



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS DO MAR E DO AMBIENTE

**CONTRIBUIÇÃO DE DECAVANADATO PARA OS EFEITOS *in vivo*
E *in vitro* DE VANADATO NO MÚSCULO CARDÍACO**

(Tese para a obtenção do grau de doutor no ramo de Biologia, especialidade
de Fisiologia Animal)

SANDRA SOFIA GANCHAS SOARES

Orientadora: Prof.^a Doutora Josefina Coucelo

Co-orientadores: Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves
Prof. Doutor Carlos Gutiérrez-Merino

Constituição do Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Pedro Andrade

Vogais: Doutor Carlos Gutiérrez-Merino

Doutor Fernando Henao Dávila

Doutora Maria Leonor Quintais Cancela da Fonseca

Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves

Doutor Manuel Aureliano Pereira Martins Alves

Doutor Jorge Manuel Martins

FARO

(2007)



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS DO MAR E DO AMBIENTE

**CONTRIBUIÇÃO DE DECAVANADATO PARA OS EFEITOS *in vivo*
E *in vitro* DE VANADATO NO MÚSCULO CARDÍACO**

(Tese para a obtenção do grau de doutor no ramo de Biologia, especialidade
de Fisiologia Animal)

SANDRA SOFIA GANCHAS SOARES

Orientadora: Prof.^a Doutora Josefina Coucelo

Co-orientadores: Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves
Prof. Doutor Carlos Gutiérrez-Merino

Constituição do Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Pedro Andrade

Vogais: Doutor Carlos Gutiérrez-Merino

Doutor Fernando Henao Dávila

Doutora Maria Leonor Quintais Cancela da Fonseca

Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves

Doutor Manuel Aureliano Pereira Martins Alves

Doutor Jorge Manuel Martins

FARO

(2007)

Sandra Sofia Ganchas Soares recebeu financiamento (bolsa de doutoramento SFRH/BD/8615/2002) da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), de Janeiro de 2003 a Dezembro de 2006.

O conteúdo desta tese é da exclusiva responsabilidade da autora

Bandra Sônia Gonçalves Soares

*Aos meus pais, à Rita e ao Carlos,
meus portos de abrigo*

*“Escolher um caminho significa abandonar outros.
Querer percorrer todos os caminhos possíveis
é acabar por não percorrer nenhum.”*

Paulo Coelho, 1991

Agradecimentos

Quem me conhece sabe que reservo sempre o melhor para o fim e, como não poderia deixar de ser, esta foi a tarefa que deixei para o final... Ainda que seja suposto ao longo de um doutoramento trilharmos o nosso próprio caminho, cada passo que damos encontra-se suportado pelo sorriso e apoio daqueles que nos acompanham nesta caminhada. É a todos esses “colegas” de percurso que quero expressar o meu sincero agradecimento:

À Prof.^a Doutora Josefina Coucelo, minha orientadora, gostaria de agradecer a oportunidade que me concedeu de desenvolver os meus estudos no laboratório de Fisiopatologia. Só deste modo, pude vivenciar a experiência de ser um “elo” da corrente de amizade, companheirismo e cumplicidade que é o GFCC. Nunca esquecerei o berço onde despertei para a ciência!

Ao Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves, meu co-orientador, o meu profundo agradecimento pela forma como me estimulou a enveredar nos meandros “vanadísticos” (ou melhor, “decavanadísticos”), pela disponibilidade e empenho com que acompanhou a minha evolução não só no campo científico como pessoal, mas sobretudo pelo apoio, simpatia, amizade, preocupação e paciência demonstrados ao longo destes já 7 anos de convivência. O meu percurso científico, profissional e pessoal estará para sempre associado aos muitos “pontos de caramelo” que partilhámos. Segundo um provérbio chinês, “os professores abrem a porta, mas tens de entrar sozinho”. Obrigada por me ter aberto a porta!

Ao Prof. Doutor Carlos Gutiérrez-Merino, meu co-orientador em terras de *nuestros hermanos*, o meu mais sincero agradecimento! O culminar deste percurso só foi possível graças ao seu empenho e dedicação e à forma sábia com que orientou esta tese. A oportunidade que me foi proporcionada de poder “beber” parte do seu conhecimento foi uma experiência ímpar no meu percurso científico. A sua sábia orientação, a sua generosidade na transmissão de conhecimentos, a sua paciência e serenidade e a sua postura perante a ciência e a vida, foram determinantes para a concretização desta etapa da minha formação e serão um marco na minha vida. Obrigada por me ter permitido passar momentos únicos de enriquecimento científico e pessoal na sua companhia. *¡Gracias también por las tapas e otras delicias gastronómicas castellanas que me a dado a conocer!*

Ao Prof. Doutor Fernando Heno Dávila, meu mestre na “arte” da cultura celular, um agradecimento muito especial por me ter acolhido tão generosa e espontaneamente não só no âmbito científico como também no seio da sua família. Tenho SAUDADES dos momentos inesquecíveis que vivemos *en los días de preparación* e pelas conversas multilíngue em torno da *campana* e durante a *merenda*. *Merci Fernando, port tout! Je n’oublierai jamais le plaisir et la chance de travailler avec toi, et je t’attends au Portugal, d’accord?*

Ao Rui Duarte, pela preciosa e indispensável contribuição na obtenção dos espectros de RPE no Departamento de Química (REQUIMTE) da Universidade Nova de Lisboa.

À Dr.^a Maria do Rosário Caras Altas, pela excelente assistência técnica na obtenção e “construção” dos espectros de RMN, no Departamento de Química da Universidade Nova de Lisboa.

Ao Dr. Hélio Martins, técnico superior da FCT, quero agradecer não só pelas análises de EAA para a quantificação de cádmio e vanádio, mas principalmente pelas conversas que tanto valorizaram os momentos passados na companhia daquele espectrofotómetro caprichoso...

À D. Cristina, de sorriso constante, que alimentou os meus charcos e as minhas douradas, fazendo de tudo para tornar aprazível o seu curto período de existência em cativeiro.

Não posso deixar de agradecer a ajuda imprescindível dos pescadores e mergulhadores (“Campanha *Halobatrachus*”) na obtenção dos charcos utilizados ao longo deste trabalho, assim como ao pessoal da Timar, Eurodáqua e Aqualvor pela forma imediata com que se disponibilizaram a fornecer as douradas necessárias ao longo deste estudo (e foram algumas...).

Ao GFCC de ontem, hoje e de sempre: Prof.^a Josefina, Natércia, Gisela, Andrea, Paulinha, Patrícia, Paulo, Inês, Rita, Sara, Mariana, João e Cláudia, o meu sincero e sentido agradecimento por toda a alegria, apoio e amizade, assim como pelos desafios científicos partilhados. O dia-a-dia laboratorial fez desenvolver e fortalecer laços no seio desta equipa que espero manter ao longo de toda a minha vida. Sejam felizes! Gisela, espero que o reencontro esteja para breve! Sara (e inseparável André), obrigada pela amizade, apoio, partilha de sonhos e viagens mentais a paragens que, quem sabe um dia... não percas nunca essa energia inesgotável (qual é mesmo o teu segredo??).

Ao laboratório 3.31, Prof. Aureliano, Prof. Jorge, Teresa, Ana, Susana, Ofélia, Ricardo (e Amy), Dorinda, André, Miguel e Dalila e a todos que por lá passaram e que comigo partilharam experiências, alegrias, e às vezes tristezas, desta vida dedicada à ciência, obrigada por terem adoptado esta bióloga. Susana, teremos sempre Aveiro! Ofélia, espero que encontres a bússola da tua vida. Miguel, obrigada pelos conselhos informáticos e pelas agradáveis conversas e teorias sobre as “nossas” séries. Ana, tu és única em todos os sentidos, não deixes nunca de ser como és: dedicada, amiga, voluntariosa e de bem com a vida, continua sempre a sorrir. Obrigada a todos pelo apoio e paciência que demonstraram nesta última fase, em que o stresse e os nervos me fizeram falar pelos cotovelos... não deve ter sido fácil, admiro a vossa resistência! Rute, Sandra e *baby* Afonso, vizinhas de laboratório e companhia de lanches e jantaras, também a vocês tenho a agradecer o apoio transmitido e a paciência demonstrada em aturar esta tagarela. Sejam muito felizes aqui e/ou para lá do Atlântico (Rute, nunca te esqueças como o mundo é pequeno...)!

Nem sempre o companheirismo evolui para amizade, mas quando assim é, a relação invariavelmente já criou raízes tão fortes que dificilmente o tempo ou a distância quebrarão. À Teresa, amiga e companheira aqui e além fronteiras, e ao seu cônjuge (Pedro) obrigada por me terem feito sentir vossa amiga desde

sempre. Pedro, obrigada pelas sobremesas que já partilhamos e ainda poderemos vir a partilhar (o *cheesecake* não está esquecido)!

À minha *familia científica española* da *Universidad de Extremadura*, Carlos, Fernando, Javier, Miguel Ángel, Alejandro, Yolanda, Ascen, Carolina, María, Fran, Sonia, Auri, Lali, Toni e Chema *muchas gracias por todas las sonrisas, por las cenas y las copas. Con vosotros, lo tiempo que me a quedado en Badajoz ha sido una buena experiencia que tengo a recordar. Besos a todos.*

A minha gratidão vai também para a Universidade do Algarve e *Universidad de Extremadura*, (não esquecendo o *Servicio de Animalario*) em nome de todos os professores, técnicos e funcionários, que constituíram parte integrante desta etapa construtiva da minha vida. Não me esqueci de ti, Beatriz, obrigada pelas curtas mas profundas conversas de “fugida”.

As verdadeiras amigas estão sempre lá, não é?! À minha amiga Rita, que esteve sempre por perto (mesmo que à distância de um telefonema), por toda a amizade, palavras de encorajamento e conforto, apoio e paciência ao longo de já quase uma vida, mas principalmente ao longo desta fase tão importante (e absorvente) na minha vida, em que nem sempre estive por perto e disponível. Sê feliz! O Jorge que me aguarde, pois quando tiver tempo vamos combinar uns passeios a cavalo, contigo incluída (prometo que vou tentar convencer o Carlos).

À “maluka” da Paula pela sua alegria e boa disposição contagiantes, pela sua “loucura” saudável, obrigada pelas “conversinhas” de Ano Novo e pelas gargalhadas sinceras que me provocas. Continua assim! Como tem sido difícil encontrarmo-nos pelos “Algarves” em 2008 vou te cobrar o serviço de guia turístico à Tailândia, não escapas...

Rui, meu eterno padrinho, mereces toda a minha admiração e carinho, muito obrigada pelas conversas, pelo apoio, pelos sábios conselhos e pelos sorrisos sinceros com que SEMPRE me brindaste. Mereces ser muito feliz e estou certa que o serás! Obrigada pela companhia em viagens transatlânticas e por me ajudares a aturar a Zélia (brincadeirinha!!!). Zélia e Joca, a festa está prometida! Espero que possamos continuar a regar esta nossa amizade para não deixar desaparecer esta empatia que tão espontaneamente surgiu. *Good luck and be strong (you know what I mean)!*

E quem somos nós, sem os pilares estruturais que são a nossa família? Quero agradecer aos meus pais, a quem devo toda a minha vida, tudo o que hoje sou, a minha coragem e determinação deles advém. Pelo apoio imensurável que sempre demonstraram, pelo incentivo e confiança incondicionais e absolutos, por me terem feito sempre acreditar que seria capaz, a vocês dedico esta tese... Amo-vos!

Rita, mana, obrigada pela cumplicidade, apoio e amizade incondicionais. Estiveste sempre presente em todas as decisões importantes da minha vida e... sempre a apoiar-me. Terás sempre a minha amizade, carinho e apoio “até ao infinito e mais além”! Recordo com saudade os tempos de vida académica que

partilhámos, longe do ninho dos pais. O vento mudou e voaste em busca dos teus sonhos para outras paragens. No entanto, ainda que esteja longe fisicamente, estarei sempre perto em pensamento e podes contar com o meu apoio e incentivo constantes. Desejo-te a maior felicidade do mundo!

E foi graças à minha irmã que conheci o João, o meu cinéfilo de eleição. Obrigada pelo humor; pelas gargalhadas; pelo apoio e amizade; pelos jantares temáticos; pela tua arte de bem desenhar e animar, que tanto admiro; pelos filmes; pelas conversas sobre ciência, ou talvez não... Enfim, és uma pessoa quase perfeita, quase... só te falta gostar de queijo!

Uma vez mais, o melhor ficou para o fim. *Last, but not the least!* Carlos, estarei sempre em dívida para contigo. Pelas horas de espera; pelas “secas” no laboratório ou no carro, quando era suposto eu não demorar mais de 5 min; pelo trabalho que levei para casa; por ter feito também do laboratório a minha casa; pelas temporadas que te deixei só e rumei além fronteiras; pelas férias que não existiram; pelos fins-de-semana que não foram de lazer; pelas folgas que passaste à minha espera; pelos supostos momentos de lazer em que eu puramente não conseguia “desligar” do trabalho... por tudo isto, e pelo que já esqueci, o meu profundo agradecimento. Obrigada por todo o encorajamento, pelo apoio constante, pela imensa paciência, por nunca teres deixado de estar presente e de acreditar em mim e nas minhas potencialidades e pelo amor incondicional que tens demonstrado ao longo destes últimos 4 anos, hoje e sempre! Creio não conseguir exprimir com exactidão em palavras o amor, carinho e a admiração que nutro por ti... no entanto, tento demonstrá-los diariamente (ainda que às vezes só me seja possível à distância). Continua a ser como és, especial! Amo-te.

Quem passa por estas “andanças” sabe avaliar o quanto uma tese de doutoramento se mescla com a nossa vida pessoal. São incontáveis os momentos que são roubados à nossa vida pessoal e ao convívio com aqueles que prezamos. No entanto, admiravelmente essas pessoas estão sempre lá, com a sua mão amiga, um sorriso de apoio, um carinho, um conforto. A todos vós, os que eu amo, e que sofreram com o meu empenho e dedicação (e às vezes, espírito de sacrifício), não encontro as palavras certas para expressar o meu agradecimento... Obrigada por terem voluntariamente partilhado as alegrias e os contratempos resultantes desta minha jornada. A todos vocês dedico esta tese.

Muitos outros houve que me ajudaram e cujos nomes, apesar de não constarem nestes agradecimentos, o meu coração não deixa esquecer. A todos vocês, amigos, colegas e conhecidos que não estão mencionados e que de alguma forma contribuíram para a minha formação, o meu sincero muito obrigada!

Apresentação da dissertação

Os estudos apresentados na presente dissertação para obtenção do grau de Doutor em Biologia na especialidade de Fisiologia Animal, pela Universidade do Algarve, resultam do trabalho de investigação desenvolvido entre 2003 e 2006. Os estudos desenvolvidos ao longo deste período foram realizados no CCMAR, Departamento de Ecologia e Recursos Vivos, Laboratório de Fisiopatologia do Grupo de Fisiologia Cardiovascular Comparada, da Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidade do Algarve, sob a orientação da Prof.^a Doutora Josefina Coucelo; CCMAR, Departamento de Química, Bioquímica e Farmácia, Laboratório de Bioquímica – Bioenergética, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, sob a orientação do Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves; e, no *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Laboratorio de Bioquímica*, da *Facultad de Ciencias da Universidad de Extremadura* (Badajoz – Espanha), sob a orientação do Prof. Doutor Carlos Gutiérrez-Merino. Os estudos realizados com culturas celulares, realizados na *Universidad de Extremadura*, decorreram também sob supervisão do Prof. Doutor Fernando Henao Dávila. Os estudos foram financiados pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, nomeadamente através da atribuição da bolsa de doutoramento SFRH/BD/8615/2002 e do projecto POCTI/QUI/38191, e pela bolsa conjunta Espanhola-Portuguesa HP2004-0080.

O tema central desta tese consiste na avaliação dos efeitos promovidos pelo vanadato decamérico no músculo cardíaco. Com esse objectivo, apresentam-se os estudos realizados para a (i) avaliação dos efeitos induzidos pela administração *in vivo* de diferentes espécies oligoméricas de vanadato, ao nível da distribuição subcelular, stresse oxidativo e respostas do sistema de defesa antioxidante; (ii) determinação dos

efeitos *in vitro* de vanadato na bioenergética mitocondrial; e, (iii) toxicidade induzida por oligovanadatos em culturas primárias de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos.

Esta dissertação encontra-se dividida em sete secções. O Capítulo 1, consiste numa breve introdução para contextualização do tema dos estudos apresentados. A secção seguinte (Capítulo 2) apresenta a caracterização e estudo da estabilidade das soluções de vanadato nas diferentes condições experimentais dos estudos realizados. Os Capítulos 3 a 5 apresentam as diferentes abordagens realizadas para o estudo dos efeitos promovidos pela espécie decamérica de vanadato no músculo cardíaco. Deste modo, no Capítulo 3, é apresentado o padrão de distribuição subcelular de vanádio no sangue e músculo cardíaco, assim como a produção de espécies reactivas de oxigénio, peroxidação lipídica e as respostas do sistema de defesa antioxidante (actividade de enzimas antioxidantes e conteúdo em glutatona) após administração *in vivo* de concentrações sub-letais de soluções de decavanadato e metavanadato. No Capítulo 4, procede-se à comparação do efeitos das duas soluções de vanadato no consumo de oxigénio e no potencial da membrana mitocondrial, apurando-se o local e a natureza da acção das espécies oligoméricas de vanadato na cadeia respiratória de mitocôndrias isoladas. No Capítulo 5, explora-se a contribuição dos diferentes oligovanadatos para a citotoxicidade cardíaca, avaliada em culturas primárias de miócitos cardíacos de ventrículos de ratos recém-nascidos expostas às respectivas soluções de vanadato. As conclusões gerais dos estudos apresentados nesta dissertação e as perspectivas de futuras abordagens ao tema são apresentadas no Capítulo 6. Por último, o Capítulo 7 apresenta as referências bibliográficas utilizadas para a contextualização do tema em estudo, para o estabelecimento das técnicas e protocolos adoptados e para a interpretação e discussão dos resultados obtidos.

Os estudos realizados nestes quatro anos de investigação, foram publicados em cinco artigos e dois capítulos, encontrando-se submetido para publicação um artigo e estando prevista a submissão de mais três artigos:

1. Gândara, R.M.C.; **Soares, S.S.**; Martins, H.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2005). *Vanadate oligomers: In vivo effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers. J. Inorg. Biochem.* 99: 1238-1244.
2. **Soares, S.S.**; Martins, H.; Aureliano, M. (2006). *Vanadium distribution following decavanadate administration. Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 60-64.
3. **Soares, S.S.**; Martins, H.; Duarte, R.O.; Moura, J.J.G.; Coucelo, J.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007). *Vanadium distribution, lipid peroxidation and oxidative stress markers upon decavanadate in vivo administration. J. Inorg. Biochem.* 101: 80-88.
4. **Soares, S.S.**; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007). *Decavanadate induces mitochondrial membrane depolarization and inhibits oxygen consumption. J. Inorg. Biochem.* 101: 789-796.
5. **Soares, S.S.**; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007). *Mitochondria as a target for decavanadate toxicity in Sparus aurata heart. Aquat. Toxicol., in press.*
6. Aureliano, M.; **Soares, S.S.**; Tiago, T.; Ramos, S.; Gutiérrez-Merino, C. (2007). *Biological effects of decavanadate: muscle contraction, mitochondrial toxicity and in vivo oxidative stress. ACS Symposium Series, in press.*

7. **Soares, S.S.**; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007). *Decavanadate toxicity effects following in vivo administration*. In: Aureliano, M. (Ed.), *Vanadium compounds/vanadate oligomers in biological systems: Chemistry, Biochemistry and Biological effects*, Research Signpost, India. Aceite para publicação.
8. **Soares, S.S.**; Henao, F.; Aureliano, M.; Gutiérrez-Merino, C. (2007). *Vanadate-induced necrotic death in neonatal rat cardiomyocytes through mitochondrial membrane depolarization*. *J. Inorg. Biochem.* 101: 789-796.
9. **Soares, S.S.**; Joaquim, N.; Coucelo, J.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007). *Vanadium and cadmium in vivo comparative effects in oxidative stress on the cardiac muscle*. Submetido para publicação.
10. **Soares, S.S.**; Duarte, R.O.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007). *Decavanadate reduction in mitochondrial studies*. A ser submetido para publicação.
11. **Soares, S.S.**; Aureliano, M. (2007). *Decavanadate in vivo toxicity*. A ser submetido para publicação.

Para além dos estudos publicados em revistas internacionais, parte do trabalho descrito nesta dissertação foi apresentado em vários congressos científicos, sob a forma de painel e comunicação oral:

Comunicações orais

1. **Soares, S.S.**; Aureliano, M.; Josefina, C.; Gutiérrez-Merino, C. (2006). *Cardiac mitochondria as a major target of decavanadate*. *VIIth International*

Congress on the Biology of Fish, St. John's – Terra Nova, Canadá (18 a 22 de Julho).

2. **Soares, S.S.**; Coucelo, J.; Aureliano, M.; Gutiérrez-Merino, C. (2005). *Mitochondria as a potential target of vanadium toxicity. 6º Congreso Ibérico y 3º Iberoamericano de Contaminación y Toxicología Ambiental*, Cádiz, Espanha (25 a 28 de Setembro). (**Premio “Jóvenes Científicos”: Mejor Comunicación Oral**)
3. **Aureliano, M.**; **Soares, S.S.**; Gutiérrez-Merino, C.; Gândara, R.; Sousa, A.; Martins, H.; Figueiredo, I.; Borges, G.; Joaquim, N.; Coucelo, J.M. (2004). *Vanadate oligomers contribution to vanadium toxicity. The 4th International Symposium on Chemistry and Biological Chemistry of Vanadium*, Szeged, Hungria (3 a 5 de Setembro).
4. **Soares, S.S.**; Gândara, R.; Borges, G.; Joaquim, N.; Martins, H.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M.; Coucelo, J. (2004). *Oxidative stress on the cardiac muscle of the Lusitanian toadfish: cadmium and vanadium in vivo effects. VI International Congress on the Biology of Fish*, Tropical Hotel Manaus Conference Center, Manaus, Brasil (1 a 5 de Agosto). (**Best Student Talk Presentation Award**)

Comunicações em painel

1. **Soares, S.S.**; Henao, F.; Aureliano, M.; Gutiérrez-Merino, C. (2006). *Effects of decavanadate in cardiac myocytes. 5th International Symposium on Chemistry and Biological Chemistry of Vanadium*, São Francisco, Califórnia, EUA (10 a 14 de Setembro) (**Poster Presenter Award**)

2. **Soares, S.S.**; Coucelo, J.; Aureliano, M.; Gutiérrez-Merino, C. (2006). *Decavanadate effects on cardiac and hepatic mitochondria*. Eurobic8, Universidade de Aveiro, Aveiro (2 a 6 de Julho).
3. **Soares, S.S.**; Palma, M.; Barrento, S.; Joaquim, N.; Coucelo, J.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2004). *Reactive oxygen species production as a tool to evaluate oxidative stress induced by vanadium (V): an in vivo study*. XIV Congresso Nacional de Bioquímica, Vilamoura (2 a 4 de Dezembro).
4. **Gândara, R.**; **Soares, S.S.**; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2004). *Vanadate oligomers toxicity: in vivo effects in overall oxidative stress markers*. XIV Congresso Nacional de Bioquímica, Vilamoura (2 a 4 de Dezembro).
5. **Soares, S.S.**; Martins, H.; Aureliano, M. (2004). *Vanadium distribution dependence on vanadate solutions administration in fish cardiac muscle*. *The 4th International Symposium on Chemistry and Biological Chemistry of Vanadium*, Szeged, Hungria (3 a 5 de Setembro).
6. **Soares, S.S.**; Barrento, S.; Palma, M.; Borges, G.; Joaquim, N.; Aureliano, M.; Coucelo, J. (2004). *Oxidative stress in the heart and liver of Sparus aurata (gilthead seabream): In vivo meta and decavanadate effects*. VI *International Congress on the Biology of Fish, Tropical Hotel Manaus Conference Center*, Manaus, Brasil (1 a 5 de Agosto).
7. **Soares, S.S.**; Joaquim, N.; Martins, H.; Coucelo, J.; Aureliano, M. (2003). *Cadmium and vanadium acute effects on fish cardiac muscle*. *1st Luso-Spanish Congress on Free Radicals & 6th Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine*, Universidade de Coimbra, Coimbra (4 a 6 de Dezembro).

8. **Soares, S.S.**; Gândara, R.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2003). *Oxidative stress in fish cardiac muscle: vanadate effects. 1st Luso-Spanish Congress on Free Radicals & 6th Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine*, Universidade de Coimbra, Coimbra (4 a 6 de Dezembro).
9. **Gândara, R.**; **Soares, S.S.**; Martins, H.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2003). *Vanadate oligomers: in vivo effects in liver stress markers. 1st Luso-Spanish Congress on Free Radicals & 6th Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine*, Universidade de Coimbra, Coimbra (4 a 6 de Dezembro).
10. **Soares, S.S.**; Joaquim, N.; Martins, H.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M.; Coucelo, J. (2003). *Oxidative stress induced by cadmium and vanadate oligomers in fish cardiac muscle. II Encontro do CIMAR – L.A., Estação Zootécnica Nacional, Vale de Santarém (7 a 8 de Novembro)*.

NOME: Sandra Sofia Ganchas Soares
FACULDADE: Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente
ORIENTADORA: Prof.^a Doutora Josefina Coucelo
CO-ORIENTADORES: Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves
Prof. Doutor Carlos Gutiérrez-Merino
DATA: 16 de MAIO, 2007
TÍTULO DA TESE:

CONTRIBUIÇÃO DE DECAVANADATO PARA OS EFEITOS *in vivo* E *in vitro* DE VANADATO NO MÚSCULO CARDÍACO

RESUMO

No presente estudo aborda-se a contribuição da espécie decamérica de vanadato nos efeitos tóxicos *in vivo* e *in vitro* de vanadato. Após administração intravenosa de decavanadato em *Sparus aurata*, o vanadato decamérico induz respostas nos marcadores de stresse oxidativo do tecido cardíaco distintas das promovidas pelo monovanadato, evidenciando a importância de considerar a contribuição dos diferentes oligómeros de vanadato para a toxicidade *in vivo* de vanadato. Quando administrado na forma de vanadato decamérico, a acumulação de vanádio na mitocôndria sugere este organelo como potencial alvo da toxicidade de vanadato. Estudos *in vitro* demonstraram que o vanadato decamérico é um potente agente despolarizador da membrana mitocondrial e inibidor do consumo de oxigénio, para além de impedir a repolarização da membrana mitocondrial, em mitocôndrias de coração de peixe e fígado de rato. Verificou-se também que o vanadato decamérico afecta a bioenergética mitocondrial bloqueando a cadeia transportadora de electrões da mitocôndria. Em cardiomiócitos, descreve-se a despolarização da membrana mitocondrial como um evento precursor de morte celular necrótica induzida por vanadato. Conclui-se que, o vanadato decamérico induz efeitos diferentes dos promovidos do monovanadato nos sistemas biológicos, através de diferentes mecanismos, contribuindo, pelo menos em parte, para os efeitos tóxicos induzidos por vanadato na mitocôndria.

Palavras-chave: decavanadato; vanadato; coração; cardiomiócitos; mitocôndria; despolarização da membrana mitocondrial.

DECAVANADATE CONTRIBUTION TO *in vivo* AND *in vitro* VANADATE EFFECTS ON CARDIAC MUSCLE

ABSTRACT

Contribution of decameric vanadate to vanadate toxic effects was studied not only *in vitro* but also *in vivo*. Following an intravenous administration of a decavanadate solution in *Sparus aurata* it is suggested that decameric vanadate has a different response pattern on oxidative stress markers of cardiac tissue than monovanadate, pointing out that the differential contribution of vanadate oligomers should be taken into account to rationalize *in vivo* vanadate toxicity. Moreover, vanadium accumulation in mitochondria, in particular when decameric vanadate is administered, indicates this subcellular organelle as a potential target of vanadate toxicity effects. In fact, *in vitro* studies showed that decameric vanadate is a stronger mitochondrial depolarization agent as well as inhibitor of oxygen consumption, besides affecting mitochondrial membrane repolarization, in fish cardiac and rat hepatic isolated mitochondria. It was also observed that decameric vanadate alters mitochondrial bioenergetics by inducing changes in the redox steady-state of *b*-type cytochromes and blocking mitochondrial electron transport chain. In cardiomyocytes, mitochondrial membrane depolarization is reported as an early event of vanadate-induced necrotic cell death. It is concluded that, when compared to monovanadate, decameric vanadate affects differently biological systems by different mechanisms and contributes, at least in part, for vanadate toxic effects on mitochondria.

Key-words: decavanadate; vanadate; heart; cardiomyocytes; mitochondria; mitochondrial membrane depolarization.

Abreviaturas e Símbolo

Å	Angstroms
AMP	adenosina 5'-monofosfato
ADP	adenosina 5'-difosfato
Ara-C	citocina-β-D-arabinofuranosido
A-SCS	sintetase de succinil-CoA
ATP	adenosina 5'-trifosfato
ATPase	adenosina 5'-trifosfatase
BP	pressão sanguínea
2,3-BPG	2,3-bifosfoglicerato
BSA	albumina de soro bovino
[Ca ²⁺] _i	concentração de Ca ²⁺ livre intracelular
CAT	catalase
C.E.	carga energética
CI	contractilidade ventricular
CM	cardiomiócitos
CPA	ácido ciclopiazónico
CsA	ciclosporina A
Da	dalton
DHE	dihidroetídio
DIV	dia <i>in vitro</i>
DMBA	7,12-dimetilbenz(a)antraceno
DMEM	meio de crescimento <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
DO	densidade óptica
DPN	2,4(α)-dinitrofenol
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
DTT	ditiotreitól
EAA	espectroscopia de absorção atómica
ECM	matriz extracelular
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	ácido etilenoglicol-bis(β-aminoetileter)N,N,N',N'-tetra-acético
EPR	espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica

Abreviaturas e Símbolos

FB	fibroblastos
FCCP	carbonil cianeto de <i>p</i> -trifluormetoxifenilhidrazona
FCS	soro fetal de bovino
Fura-2 AM	Fura-2 acetoximethyl éster
g	força da gravidade
G6PDH	desidrogenase de glucose-6-fosfato
GPx	peroxidases da glutaciona
GR	redutase da glutaciona
GSH	glutaciona reduzida
H ₂ DCFDA	diacetato de dihidroclorofluoresceína
HEPES	ácido (N-2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano sulfônico
HK	hexocinase
HMW	padrão de elevada massa molecular
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogénio
HR	frequência cardíaca
HS	soro de cavalo
Hz	ciclos por segundo (hertz)
IC ₅₀	concentração inibitória, 50%
IDH	desidrogenase de isocitrato
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
IU	quantidade de enzima que liberta 1 µmol de produto por minuto
i.v.	intravenosa
J	joule
JC-1	iodeto 5,5',6,6'-tetracoloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianeto
K _d	constante de dissociação
LC ₅₀	concentração letal, 50%
LD ₅₀	dose letal, 50%
LDH	desidrogenase de lactato
MDA	ácido malonaldeído
MCR	massa cardíaca relativa
MES	ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico
MMTP	poro de transição da membrana mitocondrial
MRC	material de referência certificado

MTT	brometo de 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MVR	massa ventricular relativa
NAD ⁺	nucleótido de nicotinamida adenina (forma oxidada)
NADH	nucleótido de nicotinamida adenina (forma reduzida)
NADP ⁺	nucleótido de nicotinamida adenina fosfato (forma oxidada)
NADPH	nucleótido de nicotinamida adenina fosfato (forma reduzida)
NBT	nitro <i>blue</i> tetrazólio
NF κB	cinase activadora do factor nuclear κB
nm	nanometros
O ₂ ⁻	anião superóxido
·OH	radical hidróxilo
PARP	poli-(ADP-ribose)polimerase
PCA	ácido perclórico
PEP	fosfoenolpiruvato
P _i	ortofosfato (sem especificar o estado de protonação)
Pipes	piperazina-N,N'-bis(ácido 2- etanosulfónico)
PK	cinase de piruvato
ppb	partes por bilião
ppm	partes por milhão
RBC	eritrócitos
RCR	razão do controlo respiratório
RMN	ressonância magnética nuclear
ROH	álcoois resultantes da redução de peróxidos lipídicos
ROOH	peróxidos lipídicos
ROS	espécies reactivas de oxigénio
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
RyR2	receptor de rianodina, isoforma cardíaca
SDS	dodecil sulfato de sódio
Se-GPx	peroxidase da glutatona dependente de selénio
SERCA	ATPase de cálcio do retículo sarco(endo)plasmático
SERCA-2	ATPase de cálcio do retículo sarco(endo)plasmático, isoforma cardíaca
SOD	dismutase de superóxido
t _{1/2}	tempo de meia-vida

Abreviaturas e Símbolos

TAPS	ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropano sulfónico
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	espécies reactivas tiobarbitúricas
TCA	ácido tricloroacético
TG	tapsigargina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
TMRE	éster de etil tetrametilrodamina
TORT-2	material de referência marinho para metais vestigiais
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
U	quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a reacção
u.a.	unidades arbitrárias
UV	gama ultravioleta do espectro electromagnético
V _i	ortovanadato (sem especificar o grau de protonação)
Vis	gama visível do espectro electromagnético

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1 – Estruturas de algumas espécies de vanadato: V_1 (VO_4^{3-}), HV_1 (HVO_4^{2-}), V_2 ($V_2O_7^{4-}$), V_{4L} ($V_4O_{13}^{6-}$), V_{4C} ($V_4O_{12}^{4-}$) e V_{10} ($V_{10}O_{28}^{6-}$). Os átomos de vanádio encontram-se representados a amarelo, os de oxigénio a vermelho e os de hidrogénio a cinzento. [Adaptado de Howarth e Jarold (1978) e Amado <i>et al.</i> (1993)].	10
Figura 1.2 – Esquema proposto para os alvos celulares do vanadato decamérico (V_{10}): sugere-se que o V_{10} seja transportado para o meio intracelular através de canais aniónicos (AC) e/ou se ligue a proteínas membranares, assim como se forme após acidificação intracelular; indica-se também a redução do vanadato monomérico (V_1) por acção de agentes antioxidantes e a redução de V_{10} por enzimas, assim como, a ligação do V_{10} a proteínas-alvo que previnam a sua redução; finalmente, propõe-se a acumulação de V_{10} em organelos subcelular, como mitocôndria. [Adaptado de Aureliano e Gândara (2005) e Soares <i>et al.</i> (2007e)].	19
Figura 2.1 – Espécies de vanadato (+5) predominantes em solução aquosa em função do pH. [Adaptado de Chasteen (1983)].	26
Figura 2.2 – Os oligómeros de vanadato podem ocorrer simultaneamente em equilíbrio em soluções aquosas. Oligómeros de vanadato: V_1 , monomérico desprotonado e monoprotonado (HV_1); V_2 , dimérico; V_4 ; tetramérico cíclico; V_{10} , decamérico. A espécie decamérica de vanadato (responsável pela coloração laranja que as soluções de decavanadato apresentam) decompõe-se em vanadato monomérico (soluções incolores), enquanto que as soluções de metavanadato (soluções de coloração amarela ou incolores dependendo da concentração de vanadatos), contêm oxovanadatos lábeis em rápido equilíbrio, tais como V_1 , V_2 e V_4 (cíclico). Nas representações das espécies oligoméricas de vanadato são indicados os átomos de vanádio (●), de oxigénio (○) e de hidrogénio (o). [Adaptado de Howard e Jarold (1973) e Amado <i>et al.</i> (1993)].	29
Figura 2.3 – Parâmetros espectrais de ressonância magnética nuclear. [Adaptado de James (1975)].	34
Figura 2.4 – Parâmetros espectrais de ressonância paramagnética electrónica.....	39
Figura 2.5 – Espectros de absorção de soluções de decavanadato e metavanadato (1 mM vanádio total, a pH 7.0) (A) e respectivas derivadas de 2. ^a ordem do espectro de absorção da solução de decavanadato (B). O espectros foram adquiridos à temperatura de 25 °C.....	47
Figura 2.6 – Espectro UV/visível das soluções de decavanadato (1 mM vanádio total, a pH 7.0), após diluição das soluções concentradas em 0.9% NaCl, em	

função do tempo pós diluição (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h). Os espectros foram adquiridos à temperatura de 25 °C.....	49
Figura 2.7 – Gráfico do ln da absorvência a 400 nm ($\ln \text{Abs}_{400 \text{ nm}}$) em função do tempo (h) para uma solução de decavanadato de 1 mM (vanádio total) após diluição da solução concentrada em 0.9% NaCl. O ensaio decorreu à temperatura de 25 e 37 °C.....	51
Figura 2.8 – Derivadas de 2. ^a ordem (A) de soluções de decavanadato e metavanadato (1 mM vanádio total, a pH 7.0) após diluição das soluções concentradas em 0.9% NaCl (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) e variação dos mínimos obtidos a 358 e 400 nm, após derivação dos espectros, em função do tempo pós diluição (B).....	52
Figura 2.9 – Espectros de RMN do isótopo 51 de vanádio (105.2 MHz), à temperatura ambiente, de soluções concentradas de decavanadato (pH 4.0) (A) e metavanadato (pH 6.7) (B) (50 mM de vanádio total). Todos os espectros foram adquiridos na presença de 10% D ₂ O. V _{10A} , V _{10B} e V _{10C} representam sinais dos átomos de vanádio da espécie decamérica (V ₁₀ O ₂₈ ⁶⁻). Os sinais de RMN V ₁ e V ₂ correspondem, respectivamente, ao vanadato monomérico (VO ₄ ³⁻ , HVO ₄ ²⁻ e H ₂ VO ₄ ⁻) e dimérico (HV ₂ O ₇ ³⁻ e H ₂ V ₂ O ₇ ²⁻), independentemente do estado de protonação; enquanto que, V ₄ e V ₅ correspondem às espécies de vanadato tetramérico cíclico (V ₄ O ₁₂ ⁴⁻) e pentamérico (V ₅ O ₁₅ ⁵⁻), respectivamente.....	54
Figura 2.10 – Composição, em oligómeros de vanadato, das soluções concentradas de decavanadato (50 mM de vanádio total, pH 4.0) e após diluição (1 e 5 mM de vanádio total) no meio de injeção (NaCl 0.9%) (A). Distribuição das espécies oligoméricas de vanadato em função da concentração total de vanádio em soluções de metavanadato (pH 6.7), após diluição para 1 e 5 mM (vanádio total) na solução salina de injeção (NaCl 0.9%) (B).....	56
Figura 2.11 – Espectros de RMN do isótopo 51 de vanádio (105.2 MHz), à temperatura ambiente, de soluções concentradas de decavanadato (pH 7.0) (A e B) e metavanadato (pH 7.0) (C e D) (5 mM de vanádio total) em tampão de respiração mitocondrial (ver Secção 2.3.2.) suplementado com 5 mM piruvato e 0.5 mM malato, na ausência (A e C) e na presença (B e D) de 5 mM glutathiona (GSH). Todos os espectros foram adquiridos na presença de 10% D ₂ O. V _{10A} , V _{10B} e V _{10C} representam sinais dos átomos de vanádio da espécie decamérica. Na presença de GSH, observam-se novos sinais de RMN, C ₁ e C ₂ , no espectro da solução de metavanadato (C e D). Os sinais de RMN V ₁ e V ₂ correspondem, respectivamente, ao vanadato monomérico e dimérico, independentemente do estado de protonação; enquanto que, V ₄ corresponde à espécie de vanadato tetramérico cíclico. C ₁ e C ₂ correspondem a complexos sacarose:vanadato.....	59
Figura 2.12 – Espectros de RMN do isótopo 51 de vanádio (105.2 MHz), à temperatura ambiente, de soluções concentradas de decavanadato (pH 7.0) (A) e metavanadato (pH 7.0) (B) (5 mM de vanádio total) em <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM). Todos os espectros foram adquiridos na presença de 10% D ₂ O. V _{10A} , V _{10B} e V _{10C} representam sinais dos átomos de vanádio da espécie decamérica. Os sinais de RMN V ₁ e V ₂ correspondem, respectivamente,	

ao vanadato monomérico e dimérico, independentemente do estado de protonação; enquanto que, V_4 e V_5 correspondem às espécies de vanadato tetramérico e pentamérico cíclicos..... 61

Figura 2.13 – Espectros de RPE de banda X (9.654 GHz) dos produtos da redução de soluções de decavanadato e metavanadato (1 mM vanádio total) em tampão de respiração mitocondrial (Secção 2.3.2.). Espectros de RPE das soluções de decavanadato (A e B) e metavanadato (C e D), 2 h após incubação com 5 mM glutathiona (agente redutor), na ausência (A e C) ou presença (B e D) de mitocôndrias (2 mg proteína mitocondrial/ml). A frequência de microondas dos espectros experimentais não se encontra calibrada. Espectro de RPE (E), para comparação, de sulfato de vanadilo (1 mM vanádio) no mesmo meio de ensaio.... 64

Figura 2.14 – Absorvência a 700 nm dos produtos da redução das soluções de decavanadato e metavanadato, num meio de reacção contendo: 0.2 M sacarose, 5 mM KH_2PO_4 , 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ e 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 suplementado com 5 mM piruvato e 0.5 mM malato, solução de decavanadato (●) ou metavanadato (○) (1 mM vanádio total) e 5 mM glutathiona (GSH) como agente redutor. Os espectros foram registados, a 700 nm, durante 5 h após a adição de GSH, em intervalos de 2 min. **Caixa:** Espectros, na gama de comprimentos de onda do visível, dos produtos de redução de uma solução de decavanadato, antes (linha a) e 2 h depois da adição de GSH (linha b), e de uma solução de metavanadato, 2 h após adição de GSH (linha c). É apresentado um espectro de sulfato de vanadilo (1 mM, concentração de vanádio usada anteriormente) na mesma solução tampão (linha d), para comparação. A absorvência máxima dos espectros (picos alargados) dos produtos da redução da solução de decavanadato e do sulfato de vanadilo é indicada com setas e o respectivo comprimento de onda..... 68

Figura 2.15 – Concentração de vanadato (μM) na solução de decavanadato (1 mM vanádio total), determinada através da absorvência característica das espécies decaméricas de vanadato registada a 400 nm, em função do tempo após diluição em meio de reacção contendo: 0.2 M sacarose, 5 mM KH_2PO_4 , 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ e 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 suplementado com 5 mM piruvato e 0.5 mM malato e 5 mM glutathiona (GSH). Os espectros foram registados, a 400 nm, durante 210 min após a adição de GSH, em intervalos ≥ 2 min..... 69

Figura 3.1 – Esquema reaccional da redução do citocromo *c* pelos aniões superóxido (O_2^-) gerados pelo sistema hipoxantina-oxidase da xantina (XO)..... 100

Figura 3.2 – Imagens obtidas ao microscópio óptico de eritrócitos de indivíduos *S. aurata* dos grupos Controlo (A) e administrados intravenosamente com soluções de decavanadato (B) e metavanadato (C), corados com corante *Giemsa* (ampliação 1000x)..... 108

Figura 3.3 – Variação da massa cardíaca relativa (A) e massa ventricular relativa (B) em indivíduos da espécie *S. aurata*, 1, 6 e 12 h após a administração intravenosa de soluções de decavanadato (V_{10}) e metavanadato (V_1) (1 mM vanádio total; 1 ml/kg). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 6$)..... 110

