esta subunidade exerce influência sob a afinidade da bomba de sódio e potássio ao substrato e aos íons transportados (Kaplan, 2002; Crambert & Geering, 2003; Geering, 2008; Clausen et al., 2017).

As quatro isoformas da subunidade α têm afinidades diferentes aos íons, ao substrato e o mesmo quanto à resistência aos inibidores e a outros agentes químicos (Murata, 2020). Devido essa diferença em afinidade, organismos que expressam diferentes isoformas da NKA, aproveitam gradiente de Na^+ e K^+ para suas funções específicas, por exemplo, a isoforma α 4 só expressa nos testículos e é essencial para a fertilidade em esperma (Câmara et al., 2017; Clausen et al., 2017), enquanto no coração de camundongos apenas as subunidades α 1 e 2 da enzima são transcritas (Blanco & Mercer, 1998). No encéfalo são encontradas as isoformas α 1,2,3 em tipos celulares diferentes. E neste caso, as subunidades α 1 e 3 são diferentes funcionalmente, sendo que esta última tem menor afinidade pelos íons Na e K, é mais sensível à OUA e acredita-se que a subunidade α 3 permita a rápida restauração dos gradientes de íons após intenso disparo ne

2.1.2. As propriedades cinéticas da Na^+ , K^+ -ATPase

As células usam de mecanismos de transporte transmembrana para diversas funções: a captação de substrato, secreção de moléculas e para manter a homeostase fisiológica (Lorsch, 2014). A membrana plasmática separa polos de cargas positivas e polos de cargas negativas, que são criados por diferentes concentrações de Na^+ , K^+ , Cl^- e outros íons (Clarke & Fan, 2011).

A composição química da estrutura de proteínas transmembranares confere a essas enzimas propriedades que exercem influência sobre a afinidade à íons e moléculas específicas presentes no meio (Green & Millar 1995). Para a NKA isso também é necessário, na α NKA estão presentes sítios de ligação para Na^+ , K^+ e Mg^{2+} , por exemplo (Dyla, M et al., 2019).

Ao medir propriedades cinéticas de uma enzima, é possível descrever suas características bioquímicas como sensibilidade a ouabaína, afinidade ao substrato e aos componentes associados (Lorsch, 2014). Na cinética de estado estacionário, as taxas iniciais de reações são medidas em um regime em que cada molécula de enzima se liga ao substrato e catalisa sua conversão em produto várias vezes (Lorsch, 2014). Este método é frequentemente usado para a caracterização de uma enzima, de moléculas com efeito inibitório e mutações ou modificações que afetam a função enzimática.

A NKA foi caracterizada em amostras de brânquias de camarão pelágico *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2014), caranguejo de mangue semi-terrestre *Cardisoma guanhumi* (Farias et al., 2017), brânquias e rins de peixe teleostídeo (Zhu et al., 2018). Em mamíferos ela foi caracterizada em rim de ratos jovens e adultos (Marín et al., 1985), posteriormente em de ratos diabéticos (Kumthekar et al., 1992) As isoformas da NKA foram caracterizadas separadamente, como a isoforma α 4 em amostra de esperma bovino (Hichey et al., 2012), as isoformas α 1, 2 e 3 em cultura de células HeLa (Zahler et al., 1992)

A constante de Michaelis–Menten (K_m) é a medida de afinidade para uma reação entre uma enzima e um substrato, a partir do K_m podemos entender e comparar as reações enzimáticas. Em 1997, um grupo de pesquisa norte americano caracterizou a atividade da NKA em cultura de células humanas, as isoformas α 1 apresentaram K_m (para Na^+) de 12 mM, para as α 2NKA foi 22 mM e 33 mM para as isoformas α 3 (Zahler et al., 1992). Em outro estudo conduzido com amostras de

córnea, a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e a constante de dissociação aparente ($K_{0,5}$) da NKA foram estimadas em relação à ativação dos íons sódio e potássio. O $V_{\text{máx}}$ para o Na^+ foi de 5,58-5,60 $\mu\text{mol Pi} / \text{mg de proteína} / 30 \text{ min}$, para e os valores $K_{0,5}$ correspondentes foram 62-57 mM. Para K^+ o $V_{\text{máx}}$ foi de 4,28-4,00 $\mu\text{mol de Pi} / \text{mg de proteína} / 30 \text{ min}$ e o $K_{0,5}$ 3,3-3,1 mM (Whikehart et al., 1987).

A caracterização cinética da NKA em encéfalo já foi realizada em membranas do encéfalo total (Naidu & Katyare, 1992), em diferentes lobos (Poole et al., 1984; Kumosani, 2002) e em algumas estruturas específicas como hipocampo e estriado (Pekovic et al., 1997). Em membranas do encéfalo total, a NKA apresenta o valor de 0,74 mM de K_m e $V_{\text{máx}}$ 255 mM Pi/ hr/ mg de proteína (Naidu & Katyare, 1992). No cerebelo, o K_m da NKA para ATP é de 3,19 mM e $V_{\text{máx}}$ 95 (Pi/ mg/ min), enquanto nos hemisférios cerebrais que compreendem o córtex cerebral ao K_m da NKA foi de 0,5 e 1,45 mM e $V_{\text{máx}}$ foi de 616 e 848 (Pi/ mg/ min) (Kumosani, 2002). A caracterização feita em hipocampo revelou K_m para ATP de 1.21 mM e 0,76 mM no corpo estriado.

O estudo das propriedades catalíticas da NKA fornece bases biológicas para a compreensão da função cinética desta enzima no encéfalo. No entanto os trabalhos de caracterização da NKA no encéfalo não abrangem a caracterização de diferentes isoformas (α 1, 2 e 3). Há a caracterização em diferentes lobos, mas carece de uma análise por regiões específicas que forneçam informações precisas sobre cada isoforma em diferentes secções do encéfalo.

2.2. Mecanismo catalítico da Na^+ , K^+ -ATPase

O mecanismo catalítico da bomba de sódio e potássio é conhecido por compreender alterações conformacionais enzimáticas entre dois estados: E1 e E2 (figura 3). No estado conformacional E1, a NKA expõe sítios de afinidade para a ligação de 3 íons Na^+ nos DomT, ligação de ATP no DomN e do íon Mg^{2+} no DomP (Palmgren & Nissen 2011; Dyla, M et al., 2019).

Essa mesma conformação (E2) expõe sítios com afinidade para íons K^+ na porção extracelular (Figura 3). A fosforilação do DomP também causa uma mudança conformacional nos domínios citosólicos da enzima, a estrutura sofre um alongamento no DomN, esta reação resulta na rotação do DomA de volta ao para o topo do DomP, os 2 íons K^+ que estavam ocluídos são liberados. As rotações no DomA ficam em proximidade estratégica com ASP fosforilado e é importante para a reversão da conformação da enzima. Essas rotações impedem que sítios de ligação para íons no DomT venham atrapalhar o ciclo catalítico e, como explicado acima, abrem caminho para a saída de íons do outro lado da membrana (Palmgren & Nissen 2011; Dyla, M et al., 2019).

Na conformação E2 é quando a bomba pode ser inibida por OUA, um esteroide cardiotônico que interage com a fração extracelular da enzima e se liga aos DomT e S da subunidade α bloqueando o ciclo catalítico da NKA (Ogawa et al., 2009). Além da OUA, que é o inibidor específico da NKA, a presença de alguns metais (como alumínio) (Silva, 2003) e agentes químicos (como vanadato) (Fraqueza et al., 2019) ou outros esteroides cardiotônicos (como digoxina) (Askari, 2019) também tem um efeito inibitório na bomba de sódio e potássio, indicando outros fatores que podem influenciar na sua atividade catalítica.

2.3. Mecanismos de regulação

Cada isoforma da subunidade α da NKA apresenta em sua estrutura pequenas diferenças nos domínios A, DomN, DomT e etc. Essas diferenças estruturais conferem a subunidade catalítica da bomba capacidade de interação com outras proteínas e afinidade distinta aos íons presentes na catálise (Clausen, et al., 2017; Xie, 2017). Um bom exemplo deste fato é a relação da NKA com a ouabaína (OUA), pois dentre as isoformas α 1, 2 e 3, apenas as duas últimas são sensíveis a concentrações baixas (0,01 mM) OUA (Parreira, et al., 2021), esta molécula é a inibidora específica da NKA, capaz de inibir a enzima no estágio E2 do ciclo catalítico se ligando a subunidade α da NKA (Figura 4) (Ogawa et al, 2009).

A OUA é um esteroide cardiotônico (Figura 4), esta molécula é sintetizada principalmente por plantas trepadeiras da espécie *Strophantus gratus*. Um derivado esteroidal da OUA é sintetizada por organismos animais, como pelo corpo humano, mas em menor concentração (Cavalcante-Silva et al., 2017). Em concentrações saturantes toda atividade da NKA é inibida, quando essa inibição não é revertida o gradiente de Na^+ e K^+ é perdido. Em seguida, outros transportadores (como o trocador de Na^+ e Ca^{2+}) também são afetados e uma série de efeitos deletérios como a condensação nuclear e degradação do DNA levam à morte celular (Donck et al., 1993).

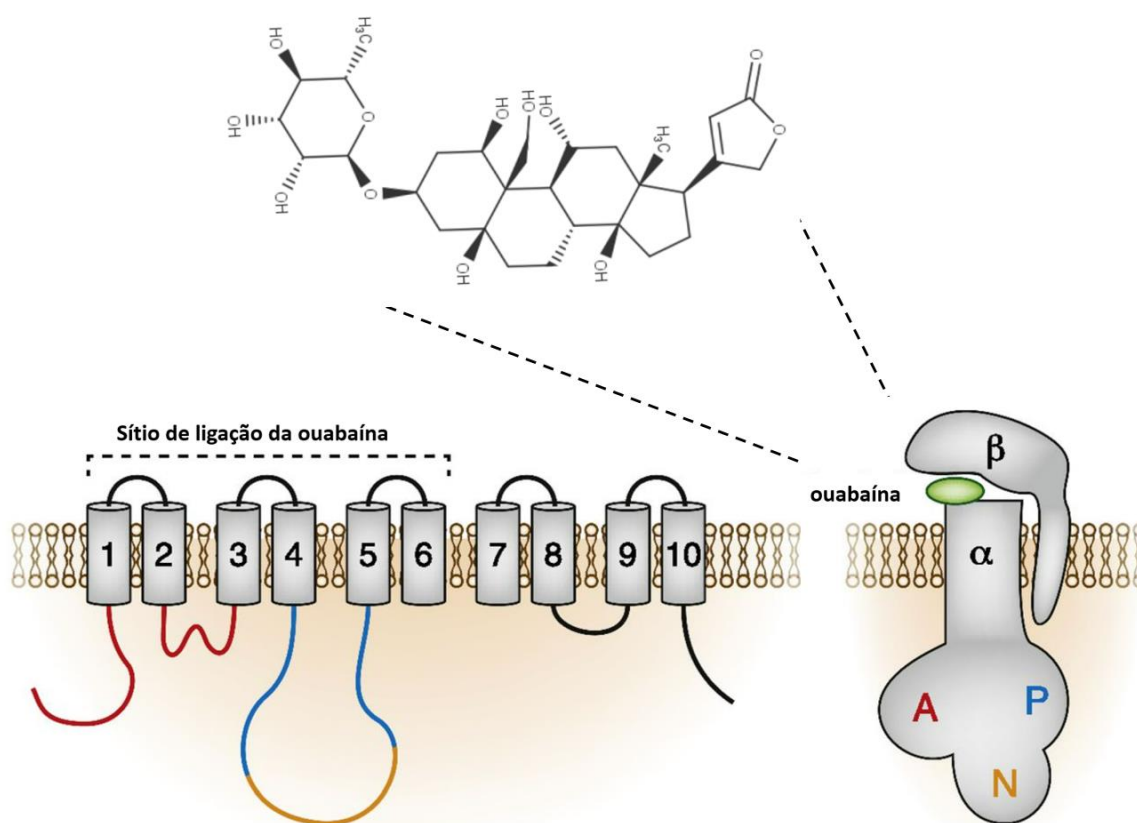


Figura 4. Interações da Ouabaína com a Na^+ , K^+ -ATPase. A imagem a esquerda esquematiza os domínios transmembranares onde ocorre a ligação com a ouabaína. À direita, encontra-se um esquema da estrutura da Na^+ , K^+ -ATPase no momento da interação com ouabaína no estágio conformacional E2 na presença da subunidade β . Adaptado de Aperia, A (2012).