- Figura 3.4** – Concentração de vanádio no plasma (A), eritrócitos (B), citosol (C) e mitocôndria cardíaca (D) de indivíduos *S. aurata* ($n = 4$) Controlo e tratados com 5 mM (vanádio total) de soluções de decavanadato (V_{10}) e metavanadato (V_1), após 0, 1, 6 e 12 h de exposição (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$); #significativamente diferente dos indivíduos tratados com V_1 ($p < 0.05$)..... 112
- Figura 3.5** – Concentração de vanádio no plasma (A), eritrócitos (B), citosol (C) e mitocôndria (D) do tecido cardíaco de indivíduos *S. aurata* ($n = 4$) Controlo e tratados com 1 mM (vanádio total) de soluções de decavanadato (V_{10}) e metavanadato (V_1), após 0, 1, 6 e 12 h de exposição (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$)..... 116
- Figura 3.6** – Variação da taxa de produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na mitocôndria cardíaca de *S. aurata* após administração intravenosa (i.v.) de soluções de decavanadato, V_{10} ou metavanadato, V_1 (1 mM vanádio total; 1 ml/kg). A variação foi calculada através do valor basal previamente determinado (Tabela 3.4). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 6$). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$)..... 119
- Figura 3.7** – Variação da actividade da dismutase do superóxido, SOD (A) e da catalase, CAT (B) na mitocôndria cardíaca de *S. aurata*, 1, 6 e 12 h após a administração de soluções de decavanadato (V_{10}) e metavanadato (V_1) (1 mM vanádio total; 1 ml/kg). A variação foi calculada através do valor basal previamente determinado (Tabela 3.4). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 6$). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$)..... 123
- Figura 3.8** – Variação da propagação da peroxidação lipídica no coração de *H. didactylus*, 1 e 7 dias após administração intravenosa (i.v.) *in vivo* de soluções de decavanadato, V_{10} ou metavanadato, V_1 (5 mM vanádio total; 1 ml/kg). A variação foi calculada através do valor basal previamente determinado (Tabela 3.4). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 6$). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$)..... 125
- Figura 3.9** – Variação da propagação da peroxidação lipídica no coração de *S. aurata*, após administração intravenosa (i.v.) de soluções de decavanadato, V_{10} ou metavanadato, V_1 (1 mM vanádio total; 1 ml/kg). A variação foi calculada através do valor basal previamente determinado (Tabela 3.4). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 6$). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$)..... 127
- Figura 3.10** – Conteúdo em glutathiona reduzida (nmol GSH/mg proteína) no tecido cardíaco de *H. didactylus* ($n = 5$) injectados i.v. com 5 mM (vanádio total; 1 ml/kg) de solução de decavanadato (V_{10}) e metavanadato (V_1), 12 e 24 h após administração (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo, $p < 0.05$ 129
- Figura 3.11** – Esquema propondo as vias de acção do vanadato decamérico (V_{10}) na formação de espécies reactivas de oxigénio e dos efeitos induzidos em algumas enzimas envolvidas na defesa antioxidante celular. [Adaptado de Storey

(1996)].....	133
Figura 4.1 – Esquema da reacção do método de enzimas acopladas cinase de piruvato (PK)/desidrogenase de lactato (LDH).....	147
Figura 4.2 – Efeito do vanadato decamérico e monomérico na actividade da F_0F_1 -ATPase da mitocôndria. Efeito da espécie decamérica e monomérica de vanadato (20 μ M vanádio total, nomeadamente 2 μ M espécie decamérica de vanadato) na actividade F_0F_1 -ATPásica (%) da mitocôndria hepática de rato (A) e cardíaca de peixe (B) (15 μ g proteína/ml). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).....	160
Figura 4.3 – Efeitos inibitórios da espécie decamérica (●) e monomérica (○) de vanadato (até 25 μ M vanádio total, nomeadamente 2.5 μ M espécie decamérica de vanadato) na respiração mitocondrial hepática de rato (A) e cardíaca de peixe (B) (2 mg proteína/ml) em piruvato e malato. Consumo de oxigénio (%) (A e B) e razão de controlo respiratório (RCR) (C e D) em mitocôndria hepática (C) e cardíaca (D) em tampão de respiração (Secção 4.2.7.) suplementado com 5 mM piruvato e 0.5 mM malato, como substratos. Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).....	162
Figura 4.4 – Despolarização da membrana mitocondrial induzida por espécies decaméricas e monoméricas de vanadato. Despolarização da membrana mitocondrial em função do tempo de incubação (A) na ausência de uma concentração fisiológica de glutathiona (GSH); despolarização da membrana mitocondrial (%) induzida por espécies decaméricas (●) e monoméricas (○) de vanadato em mitocôndria hepática de rato (B) e cardíaca de peixe (C) (15 μ g proteína/ml), na presença de 5 mM GSH. Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).....	164
Figura 4.5 – Cinéticas de repolarização da membrana mitocondrial. Cinéticas de repolarização da membrana mitocondrial com uma concentração fisiológica (5 mM) de glutathiona (GSH) (▲); repolarização – após indução de despolarização da membrana mitocondrial (15 μ g proteína mitocondrial hepática/ml) – na presença de 1 μ M de espécie decamérica de vanadato (●) ou 100 μ M de vanadato monomérico (○), em tampão de respiração mitocondrial (Secção 4.2.7.) suplementado com 5 mM GSH. Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).....	167
Figura 4.6 – Efeito de oligómeros de vanadato nos níveis de NADH mitocondrial. Conteúdo em NADH (μ M/mg proteína) na mitocôndria cardíaca de peixe (15 μ g/ml) na presença de vanadato decamérico e monomérico (até 20 μ M vanádio total). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).....	169
Figura 4.7 – Taxa de produção de espécies reactiva de oxigénio, nomeadamente anião supéroxido ($O_2^{\cdot-}$), após exposição à espécie decamérica (●) e monomérica (○) de vanadato (até 50 μ M vanádio total), na ausência (A e B) e presença de NADH (C e D) na mitocôndria hepática (A e C) e cardíaca (B e D) (15 μ g proteína/ml). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).....	171

Figura 4.8 – Alterações oxido-reductoras induzidas por vanadatos no espectro dos citocromos da cadeia respiratória. As figuras representam espectros diferenciais de mitocôndria hepática de rato (1 mg proteína/ml) em tampão de respiração mitocondrial (Secção 4.2.7.) na presença de substratos respiratórios (5 mM piruvato + 0.5 mM malato), após subtração dos espectros na ausência de substratos respiratórios (controlo, A). Todos os espectros foram adquiridos num espectrofotómetro de feixe único após incubação das preparações mitocondriais com 20 µM (vanádio total) vanadato decamérico (B) ou monomérico (C). As setas indicam os comprimentos de onda dos picos de absorvência do citocromo <i>b</i> mitocondrial (500-550 nm) [Feldman e Wainio, 1960]. Valores apresentados como média ± desvio (<i>n</i> = 3).....	172
Figura 5.1 – Cinética de redução de MTT a formazan na presença de cardiomiócitos não tratados (3 DIV). Sempre que a absorvência superou o valor 2.0 D.O. diluiu-se a amostra para obtenção de um valor fiável, representando-se no gráfico o valor da medida corrigido pelo factor de diluição utilizado.....	201
Figura 5.2 – Espectro de excitação do Fura-2 na presença de diferentes concentrações de Ca ²⁺ livre ($\lambda_{\text{emissão}}$: 510 nm). Os espectros foram registados na presença de concentrações de saturação de Ca ²⁺ , 1000, 400, 100 nM e na ausência de Ca ²⁺ . [Adaptado de Thomas e Delaville (1991)].....	209
Figura 5.3 – Cardiomiócitos de ratos recém-nascidos (3 DIV) corados com hematoxilina-eosina, que cora núcleo e citoplasma, respectivamente (ampliação 400x).....	217
Figura 5.4 – Detecção da banda correspondente à cadeia pesada de miosina (200 kDa) por imunodeteccção em: marcador de elevada massa molecular (HMW) da <i>Bio-Rad</i> ; lisados de cardiomiócitos (CM) e fibroblastos isolados (FB). Anticorpo anti-cadeia pesada da miosina sarcomérica (diluição 1:100) foi usado como anticorpo primário e peroxidase IgG anti-rato (diluição 1:10000), como anticorpo secundário.....	218
Figura 5.5 – Imunodeteccção de fibroblastos em cultivos de cardiomiócitos com anticorpo anti-Vimentina. Imagens de contraste de fase (A); coloração com anti-Vimentina realizada na presença de 10% soro de cabra (agente bloqueador), Vimentina Ab-2 (clone V9), numa diluição 1:50, como anticorpo primário e IgG-FITC de cabra anti-rato, numa diluição 1:25, como anticorpo secundário (B); coloração de núcleos com DAPI (C); na coluna D apresentam-se as imagens resultantes da sobreposição das imagens das colunas B e C (ampliação 400x). Aproximadamente 90% das células, identificadas através de coloração nuclear com DAPI (C) correspondem a cardiomiócitos (D). Todos os campos registados são representativos de 3 campos tomados em 3 preparações diferentes de cardiomiócitos.....	219
Figura 5.6 – Viabilidade celular estimada pelo ensaio de MTT, em cardiomiócitos (3 DIV) após 12 (A) e 24 h (B) de exposição a espécies decaméricas (V ₁₀) e monoméricas (V ₁) de vanadato numa gama de concentrações de 0-50 µM vanádio total (média ± desvio).....	221

- Figura 5.7** – Imagens pseudocoloridas representativas de cardiomiócitos marcados com Hoechst 33258, representando células controlo (A) e tratadas durante 24 h com 20 μM (vanádio total) com espécies decaméricas (B) e monoméricas (C) de vanadato..... 223
- Figura 5.8** – Viabilidade celular estimada por coloração com iodeto de propídio, em cardiomiócitos (3 DIV) após 24 h de exposição a espécies decaméricas (V_{10}) e monoméricas (V_1) de vanadato numa gama de concentrações de 0-50 μM vanádio total (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$)..... 224
- Figura 5.9** – Concentração de vanádio (ppb V/mg proteína) em cardiomiócitos de ratos recém-nascidos, 24 h após tratamento com soluções de decavanadato (V_{10}) e metavanadato (V_1) numa gama de concentrações de 10-50 μM vanádio total (média \pm desvio). **Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.01$). ***Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.001$)..... 227
- Figura 5.10** – Efeito da exposição a 2 μM espécies decaméricas de vanadato (20 μM vanádio total) na actividade da caspase-3 dos cardiomiócitos, 24 h após tratamento com solução de decavanadato (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$)..... 229
- Figura 5.11** – Efeito da exposição a espécies decaméricas e monoméricas de vanadato nas variações da carga energética dos cardiomiócitos, 24 h após tratamento com concentrações de vanadato decamérico (V_{10}) e monomérico (V_1) de 0-20 μM vanádio total (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$)..... 230
- Figura 5.12** – Efeito da exposição dos cardiomiócitos às soluções de decavanadato e metavanadato (10 μM vanádio total) na homeostasia de Ca^{2+} citosólico (A) e na descarga, induzida por EGTA, das reservas intracelulares de Ca^{2+} (B). Os resultados apresentados (média \pm desvio) representam a média de ensaios em triplicado ($n \geq 20$ células)..... 232
- Figura 5.13** – Cinética de oxidação do DHE (A) por cardiomiócitos Controlo (■) e após 24 h de tratamento com vanadato decamérico, V_{10} (●) e monomérico, V_1 (▲). Os dados cinéticos representam a média de ensaios em triplicado ($n \geq 100$ células, média \pm desvio)..... 236
- Figura 5.14** – Localização da produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em cardiomiócitos marcados com 10 μM H_2DCFDA (A), 2 μM JC-1 (B) e sobreposição das duas imagens (C), denotando produção de ROS (maioritariamente peróxidos de hidrogénio) na mitocôndria..... 238
- Figura 5.15** – Efeito das soluções de decavanadato e metavanadato na fluorescência de cardiomiócitos marcados com JC-1. Os painéis da esquerda e centro representam imagens de fluorescência da sonda agregada (vermelho) e do monómero (verde), respectivamente, no mesmo campo de cultivo; os painéis da direita representam a sobreposição das duas imagens anteriores, nesta situação, a

coloração amarelo/laranja-avermelhado indica a co-localização dos sinais de fluorescência vermelha e verde.....	240
Figura 5.16- Quantificação (média \pm desvio) do número de <i>pixels</i> coloridos das imagens de sobreposição, tal como apresentado na Fig. 5.15 ($n \geq 100$ células, ensaios realizados em triplicado). Os <i>pixels</i> vermelhos foram seleccionados a partir de mitocôndrias polarizadas, os amarelo-alaranjados de mitocôndrias parcialmente despolarizadas e os <i>pixels</i> verdes de mitocôndrias despolarizadas. *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$).....	241
Figura 5.17 – Efeito das soluções de vanadato na fluorescência de cardiomiócitos marcados com TMRE: imagens representativas de cardiomiócitos Controlo (A) e após 24 h de tratamento com 20 μ M vanadato decamérico (B) e monomérico (C).....	242
Figura 5.18 – Variação da intensidade de fluorescência das células marcadas com TMRE em cardiomiócitos previamente tratados, durante 24 h, com espécies decaméricas (●) e monoméricas (○) de vanadato. Os resultados representam a média (média \pm desvio) dos ensaios em triplicados ($n \geq 100$ células).....	243
<hr/>	
Tabela 2.1 – Fórmulas, valores de pKa, desvios químicos, cor e estrutura das principais espécies de vanadato em solução aquosa. [Adaptado de Crans <i>et al.</i> (1990)].....	36
Tabela 2.2 – Valores de largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) registados em vários tipos de coordenação de átomos de vanádio. [Adaptado de Rehder (1982)].....	37
Tabela 2.3 – Valores de tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) estimados para as espécies decaméricas de vanadato presentes nas soluções de decavanadato, após diluição em vários meios e respectivas temperaturas de incubação.....	48
Tabela 2.4 – Parâmetros espectrais das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato (A) e metavanadato (B) após diluição em 0.9% NaCl (5 mM vanádio total, a pH 7.0), nomeadamente desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e concentração da respectiva espécie oligomérica de vanadato (C). A concentração (C) das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato e metavanadato foram determinadas com recurso à Equação 2.2 (Secção 2.2.4.).....	55
Tabela 2.5 – Parâmetros espectrais de RMN, à temperatura ambiente, das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato (A e B) e metavanadato (C e D) – 5 mM vanádio total, a pH 7.0 – em tampão de respiração mitocondrial (Secção 4.2.7.) suplementado com 0.5 mM malato e 5 mM piruvato, na ausência (A e C) e na presença (B e D) de mitocôndria cardíaca de peixe (1 mg proteína/ml), nomeadamente desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e concentração da respectiva espécie oligomérica de vanadato (C). O factor de alargamento da largura a meia altura (F) é definido como o coeficiente entre o valor da $\Delta\nu_{1/2}$ na ausência e na presença de proteína	

(1 mg/ml). A concentração (C) dos diferentes oligómeros de vanadato foi determinada a partir das fracções da integração das áreas totais observadas nos espectros correspondentes, com recurso à Equação 2.2 (Secção 2.2.4.).....	60
Tabela 2.6 – Parâmetros espectrais das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato (A) e metavanadato (B) após diluição em <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) (5 mM vanádio total, a pH 7.0), nomeadamente desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e concentração da respectiva espécie oligomérica de vanadato (C). A concentração (C) das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato e metavanadato foram determinadas com recurso à Equação 2.2 (Secção 2.2.4.).....	62
Tabela 3.1 – Caracterização dos parâmetros de amostragem e condições operatórias utilizados na determinação da concentração de vanádio por EAA electrotérmica com câmara de grafite, num espectrofotómetro de absorção atómica <i>GBC Avanta</i>	95
Tabela 3.2 – Parâmetros de programação da câmara de grafite utilizados na determinação da concentração de vanádio por EAA electrotérmica, num espectrofotómetro de absorção atómica <i>GBC Avanta</i>	96
Tabela 3.3 – Parâmetros do fluorímetro utilizados nos ensaios.....	104
Tabela 3.4 – Valores basais (controlo) para as espécies reactivas de oxigénio (ROS), dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidação lipídica (espécies reactivas tiobarbitúricas – TBARS) no tecido cardíaco da espécie <i>S. aurata</i>	118
Tabela 4.1 – Valores médios das actividades ATPásicas (F_0F_1 -ATPase; desidrogenase do succinato, SDH; Ca^{2+} - e Mg^{2+} -ATPase) determinadas nas preparações mitocondriais de coração de peixe e fígado de rato.....	159
Tabela 5.1 – Etapas do procedimento de isolamento e recolha de células.....	189

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

Introdução geral.....	1
1.1. Breve introdução à fisiologia do sistema cardíaco.....	1
1.1.1. Cardiomiócitos: as células do músculo cardíaco contráctil.....	2
<i>Miofibrilhas e proteínas contrácteis</i>	2
<i>A função do retículo sarcoplasmático no ciclo contráctil</i>	3
<i>A mitocôndria como organelo da célula cardíaca</i>	4
<i>Comunicação entre cardiomiócitos</i>	5
<i>Cardiomiopatias</i>	5
1.1.2. O músculo cardíaco como alvo de dano oxidativo.....	6
1.2. Vanádio.....	8
1.2.1. Vanádio e a sua química complexa.....	8
1.2.2. Distribuição e biodisponibilidade de vanádio no meio ambiente.....	12
1.2.3. Efeitos fisiológicos e toxicológicos de vanádio.....	14
1.2.4. Bioquímica e metabolismo de vanádio no meio celular.....	17
1.3. Efeito de vanadato no sistema cardiovascular.....	20
1.4. O uso de peixes como modelo biológico para estudos toxicológicos.....	22
1.4.1. Acumulação de vanádio em peixes.....	22

CAPÍTULO 2

Caracterização das soluções de vanadato.....	25
2.1. Introdução.....	25
2.1.1. Vanádio e a sua química complexa.....	25
2.1.2. Espécies de vanádio(V), vanadato.....	26
2.1.3. Oligovanadatos presentes nas soluções de vanadato.....	27

2.1.4. Formação de complexos vanadato-ligando biogénico.....	30
2.1.5. Caracterização das soluções de vanadato por espectroscopia de absorção ultravioleta/visível.....	32
2.1.6. Caracterização das soluções de vanadato por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	33
2.1.7. Estudo da redução de vanadato a vanadilo por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica.....	38
2.1.8. Objectivos.....	40
2.2. Material e Métodos.....	41
2.2.1. Reagentes.....	41
2.2.2. Preparação de soluções de vanadato.....	41
2.2.3. Caracterização das soluções de vanadato por espectroscopia de absorção ultravioleta/visível.....	42
<i>Estudo da estabilidade das soluções de decavanadato.....</i>	42
2.2.4. Caracterização das soluções de vanadato por espectroscopia de ressonância magnética nuclear do isótopo 51 de vanádio.....	43
2.2.5. Análise da formação de produtos da redução dos vanadatos por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica.....	45
<i>Deteção por espectroscopia de ultravioleta/visível da formação de vanadilo (VO²⁺) por redução do vanadato na presença de concentrações fisiológicas de glutathiona.....</i>	45
2.3. Resultados e Discussão.....	46
2.3.1. Preparação e análise da composição de soluções de vanadato.....	46
2.3.2. Caracterização das soluções de vanadato por espectroscopia de absorção ultravioleta/visível.....	47
<i>Estudo da estabilidade das soluções de decavanadato.....</i>	47
2.3.3. Estudo da composição das soluções de vanadato por espectroscopia de ressonância magnética nuclear do isótopo 51 de vanádio.....	52
2.3.4. Deteção de produtos da redução dos vanadatos por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica.....	63
2.3.5. Deteção por espectroscopia de ultravioleta/visível de vanadilo (VO ²⁺) resultante da redução do vanadato na presença de concentrações fisiológicas de glutathiona.....	66

2.4. Conclusões.....	71
----------------------	----

CAPÍTULO 3

Avaliação dos efeitos no músculo cardíaco da administração <i>in vivo</i> de decavanadato.....	75
--	----

3.1. Introdução.....	75
----------------------	----

3.1.1. Stresse oxidativo.....	76
-------------------------------	----

3.1.2. Sistemas biológicos de defesa antioxidante.....	79
--	----

3.1.3. Órgãos-alvo de toxicidade.....	81
---------------------------------------	----

3.1.4. Vanádio e dano oxidativo em sistemas biológicos.....	83
---	----

3.1.5. O uso de peixes como modelos biológicos.....	85
---	----

3.1.6. Objectivos.....	88
------------------------	----

3.2. Material e Métodos.....	89
------------------------------	----

3.2.1. Reagentes e soluções.....	89
----------------------------------	----

3.2.2. Animais e tratamentos <i>in vivo</i>	89
---	----

3.2.3. Massa cardíaca relativa e massa ventricular relativa.....	90
--	----

3.2.4. Isolamento de fracções subcelulares do tecido cardíaco.....	91
--	----

<i>Isolamento da fracção citosólica de ventrículos de Sparus aurata</i>	91
---	----

<i>Isolamento da fracção mitocondrial de ventrículos de Sparus aurata</i>	92
---	----

3.2.5. Quantificação proteica.....	92
------------------------------------	----

3.2.6. Distribuição subcelular de vanádio.....	92
--	----

<i>Determinação de limites de detecção e quantificação</i>	93
--	----

<i>Preparação das amostras para quantificação do conteúdo em vanádio</i>	93
--	----

<i>Análise da distribuição subcelular de vanádio</i>	94
--	----

<i>Validação do método</i>	96
----------------------------------	----

<i>Análise de resultados</i>	97
------------------------------------	----

3.2.7. Análise do nível de peroxidação lipídica.....	98
--	----

3.2.8. Actividade de enzimas antioxidantes.....	99
---	----

<i>Actividade da dismutase do superóxido</i>	99
--	----

<i>Actividade da catalase</i>	101
-------------------------------------	-----

<i>Actividade das peroxidases da glutathiona</i>	102
--	-----

3.2.9. Produção de espécies reactivas de oxigénio.....	103
3.2.10. Determinação do nível de GSH.....	105
3.2.11. Análise estatística.....	105
3.3. Resultados e Discussão.....	107
3.3.1. Mortalidade induzida por exposição a soluções de vanadato.....	107
3.3.2. Variação das massas cardíaca e ventricular relativas.....	109
3.3.3. Distribuição subcelular de vanádio após administração <i>in vivo</i>	111
3.3.4. Marcadores de stresse oxidativo.....	117
<i>Actividade prooxidante total</i>	118
<i>Actividade de enzimas antioxidantes</i>	122
<i>Peroxidação lipídica</i>	124
<i>Conteúdo em glutathione</i>	128
3.4. Conclusões.....	131

CAPÍTULO 4

Estudo da interacção <i>in vitro</i> de decavanadato com a integridade funcional da mitocôndria.....	135
4.1. Introdução.....	135
4.1.1. A mitocôndria como potencial alvo de toxicidade.....	135
4.1.2. Estudo da cadeia respiratória.....	136
4.1.3. Integridade da membrana mitocondrial e transporte de metabolitos.....	136
4.1.4. A mitocôndria como alvo intracelular de vanadato.....	137
4.1.5. A mitocôndria de peixe como modelo para estudos toxicológicos.....	139
4.1.6. Isolamento de fracções mitocondriais.....	140
4.1.7. Objectivos.....	142
4.2. Material e Métodos.....	143
4.2.1. Reagentes.....	143
4.2.2. Sacrifício e amostragem biológica.....	143
4.2.3. Isolamento de fracções mitocondriais.....	144
<i>Isolamento de fracções mitocondriais de ventrículo de Sparus aurata</i>	144
<i>Isolamento de fracções mitocondriais de fígado de rato</i>	145

4.2.4. Quantificação proteica.....	145
4.2.5. Caracterização de fracções mitocondriais de coração de peixe e fígado de rato.....	145
<i>Actividade da F₀F₁-ATPase</i>	146
<i>Actividade da desidrogenase do succinato</i>	146
<i>Actividades ATPásicas dependentes de Ca²⁺ ou Mg²⁺</i>	147
4.2.6. Actividades enzimáticas mitocondriais.....	148
4.2.7. Determinação do consumo de oxigénio mitocondrial.....	149
4.2.8. Determinação do potencial da membrana mitocondrial.....	150
<i>Repolarização</i>	151
<i>Efeito de ciclosporina A</i>	151
4.2.9. Determinação do conteúdo em NADH mitocondrial.....	152
4.2.10. Produção de espécies reactivas de oxigénio.....	153
4.2.11. Determinação do estado oxido-reduzido do citocromo <i>b</i>	153
4.2.12. Isolamento e purificação de citocromo <i>b</i> de mamífero.....	153
<i>Remoção de citocromo a</i>	154
<i>Remoção de citocromo c</i>	154
<i>Remoção de proteínas estranhas</i>	154
<i>Purificação de citocromo b</i>	155
<i>Análise dos efeitos de vanadato no estado oxido-reduzido do citocromo b</i> ..	155
4.2.13. Análise estatística.....	156
4.3. Resultados e Discussão.....	157
4.3.1. Isolamento e caracterização de fracções mitocondriais de tecido cardíaco de peixe e de tecido hepático de rato.....	157
4.3.2. Efeito de decavanadato nas actividades mitocondriais de F ₀ F ₁ -ATPase e citocromo <i>c</i> oxidase.....	160
4.3.3. Efeito de decavanadato no consumo de oxigénio mitocondrial.....	161
4.3.4. Efeito de decavanadato no potencial da membrana mitocondrial.....	163
<i>Efeito de decavanadato na repolarização do potencial da membrana mitocondrial induzida por GSH</i>	166
<i>Efeito de ciclosporina A</i>	168
4.3.5. Efeito de decavanadato nos níveis de NADH.....	168
4.3.6. Efeito de decavanadato na produção de espécies reactivas de	

oxigênio.....	169
4.3.7. Efeito de decavanadato no estado oxido-reduzido do citocromo <i>b</i>	171
4.3.8. Efeito de decavanadato no estado oxido-reduzido do citocromo <i>b</i> purificado de mamífero.....	173
4.4. Conclusões.....	174

CAPÍTULO 5

Estudo dos efeitos da exposição de cardiomiócitos a decavanadato.....	177
5.1. Introdução.....	177
5.1.1. Contaminações em culturas de cardiomiócitos.....	178
5.1.2. Cultivos primários de cardiomiócitos de rato.....	179
5.1.3. Cardiomiócitos de ratos recém-nascidos <i>versus</i> cardiomiócitos de ratos adultos.....	180
5.1.4. Preparação de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos.....	181
5.1.5. O vanádio como agente modulador do sistema cardiovascular.....	181
5.1.6. A mitocôndria cardíaca como alvo da toxicidade do vanadato.....	182
5.1.7. Objectivos.....	185
5.2. Material e Métodos.....	186
5.2.1. Meios de cultura, suplementos, anticorpos, reagentes e soluções.....	186
5.2.2. Culturas primárias de miócitos cardíacos (ventrículo) de ratos recém- -nascidos.....	188
<i>Sacrifício e dissecação</i>	188
<i>Isolamento de miócitos cardíacos</i>	188
<i>Pré-plaqueamento para remoção de fibroblastos</i>	191
<i>Contagem de células</i>	192
<i>Cultivo celular</i>	193
<i>Determinação da concentração proteica</i>	193
5.2.3. Coloração de cardiomiócitos com hematoxilina e eosina.....	194
<i>Fixação e desidratação</i>	194
<i>Rehidratação</i>	194
<i>Coloração</i>	195

5.2.4. Imunodeteção da cadeia pesada de miosina em culturas de cardiomiócitos.....	195
<i>Obtenção de extractos proteicos de lisados de cardiomiócitos.....</i>	195
<i>Electroforese em gel de poliacrilamida.....</i>	196
<i>Transferência e imunodeteção de proteínas por Western blotting.....</i>	197
5.2.5. Detecção imunocitoquímica de fibroblastos.....	198
5.2.6. Tratamento de culturas primárias de cardiomiócitos com vanadato.....	199
5.2.7. Estudo da viabilidade celular.....	199
<i>Coloração com azul de tripano.....</i>	200
<i>Ensaio de MTT.....</i>	200
<i>Coloração de cardiomiócitos com bis-benzimida (Hoechst 33258) e iodeto de propídio.....</i>	201
5.2.8. Acumulação de vanádio em extractos celulares.....	203
5.2.9. Determinação da carga energética celular.....	204
<i>Obtenção de nucleótidos.....</i>	204
<i>Determinação da concentração de ATP, ADP e AMP intracelular.....</i>	205
5.2.10. Determinação da actividade da caspase-3.....	205
5.2.11. Determinação de Ca ²⁺ intracelular em cardiomiócitos.....	207
<i>Determinação da fluorescência de Fura-2 em cardiomiócitos.....</i>	207
<i>Calibração da intensidade de fluorescência.....</i>	209
5.2.12. Determinação de stresse oxidativo intracelular.....	211
<i>Uso do indicador fluorescente H₂DCFDA para a determinação de stresse oxidativo.....</i>	212
<i>Uso de indicador fluorescente específico para a detecção de O₂⁻ (DHE)....</i>	212
5.2.13. Determinação do potencial da membrana mitocondrial com os indicadores fluorescentes JC-1 e TMRE.....	213
<i>Monitorização do potencial da membrana mitocondrial com a sonda JC-1</i>	213
<i>Monitorização do potencial da membrana mitocondrial com a sonda TMRE.....</i>	214
5.2.14. Análise estatística.....	214
5.3. Resultados e Discussão.....	215
5.3.1. Cultivo primário de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos.....	216
5.3.2. Coloração de cardiomiócitos com hematoxilina-eosina.....	216
5.3.3. Imunodeteção da cadeia pesada de miosina em culturas de	216

cardiomiócitos.....	
5.3.4. Detecção imunocitoquímica de fibroblastos em culturas de cardiomiócitos.....	217
5.3.5. Toxicidade das soluções de decavanadato e metavanadato nas culturas de cardiomiócitos.....	218
<i>Ensaio de MTT</i>	220
<i>Coloração com bis-benzimida (Hoechst 33258) e iodeto de propídio</i>	221
5.3.6. Acumulação de vanádio nos extractos celulares.....	222
5.3.7. Determinação de morte celular por exposição ao vanadato.....	225
<i>Actividade da caspase-3</i>	228
<i>Estado bioenergético celular</i>	229
5.3.8. Efeitos de vanadato decamérico e monomérico na homeostasia de Ca^{2+} intracelular em cardiomiócitos.....	230
5.3.9. Efeitos do tratamento com decavanadato ou metavanadato no stresse oxidativo intracelular.....	236
5.3.10. Determinação do potencial da membrana mitocondrial de cardiomiócitos tratados com vanadato.....	239
5.4. Conclusões.....	244

CAPÍTULO 6

Conclusões Gerais.....	249
6.1. Conclusão.....	249
6.1.1. A ocorrência da espécie decamérica de vanadato e a sua estabilidade em solução.....	250
6.1.2. A contribuição da espécie decamérica para os efeitos induzidos <i>in vivo</i> pelo vanadato.....	251
6.1.3. A mitocôndria como alvo da toxicidade das espécies oligoméricas de vanadato.....	253
6.1.4. A indução de morte necrótica em cardiomiócitos por exposição ao vanadato.....	254
6.2. Perspectivas Futuras.....	256

CAPÍTULO 7

Referências Bibliográficas..... 259

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL



Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. BREVE INTRODUÇÃO À FISIOLOGIA DO SISTEMA CARDÍACO

A maior parte do coração é composta por células musculares contrácteis, designadas de miócitos cardíacos ou cardiomiócitos, constituindo aproximadamente 75% do volume total do miocárdio [Brilla *et al.*, 1991]. A restante parte deste órgão consiste em tecido composto por células autorítmicas (actividade de *pacemaker*) e condutor (que é responsável pela geração e propagação da actividade eléctrica cardíaca), vasos sanguíneos e espaço extracelular. Dispersas pelo citoplasma dos cardiomiócitos, encontram-se várias mitocôndrias cuja principal função é a geração de energia, na forma de ATP, essencial à manutenção da funcionalidade viabilidade do tecido cardíaco.

A matriz extracelular (ECM), maioritariamente constituída por tecido conectivo cardíaco, desempenha uma importante função de suporte mecânico ao envolver os vários tipos de células do coração e estabelecendo as ligações entre si, fazendo com que a transmissão de força seja uniformemente distribuída através do miocárdio. Esta rede de comunicação desempenha também uma função adicional na transformação de sinais induzidos por situações de stresse em sinais promotores de crescimento celular. A ECM participa, deste modo, na reestruturação do miocárdio em situações de ocorrência de hipertrofia ventricular e falha cardíaca [Opie, 2003].

1.1.1. Cardiomiócitos: as células do músculo cardíaco contráctil

As propriedades eléctricas específicas das células cardíacas (e de outras) devem-se à elevada concentração intracelular de iões potássio (mais do que à concentração extracelular), segundo a qual a membrana interna do sarcolema encontra-se carregada negativamente enquanto que a membrana externa apresenta cargas positivas, o que confere à célula o seu estado de polarização. É também no citosol que o aumento ou o decréscimo da concentração de iões cálcio causam o ciclo de contracção e relaxamento do músculo cardíaco [Opie, 2003].

Miofibrilhas e proteínas contrácteis

A principal função dos miócitos do miocárdio reside no ciclo de contracção-relaxamento. A contracção muscular é possível devido à acção de duas das principais proteínas contrácteis – os filamentos grossos de miosina e os finos de actina – localizadas nas miofibrilhas. Durante o processo de contracção, os filamentos de miosina e actina de cada sarcómero (unidade contráctil) deslizam uns sobre os outros. O início do ciclo de contracção, em que as cabeças da miosina interagem com os filamentos de actina, é induzido pelo aumento de cálcio citosólico em resposta à onda eléctrica que alcança os miócitos cardíacos através do seu sistema de condução. Ao encurtar o sarcómero, este processo produz a contracção do músculo cardíaco (sístole). O relaxamento muscular (diástole) tem lugar quando o ATP se liga à cabeça de miosina [Opie, 2003].

O aumento de cálcio citosólico induz um aumento da interacção entre o ião cálcio e a proteína contráctil troponina C. Na presença de baixas concentrações de cálcio no citosol, a troponina C, devido à sua estrutura molecular, permite ao inibidor troponina I bloquear a interacção entre a actina e a miosina. Ao aumentar a

concentração de cálcio, a troponina I liga-se mais firmemente à troponina C e não à actina, permitindo a interacção entre a actina e a miosina e a consequente contracção do músculo. No relaxamento, o cálcio citosólico é rapidamente acumulado pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (RS) e os iões cálcio, ao deixarem de estar ligados ao local de ligação da troponina C e permitem que a troponina I bloqueie, uma vez mais, a interacção entre a actina e a miosina [Opie e Bers, 2003].

A função do retículo sarcoplasmático no ciclo contráctil

O RS do tecido cardíaco desempenha uma função indispensável na regulação da sequência de contracção-relaxamento. Os canais de libertação de cálcio do RS são parte de uma estrutura molecular complexa designada por receptor de rianodina (RyR ou, mais correctamente, RyR2 para indicar a isoforma cardíaca). Este receptor recebeu esta designação por ser o local de ligação da rianodina (insecticida tóxico). No entanto, em condições fisiológicas o cálcio é o ligando natural do RyR [Opie e Bers, 2003]. Em concentrações elevadas, a cafeína pode esvaziar as reservas de cálcio do RS promovendo a abertura do RyR, impedindo a acumulação de cálcio por parte do RS. Deste modo, o rápido aumento da concentração de cálcio intracelular registado na presença de cafeína corresponde ao cálcio armazenado no RS [Bers, 2000; 2001].

Adicionalmente ao RyR, existe um segundo receptor, para o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), responsável pelo controlo da libertação de cálcio. O IP_3 faz parte do sistema mensageiro de um grupo de receptores que inclui a actividade α_1 -adrenérgica, a angiotensina II e a endotelina. No músculo cardíaco, o receptor IP_3 desempenha uma função menos importante que o RyR, tal como constatado pelo seu reduzido número [Marks, 2000]. Durante uma falha cardíaca humana, o RyR é inibido, enquanto que o

receptor IP_3 é estimulado, elucidando deste modo sobre uma eventual via alternativa de manutenção da homeostasia de cálcio [Go *et al.*, 1995].

O relaxamento das proteínas contrácteis ocorre em resposta a uma diminuição dos níveis de íões cálcio no citosol, quando estes são acumulados através da ATPase de cálcio do retículo sarco(endo)plasmático ou SERCA que ocorre em várias isoformas, sendo que a encontrada no músculo cardíaco é a SERCA-2 [Kimura *et al.*, 1997]. A elevada concentração de cálcio citosólico alcançada durante a fase de contracção estimula, deste modo, a acumulação de cálcio pela SERCA. O cálcio acumulado no RS é armazenado em associação com a proteína calsequestrina, sendo libertado aquando da estimulação da abertura do canal de libertação de cálcio do RS. A calreticulina é outra proteína de armazenamento, estrutural e funcionalmente semelhante à calsequestrina [Opie e Bers, 2003].

Para permitir o relaxamento diastólico, o cálcio necessita de ser removido do citosol. No coelho, que apresenta propriedades electrofisiológicas semelhantes às do Homem, 75% do cálcio existente no citosol é removido pela ATPase do RS, 25% pelo trocador sódio-cálcio, enquanto que aproximadamente 1% é removido pela ATPase do sarcolema ou acumulado na mitocôndria [Bers, 2002].

A mitocôndria como organelo da célula cardíaca

Grande parte dos miócitos são ocupados por mitocôndrias que se encontram alojadas entre as miofibrilhas, maximizando a proximidade entre a principal fonte de fornecimento de energia celular e o principal local de consumo energético. Nos cardiomiócitos, a mitocôndria desempenha também a função de reserva intracelular de cálcio, no entanto, a troca de cálcio entre a mitocôndria e o citosol é relativamente lenta

quando comparada à troca entre o RS e este. Deste modo, a mitocôndria não participa no controlo das contracções dependentes da concentração de iões cálcio no citosol.

O concentração de cálcio mitocondrial aumenta fisiologicamente em resposta à estimulação β -adrenérgica que ocorre aquando do aumento de cálcio no citosol, podendo este aumento, por sua vez, estimular a produção de ATP ao aumentar a taxa de fosforilação oxidativa. Em situações patológicas, durante uma acumulação de cálcio citosólico excessiva, a mitocôndria contribui para a protecção celular acumulando parte desse cálcio em excesso [Opie e Lopaschuk, 2003].

Comunicação entre cardiomiócitos

Na zona de contacto dos cardiomiócitos com as células adjacentes, o sarcolema encontra-se alterado na sua natureza formando o disco intercalar. Este disco altamente especializado é constituído por três componentes principais: (i) junções de hiato (ou *gap junctions*); (ii) junções *fascia adherens*; e, (iii) desmossomas. As junções de hiato, que se encontram maioritariamente na parte longitudinal do disco, asseguram uma comunicação eléctrica rápida entre células, de modo a que todo o coração se comporte como um sincício (*syncytium*) unificado que contrai em simultâneo, enquanto que as junções *fascia adherens* e os desmossomas asseguram que a força mecânica gerada por células individuais seja transmitida através de todo o miocárdio, resultando o somatório destas forças na contracção cardíaca [Opie, 2003].

Cardiomiopatias

Em virtude do RS estar intimamente ligado a ambas as fases do ciclo contráctil, não é de surpreender que as anomalias ao correcto funcionamento deste organelo se manifestem em falhas no funcionamento do sistema cardíaco. Uma das principais

causas das patologias cardíacas é a acumulação excessiva de cálcio, primeiramente referida por Fleckenstein no início dos anos 1970. Tal como proposto no século passado, crê-se hoje em dia que a sobrecarga de cálcio pode produzir dano nas células do miocárdio como consequência das várias respostas à isquémia do miocárdio, à reperfusão ou ao excesso de estimulação de catecolaminas: (i) ao tentar regular o cálcio citosólico, as mitocôndrias ficam sobrecarregadas de cálcio, consumindo ATP no processo e necessitando de mais oxigénio, agravando desta forma a severidade de uma situação isquémica; (ii) ao estimular a actividade das enzimas fosfolipases, o excesso de cálcio promove deste modo a ruptura das membranas celulares; (iii) a sobrecarga de cálcio pode causar um estado de contracções excessivas e contínuas; e, (iv) o excesso de cálcio em circulação, entrando e saindo do RS, pode estar na origem de algumas arritmias [Opie e Bers, 2003]. O aumento do influxo de cálcio (aumento da concentração de cálcio citosólico) em resposta ao stresse induzido no miocárdio pode levar também à promoção de hipertrofia [Sussman *et al.*, 2002].

1.1.2. O músculo cardíaco como alvo de dano oxidativo

O complexo III da cadeia transportadora de electrões na mitocôndria é uma importante fonte fisiológica de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Normalmente, as enzimas antioxidantes, tais como a dismutase de superóxido (SOD) têm a capacidade de combater a produção de ROS, mas quando a taxa de formação de radicais livres excede a capacidade dos mecanismos de defesa antioxidantes, ocorre acumulação de ROS no organismo, causando stresse oxidativo. O stresse oxidativo está na origem de inúmeros danos celulares no sistema cardíaco, nomeadamente dano vascular, aterogénese, danos de reperfusão e apoptose [Opie e Sack, 2003].

No entanto, para além dos efeitos adversos, identificou-se uma função para os ROS gerados: sinal fisiológico. Actualmente, o conceito de que os radicais livres possam transmitir sinais fisiológicos está perfeitamente estabelecido para as espécies reactivas de nitrogénio. No caso da produção de ROS, verificou-se que a sua formação pode: (i) promover o crescimento celular activando a cinase activadora do factor nuclear kB (NF kB) [Force *et al.*, 2002]; (ii) mediar a sinalização protectora preconditionada, activando o canal de protecção mitocondrial de potássio-adenina 5'-trifosfato [Zhang *et al.*, 2001]; e, (iii) eventualmente, diminuir a taxa de entrada de piruvato na mitocôndria [Nemoto *et al.*, 2000]. Taxas elevadas de metabolismo mitocondrial podem ser auto-reguláveis produzindo mais anião superóxido (O_2^-), que será convertido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2).

Deste modo, a estimulação induzida por pequenas quantidades de ROS é uma situação fisiológica no organismo, podendo induzir a libertação de sinais promotores de crescimento celular, no entanto, a estimulação excessiva e prolongada pode ter consequências anormais e patológicas, tais como a indução de apoptose [Sugden *et al.*, 1998].

1.2. VANÁDIO

Poucos são os relatos das descobertas de novos elementos, realizadas nos últimos séculos, que estejam envolvidos em histórias tão românticas como a da descoberta do vanádio. Em 1802, o professor de mineralogia Andrés Manuel del Rio descobriu, no México, um novo elemento metálico semelhante ao crómio e ao urânio, que designou de pancrómio devido à extraordinária gama de cores dos seus sais. Mais tarde, denominou-o de eritrónio (devido à coloração vermelha que os seus sais apresentam quando tratados com ácido). Uma série de infortúnios fez com que del Rio nunca tivesse revelado a sua descoberta e, em 1831, Nils Gabriel Sefstrom “redescobre” este mesmo elemento na Suíça, denominando-o de vanádio, em homenagem à lendária deusa escandinava do amor e da beleza, Vanadis, uma vez mais aludindo à gama de cores dos derivados deste elemento [Nriagu, 1998; Barceloux, 1999].

Em menos de 100 anos, o vanádio passou de metal raro e desconhecido a um pilar da tecnologia moderna industrial e militar, devido à dureza que confere às ligas metálicas que constitui. Presentemente, os progressos científicos realizados no estudo dos efeitos fisiológicos e toxicológicos do vanádio têm revelado o potencial biológico deste elemento para uso terapêutico e farmacológico [Nriagu, 1998].

1.2.2. Vanádio e a sua química complexa

A química do vanádio é caracterizada por múltiplos estados de oxidação. Este metal existe nos estados de oxidação de -1 a +5, sendo os estados de valência mais comuns do +2 ao +5. Dos quatro estados de oxidação mais comuns e estáveis em soluções aquosas, somente o +3 (forma vanádica), +4 (vanadilo) e +5 (vanadato) são biologicamente importantes, sendo o estado +2 demasiado redutor para existir em qualquer organismo vivo conhecido [Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Harland e Harden-Williams, 1994;

Crans *et al.*, 1998; Barceloux, 1999]. Em condições fisiológicas, para os mamíferos, o vanádio encontra-se nos estados de oxidação +4 e +5. O ião vanádico (+3) até agora só foi identificado nos vanadócitos da hemolinfa dos tunicados [Chasteen, 1983; Wilkins e Wilkins, 1997].

O vanádio pentavalente, é o estado de oxidação mais estável nos valores de pH usualmente encontrados em sistemas aquosos. As soluções aquosas de vanadato são incolores e consistem numa mistura em equilíbrio de diferentes oligómeros (V_1 - V_{10}) com diferentes estados de protonação [Crans *et al.*, 1998]. Os estados pentavalentes incluem o metavanadato (VO_3^-), o ortovanadato ($H_2VO_4^-$) e o pirovanadato ($V_2O_7^{4-}$) [Nechay, 1984; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999].

A importância biológica que se atribui ao vanádio está essencialmente associada ao monómero VO_4^{3-} (ortovanadato), um análogo estrutural e electrónico do ortofosfato (PO_4^{3-}) [Chasteen, 1983]. Do mesmo modo, presume-se que o HVO_4^{2-} , $H_2VO_4^{2-}$, H_3VO_4 , formados pela protonação do VO_4^{3-} sejam análogos dos correspondentes análogos de fosfato. Facto que justifica que, os vanadatos sejam capazes de actuar mimetizando a acção dos fosfatos nas reacções químicas [Chasteen, 1983; Barceloux, 1999]. O ácido vanádico, H_3VO_4 (pKa = 3.5, 7.8, 12.5) é mais fraco que o ácido fosfórico, H_3PO_4 (pKa = 1.7, 6.5, 12.1), facto que pode justificar, em parte, a ligação preferencial do vanadato a enzimas [Chasteen, 1993].

Em condições neutras e num intervalo de concentrações entre μM e mM , as formas predominantes de vanadato são o monómero ($V_1 - VO_4^{3-}$), que oligomeriza para formar o dímero ($V_2 - V_2O_7^{4-}$) que, dependendo do pH, pode existir em diversas formas protonadas ($HV_2O_7^{3-}$, $H_2V_2O_7^{2-}$ e $H_3V_2O_7^-$); o tetrâmero cíclico ($V_4 - V_4O_{12}^{4-}$); o pentâmero cíclico ($V_5 - V_5O_{15}^{5-}$) e o decâmero ($V_{10} - V_{10}O_{28}^{6-}$) (Fig. 1.1). As espécies decaméricas (V_{10}), $HV_{10}O_{28}^{5-}$ (HV_{10}) e $H_2V_{10}O_{28}^{4-}$ (H_2V_{10}) surgem a valores de pH entre

2.5 e 7.0, apresentando uma cor amarelo-alaranjada [Crans *et al.*, 1998]. As espécies V_1 , V_2 , V_4 e V_5 são os principais vanadatos presentes em solução aquosa, no entanto, é possível a formação de outros oligómeros sendo que, provavelmente, o mais importante é o vanadato decamérico, presente em soluções de vanadato com uma concentração de vanádio total superior a $100 \mu\text{M}$ e moderadamente ácidas (pH 2-6).

O vanádio tetravalente, vanadilo (VO^{2+}), exibe em solução aquosa uma cor azulada. Este ião é estável a valores de pH ácidos, mas acima de pH 2-3, é instável e rapidamente oxidado a vanadato [Chasteen, 1983]. As espécies de vanádio predominantes em solução aquosa variam, deste modo, em função do pH, da concentração total do elemento, força iónica e temperatura (Fig. 1.1). Os compostos pentavalentes são geralmente os mais tóxicos [Barceloux, 1999].

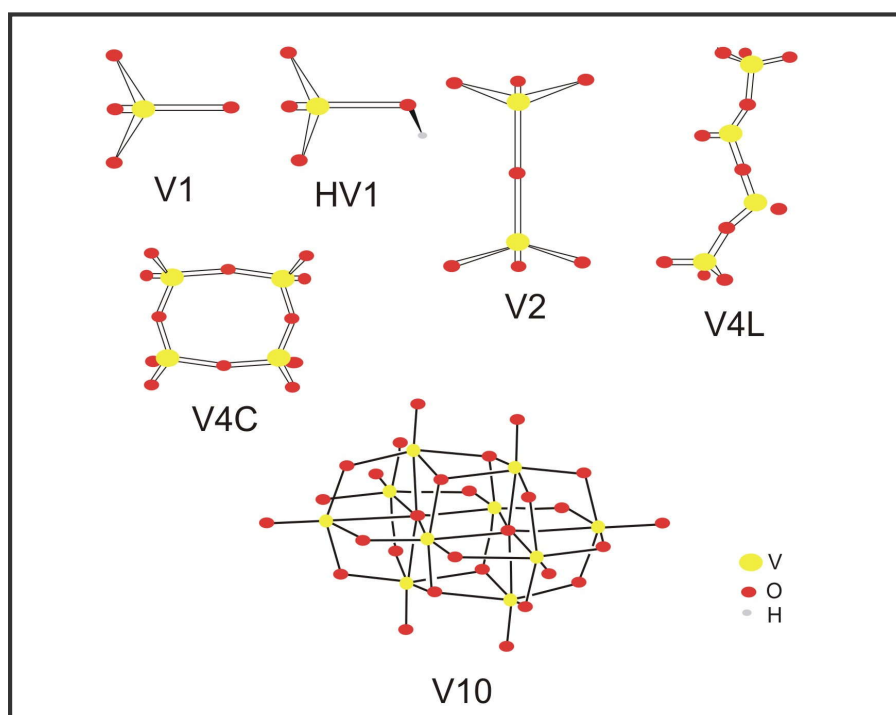


Figura 1.1 – Estruturas de algumas espécies de vanadato: V_1 (VO_4^{3-}), HV_1 (HVO_4^{2-}), V_2 ($\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$), V_{4L} ($\text{V}_4\text{O}_{13}^{6-}$), V_{4C} ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$) e V_{10} ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$). Os átomos de vanádio encontram-se representados a amarelo, os de oxigênio a vermelho e os de hidrogênio a cinzento. [Adaptado de Howarth e Jarold (1978) e Amado *et al.* (1993)].

O vanádio entra na célula na forma de vanadato (VO_3^-) pelos sistemas de transporte aniónico (canais aniónicos não específicos), onde é bio-reduzido a VO^{2+} (estado de oxidação +4). A redução de vanadato a vanadilo, que ocorre nos fluidos intracelulares, por vários agentes redutores (glutathiona celular, catecol, cisteína, NADH, NADPH e ácido L-ascórbico), indica que este é provavelmente o estado de oxidação existente nos organismos vivos. O VO^{2+} é relativamente não reactivo devido a complexar com proteínas celulares (como a hemoglobina) e outras pequenas moléculas, podendo também competir com outros iões metálicos pela ligação a metaloproteínas. O VO_3^- , geralmente, não complexa com compostos orgânicos [Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Boscolo *et al.*, 1994; Harland e Harden-Williams, 1994; Zaporowska e Scibior, 1998a; Barceloux, 1999]. Devido à alta afinidade do VO^{2+} para as proteínas e pelo facto de poder formar complexos estáveis com pequenos ligandos, é pouco provável que o VO^{2+} exista livre nos sistemas biológicos, excepto talvez em vacúolos acídicos tal como lisossomas [Chasteen, 1983]. Crê-se que a redução do vanadato a vanadilo constitui um mecanismo natural de desintoxicação por parte dos organismos, na medida em que o vanadilo é menos tóxico para a célula [Baran, 1998].

Dada a facilidade com que as espécies de vanádio se interconvertem em condições fisiológicas, qualquer estudo que envolva compostos de vanádio deve considerar a química subjacente envolvida [Crans *et al.*, 1998].

Foram desenvolvidos métodos distintos para a preparação de soluções de vanadato contendo unicamente espécies monoméricas ou decaméricas, para testar quais os efeitos destas espécies nos sistemas biológicos. Mas, apesar de ser possível obter uma única espécie de vanadato numa solução concentrada, as soluções denominadas de “monovanadato” (contendo presumivelmente só espécies monoméricas) e “decavanadato” (espécies decaméricas) encontram-se frequentemente contaminadas

com outras espécies [Aureliano e Madeira, 1998]. Estudos espectroscópicos por ressonância magnética nuclear (RMN) revelaram que, em ambas as soluções, estavam presentes mais do que uma espécie de vanadato e que a solução de “decavanadato” se encontrava significativamente contaminada com espécies monoméricas, enquanto que a solução de “monovanadato” continha, em adição à espécie monomérica, também pirovanadatos e metavanadatos [Aureliano e Madeira, 1994]. No presente trabalho adoptou-se a designação de “metavanadato” para uma solução contendo oligovanadatos de V_1 a V_5 e “decavanadato” para uma solução contendo só espécies decaméricas, V_{10} .

1.2.3. Distribuição e biodisponibilidade de vanádio no meio ambiente

O vanádio está presente numa grande variedade de produtos naturais, nomeadamente óleo de crude, carvão e gasolina [Chasteen, 1983; Barceloux, 1999], cinzas formadas aquando da produção de ligas ferrosas, e subprodutos do processamento de alguns minérios não ferrosos (por exemplo, alumínio, titânio, urânio). A extracção de alguns metais contendo vanádio produz ligas ricas neste metal (por exemplo, ferrovanádio) [Barceloux, 1999]. Devido à sua dureza e capacidade de formar ligas metálicas, o vanádio tem sido utilizado como componente em sólidas ligas de aço utilizadas no fabrico de máquinas e ferramentas e em ligas não ferrosas, na tecnologia espacial e na indústria nuclear [Nriagu, 1998; Barceloux, 1999]. A exposição da população ao vanádio ocorre principalmente pela combustão de petróleo, carvão e óleos, na produção de electricidade e calor [Barceloux, 1999].

As principais fontes alimentares de vanádio são a pimenta preta, sementes de funcho, cogumelos ($0.05-2 \mu\text{g/g}$), salsa ($1.8 \mu\text{g/g}$), marisco, espinafres ($0.5-0.8 \mu\text{g/g}$) e alguns alimentos preparados. O tabaco apresenta elevadas concentrações de vanádio,

contendo o fumo do tabaco 1-8 ppm de vanádio [Chasteen, 1983; Nielsen, 1991; Uthus e Seaborn, 1996].

Nos oceanos, o vanádio está presente como ião vanadato, principalmente H_2VO_4^- [Kustin e McLeod, 1983] na concentração de 10 nM [Chasteen, 1983; Wilkins e Wilkins, 1997; Miramand e Fowler, 1998]. A maior acumulação de vanádio no estado de oxidação +3 em sistemas vivos ocorre nas células da hemolinfa dos tunicados, denominadas vanadócitos, podendo atingir concentrações na ordem dos 1 M, ou 10^8 vezes superiores à concentração dos oceanos [Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Wilkins e Wilkins, 1997]. As plantas marinhas e invertebrados tendem em acumular vanádio em concentrações superiores do que as plantas e animais terrestres [Bewers *et al.*, 1987].

Nos peixes, as vias a partir das quais o vanádio é incorporado são a água ou o alimento. O vanádio acumula-se predominantemente no fígado e rim [Knudtson, 1979]. Os órgãos que servem como locais de captação de metais (brânquias e intestino) apresentam igual tendência para os concentrar, exibindo assim potenciais de acumulação relativamente elevados [Edel e Sabbioni, 1993]. Os tecidos em que se verifica pouca ou nenhuma acumulação incluem o cérebro, o músculo e as gónadas [Zaporowska e Scibior, 1998a]. Sabe-se que os ossos e os dentes dos mamíferos, zonas de ossificação onde tem lugar a mineralização, acumulam as maiores concentrações de vanádio, relativamente aos peixes a informação é inexistente. A excreção de vanádio faz-se por via renal [Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Barceloux, 1999]. Contrariamente a outros metais pesados, como o cádmio e o zinco que exibem uma enorme taxa de acumulação, o vanádio só atinge os órgãos internos dos peixes após exposições prolongadas a elevadas concentrações do elemento [Miramand e Fowler, 1998]. Células hepáticas de cultivo incubadas em meios suplementados com diferentes compostos de

vanádio acumularam este elemento, sobretudo no núcleo e nas mitocôndrias [Zaporowska e Scibior, 1998b].

1.2.4. Efeitos fisiológicos e toxicológicos de vanádio

Na Europa, o uso de vanádio no meio médico vulgarizou-se logo após a sua descoberta. No início dos anos 1920, quando pouco ou nada se sabia sobre os efeitos do uso farmacológico deste elemento, alguns médicos franceses recorriam ao uso de metavanadato de sódio (até 5 mg) para o tratamento de anemia, tuberculose, reumatismo crónico e diabetes, publicitando mesmo a administração intramuscular ou intravenosa de hexavanadato de sódio como uma cura para a sífilis [Nriagu, 1998].

O progressivo aumento dos níveis de vanádio no ambiente, como resultado do seu uso em diferentes processos industriais e da queima de combustíveis com vanádio [Harland e Harden-Williams, 1994] e o crescente interesse dos efeitos farmacológicos de alguns dos seus compostos, torna o estudo dos efeitos do vanádio nos sistemas biológicos uma importante área de investigação.

O vanádio é um nutriente essencial para certas plantas, animais e microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*), mas ainda não foram detectadas patologias humanas associadas a deficiências de vanádio [Nechay, 1984; Nielsen, 1991; French e Jones, 1993; Boscolo *et al.*, 1994; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999]. No entanto, vários estudos relacionam o aparecimento de deficiências em caprinos, frangos e ratos, tais como crescimento retardado, malformações ósseas e diminuição da fertilidade, com uma alimentação deficiente em vanádio [Nechay, 1984; Nielsen, 1991].

No entanto, a toxicidade associada ao vanádio está bem documentada. Vários autores sugerem que a exposição ao vanádio promove efeitos cardiovasculares, tais

como efeitos inotrópicos positivos e negativos e hipertensão, toxicidade renal e hepática, vasoconstrição em vários órgãos (baço, rim e fígado) [Simons, 1979; Akera *et al.*, 1983; Chasteen, 1883; Nechay, 1984; Boscolo *et al.*, 1994; Harland e Harden-Williams, 1994; Stohs e Bagchi, 1995; Carmignani *et al.*, 1998], e intervém noutros processos fisiológicos, nomeadamente, na acção hormonal, alterando o metabolismo da tiróide [Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Nielsen, 1991; Harland e Harden-Williams, 1994], para além de possuir acção carcinogénica e mutagénica [Léonard e Gerber, 1994]. Existem também registos de que o vanádio causa perturbações gastrointestinais, descoloração da língua (síndrome da língua verde), lesões neurológicas focais [Barceloux, 1999] e redução da pressão intraocular [Nechay, 1984].

Na célula, o vanadato pode afectar os processos de fosforilação e desfosforilação proteica, o que possivelmente é justificado pela semelhança química do vanadato com o fosfato [Simons, 1979; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999] e interfere nos sistemas de defesa antioxidante [Serra *et al.*, 1992]. Segundo Stohs e Bagchi [1995], o vanadato induz stresse oxidativo e peroxidação lipídica por geração de radicais livres [Simons, 1979; Chasteen, 1983; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999].

Para além de potentes inibidores da actividade enzimática, os compostos de vanádio, são reguladores fisiológicos da bomba de sódio [Simons, 1979; Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Nielsen, 1991; Boscolo *et al.*, 1994; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999], assim como alteram a translocação de cálcio no retículo sarcoplasmático [Aureliano e Madeira, 1994; 1998], diminuem os antioxidantes celulares, promovem danos no ADN e estimulam a proliferação e/ou apoptose celular [Viarengo, 1989; Stohs e Bagchi, 1995]. Existem evidências de que o vanádio possa estar envolvido no metabolismo da glucose, mimetizando a acção da insulina [Nielsen, 1991; Hamel *et al.*, 1993]; assim como, mimetiza factores de crescimento [Nielsen,

1991] e inibe a biosíntese de colesterol em animais, incluindo o Homem [Chasteen, 1983; Nielsen, 1991; Harland e Harden-Williams, 1994].

Com um tempo de meio vida no sangue inferior a 1 hora [Nechay, 1984], o vanádio, na forma de vanadato de amónia (0.2-5.0 mM) produz peroxidação lipídica nos eritrócitos e decréscimo no número de eritrócitos, nível de hemoglobina e valor de hematócrito [Zaporowska *et al.*, 1993; Soares *et al.*, 2003]. Observa-se também, em intoxicações de vanádio, um aumento no nível de metahemoglobina no sangue [Zaporowska e Scibior, 1998a; Soares *et al.*, 2003]. Segundo Hogan [1990], os eritrócitos expostos *in vivo* ao vanádio tornam-se mais susceptíveis à hemólise, devido a uma alteração na permeabilidade da sua membrana, que induz alterações na pressão osmótica intracelular. O vanádio afecta também o metabolismo da glucose nos eritrócitos [Zaporowska e Scibior, 1998a].

Estudos realizados *in vitro* demonstraram a influência do vanádio no transporte de oxigénio pela hemoglobina. O 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) é um importante regulador da afinidade da hemoglobina para o oxigénio. Logo, a eficiência do transporte de oxigénio pela hemoglobina depende da concentração de 2,3-BPG nos eritrócitos, que liga as moléculas de hemoglobina diminuindo desta forma a afinidade para o oxigénio. Eritrócitos humanos incubados *in vitro* com compostos de vanádio exibiram um decréscimo no nível de 2,3-BPG, causando um aumento da afinidade da hemoglobina para o oxigénio [Zaporowska e Scibior, 1998a].

Em exposições ao metal, observam-se também alterações no sistema leucocitário. Os compostos de vanádio decrescem a actividade fagocitária dos macrófagos. Outro efeito descrito é a acção anticoagulante do vanádio, inibindo a agregação dos trombócitos e as actividades dos factores de coagulação [Zaporowska e Scibior, 1998b].

Presentemente, está estabelecido o potencial uso de compostos de vanádio como substitutos da insulina em tratamentos de diabetes tipo I (insuficiência na produção de insulina) e, particularmente, de diabetes tipo II (tolerância à insulina). Os efeitos destes compostos insulino-miméticos compreendem a inibição de vários sistemas enzimáticos hepáticos, musculares e adiposos que participam colectivamente na utilização e armazenamento celular de glicose, bem como no bloqueio de acções hormonais que se opõem à acção da insulina [Shechter, 1990; Matsumoto, 1994; Elberg *et al.*, 1998; Sakurai e Tsuji, 1998].

Para além de reverter *in vivo* a resistência a drogas anticarcinogénicas, por possuir actividade anti-tumoral, o uso de vanádio também se tem apresentado como um potencial tratamento para tumores [Colin *et al.*, 1994; Evangelou, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004]. Deste modo, e uma vez que o principal obstáculo à quimioterapia actual é a resistência das células malignas às drogas anticarcinogénicas, o uso de compostos de vanádio tem-se revelado muito promissor [Colin *et al.*, 1994; Evangelou, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004]. Recentemente, têm sido apresentadas evidências a favor da aplicação de polioxometalatos como agentes anti-virais, com base na eficácia da interacção do vanadato decamérico com enzimas metabolizadoras de fosfato [Pope e Müller, 1994; Stankiewicz *et al.*, 1995; Rehder, 2003].

Deste modo, ainda que em concentrações vestigiais (1-10 nM) o vanádio possa exercer uma vasta gama de efeitos benéficos nos organismos vivos, em concentrações superiores torna-se tóxico [Nechay, 1984].

1.2.5. Bioquímica e metabolismo de vanádio no meio celular

Crê-se que o vanádio exista nos fluídos extracelulares, predominantemente, no estado de oxidação pentavalente (vanadato). Após entrarem no meio intracelular, através de

canais iónicos não-específicos, os oligovanadatos são reduzido a vanadilo, por acção da glutathiona (GSH) ou de outros compostos com grupos –OH [Chasteen, 1983].

Intracelularmente, o vanádio reduzido (vanadilo, VO^{2+}) encontra-se ligado à GSH, transferrina, catecolaminas e outros pequenos péptidos. No plasma, este elemento existe como monovanadato (H_2VO_4^-) estando normalmente ligado à transferrina do soro e à hemoglobina. Apesar de se registar uma reoxidação de uma pequena parte do vanadilo a vanadato, a complexação da espécie reduzida impede uma acumulação de vanadato nos sistemas biológicos, impedindo deste modo o dano celular que poderiam advir dos seus efeitos inibitórios [Chasteen, 1983; Zaporowska e Scibior, 1998a].

Considera-se que cerca de 98% do vanádio intracelular está presente como vanadilo, sendo a concentração de vanadato demasiado baixa para permitir a formação da diferentes espécies oligoméricas. Esta deve ser a principal razão, pela qual, os estudos toxicológicos *in vivo* menosprezam os efeitos promovidos pelos diferentes oligovanadatos nos sistemas biológicos. No entanto, foi recentemente proposto que a espécie decamérica de vanadato é estabilizada após interacção com proteínas do citoesqueleto e membranares [Ramos *et al.*, 2006].

Os primeiros estudos sobre a interacção do vanadato decamérico com proteínas foram realizados com ribonucleases, em 1973 [DeMaster e Mitchell, 1973]. Estes e outros estudos demonstraram que a espécie decamérica é potencialmente responsável pelos efeitos promovidos nas actividades enzimáticas [Chasteen, 1983]. Desde então, tornou-se evidente que o vanadato decamérico apresenta diferentes vias de acção não só *in vitro* como *in vivo*, diferentes alvos e efeitos que os restantes oligómeros de vanadato. Intracelularmente, o vanadato é reduzido a vanadilo, prevenindo os efeitos tóxicos do vanádio, no entanto esta biorredução depende da razão entre os elementos redutores e oxidantes presentes na célula [Zaporowska e Scibior, 1998a]. Contudo, a presença de

determinados oligómeros de vanadato (a espécie decamérica, por exemplo) pode impedir a redução do vanadato. O vanadato decamérico pode também ser formado após acidificação das células musculares, tornando-se deste modo acessível a locais de ligação específicos nas proteínas e inacessível à redução, e induzir respostas celulares distintas das promovidas por outros oligovanadatos (Fig. 1.2) [Aureliano e Gândara, 2005; Soares *et al.* 2007e]. Deste modo, sugere-se que a espécie decamérica de vanadato contribua, pelo menos em parte, para os efeitos toxicológicos promovidos pelo vanadato nos sistemas biológicos.

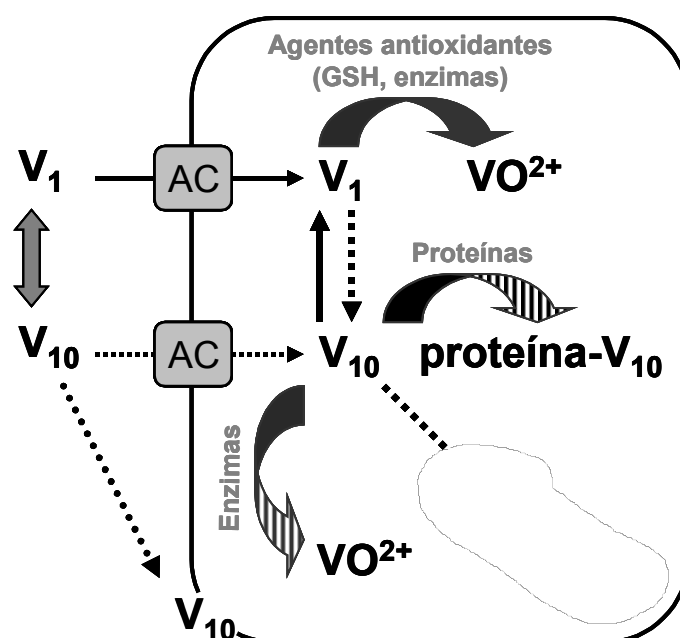


Figura 1.2 – Esquema proposto para os alvos celulares do vanadato decamérico (V₁₀): sugere-se que o V₁₀ seja transportado para o meio intracelular através de canais aniônicos (AC) e/ou se ligue a proteínas membranares, assim como se forme após acidificação intracelular; indica-se também a redução do vanadato monomérico (V₁) por acção de agentes antioxidantes e a redução de V₁₀ por enzimas, assim como, a ligação do V₁₀ a proteínas-alvo que previnam a sua redução; finalmente, propõe-se a acumulação de V₁₀ em organelos subcelular, como a mitocôndria. [Adaptado de Aureliano e Gândara (2005) e Soares *et al.* (2007e)].

1.3. EFEITO DE VANADATO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

As doenças degenerativas cardiovasculares com patologias renais associadas afectam grande parte da população dos países desenvolvidos, e a hipertensão arterial é um dos problemas de saúde pública mais preocupante da actualidade. Embora haja uma predisposição genética para sofrer de hipertensão arterial, a exposição a metais também é um factor a ter em consideração.

São vários os efeitos desencadeados por exposição ao vanádio, dos quais se destaca a sua acção nos mecanismos reguladores do sistema cardiovascular, nomeadamente nas várias enzimas e biomoléculas envolvidas no processo de contracção muscular, nomeadamente ao nível da libertação de catecolaminas, dos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e caliceína-cinina, da actividade nervosa, entre outros [Carmignani *et al.*, 1998].

Estudos sobre os efeitos tóxicos de vanádio no sistema cardiovascular indicaram que este induz vasoconstrição em vários órgãos (baço, rim e intestino) e várias modificações cardiovasculares ao nível fisiológico [Carmignani *et al.*, 1991]. As manifestações clínicas incluem palpitações, em repouso e em exercício, e insuficiência coronária transitória [Sitprija e Eiam-Ong, 1998]. A sugestão do vanádio induzir hipertensão arterial em humanos surgiu quando se observou que este metal é muito activo nas enzimas envolvidas nos mecanismos de regulação do sistema cardiovascular (Na^+, K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase e adenilato ciclase) [Nechay, 1984]. Estudos em ratos sujeitos a uma exposição crónica (7 e 10 meses) de 100 $\mu\text{gV/ml}$ (100 ppm) de metavanadato de sódio (NaVO_3) na dieta da água registaram um aumento da concentração do metal no coração dos dois grupos, mais significativo nas aurículas (3 ppb) do que nos ventrículos (0.5 ppb), assim como, um aumento da frequência cardíaca (HR) e da pressão sanguínea (BP), mantendo-se constante a contractibilidade

ventricular (CI) [Carmignani *et al.*, 1989; 1992a]. Boscolo *et al.* [1994] e Carmignani *et al.* [1992b] realizaram um estudo similar em ratos expostos durante 7 meses a concentrações de 10 e 40 ppm de NaVO₃ na dieta da água e observaram, tal como anteriormente, um aumento da BP não se alterando a HR e a CI. Para além disso, observou-se em ambos os trabalhos que o vanádio induziu a libertação de catecolaminas, actuou nos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e encefalina, assim como, nos adrenoreceptores [Carmignani *et al.*, 1989; 1992a; 1992b; Boscolo *et al.*, 1994]. Assim, a hipertensão arterial observada nesta exposição crónica deveu-se aos efeitos do vanádio a nível dos mecanismos de regulação cardiovascular.

Por outro lado, a ocorrência de dano oxidativo no músculo cardíaco associado a metais tóxicos sugere que este órgão apresenta elevada vulnerabilidade à intoxicação por metais, tais como vanádio [Jamall *et al.*, 1989; Tort e Madsen, 1991; Sarkar *et al.*, 1995; Limaye e Shaikh, 1999]. No entanto, e apesar da abrangência dos conhecimentos adquiridos até ao momento, os fundamentos bioquímicos dos efeitos oxidativos de vanádio registados *in vivo* no músculo cardíaco encontram-se por esclarecer.

1.4. O USO DE PEIXES COMO MODELO BIOLÓGICO PARA ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

A avaliação das implicações das actividades antropogénicas no meio ambiente e saúde humana, através do estudo do seu impacto nos ecossistemas marinhos, são de extrema importância quando se sabe que os organismos marinhos são especialmente sensíveis a agentes xenobióticos e metais, tais como o vanádio [Nechay, 1986].

Segundo Kelly *et al.* [1998], os peixes são bons modelos experimentais em estudos de stresse oxidativo, uma vez que exibem respostas toxicológicas e adaptativas semelhantes às dos mamíferos, para além de várias espécies ictiológicas apresentarem maior vulnerabilidade aos efeitos tóxicos de metais que os mamíferos. Actualmente, os peixes são considerados modelos experimentais de fácil obtenção, manutenção e manuseamento, em estudos de toxicologia. Apesar do interesse das espécies ictiológicas para o estudo de efeitos de stresse oxidativo, os peixes são um modelo adequado ao estudo dos efeitos tóxicos do vanadato decamérico, uma vez que à sua temperatura fisiológica esta espécie oligomérica de vanadato apresenta-se relativamente estável para permitir a promoção de efeitos diferentes dos induzidos pelo vanadato monomérico [Soares *et al.*, 2007a].

1.4.1. Acumulação de vanádio em peixes

A dificuldade de analisar o vanádio nos organismos, devido à sua complexa bioquímica, é uma das razões pela qual existem escassos dados comparando com outros metais pesados, tais como cádmio, cobre, chumbo e zinco, entre outros [Miramand e Fowler, 1998].

Nos peixes a acumulação de vanádio directamente pela água é um processo gradual que resulta numa acumulação relativamente baixa deste metal nos tecidos internos. Enquanto outros metais pesados, como o cádmio, tendem a ser acumulados nos tecidos em factores de concentração de 1 a 5×10^2 , em exposições de duas a três semanas com ^{48}V na água do mar os factores de concentração mais elevados são inferiores a 10 e são detectados em tecidos com contacto directo com a água do mar (brânquias, pele) ou no aparelho digestivo. Nas mesmas condições, o fígado, rins, baço e músculo dos peixes expostos apresentam valores basais de concentração deste elemento, indicando que nestes órgãos a acumulação de vanádio é muito reduzida ou mesmo nula [Miramand *et al.*, 1992; Miramand e Fowler, 1998]. Os resultados destes estudos indicam que, provavelmente devido à sua forma aniónica na água do mar, o vanádio é relativamente não reactivo em substratos biológicos [Miramand e Fowler, 1998].

Também é improvável que a ingestão de alimento represente a via preferencial de entrada de vanádio nos peixes. Em experiências com o peixe bentónico *Gobius minutus* com uma única ingestão de camarão marcado com ^{48}V verificou-se que pouco vanádio foi absorvido ao longo do aparelho digestivo (2-3 %), e a quantidade acumulada foi rapidamente excretada através dos rins e brânquias [Miramand *et al.*, 1992].

Apesar do coração não ser um dos locais de acumulação preferencial de metais, é um órgão vulnerável ao stresse oxidativo induzido por metais. Estão descritas alterações nas respostas do tecido cardíaco ao stresse oxidativo em indivíduos da espécie *Halobatrachus didactylus* expostos (administração intraperitoneal), durante 1 e 7 dias, a soluções de vanadato (5 mM vanádio total), tendo-se registado uma diminuição da actividade das enzimas de defesa antioxidante (dismutase de superóxido e catalase)

associada a um aumento da peroxidação lipídica, sendo sugerido que a espécie decamérica de vanadato induz efeitos mais severos que as restantes espécies oligoméricas [Aureliano *et al.*, 2002]. Estudos histológicos, realizados nas mesmas condições, referem que os diferentes oligovanadatos causam lesões nos tecidos renal e hepático, apesar de não se detectarem alterações no tecido cardíaco [Borges *et al.*, 2003]. No entanto, os mesmos autores sugerem que, apesar de não se observarem alterações tecidulares evidentes, o coração é um órgão sensível e fortemente afectado pela toxicidade de vanádio.

Capítulo 2

CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE VANADATO



Capítulo 2

CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE VANADATO

2.1. INTRODUÇÃO

O vanádio é um elemento de transição membro do grupo VB da tabela periódica, com uma configuração electrónica $[Ar]3d^34s^2$ e massa molecular de 50.94 g/mol, cinzento-azulado e resistente à corrosão, que não ocorre na natureza na sua forma metálica livre devido à sua propensão em reagir com outros elementos, particularmente o oxigénio [Greenwood e Earnshaw, 1997].

2.1.1. Vanádio e a sua química complexa

O vanádio exhibe uma química extremamente rica devido, em parte, à sua flexibilidade para adoptar várias geometrias de coordenação e à sua capacidade oxido-redutora nas condições observadas nos ecossistemas [Crans *et al.*, 1998]. A química complexa deste metal é caracterizada por múltiplos estados de oxidação. Este metal existe nos estados de oxidação de -1 a +5, sendo os estados de valência mais comuns o +2, +3, +4 e +5. Dos quatro estados de oxidação mais comuns e estáveis em soluções aquosas, somente o +3 (forma vanádica), +4 (vanadilo) e +5 (vanadato) são biologicamente importantes, sendo o estado +2 muito redutor para existir em organismos vivos [Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Harland e Harden-Williams, 1994; Crans *et al.*, 1998; Barceloux, 1999]. O ião vanádico (+3) parece ocorrer apenas nos vanadócitos da hemolinfa dos tunicados. Nos mamíferos, em condições fisiológicas, o vanádio encontra-se nos estados de oxidação +4 e +5 [Chasteen, 1983; Wilkins e Wilkins, 1997].

2.1.2. Espécies de vanádio(V), vanadato

O vanádio pentavalente, é o estado de oxidação mais estável nos valores de pH usualmente encontrados em sistemas biológicos. As soluções aquosas de vanadato são incolores e consistem numa mistura em equilíbrio de diferentes oligómeros (V_1 - V_{10}) com diferentes estados de protonação [Crans *et al.*, 1998]. Os estados pentavalentes incluem o metavanadato (VO_3^-), o ortovanadato ($H_2VO_4^-$) e o pirovanadato ($V_2O_7^{4-}$) [Nechay, 1984; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999]. Os compostos pentavalentes são geralmente os mais tóxicos [Barceloux, 1999].

Em condições neutras e num intervalo de concentrações entre μM e mM , as formas predominantes de vanadato são o monómero ($V_1 - H_2VO_4^-$), dímero ($V_2 - H_2V_2O_7^{2-}$), tetrâmero cíclico ($V_4 - V_4O_{12}^{4-}$), pentâmero cíclico ($V_5 - V_5O_{15}^{5-}$) e decâmero ($V_{10} - V_{10}O_{28}^{6-}$). As espécies decaméricas (V_{10}), $HV_{10}O_{28}^{5-}$ (HV_{10}) e $H_2V_{10}O_{28}^{4-}$ (H_2V_{10}) surgem a valores de pH entre 2.5 e 7.0, apresentando uma cor amarelo-alaranjada [Crans *et al.*, 1998]. O vanádio tetravalente, vanadilo (VO^{2+}), exibe em solução aquosa uma cor azulada. Este não é estável a valores de pH ácidos, mas acima de pH 2-3, é instável e rapidamente oxidado a vanadato [Chasteen, 1983].

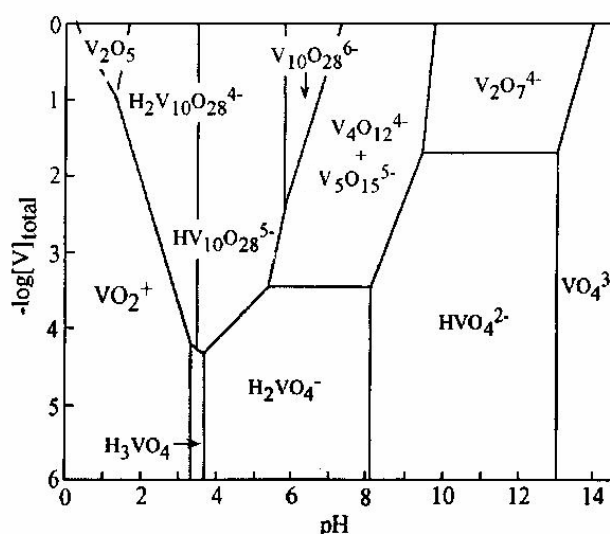


Figura 2.1 – Espécies de vanadato (+5) predominantes em solução aquosa em função do pH. [Adaptado de Chasteen (1983)].

As espécies de vanádio predominantes em solução aquosa, variam em função do pH e da concentração total do elemento (Fig. 2.1). Dada a facilidade com que as espécies de vanádio se interconvertem em condições fisiológicas, qualquer estudo que envolva compostos de vanádio deve considerar a química subjacente envolvida [Crans *et al.*, 1998].

2.1.3. Oligovanadatos presentes nas soluções de vanadato

Apesar de ser possível obter soluções concentradas de vanadato compostas por uma única espécie de vanádio(V), as soluções denominadas de “monovanadato” (contendo presumivelmente só espécies monoméricas, V_1) e “decavanadato” (espécies decaméricas, V_{10}) encontram-se frequentemente contaminadas com outras espécies oligoméricas [Aureliano e Madeira, 1998]. Foram desenvolvidos métodos distintos para a preparação de soluções de vanadato contendo unicamente espécies V_1 ou V_{10} , no entanto, estudos espectroscópicos por ressonância magnética nuclear (RMN) revelaram que, em ambas as soluções, estão presentes mais do que uma espécie de vanadato e que a solução de “decavanadato” se encontrava significativamente contaminada com espécies V_1 , enquanto que a solução de “monovanadato” contém, em adição à espécie ortovanadato (V_1), também pirovanadatos (V_2) e metavanadatos (V_4 , V_5) [Aureliano e Madeira, 1994]. Torna-se, deste modo, difícil atribuir o efeito promovido por uma determinada solução de vanadato no sistema biológico em estudo à(s) respectiva(s) espécie(s) que a constitui.

O termo “metavanadato” é habitualmente usado para referir a mistura incolor de oxovanadatos em solução aquosa, com a forma empírica (VO_3^-) e surgiu por analogia ao “metafosfato” (PO_3^-) [Pope, 1983]. No presente trabalho adoptou-se a designação de

“metavanadato” para uma solução contendo oligovanadatos de V_1 a V_5 e “decavanadato” para uma solução contendo maioritariamente V_{10} .

Nas soluções de vanádio(V), as diferentes espécies oligoméricas de vanadato ($n = 1-10$) podem ocorrer simultaneamente em equilíbrio, ou seja, espécies monoméricas (V_1), diméricas (V_2), tetraméricas (V_4) e decaméricas (V_{10}), e em alguns casos, com diferentes estados de protonação e conformacionais. A predominância de determinada(s) espécie(s) em solução é dependente de pH, concentração e força iônica [Heath e Howarth, 1981; Petterson *et al.*, 1985; Pope, 1983; Rehder, 1991]. No entanto, a pH neutro e na gama de concentrações geralmente usadas nos estudos bioquímicos (de μM a mM) as espécies predominantes são o V_1 , o V_2 , o V_4 e o pentâmero (V_5). Em solução, estas espécies atingem o equilíbrio muito rapidamente (na escala de milissegundos) devido a trocas entre átomos de vanádio e oxigênio [Crans *et al.*, 1990].

A espécie V_1 , vulgarmente designada de vanadato, possui três estados distintos de protonação (HVO_4^{2-} , H_2VO_4^- e H_3VO_4), resultantes da protonação do ortovanadato (VO_4^{3-}). A pH neutro, o V_1 encontra-se mais comumente na forma de H_2VO_4^- . O V_1 pode, por sua vez oligomerizar-se formando dímeros ($\text{H}_3\text{V}_2\text{O}_7^-$), tetrâmeros ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$) e pentâmeros cíclicos ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$), assim como tetrâmeros e pentâmeros lineares [Crans *et al.*, 1990].

Têm-se desenvolvido métodos para a preparação de soluções contendo unicamente espécies V_1 ou V_{10} , no sentido de avaliar a contribuição destas espécies nos efeitos promovidos pelo vanadato em sistemas biológicos [Aureliano e Madeira, 1998; Aureliano e Gândara, 2005]. As soluções de decavanadato são compostas unicamente por espécies V_{10} , no entanto, quando estas desoligomerizam surge em solução V_1 (Fig. 2.2). As soluções de metavanadato contêm para além de V_1 outras espécies de metavanadato, tais como V_2 e V_4 cíclico (Fig. 2.2). Em determinadas condições, as

espécies V_{10} (responsáveis pela coloração laranja que as soluções de decavanadato apresentam) decompõem-se em V_1 (soluções incolores), enquanto que as soluções de metavanadato (soluções de coloração amarela ou incolores dependendo da concentração de vanadatos), contêm oxovanadatos, tais como V_1 , V_2 e V_4 (Fig. 2.2) [Howard e Jarrold, 1973; Amado *et al.*, 1993].

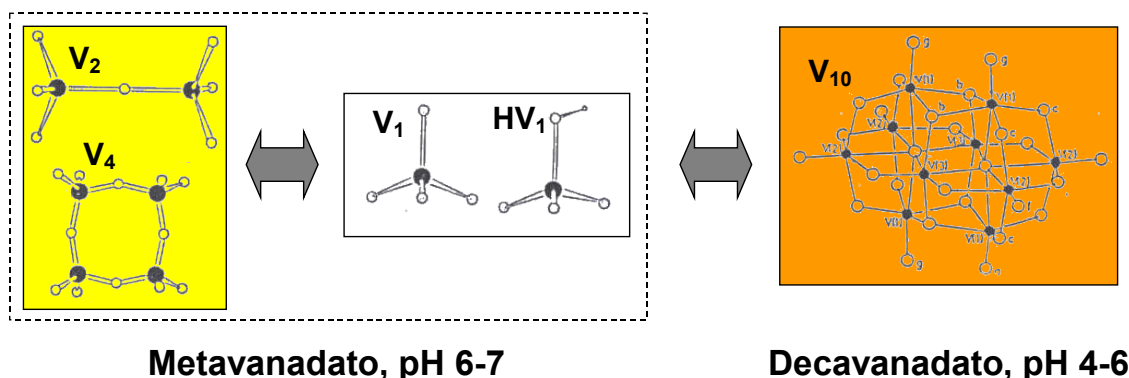


Figura 2.2 – Os oligómeros de vanadato podem ocorrer simultaneamente em equilíbrio em soluções aquosas. Oligómeros de vanadato: V_1 , monomérico desprotonado e monoprotonado (HV_1); V_2 , dimérico; V_4 ; tetramérico cíclico; V_{10} , decamérico. A espécie decamérica de vanadato (responsável pela coloração laranja que as soluções de decavanadato apresentam) decompõe-se em vanadato monomérico (soluções incolores), enquanto que as soluções de metavanadato (soluções de coloração amarela ou incolores dependendo da concentração de vanadatos), contêm oxovanadatos lábeis em rápido equilíbrio, tais como V_1 , V_2 e V_4 (cíclico). Nas representações das espécies oligoméricas de vanadato são indicados os átomos de vanádio (●), de oxigénio (○) e de hidrogénio (o). [Adaptado de Howard e Jarrold (1973) e Amado *et al.* (1993)].

Segundo Pope [1983], apesar de instável a $\text{pH} \geq 7$, a espécie V_{10} mantém a sua integridade por períodos de tempo até 2 dias, devido a possuir uma taxa de desoligomerização lenta, contrariamente aos oxovanadatos lábeis presentes nas soluções de metavanadato.

2.1.4. Formação de complexos vanadato-ligando biogénico

É de extrema importância a caracterização e controlo das condições de reacção, com o objectivo de assegurar a reproducibilidade e a não ocorrência de artefactos, principalmente quando se sabe que o vanadato interacciona com vários dos tampões rotineiramente utilizados nos ensaios experimentais. Para além disso, é comum a adição, aos meios de reacção, de determinados compostos que poderão eventualmente ocultar o efeito promovido pelo vanádio no sistema em estudo.

Em geral, o tampão mais adequado ao estudo da química do vanádio e dos seus efeitos em cinéticas enzimáticas, que não envolvam químicas de oxido-redução, é o HEPES, ácido(N-2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano sulfónico [Crans *et al.*, 1989]. O vanadato não interacciona significativamente com este tampão e a estabilidade dos complexos formados em solução aquosa parece não ser afectada. No entanto, quando o tampão HEPES não é compatível com o sistema enzimático em estudo, o uso do tampão Tris (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) é o mais aconselhado, desde que usado em concentrações reduzidas, uma vez que uma solução contendo 20 mM Tris e 1 mM vanadato irá conter a pH neutro aproximadamente 0.01 mM de complexo vanadato-Tris [Tracey e Gresser, 1988]. Outros compostos com capacidade tampão de pH, tais como o TAPS, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropano sulfónico; MES, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico; Pipes, piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico); ou, acetato podem ser usados em estudos com vanadato, ainda que ocorra a formação de complexos vanadato-tampão para concentrações elevadas [Crans, 1994]. Para o estudo das interacções de vanadatos com enzimas, monitorizadas através das reacções de oxido-redução NADH/NAD⁺ ou NADPH/NADP⁺, o imidazole é o tampão de eleição, uma vez que os tampões HEPES e Tris suportam a reacção química entre o vanadato e o cofactor NADH ou NADPH [Vyskocil *et al.*, 1980]. De entre os tampões a evitar,

incluem-se a trietanolamina; tricina, N-tris(hidroximetil)metil-glicina; bicina, N,N'-bis(2-hidroxietil)glicina; fosfato; citrato; e, glicilglicina [Crans, 1994]. O vanadato interacciona fortemente com todos estes tampões, formando complexos e como tal, resultando em soluções de vanadato contendo concentrações reduzidas de vanadato livre para interagir com o sistema, ou outras biomoléculas, em estudo.

Por outro lado, o vanadato pode também formar complexos com alguns dos aditivos adicionados às preparações proteicas para promover a estabilidade das proteínas. Compostos como EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e citrato são muitas vezes adicionados para protecção contra metais pesados e os seus efeitos nefastos; compostos como o DTT (ditiotreitól) ou β -mercaptoetanol são adicionados para manutenção de um ambiente redutor e prevenção da oxidação proteica; compostos como o glicerol ou a sacarose são adicionados para preservação das proteínas durante a sua congelação. Crans [1994] descreveu a formação de um complexo muito estável entre o catião VO_2^+ e o anião EDTA, para concentrações de vanadato e ligando na ordem de μM . Desta forma, devem ser usados substitutos do EDTA tais como o EGTA, ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetileter)N,N,N',N'-tetra-acético, menos efectivos na complexação com o vanadato [Crans *et al.*, 1989]. O composto DTT, por sua vez, reduz rapidamente o vanadato a vanadilo. Ainda que menos eficaz na promoção desta redução, o β -mercaptoetanol também induz o mesmo efeito, pelo que, sempre que possível, deverão ser evitados os tais como elementos constituintes dos meios de reacção [Crans, 1994]. Demonstrou-se ainda que o vanadato forma complexos com glicerol [Crans, 1994] e sacarose [Aureliano e Madeira, 1998], pelo que deverão ser igualmente evitados nos meios reaccionais ou tidos em consideração para a análise dos efeitos promovidos pelo vanadato.