A OUA ministrada em baixas concentrações exerce uma influência na atividade da NKA em organismos vivos. No DomN há sítios que podem interagir com outras proteínas moduladoras como Scr quinases, Fosfoinositídeo 3-quinase,

Phospholipase C γ . A região do DomN, chamada de *NaKtide*, pode inibir a atividade da Src cinase, e é capaz de interagir com outros moduladores para induzir apoptose, inibir crescimento celular e diminuir a formação de tumores em célula com baixas concentrações de α 1NKA (Reinhard et al., 2013).

A OUA se liga a subunidade α e curiosamente as isoformas α 1, 2 e 3 são 87% idênticas umas às outras, enquanto a isoforma α 4 78%. As diferenças estão principalmente no DomN (sítio de ligação de ATP) e nas regiões de ligação para íons e OUA (DomT e S) (Clausen et al., 2017). Isso se dá pois a função de transporte está fortemente relacionada às partes internas, onde os íons são transportados em resposta à hidrólise de ATP, enquanto diferenças na superfície permitem que cada isoforma tenha sua própria interação proteína-proteína (Reinhard et al., 2013; Cui & Xie, 2017).

Na membrana plasmática estão dispostas proteínas e canais que proporcionam a entrada e saída de componentes importantes para a célula (Clarke & Fan, 2011). Em regiões com muitas proteínas com função de sinalização e transporte a NKA interage com outras proteínas de membrana ajudando a regular a entrada de Ca^{2+} e K^+ , água e glicose (Mobasheri et al., 2000; Kaplan, J. H., 2002). Além disso, a NKA pode interagir com o receptor de ácido propanoico (Reinhard et al., 2013) para sua internalização e degradação se necessário suprimir a atividade da bomba.

Outro mecanismo de modulação da atividade da NKA parte da ativação desta enzima. A bomba de sódio e potássio é ativada na presença de Na^+ e ATP e Mg^{2+} , de fato os íons e o substrato são essenciais para a atividade da bomba, mas dependendo da concentração de Na^+ , K^+ e ATP disponíveis a atividade da bomba pode ser aumentada ou suprimida (Xu, 2005). Por exemplo, em um contexto de alta concentração de K^+ intracelular pode ocorrer competição pelos sítios de Na^+ na fase E1 do ciclo catalítico (Clausen et al., 2017).

A NKA é ativada também por neurotransmissores, hormônios e uma série de substâncias que fosforilam resíduos de Serina e Tirosina na subunidade α (Xu, 2005). A interação da NKA com aducinas e policistinas aumenta a atividade da bomba, enquanto proteínas transmembranares controladoras de tumor podem inibir parcialmente a NKA (Xu, 2005). Os estudos que relacionam a NKA às funções de

sinalização são diversos e isso ajuda a compreender a participação desta enzima nos processos fisiológicos e intracelulares.

2.4 A Na^+ , K^+ -ATPase no encéfalo

No encéfalo a NKA é responsável por grande parte do processo de transmissão de sinal entre as células neurais. Cerca de 70% da energia gerada é usada pela NKA para a manutenção do potencial elétrico necessário para a transmissão de sinais entre neurônios (Figura 5.a) (Murata et al., 2020).

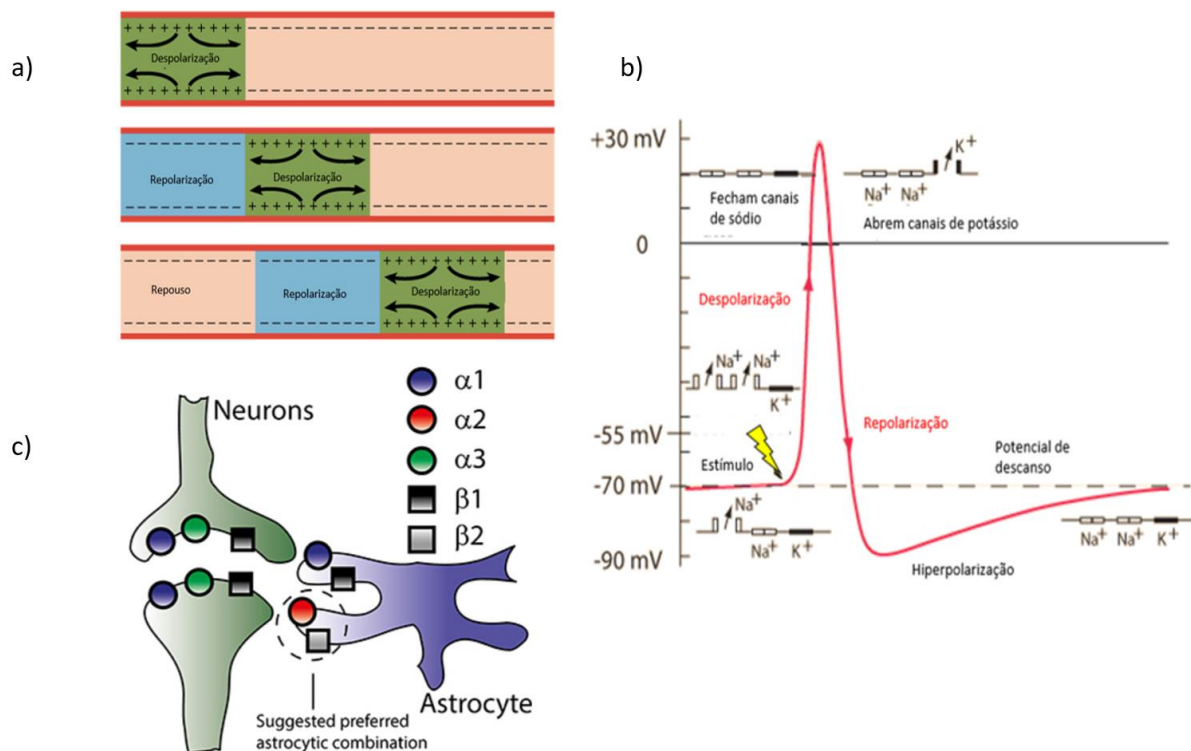


Figura 5. Mecanismo de transmissão sinais através de potenciais de ação no neurônio: a) Esquema do efeito na troca de cargas dentro e fora da célula resultantes do potencial de ação nos neurônios, setas indicam entrada de Na^+ . b) Gráfico ilustrativo das alterações de voltagem durante um potencial de ação. Repare que um estímulo leva a abertura de canais de sódio. O influxo de Na^+ continua até que a carga interna seja positiva (~ 40 mV), causando uma despolarização. Os canais de Na^+ então se fecham e transportadores de K^+ são abertos para liberar K^+ até que a o

espaço intracelular fique hiperpolarizado (~ -90 mV). c) Distribuição das isoformas da NKA em neurônio e astrócitos (Adaptado de Reece, et al., 2011; Larsen, et al., 2016).

O equilíbrio iônico entre os metais dos meios intracelular e extracelular é essencial na manutenção das funções neuronais como captação e recepção de neurotransmissores (Pivovarov et al., 2018), formação da mielina, garantir a atividade de outras enzimas, potenciais de repouso e de ação (McDonough & Farley, 1993). Isso se reflete em dar manutenção às funções associadas a este órgão, que são: capacidade cognitiva, memória de curto e longo prazo, visão, função motora e etc (Shrivastava et al., 2018). Em outras palavras, encéfalo tem função na codificação, formação e processamento e resposta rápida a estímulos ambientais. Para codificar tantas funções, diferentes sinais são gerados e transmitidos através de neurotransmissores e neuromoduladores (Raichle, 2010).

O processo responsável pela transmissão das informações entre as células neuronais, é chamado facilitação sináptica (Jackman & Regehr, 2017), que consiste na ativação, ou a ou facilitação, do início de um potencial de ação em outra célula (pós-sináptica) durante um disparo sináptico repetitivo. No caso de um estímulo que gere um baixo potencial de ação, esse impulso transmite um sinal que muitas vezes não é respondido pela célula pós-sináptica, chamado de potencial de curto prazo (Jackman & Regehr, 2017). No entanto, alguns impulsos podem fazer as células pré-sinápticas excitarem fortemente as células pós-sinápticas, garantindo a transmissão de um sinal por horas, até que seja ativado um mecanismo para suprimir a transmissão (Jackman & Regehr, 2017).

Nas membranas das células que compõe o SNC de mamíferos, três isoformas da α NKA estão dispostas através da bicamada (Blanco & Mercer, 1998; Clausen et al., 2017; Murata et al., 2020). Essas enzimas efetuam repetidamente a quebra de ATP durante uma despolarização, restaurando a polaridade da membrana, o potencial de ação e regulando a composição eletrolítica do meio (de Lores Arnaiz & Ordieres, 2014, Clarke & Fan, 2011).

No potencial de repouso da célula predominam íons com cargas negativas no interior enquanto no exterior os de carga positiva. O início de um potencial de ação se dá pela mudança das concentrações iônicas dentro e fora da célula (Figura 5.b)(Hodgkin & Huxley 1952). Isto é, Uma ligeira entrada de Na^+ no meio intracelular dá

início à uma sinalização com *feedback positivo* para a abertura dos canais iônicos de Na^+ , e mais sódio entra na célula. O aumento da concentração de Na^+ intracelular causa despolarização interna do neurônio, que de -70 mV passa a ter ~40 mV por conta do influxo da carga positiva (Figura 5.b).

Em seguida, os canais de K^+ (dependentes de voltagem) se abrem lentamente liberando o íon para fora da célula. Durante este processo a bomba de sódio e potássio é ativada constantemente para restaurar o potencial de repouso da membrana, ela responde ao acúmulo de Na^+ e de acordo com o mecanismo anteriormente descrito ela restabelece a diferença entre as cargas dentro e fora da célula, o que é essencial para o contínuo potencial de ação nos neurônios (Bliss & Cooke, 2011; Nelson & Cox 2014; Guyton & Hall, 2017).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, a NKA é transcrita em 10 vezes a quantidade que em indivíduos adultos. No entanto, a expressão da NKA reduz com o avanço da idade, o que é causado por eventos de adaptação plástica a condições de hipóxia intermitentes. No hipocampo e cerebelo de ratos jovens há uma mudança na expressão da subunidade α , aumento da isoforma $\alpha 1$ e diminuição da isoforma $\alpha 3$ (de Lores Arnaiz & Ordieres, 2014).

A ontogenia no cerebelo é marcada por um aumento progressivo no potencial de descanso das membranas, e na sensibilidade à OUA. Essas mudanças são mais recorrentes nas isoformas $\alpha 3$ e poucas mudanças na $\alpha 1$ e 2 (de Lores Arnaiz & Ordieres, 2014). Na velhice, há uma diminuição da excitabilidade neural, aparecem dificuldades nas funções cognitivas e em consonância a NKA tem a atividade reduzida. O declínio na expressão e atividade da NKA no encéfalo é consequência do acúmulo de danos ao tecido cerebral mais velho, alvo de produtos de peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio (de Lores Arnaiz & Ordieres, 2014. Clausen et al., 2017).

Estudos recentes evidenciam a relação da atividade da NKA na função motora e em propriedades do aprendizado, memória e semântica. Por exemplo, há uma diminuição na excitabilidade, na expressão e atividade sinalizadora gerada pela $\alpha 3$ NKA no córtex cerebral durante o desenvolvimento de Alzheimer (Zhang et al., 2012; Clausen et al., 2017; Shrivastava et al., 2018). Em casos após um edema cerebral, no contexto intracelular, há falha no transporte ativo de Na^+ mediado pela NKA e

aumento da permeabilidade de Na^+ via canais dependentes de voltagem (Clausen et al., 2017).

No encéfalo a excitabilidade neural regula o humor, um exemplo disso é a desordem bipolar, que é caracterizada por mudanças no estado de humor individual, e na excitabilidade neural (Lichtstein et al., 2018). Neste caso, o tratamento com hormônios esteroidais podem suprimir a atividade da NKA no hipotálamo, diminuindo a excitabilidade nesta região e levando a um comportamento de humor estável (Clausen et al., 2017). Isso ocorre pois há uma conversão destes hormônios em componentes que, como a OUA, podem interferir na atividade da NKA (Clausen et al., 2017). Outro exemplo de como a função da NKA exercer efeito sobre nossas capacidades neurais é a depressão, ou episódios de depressão, estudos relatam que há uma redução de na expressão e funcionamento da enzima NKA em humanos e outros animais (Shrivastava et al.,2018).