Resumindo, uma vez que cada sistema biológico requer tampões e aditivos específicos para a manutenção das suas propriedades e actividades, e na consequente impossibilidade de seleccionar um meio de ensaio ideal para todos os sistemas, sugere-se que se encontre aquele que melhor se adequa ao sistema em estudo e com o qual o vanadato interaccione o mínimo possível.

2.1.5. Caracterização das soluções de vanadato por espectroscopia de absorção ultravioleta/visível

O estudo das regiões ultravioleta e visível (UV/Vis) do espectro electromagnético baseia-se na absorção desta radiação por parte do grupo cromóforo (unidade estrutural de determinado composto que absorve de modo mensurável a radiação incidente). De acordo com a lei de Lambert-Beer, esta absorção é proporcional à concentração de cromóforo (e consequentemente, ao composto que o possui). Assim, as técnicas associadas às regiões UV/Vis do espectro electromagnético de um determinado composto não só constituem um método de análise quantitativa, baseando-se no facto de certos cromóforos absorverem comprimentos de onda específicos, como também permitem uma análise qualitativa do composto, tanto no seu estado puro como em misturas biológicas. Dado que muitos desses compostos possuem espectros de absorção característicos nas regiões UV/Vis, que permitem a sua identificação, estas técnicas podem ainda facultar informações relativas a alterações ocorridas no ambiente físico-químico desse cromóforo.

A espectroscopia de absorção UV/Vis foi uma das primeiras técnicas utilizadas para esclarecer alguns aspectos da química do vanádio(V), tais como a caracterização de diferentes espécies oligoméricas de vanadato [Ingrid e Brito, 1959; Borgen *et al.*, 1977; Coan *et al.*, 1986; Legrum, 1986]. A cor amarelo-alaranjada observada nas soluções de

vanadato deve-se a uma absorção intensa na zona terminal do UV. Foi determinado o espectro de absorção na região do UV, para cada espécie de vanadato, através do cálculo de constantes de equilíbrio de formação das diversas espécies oligoméricas de vanadato [Borgen *et al.*, 1977]. No entanto, a sobreposição dos espectros de absorvência para cada isômero de vanadato, levou à adoção preferencial da espectroscopia de RMN do isótopo 51 de vanádio (RMN de ^{51}V), onde as ressonâncias de cada espécie de vanadato se encontram bem resolvidas [Wilson e Walker, 1999].

2.1.6. Caracterização das soluções de vanadato por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A RMN é uma técnica espectroscópica que monitoriza a absorção de energia associada a transições de núcleos entre níveis de energia magnética nuclear adjacentes. Esta energia é medida como uma função do campo magnético externo aplicado, sendo o resultado um espectro de absorção em função da força do campo [Cantor e Schimmel, 1980].

A análise dos parâmetros dos sinais de um espectro de RMN de um determinado núcleo molecular fornece informações sobre a estrutura da molécula, as interações intermoleculares e ainda, sobre os processos dinâmicos em solução. Embora a maioria da informação obtida seja de natureza qualitativa, a espectroscopia de RMN pode fornecer também dados quantitativos relevantes.

As bandas de ressonância de forma lorentziana, na região das radiofrequências do espectro electromagnético, que constituem um espectro de RMN, apresentam os seguintes parâmetros espectrais (Fig. 2.3): 1) desvio químico, δ (posição de cada banda relativamente ao desvio químico da referência, δ_0); 2) amplitude (altura do sinal em unidades arbitrárias); 3) intensidade (área da banda); 4) largura a meia altura, $\Delta\nu_{1/2}$

(medida da largura do sinal a metade da amplitude máxima, em Hz); 5) constante de acoplamento de *spin*, J (separação, em Hz, entre os sinais de um multiplete); 6) tempos de relaxação de *spin* nuclear longitudinal (T_1) e transversal (T_2) [James, 1975]. A análise destes parâmetros pode ser usada para a obtenção informações sobre a estrutura, ambiente químico, mobilidade, concentração, interação entre moléculas, ou ainda sobre processos cinéticos.

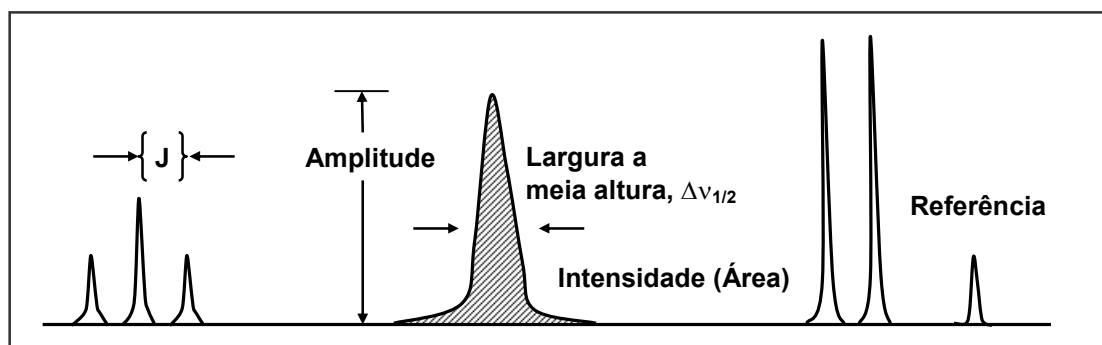


Figura 2.3 – Parâmetros espectrais de ressonância magnética nuclear. [Adaptado de James (1975)].

Os desvios químicos (δ) reflectem a mudança do ambiente químico em torno do núcleo, sendo o alargamento do sinal uma consequência de processos dinâmicos em solução. Os desvios químicos podem ser expressos em termos da frequência (Hz) a que um sinal surge relativamente a um sinal de referência. No entanto, uma vez que o desvio químico é dependente da intensidade do campo magnético aplicado, é preferível expressá-lo em função do campo magnético necessário para obter a condição de ressonância. Consequentemente, o desvio químico é usualmente referido com um número adimensional, expresso em partes por milhão (ppm).

O valor da $\Delta\nu_{1/2}$ de um sinal de RMN encontra-se directamente relacionado com o tempo de relaxação *spin-spin* (relaxação transversal, T_2) do núcleo em questão (Equação 2.1).

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi} \times T_2 \quad [\text{Eq. 2.1}]$$

Para o valor de $\Delta\nu_{1/2}$ não contribui somente o valor de T_2 , que representa o tempo relativo ao processo de relaxação *spin-spin*, mas também a heterogeneidade do campo magnético exterior [Gil e Gerald, 1987]. Quando um núcleo quadrapolar é colocado sob a acção de um campo magnético, o valor de T_2 depende inversamente do tempo de correlação rotacional (τ_r) do sistema que por sua vez, varia com a dimensão da molécula (suposta esférica) e com a viscosidade do meio onde ela se move. Deste modo, o tempo de correlação rotacional aumenta na presença de macromoléculas, soluções viscosas e temperaturas baixas. O valor de T_2 depende ainda de outros factores que afectam a relaxação *spin-spin*, assim como o valor da largura do sinal a $\Delta\nu_{1/2}$. Uma contribuição por vezes importante resulta da presença de substâncias paramagnéticas em solução que ao afectar o valor de $\Delta\nu_{1/2}$, o sinal de RMN deixa de ser observável.

As propriedades magnéticas do vanádio adequam-se ao estudo deste elemento por espectroscopia de RMN. O isótopo 51 de vanádio (^{51}V) tem uma abundância natural de cerca de 100%, um *spin* nuclear de 7/2 e apresenta uma sensibilidade de 39% relativamente ao ^1H . Apesar do ^{51}V possuir um momento quadrangular, este é muito pequeno, não sendo os sinais detectados excessivamente largos ($\Delta\nu_{1/2}$ entre 60 e 100 Hz, no caso dos vanadatos tetraédricos ou aproximadamente tetraédricos) [O'Donnel e Pope, 1976; Heath e Howarth, 1981; Rehder, 1982; Drakenberg, 1986; Howarth, 1990]. Estas características tornam o núcleo de ^{51}V um dos mais bem sucedidos em estudos de RMN, particularmente em estudos que envolvem as espécies diamagnéticas (como as de vanadádio(V)), uma vez que, para as espécies paramagnéticas (como as do vanádio(IV)), os sinais alargam-se tanto que deixam de ser observáveis [Chasteen, 1983; Rehder, 1982].

Cada espécie de vanadato origina ressonâncias bem resolvidas no espectro de RMN, cuja localização é sensível ao estado de protonação da solução (Tabela 2.1) [Crans e Amin, 1998]. Uma vez que as diversas espécies têm tempos de relaxação semelhantes [Heath e Howarth, 1981], a integração dos sinais fornece a fração molar de cada espécie que pode ser usada para calcular as concentrações de cada oligômero [Crans, 1994].

Tabela 2.1 – Fórmulas, valores de pKa, desvios químicos, cor e estrutura das principais espécies de vanadato em solução aquosa. [Adaptado de Crans *et al.* (1990)].

Fórmula	pKa	Desvio químico (ppm)	Cor e estrutura
VO_4^{3-}	-	-541.2	incolor; linear
HVO_4^{2-}	~12	-538.8	incolor; linear
H_2VO_4^-	7.1	-560.4	incolor; linear
$\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$	-	-561.0	incolor; linear
$\text{HV}_2\text{O}_7^{3-}$	8.9	-563.5	incolor; linear
$\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$	7.2	-572.7	incolor; linear
$\text{V}_4\text{O}_{13}^{6-}$	-	-564 a -572	incolor; linear
$\text{HV}_4\text{O}_{13}^{5-}$	8.3	-	-
$\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$	-	-574.9	incolor; cíclica
$\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$	-	-582.7	incolor; cíclica
$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	-	-423, -497, -514	amarelo/laranja; <i>cluster</i>
$\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$	5.7	-424, -500, -516	amarelo/laranja; <i>cluster</i>
$\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{4-}$	3.6	-425, -506, -524	amarelo/laranja; <i>cluster</i>
$\text{H}_3\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{3-}$	1.6	-427, -515, -534	amarelo/laranja; <i>cluster</i>

Em geral, é possível obter uma boa correlação entre as simetrias do centro de coordenação (tetraédrica, octaédrica, bipiramidal trigonal) e os desvios químicos (que variam entre -480 e -600 ppm relativamente à referência VOCl_3) ou as larguras a meia altura dos sinais de RMN de ^{51}V [Rehder, 1982]. Em núcleos com momentos quadrapolares, os valores de $\Delta\nu_{1/2}$ dependem da simetria de coordenação, contribuindo a formação de compostos com simetrias distorcidas para o aumento deste valor, como é o caso do complexo $\text{VO}_2(\text{EDTA})^{3-}$ (Tabela 2.2). As espécies de vanádio ligadas a proteínas também apresentam um alargamento do sinal, devido a um aumento do tempo de correlação rotacional e/ou à redução na simetria do campo eléctrico devido a um átomo dador da proteína na esfera de coordenação do vanádio [Crans *et al.*, 1990; Wittenkeller *et al.*, 1991]. Se uma determinada espécie de ^{51}V na presença de uma proteína sofrer um alargamento acentuado do seu sinal de RMN, é possível que esse alargamento resulte de uma interacção (covalente ou não) dessa espécie com a proteína num regime de troca rápida entre a espécie livre em solução e a espécie complexada [Crans *et al.*, 1990; Wittenkeller *et al.*, 1991; Crans, 1994].

Tabela 2.2 – Valores de largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) registados em vários tipos de coordenação de átomos de vanádio. [Adaptado de Rehder (1982)].

Simetria do vanádio	Complexo ou espécie	$\Delta\nu_{1/2}$
Tetraédrico	VOCl_3 ; VO_4^{3-}	< 10-60
Quase tetraédrico	H_2VO_4^- ; “ VO_4^{3-} ”	80
Tetragonal	$\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$; $\text{V}_3\text{O}_9^{3-}$	150-180
Tetragonal	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	150 (10A) ¹
(com átomos de vanádio vizinhos)	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	150 (10B) ¹
	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	350 (10C) ¹
Rômbico	$\text{VO}_2(\text{EDTA})^{3-}$	800

¹10A, 10B e 10C: referem-se às três bandas que se observam no espectro de RMN de ^{51}V , correspondentes à espécie decamérica de vanadato.

2.1.8. Estudo da redução de vanadato a ião vanadilo por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica

A espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE) baseia-se em princípios físicos semelhantes aos da espectroscopia de RMN e tem em atenção o facto de um electrão desemparelhado possuir também um momento magnético de *spin* quando sujeito à acção de um campo magnético externo. No entanto, o momento magnético de *spin* associado a um electrão desemparelhado é 10^3 vezes superior ao do núcleo e, conseqüentemente, enquanto que os ensaios de RMN são medidos na gama de frequências dos MHz (zona das radio-ondas do espectro electromagnético), a RPE requer frequências na gama dos GHz (zona das micro-ondas) [Cantor e Schimmel, 1980].

As características dos sinais de um espectro de RPE de uma dada molécula com um electrão emparelhado podem ser afectadas por dois factores: o factor g e a interacção nuclear hiperfina (Fig. 2.4). Para um electrão livre no vácuo, o factor g tem um valor de 2.0023, no entanto, pode ter vários valores para amostras paramagnéticas diferentes. Deste modo, os valores experimentais de g podem ser usados na identificação do respectivo grupo químico paramagnético. A interacção nuclear hiperfina de um electrão desemparelhado com um núcleo possuindo um número quântico de *spin* I origina $2I + 1$ linhas no espectro de EPR [Cantor e Schimmel, 1980]. O espaço entre as linhas depende da força de acoplamento e designa-se de constante isotrópica hiperfina de acoplamento (A). Tanto o factor g como A são sensíveis à orientação da molécula relativamente ao campo externo, à mobilidade molecular, assim como, à polaridade do ambiente local e, como tal, a análise dos sinais de RPE pode facultar informações sobre a estrutura, mobilidade e polaridade da molécula em estudo [Cantor e Schimmel, 1980].

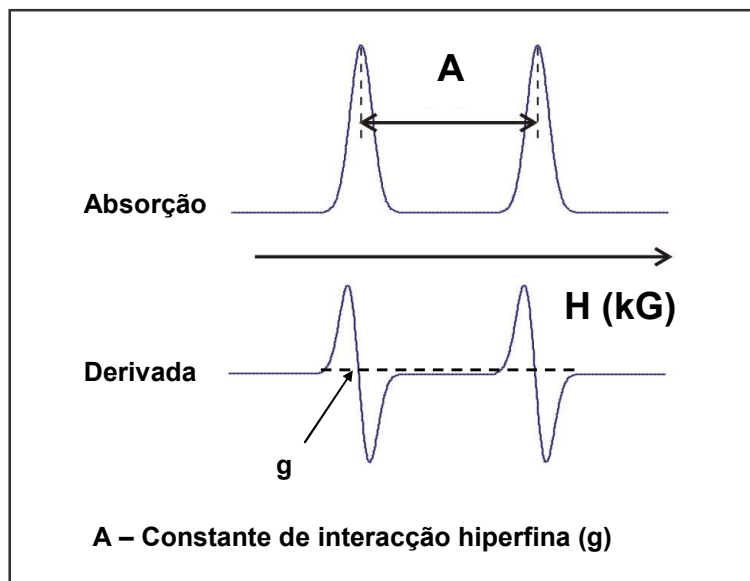


Figura 2.4 – Parâmetros espectrais de ressonância paramagnética electrónica.

A espectroscopia de RPE é, regra geral, o método preferencial para a caracterização do ião vanadilo (VO^{2+}), e seus complexos, nomeadamente com proteínas. O vanadilo é caracterizado por quatro ligandos equatoriais e um axial correspondente ao grupo oxo na posição trans, assumindo assim uma posição octaédrica. Devido ao *spin* nuclear ($I = 7/2$) e à anisotropia da molécula, o electrão desemparelhado de VO^{2+} origina um espectro de RPE composto por duas séries de oito transições correspondentes à fracção de moléculas com a ligação V=O alinhada paralelamente ou perpendicularmente ao campo magnético. O centro de cada série de oito transições e o espaço entre elas é definido pelos valores de g e **A**, respectivamente. A magnitude destes valores, por sua vez, depende da força de acoplamento hiperfino entre o electrão desemparelhado e o núcleo de ^{51}V [Chasteen, 1983].

2.1.9. Objectivos

Esta secção tem por objectivo caracterizar as espécies oligoméricas de vanadato presentes nas soluções de decavanadato e metavanadato, por espectroscopia de absorção UV/vis e RMN, nas condições experimentais do presente estudo. Para além da identificação e determinação da concentração das espécies oligoméricas nas soluções de vanadato, pretende-se analisar a estabilidade das espécies decaméricas de vanadato nas diferentes condições experimentais estudadas (após administração *in vivo*; estudos *in vitro* com mitocôndrias isoladas; e em culturas primárias de miócitos cardíacos) e a sua interacção com os sistemas analisados. Por último, monitorizou-se a eventual redução/decomposição do vanadato decamérico a pH neutro, com a concomitante formação de vanádio(IV) por espectroscopia UV/Vis e RPE.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados, de elevado grau de pureza, foram obtidos através de empresas especializadas, nomeadamente o metavanadato de amónia (NH_4VO_3) foi adquirido à companhia Riedel-de Haën e o sulfato de vanadilo (VOSO_4) à empresa Aldrich. A caracterização e o estudo da estabilidade das espécies oligoméricas de vanadato, nas condições experimentais dos estudos realizados com culturas primárias de cardiomiócitos de rato (Secção 5), foram executados em meio de crescimento *Dulbecco's modified Eagle's medium* F-12 (DMEM) sem vermelho de fenol (D-6434, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), evitando deste modo a interferência da absorvência deste indicador de pH nos estudos de espectroscopia UV/visível (Secção 2.2.3.).

2.2.2. Preparação de soluções de vanadato

As soluções concentradas de metavanadato (50 mM, pH aproximadamente 7.0) foram preparadas a partir de metavanadato de amónia. As soluções concentradas de decavanadato foram obtidas após acidificação (com HCl) das soluções de metavanadato a pH 4.0 [Aureliano e Madeira, 1994]. Quando ajustada a pH 4.0, a solução de metavanadato muda de cor amarelo claro para laranja, indicativo da presença de espécies decaméricas (V_{10}). As soluções foram armazenadas a 4 °C e mantidas a esta temperatura durante a sua utilização.

Imediatamente antes da administração intravenosa das soluções, o pH das soluções de decavanadato foi sempre ajustado a aproximadamente 7.0 com NaOH; ambas as soluções foram diluídas para a concentração de administração (1 ou 5 mM) em solução fisiológica (NaCl 0.9%) e mantidas a 4 °C até à sua administração.

Também na realização dos estudos *in vitro* com mitocôndrias isoladas (Secção 4) e durante tratamento dos miócitos cardíacos (Secção 5), as soluções de vanadato usadas foram acertadas a pH 7.0 imediatamente antes de serem diluídas para a concentração desejada (gama μM), nos respectivos meios de diluição, e adicionadas aos meios reaccionais utilizados nos estudos *in vitro* ou ao meio de cultura dos cardiomiócitos.

2.2.3. Caracterização das soluções de vanadato por espectroscopia de absorção ultravioleta/visível

Os espectros de absorção ultravioleta/visível (UV/Vis) de 1 mM vanádio total das soluções concentradas de decavanadato e metavanadato foram adquiridos em espectrofotómetros de duplo feixe *Hitachi U-2000* e *Shimadzu* modelo *UV-2401 PC* (espectrofotómetro computadorizado), nas seguintes condições: fenda, 1 nm; intervalo espectral, 230-750 nm; velocidade de varrimento, 60 nm/min; temperatura, 25 ou 37 °C; e, em células de quartzo com 1 cm de percurso óptico. A correcção da linha de base foi realizada com o meio de ensaio onde as soluções de vanadato foram diluídas (NaCl 0.9%, tampão de respiração mitocondrial e DMEM sem vermelho de fenol). Após a aquisição dos espectros característicos das soluções de vanadato obtiveram-se espectros da 2ª derivada e o gráfico de ln absorvência *versus* tempo a partir dos espectros de absorção e do gráfico de absorvência *versus* tempo, respectivamente.

Estudo da estabilidade das soluções de decavanadato

Apesar da instabilidade das espécies decaméricas de vanadato, a pH 7.0, ser descrita em vários estudos [Pope, 1983; Aureliano e Madeira, 1998], apenas recentemente se determinou a estabilidade das espécies V_{10} nas soluções de decavanadato, ou seja, o

tempo de permanência destes oligômeros em solução [Soares *et al.*, 2003; Gândara *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2006; 2007a; 2007b; 2007c]. A estabilidade do vanadato decamérico varia com as condições experimentais (temperatura, pH, força iônica, composição do meio de diluição) e pode ser facilmente avaliada por espectroscopia UV/Vis. Após o ajuste do pH da solução de decavanadato (solução concentrada a pH 4.0) a 7.0 com NaOH, diluíram-se as soluções concentradas de decavanadato e metavanadato para uma concentração final de 1 mM e monitorizou-se o desaparecimento (desoligomerização) das espécies decaméricas de vanadato a 400 nm, durante um máximo de 6 h, nos diferentes meios usados neste estudo (NaCl 0.9%, tampão de respiração mitocondrial e DMEM).

2.2.4. Caracterização das soluções de vanadato por espectroscopia de ressonância magnética nuclear do isótopo 51 de vanádio

A caracterização dos oligômeros de vanadato presentes nas soluções de decavanadato e metavanadato utilizadas ao longo deste trabalho foi realizada por espectroscopia de RMN do isótopo 51 de vanádio (^{51}V). Os espectros de RMN foram adquiridos num espectrofotômetro *Brüker AM-400 MHz* equipado com uma sonda multinuclear inversa de 5 mm. As amostras das soluções de vanadato (500 μl) suplementadas com 10% D_2O foram colocadas em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro, irradiadas a uma frequência de 105.2 MHz e os espectros adquiridos à temperatura ambiente da sonda. Foram utilizadas transformadas de Fourier com um alargamento das bandas (LB) de 20 Hz para o processamento dos espectros e os desvios químicos de ^{51}V foram expressos relativamente à referência externa, VOCl_3 (0 ppm), tendo-se usado a espécie tetramérica de vanadato como referência interna (-578 ppm a pH 7.0) [Heath e Howarth, 1981].

As condições espectrais de aquisição – largura do pulso (11 μ s), largura espectral (45 455 Hz), tempo de aquisição (0.045 s), tempo de excitação e de espera (0 s), número de transientes (30 000), tempo de relaxação (0.01 s), sequência de pulsos (90°), escala vertical, largura espectral, impressão – foram mantidas constantes entre ensaios para possibilitar a realização de análises quantitativas comparativas. A aquisição dos espectros demorou entre 5 (soluções concentradas de vanadatos, 50 mM vanádio total) e 30 min (amostras com 5 mM vanádio total).

Os valores das larguras a meia altura dos sinais de ressonância foram corrigidos relativamente ao valor atribuído para o alargamento das bandas (20 Hz). Deste modo, aos valores de largura a meia altura está associada uma variação de ± 10 Hz.

As áreas dos sinais de RMN correspondentes às várias espécies oligoméricas de vanadato foram obtidas por integração dos sinais e as concentrações relativas dos oligómeros de vanadato (V_x) foram calculadas a partir das fracções do total das áreas dos sinais observados no espectro (Equação 2.2).

$$[V_x] = \frac{A_x}{A_t} \times \frac{[V_t]}{n} \quad [\text{Eq. 2.2}]$$

O símbolo **A** corresponde à área medida para o sinal referente à ressonância da espécie oligomérica de vanadato x (A_x) com o número de agregação **n** (número de átomos de vanádio), A_t corresponde à soma total das áreas medidas e $[V_t]$ à concentração total de vanádio. As concentrações de oligómeros de vanadato calculadas apresentaram uma reprodutibilidade de 2-4%.

2.2.5. Análise da formação de produtos da redução dos vanadatos por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica

Os produtos da redução do vanadato (1 mM vanádio total) foram registados por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE) num espectrofotómetro computadorizado *Brüker EMX-300* a uma frequência de microondas de 9.654 GHz (banda X) equipado com um criostato *Oxford* (ESR900), num meio contendo tampão de respiração mitocondrial (Secção 5.2.2.) e 5 mM glutatona reduzida (GSH), na presença e ausência de 2 mg proteína mitocondrial/ml. Os espectros de vanádio reduzido, foram adquiridos usando uma potência de microondas de 2 mW e uma amplitude de modulação de 5 Gpp. Registaram-se os espectros à temperatura de 77 K em amostras de 0.2 ml com os seguintes parâmetros espectrais: ganho do receptor, 1.0×10^5 ; e uma média de 4 varrimentos, tal como anteriormente descrito [Soares *et al.*, 2007c].

Deteção por espectroscopia de ultravioleta/visível da formação de vanadilo (VO^{2+}) por redução do vanadato na presença de concentrações fisiológicas de glutatona

As alterações nos espectros de absorvência das soluções de vanadato a 700 nm, devido à formação de produtos da redução dos vanadatos [Ramasarma e Rao, 2006], foram monitorizadas à temperatura ambiente num espectrofotómetro *Shimadzu UV mini 1240*. A redução das espécies decaméricas e monoméricas de vanadato (1 mM vanádio total) foi avaliada através do registo da formação de produtos de redução, num meio contendo tampão de respiração mitocondrial (Secção 2.3.2.) e 5 mM GSH, na presença e ausência de 2 mg proteína mitocondrial/ml. Neste capítulo são apresentadas as alterações na absorvência a 700 nm e na taxa de formação dos produtos da redução do vanadato na presença de uma concentração fisiológica de GSH.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

São escassos os estudos que consideram a hipótese das espécies decaméricas (V_{10}) de vanadato poderem induzir efeitos em condições fisiológicas, uma vez que se considera que nestas condições o vanadato (estado de oxidação +5) se encontra, na sua quase totalidade, reduzido a vanadilo (+4) e que a concentração de vanadato decamérico é tão reduzida (ou não está presente por um período de tempo suficiente) para induzir efeitos nos sistemas biológicos [Edel e Sabbioni, 1993; Baran, 1998; Yang *et al.*, 2003].

A correcta caracterização da composição das soluções de vanadatos, assim como a determinação da estabilidade das espécies oligoméricas em solução, são de extrema importância para estabelecer a correlação entre os efeitos observados e as espécies oligoméricas presentes nas soluções de vanadato.

2.3.1. Preparação e análise da composição de soluções de vanadato

As soluções concentradas de decavanadato e metavanadato (50 mM) preparadas no presente estudo são essencialmente compostas pela espécie V_{10} e por espécies metaméricas $[(VO_3)_n]$ de vanadato, respectivamente [Aureliano e Madeira, 1998].

A composição oligomérica de uma solução de metavanadato, após diluição em meio de ensaio, depende essencialmente da concentração final de vanádio. A composição em oligómeros de vanadato da solução de decavanadato diluída depende, por sua vez, do período de tempo após diluição devido à ocorrência de desoligomerização da espécie decamérica de vanadato. Torna-se, portanto, importante a correcta caracterização da composição das soluções de vanadato, nas condições experimentais do estudo em questão, de modo a estabelecer-se uma correlação com os efeitos promovidos pela(s) respectiva(s) espécie(s) oligomérica(s) de vanadato no sistema biológico em estudo.

2.3.2. Caracterização das soluções de vanadato por espectroscopia de absorção ultravioleta/visível

A caracterização espectroscópica por ultravioleta/visível (UV/Vis) das soluções de vanadato mostra que a solução de decavanadato (1 mM vanádio total) apresenta um espectro característico (Fig. 2.5A) com absorção na gama do visível até 500 nm, devido à presença de espécies V_{10} que absorvem a 360 e 400 nm, enquanto que o espectro das soluções de metavanadato quase não apresentam absorvência a 400 nm. Esta banda larga de absorção é bem resolvida através da obtenção da derivada de 2ª ordem do espectro e apresenta dois vales com mínimos a 358 e 400 nm (Fig. 2.5B).

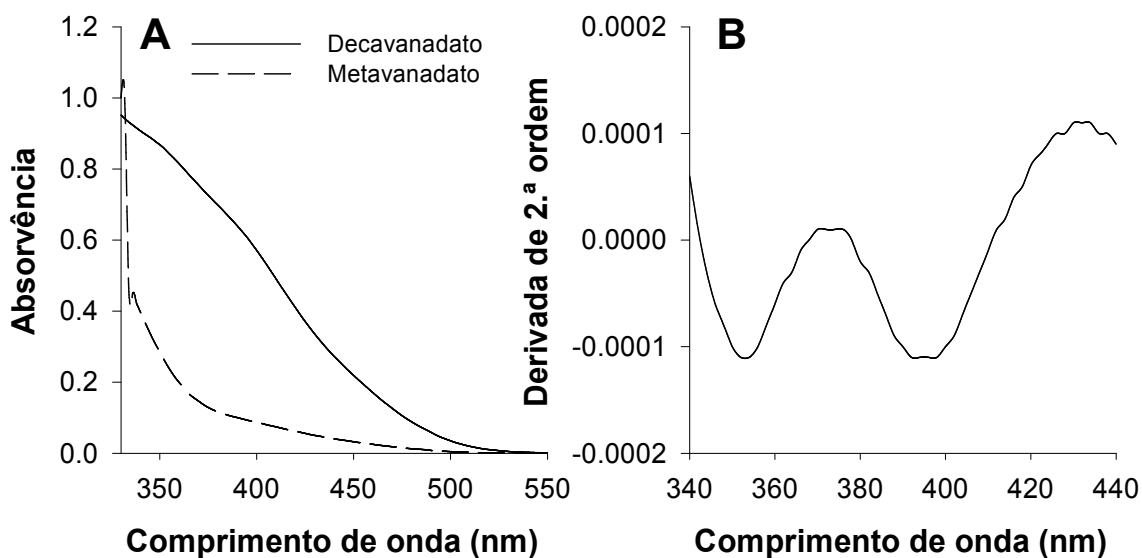


Figura 2.5 – Espectros de absorção de soluções de decavanadato e metavanadato (1 mM vanádio total, a pH 7.0) (A) e respectivas derivadas de 2.^a ordem do espectro de absorção da solução de decavanadato (B). O espectros foram adquiridos à temperatura de 25 °C.

Estudo da estabilidade das soluções de decavanadato

Enquanto que as soluções de metavanadato são estáveis, devido à presença de oxovanadatos lábeis que se interconvertem numa escala temporal de milissegundos a

segundos, as soluções de decavanadato, por contrário, são instáveis após diluição. O vanadato decamérico, presente nas soluções de decavanadato, apresenta uma cinética de decomposição lenta para vanadato monomérico (V_1) após diluição (Fig. 2.6A), com tempos de meia-vida que podem variar entre cerca de 2 a 11 h (Tabela 2.3) [Aureliano *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2003; 2006; 2007a; 2007b; 2007c; 2007d]. A estabilidade da espécie V_{10} nas soluções de vanadato diluídas depende do tempo após diluição, e das condições do próprio meio de diluição (pH, temperatura e força iônica).

Tabela 2.3 – Valores de tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) estimados para as espécies decaméricas de vanadato presentes nas soluções de decavanadato, após diluição em vários meios e respectivas temperaturas de incubação.

Meio	Temperatura	$t_{1/2}$	Autor
0.9% NaCl (pH 8.0)	25 °C	15 h	Aureliano <i>et al.</i> (2002)
		10 h	Soares <i>et al.</i> (2003)
		12 h	Soares <i>et al.</i> (2006)
		16 h	Soares <i>et al.</i> (2007a)
1 M Tris + 5 mM EDTA (pH 8.0)	25 °C	6 h	
GV ¹ + 5 mM EDTA (pH 8.0)	25 °C	11 h	Soares <i>et al.</i> (2003)
0.5 M fosfato (pH 7.2)	25 °C	2 h	
Tampão de respiração mitocondrial ²	25 °C	230 min	Soares <i>et al.</i> (2007c)
	37 °C	180 min	Soares <i>et al.</i> (2007b)
DMEM ³	37 °C	150 min	Soares <i>et al.</i> (2007d)

¹GV: eritrócitos hemolisados; ²Tampão de respiração mitocondrial: 0.2 M sacarose, 5 mM KH_2PO_4 , 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ e 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; ³DMEM: meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (meio de cultivo celular).

A desoligomerização das espécies V_{10} em vanadato V_1 (cujas soluções são transparentes) pode ser detectada por espectroscopia de absorção na região do UV/Vis,

uma vez que estas espécies apresentam uma banda característica na região do visível que não se regista para as outras espécies oligoméricas de vanadato, nomeadamente as presentes nas soluções de metavanadato (mono-, di-, tetra- e pentamérica) (Fig. 2.6). A estabilidade da espécie V_{10} após diluição da solução de decavanadato na solução salina (0.9% NaCl) usada para a administração *in vivo* das soluções de vanadato foi determinada através da absorção registada a 400 nm, a 25 °C. O ensaio revelou uma cinética de dissociação de 1ª ordem, caracterizada pela linearidade do ln da absorvência em função do tempo de aquisição espectral (Fig. 2.7). Verificou-se também, tal como anteriormente referido, que a estabilidade da espécie V_{10} em solução varia em função da temperatura, sendo favorecida a temperaturas mais baixas (25 °C: $t_{1/2} = 13 \pm 3$ h; 37 °C: $t_{1/2} = 165 \pm 21$ min).

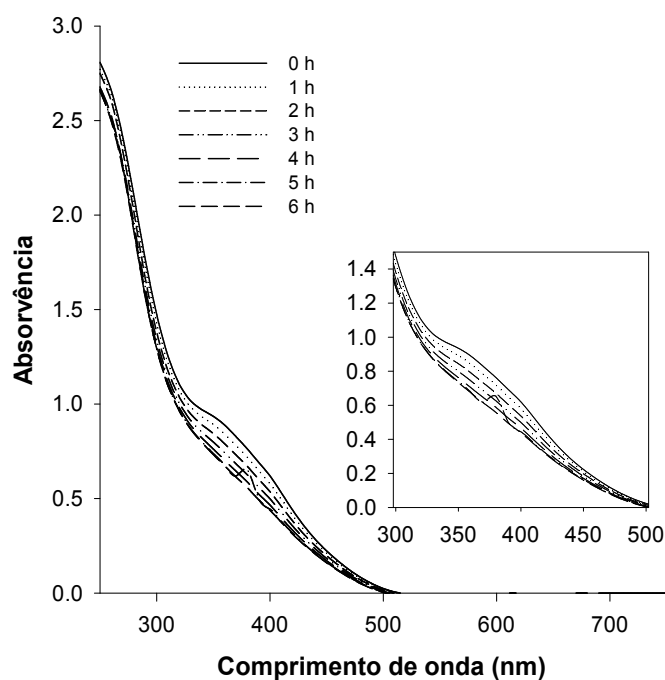


Figura 2.6 – Espectro UV/visível das soluções de decavanadato (1 mM vanádio total, a pH 7.0), após diluição das soluções concentradas em 0.9% NaCl, em função do tempo pós diluição (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h). Os espectros foram adquiridos à temperatura de 25 °C.

A linha de tendência observada (Equação 2.3), cujo declive é $-K$ e cuja intercepção do $\ln A$ é $\ln A_0$, permitiu descrever o tempo de meia-vida – que numa reacção de 1ª ordem é independente da concentração inicial do reagente – onde K representa a constante de 1ª ordem previamente determinada pelo declive da linha de tendência (Equação 2.4).

$$A = A_0 e^{-Kt} \quad [\text{Eq. 2.3}]$$

$$t_{1/2} = \ln \frac{2}{K} \quad [\text{Eq. 2.4}]$$

Após a determinação da constante de dissociação para espécie V_{10} , obteve-se um tempo de meia-vida entre 13 ± 3 h (estimação a partir de 1 mM vanádio total, ou seja, 100 mM espécie V_{10}) em 0.9% NaCl. Deste modo, este complexo oxoanião permanece relativamente estável à temperatura ambiente, permitindo estudar não só os seus efeitos *in vitro*, mas também *in vivo*. Recentemente, foi descrito que o vanadato pode ser estabilizado por interacção com proteínas do citoesqueleto e associadas à membrana [Ramos *et al.*, 2006].

Do mesmo modo, verificou-se também que, tal como anteriormente referido, a estabilidade da espécie V_{10} em solução depende da composição do meio de diluição, registando-se a 37 °C um $t_{1/2}$ de 180 e 150 min em tampão de respiração mitocondrial e DMEM, respectivamente (Tabela 2.3). Verificou-se igualmente que, no tampão de respiração mitocondrial a desoligomerização do vanadato decamérico foi acelerada à temperatura de 37 °C (25 °C: $t_{1/2} = 230$ min; 37 °C: $t_{1/2} = 180$ min) (Tabela 2.3).

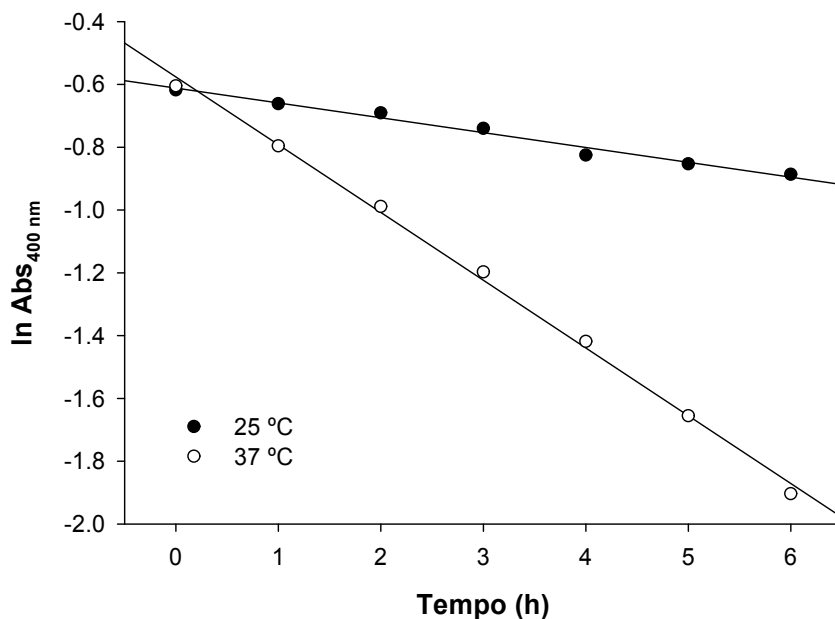


Figura 2.7 – Gráfico do ln da absorvência a 400 nm ($\ln \text{Abs}_{400 \text{ nm}}$) em função do tempo (h) para uma solução de decavanadato de 1 mM (vanádio total) após diluição da solução concentrada em 0.9% NaCl. O ensaio decorreu à temperatura de 25 e 37 °C.

A desoligomerização parcial da espécie decamérica de vanadato é evidente nas derivadas de 2ª ordem dos espectros (Fig. 2.8A). Os valores de absorvência registados a 358 e 400 nm apresentaram uma dependência linear em função do período de tempo pós diluição (na solução de injeção, 0.9% NaCl, assim como nos restantes meios de diluição) (Fig. 2.8B), indicando que as absorções que ocorrem neste comprimento de onda se encontram efectivamente relacionadas com a espécie decamérica de vanadato.

Após o tempo de meia-vida estimado, os espectros de RMN (Secção 2.3.3.) apresentam para além das espécies decaméricas de vanadato, outras espécies presentes nas soluções de metavanadato [Aureliano e Madeira, 1994; 1998; Aureliano e Gândara, 2005]. Nas condições do presente estudo, e uma vez que para concentrações inferiores a 100 μM as soluções de metavanadato são maioritariamente constituídas por V_1 [Aureliano *et al.*, 1998], considera-se que nas concentrações usadas as soluções de metavanadato contêm unicamente espécies monoméricas de vanadato.

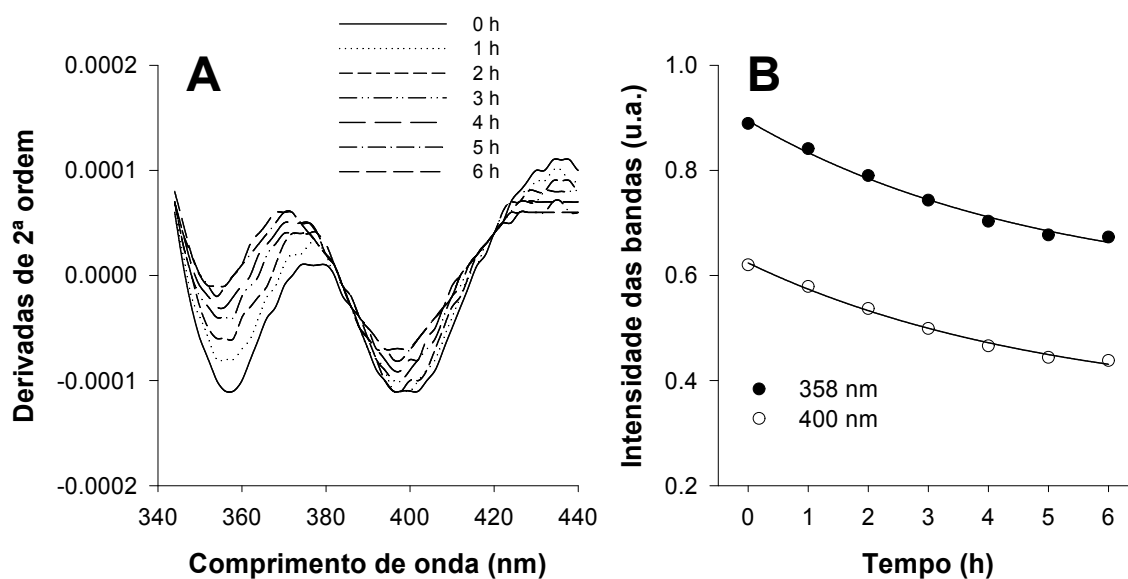


Figura 2.8 – Derivadas de 2.^a ordem (A) de soluções de decavanadato e metavanadato (1 mM vanádio total, a pH 7.0) após diluição das soluções concentradas em 0.9% NaCl (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) e variação dos mínimos obtidos a 358 e 400 nm, após derivação dos espectros, em função do tempo pós diluição (B).

2.3.3. Estudo da composição das soluções de vanadato por espectroscopia de ressonância magnética nuclear do isótopo 51 de vanádio

Metaforicamente, o estudo dos efeitos do vanadato nos sistemas biológicos pode ser comparado a um *iceberg*: existe uma parte invisível, que pode não ser a mais interessante, mas é certamente a de maior importância [Aureliano e Gândara, 2005]. Deste modo, é de extrema importância proceder à correcta caracterização da composição das soluções de vanadato e das suas interacções com o sistema em estudo, antes de proceder à análise dos efeitos por elas promovidos. Uma vez que a maioria das espécies de vanadato podem ser detectadas por RMN de ^{51}V , recorreu-se a esta técnica para avaliar a composição das soluções de vanadato, assim como detectar eventuais interacções dos oligovanadatos com os constituintes dos meios de diluição (0.9% NaCl, tampão de respiração mitocondrial e DMEM).

Tal como verificado por RMN de ^{51}V , as soluções concentradas de decavanadato (50 mM vanádio total, a pH 4.0) contêm unicamente V_{10} , um oligómero composto por octaedros de vanadato fundidos com um estrutura elipsoidal de aproximadamente 10 Å de largura, uma vez que foram observados os três sinais correspondentes aos três átomos da estrutura da espécie decamérica de vanadato [Howarth e Jarrold, 1978; Rehder, 1995]: $\text{V}_{10\text{A}}$ a -517 ppm, $\text{V}_{10\text{B}}$ a -501 ppm e $\text{V}_{10\text{C}}$ a -426 ppm (Fig. 2.9A). Contrariamente às soluções concentradas de decavanadato, que contêm unicamente espécies V_{10} , as soluções concentradas de metavanadato contêm espécies de orto- e metavanadato [Soares *et al.*, 2007a]. Detectaram-se, nos espectros de RMN das soluções concentradas de metavanadato (50 mM vanádio total, a pH 6.7), espécies mono- (V_1), di- (V_2), tetra- (V_4) e pentaméricas (V_5) de vanadato a -561 ppm, -575 ppm, -579 ppm e -587 ppm, respectivamente (Fig. 2.9B), tal como descrito por Aureliano e Madeira [1994].

Após diluição em meio de injeção (0.9% NaCl), o espectro de RMN da solução de decavanadato (5 mM vanádio total, pH 7.0) – contendo presumivelmente só espécies decaméricas de vanadato – encontra-se contaminado com espécies monoméricas de vanadato, apresentando para além dos sinais de RMN das espécies decaméricas um sinal a -562 ppm, com uma largura a meia-altura de 55 Hz (Tabela 2.4). Nesta solução, a concentração de oligómeros de vanadato presentes foi de 488 e 126 μM para a espécie decamérica e monomérica de vanadato, respectivamente. De acordo com os desvios químicos apresentados (Tabela 2.4), concluiu-se que a espécie decamérica encontra-se na forma protonada ($\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$) tal como previsto para um valor de pH superior a 5.7 de acordo com o descrito por Crans *et al.* [1990] (Tabela 2.1).

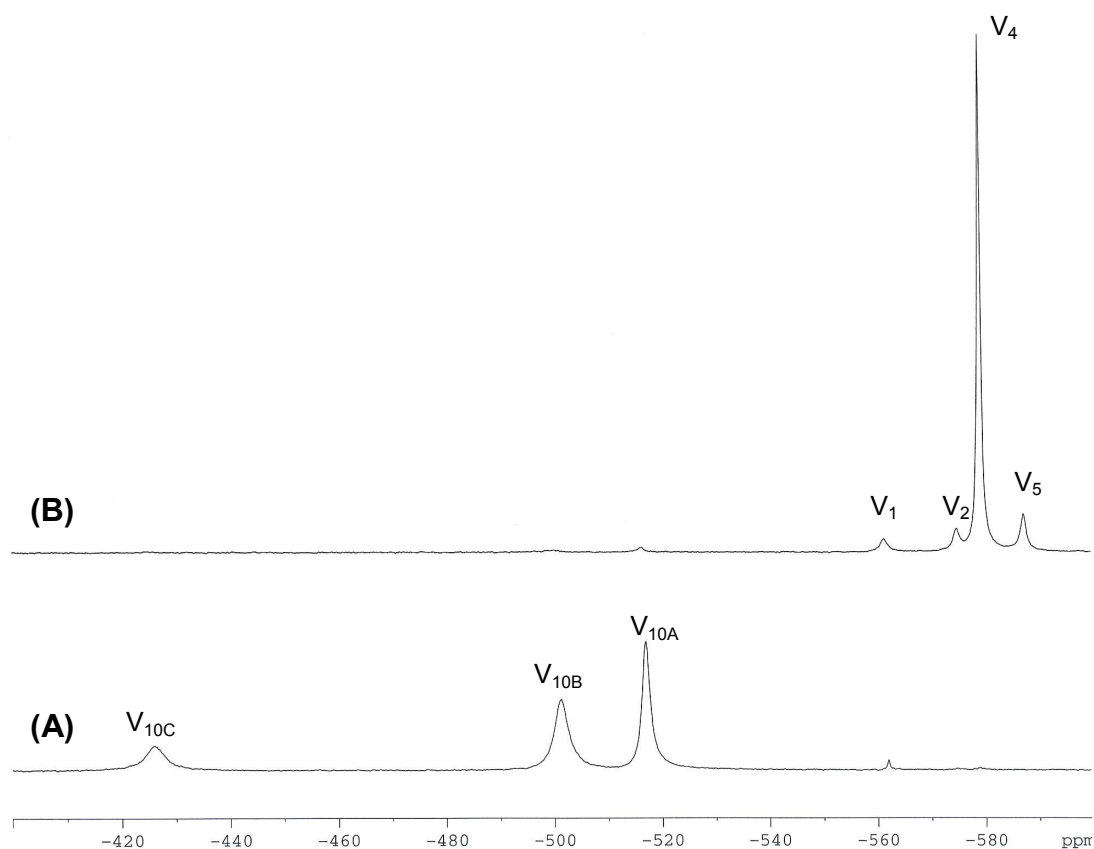


Figura 2.9 – Espectros de RMN do isótopo 51 de vanádio (105.2 MHz), à temperatura ambiente, de soluções concentradas de decavanadato (pH 4.0) (A) e metavanadato (pH 6.7) (B) (50 mM de vanádio total). Todos os espectros foram adquiridos na presença de 10% D₂O. V_{10A}, V_{10B} e V_{10C} representam sinais dos átomos de vanádio da espécie decamérica (V₁₀O₂₈⁶⁻). Os sinais de RMN V₁ e V₂ correspondem, respectivamente, ao vanadato monomérico (VO₄³⁻, HVO₄²⁻ e H₂VO₄⁻) e dimérico (HV₂O₇³⁻ e H₂V₂O₇²⁻), independentemente do estado de protonação; enquanto que, V₄ e V₅ correspondem às espécies de vanadato tetramérico cíclico (V₄O₁₂⁴⁻) e pentamérico (V₅O₁₅⁵⁻), respectivamente.

A adição de 5% de plasma sanguíneo à solução salina (0.9% NaCl), não induz alterações na concentração das diferentes espécies de vanadato, nem na razão entre os oligómeros de vanadato, em ambas as soluções. Contudo, na presença de 10% de plasma os sinais de RMN tornaram-se de difícil detecção, provavelmente devido a um

alargamento dos picos, sugerindo a ocorrência de interações vanadato/proteína (*não apresentado*).

Tabela 2.4 – Parâmetros espectrais das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato (A) e metavanadato (B) após diluição em 0.9% NaCl (5 mM vanádio total, a pH 7.0), nomeadamente desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) e concentração da respectiva espécie oligomérica de vanadato (C). A concentração (C) das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato e metavanadato foram determinadas com recurso à Equação 2.2 (Secção 2.2.4.).

	Vanádio (5 mM, pH 7.0)						
	V ₁	V ₂	V ₄	V ₅	V _{10A}	V _{10B}	V _{10C}
A: decavanadato							
δ (ppm)	-561.7	-	-	-	-516.6	-500.8	-425.6
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	55	-	-	-	206	318	393
C (μ M)	126	-	-	-	214	195	79
B: metavanadato							
δ (ppm)	-561.2	-574.5	-578.8	-587.2	-	-	-
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	93	130	55	130	-	-	-
C (μ M)	443	389	903	33	-	-	-

Os valores de $\Delta v_{1/2}$ têm uma variação de ± 20 Hz.

Nas concentrações administradas *in vivo* no presente estudo (1 e 5 mM vanádio total), a concentração das espécies decaméricas aumenta linearmente com a concentração de vanádio total, enquanto que o vanadato monomérico não (Fig. 2.10A), tal como previamente descrito [Ramos *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2007a]. A concentração de cada oligómero de vanadato, determinada pela integração da respectiva área do espectro de RMN (Equação 2.2), em função da concentração total de vanadato presente em solução, apresenta um padrão distinto para cada espécie oligomérica. Este facto foi observado após diluição das soluções de metavanadato em meio de injeção

(0.9% NaCl): na gama de concentrações usadas neste estudo, estão presentes diferentes concentrações de V_1 , V_2 , V_4 e V_5 , favorecendo-se a formação de oligómeros de vanadato de maior massa molecular ao aumentar a concentração de vanádio total (Fig. 2.10B). A título de exemplo, 1 mM metavanadato contém, para além de cerca de 500 μM V_1 , 83 μM V_2 e 84 μM V_4 .

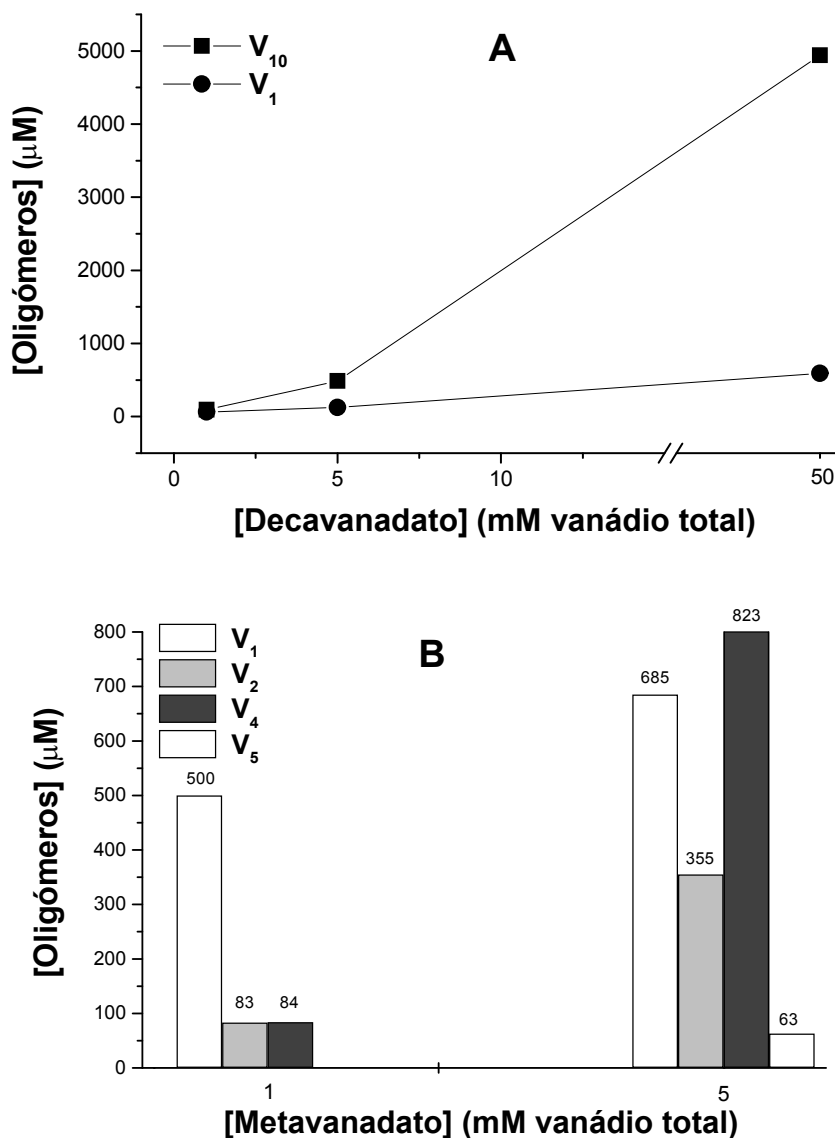


Figura 2.10 – Composição, em oligómeros de vanadato, das soluções concentradas de decavanadato (50 mM de vanádio total, pH 4.0) e após diluição (1 e 5 mM de vanádio total) no meio de injeção (NaCl 0.9%) (A). Distribuição das espécies oligoméricas de vanadato em função da concentração total de vanádio em soluções de metavanadato (pH 6.7), após diluição para 1 e 5 mM (vanádio total) na solução salina de injeção (NaCl 0.9%) (B).

No sentido de definir com precisão qual(ais) a(s) espécie(s) de vanadato responsável(eis) pelos efeitos observados na mitocôndria cardíaca de peixe e hepática de rato (Secção 4), procedeu-se à análise da composição em espécies oligoméricas das soluções de vanadato nas condições experimentais dos estudos *in vitro*. Observou-se que, também nestas condições experimentais (após diluição em tampão de respiração mitocondrial), a solução de decavanadato (5 mM de vanádio total em tampão de respiração mitocondrial, pH 7.0) é composta unicamente pela espécie decamérica de vanadato: V_{10A} a -516 ppm, V_{10B} a -499 ppm e V_{10C} a -425 ppm (Fig. 2.11A). Contrariamente, na solução de metavanadato (Fig. 2.11C), 5 mM total vanádio, para além dos sinais das espécies V_1 , V_2 e V_4 registados a -561 ppm, -575 ppm e a -579 ppm, respectivamente, foram observados dois novos sinais de vanadato no espectro de RMN de ^{51}V da solução de metavanadato após diluição no tampão de respiração mitocondrial (Fig. 2.11C): estes sinais de vanadato ligado, detectados a -555 ppm (C_1) e -540 ppm (C_2) são resultantes da presença de sacarose no meio, sendo C_1 e C_2 complexos de vanadato com isómeros geométricos de sacarose [Aureliano e Madeira, 1998].

A glutationa reduzida (GSH), numa concentração na ordem de milimolar – a gama de concentrações descrita na maioria dos tecidos de mamíferos – é conhecida por reduzir o vanadato (concentrações na ordem de milimolar) a vanádio (IV), a pH fisiológico [Macara *et al.*, 1980]. Na presença de 5 mM GSH, a concentração usada nos estudos do potencial da membrana mitocondrial (Secção 4.2.9.), os sinais de V_{10} sofreram uma diminuição da intensidade sem alargamento dos picos (Fig. 2.11B). Este decréscimo de intensidade dos sinais do vanadato decamérico deve-se à desoligomerização do V_{10} , uma vez que se observou que a GSH induz a sua decomposição (Secção 2.3.5.). De facto, observa-se um pequeno pico a -561 ppm após adição de 5 mM GSH (Fig. 11.2D). A eventual presença de espécies vanadilo em

solução iria induzir um alargamento dos sinais de V_{10} , para além de um aumento da razão sinal/ruído (não observada, ver Fig. 2.11B). A pH fisiológico, os sinais de RMN de vanadato observados na solução de metavanadato permaneceram inalterados após adição de GSH ao meio (Fig. 2.11D), apesar de se ter descrito que em eritrócitos humanos, na presença de GSH, o vanadato é reduzido a vanadilo e permanece ligado à hemoglobina [Macara *et al.*, 1980].

Contudo, na presença de 1 mg/ml de proteína mitocondrial, nem a concentração das diferentes espécies de vanadato nem a razão entre elas foi alterada em ambas as soluções (Tabela 2.5). Estes resultados revelaram que as espécies oligoméricas de vanadato não desaparecem totalmente nas condições usadas nos estudos cinéticos apresentados neste trabalho, o que permite relacionar os efeitos observados *in vitro* na integridade e funcionalidade mitocondrial com as espécies oligoméricas presentes nas soluções de vanadato.

Do mesmo modo, a caracterização das soluções de vanadato no meio DMEM sem soro demonstrou que, nestas condições, a solução de decavanadato (5 mM vanádio total, pH 7.0) contém essencialmente espécies decaméricas (V_{10A} a -516 ppm, V_{10B} a -499 ppm e V_{10C} -425 ppm) e um pequeno sinal a -560 ppm, correspondendo ao vanadato monomérico (Fig. 2.12A). Tal como anteriormente registado em NaCl, nestas condições, a solução de metavanadato (5 mM vanádio total) é composta por espécies V_1 , V_2 , V_4 e também V_5 a -560 ppm, -574 ppm, -579 ppm e -587 ppm (Fig. 2.12B).

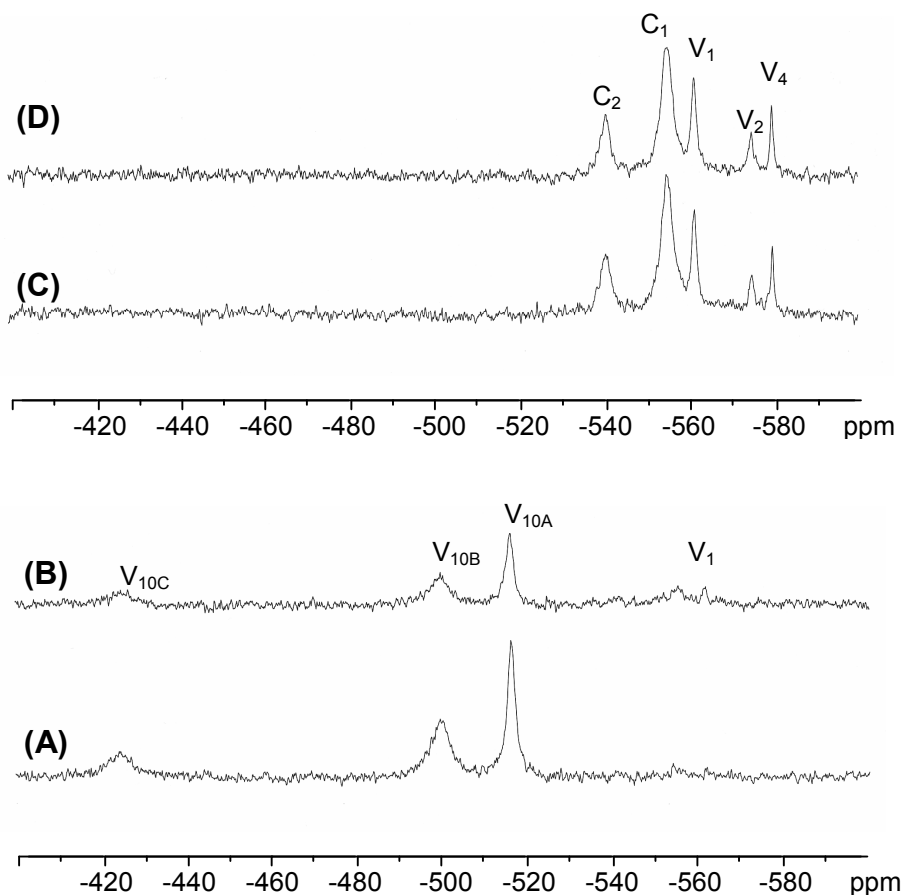


Figura 2.11 – Espectros de RMN do isótopo 51 de vanádio (105.2 MHz), à temperatura ambiente, de soluções concentradas de decavanadato (pH 7.0) (A e B) e metavanadato (pH 7.0) (C e D) (5 mM de vanádio total) em tampão de respiração mitocondrial (ver Secção 2.3.2.) suplementado com 5 mM piruvato e 0.5 mM malato, na ausência (A e C) e na presença (B e D) de 5 mM glutathiona (GSH). Todos os espectros foram adquiridos na presença de 10% D₂O. V_{10A}, V_{10B} e V_{10C} representam sinais dos átomos de vanádio da espécie decamérica. Na presença de GSH, observam-se novos sinais de RMN, C₁ e C₂, no espectro da solução de metavanadato (C e D). Os sinais de RMN V₁ e V₂ correspondem, respectivamente, ao vanadato monomérico e dimérico, independentemente do estado de protonação; enquanto que, V₄ corresponde à espécie de vanadato tetramérico cíclico. C₁ e C₂ correspondem a complexos sacarose:vanadato.

Tabela 2.5 – Parâmetros espectrais de RMN, à temperatura ambiente, das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato (A e B) e metavanadato (C e D) – 5 mM vanádio total, a pH 7.0 – em tampão de respiração mitocondrial (Secção 4.2.7.) suplementado com 0.5 mM malato e 5 mM piruvato, na ausência (A e C) e na presença (B e D) de mitocôndria cardíaca de peixe (1 mg proteína/ml), nomeadamente desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e concentração da respectiva espécie oligomérica de vanadato (C). O factor de alargamento da largura a meia altura (F) é definido como o coeficiente entre o valor da $\Delta\nu_{1/2}$ na ausência e na presença de proteína (1 mg/ml). A concentração (C) dos diferentes oligómeros de vanadato foi determinada a partir das fracções da integração das áreas totais observadas nos espectros correspondentes, com recurso à Equação 2.2 (Secção 2.2.4.).

	V_1	V_2	V_4	C_1	C_2	V_{10A}	V_{10B}	V_{10C}
(A) δ (ppm)						-516.6	-501.1	-425.9
(A) $\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)						243	431	431
(C) μM						209	188	92
(B) δ (ppm)						-516.7	-500.2	-525.5
(B) $\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)						243	431	431
(C) μM						214	203	84
F (relativo a A)						(1.0)	(1.0)	(1.0)
(C) δ (ppm)	-562.2	-574.8	-579.3	-554.3	-540.2			
(C) $\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	206	55	93	281	318			
(C) μM	721	175	164	nd	nd			
(D) δ (ppm)	-562.8	-574.7	-579.3	-554.1	-540.7			
(D) $\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	206	63	93	356	318			
(C) μM	809	136	108	nd	nd			
F (relativo a C)	(1.0)	(1.1)	(1.0)	(1.3)	(1.0)			

Os valores de $\Delta\nu_{1/2}$ têm uma variação de ± 20 Hz; nd: não determinado.

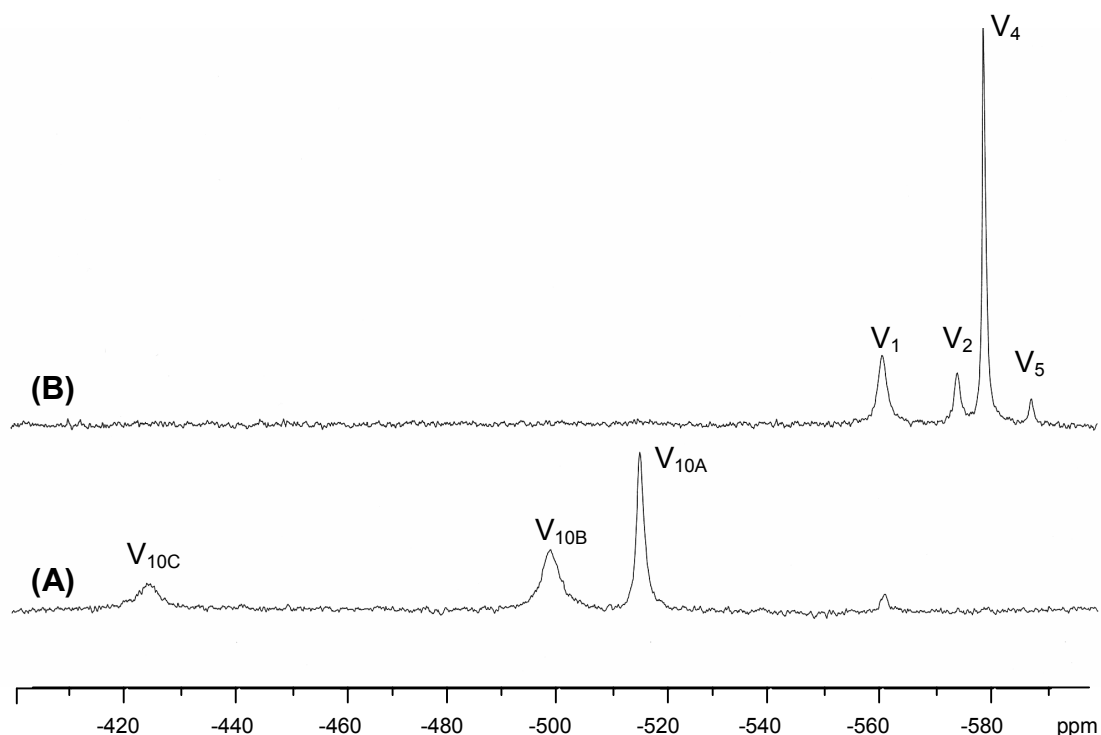


Figura 2.12 – Espectros de RMN do isótopo 51 de vanádio (105.2 MHz), à temperatura ambiente, de soluções concentradas de decavanadato (pH 7.0) (A) e metavanadato (pH 7.0) (B) (5 mM de vanádio total) em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM). Todos os espectros foram adquiridos na presença de 10% D₂O. V_{10A}, V_{10B} e V_{10C} representam sinais dos átomos de vanádio da espécie decamérica. Os sinais de RMN V₁ e V₂ correspondem, respectivamente, ao vanadato monomérico e dimérico, independentemente do estado de protonação; enquanto que, V₄ e V₅ correspondem às espécies de vanadato tetramérico e pentamérico cíclicos.

Obtiveram-se diferentes concentrações de V₁, V₂, V₄ e V₅ quando se preparou a solução de metavanadato no meio de crescimento sem soro, sendo favorecidos os oligômeros de vanadato de massas moleculares mais elevadas com o aumento da concentração total de vanadato, tal como descrito anteriormente [Soares *et al.*, 2007a]. Enquanto que 5 mM (vanádio total) da solução de decavanadato contém cerca de 480 μM V₁₀ (4.8 mM vanádio total como V₁₀) e 0.2 mM V₁, 5 mM da solução de metavanadato apresenta uma elevada contribuição de V₄ e V₂ (1.22 mM V₁, 0.706 mM

Soluções de vanadato

V₄ e 0.348 mM V₂, ou seja, 2.824 mM e 0.68 mM vanádio total como V₄ e V₂, respectivamente) (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 – Parâmetros espectrais das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato (A) e metavanadato (B) após diluição em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (5 mM vanádio total, a pH 7.0), nomeadamente desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e concentração da respectiva espécie oligomérica de vanadato (C). A concentração (C) das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato e metavanadato foram determinadas com recurso à Equação 2.2 (Secção 2.2.4.).

	Vanádio (5 mM, pH 7.0)						
	V ₁	V ₂	V ₄	V ₅	V _{10A}	V _{10B}	V _{10C}
A: decavanadato							
δ (ppm)	-560.3	-	-	-	-515.5	-498.9	-424.6
$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	168	-	-	-	130	393	431
C (μ M)	236	-	-	-	209	189	78
B: metavanadato							
δ (ppm)	-560.0	-573.8	-578.9	-587.4	-	-	-
$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	168	130	55	55	-	-	-
C (μ M)	1220	348	706	54	-	-	-

Os valores de $\Delta\nu_{1/2}$ têm uma variação de ± 20 Hz.

Deste modo, os efeitos diferenciais das soluções de decavanadato e metavanadato nos miócitos cardíacos em DMEM (Secção 5) podem ser inequivocamente atribuídos à espécie decamérica de vanadato unicamente em incubações até 2-3 h. Após este período de exposição, a solução de decavanadato irá conter não só vanadato decamérico como também outras espécies presentes na solução de metavanadato, de acordo com os dados anteriormente obtidos com outras soluções tampão [Aureliano *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003; 2006; 2007a]. Uma vez que as

soluções de metavanadato até 100 mM contêm maioritariamente V_1 [Aureliano e Madeira, 1998], em incubações mais longas das células com soluções de decavanadato somente os efeitos diferenciais, observados após tratamento com a solução de decavanadato *versus* a solução de metavanadato, podem ser interpretados como indicativos de um efeito específico do vanadato decamérico.

2.3.4. Detecção de produtos da redução dos vanadatos por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica

O vanádio(IV) é rapidamente formado em meio aquoso a partir de vanádio(V) na presença de qualquer agente redutor [Crans *et al.*, 1998], sendo uma pequena parte do vanadilo reoxidada intracelularmente a vanadato [Chasteen, 1983; Zaporowska e Scibior, 1998a]. No entanto, apesar de estar registada a interconversão entre os diferentes estados de oxidação das espécies de vanádio, poucos são os estudos com compostos de vanádio (estado de oxidação 4 ou 5) que têm em consideração a eventual redução do estado de oxidação +5 (vanadato) a +4 (vanadilo) ou a eventual oxidação de vanadilo, nas condições experimentais dos ensaios [Soares *et al.*, 2007g].

A glutathiona reduzida (GSH) tem sido descrita como um dos agentes mais efectivos na redução do vanadato citoplasmático, quando comparada com NADH, NADPH ou ascorbato [Macara *et al.*, 1980]. Na presença de 3 mM de GSH – a maioria dos tecidos possui concentrações de GSH na ordem de milimolar – supõe-se que a totalidade do vanadato seja reduzido a vanádio(IV), a pH fisiológico [Macara *et al.*, 1980]. Neste sentido, pretendeu-se detectar a eventual ocorrência de redução do vanadato, pela técnica de RPE, nas condições dos ensaios *in vitro* realizados com mitocôndrias isoladas, em que se recorreu à adição de 5 mM de GSH ao meio reaccional para conferir estabilidade ao potencial da membrana mitocondrial (Secção 4.2.9.).

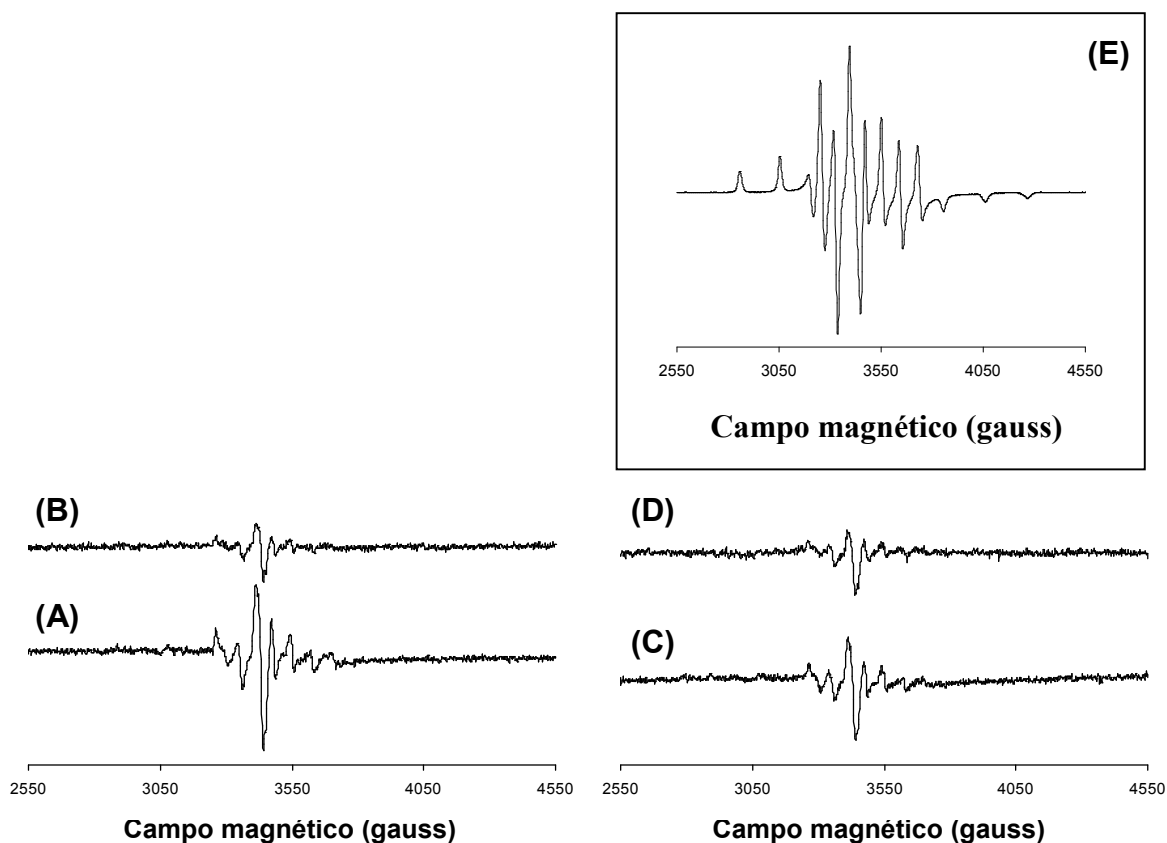


Figura 2.13 – Espectros de RPE de banda X (9.654 GHz) dos produtos da redução de soluções de decavanadato e metavanadato (1 mM vanádio total) em tampão de respiração mitocondrial (Secção 2.3.2.). Espectros de RPE das soluções de decavanadato (A e B) e metavanadato (C e D), 2 h após incubação com 5 mM glutationa (agente redutor), na ausência (A e C) ou presença (B e D) de mitocôndrias (2 mg proteína mitocondrial/ml). A frequência de microondas dos espectros experimentais não se encontra calibrada. Espectro de RPE (E), para comparação, de sulfato de vanadilo (1 mM vanádio) no mesmo meio de ensaio.

Após 2 h de incubação das respectivas soluções de vanadato (decavanadato e metavanadato, 1 mM vanádio total, a pH 7.0) em tampão de respiração mitocondrial (Secção 2.3.2.) suplementado com uma concentração fisiológica de GSH (5 mM), na presença e ausência de proteína mitocondrial (2 mg/ml), os sinais de RPE dos produtos de redução do vanádio foram muito ténues, quer na ausência quer na presença de mitocôndrias (Fig. 2.13). Na presença de proteína mitocondrial, regista-se inclusive uma

diminuição dos sinais de RPE em ambas as soluções de vanadato (Fig. 2.13B e 2.13D). Apesar de se saber que intracelularmente o vanadato é reduzido a vanadilo [Rehder, 1992; 1995], nas condições do presente estudo não foi possível quantificar o sinal corresponde à presença de vanádio reduzido, significando que a formação de produtos da redução de vanádio está abaixo dos limites de detecção do equipamento de RPE utilizado (<10 μ M vanádio reduzido).

No sentido de compreender a acumulação intracelular de vanádio e o metabolismo dos oligómeros de vanadato nas células cardíacas, combinaram-se os estudos de RMN apresentados anteriores (Secção 2.3.3.), realizados nas condições de cultura celular, com a análise por espectroscopia de RPE. A espectroscopia de RMN de ^{51}V forneceu informação sobre a especiação dos oligómeros de vanadato no meio de cultura sem soro. Posteriormente, procedeu-se ao estudo da eventual biorredução do vanádio nas células, através da análise por espectroscopia de RPE do meio de cultura (sobrenadante) e dos miócitos cardíacos. Após 12 h de incubação dos cardiomiócitos com 50 μ M de vanadato (na forma das soluções de decavanadato ou metavanadato), não se registaram sinais de vanádio reduzido quer no sobrenadante quer no extracto celular das culturas (*dados não apresentados*). Deste modo, apesar de se saber que o vanadato pode ser reduzido intracelularmente a vanadilo [Rehder, 1995], não foi possível detectar sinais correspondentes à espécie vanadilo, significando que a concentração de vanadato reduzido encontra-se abaixo do limite de detecção do equipamento de RPE utilizado (<10 μ M vanádio reduzido).

2.3.5. Detecção por espectroscopia de ultravioleta/visível de vanadilo (VO^{2+}) resultante da redução do vanadato na presença de concentrações fisiológicas de glutathiona

Alguns autores referem a espécie decamérica de vanadato, e não o meta- ou ortovanadato, como substrato para a redução do vanadato a pH 7.0 [Ramasarma *et al.*, 1981; Patole *et al.*, 1986; 1987; 1988]. Segundo Rao e Ramasarma [2000], a desidrogenase de isocitrato específica de NADH (IDH) é capaz de reduzir as espécies oligoméricas que compõem as soluções de decavanadato, mas não as presentes nas soluções de metavanadato, utilizando NADH como fonte de electrões. Esta forma reduzida de vanádio assemelhasse na sua oitava banda do espectro RPE ao sulfato de vanadilo, mas apresenta uma absorvência 20 vezes superior a 700 nm [Rao e Ramasarma, 2000].

No presente estudo, demonstrou-se a redução das espécies V_{10} a um produto de cor azul, com absorção a 700 nm – uma possível forma de vanádio(IV) – na ausência e presença de proteína mitocondrial usando GSH (5 mM) como agente redutor. A redução de 100 μM de espécies V_{10} (1 mM vanádio total) a vanádio(IV), com consequente decréscimo da absorvência a 400 nm, devido à desoligomerização do vanadato decamérico (*dados não apresentados*), foi confirmada pela formação de um produto corado de azul semelhante ao vanadilo com absorvência máxima a 700 nm (Fig. 2.14). Esta forma reduzida de vanádio, não parece corresponder, contudo, ao vanadilo, uma vez que o espectro de 1 mM sulfato de vanadilo apresenta um pico largo a 750 nm e uma absorvência consideravelmente mais baixa (Fig. 2.14, Caixa). A redução da espécie V_{10} , determinada através do aumento de absorvência a 700 nm, verificou-se ser dependente de GSH (taxa de redução de 100 μM V_{10} : 25 e 35 mDO/min na presença de 2 e 5 mM GSH, respectivamente) e atinge o seu máximo 2 horas após a adição de GSH,

seguinte-se um declínio da absorvência (Fig. 2.14). Verificou-se também que a absorvência e a taxa de redução máximas da forma de vanádio reduzido são tanto maiores quanto maior for a razão GSH:vanadato decamérico (razão 1:0.1 = A_{700} 0.022 DO, 12.5 mDO/min; razão 1:0.2 = A_{700} 0.071 DO, 35 mDO/min). A perda de absorvência a 700 nm pode não representar uma re-oxidação da forma reduzida de vanádio, mas sim uma exaustão de GSH. A redução do vanadato decamérico foi também monitorizada a 400 nm (comprimento de onda característico das espécies decaméricas de vanadato), registando-se um decréscimo da absorvência com um tempo de meia-vida estimado em 115 min (Fig. 2.15). O vanadato decamérico apresenta, deste modo, uma maior estabilidade na ausência de GSH (Secção 2.3.2.). No entanto, nestas condições, o produto da redução do vanadato pode ser negligenciado devido à sua reduzida contribuição (2.6 μ M) para a concentração de vanádio total presente no meio (\sim 50 μ M V_{10} , ou seja 500 mM vanádio total, 2 h após diluição de 1 mM da solução de decavanadato em tampão de respiração mitocondrial, na presença de 5 mM GSH).

Na presença da mesma concentração de GSH, não se registou uma redução significativa das espécies oligoméricas de vanadato presentes nas soluções de metavanadato (1 mM vanádio total, pH 7.0) (Fig. 2.14), permanecendo o valor de absorvência a 700 nm constante ($A_{700} = 0.014 \pm 0.003$). Consequentemente, parece não ocorrer redução de vanadato na presença das formas oligoméricas V_1 , V_2 , V_4 e V_5 , nas mesmas condições experimentais em que se regista uma redução das espécies V_{10} . Este resultado encontra-se de acordo com o previamente descrito pelo grupo de investigação de Ramasarma [Patole *et al.*, 1986; Ramasarma *et al.*, 1981], que publicaram que o substrato para a redução do vanadato, a pH neutro, é o vanadato decamérico e não as espécies orto- ou metaméricas. Estes autores demonstraram que a redução da espécie decamérica de vanadato é várias centenas de vezes mais rápida que a das espécies

metaméricas (maioritariamente V_4 e algum V_2 e V_1), para concentrações de vanádio equivalentes e a pH neutro, sugerindo assim que o substrato para a redução do vanádio(V) resulta da decamerização do vanadato.

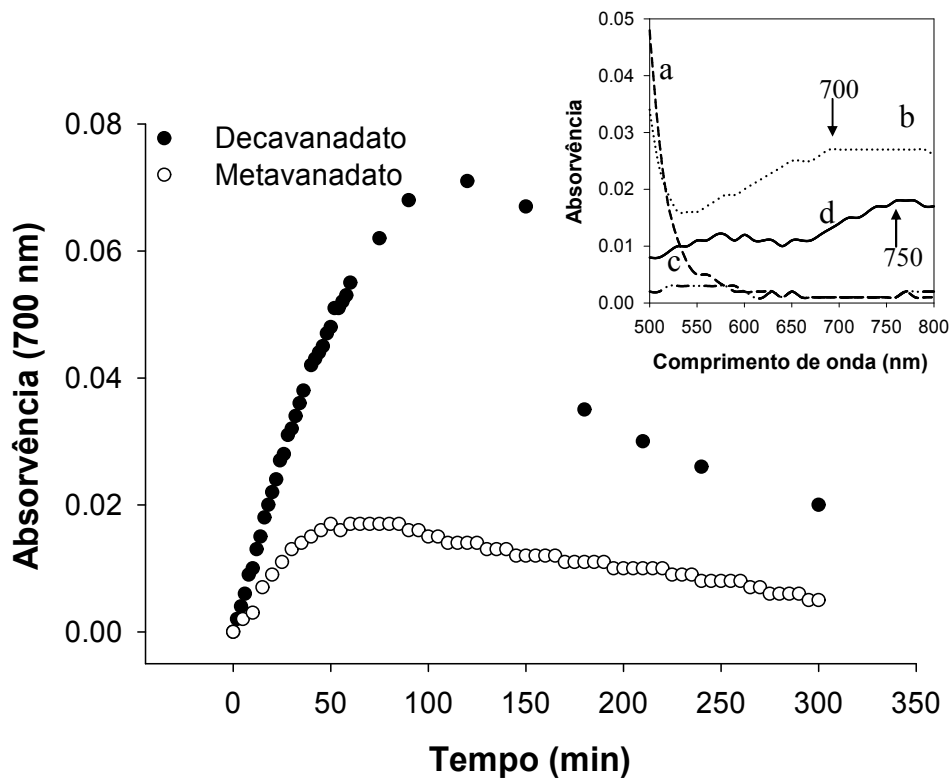


Figura 2.14 – Absorvência a 700 nm dos produtos da redução das soluções de decavanadato e metavanadato, num meio de reacção contendo: 0.2 M sacarose, 5 mM KH_2PO_4 , 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ e 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 suplementado com 5 mM piruvato e 0.5 mM malato, solução de decavanadato (●) ou metavanadato (○) (1 mM vanádio total) e 5 mM glutathiona (GSH) como agente redutor. Os espectros foram registados, a 700 nm, durante 5 h após a adição de GSH, em intervalos de 2 min. **Caixa:** Espectros, na gama de comprimentos de onda do visível, dos produtos de redução de uma solução de decavanadato, antes (linha a) e 2 h depois da adição de GSH (linha b), e de uma solução de metavanadato, 2 h após adição de GSH (linha c). É apresentado um espectro de sulfato de vanadilo (1 mM, concentração de vanádio usada anteriormente) na mesma solução tampão (linha d), para comparação. A absorvência máxima dos espectros (picos alargados) dos produtos da redução da solução de decavanadato e do sulfato de vanadilo é indicada com setas e o respectivo comprimento de onda.

Na presença de mitocôndrias (0.5 a 2.0 mg proteína mitocondrial/ml), regista-se uma elevada taxa de re-oxidação dos produtos da redução do vanadato decamérico não dependente da concentração de proteína presente no meio: 0.440, 0.560 e 0.520 DO/min na presença de 0.5, 1.0 e 2.0 mg/ml de proteína mitocondrial). Deste modo, e tal como registado por Ramasarma e Rao [2006] em tampão fosfato e na presença de microsomas, verifica-se a conversão da espécie decamérica de vanadato a uma forma de menor absorção.

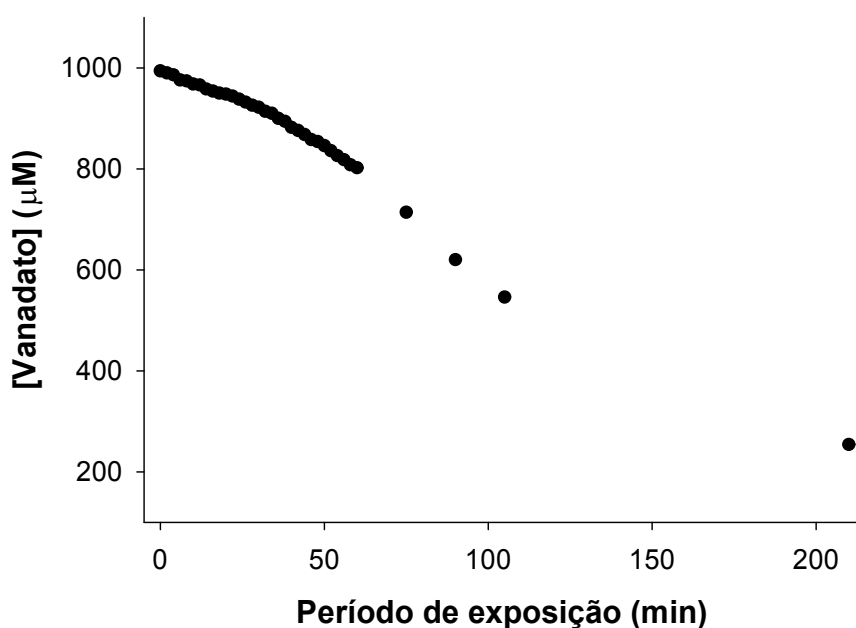


Figura 2.15 – Concentração de vanadato (μM) na solução de decavanadato (1 mM vanádio total), determinada através da absorvência característica das espécies decaméricas de vanadato registada a 400 nm, em função do tempo após diluição em meio de reacção contendo: 0.2 M sacarose, 5 mM KH_2PO_4 , 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 e 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 suplementado com 5 mM piruvato e 0.5 mM malato e 5 mM glutathiona (GSH). Os espectros foram registados, a 400 nm, durante 210 min após a adição de GSH, em intervalos ≥ 2 min.

Tal como anteriormente referido por Ramasarma e Rao [2006], para o sistema de oxidação do NADPH, aparentemente só o vanadato decamérico interage com a oxidação da GSH como dador de electrões, em adição ao já descritos ferricianeto e citocromo *c*. No entanto, devido à reduzida quantidade de vanadato reduzido nas condições experimentais dos estudos *in vitro*, os efeitos observados na funcionalidade mitocondrial, após administração das soluções de decavanadato, serão devidos à presença das diferentes espécies oligoméricas de vanadato e não consequências da sua biorredução.

Dada a facilidade com que as espécies de vanádio se interconvertem em condições fisiológicas [Crans *et al.*, 1998], qualquer estudo químico, biológico, bioquímico, farmacológico, toxicológico ou ambiental que envolva compostos de vanádio deve considerar a química subjacente envolvida e, deste modo, avaliar a eventual ocorrência de redução de vanádio(V) a vanádio(IV) ou a oxidação do ião vanadilo a vanadato nas condições dos ensaios experimentais [Soares *et al.*, 2007g].