No hipocampo a NKA tem efeito sobre a aprendizagem e a memória (Lisman et al., 2017; Moseley et al.,2007). Deprinil, um fármaco usado para melhorar a aprendizagem e memória em idosos, causa aumento na excitabilidade neural, taxa de disparo elétrico e na atividade da NKA na região do hipocampo (Clausen et al., 2017). Em estudos usando modelos de depressão animal, descrevem uma redução da atividade hipocampal da NKA. O tratamento com Fluoxetina reverteu os sintomas e causou um aumento na atividade da bomba (Clausen et al., 2017). Em outro modelo de depressão, uma variável $\alpha 3$ NKA mutante e uma selvagem foram testadas quanto ao efeito do estresse na atividade da enzima. A variável mutante foi sensível ao estresse, enquanto na selvagem não houve alteração na atividade da NKA (Clausen et al., 2017). A isoforma $\alpha 3$ é comumente estudada nas disfunções neurológicas, devido sua localização nos neurônios, função de bomba eletrogênica e transdutora de sinal (Di Fonzo et al., 2007; Moseley et al.,2007; Zhang et al., 2012; Reinhard et al., 2013; Shrivastava et al.,2018).

No tecido neural as isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são predominantes em células da glia, enquanto nos neurônios são encontradas as isoformas $\alpha 1$ e 3, esta última principalmente nas projeções neurais e dendritos (Figura 5c) (Clausen et al., 2017; Shrivastava et al.,2018; Reinhard et al., 2013). A isoforma $\alpha 2$ é localizada próxima aos trocadores de Na^+ e Ca^{2+} , o que ajuda a regular os níveis de Ca^{2+} na célula (Reinhard et al., 2013). Em astrócitos a afinidade da isoforma $\alpha 2$ em astrócitos ajuda

na depuração de K^+ após um intenso disparo neural (Larsen & Mc Aulay, 2016). As NKA em todas suas isoformas oferecem um maquinário indispensável na função do encéfalo (Golden et al., 2001; Murata, et al 2020), e por isso é um marcador para diferentes contextos que afetam o metabolismo, transporte de íons e moléculas, a sinalização, a excitabilidade celular (Reinhard et al., 2013). E é alvo para terapia para cardiopatias, doenças renais e neuropatias (Abrams & Osborn, 2008; Funck et al., 2015; Clausen et al., 2017; (Lichtstein et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos geral

Caracterizar a atividade das enzimas $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ Na^+ , K^+ -ATPase em homogenatos de córtex cerebral e hipocampo de ratos Wistar.

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar a atividade das enzimas $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ Na^+ , K^+ -ATPase em função de crescente concentração de enzimas em HP e CX.

- Determinar as constantes cinéticas, como a constante de Michaelis e Menten (K_m) ou constante de dissociação aparente ($K_{0,5}$), coeficiente de Hill (nH) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), para ambas isoformas em CX, HP frente a crescentes concentrações de ATP, NaCl, KCl e MgCl_2 e o efeito de crescentes concentrações de NH_4Cl .

- Analisar comparativamente os resultados obtidos nas diferentes regiões do encéfalo quanto ao perfil de atividade enzimática nas isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ Na^+ , K^+ -ATPase.

REFERÊNCIAS

- Abrams, J. M., & Osborn, J. W. (2008). A role for benzamil-sensitive proteins of the central nervous system in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35(5-6), 687–694. doi:10.1111/j.1440-1681.2008.04929.x
- Anderson, S. A., & Mukkada, A. J. (1994). Biochemical and immunochemical characterization of a P-type ATPase from *Leishmania donovani* promastigote plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1195(1), 71–80. doi:10.1016/0005-2736(94)90011-6
- Apell, H.-J., Hitzler, T., & Schreiber, G. (2017). Modulation of the Na,K-ATPase by Magnesium Ions. *Biochemistry*, 56(7), 1005–1016. doi:10.1021/acs.biochem.6b01243
- Askari, A. (2019). The sodium pump and digitalis drugs: Dogmas and fallacies. *Pharmacology Research & Perspectives*, 7(4). doi:10.1002/prp2.505
- Belisario, D. C., Rocafull, M. A., & Del Castillo, J. R. (2010). Purification and characterization of the ouabain-sensitive H⁺/K⁺-ATPase from guinea-pig distal colon. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 496(1), 21–32. DOI:10.1016/j.abb.2010.01.014
- Blanco, G., & Mercer, R. W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 275(5), F633–F650. DOI:10.1152/ajprenal.1998.275.5.f
- Bliss, T. V. P., & Cooke, S. F. (2011). Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics*, 66, 3–17. DOI: 10.1590/s1807-59322011001300002
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Burth, P & Goncalvez, F. & Costa, E & Faria, Mauro. (1997). Purification and characterization of a Na/K-ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira*. *Infection and immunity*. 65. 1557-60. 10.1128/IAI.65.4.1557-1560.1997.

Câmara, D. R., Kastelic, J. P., & Thundathil, J. C. (2017). Role of the Na⁺/K⁺-ATPase ion pump in male reproduction and embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(8), 1457. DOI: 10.1071/rd16091

Cavalcante-Silva, L. H. A., Lima, É. de A., Carvalho, D. C. M., Sales-Neto, J. M. de, Alves, A. K. de A., Galvão, J. G. F. M., Rodrigues-Mascarenhas, S. (2017). Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain. *Frontiers in Physiology*, 8. DOI:10.3389/fphys.2017.00895

Clarke, R. J., & Fan, X. (2011). Pumping ions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 38(11), 726–733. DOI:10.1111/j.1440-1681.2011.05590.x

Clausen, M. V., Hilbers, F., & Poulsen, H. (2017). The Structure and Function of the Na, K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Frontiers in Physiology*, 8. DOI:10.3389/fphys.2017.00371

Crambert, G., & Geering, K. (2003). FXYD Proteins: New Tissue-Specific Regulators of the Ubiquitous Na, K-ATPase. *Science Signaling*, 2003(166), re1–re1. DOI:10.1126/stke.2003.166.re1

Cui X and Z. Xie (2017). Protein Interaction and Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction. *Molecules*, 22(6), 990. DOI:10.3390/molecules22060990

De Lima Santos, H., & Ciancaglini, P. (2003). Kinetic characterization of Na,K-ATPase from rabbit outer renal medulla: properties of the (αβ)₂ dimer. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135(3), 539–549. DOI:10.1016/s1096-4959(03)00139-8

De Lores Arnaiz, G. R., & Ordieres, M. G. (2014). Brain Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase Activity in Aging and Disease. *International journal of biomedical science: IJBS*, 10(2), 85–102.

- Di Fonzo, A., Chien, H. F., Socal, M., Giraudo, S., Tassorelli, C., Iliceto, G. (2007). ATP13A2 missense mutations in juvenile Parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology*, 68(19), 1557–1562. DOI:10.1212/01.wnl.0000260963.08711.08
- Donck, L. V., Borgers, M., & Verdonck, F. (1993). Inhibition of sodium and calcium overload pathology in the myocardium: a new cytoprotective principle. *Cardiovascular Research*, 27(3), 349–357. DOI:10.1093/cvr/27.3.349
- Dyla, M., Kjærgaard, M., Poulsen, H., & Nissen, P. (2019). Structure and Mechanism of P-Type ATPase Ion Pumps. *Annual Review of Biochemistry*, 89(1). DOI: 10.1146/annurev-biochem-010611-112801
- Fan, B., & Rosen, B. P. (2002). Biochemical Characterization of CopA, the *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 46987–46992. DOI:10.1074/jbc.m208490200
- Farias D. L Farias, M. N. Lucena, D. P. Garçon, F. L. Mantelatto, J. C. McNamara & F. A. Leone (2017). A Kinetic Characterization of the Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the Semi-terrestrial Mangrove Crab *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825 (Decapoda, Brachyura). *The Journal of Membrane Biology*, 250(5), 517–534. DOI: 10.1007/s00232-017-9978-6
- Fraqueza, G., Fuentes, J., Krivosudský, L., Dutta, S., Mal, S. S., Roller, A., Aureliano, M. (2019). Inhibition of Na⁺/K⁺- and Ca²⁺-ATPase activities by phosphotetradecavanadate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 197, 110700. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2019.110700
- Funck, V. R., Ribeiro, L. R., Pereira, L. M., de Oliveira, C. V., Grigoletto, J., Della-Pace, I. D., Oliveira, M. S. (2015). Contrasting effects of Na⁺, K⁺-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. *Neuroscience*, 298, 171–179. DOI:10.1016/j.neuroscience.2015.04.031
- Geering, K. (1997). Na, K-ATPase. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 6(5), 434–439. DOI: 10.1097/00041552-199709000-00005
- Geering, K. (2008). Functional roles of Na, K-ATPase subunits. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 17(5), 526–532. DOI:10.1097/mnh.0b013e3283036cbf

Geisler, M., Koenen, W., Richter, J., & Schumann, J. (1998). Expression and characterization of a *Synechocystis* PCC 6803 P-type ATPase in *E. coli* plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1368(2), 267–275. DOI:10.1016/s0005-2736(97)00193-4

Golden, W. C., Brambrink, A. M., Traystman, R. J., & Martin, L. J. (2001). Failure to sustain recovery of Na,K-ATPase function is a possible mechanism for striatal neurodegeneration in hypoxic–ischemic newborn piglets. *Molecular Brain Research*, 88(1-2), 94–102. doi:10.1016/s0169-328x(01)00032-8

Green, W. N., & Millar, N. S. (1995). Ion-channel assembly. *Trends in Neurosciences*, 18(6), 280–287. doi:10.1016/0166-2236(95)80009-q

Grindstaff KK, Blanco G, Mercer RW (1995). Characterization of Na, K-ATPase isoform expression and activity in MDCK and Caco-2 epithelial cells. *Epithelial Cell Biol.*4(1):17-24. PMID: 8563791.

Guglielmi, V., Oosterhof, A., Voermans, N. C., Cardani, R., Molenaar, J. P., Van Kuppevelt, V., Vatter, G. (2016). Characterization of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase pumps in muscle of patients with myotonic dystrophy and with hypothyroid myopathy. *Neuromuscular Disorders*, 26(6), 378–385. DOI:10.1016/j.nmd.2016.04.003

Guyton A. C. & Hall J. E. (2017). *Guyton & Hall tratado de fisiologia médica*. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

Hansson E, Rönnbäck L, Persson LI, Lowenthal A, Noppe M, Alling C, Karlsson B (1984). Cellular composition of primary cultures from cerebral cortex, striatum, hippocampus, brainstem and cerebellum. *Brain Res.* (1):9-18. DOI: 10.1016/0006-8993(84)91335-0. PMID: 6733469.

Harel, M., Canner, D., Berchansky, A. (2016). Sodium-Potassium ATPase. *Protopédia.org*. Disponível em: <https://proteopedia.org/wiki/index.php/Sodium-Potassium_ATPase>. Acesso em: 06/02/2021.

Hilbers, F., Kopec, W., Isaksen, T. J., Holm, T. H., Lykke-Hartmann, K., Nissen, P., Poulsen, H. (2016). Tuning of the Na, K-ATPase by the beta subunit. *Scientific Reports*, 6(1). DOI: 10.1038/srep20442

Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* 117, 500–544.

Holm, T. H., Isaksen, T. J., Gglerup, S., Heuck, A., Bøttger, P., Füchtbauer, E. (2016). Cognitive deficits caused by a disease-mutation in the $\alpha 3$ Na⁺/K⁺-ATPase isoform. *Scientific Reports*, 6(1). DOI: 10.1038/srep31972

Horisberger, J.-D. (2004). Recent Insights into the Structure and Mechanism of the Sodium Pump. *Physiology*, 19(6), 377–387. doi:10.1152/physiol.00013.2004 10.1152/physiol.00013.2004

Horvat A, Momić T, Petrović S, Nikezić G, Demajo M (2006). Selective inhibition of brain Na,K-ATPase by drugs. *Physiol Res*;55(3):325-38. Epub 2005 Aug 5. PMID:16083303.

Jackman, S. L., & Regehr, W. G. (2017). The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron*, 94(3), 447–464. DOI:10.1016/j.neuron.2017.02.047

Jaques J. A. S. , J. F. P. Rezer, F. B. Carvalho, M. M. Rosa, J. M. Gutierrez, J. F. Gonçalves, R. Schmatz, A.V. Bairros, C. M. A. Mazzantti, M. A. Rubin, M. R. C. Schetinger, D. B. R. Leal (2012). Curcumin protects against cigarette smoke-induced cognitive impairment and increased acetylcholinesterase activity in rats. *Physiology & Behavior*, v. 106, p. 664-669

Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na, K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 511–535. DOI:10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218

Krishnan G. P., G. Filatov, A. Shilnikov & M. Bazhenov (2015). Electrogenic properties of the Na⁺/K⁺ ATPase control transitions between normal and pathological brain states. *Journal of Neurophysiology*, 113(9), 3356–3374. DOI:10.1152/jn.00460.2014

Kumosani T. A., 2002. Kinetics Parameters of Na⁺, K⁺-ATPase from Different Mice Brain Lobes. *Journal of Medical Sciences*, 2: 29-31.

- Larsen, B. R., Stoica, A., & MacAulay, N. (2016). Managing Brain Extracellular K⁺ during Neuronal Activity: The Physiological Role of the Na⁺/K⁺-ATPase Subunit Isoforms. *Frontiers in Physiology*, 7. DOI:10.3389/fphys.2016.00141
- Leone, F. A., Lucena, M. N., Rezende, L. A., Garçon, D. P., Pinto, M. R., Mantelatto, F. L., & McNamara, J. C. (2014). A Kinetic Characterization of (Na⁺, K⁺)-ATPase Activity in the Gills of the Pelagic Seabob Shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda, Penaeidae). *The Journal of Membrane Biology*, 248(2), 257–272. DOI:10.1007/s00232-014-9765-6
- Lichtstein, D., Ilani, A., Rosen, H., Horesh, N., Singh, S., Buzaglo, N., & Hodes, A. (2018). Na⁺, K⁺-ATPase Signaling and Bipolar Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2314. DOI: 10.3390/ijms19082314
- Lisman, J., Buzsáki, G., Eichenbaum, H., Nadel, L., Rangananth, C., & Redish, A. D. (2017). Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nature Neuroscience*, 20(11), 1434–1447. DOI:10.1038/nn.4661
- Lorsch, J. R. (2014). Practical Steady-State Enzyme Kinetics. *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part A*, 3–15. DOI:10.1016/b978-0-12-420070-8.00001-5.
- Matchkov, V. V., & Krivoi, I. I. (2016). Specialized Functional Diversity and Interactions of the Na, K-ATPase. *Frontiers in Physiology*, 7. DOI:10.3389/fphys.2016.00179
- McDonough, A. A., & Farley, R. A. (1993). Regulation of Na, K-ATPase activity. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2(5), 725–734. DOI: 10.1097/00041552-199309000-00006
- Mobasheri, A. J. Avila, I. Cózar-Castellano, M. D. Brownleader, M. Trevan, M. J. O. Francis, F. J. Francis, P. Martín-Vasallo (2000). Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Bioscience Reports*, 20(2), 51–91. DOI: 10.1023/a: 1005580332144
- Mohammadi, S., Gompert, Z., Gonzalez, J., Takeuchi, H., Mori, A., & Savitzky, A. H. (2016). Toxin-resistant isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in snakes do not closely track dietary specialization on toads. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1842), 20162111. DOI:10.1098/rspb.2016.2111

Moseley, A. E., Williams, M. T., Schaefer, T. L., Bohanan, C. S., Neumann, J. C., Behbehani, M. M., Lingrel, J. B. (2007). Deficiency in Na, K-ATPase Isoform Genes Alters Spatial Learning, Motor Activity, and Anxiety in Mice. *Journal of Neuroscience*, 27(3), 616–626. DOI:10.1523/jneurosci.4464-06.2007

Murata, K., Kinoshita, T., Ishikawa, T., Kuroda, K., Hoshi, M., & Fukazawa, Y. (2020). Region- and neuronal-subtype-specific expression of Na, K-ATPase alpha and beta subunit isoforms in the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*. DOI:10.1002/cne.24924

Naidu, Mamta & Katyare, Surendra. (1992). Altered kinetic attributes of Na⁽⁺⁾ /K⁽⁺⁾-ATPase activity in kidney, brain and erythrocyte membranes in alloxan-diabetic rats. *Indian journal of experimental biology*. 30. 26-32.

Nave, C.R & Charand, K. X. (2016). Action Potentials. Hyperphysics, Georgia State University. Disponível em: <<http://hyperphysics.phyastr.gsu.edu/hbase/hframe.html>>. Acesso em: 06/02/2021.

Nelson, David L.; Cox, Michael M (2014). Princípios de Bioquímica de Lehninger - 6ª Ed. Editora Artmed

Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺, K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13742–13747. DOI:10.1073/pnas.0907054106

Palmgren, M. G., & Nissen, P. (2011). P-Type ATPases. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 243–266. DOI:10.1146/annurev.biophys.093008.131331

Parreira, G. M., Faria, J. A., Marques, S. M. S., Garcia, I. J. P., Silva, I. F., De Carvalho, L. E. D., de Lima Santos, H. (2021). The γ-Benzylidene Digoxin Derivative BD-15 Increases the α3-Na, K-ATPase Activity in Rat Hippocampus and Prefrontal Cortex and no Change on Heart. *The Journal of Membrane Biology*, 254(2), 189–199. DOI:10.1007/s00232-021-00173-2

Peković S, Nedeljković N, Nikezić G, Horvat A, Stojiljković M, Rakić L, Martinović JV (1997). Biochemical characterization of the hippocampal and striatal Na, K-ATPase

reveals striking differences in kinetic properties. *Gen Physiol Biophys*. Sep; 16(3):227-40. PMID: 9452945.

Pivovarov, A. S., Calahorro, F., & Walker, R. J. (2018). Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invertebrate Neuroscience*, 19(1). DOI: 10.1007/s10158-018-0221-7

Poole LB, Liu MS, Landfield PW (1984). Kinetic studies of the Na⁺-K⁺-ATPase enzyme system in brain and heart of aging rats. *Am J Physiol*. 1984 Nov;247(5 Pt 2):R850-5. DOI: 10.1152/ajpregu.1984.247.5.R850. PMID: 6093604.

Raichle, M. E. (2010). Two views of brain function. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(4), 180–190. DOI:10.1016/j.tics.2010.01.008

Rakowski, R. F., Bezanilla, F., De Weer, P., Gadsby, D. C., Holmgren, M., & Wagg, J. (1997). Charge Translocation by the Na/K Pump. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 834(1 Na/K-ATPase a), 231–243. DOI:10.1111/j.1749-6632.1997.tb52254.x

Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., Kubisch, C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature Genetics*, 38(10), 1184–1191. DOI: 10.1038/ng1884

Rayi P. R. Rayi, L. Koyavski, D. Chakraborty, A. Bagrov & H. Kaphzan (2019). A1-Na/K-ATPase inhibition rescues aberrant dendritic calcium dynamics and memory deficits in the hippocampus of an Angelman syndrome mouse model. *Progress in Neurobiology*, 101676. DOI:10.1016/j.pneurobio.2019.101676

Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2011). Neurons, synapses, and signaling. In *Campbell biology* (10th ed., pp. 1061-1078). San Francisco, CA: Pearson.

Reinhard, L., Tidow, H., Clausen, M. J., & Nissen, P. (2012). Na⁺, K⁺-ATPase as a docking station: protein–protein complexes of the Na⁺, K⁺-ATPase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(2), 205–222. DOI: 10.1007/s00018-012-1039-9

Roegner, M. E., Chen, H.-Y., & Watson, R. D. (2018). Molecular Cloning And characterization of a sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) from Y-organs of the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Gene*, 673, 12–21. DOI:10.1016/j.gene.2018.06.

Sáez, A. G., Lozano, E., & Zaldívar-Riverón, A. (2009). Evolutionary history of Na, K-ATPases and their osmoregulatory role. *Genetica*, 136(3), 479–490. DOI:10.1007/s10709-009-9356-0

Sánchez, G. A., Croce, D. E. D., Casadoumécq, A. C., Richard, S. B., & Takara, D. (2012). Characterization of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase from rabbit temporalis muscle. *Archives of Oral Biology*, 57(10), 1429–1437. DOI:10.1016/j.archoralbio.2012.08.005

Serratosa J, James P, Caride Aj, Gazzotti P, Penniston Jt, Carafoli E. (1990). Partial Purification and Characterization of the Ca^{2+} -pumping ATPase of the Liver Plasma Membrane. *J Biol Chem*. 265(26):16012-9.18

Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2009). Crystal structure of the sodium–potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature*, 459(7245), 446–450. DOI:10.1038/nature07939

Shrivastava, A. N., Triller, A., & Melki, R. (2018). Cell Biology and Dynamics of Neuronal Na^+/K^+ -ATPase in Health and Diseases. *Neuropharmacology*. DOI:10.1016/j.neuropharm.2018.12.008

Silva, V. (2003). The inhibitory effect of aluminium on the (Na^+/K^+) ATPase activity of rat brain cortex synaptosomes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97(1), 143–150. DOI: 10.1016/s0162-0134(03)00257-5

Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta*, 23, 394–401. DOI:10.1016/0006-3002(57)90343-8

Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2008). Understanding Synapses: Past, Present, and Future. *Neuron*, 60(3), 469–476. DOI:10.1016/j.neuron.2008.10.011

Sweadner, K. J., & Rael, E. (2000). The FXYD Gene Family of Small Ion Transport Regulators or Channels: cDNA Sequence, Protein Signature Sequence, and Expression. *Genomics*, 68(1), 41–56. DOI:10.1006/geno.2000.6274

Therien, A. G., & Blostein, R. (2000). Mechanisms of sodium pump regulation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(3), C541–C566. DOI:10.1152/ajpcell.2000.279.3.c541

Torrie, L. S., Radford, J. C., Southall, T. D., Kean, L., Dinsmore, A. J., Davies, S. A., & Dow, J. A. T. (2004). Resolution of the insect ouabain paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37), 13689–13693. DOI:10.1073/pnas.0403087101

Wall SM (1996). Ammonium transport and the role of the Na,K-ATPase. *Miner Electrolyte Metab.* ;22(5-6):311-7. PMID: 8933502.

Whikehart, D. R., Montgomery, B., & Hafer, L. M. (1987). Sodium and potassium saturation kinetics of Na⁺K⁺-ATPase in plasma membranes from corneal endothelium: Fresh tissue vs. tissue culture. *Current Eye Research*, 6(5), 709–717. DOI: 10.3109/02713688709034834

Xu, K. Y. (2005). Activation of (Na⁺/K⁺)-ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(4), 1669–1677. DOI:10.1016/j.bbrc.2005.10.067

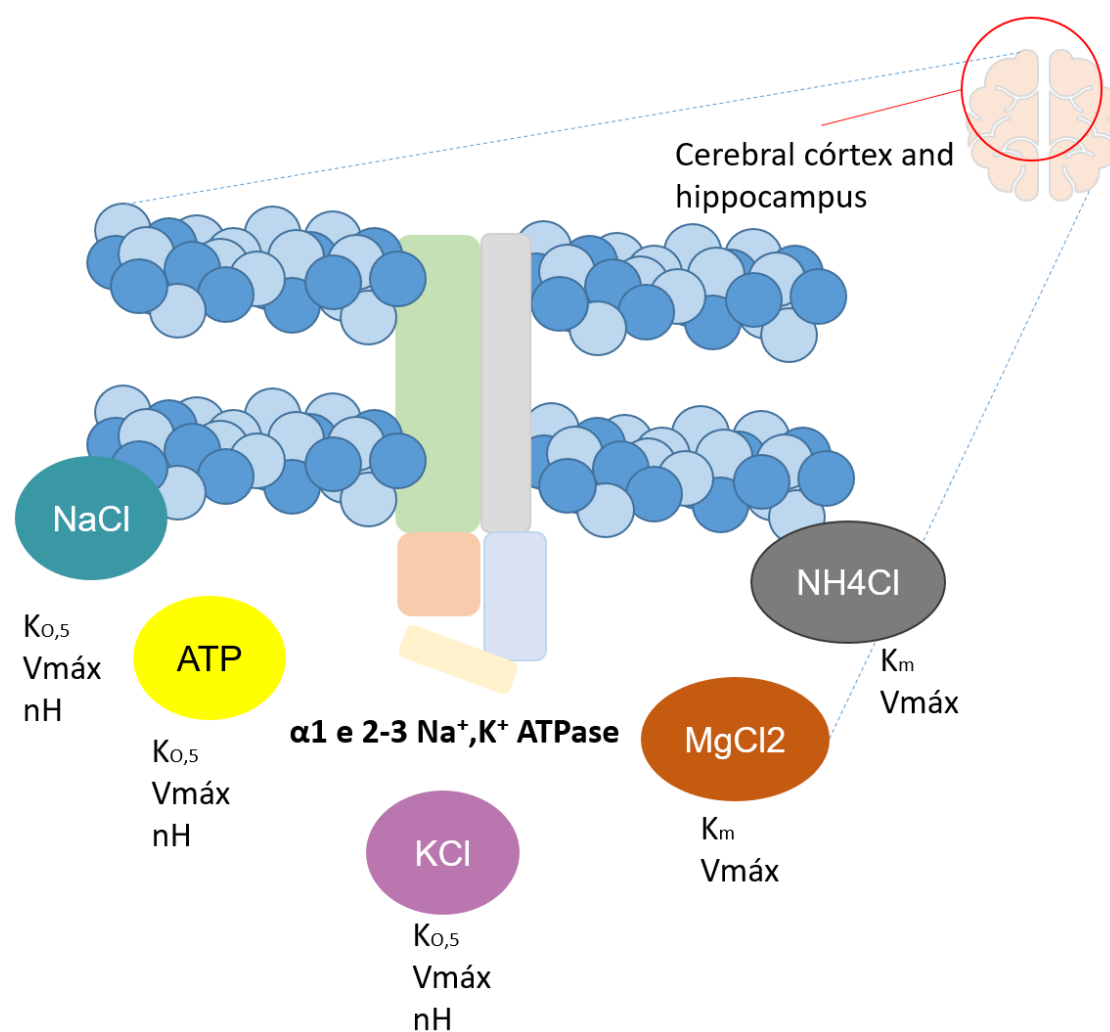
Y. Ding, J. Zhao, X. Zhang, S. Wang, K.L. Viola, F.E. Chow, Y. Gong, 2019. Amyloid Beta Oligomers Target to Extracellular and Intracellular Neuronal Synaptic Proteins in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*, 10. DOI:10.3389/fneur.2019.01140

Zahler, R., Zhang, Z.-T., Manor, M., & Boron, W. F. (1997). Sodium Kinetics of Na, K-ATPase α Isoforms in Intact Transfected HeLa Cells. *The Journal of General Physiology*, 110(2), 201–213. DOI:10.1085/jgp.110.2.201

Zhang, L.-N., Sun, Y.-J., Pan, S., Li, J.-X., Qu, Y.-E., Li, Y. Gao, Z.-B. (2012). Na⁺-K⁺-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 27(1), 96–103. DOI:10.1111/fcp.12000

CAPITULO II – MANUSCRITO

GRAPHICAL ABSTRACT



This graphical abstract illustrates the main object of the present study ($\alpha 1$ and 2-3 Na^+, K^+ ATPase), the components whose concentrations were varied in the kinetic analyses and the constants determined in this study.