2.4. CONCLUSÕES

A ocorrência em simultâneo, em solução aquosa, de diferentes espécies oligoméricas de vanadato em equilíbrio, justifica a importância de proceder a uma análise prévia da composição oligomérica das soluções de decavanadato e metavanadato, após diluição das respectivas soluções concentradas no meio de injeção (0.9% NaCl) utilizado para os estudos *in vivo*, assim como no meio reaccional usado nos estudos *in vitro* com mitocôndrias isoladas (tampão de respiração mitocondrial) e nas condições dos tratamentos realizados às culturas primárias de cardiomiócitos (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM, sem soro). A presente secção centrou-se essencialmente na análise da composição das soluções de decavanadato, bem como na estabilidade da espécie decamérica (V_{10}) após diluição nos diferentes meios utilizados. Os resultados obtidos demonstram que, da combinação das duas técnicas aqui apresentadas – espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e de absorção na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) – resulta uma apropriada caracterização da composição das soluções de vanadato, acrescida de uma análise da estabilidade das espécies V_{10} que compõem a solução de decavanadato. Os resultados aqui apresentados permitiram, deste modo, estabelecer uma relação entre a(s) espécie(s) de vanadato presentes nas soluções usadas e os efeitos promovidos por estas nos sistemas biológicos em estudo.

Verificou-se que uma vez formada a pH 4.0 e, após ajuste a um valor de pH fisiológico, a espécie decamérica de vanadato irá desoligomerizar-se lentamente apresentando um tempo de meia-vida que pode alcançar as 16 h (em 0.9% NaCl, a 25 °C) [Soares *et al.*, 2003; 2006; 2007a]. Verificou-se também que, para além de depender da composição do meio, a estabilidade da espécie decamérica varia em função da temperatura, sendo favorecida a temperaturas mais baixas ($t_{1/2} = 230$ e 180 min nas condições dos estudos mitocondriais *in vitro*, a 25 e 37 °C, respectivamente). O

vanadato decamérico mantém portanto, a sua estrutura em solução aquosa por um período de tempo suficiente para induzir efeitos, diferentes dos promovidos pelo monovanadato (V_1), nos sistemas biológicos. Saliente-se ainda que, proteínas com elevada afinidade para a espécie V_{10} previnem a decomposição do vanadato decamérico [Ramos *et al.*, 2006], que segue uma cinética de desoligomerização de 1ª ordem.

Nas condições experimentais deste estudo, as soluções de decavanadato utilizadas contêm essencialmente espécies V_{10} com uma reduzida contaminação pela espécie V_1 , enquanto que a solução de metavanadato contém principalmente a espécie tetramérica (V_4), mas também a espécie pentamérica (V_5), tal como registado por espectroscopia de RMN do isótopo 51 de vanádio (^{51}V). A título de exemplo, os espectros de RMN de ^{51}V das soluções de metavanadato (5 mM vanádio total, a pH 7.0, em 0.9% NaCl) apresentaram para além de 443 μM V_1 (-561 ppm), também espécies diméricas de vanadato (V_2 , a -575 ppm) e V_4 (-579 ppm), enquanto que uma solução de 5 mM decavanadato (equivalente a 500 μM V_{10}) contém, para além dos sinais característicos (V_{10A} a -517 ppm; V_{10B} a -501 ppm; V_{10C} a -426 ppm) da espécie decamérica (488 μM), espécies V_1 (126 μM). Ou seja, nas condições experimentais do presente estudo e para o intervalo de concentração usado, a razão das espécies decamérica:monomérica, na solução de decavanadato, é de cerca de 4:1. Nestas condições de ensaio, assim como nas condições dos estudos *in vitro* e celulares, verificou-se que, na gama de concentrações usada, a concentração das espécies decaméricas aumenta linearmente com a concentração de vanádio total, enquanto que o vanadato monomérico não, tal como previamente descrito [Ramos *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2007a].

Procedeu-se à detecção por ressonância paramagnética electrónica (RPE) de eventuais produtos da redução do vanadato, no sentido de se detectar a eventual

ocorrência de redução do vanadato nas condições dos ensaios *in vitro* realizados com mitocôndrias isoladas, em que se recorreu à adição de 5 mM de GSH ao meio reaccional para conferir estabilidade ao potencial da membrana mitocondrial. No entanto, apesar de ser descrita a redução de vanadato a vanadilo [Rehder, 1992; 1995], possivelmente como parte de um processo de desintoxicação celular [Sabbioni *et al.*, 1991; 1993], os estudos por RPE falharam na quantificação do conteúdo em vanadilo (apesar de se ter assinalado a formação de produtos de redução de vanadato decamérico, por espectroscopia UV/Vis), significando que nas condições fisiológicas, impostas pelo protocolo adoptado, esta espécie encontra-se abaixo do limite de detecção do equipamento de RPE (<10 µM). Uma vez que, na ausência de proteína quase não se observa sinal de RPE sugere-se uma das seguintes hipóteses: (i) o vanadato decamérico na ausência de proteína e no meio de reacção utilizado não é reduzido; (ii) o vanadilo eventualmente formado por redução do vanadato decamérico não é estabilizado pela formação de um complexo que impeça a sua re-oxidação (os iões de vanadilo quelados são oxidados mais lentamente pelo oxigénio molecular que o vanadilo livre [Chasteen, 1983]).

Em suma, contrastando com as soluções de metavanadato, que contêm diversos oxovanadatos lábeis em equilíbrio, as soluções de decavanadato contêm espécies decaméricas de vanadato, cuja desoligomerização é lenta o suficiente para permitir o estudo dos seus efeitos não só *in vitro* como também *in vivo*.

Capítulo 3

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NO MÚSCULO CARDÍACO DA ADMINISTRAÇÃO *in vivo* DE DECAVANADATO



Capítulo 3

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NO MÚSCULO CARDÍACO DA ADMINISTRAÇÃO *in vivo* DE DECAVANADATO

3.1. INTRODUÇÃO

Para além de essencial à vida na Terra, o oxigénio pode constituir um agente tóxico para a célula [Storey, 1996], na medida em que a redução incompleta da molécula de oxigénio – que ocorre durante a respiração celular – pode originar formas altamente reactivas, tais como as espécies reactivas de oxigénio (ROS) e, eventualmente, de nitrogénio. A formação intracelular destes radicais nem sempre implica um efeito tóxico, pois existem na célula sistemas antioxidantes que minimizam ou previnem os seus efeitos nocivos. Contudo, existem diversas situações em que ocorre uma diminuição dos níveis de defesa ou uma produção excessiva de ROS, excedendo a capacidade de defesa antioxidante do organismo, fenómeno que se denomina de stresse oxidativo [Storey, 1996; Pascual *et al.*, 2003]. Para além das fontes endógenas de ROS também diversos agentes ambientais, xenobióticos e metais de transição têm sido implicados na produção de radicais de oxigénio [Di Giulio *et al.*, 1995].

O vanádio é um metal de transição conhecido pela sua capacidade pró-oxidante [Zaporowska e Scibior, 1998a]. Os metais de transição são conhecidos por poderem actuar como catalizadores na deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas. Estudos recentes vêm comprovar que o vanádio é um dos metais implicados na produção de ROS. Estudos *in vitro* com linhas celulares de osteoblastos demonstraram que o vanadato, vanádio(V), induz alterações morfológicas [Edel e Sabbioni, 1993] e

que induz stresse oxidativo [Cortizo *et al.*, 2000], promovendo alterações nas estruturas lipídicas, no ADN e no metabolismo do cálcio [Nechay *et al.*, 1984; Viarengo, 1989; Stohs e Bagchi, 1995]. No entanto, apesar de estarem descritos efeitos tóxicos promovidos por vanadato nos sistemas biológicos, poucos são os estudos que consideram a contribuição individual das diferentes espécies oligoméricas de vanadato para estes efeitos de toxicidade. Neste sentido, urge explorar a contribuição dos diferentes oligovanadatos para as respostas ao stresse oxidativo induzido *in vivo* pelo vanadato.

3.1.1. Stresse oxidativo

A produção de energia metabólica na célula está dependente da redução de oxigénio molecular a água, na cadeia transportadora de electrões da mitocôndria. Durante este processo pode ocorrer a formação de radicais livres de oxigénio, espécies muito instáveis e portanto extremamente reactivas, que possuem um ou mais electrões desemparelhados [Benov e Fridovich, 1998]. Como consequência da dependência de oxigénio, os organismos vivos têm de lidar com a contínua produção ROS como produtos metabólicos [Comporti, 1993]. Para além da contínua formação de radicais livres de oxigénio no metabolismo, agentes oxidantes podem induzir um aumento da sua produção no organismo. A produção excessiva de radicais livres de oxigénio pode, deste modo, levar a uma condição de desequilíbrio denominada de stresse oxidativo, caracterizada por desencadear alterações celulares [Stohs, 1995; Matés, 2000].

Os radicais livres podem ser definidos como qualquer molécula ou espécie química, com um ou mais electrões desemparelhados na sua orbital externa, capaz de ter uma existência independente, ainda que por um período muito curto de tempo. A existência deste electrão confere-lhes uma elevada reactividade química, permitindo que

reajam rapidamente com outras moléculas para readquirirem estabilidade. Qualquer molécula pode assim converter-se num radical livre, pela cedência ou aceitação de um electrão ou por clivagem homolítica de uma ligação [Comporti, 1985; Matés, 2000]. As espécies reactivas de oxigénio (ROS) incluem o radical hidróxilo (OH^\cdot) e o anião superóxido ($\text{O}_2^\cdot^-$) [Sies, 1985]. A maioria das reacções formadoras de radicais livres no organismo – um processo fisiológico resultante do metabolismo normal – processa-se sob controlo enzimático, essencial na cadeia respiratória mitocondrial, no metabolismo de xenobióticos e nos processos de fagocitose relacionados com a actividade NADPH oxidase, entre outras. A produção excessiva e não controlada de radicais livres pode condicionar o aparecimento de lesões diversas que podem afectar diferentes macromoléculas e estruturas moleculares ou determinar a activação de determinados genes [Storey, 1996; Matés, 2000].

Os organismos aeróbios desenvolveram vários mecanismos de defesa contra os efeitos promovidos pelos radicais livres [Comporti, 1993], conhecendo-se três níveis distintos de protecção: (i) prevenção da geração de ROS; (ii) destruição de ROS por sequestradores não enzimáticos de radicais livres e por enzimas antioxidantes; e, (iii) reparação dos componentes celulares destruídos [Storey, 1996]. Em situações em que o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante é afectado, prevalecendo a acção pró-oxidante, ocorre uma situação denominada de stresse oxidativo [Sies, 1985]. Por outro lado, alterações no equilíbrio podem surgir como resultado da deplecção das defesas antioxidantes ou pelo aumento da produção de ROS nos sistemas biológicos, provocando danos celulares como a oxidação de algumas enzimas e a degradação proteica [Stohs, 1995; Matés, 2000], para além da peroxidação lipídica, alterações no metabolismo de Ca^{2+} e da expressão genética, tal como referido anteriormente.

A peroxidação lipídica é um processo autocatalítico e descontrolado de destruição oxidativa dos ácidos gordos polinsaturados das membranas celulares e subcelulares, que tem sido descrito como a principal causa para a perda da funcionalidade celular em situações de stresse oxidativo [Cheeseman, 1993; Storey, 1996]. O processo de peroxidação lipídica tem início com a formação de peróxidos e hidroperóxidos lipídicos, os radicais peróxido são formados na presença de oxigénio e inicia-se uma cadeia de propagação [Cheeseman, 1993]. Os produtos de degradação interagem posteriormente com várias macromoléculas e produzem novas ROS, desencadeando um processo de reacção em cadeia [Stohs, 1995]. Ao nível da membrana celular, a peroxidação lipídica pode provocar diminuição da fluidez e perda da capacidade de actuar como barreira, alterando assim a homeostasia celular. O ataque oxidativo é também responsável pela diminuição da actividade da maioria das enzimas associadas à membranas celulares, apesar de algumas enzimas membranares serem notavelmente resistentes, sendo, no entanto, a actividade de outros estimulada pelo dano oxidativo. Os efeitos indirectos da peroxidação lipídica devem-se à natureza reactiva dos produtos intermédios e finais do processo peroxidativo, no entanto, é difícil distingui-los dos efeitos directos [Cheeseman, 1993]. A peroxidação lipídica das membranas tem sido sugerida como um processo comum envolvido em várias condições biopatológicas e enfermidades [Comporti, 1993].

No sentido de proteger a célula contra o dano provocado pelos radicais livres, os organismos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante [Comporti, 1993], que podem ser divididos em sistemas enzimáticos e não enzimáticos.

3.1.2. Sistemas biológicos de defesa antioxidante

Existem vários tipos de antioxidantes que protegem, directa ou indirectamente, as células contra os efeitos adversos de xenobióticos, drogas, agentes carcinogénicos e radicais livres. Os antioxidantes podem ser diferenciados em não-enzimáticos, como a glutathiona e as vitaminas A, C e D, e enzimáticos como a dismutase de superóxido (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases da glutathiona (GPx) [Halliwell, 1995]. Os agentes antioxidantes têm a capacidade de captar directamente o $O_2^{\cdot-}$ e outros radicais livres, ou estimular os mecanismos de desintoxicação celular, prevenindo assim o aparecimento de processos patofisiológicos. A SOD, CAT, GPx, por exemplo, captam directamente os radicais livres, enquanto que outros antioxidantes induzem a expressão de genes cujos produtos vão conferir protecção celular contra o stresse oxidativo e as suas consequências [Matés, 2000].

A SOD neutraliza os radicais $O_2^{\cdot-}$ que são constantemente produzidos no metabolismo de respiração aeróbia, convertendo-os em oxigénio molecular e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que será posteriormente captado pela CAT ou GPx [Benov e Fridovich, 1998]. São vários os estudos que associam a indução da SOD nos organismos com factores associados ao aumento da produção de ROS e à exposição a contaminantes oxido-redutores activos [Di Giulio *et al.*, 1995].

A CAT catalisa a degradação de H_2O_2 em água e oxigénio molecular [Hunt *et al.*, 1998] e é das enzimas com maior eficiência (8000 J/mol), com uma cinética de não saturação para o substrato [Lledías *et al.*, 1998], que se encontra primeiramente associado aos peroxissomas, onde degrada o H_2O_2 que surge como produto da oxidação de ácidos gordos [Di Giulio *et al.*, 1995]. Apesar da CAT não ser essencial para alguns tipos de células, sob condições normais, desempenha um importante papel no

desenvolvimento de tolerância ao stresse oxidativo na resposta adaptativa das células [Hunt *et al.*, 1998].

As GPx são um grupo de enzimas citosólicas, que para além de degradarem o H_2O_2 a água, reduzem os peróxidos lipídicos (ROOH) aos seus respectivos álcoois (ROH), num reacção importante para a interrupção da cadeia de reacções que desencadeia a peroxidação lipídica [Di Giulio *et al.*, 1995]. Existem várias isoenzimas de GPx, entre eles a peroxidase da glutathione dependente de selénio (Se-GPx). Esta enzima é considerada como a GPx mais importante, por catalisar a redução de várias hidroperóxidos (ROOH e H_2O_2) usando a glutathione (GSH) como dadora de electrões [Matés, 2000]. Nos mamíferos, a Se-GPx é de extrema importância uma vez que cataliza a degradação do peróxido de hidrogénio e dos hidroperóxidos lipídicos, no entanto, quando comparada com outras enzimas, como a CAT e a SOD, esta apresenta valores de actividade extremamente baixos [Gamble *et al.*, 1995].

Aksnes e Njaa [1981] realizaram estudos em várias espécies de peixes com actividades metabólicas diferentes e referem que a actividade basal destas enzimas varia em função da espécie e do tecido analisados. Geralmente, a CAT apresenta valores de actividade basal decrescentes nos seguintes órgãos: fígado > rim > baço > coração. Os mesmos autores indicam também que a actividade basal da GPx é menor do que a da CAT, na maioria das espécies estudadas.

No entanto, a actividade destas enzimas pode ser modelada na presença de agentes oxidantes. Estudos de determinação da actividade de enzimas antioxidantes e captadores de ROS realizados em organismos marinhos (anémonas e mexilhões), sugerem a ocorrência de respostas adaptativas dos sistemas antioxidantes após exposição *in vivo* a condições ou xenobióticos que aumentem o fluxo de ROS no

organismo [Di Giulio *et al.*, 1995]. Algumas enzimas inibidas por iões metálicos são consideradas potenciais indicadores da toxicidade subletal de metais (Viarengo, 1989).

3.1.3. Órgãos-alvo de toxicidade

Os metais de transição actuam como catalisadores na deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas estando assim a toxicidade destes metais relacionada com a destruição oxidativa dos tecidos, principalmente do cérebro, fígado e rim [Stohs e Bagchi, 1995]. As diferenças específicas de toxicidade dos iões metálicos estão relacionadas com as diferenças de solubilidade, absorção, transporte, reactividade química e com a formação de complexos no organismo. Apesar destes factores, os mecanismos básicos que envolvem a produção de ROS são os mesmos para alguns metais de transição (ferro, cobre, cádmio, crómio, níquel, chumbo, mercúrio e vanádio) [Stohs e Bagchi, 1995]. No caso do vanádio, a absorção depende da solubilidade e da via de entrada no organismo (alimento ou água). Nos organismos marinhos, o vanádio é inicialmente transportado pelo plasma e distribuído pelo sangue, atingindo inicialmente o rim e o fígado. Estudos com peixes marinhos indicam que o vanádio tem um comportamento diferente de outros metais como o cádmio, o cobalto, o ferro, o mercúrio, a prata e o zinco, que tendem a acumular-se especialmente nos tecidos que contactam directamente com a água do mar e no tracto digestivo. Indivíduos da espécie *Anguilla anguilla* expostos a vanádio na água apresentaram valores de concentração crescente deste metal no músculo, sangue, osso, rim e fígado [Miramand e Fowler, 1998]. Deste modo, as informações sobre o conteúdo em vanádio existente nos animais são limitadas e referem-se normalmente a tecidos como o fígado ou rim, sem prestarem atenção ao tecido cardíaco.

Apesar do coração não ser um dos locais de acumulação preferencial de metais, é um órgão vulnerável ao stresse oxidativo induzido por estes [Aureliano *et al.*, 2002; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2007a]. Estudos histológicos realizados por Borges *et al.* [2003] referem que os oligómeros de vanadato causam lesões nos tecidos renal e hepático, apesar de não se detectarem alterações no tecido cardíaco. No entanto, estes estudos sugerem que apesar de não se observarem alterações tecidulares evidentes, o coração é um órgão sensível e fortemente afectado pela toxicidade do vanádio [Borges *et al.*, 2003]. A escolha do coração como órgão de estudo prende-se ainda com o facto do músculo cardíaco ter uma elevada actividade metabólica e, conseqüentemente, estar sujeito a uma maior produção de ROS proveniente do metabolismo normal. Para além disso, o facto de se proceder a uma administração por via intravenosa, faz do coração um dos primeiros órgãos a ser exposto ao metal.

3.1.4. Vanádio e dano oxidativo em sistemas biológicos

Vários estudos biológicos têm associado o vanádio à capacidade de produzir ROS, resultando em peroxidação lipídica e alterações das enzimas antioxidantes, promovendo stresse oxidativo [Ghe *et al.*, 1985; Kalyani *et al.*, 1992; Ferrer *et al.*, 1993; Stohs e Bagchi, 1995; Shi *et al.*, 1997; Byczkowski e Kulkarni, 1998; Capella *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003]. O envolvimento de metais tóxicos no dano oxidativo do músculo cardíaco sugere que este órgão apresenta elevada vulnerabilidade à intoxicação por metais [Jamall *et al.*, 1989; Tort e Madsen, 1991; Sarkar *et al.*, 1995; Limaye e Shaikh, 1999]. Apesar do conhecimento acumulado até ao momento, os efeitos oxidativos do vanádio observados após exposição aguda *in vivo* no músculo cardíaco não se

encontram devidamente esclarecidos, nomeadamente a contribuição das diferentes espécies oligoméricas para os efeitos tóxicos promovidos pelo vanádio(V).

De facto, a maioria dos estudos sobre os efeitos toxicológicos do vanadato nos sistemas biológicos não têm em consideração a contribuição dos diferentes oligómeros de vanadato. Contudo, sabe-se que a espécie decamérica – formada após acidificação do meio – afecta a actividade de várias enzimas [Stankiewicz *et al.*, 1995; Aureliano e Madeira, 1998; Tiago *et al.*, 2004]. Foi sugerido que a decomposição do vanadato decamérico é suficientemente lenta para permitir o estudo dos seus efeitos, nos sistemas bioquímicos [Aureliano *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003], não só *in vitro* como também *in vivo* [Aureliano *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; Soares e Aureliano, 2007]. Além disso, recentemente foi descrito por Ramos *et al.* [2006], que a interacção do vanadato decamérico com proteínas do citoesqueleto e com proteínas membranares aumentam a sua estabilidade. Deste modo, não é de excluir a hipótese de que a espécie decamérica de vanadato possa ocorrer em condições fisiológicas durante um período de tempo suficiente para induzir efeitos biológicos distintos dos promovidos pelo monovanadato. Se o vanadato decamérico ocorrer em condições fisiológicas, induzirá este oligovanadato efeitos *in vivo* específicos? Serão estes efeitos diferentes dos promovidos pelo vanadato monomérico? Contribuirá a espécie decamérica para a toxicidade induzida pelo vanadato? Uma vez formado *in vivo*, o vanadato decamérico terá a capacidade de prevenir os efeitos induzidos pelo vanadato? Estas e outras questões serão discutidas no presente capítulo.

Poucos são os estudos que se têm desenvolvido sobre o vanadato decamérico. Desde 1999, o nosso grupo de investigação tem realizado estudos *in vivo* administrando soluções de decavanadato na tentativa de avaliar a contribuição da espécie decamérica

para os efeitos tóxicos do vanadato [Aureliano *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; Soares e Aureliano, 2007]. Estudos realizados por Borges *et al.* [2003], evidenciaram que a exposição aguda de um teleósteo marinho bentónico (*Halobatrachus didactylus*) a diferentes oligómeros de vanadato (vanadato decamérico e monomérico), numa concentração de 5 mM, durante um período de 1 a 7 dias, induz alterações histológicas nos tecidos renal e hepático. No que respeita ao fígado, as alterações foram mais expressivas nos indivíduos injectados intraperitonealmente com vanadato decamérico. Num estudo semelhante, verificou-se que a administração destas soluções de vanadato, induziu peroxidação lipídica e diminuição da actividade de enzimas antioxidantes no tecido cardíaco da mesma espécie, sugerindo-se que a espécie decamérica induz um efeito mais potente [Aureliano *et al.*, 2002]. Uma vez que se sabe que podem ocorrer alterações ao nível das defesas antioxidantes, mediante a necessidade de protecção antioxidante, dependendo da taxa metabólica da espécie [Aksnes e Njaa, 1981], o uso de uma espécie ictiológica com maior actividade metabólica no estudo das respostas antioxidantes à exposição a diferentes espécies oligoméricas de vanadato poderá contribuir para um melhor esclarecimento da relação entre o vanadato, como agente oxidante, e a resposta dos respectivos mecanismos de defesa antioxidante.

Porém, estudos *in vivo* com concentrações subletais de vanadato para um período de exposição mais curto ainda não foram realizados. Encurtar o período de exposição às soluções de vanadato poderá contribuir para dar uma indicação quanto ao mecanismo inicial promotor de stresse oxidativo. Para além disso, uma vez que a produção de ROS está dependente do metabolismo e os mecanismos de defesa são muito variáveis, a susceptibilidade à toxicidade provocada por metais pode variar consideravelmente entre espécies.

3.1.5. O uso de peixes como modelos biológicos

A utilização de modelos ictiológicos em estudos de stresse oxidativo tem vindo a ganhar importância e alguns estudos referem que os peixes parecem ser mais sensíveis ao efeito dos metais do que os mamíferos [Palace e Klaverkamp, 1993].

No presente estudo, recorreu-se a duas espécies de teleósteos marinhos (*Halobatrachus didactylus*, charroco, e *Sparus aurata*, dourada) como organismos-teste. Os organismos aquáticos encontram-se expostos ao vanádio no seu ambiente natural uma vez que, para além deste metal existir na natureza, existem várias fontes antropogénicas deste elemento no meio aquático [Nechay, 1986; Baran, 1998]. Neste sentido, é importante o estudo da vulnerabilidade destes animais ao vanádio. Para além disso, segundo Kelly *et al.* [1998], os peixes são bons modelos experimentais em estudos de stresse oxidativo, uma vez que exibem respostas toxicológicas e adaptativas similares à dos mamíferos. Sendo a dourada um peixe com uma actividade metabólica relativamente elevada, o estudo dos mecanismos de defesa antioxidante nesta espécie tem particular interesse uma vez que, os trabalhos realizados até ao momento nesta área utilizaram peixes com uma actividade metabólica mais reduzida (espécies bentónicas, tais como o *H. didactylus*).

A espécie *S. aurata* é um peixe de elevado valor comercial, particularmente nos países mediterrâneos, sendo uma das principais espécies de produção em aquacultura em Portugal. A elevada procura de produtos da pesca na alimentação humana, acompanhada pelo decréscimo das reservas naturais, têm impulsionado a investigação no que respeita, não só a aquacultura, que tem vindo a apostar no cultivo intensivo desta espécie, mas também à fisiologia destes animais [Pillay, 1990]. Como se trata de uma espécie explorada em aquacultura, o seu ciclo de vida, bem como os requisitos abióticos e alimentares são bem conhecidos. Deste modo, a sua manutenção em cativeiro e o seu

manuseamento são de fácil execução. Todos estes factores são vantajosos na escolha de um modelo biológico, e neste caso, a fácil disponibilidade, a sua importância comercial, bem como o vasto conhecimento que existe sobre esta espécie, normalmente utilizada em estudos sobre a dieta alimentar, mas também em ecotoxicologia [Arufe *et al.*, 2004], foram determinantes na escolha da dourada como modelo experimental neste estudo. Nos últimos anos, a dourada tem sido utilizada como modelo biológico no estudo dos efeitos de metais tóxicos e dos mecanismos de defesa antioxidante [Rodriguez-Ariza *et al.*, 1994; Pedrajas *et al.*, 1995; Vaglio e Landriscina, 1999; Rodriguez-Ariza *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2003]. Para além disso, é um animal de fácil obtenção e manutenção, que não se encontra ameaçado nem protegido por nenhuma convenção internacional.

A espécie *H. didactylus* para além de muito abundante na Ria Formosa (Algarve), o que proporcionava uma fácil aquisição de exemplares, apresenta uma grande variabilidade de dimensões e/ou idades e, conseqüentemente, de taxas metabólicas, não sendo também possível avaliar a proveniência exacta de todos os espécimens, o que ocasionada frequentemente grupos de estudo bastante heterogéneos. Os indivíduos da espécie *S. aurata* por sua vez, adquiridos a empresas de aquacultura, possibilitaram a formação de grupos homogéneos, apresentando tamanhos padrão, a mesma idade e tendo estado sujeitos às mesmas condições de cativeiro (dieta alimentar e factores abióticos). Estes aspectos permitiram diminuir a variabilidade individual. Para mais, esta é uma espécie de elevado interesse comercial, sendo extensivamente produzida em aquacultura. No entanto, apesar da sua fisiologia reprodutiva e nutricional ser amplamente estudada, os estudos toxicológicos são em geral negligenciados. A espécie ictiológica escolhida para substituição do modelo biológico inicialmente eleito, veio deste modo colmatar as lacunas apresentadas pela espécie anteriormente utilizada.

Recentemente, esta espécie tem sido utilizada em estudos sobre stresse oxidativo, normalmente associado a xenobióticos apolares (dielrina e paraquato) ou metais tóxicos como o cádmio [Pedrajas *et al.*, 1995; Vaglio e Landriscina, 1999].

3.1.6. Objectivos

São objectivos deste capítulo, avaliar a distribuição subcelular de vanádio após administração *in vivo* dependente das espécies oligoméricas de vanadato, assim como, analisar as respostas antioxidantes induzidas, nas fracções mitocondrial e citosólica do tecido cardíaco, após administração *in vivo* de concentrações sub-letais de soluções de decavanadato e metavanadato (1 e 5 mM de vanádio total), durante uma exposição aguda (1, 6 e 12 h), em indivíduos da espécie *Sparus aurata* injectados intravenosamente. Os efeitos promovidos pelas duas soluções de vanadato foram determinados e comparados nos seguintes parâmetros: (i) distribuição subcelular de vanádio no sangue e músculo cardíaco, (ii) produção de espécies reactivas de oxigénio, (iii) peroxidação lipídica, (iv) alterações na actividade de enzimas antioxidantes cardíacas e (v) conteúdo de glutathiona.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados, de elevado grau de pureza, foram adquiridos a empresas especializadas, nomeadamente: diacetato de dihidroclorofluoresceína (H₂DCF-DA) Cat. D-399 (Molecular Probes, Groningen, Holanda); ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) Cat. D-8130; nitro *blue* tetrazólio (NBT) Cat. N-6639 (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA); e, material de referência marinho para metais vestigiais: hepatopâncreas de lagosta (TORT-2), 1.64 ± 0.19 mg vanádio/kg (*National Research Council of Canada*).

Solução tampão de homogeneização: 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M sacarose, 1 mM EDTA, 0.15 M KCl e 1 mM ditionietol.

3.2.2. Animais e tratamentos *in vivo*

A administração *in vivo* de soluções de vanadato, numa concentração sub-letal, por via intravenosa (i.v.) foi realizada em douradas (*Sparus aurata*), pesando 400-600 g. Os animais foram adquiridos a duas aquaculturas locais (Algarve) e mantidos em tanques de 450 L, em água do mar arejada e com recirculação constante, sob condições de cativeiro controladas (20 °C, 35‰ e exposição a ciclos circadianos naturais) por períodos superiores a 2 semanas. Durante o período de aclimação às condições laboratoriais, os peixes foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial e privados de alimentação durante os 2 dias que antecederam o sacrifício, por sobredosagem com anestésico 2-fenoxietanol (banho).

Para a realização dos tratamentos *in vivo* com soluções de decavanadato e metavanadato (1 ou 5 mM de vanádio total), dividiram-se 54 peixes em três grupos de estudo (grupos Placebo; decavanadato, V₁₀; e, metavanadato, V₁) e injectaram-se os

indivíduos i.v. com 1 ml/kg de 0.9% NaCl (Placebo) ou de soluções de decavanadato e metavanadato, respectivamente; sacrificaram-se sub-grupos de 6 indivíduos 1, 6 e 12 h após injeção. Tal como referido na Secção 2.2.2., antes da sua utilização a solução concentrada de decavanadato (50 mM, pH 4.0) foi ajustada a pH aproximadamente 7.0, diluída para a concentração final (1 ou 5 mM) em solução fisiológica (0.9% NaCl) e mantida em gelo até à sua administração. Simultaneamente, no início da experiência, sacrificou-se um grupo Controlo ($n = 6$) para determinação dos valores basais de distribuição subcelular de vanádio e de marcadores de stresse oxidativo (Tabela 3.4).

Recolheram-se amostras hematológicas por punção directa da veia caudal que foram mantidas em heparina a 4 °C. As amostras de sangue foram centrifugadas a 500 g durante 10 min, com o objectivo de isolar os eritrócitos (RBC) do plasma (para remoção de leucócitos e outros constituintes do sangue).

O manuseamento e as experiências realizadas com os animais respeitaram as directrizes estabelecidas no guia do *National Research Council* para o cuidado e uso de animais de laboratório.

3.2.3. Massa cardíaca relativa e massa ventricular relativa

A partir do registo da massa corporal, da massa cardíaca e da massa ventricular dos indivíduos estudados foi analisado o efeito da administração das soluções de vanadato nos índices de massa cardíaca relativa, MCR (Equação 3.1) e massa ventricular relativa, MVR (Equação 3.2).

$$\text{Massa Cardíaca Relativa (\%)} = \frac{\text{massa coração (g)}}{\text{massa corporal (g)}} \times 100 \quad [\text{Eq. 3.1}]$$

$$\text{Massa Ventricular Relativa (\%)} = \frac{\text{massa ventrículo (g)}}{\text{massa corporal (g)}} \times 100 \quad [\text{Eq. 3.2}]$$

3.2.4. Isolamento de fracções subcelulares do tecido cardíaco

Para o isolamento das fracções mitocondriais e citosólicas do tecido ventricular, removeu-se o coração imediatamente após a colheita de sangue e após o registo dos seus dados morfométricos, isolaram-se os ventrículos. As fracções subcelulares do tecido cardíaco foram isoladas a partir de homogenatos do respectivo órgão por centrifugação diferencial. Todos os procedimentos de isolamento foram realizados à temperatura de 0-4 °C.

Isolamento da fracção citosólica de ventrículos de Sparus aurata

Trituraram-se os ventrículos em tampão de homogeneização e posteriormente homogeneizaram-se os ventrículos num homogeneizador *Ultraturrax X-620*, por 3 períodos de 30 s à velocidade máxima (20500 rpm), em 10 ml de tampão por grama de tecido (homogenato total). A fracção citosólica foi isolada por centrifugação diferencial, tal com anteriormente descrito [Aureliano *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2006; 2007a]. O homogenato inicial foi centrifugado a 460 g, durante 10 min a 4 °C, com o objectivo de separar membranas e fragmentos celulares (sedimento). O sedimento resultante (contendo núcleos, eritrócitos e fragmentos celulares) foi desprezado e o sobrenadante submetido a nova centrifugação a 10000 g, durante 30 min a 4 °C. O sobrenadante e o sedimento obtidos nesta centrifugação foram utilizados para o isolamento das fracções citosólica e mitocondrial, respectivamente.

Posteriormente, o sobrenadante resultante desta segunda centrifugação, contendo a fracção pós-mitocondrial, foi centrifugado a 50000 g, durante 120 min a 4 °C. O sobrenadante obtido (fracção citosólica) foi conservado a -80 °C até ao momento dos ensaios.

Isolamento da fracção mitocondrial de ventrículos de Sparus aurata

Ressuspendeu-se o sedimento (rico em mitocôndrias) resultante da centrifugação a 10000 g, em 5 ml de tampão de homogeneização e submeteu-se a nova centrifugação nas mesmas condições (10000 g, 30 min a 4 °C). Por último, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento (mitocôndrias) em 3 ml da mesma solução. A suspensão mitocondrial foi conservada a -80 °C até ao momento dos ensaios.

3.2.5. Quantificação proteica

A determinação do conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de Bradford [1967], usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão de proteína.

3.2.6. Distribuição subcelular de vanádio

A determinação da concentração de vanádio, em sub-amostras do homogenato total e das fracções citosólica e mitocondrial do tecido cardíaco, foi realizada por espectroscopia de absorção atómica (EAA). Esta técnica consiste na absorção selectiva de radiação linear das zonas do visível por átomos ou iões no estado gasoso [Rubinson e Rubinson, 1998] e tem sido amplamente utilizada na detecção e quantificação de metais, nomeadamente vanádio em tecidos e fracções subcelulares [Ray, 1994].

Neste método, as amostras do elemento a analisar são submetidas a temperaturas elevadas de modo a dissociarem as suas ligações químicas num processo denominado de atomização. Neste estado atomizado, o elemento é capaz de absorver a radiação incidente, o que se traduz num pico de absorção cuja altura ou área pode ser usada para a sua quantificação, através da lei de Lambert-Beer [Ray, 1994; Rouessac e Rouessac, 2001]. O processo de atomização pode ser realizado num atomizador de chama ou electrotérmico, dependendo da amostra e/ou metal em questão [Skoog *et al.*, 1998]. As

quantificações de vanádio apresentadas na presente tese foram realizadas recorrendo-se ao método de EAA electrotérmica, visto apresentar vantagens relativamente à atomização por chama, nomeadamente: maior sensibilidade e o maior tempo de residência dos átomos no percurso luminoso (obtenção de sinais mais estáveis, definidos e constantes) [Gonçalves, 1996; Skoog *et al.*, 1998]. Tais características possibilitam um limite de detecção cerca de 1000 vezes superior ao do método por chama, permitindo a detecção de reduzidas concentrações. Para além disso, a EAA electrotérmica permite o uso de pequenos volumes de amostra (na ordem dos microlitros), em solução ou matriz biológica [Gonçalves, 1996].

Determinação de limites de detecção e quantificação

Antes de se proceder à quantificação do teor em vanádio presente nas diferentes fracções subcelulares dos tecido cardíaco, determinaram-se os limites de detecção e quantificação do equipamento para as condições de análise utilizadas no presente estudo, conforme recomendado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

Seguindo as recomendações da norma ISO 8466-1, calcularam-se os referidos limites a partir da estatística de mínimos quadráticos da recta de calibração, admitindo-se que o desvio-padrão da estimativa representa o desvio-padrão do branco (ISO 8466-1). Nas condições de análise utilizadas no presente estudo, os limites de detecção e quantificação registados para o vanádio foram de 5 ± 1 e 14 ± 3 ppb, respectivamente.

Preparação das amostras para quantificação do conteúdo em vanádio

Após registo das massas húmidas das amostras destinadas a análise por EAA electrotérmica (homogenato total, fracções citosólica e mitocondrial), procedeu-se à

desidratação das amostras a 60 °C, até massa constante (aproximadamente 48 h). Após a secagem completa das amostras, registaram-se as respectivas massas secas e procedeu-se a um ataque por via húmida com ácido nítrico (HNO₃ a 65%).

O ataque por via húmida com HNO₃ foi efectuado de acordo com o método previamente descrito por Bryan *et al.* [1985] e Greenberg *et al.* [1992] e consiste numa oxidação da matéria orgânica presente nas amostras biológicas de modo a impedir a sua interferência no processo de detecção de metais [Solchaga *et al.*, 1986; Ray, 1994]. Resumidamente, as amostras foram incubadas durante 24 h com HNO₃ a 65%, adicionado numa razão de 20 ml por grama de tecido seco, e posteriormente digeridas a 100 °C até à obtenção de um resíduo amarelo claro, indicativo de uma digestão completa e eficaz. Este resíduo foi posteriormente ressuspensão em 1 ml de solução de ácido clorídrico (HCl) a 10%.

Paralelamente, e de modo a corrigir a potencial contaminação das amostras introduzida pelos ácidos adicionados, foram efectuados triplicados de uma amostra controlo (sem amostra biológica) composta unicamente por HNO₃ a 65% e HCl a 10%. Note-se que, todo o material de vidro envolvido na preparação das amostras e no seu tratamento para os ensaios de EAA foi previamente descontaminado com água régia (3 HCl a 37%: 1 HNO₃ a 65%).

Análise da distribuição subcelular de vanádio

A determinação da concentração de vanádio existente nas fracções subcelulares das amostras cardíacas foi efectuada por EAA electrotérmica num espectrofotómetro de absorção atómica *GBC Avanta*, equipado com um sistema de forno de grafite *GBC GF 3000*, com um amostrador automático *GBC PAL 3000*, operando segundo parâmetros de amostragem e condições de aquisição previamente definidos (Tabela 3.1 e Tabela 3.2).

Seguindo o método descrito por Gonçalves [1996], o equipamento foi calibrado com uma série de soluções padrão contendo 12.5, 25, 50 e 100 ppb de vanádio, obtidas através de diluições sucessivas de uma solução de vanádio concentrada (1002 ± 2 mg/L, *Merck*), de modo a traçar rectas de calibração que permitiram determinar, por interpolação, a concentração de vanádio (ppb) presente em cada uma das amostras.

Tabela 3.1 – Caracterização dos parâmetros de amostragem e condições operatórias utilizados na determinação da concentração de vanádio por EAA electrotérmica com câmara de grafite, num espectrofotómetro de absorção atómica *GBC Avanta*.

Condições operatórias de EAA electrotérmica		Parâmetros da câmara de grafite		Parâmetros de amostragem ^a	
Modo de instrumento	Absorvência	Etapa 1	Injecção	Padrão 1 (25 ppb)	5 µl solução ^b
Modo de calibração	Concentração	Etapa 2	85 °C; 2.0 s		15 µl Branco ^c
Modo de medida	Altura pico	Etapa 3	97 °C; 1.0 s	Padrão 2 (50 ppb)	10 µl solução ^b
Intensidade	18 mA	Etapa 4	120 °C; 10.0 s		10 µl Branco ^c
Largura da fenda	0.2 nm	Etapa 5	1200 °C; 10.0 s	Padrão 3 (100 ppb)	20 µl solução ^b
Comprimento de onda	318.2 nm	Etapa 6	1200 °C; 1.0 s		
Introdução da amostra	<i>Auto-mix</i>	Etapa 7	2700 °C; 0.8 s	Amostra	20 µl amostra
Constante do tempo	0.0	Etapa 8	2800 °C; 0.1 s		
Amostras	3				

^aAmostragem efectuada em triplicado; ^bOs padrões 1 e 2 foram preparados automaticamente a partir do padrão 3, por diluição em água desionizada (Branco); ^cÁgua desionizada.

Saliente-se que as amostras foram analisadas em triplicado, sendo injectado na câmara de grafite um volume conhecido de amostra (20 µl) e submetido a uma vaporização lenta até 700 K (~427 °C), para dispersão de produtos de decomposição voláteis, e finalmente a temperatura foi elevada 100 °C acima da temperatura de atomização [Alloway e Ayres, 1993; Gonçalves, 1996; Skoog *et al.*, 1998], para uma dissociação completa das suas ligações químicas (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Parâmetros de programação da câmara de grafite utilizados na determinação da concentração de vanádio por EAA electrotérmica, num espectrofotómetro de absorção atómica *GBC Avanta*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Fluxo de gás (L/min)	Padrão de gás	Comando de leitura
1	85	5	3.0	Normal	Não
2	95	40	3.0	Normal	Não
3	120	5	3.0	Normal	Não
4	1400	5	3.0	Normal	Não
5	1400	1	3.0	Normal	Não
6	1400	2	0.0	Normal	Não
7	2700	1	0.0	Normal	Sim
8	2700	2	0.0	Normal	Sim
9	2700	2	3.0	Normal	Não

Validação do método

Em conformidade com os métodos de referência descritos pelo *United Nations Environment Programme* (UNEP) em 1990, a exactidão do método foi avaliada através da análise de material de referência certificado (MRC), nomeadamente hepatopâncreas de lagosta TORT-2 do *National Research Council of Canada* (NRCC), cujo valor certificado de vanádio é de 1.64 ± 0.19 mg/kg. Deste modo, submeteu-se uma

quantidade conhecida de MRC ao mesmo procedimento que as amostras de tecido cardíaco (Secção 3.2.6.) e calculou-se o factor de rendimento do MRC (Z) por intermédio do teste “ Z – scores” (Equação 3.3) [Castro, 1997].

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad [\text{Eq. 3.3}]$$

X_{lab} , representa o valor da concentração de metal obtido no ensaio;

X_v , representa o valor da concentração de metal certificado no MRC;

S , representa a unidade de desvio admissível (desvio padrão da média dos resultados ou incerteza de X_v).

Posteriormente, o resultado obtido foi avaliado segundo os parâmetros estabelecidos para a classificação do factor de rendimento do MRC, nomeadamente:

$$0 < |Z| \leq 2 : \text{Satisfatório}$$

$$2 < |Z| \leq 3 : \text{Questionável}$$

$$|Z| > 3 : \text{Incorrecto}$$

A taxa de recuperação do MRC variou entre 92 e 110% do valor certificado, considerando-se a precisão do método aceitável numa gama de 8 a 10%, relativamente ao desvio padrão previsto.

Análise de resultados

A concentração de vanádio ($[V]$) presente nas amostras analisadas foi calculada (Equação 3.4) (Aureliano *et al.*, 2002) e expressa em ng V/g tecido seco ou ng V/mg proteína.

$$[V] = A \times \left(\frac{V_{retoma}}{M_{seca} \text{ ou } Proteína} \right) \quad [\text{Eq. 3.4}]$$

A, representa o valor da concentração de metal obtido no ensaio (ppb);

V_{retoma}, representa o volume de HCl 10% utilizado para a retoma das amostras (1 ml);

M_{seca}, representa a valor massa seca das amostras analisadas;

Proteína, representa o valor da quantidade de proteína presente na amostra analisada.

3.2.7. Análise do nível de peroxidação lipídica

Os produtos da degradação lipídica, em todos os indivíduos em estudo, foram determinados em homogenatos cardíacos totais (Secção 3.2.5.), em tampão fosfato de potássio (0.1 M K₂HPO₄ e 300 mM NaCl, pH 8.3), pelo teste do ácido tiobarbitúrico (TBA). Este método determina os aldeídos formados pela degradação de hidroperóxidos, incluindo o malonaldeído (MDA) – usado como padrão neste ensaio – a temperatura elevada (100 °C) e em meio ácido (conferido pela presença de ácido tricloroacético, TCA). A reacção entre o MDA e o TBA origina um cromóforo MDA-TBA, de coloração rosa com um máximo de absorção a 530 nm [Wills, 1987].