ESTUDO DAS PROPRIEDADES CINÉTICAS DAS ISOFORMAS α 1 e α 2-3 Na^+ , K^+ - ATPase EM CÓRTEX CEREBRAL e HIPOCAMPO DE RATOS

Igor Leal Brito^a, Andreza Negreli Santos ^a, Malson Neilson de Lucena^a, Jean Pierre Oses^b, Jeandre Augusto dos Santos Jaques^{a*}

a- Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul, Campo Grande - MS, Brasil

b- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, Brasil

*e-mail: jeandreaugusto@hotmail.com ou jeandre.jaques@ufms.br

ABSTRACT

KINETIC PROPERTIES STUDY OF α 1-2 and α 3 ISOFORMS of Na^+ , K^+ - ATPase IN RAT CEREBRAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS.

Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) is an electrogenic pump that maintains cellular homeostasis by transporting Na^+ and K^+ ions through the lipid bilayer. In the cells of the nervous system, NKA preserves the integrity of the neuron and the transmission of the nerve impulse. The deficiency in the catalytic activity of this ion pump in the brain is correlated with the development of different functional and cognitive neuropathies. Regions of the brain that regulate motor functions, memory and learning are the target for understanding the functioning of these neural processes. However, there are no studies on the catalytic properties of α 1, 2 and α 3 NKA isoforms in different regions of the brain. Thus, this study brings the characterization of the kinetic activity of α 1 and α 2-3 NKA in homogenates from cerebral cortex (CX) and hippocampus (HP). The activities of α 1 and α 2-3 NKA were quantified in HP and CX and in increasing concentrations of ATP, NaCl, KCl, MgCl_2 and NH_4Cl . The kinetic constants for α 1 and α 2-3 and total NKA (K_m or $K_{0.5}$, nH and V_{max}) were determined for HP and CX. The results of this study demonstrate that the specificity of NKA to ions Na^+ , K^+ , Mg_2^+ and to ATP differs among the α isoforms of NKA and between the CX and HP brain regions. Furthermore, our data show that at low and high concentrations NH_4^+ can affect NKA activity in the CX, but seems to have little effect on the activity in the HP.

Keywords: Kinetic characterization, α Na^+ , K^+ -ATPase, Hippocampus, Cerebral cortex and enzymatic activity.

INTRODUÇÃO

A Na^+ , K^+ -ATPase (EC 3.6.3.9 ou NKA) é uma enzima transmembranar da família das ATPases do Tipo P (subfamília P2-C) ¹⁻². Na membrana plasmática das células, a NKA atua no transporte de íons Na^+ e K^+ através da bicamada, mantendo a homeostase eletroquímica da célula. Este gradiente transmembrana é importante para uma variedade de funções celulares essenciais, incluindo a captação ativa de moléculas como neurotransmissores, aminoácidos, açúcares e nucleosídeos ³⁻⁴. A NKA bombeia três íons Na^+ do espaço intracelular para o extracelular, e dois íons K^+ do espaço extracelular para dentro da célula, contra o gradiente de concentração ³⁻⁷. Para esse transporte, a enzima consome a energia gerada pela hidrólise de uma molécula de ATP ⁵⁻⁶.

No encéfalo, diferentes isoformas de NKA interagem com proteínas de membrana, com células vizinhas, participam de cascatas de sinalização citosólicas para enviar sinais intracelulares, ⁷⁻⁸. Nas membranas celulares do sistema nervoso são encontradas três isoformas α da NKA. A isoforma $\alpha 1$ NKA é mais distribuída entre as células, por outro lado a isoforma $\alpha 3$ é encontrada especificamente em neurônios e a isoforma $\alpha 2$ em células da glia ¹⁰⁻¹¹. As isoformas da NKA são expressas de forma heterogênea entre as regiões do encéfalo ¹¹ e exibem propriedades distintas quanto a afinidade aos íons Na^+ , K^+ e ao ATP, e além disso também exibem sensibilidade específica ao inibidor ouabaína (OUA) ¹²⁻¹³.

No encéfalo são expressas três isoformas da subunidade α : a subunidade $\alpha 1$, que é expressa em diferentes tipos celulares, a isoforma $\alpha 3$ que é expressa especificamente neurônios e a isoforma $\alpha 2$ que é expressa nas células da neuroglia. Essas características refletem no papel fisiológico da NKA no encéfalo. ^{10,12,14}.

Os mecanismos envolvidos na propagação de um impulso nervoso são químicos e elétricos ¹⁵. A diferença de carga dentro e fora da membrana gera um potencial transmembrana. Esse potencial é dinâmico e existe devido às diferentes concentrações intra e extracelulares de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), cálcio (Ca^{2+}), entre outros ¹⁶⁻¹⁷. Para a transmissão do impulso nervoso, é necessário que um pequeno estímulo crie um rápido desequilíbrio na composição iônica da célula. Esse estímulo inicial cria um *feedback* positivo para a entrada de Na^+ , como consequência a alta concentração de Na^+ dentro da célula a leva a um estado de despolarização nas fibras nervosas. A NKA responde ao acúmulo de Na^+ dentro da célula e ajuda a restaurar o potencial de repouso da membrana ¹⁸

Vários estudos demonstram que alterações na atividade da NKA, leva ao desequilíbrio iônico e distúrbios neurais, afetando as capacidades motoras e de aprendizado ^{9,19-22}. Assim, a atividade enzimática da NKA pode ser usada como marcador para diferentes diagnósticos e alvo para modulação com finalidade de tratar distúrbios cardíacos e neurais ^{9,14}.

O estudo das propriedades cinéticas da NKA ajuda a compreender aspectos que afetam a enzima em sua função catalítica. Por exemplo, estudos prévios revelam diferenças marcantes nas propriedades cinéticas e na expressão da NKA no hipocampo (HP), e em lobos que compreendem o córtex cerebral (CX) ^{11,24-25}. Os resultados encontrados na literatura estão distribuídos em diferentes publicações por região encefálica. Além disso, não há resultados quanto a caracterização das diferentes isoformas α NKA, com as constantes cinéticas de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para íons Na^+ e K^+ e ao substrato.

A compreensão das propriedades catalíticas da subunidade α da NKA no encéfalo fornece bases biológicas para a compreensão de aspectos dos processos mentais que nos garantem perceber, transmitir, e responder aos estímulos. O objetivo deste estudo é descrever e comparar os parâmetros cinéticos das isoformas α 1, 2-3 e NKA total no CX e HP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 24 ratos Wistar adultos (*Rattus norvegicus*) (150-200 g), machos e fêmeas. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Instituto de Biociências (INBIO) da UFMS. Todos os procedimentos e protocolos seguiram as diretrizes aprovadas para o tratamento ético de animais de acordo com o Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e foi aprovada sob o protocolo nº 1.059 / 2019.

A luz e a temperatura foram controladas, com foto período de 12 horas (12 horas de luz: 12 horas de escuro), e a temperatura mantida em $20 \pm 2^\circ C$, em gaiolas de polipropileno e de 3 a 4 animais por caixa. Os ratos receberam ração comercial e água filtrada *ad libitum*.

Ensaio e procedimentos experimentais

Todos os testes e procedimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Bioquímica Geral e Microrganismos (INBIO) da UFMS.

Preparação de homogenatos de HP e CX

Os animais foram anestesiados e mortos por exsanguinação. Em seguida, eles foram decapitados e o cérebro foi cuidadosamente removido. Todos os procedimentos a partir de então ocorreram com as amostras resfriadas. As estruturas cerebrais foram dissecadas em HP e CX²⁶. As amostras foram homogeneizadas em Tris-HCl 10 mM (pH 7,4; Vol 1mg:1mL) e centrifugados a 8000 g por 30 minutos. O sobrenadante resultante deste processo (S1) foi coletado e o pellet foi ressuspensionado e homogeneizado novamente com Tris-HCl 10 mM (pH 7,4). Esse segundo homogenato foi novamente centrifugado a 8000 g por 30 minutos. O sobrenadante resultado da segunda centrifugação (S2) foi homogeneizado com o S1 e posteriormente aliquoteado. Este material contendo as enzimas foi armazenado a - 20 ° C para os experimentos.

Quantificação do teor de proteína

O teor de proteína das amostras foi determinado de acordo com o método previamente descrito (Bradford, 1976) utilizando albumina sérica bovina como padrão. A concentração de proteína será realizada assim como na *equação 1*:

$$\text{Atividade Enzimática} = \frac{\Delta \times \text{Fator de Correção de Fosfato} \times \text{Diluição}}{\text{Tempo} \times \text{Vol. amostra} \times [\text{Proteína}]}$$

Condições para a incubação da enzima Na⁺, K⁺ -ATPase.

O ensaio para a quantificação da atividade enzimática foi realizado com base em adaptações de protocolos usados em estudos anteriores para a atividade de NKA²⁶⁻²⁷.

O sistema de reação enzimática consistiu em EDTA 0,1 mM, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 6 mM, tampão 30 mM (Tris-HCl, pH 7,4), na presença e ausência de ouabaína 1 mM ou 10 µM, e com volume final de 368 µL. O ensaio foi realizado usando micro túbulos contendo 300 µL do sistema e 34 µL dos respectivos homogenatos. Cada tubo foi pré-incubado por 10 minutos, posteriormente a reação foi iniciada pela adição de 34 µL de substrato (ATP 3mM), suficiente para atingir uma concentração saturante final. O tempo de incubação foi de 60 minutos e a reação ocorreu à temperatura de 37°C. As reações foram interrompidas com 167 µL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) e os tubos foram imediatamente resfriados. As atividades enzimáticas foram medidas pela quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado durante as reações. O Pi liberado foi quantificado usando Verde de Malaquita. A leitura da absorbância foi realizada a 630 nm. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

A atividade foi expressa em nano mol de Pi liberado / minuto / mg de proteína, segundo a equação (2):

$$\text{Atividade Enzimática} = \frac{\Delta \times \text{Fator de Correção de Fosfato} \times \text{Diluição}}{\text{Tempo} \times \text{Vol. amostra} \times [\text{Proteína}]}$$

Calculo para obtenção da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase Total (NKAT), α1 Na⁺, K⁺-ATPase (α1NKA) e α2-3 Na⁺, K⁺-ATPase (2-3 NKA)

A atividade específica da α 1NKA e das isoformas α 2 - 3 NKA foi calculada assim como descrito por ²⁸. O cálculo se trata da subtração entre os valores obtidos da atividade da NKA sem ouabaína e com ouabaína 10μM, concentração capaz de inibir as isoformas α2 e α3 NKA. A NKAT foi calculada pela subtração entre os dados da atividade da NKA sem ouabaína e com ouabaína 1mM, concentração capaz de inibir todas as isoformas da NKA. Por fim, a atividade das isoformas α2 e 3 foi calculada pela subtração da Atividade total e atividade específica da α1NKA, um esquema exemplifica o cálculo na Tabela1.

Tabela 1. Esquema para obtenção da atividade das isoformas α1 e α 2-3 e NKAT

Atv. NKAT = Atv. ATPásica – ATV ATPásica sensível a OUA 1mM

Atv. α1NKA = Atv. NKAT – Atv. ATPásica sensível a OUA 10μM

Atv. α2-3NKA= Atv. α1NKA – Atv. NKAT

* Atv. refere-se a atividade enzimática.

Caracterização da atividade enzimática

Primeiramente, diferentes concentrações de proteína (20, 30, 40, 50 e 60 μg por tubo) foram testadas de forma a garantir a linearidade das reações num período de 60 minutos.

Os experimentos seguintes objetivaram para determinar os valores da constante de Michaelis (K_m) ou constante de dissociação aparente (K_{0,5}), constante de Hill (nH) velocidade máxima (V_{máx}), usando concentrações crescentes de substrato na faixa de 0 a 4 mM de ATP e também de KCl (de 0 a 7 mM), NaCl (de 0-130 mM); MgCl₂ (de 0-7mM) e de NH₄Cl (de 0-10 mM).

Os resultados foram divididos e organizados no seguinte formato: α 1NKA, NKA 2 – 3 e NKA (para α 1, α 2-3 e atividade total da Na^+ , K^+ ATPase respectivamente).

Análise estatística

As análises estatísticas, o cálculo dos parâmetros cinéticos (K_m , $K_{0,5}$, $V_{\text{máx}}$ e nH) e a construção dos gráficos foram realizados usando o programa Prism7.0. Os resultados serão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curva da determinação da concentração ideal de proteína.

A atividade da NKA foi medida em função de diferentes concentrações de proteínas. Os resultados demonstram que a atividade da NKA em CX e HP é linear nas concentrações 20-60 μg de proteína/ml para as isoformas α 1 e 2-3 NKA (Figura 1). O r^2 α 1NKA = 0,97 e $P < 0,05$; r^2 α 2-3NKA = 0,91 e $P < 0,05$; r^2 NKA total = 0,99 e $P < 0,05$ para CX. Em HP o r^2 α 1NKA foi = 0,83 e $P < 0,05$; r^2 α 2-3NKA = 0,93 e $P = 0,05$; r^2 NKA total = 0,80 e $P = 0,14$.

No encéfalo, a atividade da NKA é determinante para a homeostase iônica e como consequência para a transmissão sináptica. Nossos resultados da curva de proteína demonstram a linearidade da atividade da NKA em diferentes concentrações variando entre 20 e 60 μg de proteína, outros estudos realizados com esta enzima também encontraram linearidade entre concentrações similares (Figura 1) ²⁹⁻³¹. Para as amostras de CX os resultados apresentaram maiores valores de r^2 e menores valores de P em comparação com os resultados expressos no HP. Embora fora verificada que a atividade é linear entre todos pontos, posteriormente observou-se que em amostras de HP os resultados e repetições ficavam mais consistentes em maiores concentrações (40-50 μg). As diferenças entre as atividades de NKA total, 1 e 2-3 nas amostras de CX e HP podem estar relacionadas à expressão assimétrica de subtipos de NKA em cada região ¹¹.

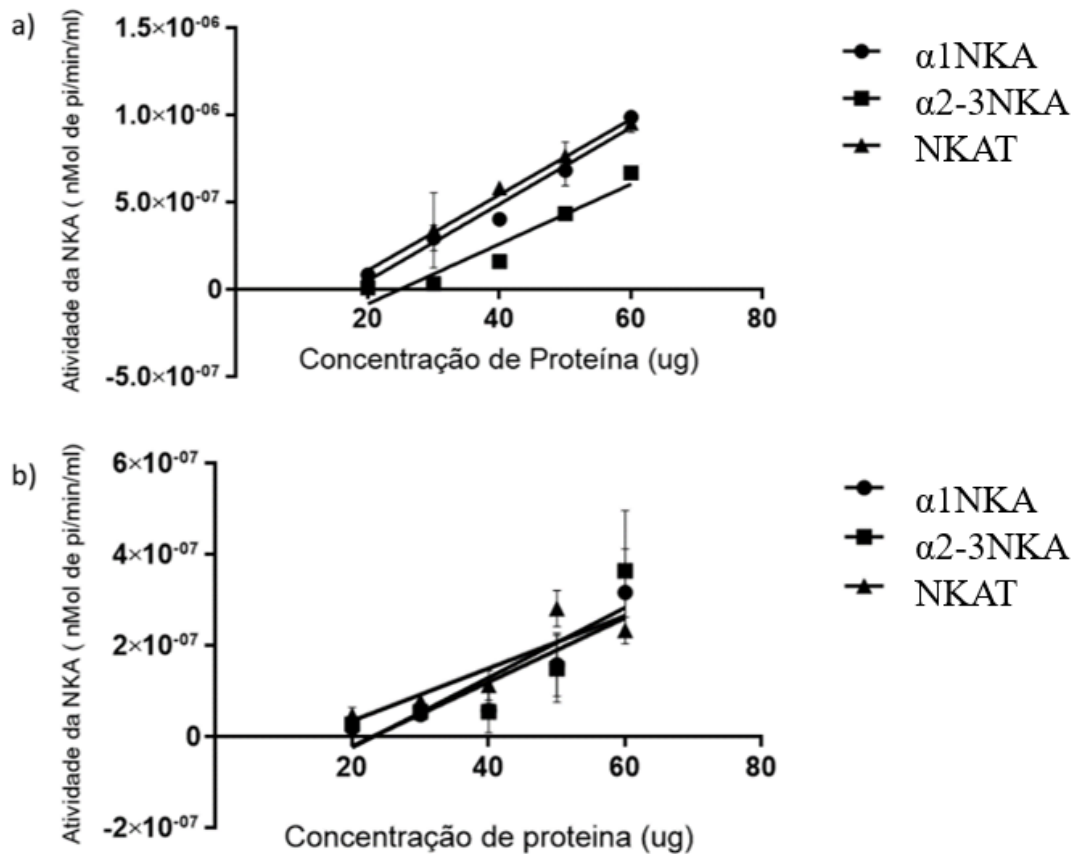


Figura 1. A Atividade das isoformas α 1 e 2- 3 e NKA total em função da concentração de proteínas (20; 30; 40; 50; 60 μ g de proteína/ml) no CX (a) e HP (b).

Efeito do aumento da concentração de ATP na atividade da NKA.

. As atividades das α 1NKA, 2-3 e NKA total foram mensuradas em crescentes concentrações de ATP (1 μ M - 4 mM). Os resultados são demonstrados na Figura 2.a para CX e Figura 2.b para HP. As constantes cinéticas foram definidas como demonstrado na tabela 2.

Assim como demonstrado nas Figuras 2.a e 2.b a enzima possui um perfil cinético diferente entre as regiões encefálicas. No CX as isoformas α 2-3NKA aparecem mais sensíveis ao substrato que a isoforma α 1NKA. Em contra partida, no HP todas isoformas possuem uma sensibilidade similar ao ATP. Em geral essas enzimas expressas na região cortical apresentam menor K_m , exceto pelo que foi observado na atividade da NKA total.

Estudos anteriores descreveram a NKA com uma cinética michaeliana, ou seja, com a curva de substrato perfilando uma hipérbole ³²⁻³³. Por outro lado, em estudos mais recentes a curva de substrato da NKA aparece com um perfil sigmoide ³¹⁻³⁴, o que seria compatível com o número de sítios de ligação e com as alterações estruturais que expõem sítios com maior ou menor afinidade.

Em 1995, Blanco e colaboradores expressaram as isoformas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ da NKA de ratos em cultura de células *Sf9* com o cDNA da NKA subclonado. O $K_{0,5}$ definido após a estimulação por ATP, para as isoformas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$, foram $0,46 \pm 0,10$, $0,11 \pm 0,01$ e $0,09 \pm 0,01$ respectivamente. Esses resultados se aproximam aos definidos na Tabela 2, mais especificamente para o $K_{0,5}$ da isoforma $\alpha 1$ NKA ($0,51 \pm 0,06$) em CX e HP ³⁵⁻³⁶.

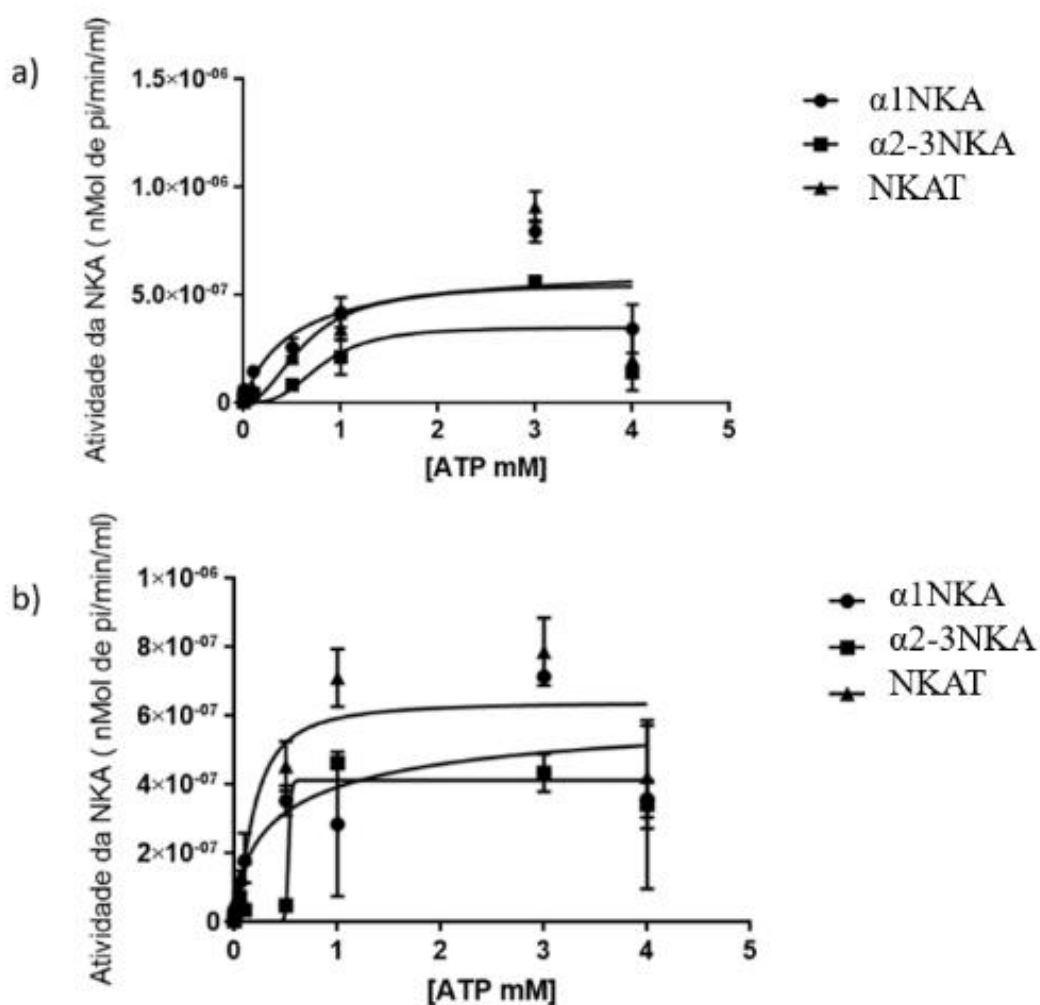


Figura 2. Estimulação da atividade da $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ NKA por ATP (0-4mM) no CX (a) e HP (a).

Tabela 2. Valores de $K_{0,5}$, $V_{\text{máx}}$ e constante de hill definidos pela a curva com ATP.

Córtex cerebral			
	$\alpha 1\text{NKA}$	$\alpha 2\text{-3NKA}$	NKA total
$K_{0,5}$	$0,51 \pm 0,06$	$0,80 \pm 0,18$	$0,63 \pm 0,02$
$V_{\text{máx}}$ (nmol de Pi/min/ml)	640 ± 152	348 ± 45	549 ± 102
nH	$0,94 \pm 0,01$	$3,7 \pm 0,03$	$2,07 \pm 0,02$
Hipocampo			
	$\alpha 1\text{NKA}$	$\alpha 2\text{-3NKA}$	NKA total
$K_{0,5}$	$0,51 \pm 0,06$	$0,52 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,06$
$V_{\text{máx}}$ (nmol de Pi/min/ml)	641 ± 22	411 ± 25	639 ± 52
nH	0,67	0,40	1,4

Efeito do aumento da concentração de sódio na atividade da NKA.

A curva de Na^+ foi feita com concentrações crescentes de NaCl (de 0 – 130 mM). As Figuras 3.a e 3.b demonstram o efeito de NaCl na atividade da $\alpha 1\text{NKA}$, 2-3 e NKA total em CX e HP respectivamente. Além disso a Tabela 3 traz o K_m e o $V_{\text{máx}}$ definidos para cada isoforma nas regiões encefálicas em destaque.