No presente estudo, procedeu-se à avaliação da peroxidação lipídica induzida por exposição às soluções de vanadato, através da reacção dos produtos de degradação lipídica com TBA (1%), a 100 °C e na presença de 20% de TCA. O MDA gerado por um conjunto de reacções de propagação, em resultado de fenómenos de peroxidação, é expresso em mmol de espécies reactivas tiobarbitúricas (TBARS) formadas. A conversão dos valores de absorvência registados a 530 nm para concentração de MDA foi efectuada com base numa recta de calibração obtida com soluções padrão de MDA (0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 e 25 µM) sendo a concentração de MDA determinada pela lei de Lambert-Beer. Os ensaios foram realizados em triplicado e a quantificação dos produtos

de peroxidação lipídica expressa pela concentração de MDA ([MDA]) em $\mu\text{mol/g}$ tecido (Equação 3.5).

$$[MDA](\mu\text{mol/g}) = \frac{[(Abs_{amostra} - b) / m] / 1000}{(M_{tecido} \times V_{homogeneização}) \times V_{amostra}} \quad [\text{Eq. 3.5}]$$

$Abs_{amostra}$, representa a média das absorvências a 530 nm da amostra.

b , representa a ordenada na origem (recta de calibração com MDA).

m , representa o coeficiente de extinção molar (recta de calibração com MDA).

1000, conversão de μM para μmol .

M_{tecido} , massa de tecido no homogenato cardíaco total (g).

$V_{homogeneização}$, volume de tampão fosfato utilizado para homogeneização do tecido cardíaco (ml).

$V_{amostra}$, volume de amostra (homogenato total) utilizado na realização do ensaio (ml).

3.2.8. Actividade de enzimas antioxidantes

Avaliou-se a resposta antioxidante do tecido cardíaco de indivíduos tratados com soluções de vanadato, determinando-se as alterações nas actividades de enzimas antioxidantes por espectroscopia UV/visível num espectrofotómetro *Hitachi U-2000*: a actividade da dismutase do superóxido (SOD) e da catalase (CAT) foram determinadas nas fracções mitocondrial e citosólica, enquanto que a actividade das peroxidases totais da glutathiona (GPx_{total}) e das peroxidases dependentes de selénio (Se- GPx) na fracção citosólica cardíaca de todos os indivíduos em estudo.

Actividade da dismutase do superóxido

A determinação da actividade da SOD realizou-se nas fracções citosólica e mitocondrial do tecido cardíaco dos indivíduos amostrados segundo a técnica descrita por McCord e Fridovich [1969], que tem por base a inibição da redução do citocromo c pelos aniões superóxido ($O_2^{\cdot-}$) gerados pelo sistema hipoxantina-oxidase da xantina (Fig. 3.1). A

SOD capta os radicais $O_2^{\cdot-}$, diminuindo a redução do citocromo *c*. O volume de amostra utilizado neste ensaio foi variável, de modo a obter-se 50% de inibição da redução do citocromo *c*.

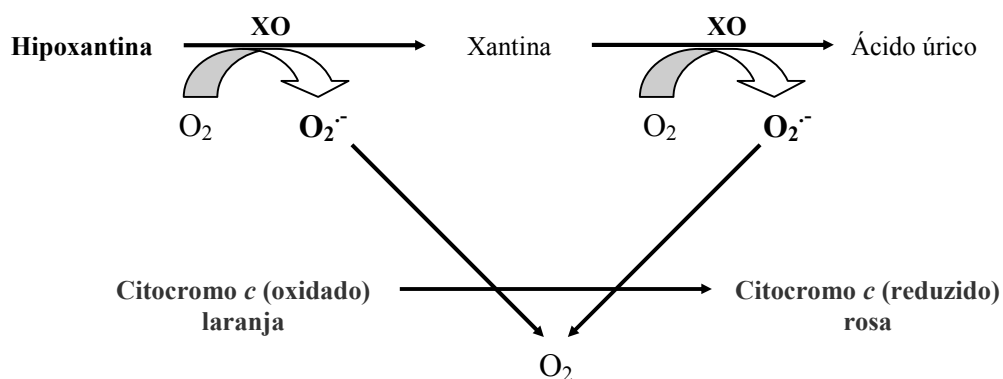


Figura 3.1 – Esquema reaccional da redução do citocromo *c* pelos aniões supéroxido ($O_2^{\cdot-}$) gerados pelo sistema hipoxantina-oxidase da xantina (XO).

Neste ensaio, a reacção decorreu à temperatura de 25 °C, durante 80 s, foi iniciada por adição de xantina oxidase (uma quantidade suficiente para produzir um taxa de redução do citocromo *c*, a 550 nm, superior a 0.020 unidades de absorvência por min) ao meio de ensaio (50 mM tampão fosfato, pH 7.8), na presença de 0.1 mM EDTA, 50 μ M hipoxantina e 10 μ M citocromo *c* e monitorizada espectrofotometricamente a 550 nm. No início de cada análise, efectuou-se um ensaio em que a amostra foi substituída por igual volume de tampão fosfato (50 mM , pH 7.8), de modo a obter-se o valor de redução máxima do citocromo *c* (a variação da absorvência por minuto deverá ser aproximadamente 0.025). Os ensaios foram realizados em triplicado e a actividade da SOD expressa em U/mg proteína, sendo que neste caso uma unidade (U) corresponde à quantidade de enzima necessária para que ocorra 50% de inibição da redução máxima do citocromo *c*, calculada segundo as condições do ensaio (Equação 3.6).

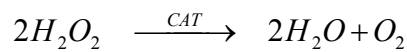
$$\text{Actividade SOD (U / mg proteína)} = \frac{\%I}{50} \times \text{Pr oteína} \quad [\text{Eq. 3.6}]$$

%I, representa a percentagem de inibição.

Proteína, representa a quantidade de proteína (mg) usada no ensaio.

Actividade da catalase

A CAT catalisa a redução bivalente do peróxido de hidrogénio a duas moléculas de água, com libertação de oxigénio, de acordo com a reacção:



A actividade da CAT foi determinada nas fracções citosólica e mitocondrial no tecido cardíaco dos indivíduos de *S. aurata* dos vários grupos de estudo, segundo a técnica descrita por Clairborne [1985]. Este método baseia-se na determinação espectrofotométrica (240 nm) directa da decomposição de peróxido de hidrogénio (H₂O₂). No presente estudo, a reacção decorreu durante 60 s, a 25 °C e foi iniciada pela adição da amostra a um meio de ensaio contendo tampão fosfato (50 mM, pH 7.0) e 50 mM H₂O₂ e monitorizada a 240 nm. Os ensaios foram realizados em triplicado e a actividade da CAT expressa em mmol/min/mg proteína (Equação 3.7).

$$\text{Actividade CAT} = \frac{(\Delta OD / \varepsilon)}{\text{Pr oteína}} \quad [\text{Eq. 3.7}]$$

ΔOD , representa a média dos declives parciais (intervalos de 6 s) da recta que expressa o consumo de H₂O₂, durante 60 s.

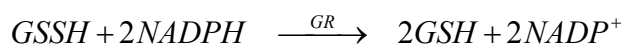
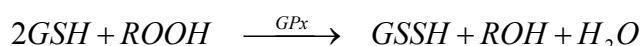
ε , representa o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogénio a 240 nm (40 M⁻¹ cm⁻¹).

Proteína, representa a quantidade de proteína (mg) usada no ensaio.

Actividade das peroxidases da glutathiona

Neste estudo foram determinadas as actividades das GPx_{total} e da Se-GPx, na fracção citosólica do tecido cardíaco.

A actividade da GPx_{total} é uma medida das actividades combinadas das Se-GPx e das transferases S da glutathiona e foi determinada pela técnica descrita por Lawrence e Burk [1976]. A GPx_{total} catalisa a redução de peróxidos orgânicos (como o cumeno de hidroperóxido) a um álcool e água, segundo as reacções:



O método adoptado baseia-se na determinação espectrofotométrica indirecta da actividade da GPx_{total} através da medida da oxidação do NADPH pela redutase da glutathiona (GR). A reacção decorreu em tampão fosfato (65 mM, pH 7.5) num meio contendo 2 mM GSH, 1 U/ml GR, 0.12 mM NADPH e iniciou-se com a adição de substrato (4 mM cumeno de hidroperóxido), observando-se um declive negativo. Os ensaios foram realizados em triplicado, registados a 340 nm e a actividade da GPx_{total} expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína (Equação 3.8).

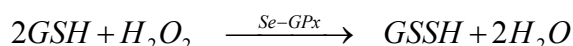
$$\text{Actividade } GPx_{total} (\mu\text{mol} / \text{mg} \text{ proteína}) = \frac{(\Delta OD / \varepsilon)}{\text{Proteína}} \quad [\text{Eq. 3.8}]$$

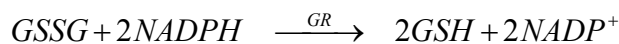
ΔOD , representa a média dos declives parciais (intervalos de 6 s) da recta que expressa o consumo de cumeno de hidroperóxido, durante 60 s.

ε , representa o coeficiente de extinção molar do NADPH 340 nm ($6.2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Proteína, representa a quantidade de proteína (mg) usada no ensaio.

A Se-GPx catalisa a decomposição de H_2O_2 a duas moléculas de água, segundo a reacção:

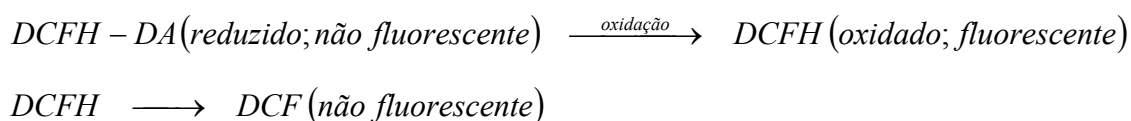




Foi seguido o método descrito por Lawrence e Burk [1976], que consiste na determinação espectrofotométrica indirecta da actividade da Se-GPx através da medida da oxidação de NADPH pela GR. A reacção decorreu em tampão fosfato (65 mM, pH 7.5) num meio contendo 2 mM GSH, 2 U/ml GR, 1 mM NaN₃, 0.12 mM NADPH e iniciou-se com a adição de 0.2 mM H₂O₂, observando-se um declive negativo. Tal como anteriormente descrito, os ensaios foram realizados em triplicado, registados a 340 nm e a actividade da Se-GPx expressa em μmol/min/mg proteína (Equação 3.8).

3.2.9. Produção de espécies reactivas de oxigénio

A actividade pró-oxidante total nos indivíduos da espécie *S. aurata* dos diferentes grupos em estudo foi avaliada através da análise da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na fracção mitocondrial, numa cinética com uma duração de 30 min, na qual se utilizou o diacetato de dihidroclorofluoresceína (H₂DCFDA) como marcador das ROS produzidas em resposta ao metabolismo oxidativo [Greenlund *et al.*, 1995; Hoyt *et al.*, 1997]. A cinética de oxidação desta molécula é uma medida indirecta de stresse oxidativo. Este ensaio baseia-se na seguinte reacção:



A reacção teve início com a adição de amostra a um meio reaccional contendo 50 mM tampão fosfato (pH 7.0), 100 mM KCl e 2 ng/ml H₂DCFDA. Após 30 min de incubação adicionaram-se 0.1 mM NADH e registou-se a intensidade de fluorescência continuamente durante 30 min, sob parâmetros de aquisição constantes (Tabela 3.3). O registo das intensidades de fluorescência ocorreu sob agitação contínua, a 25 °C, num espectrofluorímetro *Perkin-Elmer 650-40* (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)

($\lambda_{exc} = 495 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$). As intensidades de fluorescência de cada amostra foram comparadas com a fluorescência da sonda (H_2DCF) na ausência de amostra. A molécula de H_2DCFDA é um marcador indirecto da taxa de produção de ROS, na medida em que quanto maior for a velocidade de oxidação, mais ROS existem na amostra capazes de promoverem essa oxidação, o que se traduz num sinal de fluorescência.

Tabela 3.3 – Parâmetros do fluorímetro utilizados nos ensaios.

Parâmetros do fluorímetro	
λ excitação	495 nm
λ emissão	520 nm
Tempo de aquisição	100 min 00 s
Velocidade de registo	5 mm/min
Escala	0.000 ~9000
Impressora	Ligada
Resposta	1 s
Ganho	Elevado
Fenda de excitação	5 nm
Fenda de emissão	10 nm

A produção de ROS foi determinada pelo declive do registo de intensidade de fluorescência após adição de NADH e expressa em unidades arbitrárias (u.a.)/min/mg proteínas.

A produção de O_2^- na fracção mitocondrial foi determinada através da análise da taxa de redução do nitro *blue* tetrazólio (NBT), tal como indicado por Auclair e Voisin [1985]. O ensaio decorreu em meio contendo 50 mM fosfato (pH 7.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM NBT e 120 μg de proteína mitocondrial do tecido cardíaco e as determinações da redução do NBT foram realizadas a 560 nm num espectrofotómetro

Shimadzu UV mini 1240. A produção de O_2^- foi determinada com base no decréscimo da taxa de redução do NBT após adição de 350 U de SOD.

3.2.10. Determinação do nível de GSH

O conteúdo em glutathiona reduzida (GSH), um antioxidante não enzimático, foi determinado em homogenatos de ventrículo através da redução do ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) pelos grupos sulfidriilo, tal como descrito por Gândara *et al.* [2005]. Resumidamente, adicionou-se 20% de ácido perclórico às amostras para precipitar o conteúdo proteico, após o que se centrifugou a mistura a 16000 g durante 10 min, a 4 °C, e neutralizou-se o sobrenadante com KOH. Posteriormente, repetiram-se estes passos mais duas vezes. O ensaio decorreu num meio contendo 50 mM fosfato (pH 7.0), 100 mM KCl e 0.5 mM DTNB, e os valores de absorvência a 412 nm ($\epsilon_{DTNB} = 13.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foram registados, após adição da amostra, num espectrofotómetro *Shimadzu UV mini 1240*.

3.2.11. Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram processados nos programas *SigmaPlot 2001* e *Microsoft Office Excel 2003*. De modo a detectar possíveis diferenças entre as médias dos valores dos vários grupos para os biomarcadores de stresse oxidativo estudados foi aplicado um tratamento estatístico, realizado com o programa *SigmaStat 3.1*.

A comparação entre os grupos de estudo, relativamente a todos os parâmetros abordados, foi efectuada usando o teste *t-student* (representado pela letra *t*), um teste paramétrico, sempre que os parâmetros de normalidade da distribuição das amostras e de homogeneidade de variâncias entre os grupos foram cumpridos. Este teste é aplicado a um reduzido número de amostras ($n < 30$) e compara os grupos através da média dos

seus valores. As hipóteses nula e alternativa do teste são, respectivamente, H_0 : as médias dos grupos comparados são iguais e as diferenças que se observam entre grupos devem-se a erros de amostragem; e, H_1 : as médias dos grupos comparados são diferentes, rejeitando-se a hipótese nula sempre que os valores de t calculados excedem o valor tabelado para a distribuição t para um nível de significância de $p = 0.05$.

Nos casos em que um dos parâmetros de aplicabilidade do teste *t-student* não se verificou, foi aplicado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para $\alpha = 0.05$, uma vez que este teste pode ser aplicado a um número mais reduzido de amostras (até $n = 4$) e não requer os pressupostos do teste *t-student*. Ao aplicar este teste, os grupos são comparados através das respectivas medianas e são estipuladas as hipóteses nula e alternativa, com o mesmo critério de rejeição que o teste *t-student* [Fowler e Cohen, 1990].

Os resultados apresentados representam a média e o desvio padrão (média \pm desvio) dos valores obtidos *in vivo* para cada um dos grupos estudados. Verificou-se para todos os parâmetros analisados, que os grupos Controlo e Placebo eram semelhantes, não apresentando diferenças significativas entre si ($p > 0.05$). Por isso, os resultados destes dois grupos foram analisados e apresentados em conjunto, sob a designação de “grupo Controlo”.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após se ter confirmado por espectroscopia de ressonância magnética do isótopo 51 de vanádio (RMN de ^{51}V) (Secção 2.3.3.), que após diluição no meio de injeção (0.9% NaCl), a solução de decavanadato (1 ou 5 mM vanádio total) é maioritariamente composta por espécies decaméricas de vanadato e a solução de metavanadato essencialmente composta por monovanadato, procedeu-se à administração intravenosa das respectivas soluções de vanadato em indivíduos da espécie *S. aurata* para avaliar os efeitos da administração *in vivo* de diferentes espécies oligoméricas de vanadato na distribuição subcelular de vanádio e em marcadores de stresse oxidativo. Verificou-se também, por espectroscopia UV/visível (Secção 2.3.2.) que, apesar de, contrariamente ao vanadato monomérico, a solução de decavanadato ser instável após diluição no meio de ensaio, as espécies decaméricas apresentam uma cinética de desoligomerização lenta em solução salina (0.9% NaCl) com um tempo de meia-vida estimado em cerca 16 h (25 °C). Deste modo, comprovou-se que o vanadato decamérico é relativamente estável à temperatura ambiente, permitindo o estudo dos seus efeitos não só *in vitro*, mas também *in vivo*, tal como se descreve nas secções seguintes.

3.3.1. Mortalidade induzida por exposição a soluções de vanadato

Ensaio preliminares, nos quais se administrou 5 mM de vanadato (soluções de decavanadato e metavanadato) a espécimens de *S. aurata*, reproduzindo as condições experimentais dos estudos previamente realizados com indivíduos da espécie *Halobatrachus didactylus* [Aureliano *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Gândara *et al.*, 2005], revelaram que para essa concentração a solução de metavanadato é letal aos indivíduos da espécie *S. aurata*, (64% de mortalidade 1 h após administração i.v.; estudo realizado com 25 animais). No entanto, não foi registada

mortalidade nem alterações comportamentais após administração i.v. de vanadato decamérico. Também Abbasi [1998], registou um efeito semelhante em teleósteos de água doce (*Nuria denricus*) expostos a vanadato na água (>0.5 ppm) com um LC₅₀ de 13.3 mg V/l após 24 h de exposição. Este comportamento descrito em teleósteos poderá servir de marcador para uma resposta típica à toxicidade por metavanadato.

Para além das alterações comportamentais, a solução de metavanadato induziu também modificações hematológicas: maior fluidez e reduzida capacidade de coagulação, relativamente aos animais Controlo. As alterações hematológicas registadas devem-se ao facto do vanádio reduzir a permeabilidade da membrana eritrocítica e alterar a pressão osmótica intracelular, induzindo hemólise [Hogan, 1990] (Fig. 3.2). A selecção de imagens representativa dos efeitos das soluções de vanadato nos parâmetros hematológicos foram captadas através de uma câmara de vídeo *Sony* acoplada a um microscópio óptico *Zeiss Axiolab*, digitalizadas com uma placa de vídeo *Miro DC30* (704 x 576 pixels) e, posteriormente, gravadas em ficheiros DIB.

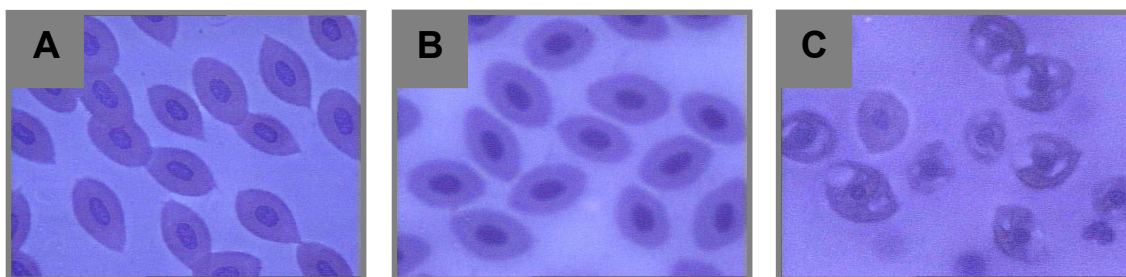


Figura 3.2 – Imagens obtidas ao microscópio óptico de eritrócitos de indivíduos *S. aurata* dos grupos Controlo (A) e administrados intravenosamente com soluções de decavanadato (B) e metavanadato (C), corados com corante *Giemsa* (ampliação 1000x).

Em consequência da destruição dos eritrócitos observou-se um decréscimo significativo do número de glóbulos vermelhos (-58%), nível de hemoglobina (-52%) e hematócrito (-49%), tal como anteriormente descrito [Zaporowska e Wasilewski, 1992;

Zaporowska *et al.*, 1993]. No entanto, estes resultados permitem concluir que existem diferentes sensibilidades às diferentes espécies de vanadato entre espécies piscícolas, sendo a dourada mais sensível que o charroco.

3.3.2. Variação das massas cardíaca e ventricular relativas

A importância da estrutura ventricular para o desempenho funcional do ventrículo está também associado à sua massa relativa. A massa ventricular relativa (MVR; Equação 3.2) nos peixes varia consideravelmente, entre 0.04 (espécies pouco activas) a 0.2 % (espécies de elevada actividade). Vários estudos demonstraram que uma MVR elevada corresponde a uma maior eficiência funcional do coração, visto as espécies metabolicamente mais activas possuírem um índice de MVR elevado [Farrell *et al.*, 1988; Farrell e Jones, 1992; Farrell, 1993].

Da análise da variação das massas cardíaca (MCR) e ventricular (MVR) relativas em indivíduos da espécie *S. aurata* expostos durante 24 h a 1 mM de vanadato (soluções de decavanadato e metavanadato, administradas i.v.), verificou-se que, para este período de exposição e concentração total de vanádio, não existem alterações nos grupos tratados com as duas soluções de vanadato (MCR: $0.091 \pm 0.009\%$; MVR: $0.051 \pm 0.008\%$), relativamente ao grupo Controlo (Fig. 3.3).

No entanto, num estudo recente, com indivíduos da espécie *H. didactylus* expostos a 5 mM (vanádio total) na forma de espécies decaméricas e monoméricas de vanadato, observou-se que apesar da exposição ao monovanadato não induzir alterações nos índices de MCR e MVR, o vanadato decamérico promoveu um aumento significativo ($p < 0.05$) da MVC (+24%) 7 dias após exposição [Soares *et al.*, 2007f]. Também Borges *et al.* [2003], num estudo anterior realizado com a mesma espécie

ictiológica, verificaram um aumento significativo ($p < 0.05$) da MCR (+24%) e MVR (+27%), 7 dias após exposição à espécie decamérica de vanadato.

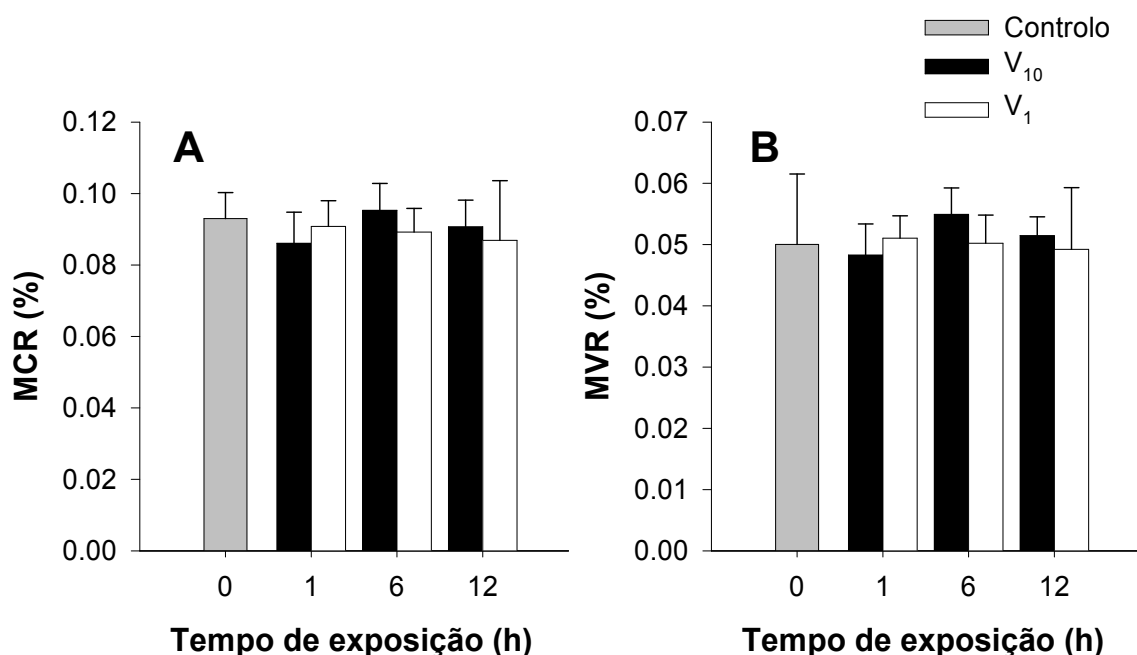


Figura 3.3 – Variação da massa cardíaca relativa (A) e massa ventricular relativa (B) em indivíduos da espécie *S. aurata*, 1, 6 e 12 h após a administração intravenosa de soluções de decavanadato (V₁₀) e metavanadato (V₁) (1 mM vanádio total; 1 ml/kg). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 6$).

Estas observações sugerem que o vanádio, mais especificamente as espécies decaméricas de vanadato, induzem hipertrofia dos miócitos cardíacos. Define-se de hipertrofia um aumento de tamanho das células existentes, sendo a principal responsável pelo crescimento do coração durante o desenvolvimento de um indivíduo [Nadal-Ginard, 2001]. No entanto, a hipertrofia do ventrículo tem sido associada a várias patologias no Homem e a situações de adaptação fisiológica em peixes [Clark e Rodnick, 1998; Nadal-Ginard, 2001]. Hamet *et al.* [1995], demonstraram que na fase inicial do processo hipertrófico no coração ocorre apoptose (morte celular programada).

Diversos estudos em ratos, sujeitos a uma exposição crónica a 100 ppm de vanádio na água de beber evidenciaram hipertensão arterial e/ou aumento da resistência

periférica vascular [Carmignani *et al.*, 1996], apesar de, coelhos expostos durante um ano à mesma concentração de vanádio na água de beber não apresentaram mudanças significativas na pressão sistólica e diastólica [Carmignani *et al.*, 1998], sugerindo que os metais tóxicos podem ter efeitos opostos nos miócitos dependendo da espécie em estudo [Carmignani *et al.*, 1996]. Akera *et al.* [1983] confirmam esta suposição ao verificarem que o vanadato produz efeitos inotrópicos positivos e negativos no músculo cardíaco isolado, dependendo da espécie, tipo de músculo e condições experimentais. No entanto, as alterações histológicas verificadas nestas condições não foram objecto de estudo do presente trabalho, permanecendo por esclarecer.

3.3.3. Distribuição subcelular de vanádio após administração *in vivo*

A acumulação de vanádio depende entre outros factores da espécie animal em questão e da idade do organismo, registando-se, no geral, maior quantidade de metal nos ossos, músculos, gorduras, rim, fígado, baço e plasma, enquanto que menores quantidades são detectadas no cérebro e outros órgãos [Hamel *et al.*, 1993; Yuen *et al.*, 1993; Saeki *et al.*, 1999].

No presente estudo, a quantidade de vanádio basal detectada no músculo cardíaco dos indivíduos da espécie *S. aurata* (46 ± 11 ng V/g tecido seco) e sangue (231 ± 45 ng V/g tecido seco) encontrou-se no intervalo de valores descritos em peixes de várias espécies, tais como: *Acanthoparagus bifasciatus*, *Anguilla anguilla*, *Auxis rochei*, *Carassius auratus*, *Epinephelus tauvina*, *Gobius minutus*, *Halobatrachus didactylus*, *Limanda limanda*, *Morone saxatilis*, *Mullus barbatus*, *Pleuronectes platessa*, *Scorpaena porcus* e *Siganus canaliculatus* [Miramand e Fowler, 1998; Aureliano *et al.*, 2002; Al-Saleh e Shinwari, 2002]. Os valores de vanádio basal registados no tecido

cardíaco foi cerca de 10 vezes inferior aos valores referidos para o tecido hepático [Gândara *et al.*, 2005].

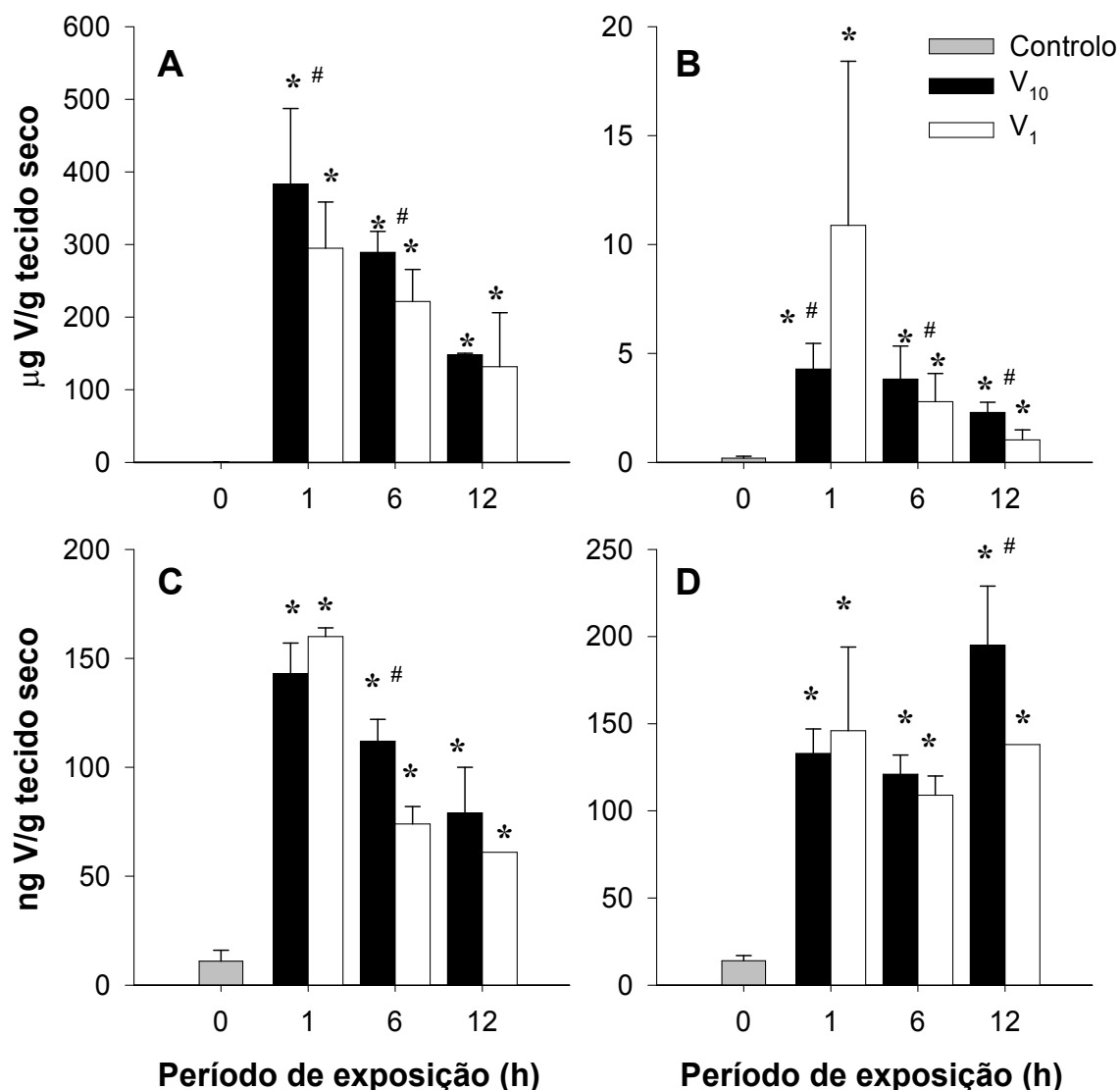


Figura 3.4 – Concentração de vanádio no plasma (A), eritrócitos (B), citosol (C) e mitocôndria cardíaca (D) de indivíduos *S. aurata* ($n = 4$) Controlo e tratados com 5 mM (vanádio total) de soluções de decavanadato (V₁₀) e metavanadato (V₁), após 0, 1, 6 e 12 h de exposição (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$); #significativamente diferente dos indivíduos tratados com V₁ ($p < 0.05$).

Estudos preliminares com concentrações superiores de vanadato (5 mM vanádio total) em peixes da espécie *S. aurata* demonstraram uma tendência para o vanádio se

acumular na mitocôndria, 12 h após administração intravenosa (i.v.) das soluções de vanadato (195 ± 34 e 138 ± 1 ng V/g tecido seco, 12 h após exposição às soluções de decavanadato e metavanadato, respectivamente), em comparação com o citosol, sendo a acumulação 2 vezes superior na mitocôndria do coração e registada mais cedo após exposição à solução de metavanadato do que às espécies decaméricas de vanadato (12 h) [Soares *et al.*, 2006] (Fig. 3.4). Um padrão de distribuição semelhante foi observado na espécie *H. didactylus* após exposição ao vanadato (5 mM vanádio total; administração intraperitoneal, i.p.) [Aureliano *et al.*, 2002]. Estes autores verificaram que, após administração i.p. da solução de metavanadato a concentração de vanádio detectada na fracção mitocondrial do tecido cardíaco duplicou após o primeiro dia de exposição, enquanto que no grupo tratado com a solução de decavanadato só se registou um aumento significativo da concentração de vanádio na mitocôndria, após 7 dias de exposição [Aureliano *et al.*, 2002]. No entanto, apesar do vanádio ter sido encontrado maioritariamente distribuído no plasma sanguíneo, também neste estudo se sugere que a mitocôndria seja um eventual alvo intracelular no músculo cardíaco de peixes, uma vez que foi nesta fracção que se registaram as maiores alterações na actividade das enzimas antioxidantes cardíacas.

Após 1 h de exposição ao vanadato administrado i.v., a maior quantidade de vanádio foi detectada no plasma sanguíneo (383 ± 104 e 295 ± 64 μ g V/g tecido seco em indivíduos tratados com soluções de decavanadato e metavanadato, respectivamente), sendo 80 vezes superior à registada nos eritrócitos (Fig. 3.4). Nos eritrócitos dos indivíduos intoxicados com a solução de metavanadato, registou-se uma concentração de vanádio superior à determinada nos indivíduos injectados com vanadato decamérico, apenas 1 h após a administração i.v. de vanadato (Fig. 3.4). No período de 1 e 12 h de exposição, a razão vanádio no plasma/vanádio nos eritrócitos

aumento de 27 para 128 nos indivíduos tratados com a solução de metavanadato, enquanto que permaneceu constante (77) nos animais injectados com a espécie decamérica de vanadato, indicando que após a administração da solução de decavanadato a quantidade de vanádio decresce igualmente no plasma e nos eritrócitos, enquanto que após intoxicação com a solução de metavanadato regista-se um decréscimo mais acentuado de vanádio nos eritrócitos (Fig. 3.4).

Verificou-se também neste estudo que, durante o período de exposição às soluções de vanadato (12 h), a quantidade de vanádio no citosol cardíaco, assim como no plasma sanguíneo, decresceu cerca de 50% em ambos os grupos tratados com vanadato, enquanto que permaneceu praticamente constante na mitocôndria. De facto, para além da mitocôndria, tem sido sugerido que, a nível subcelular, a maior parte do vanádio existente nos sistemas biológicos encontra-se no núcleo [Zychlinski e Byczkowski, 1990; Carmignani *et al.*, 1998; Saeki *et al.*, 1999].

Após administração i.v. de 1 mM de soluções de vanadato (vanádio total), a maior quantidade de vanádio foi detectada no plasma sanguíneo 1 h após exposição (4111 ± 467 e 5484 ± 1483 ng V/g tecido seco em indivíduos expostos às soluções de decavanadato e metavanadato, respectivamente), sendo cerca de 1000 vezes superior ao valores determinado nos eritrócitos (380 ± 135 e 291 ± 78 ng V/g tecido seco em indivíduos expostos às soluções de decavanadato e metavanadato, respectivamente) (Fig. 3.5). Após 6 e 12 h de exposição, a quantidade de vanádio no plasma decresceu para cerca de 6000 e 4000 ng V/g tecido seco, respectivamente, para ambas as soluções de vanadato. A ligação do vanádio a proteínas do plasma humano, tais como a transferrina e a albumina, tem sido descrita como desempenhando uma função relevante no transporte de vanádio no sangue [Chasteen, 1983], facto que pode justificar o decréscimo de vanádio registado no plasma sanguíneo. Nos eritrócitos de douradas

tratadas com a solução de decavanadato, registou-se, 12 h após a administração i.v. das soluções de vanadato, uma concentração de vanádio inferior (320 ± 67 ng V/g tecido seco) à observada nos indivíduos injectados com soluções de metavanadato (966 ± 454 ng V/g tecido seco) (Fig. 3.5).

Relativamente à mitocôndria e citosol cardíacos, foi registado um reduzido teor em vanádio (<100 ng V/g tecido seco) após administração *in vivo* de vanadato, não tendo esse valor variado com o tempo de exposição na fracção citosólica (~ 50 ng V/g tecido seco), para ambas as soluções, enquanto que na mitocôndria a quantidade de vanádio detectada na primeira hora de tratamento (cerca 45 ng V/g tecido seco) representa cerca de metade do conteúdo em vanádio registado após 6 e 12 h, para ambas as soluções. Contrariamente ao observado após administração de 5 mM de vanadato, 100 μ M de vanadato decamérico (1 mM vanádio total), não afecta a distribuição de vanádio nos períodos de exposição mais curtos, uma vez que foram observados valores semelhantes após exposição à solução de metavanadato.

Num estudo realizado com o mesmo modo de administração (i.v.) usado no presente estudo, mas para outro tecido (fígado) foi descrita a acumulação preferencial de vanádio na mitocôndria hepática (2 vezes superior que no citosol), 24 h após a administração i.v. de 5 mM (vanádio total) de solução de decavanadato em *H. didactylus* [Gândara *et al.*, 2005]. Estes resultados indiciam que tanto a mitocôndria cardíaca como a hepática são alvos intracelulares do vanádio. Aparentemente, em ambos os tecidos, a acumulação de vanádio na mitocôndria é favorecida após administração de vanadato decamérico, no entanto, a distribuição de vanádio no músculo cardíaco, após administração de vanadato decamérico, depende da concentração total de vanádio e do modo de administração. Esta evidência está de

acordo com o facto da distribuição subcelular de vanádio depender do modo de administração [Zaporowska e Scibior, 1998a].

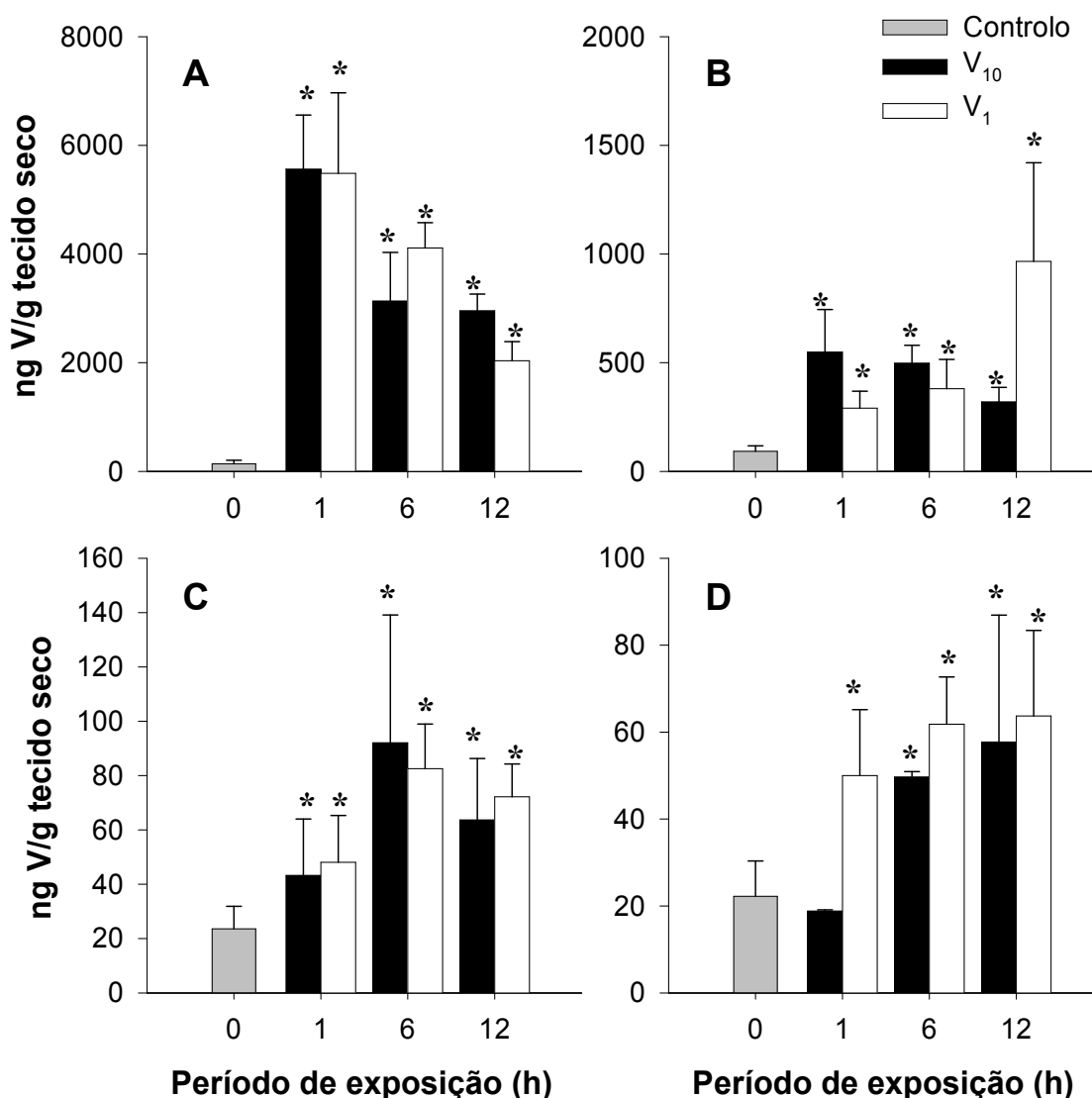


Figura 3.5 – Concentração de vanádio no plasma (A), eritrócitos (B), citosol (C) e mitocôndria (D) do tecido cardíaco de indivíduos *S. aurata* ($n = 4$) Controlo e tratados com 1 mM (vanádio total) de soluções de decavanadato (V_{10}) e metavanadato (V_1), após 0, 1, 6 e 12 h de exposição (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$).

Em resumo, os estudos de toxicidade com vanádio não têm tido em consideração a contribuição dos diferentes oligómeros de vanadato. No entanto, os estudos agora

apresentados demonstram que a concentração de vanádio encontrada no plasma sanguíneo, eritrócitos e fracções subcelulares do músculo cardíaco, após uma exposição aguda *in vivo* a concentrações sub-letais de vanadato, é afectada após administração de vanadato decamérico, confirmando estudos recentes [Aureliano *et al.*, 2002; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a]. Em exposições agudas (1 h a 7 dias) a concentrações sub-letais das soluções de decavanadato ou metavanadato (1 e 5 mM de vanádio total) verificou-se também que, independentemente da forma de vanádio administração, o vanádio distribui-se nos órgãos internos dos peixes da espécie *H. didactylus* e *S. aurata* com a seguinte ordem de concentração: sangue > fígado > rim > coração > músculo [Aureliano *et al.*, 2002; Sousa, 2004; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a; 2007f].

3.3.4. Marcadores de stresse oxidativo

Apesar de estar estabelecido crer que intracelularmente o vanadato (vanádio +5) é reduzido a vanadilo (vanádio +4) por diversos compostos antioxidantes, prevenindo-se deste modo os efeitos tóxicos do vanadato [Byczkowski e Kulkarni, 1998], vários estudos animais *in vivo* têm associado o vanadato com a promoção de stresse oxidativo e peroxidação lipídica [Stohs e Bagchi, 1995]. Recentemente, foi demonstrado que a exposição aguda à espécie decamérica de vanadato induz efeitos mais potentes que o monovanadato, promovendo stresse oxidativo, através da inibição da actividade de enzimas antioxidantes (dismutase do superóxido, catalase e peroxidases da glutathione) e do aumento da peroxidação lipídica nos tecidos cardíaco, hepático e renal [Aureliano *et al.*, 2002; Sousa, 2004; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a; 2007f].

Com objectivo de avaliar o efeito da espécie decamérica de vanadato na indução de stresse oxidativo, determinaram-se os valores basais de alguns marcadores de stresse oxidativo (Tabela 3.4) e analisou-se o efeito das diferentes espécies oligoméricas de vanadato nesses parâmetros.

Tabela 3.4 – Valores basais (controlo) para as espécies reactivas de oxigénio (ROS), actividades da dismutase do superóxido (SOD) e catalase (CAT), e peroxidação lipídica (espécies reactivas tiobarbitúricas – TBARS) no tecido cardíaco da espécie *S. aurata*.

	Valores basais (controlo)
Produção de ROS na mitocôndria	384 ± 140 u.a./min/mg proteína
Actividade da SOD mitocondrial	20091 ± 6951 U/mg proteína
Actividade da CAT mitocondrial	1.63 ± 0.51 nmol/min/mg proteína
Peroxidação lipídica	3.02 ± 0.51 µM TBARS/g tecido

Valores apresentados com média ± SD (n = 3).