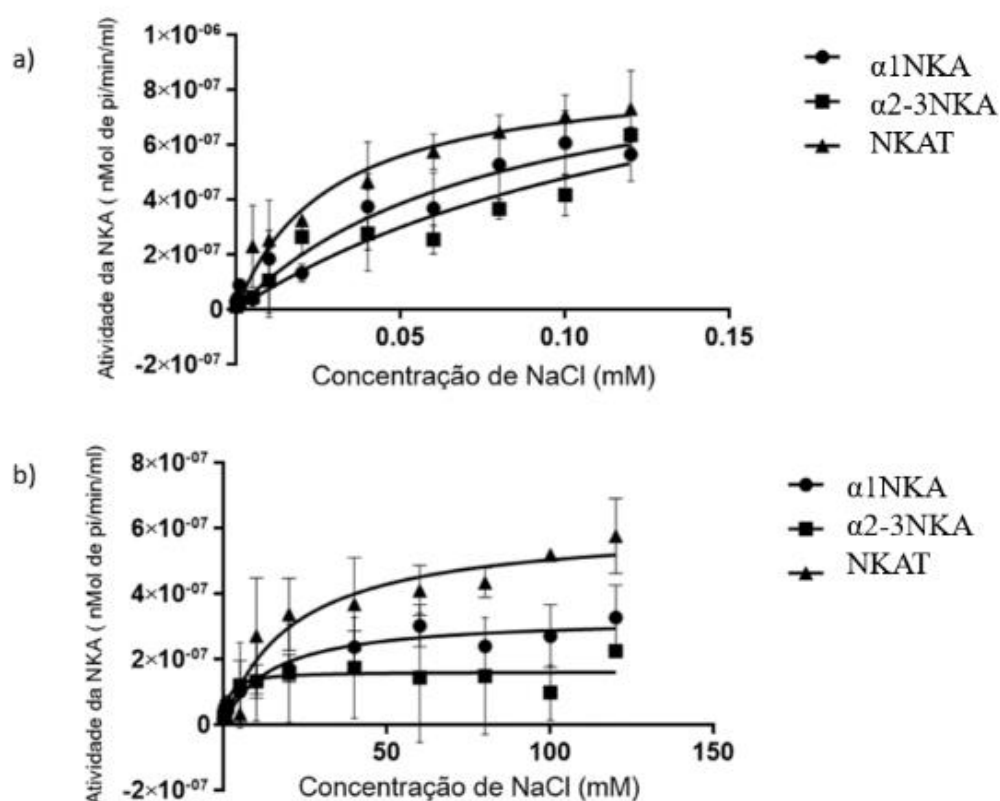


Figura 3. Estimulação da atividade da $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ NKA por NaCl (0-130mM) no CX (a) e HP (b).

O HP e CX possuem uma composição celular diferente³². Embora células de ambas regiões usem a distribuição assimétrica de Na^+ entre a bicamada para suas funções neurais, em CX a NKA apresentou menores valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ que no HP (Tabela 3). Entre as isoformas no CX, a $\alpha 1$ NKA apresentou maior sensibilidade a NaCl que as demais. Em HP foi o contrário as isoformas $\alpha 2-3$ NKA foram mais sensíveis ao NaCl que a isoforma $\alpha 1$ NKA.

Tabela 3. Valores de $K_{0,5}$ e $V_{\text{máx}}$ definidos com a curva com NaCl.

Córtex cerebral			
	$\alpha 1$ NKA	$\alpha 2-3$ NKA	NKA total
$K_{0,5}$	$0,51 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,06$
$V_{\text{máx}}$ (nmol de Pi/min/ml)	233 ± 72	120 ± 20	191 ± 15
nH	$0,71 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,01$

Hipocampo

	α 1NKA	α 2-3NKA	NKA total
$K_{0,5}$	$0,44 \pm 0,09$	$0,17 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,02$
$V_{m\acute{a}x}$ (nmol de Pi/min/ml)	475 ± 27	166 ± 47	694 ± 23
nH	$0,59 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,01$

A constante de dissociação aparente ($K_{0,5}$) para Na^+ determinada neste estudo é menor quando comparada à outras referências ³⁵⁻³⁶. Isso é explicado pela diferença na forma de obtenção da enzima, preparação do sistema e outras condições metodológicas.

Efeito do aumento da concentração de potássio na atividade da NKA.

Os resultados das curvas de KCl em CX e HP para a α 1NKA, 2-3 e NKAT estão demonstradas nas Figuras 4a e 4b. As constantes cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) estão definidas na Tabela 4.

Durante um disparo neural os astrócitos são responsáveis pela liberação imediata de K^+ enquanto após o disparo os neurônios são os primeiros a absorver o K^+ extracelular. Nesse cenário, a NKA é uma reguladora dos níveis de K^+ extracelulares ¹⁰. No HP a NKA apresentou um K_m para KCl próximo entre as isoformas α 1 e α 2-3NKA. No entanto foi mais sensível ao aumento dos níveis de KCl que em CX. Neste último, a isoforma α 1NKA foi a que apresentou maior afinidade aos íons K^+ dentre as isoformas analisadas. As combinações de isoformas expressas entre astrócitos, neurônios e outras células neurais fornecem as características cinéticas específicas para dar destino ao K^+ durante e após o disparo neural ¹⁰.

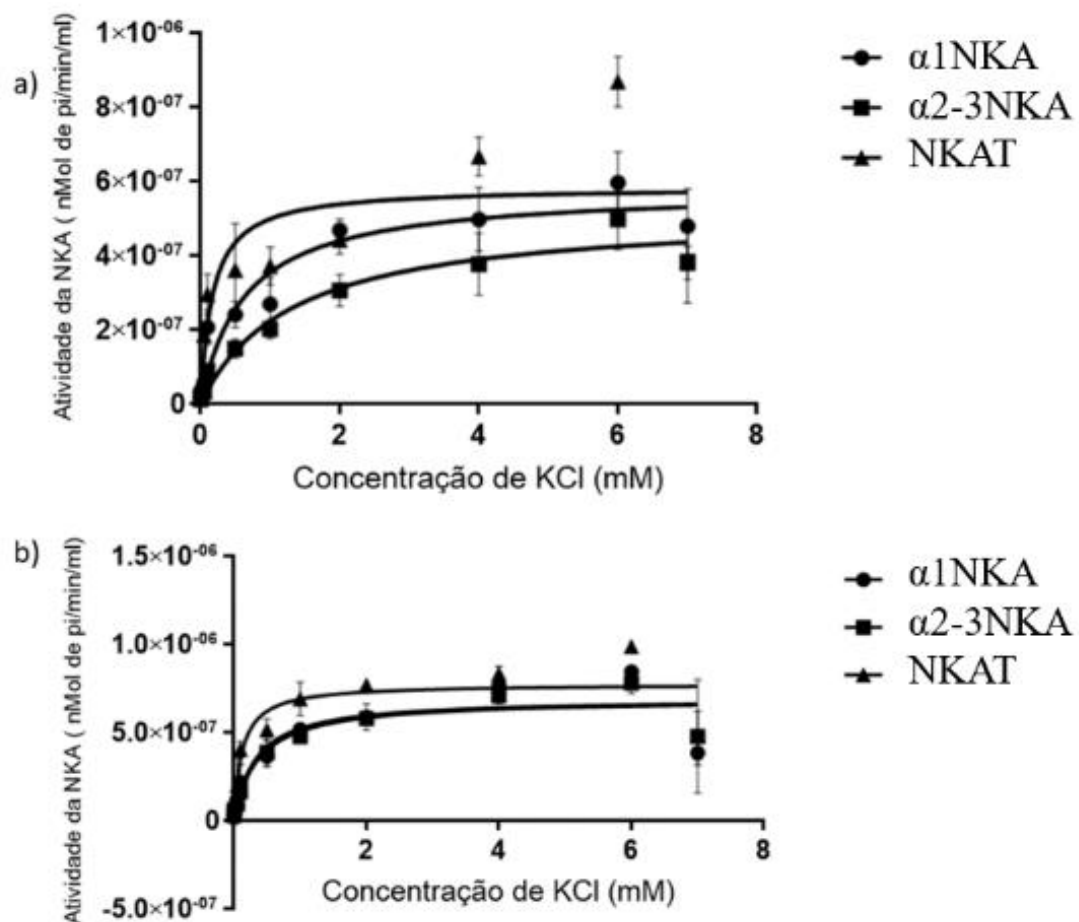


Figura 4. Estimulação da atividade da $\alpha 1$ e $\alpha 2-3$ NKA por KCl (0-7mM) no CX (a) e HP (b).

Tabela 4. Valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ definidos para a curva com KCl.

Córtex cerebral

	$\alpha 1$ NKA	$\alpha 2-3$ NKA	NKA total
$K_{0,5}$	$1,96 \pm 0,18$	$3,41 \pm 0,36$	$1,75 \pm 0,08$
$V_{m\acute{a}x}$ (nmol de Pi/min/ml)	819 ± 302	720 ± 334	983 ± 72
nH	$0,55 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$

Hipocampo

	$\alpha 1$ NKA	$\alpha 2-3$ NKA	NKA total
$K_{0,5}$	$0,33 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$
$V_{m\acute{a}x}$ (nmol de Pi/min/ml)	706 ± 57	705 ± 91	812 ± 90

O $K_{0,5}$ definido na literatura para K^+ nas isoformas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ da NKA de ratos é maior, exceto para a isoforma $\alpha 2$ NKA de CX ($3,41 \pm 0,36$), que é similar ao descrito por Blanco e colaboradores³⁵⁻³⁶. Nossos resultados expressam as constantes cinéticas para as $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -3NKA de homogenatos de CX e HP. As propriedades da enzima no tecido cerebral podem diferir dada especificidade e distribuição em tecidos e células específicas.

Efeito do aumento da concentração de magnésio na atividade da NKA.

Os dados de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ referentes as curvas com $MgCl_2$ são apresentados na Tabela 5. As curvas estão apresentadas na Figura 5.a para CX e 5.b para HP. Para a curva, os pontos usados compreenderam entre 0 e 7 mM de $MgCl_2$.

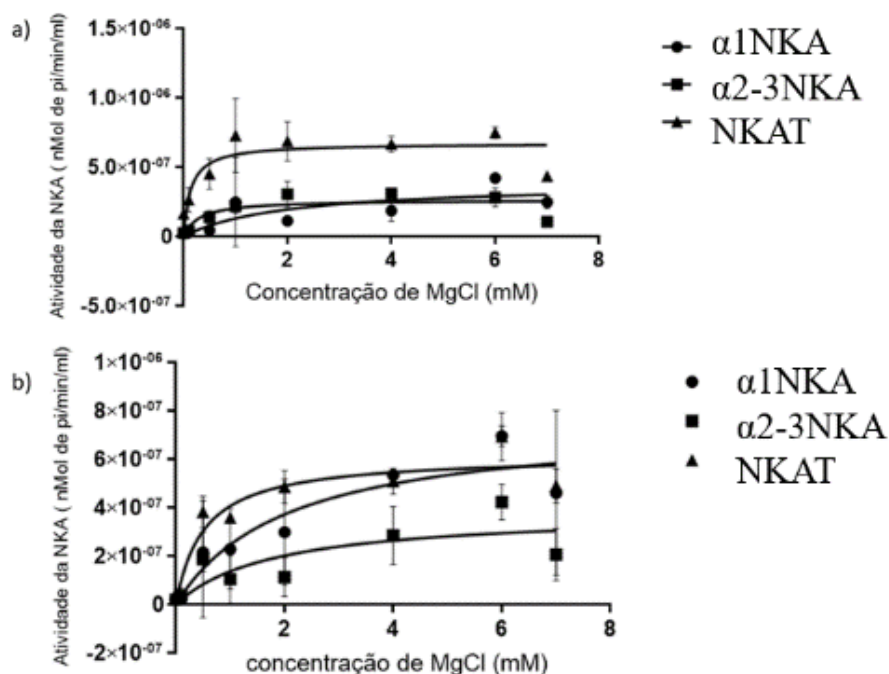


Figura 5. Estimulação da atividade da $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -3 NKA por $MgCl_2$ (0-7mM) no CX (a) e HP.

O íon Mg^{2+} tem papel indispensável na atividade da NKA. Este é um cofator na ativação da hidrólise por ATP, além disso o Mg^{2+} exerce um efeito regulador no transporte de íons, interagindo com região citoplasmática da α NKA³⁵. Em nosso estudo foi observado que

no geral a NKA em CX é mais sensível aos íons de MgCl_2 que em HP, pois possui menor K_m . Entre as isoformas analisadas em CX a atividade da α 2-3NKA foi a que apresentou menor

K_m , esse resultado também foi observado entre as isoformas do HP. Esses resultados, somados aos publicados por Apel et al e colaboradores ³⁷, contribuem para a compreensão da função cinética do Mg^{2+} na atividade da NKA. O K_m da NKA para Mg^{2+} foi definido em amostras de *Cardisoma guanhumi* ($K_{0,5} = 0.27 \pm 0.04 \text{ mmol L}^{-1}$) ³¹ e em *Macrobrachium amazonicum* $K_{0,5} = 0.33 \pm 0.042 \text{ mmol L}^{-1}$ ²⁷. Os as constantes definidas na tabela 5 são as primeiras descritas na literatura para a subunidade catalítica α 1,2-3NKA em HP e CX de ratos.

Tabela 5. Valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ definidos para a curva com MgCl_2

Córtex cerebral			
	α 1NKA	α 2-3NKA	NKA total
K_m (mM)	$1,97 \pm 0,18$	$0,70 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,07$
$V_{\text{máx}}$ (nmol de Pi/min/ml)	386 ± 13	264 ± 31	670 ± 51
Hipocampo			
	α 1NKA	α 2-3NKA	NKA total
K_m (mM)	$2,05 \pm 0,12$	$1,77 \pm 0,16$	$0,51 \pm 0,01$
$V_{\text{máx}}$ (nmol de Pi/min/ml)	753 ± 163	381 ± 118	615 ± 41

Efeito do íon amônio sobre a atividade da α 1NKA, α 2-3NKA e NKA total

O efeito do NH_4Cl na atividade da 1, 2-3 e NKA total foi avaliado com concentrações de 0 à 10 mM. Os resultados são expostos na Figura 6.a para CX e 6.b HP.

Os resultados demonstram como o amônio pode afetar a atividade da NKA e suas isoformas em HP e CX. A excreção de amônio varia com mudanças no equilíbrio ácido-base. Como o NH_4^+ tem um raio iônico similar ao do K^+ , esses íons competem pela mesma região na NKA. Quando isso ocorre o gradiente eletroquímico através da membrana é afetado e reflete em outras vias de transporte nas células ^{27,38}. Nossos resultados demonstram que a atividade da NKA é grandemente afetada na presença de NH_4 em todas concentrações no CX, assim como demonstrado na Figura 6a. No HP (Figura 6.b) a atividade da NKA foi mais afetada nas

isoformas 2-3 NKA em relação as demais. Isso demonstra que algumas isoformas da α NKA podem apresentar sensibilidade distinta ao íon, assim como nos demais analisados.

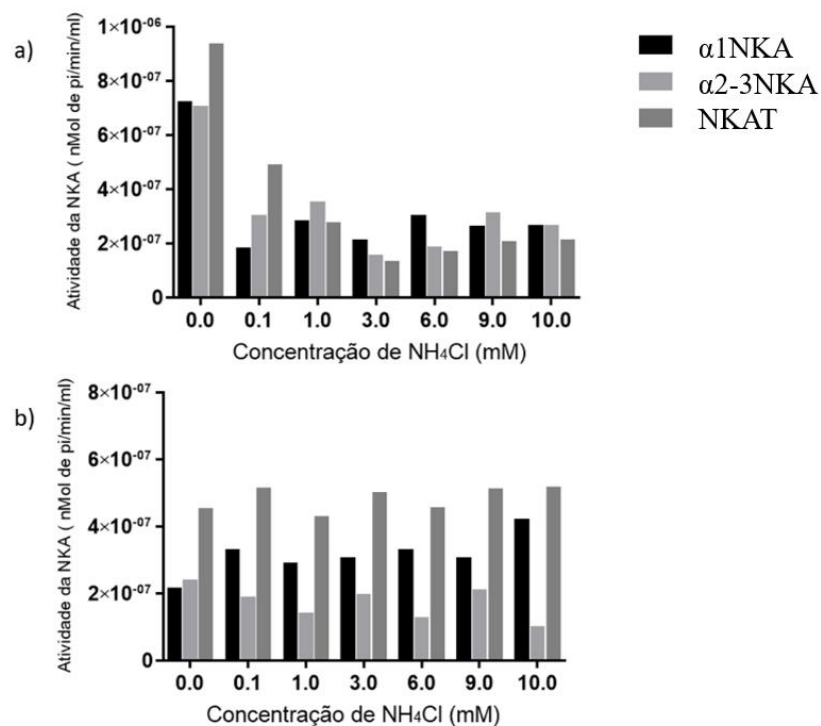


Figura 6. Efeito do NH_4^+ na atividade da NKA. Em a) o efeito de NH_4Cl (de 0-10 mM) na atividade da 1, 2-3 e NKA total em CX. Em b) o efeito de NH_4Cl no HP.

CONCLUSÃO

A NKA é uma enzima de interesse científico por seu papel na homeostase celular e biossinalização. O presente estudo traz, pela primeira vez na literatura, uma comparação entre a função cinética da 1, 2-3 e NKA total em diferentes regiões encefálicas. Esses dados somam a literatura e enriquecem o conhecimento acerca da NKA e suas isoformas em diferentes condições de incubação. Experimentos futuros, com mais regiões encefálicas, podem elucidar mais do papel da NKA no encéfalo.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGFARM) e a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

REFERÊNCIAS

- 1 - Palmgren, M. G., & Nissen, P.; *Annual Review of Biophysics* **2011**, 40(1), 243–266. DOI:10.1146/annurev.biophys.093008.131331
- 2- Dyla, M., Kjærgaard, M., Poulsen, H., & Nissen, P.; *Annual Review of Biochemistry* **2019**, 89(1). DOI: 10.1146/annurev-biochem-010611-112801
- 3-Mobasher, A. J. Avila, I. Cózar-Castellano, M. D. Brownleader, M. Trevan, M. J. O. Francis, F. J. Francis, P. Martín-Vasallo, 2000. *Bioscience Reports* **2000**, 20(2), 51–91. DOI: 10.1023/a: 1005580332144
- 4- Krishnan G. P., G. Filatov, A. Shilnikov & M. Bazhenov. *Journal of Neurophysiology* **2015**, 113(9), 3356–3374. DOI:10.1152/jn.00460.2014
- 5- Skou, J. C. *Biochimica et Biophysica Acta* **1957**, 23, 394–401. DOI: 10.1016/0006-3002(57)90343-8
- 6- Kaplan, J. H. *Annual Review of Biochemistry* **2002**, 71(1), 511–535. DOI:10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218
- 7-Pivovarov, A. S., Calahorra, F., & Walker, R. J. *Invertebrate Neuroscience* **2018**, 19(1). DOI: 10.1007/s10158-018-0221-7
- 8- Cui X. Cui and Z. Xie, 2017. *Molecules* **2018**, 22(6), 990. DOI: 10.3390/molecules22060990
- 9-Shrivastava, A. N., Triller, A., & Melki, R. *Neuropharmacology* **2018**. DOI:10.1016/j.neuropharm.2018.12.008
- 10- Larsen, B. R., Stoica, A., & MacAulay, N. *Frontiers in Physiology* **2016**, 7. DOI:10.3389/fphys.2016.00141
- 11- Murata, K., Kinoshita, T., Ishikawa, T., Kuroda, K., Hoshi, M., & Fukazawa, Y. *Journal of Comparative Neurology* **2020**. DOI:10.1002/cne.24924
- 12- Blanco, G., & Mercer, R. W. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **1998**, 275(5), F633–F650. DOI:10.1152/ajprenal.1998.275.5.f
- 13- Therien, A. G., & Blostein, R. (2000). *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2000**, 279(3), C541–C566. DOI:10.1152/ajpcell.2000.279.3.c541
- 14- Clausen, M. V., Hilbers, F., & Poulsen, H. (2017). *Frontiers in Physiology* **2017**, 8. doi:10.3389/fphys.2017.00371
- 15-Südhof, T. C., & Malenka, R. C. *Neuron* **2008**, 60(3), 469–476. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.011
- 16- Rakowski, R. F., Bezanilla, F., De Weer, P., Gadsby, D. C., Holmgren, M., & Wagg, J. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1997**, 834, 231–243. doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb52254.x

- 17- Nelson, David L.; Cox, Michael M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger* - 6ª Ed. Editora Artmed, **2014**.
- 18- Hall J. E. Hall & A. C. Guyton, 2017. *Guyton & Hall tratado de fisiologia médica*. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, **2017**.
- 19- Moseley, A. E., Williams, M. T., Schaefer, T. L., Bohanan, C. S., Neumann, J. C., Behbehani, M. M., ... Lingrel, J. B. *Journal of Neuroscience* **2007**, 27(3), 616–626. doi:10.1523/jneurosci.4464-06.2007
- 20- Zhang, L.-N., Sun, Y.-J., Pan, S., Li, J.-X., Qu, Y.-E., Li, Y. Gao, Z.-B. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2012**, 27(1), 96–103. doi:10.1111/fcp.12000
- 21- Holm, T. H., Isaksen, T. J., Gglerup, S., Heuck, A., Bøttger, P., Füchtbauer, E. *Scientific Reports* **2016**, 6(1). Doi: 10.1038/srep31972.
- 22- Lichtstein, D., Ilani, A., Rosen, H., Horesh, N., Singh, S., Buzaglo, N., & Hodes, A. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, 19(8), 2314. Doi: 10.3390/ijms19082314.
- 23- Rayi P. R. Rayi, L. Koyavski, D. Chakraborty, A. Bagrov & H. Kaphzan. *Progress in Neurobiology* **2019**, 101676. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.101676.
- 24- Naidu, Mamta & Katyare, Surendra. *Indian Journal of Experimental Biology* **1992**. 30. 26-32.
- 25- Kumosani T. A. *Journal of Medical Sciences* **2002**, 2: 29-31.
- 26- Jaques J. A. S. , J. F. P. Rezer, F. B. Carvalho, M. M. Rosa, J. M. Gutierrez, J. F. Gonçalves, R. Schmatz, A.V. Bairos, C. M. A. Mazzanti, M. A. Rubin, M. R. C. Schetinger, D. B. R. Leal. *Physiology & Behavior* **2012**, v. 106, p. 664-669.
- 27- Leone, F. A., Lucena, M. N., Rezende, L. A., Garçon, D. P., Pinto, M. R., Mantelatto, F. L., & McNamara, J. C. (2014). *The Journal of Membrane Biology* **2014**, 248(2), 257–272. doi:10.1007/s00232-014-9765-6.
- 28- Parreira, G. M., Faria, J. A., Marques, S. M. S., Garcia, I. J. P., Silva, I. F., De Carvalho, L. E. D., de Lima Santos, H. *The Journal of Membrane Biology* **2021**, 254(2), 189–199. doi:10.1007/s00232-021-00173-2
- 29- Peković S, Nedeljković N, Nikezić G, Horvat A, Stojiljković M, Rakić L, Martinović JV. *Gen Physiol Biophys* **1997**. Sep; 16(3):227-40. PMID: 9452945.
- 30- Sengupta T. M. Mukherjee C. Mandal, T. Mukherjee, & H.K. Majumder. *Biochemical Journal* **2005**, 390(2), 419–426. Doi: 10.1042/bj20042128.
- 31- Farias D. L Farias, M. N. Lucena, D. P. Garçon, F. L. Mantelatto, J. C. McNamara & F. A. Leone. *The Journal of Membrane Biology* **2017**, 250(5), 517–534. Doi: 10.1007/s00232-017-9978-6.

- 32- Hansson E, Rönnbäck L, Persson LI, Lowenthal A, Noppe M, Alling C, Karlsson B. *Brain Res* **1984**, May 21;300(1):9-18. doi: 10.1016/0006-8993(84)91335-0. PMID: 6733469.
- 33- Horvat A, Momić T, Petrović S, Nikezić G, Demajo M. *Physiol Res*, **2006**. ;55(3):325-38. Epub 2005 Aug 5. PMID: 16083303.
- 34- De Lima Santos, H., & Ciancaglini, P. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2003**, 135(3), 539–549. doi:10.1016/s1096-4959(03)00139-8
- 35- Blanco, G., Sanchez, G., & Mercer, R. W. *Biochemistry*, **1994** 34(31), 9897–9903. doi:10.1021/bi00031a011
- 36- Blanco, G., Koster, J. C., Sanchez, G., & Mercer, R. W. *Biochemistry*, **1995** 34(1), 319–325. doi:10.1021/bi00001a039
- 37- Apell, H.-J., Hitzler, T., & Schreiber, G. *Biochemistry* **2017**, 56(7), 1005–1016. doi:10.1021/acs.biochem.6b01243
- 38- Wall SM. *Miner Electrolyte Metab* **1996**. 22(5-6):311-7. PMID: 8933502.