Actividade pró-oxidante total

Tal como sucede com outros metais tóxicos, também o vanádio é conhecido por apresentar a capacidade de produzir espécies reactivas de oxigénio (ROS), resultado em peroxidação lipídica e alterações na actividade de enzimas antioxidantes [Byczkowski e Kulkarni, 1998]. O vanádio pode induzir a formação de ROS nos sistemas biológicos através de: (i) reacções tipo *Fenton* [Stohs e Bagchi, 1995]; (ii) biorredução do vanadato por acção da glutathiona (GSH), flavoenzimas ou oxidases de NAD(P)H com a consequente formação de ROS [Ghe *et al.*, 1985; Kalyani *et al.*, 1992; Ferrer *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001; Capella *et al.*, 2002]; e, (iii) estudos recentes têm indicado a promoção indirecta de ROS, provavelmente por interacção com a mitocôndria [Yang *et al.*, 2004]. Têm-se formulado várias teorias sobre a relação entre o vanadato e a promoção de ROS, no entanto ainda há muito trabalho a desenvolver para

clarificar se a especiação *in vivo* do vanadato, a sua redução e os seus mecanismos e vias de acção podem ter diferentes funções fisiológicas.

A actividade pró-oxidante total, após exposição ao vanadato, foi avaliada através da análise quantitativa da produção de ROS e apurou-se que, na mitocôndria cardíaca de peixe, apenas a solução de metavanadato induz um aumento significativo ($p < 0.05$) e retardado na produção de ROS (Fig. 3.6). O valor basal estimado para a actividade pró-oxidante do tecido cardíaco (384 ± 140 u.a./min/mg proteína; Tabela 3.4) aumentou cerca de 198% ($p < 0.05$), 12 h após a administração da solução de metavanadato, enquanto que não se registaram efeitos nos níveis de actividade pró-oxidante dos indivíduos tratados com decavanadato (Fig. 3.6).

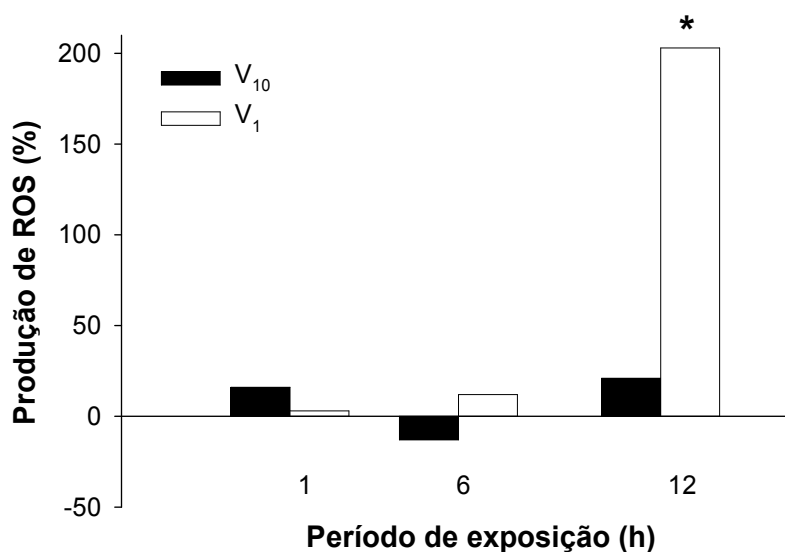


Figura 3.6 – Variação da taxa de produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na mitocôndria cardíaca de *S. aurata* após administração intravenosa (i.v.) de soluções de decavanadato, V₁₀ ou metavanadato, V₁ (1 mM vanádio total; 1 ml/kg). A variação foi calculada através do valor basal previamente determinado (Tabela 3.4). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 6$). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$).

Também no tecido hepático, ambos os oligómeros de vanadato afectam diferentemente a actividade pró-oxidante: a solução de decavanadato induziu um aumento na taxa de produção de ROS de cerca de 80%, durante todo o período de exposição (12 h), enquanto que a solução de metavanadato induziu um aumento de 150% após a primeira hora de exposição, registando-se um bloqueio da sua capacidade pró-oxidante ao longo das 12 h de exposição (40% e ~0%, 6 e 12 h após a exposição ao vanádio, respectivamente) [Soares *et al.*, 2007e].

Deste modo, com base nas observações anteriores, são de se esperar diferentes efeitos promovidos pelas espécies decamérica e monomérica de vanadato na produção de ROS. Contudo, num estudo *in vivo* semelhante [Gândara *et al.*, 2005], foi apresentada uma actividade antioxidante promovida por ambos os vanadatos no tecido hepático, após 24 h de exposição. Nesse estudo, os indivíduos *H. didactylus* administrados com soluções de decavanadato exibiram um ligeiro aumento na produção de ROS 12 h após exposição (cerca de 15% de aumento), mas 24 h depois registou-se uma diminuição da produção de ROS em cerca de 30%. Em oposição, nos animais injectados com a solução de metavanadato observou-se uma diminuição na produção de ROS de quase 40% (12 e 24 h), consistente com o aumento registado do conteúdo em GSH. A interpretação mais provável, para que após desoligomerização a espécie decamérica reproduza o comportamento registado com monovanadato, é que a decomposição do vanadato decamérico irá promover uma exposição retardada e gradual do fígado à espécie monomérica de vanadato. De facto, o mesmo efeito foi também registado relativamente ao conteúdo em GSH, descrito no mesmo órgão e para as mesmas condições experimentais [Gândara *et al.*, 2005].

Apesar de se saber que o vanádio participa em reacções tipo *Fenton* [Stohs e Bagchi, 1995] e dos mecanismos propostos para a acção do vanadato, que envolve a sua

bio-redução e a produção de ROS [Capella *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003], os resultados apontam para uma depressão da taxa de produção de ROS. Esta observação encontra-se de acordo com publicações anteriores em que se refere que em determinadas condições experimentais, tais como em ratos com hepatocardinogénese induzida [Chakraborty *et al.*, 2000] e diabetes [Genet *et al.*, 2002], o vanadato pode diminuir o stresse oxidativo.

Relativamente à produção do radical anião superóxido (O_2^-) na fracção mitocondrial do tecido hepático [Gândara *et al.*, 2005], verifica-se uma vez mais que as soluções de decavanadato e metavanadato induzem efeitos contrários: 12 h após exposição, a taxa de produção de O_2^- decresceu 35% nos indivíduos administrados com vanadato decamérico, enquanto que nos tratados com monovanadato registou-se um aumento de 45%. Curiosamente, os resultados inverteram-se após 24 h de exposição, a solução de decavanadato induziu um aumento de 30% e o vanadato monomérico diminuiu a produção de O_2^- em 40%. Pode-se afirmar que, as espécies decaméricas de vanadato induzem alterações na produção de O_2^- mitocondrial opostas às produzidas pelas espécies oligoméricas de vanadato presentes na solução de metavanadato, a partir do que se podem sugerir diferentes vias de acção biológica para os diferentes oligómeros. Das vias de acção intracelular propostas para o vanadato, são várias as que envolvem a produção de O_2^- mediada por oxido-reductases de NADPH da cadeia respiratória [Capella *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003]. Considerando os mecanismo de acção e desintoxicação propostos para o vanadato, que reduzem o vanadato a vanadilo com produção de O_2^- , é possível sugerir que o vanadato decamérico possa participar em tais reacções de um modo distinto do monovanadato. Note-se que, o aumento registado na produção de O_2^- , 24 após injeção

da solução de decavanadato, pode ser correlacionado com o aumento da concentração de vanádio registado na fracção mitocondrial [Gândara *et al.*, 2005].

Actividade de enzimas antioxidantes

De acordo com o aumento registado na produção de ROS, observou-se que a solução de metavanadato induziu também um aumento ($p < 0.05$) de 115% na actividade da dismutase do superóxido (SOD) da mitocôndria, 12 h após exposição ao vanadato, enquanto que a solução de decavanadato induziu um aumento de cerca de 30% ($p < 0.05$), 1 a 12 h após a administração *i.v.* (Fig. 3.7A; Tabela 3.4). Está postulado que a actividade da SOD aumenta com a necessidade de protecção contra agentes oxidativos, tais como o vanadato [Di Giulio *et al.*, 1995]. No entanto, aparentemente, só o monovanadato age como um agente pró-oxidante, visto que o vanadato decamérico não promove a mesma resposta, provavelmente devido a possuírem diferentes reactividades, que advêm de diferentes mecanismos de acção.

Relativamente à actividade da catalase mitocondrial (CAT), registou-se um decréscimo na actividade basal da CAT da mitocôndria (1.63 ± 0.51 nmol/mg proteína; Tabela 3.3) de -55% ($p < 0.05$), 12 h após exposição à solução de decavanadato, enquanto que a solução de metavanadato não induziu efeitos significativos (Fig. 3.7B). Resumidamente, a administração *in vivo* de 100 μ M de espécies decaméricas de vanadato (1 mM vanádio total) difere da administração de monovanadato, não induzindo a produção de ROS, nem estimulando a actividade da SOD, para além de diminuir a actividade da CAT. Registam-se, deste modo, efeitos pró-oxidantes mais significativos na mitocôndria cardíaca após administração *in vivo* da solução de metavanadato, enquanto que a exposição à solução de decavanadato parece prevenir este efeito, provavelmente (i) ligando-se a proteínas alvo e prevenindo deste modo a sua

decomposição a monovanadato, que induz a produção de ROS ou (ii) devido a diferentes reactividades. Uma vez formado, o vanadato decamérico exibe uma reactividade diferente da do monovanadato, evidenciando-se assim a necessidade de ter em conta a diferente contribuição dos oligómeros de vanadato na compreensão da toxicidade *in vivo* do vanadato.

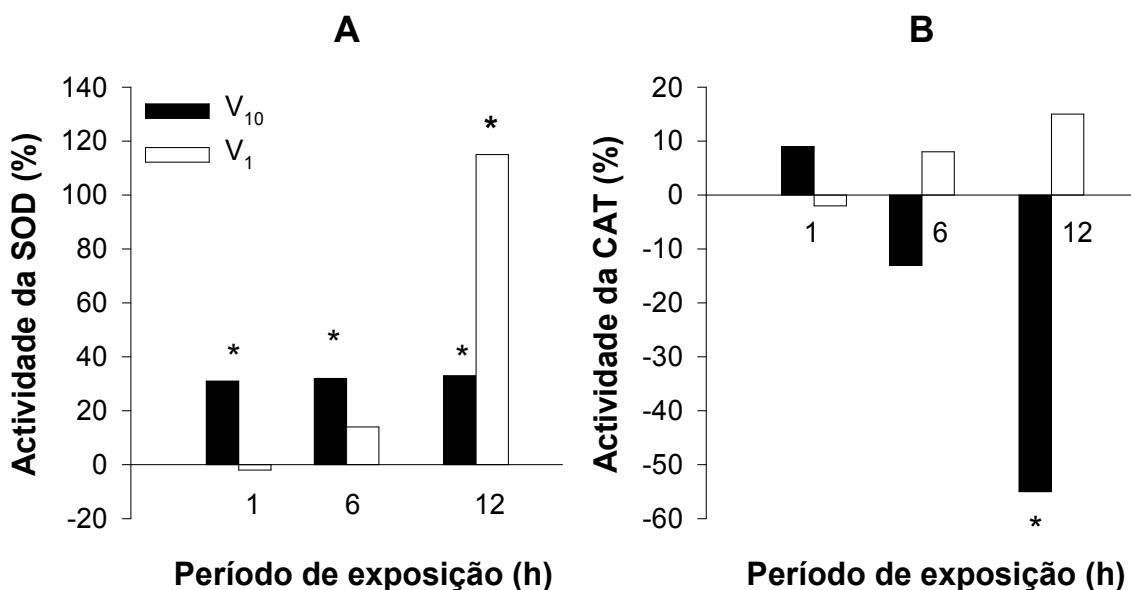


Figura 3.7 – Variação da actividade da dismutase do superóxido, SOD (A) e da catalase, CAT (B) na mitocôndria cardíaca de *S. aurata*, 1, 6 e 12 h após a administração de soluções de decavanadato (V₁₀) e metavanadato (V₁) (1 mM vanádio total; 1 ml/kg). A variação foi calculada através do valor basal previamente determinado (Tabela 3.4). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 6$). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$).

A diminuição da actividade da CAT, induzida pelo vanadato decamérico, está de acordo com resultados anteriores, onde se observa um decréscimo na actividade da CAT mitocondrial do tecido cardíaco induzido pela solução de decavanadato (-60%), 7 dias após administração i.p. de 5 mM de vanádio total em *H. didactylus* [Aureliano *et al.*, 2002]. Um decréscimo na actividade da CAT foi também descrito em peixes expostos a

5 μM de cádmio [Pruell e Engelhardt, 1980] e de prata [Atli *et al.*, 2006]. Verificou-se, num estudo semelhante, que a administração de vanadato decamérico e monovanadato induz alterações expressivamente diferentes em marcadores de stresse oxidativo do fígado [Gândara *et al.*, 2005]. Por outro lado, numa experiência anterior não se registaram alterações significativas na actividade de SOD mitocondrial em *H. didactylus*, 1 e 7 dias após exposição i.p. dos animais a 5 mM (vanádio total) das soluções de decavanadato e metavanadato [Soares *et al.*, 2007e].

Apesar de, nas condições do presente ensaio, não se terem verificado alterações significativas da actividade das GPx, estudos anteriores (5 mM vanádio total; administração i.p.) registaram que a solução de metavanadato induz um decréscimo (-35%) da actividade das GPx_{totais} em indivíduos da espécie *H. didactylus*, 7 dias após exposição, enquanto que no grupo tratado com vanadato decamérico observou-se um decréscimo de -20% após o primeiro dia de exposição, que retrocedeu por completo 7 dias após a administração da solução de decavanadato. Relativamente à actividade das Se-GPx, ambas as soluções de vanadato promoveram um decréscimo de actividade, sendo os efeitos inibidos ou estimulados 1 e 7 dias após a exposição às soluções de metavanadato ou decavanadato, respectivamente. Tendo em conta o descrito anteriormente, conclui-se que a resposta antioxidante induzida pelos vanadatos depende então, da concentração total de vanádio administrado, do modo de exposição e/ou varia entre diferentes espécies de peixe, para além de depender da composição em espécies de vanadato das soluções de vanadato.

Peroxidação lipídica

Fenómenos de peroxidação lipídica são communmente observados após a indução da produção de ROS no meio celular. Foram vários os estudos que, sem especificar a

espécie de vanadato presente, registaram que o vanadato pode atenuar a peroxidação lipídica no tecido hepático em situações de indução de hepatocarcinogénese [Chakraborty *et al.*, 2000] e de carcinogénese mamária por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) [Bishayee *et al.*, 2000], sem alterar os níveis de peroxidação lipídica em indivíduos Controlo.

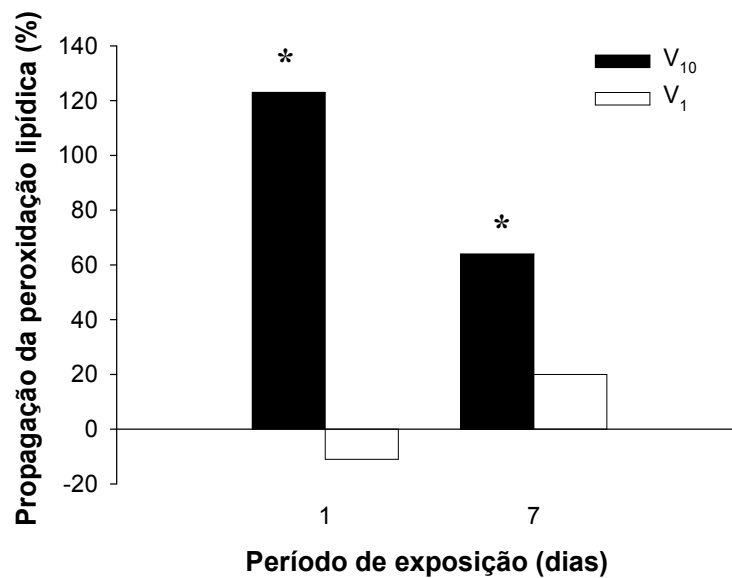


Figura 3.8 – Variação da propagação da peroxidação lipídica no coração de *H. didactylus*, 1 e 7 dias após administração intravenosa (i.v.) *in vivo* de soluções de decavanadato, V₁₀ ou metavanadato, V₁ (5 mM vanádio total; 1 ml/kg). A variação foi calculada através do valor basal previamente determinado (Tabela 3.4). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 6$). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$).

Em estudos anteriores, demonstrou-se para concentrações superiores de vanadato (5 mM), diferente período de exposição (mais longo), diferente espécie biológica (*H. didactylus*), mas para o mesmo tecido (coração), um aumento significativo ($p < 0.05$) na propagação da peroxidação lipídica do tecido cardíaco 1 e 7 dias após exposição à solução de decavanadato, enquanto que não se registaram efeitos após

administração da solução de metavanadato (Fig. 3.8) [Aureliano *et al.*, 2007]. Posteriormente, procedeu-se à avaliação das respostas celulares precoces induzidas pela espécie decamérica de vanadato em períodos de exposição mais reduzidos, tais como 1, 6 e 12 h.

Verificou-se no presente estudo que 1 h após a administração *in vivo* de ambas as soluções de vanadato, a peroxidação lipídica no tecido cardíaco se propagou de igual modo (Fig. 3.9). Os produtos da peroxidação lipídica foram quantificados no coração total e, registou-se que, 1 h após a administração i.v. de decavanadato ou metavanadato, ambas as soluções de vanadato aumentaram ($p < 0.05$) o valor basal $3.02 \pm 0.51 \mu\text{mol TBARS/g}$ tecido (Tabela 3.4) em cerca de 20%, mantendo-se este aumento após 6 e 12 h só no caso do tratamento com a solução de metavanadato (Fig. 3.9). Para concentrações mais elevadas de vanadato (5 mM vanádio total), diferente modo de administração (i.p.), períodos de exposição mais longos, diferente espécie (*H. didactylus*), mas no mesmo tecido (coração) tem sido descrito um aumento significativo ($p < 0.05$) na propagação da peroxidação lipídica do tecido do tecido cardíaco apenas 7 dias após a administração i.p. em *H. didactylus* (cerca de 80 e 60% após tratamento com decavanadato e metavanadato, respectivamente) [Aureliano *et al.*, 2002].

No tecido hepático de uma espécie diferente de teleósteo (*H. didactylus*), administrado i.v. com uma concentração superior de vanadato (5 mM), registou-se um aumento de 80% ($p < 0.05$) na peroxidação lipídica 24 h após a administração i.v. de ambas as soluções de vanadato [Gândara *et al.*, 2005]. Nesse estudo, o vanadato decamérico não promoveu alterações significativas 12 h após a administração, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, enquanto que a solução de metavanadato induziu um aumento nos produtos da peroxidação lipídica de cerca de

55% ($p < 0.05$). Contudo, 24 h após a administração i.v. da espécie decamérica, o valor de peroxidação lipídica foi semelhante ao registado nos indivíduos administrados com a solução de metavanadato (80%) [Gândara *et al.*, 2005]. Consequentemente, para concentrações de vanadato decamérico superiores (5 mM vanádio total) regista-se um efeito mais demorado na propagação da peroxidação lipídica após administração da solução de decavanadato, comparativamente à aplicação da solução de metavanadato, provavelmente devido à sua estabilidade a pH fisiológico.

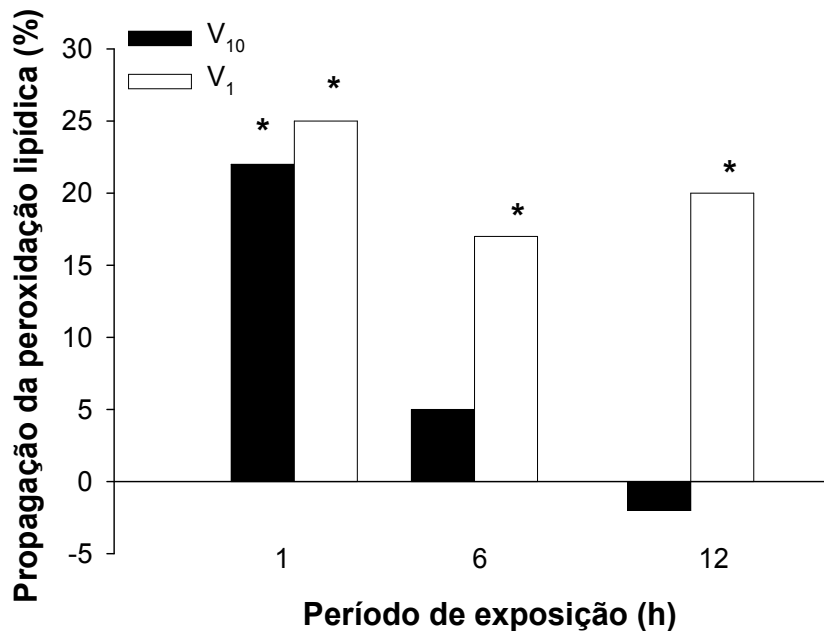


Figura 3.9 – Variação da propagação da peroxidação lipídica no coração de *S. aurata*, após administração intravenosa (i.v.) de soluções de decavanadato, V₁₀ ou metavanadato, V₁ (1 mM vanádio total; 1 ml/kg). A variação foi calculada através do valor basal previamente determinado (Tabela 3.4). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 6$). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$).

Para concentrações de vanadato inferiores (1 mM), ambas as soluções induzem peroxidação lipídica, mas uma vez mais os efeitos demonstram ser diferentes e dependentes do período de tempo decorrido após a respectiva administração (Fig. 3.9).

Sugere-se então que, a espécie decamérica de vanadato induz peroxidação devido a uma diferente reactividade ou, inclusive, previne os efeitos promovidos pelo vanadato monomérico uma vez que não apresenta níveis tão elevados como os registados 6 e 12 h após exposição à solução de metavanadato. Eventualmente, a decomposição total do vanadato decamérico em monovanadato, após administração, não irá induzir os mesmos efeitos que os promovidos pela administração da solução de metavanadato. Provavelmente, as interações promovidas pelos oxovanadatos lábeis são diferentes das induzidas pelo vanadato decamérico. Mais ainda, pode acontecer que no momento em que a espécie decamérica de vanadato se encontre totalmente desoligomerizada noutros oligómeros de vanadato os alvos possam não ser os mesmos, de modo a não induzir os mesmos efeitos registados anteriormente.

A espécie decamérica de vanadato é, inequivocamente, um promotor de peroxidação lipídica uma vez que a solução de metavanadato, que para as concentrações usadas no presente estudo contém essencialmente espécies monoméricas, induz um efeito menos acentuado. Este dano peroxidativo, por sua vez, parece estar relacionado com a diminuição da actividade das enzimas antioxidantes.

Conteúdo em glutathiona

A glutathiona reduzida (GSH) é conhecida por ser o antioxidante intracelular mais importante [Hasspieller *et al.*, 1994; Storey, 1996], encontrando-se envolvido na biorredução do vanadato [Ghe *et al.*, 1985; Kalyani *et al.*, 1992; Ferrer *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001; Capella *et al.*, 2002]. Neste sentido, é de se esperar que os níveis de GSH sejam afectados pela administração de vanadato. De facto, vários estudos mostraram que o conteúdo em GSH é aumentado na presença de vanadato [Chakraborty *et al.*, 2000; Rinaldi *et al.*, 2002]. Recentemente [Soares *et al.*, 2007f],

observou-se que as soluções de vanadato promovem um aumento de 170% ($p < 0.001$) nos níveis cardíacos de GSH 12 h após a administração i.v. da solução de metavanadato (5 mM vanádio total) e um aumento de 120 e 135%, 12 e 24 h após administração da solução de decavanadato, respectivamente, em indivíduos da espécie *H. didactylus* (Fig. 3.10). Uma vez mais, a interpretação destes resultados assenta no facto da desoligomerização das espécies decaméricas de vanadato produzir uma exposição retardada do coração ao monovanadato.

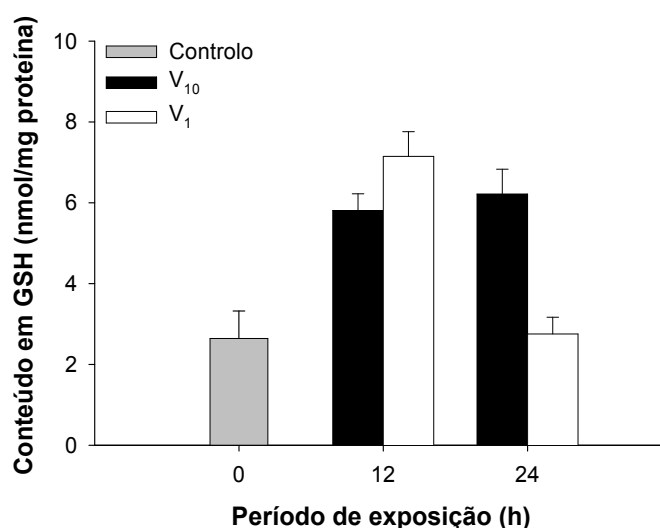


Figura 3.10 – Conteúdo em glutathiona reduzida (nmol GSH/mg proteína) no tecido cardíaco de *H. didactylus* ($n = 5$) injectados i.v. com 5 mM (vanádio total; 1 ml/kg) de solução de decavanadato (V₁₀) e metavanadato (V₁), 12 e 24 h após administração (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo, $p < 0.05$.

Por sua vez, e tal como registado por Gândara *et al.* [2005], no tecido hepático os níveis de GSH são afectados de modo diferente após administração das soluções de decavanadato e metavanadato (5 mM vanádio total) em espécimens *H. didactylus*. Enquanto que o conteúdo basal de GSH (7.8 ± 3.0 nmol GSH/mg proteína) não sofreu alterações significativas após administração i.v. da solução de decavanadato, os autores

Efeito *in vivo* de decavanadato

registaram um aumento de 20 e 35% no teor em GSH 12 e 24 h após a administração da solução de metavanadato, respectivamente. Deste modo, o músculo cardíaco parece ser mais sensível ao stresse oxidativo promovido pelos oligovanadatos que o fígado, sugerindo que órgãos diferentes apresentam diferentes sensibilidades aos oligómeros de vanadato.

3.4. CONCLUSÕES

Apesar de na maioria dos estudos biológicos a contribuição do vanadato decamérico não ser frequentemente considerada para os efeitos do vanádio, o presente estudo evidencia que devido à sua longa estabilidade a pH fisiológico, a espécie decamérica não se decompõe totalmente em vanadato monomérico antes de induzir fortes alterações nos marcadores de stresse oxidativo, permitindo deste modo o estudo não só dos seus efeitos *in vitro*, mas também *in vivo*. Demonstra-se também que a administração de vanadato decamérico, ainda que parcialmente desoligomerizado em solução (com um tempo de meia-vida de ~16 h), induz diferentes efeitos no coração quando comparada com a administração de soluções de metavanadato. Estes dados evidenciam a importância de ter em consideração a espécie decamérica de vanadato na avaliação da toxicidade induzida por vanadato, além de aprofundar o conhecimento dos efeitos bioquímicos do vanádio. Mais ainda, o uso de peixes como modelo biológico em estudos toxicológicos parece adequado ao estudo dos efeitos da administração da solução de decavanadato nos marcadores de stresse oxidativo, peroxidação lipídica e distribuição subcelular de vanádio, não só devido à sua temperatura fisiológica, mas também devido à sua elevada sensibilidade à toxicidade por metais.

A distribuição de vanádio na mitocôndria do tecido cardíaco, assim como anteriormente descrita para o tecido hepático e renal, após administração *in vivo* de vanadato decamérico depende da concentração total de vanádio e do modo de administração, corroborando os estudos de Zaporowska e Scibior [1998a]. Conclui-se também que, a mitocôndria cardíaca é um alvo subcelular da acumulação de vanádio. A acumulação de vanádio parece depender da presença de espécies decaméricas, sugerindo então que a desoligomerização *in vivo* do vanadato decamérico é suficientemente lenta, o que permitir afectar a taxa de acumulação de vanádio. A

contribuição do vanadato decamérico para os efeitos biológicos induzidos pelo vanadato permite, deste modo, um novo conhecimento sobre as funções biológicas do vanádio.

Concluiu-se também que, as respostas antioxidantes induzidas pelos vanadatos depende da concentração total de vanádio administrada, da via de exposição e/ou varia entre diferentes espécies de peixe, para além de depender da composição oligomérica das soluções de vanadato. De facto, a solução de decavanadato exhibe padrões de resposta de peroxidação lipídica e de marcadores de stresse oxidativo diferentes que os induzidos pelo monovanadato. Os resultados *in vivo* indicam que o vanadato decamérico induz efeitos severos na actividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica, que parecem estar relacionados com o aumento de vanádio intracelular registado. Após intoxicação com a solução de decavanadato, o metabolismo do vanádio é afectado, tendo-se identificado a mitocôndria como o seu principal alvo subcelular.

Os resultados agora descritos evidenciam a importância de ter em consideração as espécies decaméricas de vanadato na avaliação dos efeitos biológicos do vanadato. O progressivo conhecimento da função e contribuição do vanadato decamérico nos efeitos promovidos pelo vanádio é necessário para a compreensão das funções do vanádio nos sistemas biológicos. Deste modo, com base nos resultados obtidos com o presente estudo e em ensaios anteriores, é possível propor um esquema explicativo da acção que a espécie decamérica de vanadato exhibe na actividade pró-oxidante através da promoção da formação de anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$); este acréscimo na produção radicalar leva a um concomitante aumento da actividade da dismutase de superóxido (SOD); o incremento de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) produzido por esta via irá, por sua vez, induzir um aumento da actividade das peroxidases da glutathiona (GPx); levando a um aumento do conteúdo em glutathiona reduzida (GSH); enquanto que o $O_2^{\cdot-}$, por sua vez, irá promover a propagação de peroxidação lipídica através de reacções *Haber-Weiss* (Fig. 3.11).

Sugere-se deste modo que, a actividade oxidativa do vanadato decamérico não resulte directamente da indução da produção de H_2O_2 , uma vez que a actividade antioxidante da catalase (CAT) parece não estar relacionada com as respostas ao stresse oxidativo induzidas pelos efeitos tóxicos do vanadato decamérico; o que sugere que, a peroxidação dos lípidos membranares, registada após administração *in vivo* da solução de decavanadato, não resulta da estimulação de reacções *Fenton* (Fig. 3.11). Em virtude dos resultados obtidos após exposição *in vivo* ao vanadato decamérico, que diferem dos efeitos promovidos pelo monovanadato, torna-se evidente a importância de ter em consideração a especiação do vanadato na contribuição para os seus efeitos biológicos. No entanto, algumas questões permanecem por esclarecer: (i) Quais os alvos subcelulares e moleculares do vanadato decamérico com importância fisiológica?; (ii) O stresse oxidativo induzido pela espécie decamérica de vanadato deve-se à sua desoligomerização?

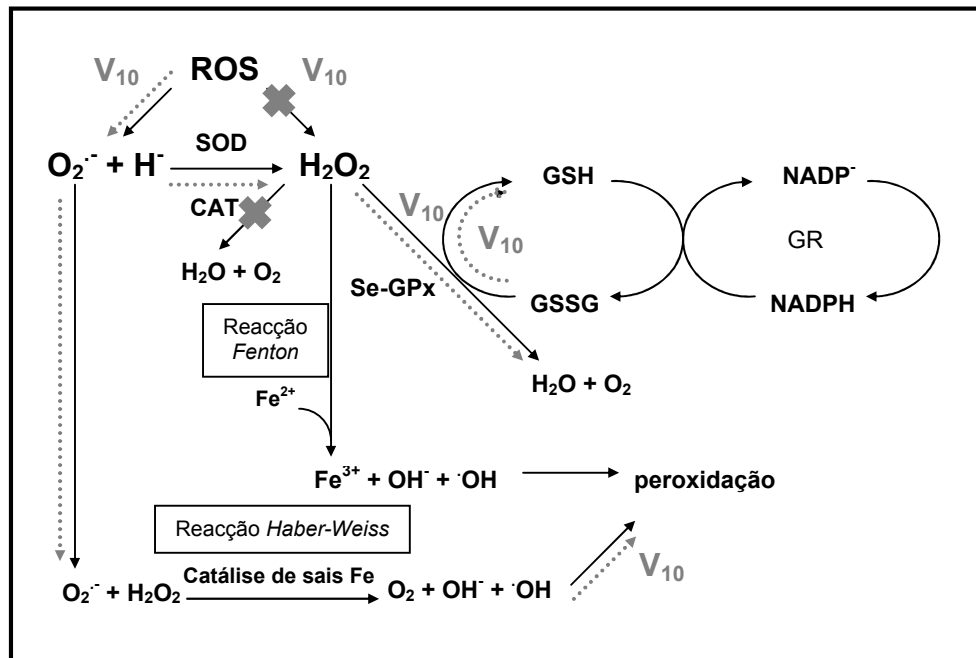


Figura 3.11 – Esquema propondo as vias de acção do vanadato decamérico (V_{10}) na formação de espécies reactivas de oxigénio e dos efeitos induzidos em algumas enzimas envolvidas na defesa antioxidante celular. [Adaptado de Storey (1996)].

Em conclusão, propõem-se no presente capítulo que após administração em modelos piscícolas (*Sparus aurata*) a espécie decamérica de vanadato induz respostas biológicas diferentes das promovidas por outros oxovanadatos lábeis, provavelmente devido a diferentes reactividades resultantes de diferentes mecanismos de acção, realçando a importância de ter em atenção a contribuição do vanadato decamérico para a avaliação e interpretação dos efeitos da toxicidade *in vivo* do vanadato.

Capítulo 4

ESTUDO DA INTERACÇÃO *in vitro* DE DECAVANADATO COM A INTEGRIDADE FUNCIONAL DA MITOCÔNDRIA



Capítulo 4

ESTUDO DA INTERACÇÃO *in vitro* DE DECAVANADATO COM A INTEGRIDADE FUNCIONAL DA MITOCÔNDRIA

4.1. INTRODUÇÃO

A fosforilação oxidativa é o processo bioquímico de maior relevância desempenhado pela mitocôndria para suprir os requisitos energéticos das células. Consequentemente, este organelo tende a concentrar-se em tecidos com elevadas exigências energéticas. O consumo de oxigénio pelo tecido renal é apenas suplantado pelo do coração, sendo 95% do ATP produzido aerobicamente consumido nos processos de reabsorção tubular [Cain e Skilleter, 1987]. Um composto tóxico que iniba a fosforilação oxidativa mitocondrial pode induzir efeitos drásticos no metabolismo de órgãos importantes, tais como o coração, o rim, o fígado e o cérebro.

A análise dos efeitos de um composto tóxico no metabolismo mitocondrial – tais como a respiração mitocondrial, a fosforilação e o transporte de metabolitos – pode ser uma ferramenta útil na determinação do local e modo de acção do referido composto.

4.1.1. A mitocôndria como potencial alvo de toxicidade

A avaliação dos efeitos toxicológicos de um determinado composto na integridade estrutural e funcional da mitocôndria é, usualmente, baseada na combinação de estudos *in vivo* com estudos *in vitro*. Nos estudos *in vitro*, são avaliados os efeitos de um determinado composto adicionado a mitocôndrias isoladas, enquanto que, a realização de estudos *in vivo* implica o envolvimento de animais pré-tratados ou expostos ao

composto em estudo e proceder, posteriormente, ao isolamento da fracção mitocondrial do tecido em estudo para comparação das suas reacções metabólicas com mitocôndrias de controlo. Em ambos os casos, o uso de preparações mitocondriais para o estudo da toxicidade de determinado composto implica a convicção de que esse composto induz os seus efeitos tóxicos através de uma perturbação inicial da fosforilação oxidativa mitocondrial. Os ensaios *in vitro* permitem caracterizar determinado composto como sendo um inibidor mitocondrial, implicando desta forma a mitocôndria como um dos principais alvos de toxicidade.

4.1.2. Estudo da cadeia respiratória

Visto vários inibidores da fosforilação oxidativa actuarem directamente na cadeia respiratória, tais inibições têm sido demonstradas com recurso a estudos respiratórios. A determinação de várias actividades mitocondriais, tais como o controlo respiratório, a actividade ATPásica e da oxidase de NADH, são importantes na monitorização do grau de disfunção mitocondrial induzido por um agente tóxico. A determinação do consumo de oxigénio na presença de um agente inibidor é, portanto, um poderoso método analítico para o estudo do metabolismo mitocondrial. Outro método, alternativo e complementar, é a análise das propriedades espectrais dos citocromos e flavoproteínas da cadeia respiratória que podem ser facilmente monitorizados num espectrofotómetro de feixe único [Cain e Skilleter, 1987].

4.1.3. Integridade da membrana mitocondrial e transporte de metabolitos

A membrana interna da mitocôndria actua como barreira à maioria dos metabolitos que têm de ser transportados através da membrana mitocondrial, para o correcto funcionamento celular. Estes mecanismos de transporte permitem à mitocôndria a

manutenção do pH e do potencial de membrana, essenciais à manutenção da fosforilação oxidativa e à regulação da transferência de substratos e ADP/ATP para o citosol.

Todas as células estão envolvidas por membranas semipermeáveis, com uma carga desequilibrada de moléculas carregadas, de um e outro lado da membrana. Esta diferença de potencial através da membrana varia em função da distribuição relativa de iões intra- (K^+ e proteínas) e extracelularmente (Na^+), ou seja, de um e de outro lado da membrana, sendo a diferença de potencial eléctrico através da membrana celular na ordem de -10 a -90 milivolts. O potencial da membrana mitocondrial, que deriva portanto da distribuição assimétrica dos protões através da membrana interna mitocondrial, é essencial para a manutenção das funções exercidas pela mitocôndria, tendo sido abordadas em vários estudos a relação entre o potencial de membrana e algumas condições patológicas, tais como anóxia e apoptose [Zurgil *et al.*, 2002; Matarrese *et al.*, 2003].

Note-se que: (i) uma célula com diferença de potencial normal (fisiológico) através da membrana celular, designa-se de polarizada; (ii) ao modificar a concentração iónica no interior da célula, aumentando a sua carga iónica, o potencial torna-se hiperpolarizado; ao contrário, (iii) ao aumentar as cargas positivas no interior da célula, diminuindo a diferença de potencial através da membrana, o potencial torna-se despolarizado.

4.1.4. A mitocôndria como alvo intracelular de vanadato

Descreveu-se recentemente [Soares *et al.*, 2006] que o decavanadato, quando administrado *in vivo*, induz uma distribuição de vanádio na mitocôndria diferente da observada após exposição ao monovanadato (Secção 3.3.2.), sugerindo este organelo

como um alvo subcelular da espécie decamérica. Mais ainda, observou-se um padrão distinto de peroxidação lipídica e de marcadores de stresse oxidativo em resposta ao vanadato decamérico, em comparação com as induzidas pela espécie monomérica de vanadato (Secções 3.3.3.), provavelmente devido a uma diferente reactividade da espécie decamérica vanadato [Soares *et al.*, 2007a].

Sabe-se que o vanadato afecta a respiração mitocondrial alterando a transferência de electrões entre os complexos III e IV [DeMaster e Mitchell, 1973]. Para além disso, vários estudos têm associados a toxicidade do vanádio com a capacidade de induzir a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), provavelmente por interacção com centros oxido-redutores mitocondriais [Yang *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2005]. Investigações nesta área de estudo, comprovaram também que o vanadato bloqueia a transferência de electrões na cadeia respiratória entre os citocromos b_1 e c , causando inibição da oxidação do succinato e de substratos associados ao NADH [Byczkowski *et al.*, 1979; Zychlinski *et al.*, 1990; Zychlinski e Byczkowski, 1990]. Os iões de vanadato têm sido também implicados na inibição da desidrogenase de succinato mitocondrial [Velours *et al.*, 1975], assim como da sintetase de succinil-CoA dependente de ATP (A-SCS) da mitocôndria cerebral de rato [Krivanek e Novakova, 1991; 1992]. Estudos envolvendo espécies oligoméricas de vanadato, demonstraram que o vanadato decamérico, e não outro oligómero: (i) estimula a oxidação de NADH na membrana plasmática de eritrócitos [Vijaya *et al.*, 1984; Kalyani e Ramasarma, 1992] e em microssomas hepáticos, de rato [Kalyani *et al.*, 1992; Kalyani e Ramasarma, 1993]; (ii) induz a redução do citocromo c [Rao e Ramasarma, 2000]; (iii) apresenta actividade α -adrenérgica agonista em anéis da aorta em ratos [Venkataraman *et al.*, 1997]; e, (iv) é reduzido pela desidrogenase de isocitrato específica de NADP⁺ (IDH) [Rao e Ramasarma, 2000].

Apesar da evidência de que o vanádio compromete a funcionalidade mitocondrial, os efeitos deste metal na bioenergética mitocondrial dos organismos aquáticos não se encontram completamente esclarecidos.

4.1.5. A mitocôndria de peixe como modelo para estudos toxicológicos

Tradicionalmente, os estudos de toxicidade têm utilizado espécies de mamíferos como modelos biológicos. A conveniência da utilização destes animais, para a elucidação dos mecanismos implicados no dano celular advém, em grande parte, do interesse que os estudos de saúde humana têm demonstrado por questões relacionadas com a toxicidade induzida por metais. No entanto, tem-se tornado evidente que algumas espécies de peixes apresentam maior sensibilidade aos efeitos tóxicos de metais pesados que os mamíferos [Kelly *et al.*, 1998]. A maioria dos estudos sobre toxicidade de metais em peixes limita-se a uma abordagem dos efeitos *in vivo*, indicando os efeitos adversos na fisiologia dos órgãos alvo. Uma vez mais, as investigações a nível celular têm sido realizadas com células de modelos mamíferos. Os estudos da toxicidade induzida por cádmio, zinco, selénio, cobre e até mesmo vanádio em peixes limitam-se à determinação de insultos ao nível hepático e renal [Palace e Klaverkamp, 1993; Palace *et al.*, 1993; Zikic *et al.*, 1998; Vaglio e Landriscina, 1999], sendo escassos os estudos existentes que relacionem a toxicidade por metais pesados com o tecido cardíaco de peixes [Tort e Madsen, 1991; Wang *et al.*, 1999]. O registo da toxicidade de vanádio neste tecido é, por sua vez, quase inexistente [Akeru *et al.*, 1983; Llobet e Domingo, 1984; Boscolo *et al.*, 1994; Aureliano *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2006; 2007a]. No entanto, o envolvimento de metais tóxicos no dano oxidativo do tecido cardíaco sugere que este órgão apresenta elevada vulnerabilidade à intoxicação por metais [Jamall *et al.*, 1989; Tort e Madsen, 1991; Sarkar *et al.*, 1995; Limaye e Shaikh, 1999].

4.1.6. Isolamento de fracções mitocondriais

Nos estudos *in vitro*, a manutenção da capacidade da mitocôndria desempenhar as suas funções metabólicas está estreitamente associada à qualidade e/ou pureza das preparações mitocondriais, assim como à presença de um agente inibidor. Os métodos disponíveis para determinação da pureza e qualidade das preparações mitocondriais baseiam-se na monitorização das várias funções metabólicas exercidas por este organelo e podem também ser úteis na identificação do local de inibição de um determinado agente inibidor [Cain e Skilleter, 1987].

Durante o processo de isolamento, as mitocôndrias são facilmente danificadas e surgem usualmente problemas na obtenção de controlos respiratórios aceitáveis, que serão evitados se algumas precauções gerais forem tomadas. Na preparação de mitocôndrias intactas e funcionais (acopladas) é de extrema importância a optimização de métodos de homogeneização não violentos que possibilitem a obtenção de mitocôndrias com elevado índice de integridade, essencialmente determinada pela razão do controlo respiratório (RCR). Contudo, qualquer método de homogeneização irá invariavelmente produzir mitocôndrias danificadas, que serão facilmente separadas das mitocôndrias intactas por centrifugação diferencial [Cain e Skilleter, 1987].

A maioria das funções mitocondriais requer a manutenção da integridade mitocondrial. Para tal, recorre-se usualmente à isotonicidade dos meios de homogeneização, alcançada através do uso quer de agentes iónicos (tais como 100 mM KCl) quer não aniónicos (tais como 0.25 M sacarose). A composição das soluções tampão usadas nos processos de isolamento pode diferir de acordo com a natureza do tecido ou com o protocolo adoptado pelo laboratório em questão, no entanto o pH das soluções é usualmente aferido a aproximadamente 7.5 com Tris

[tris(hidroximetil)aminometano] ou outro reagente com capacidade tampão que seja adequado [Cain e Skilleter, 1987].

Uma vez que, o rendimento dos métodos de isolamento é invariavelmente baixo convém compensar este facto utilizando elevadas quantidades de tecido para, deste modo, ser possível obter quantidades razoáveis de mitocôndrias. Outro factor chave para a obtenção de mitocôndrias intactas funcional e morfologicamente é a duração do processo de isolamento, que não deve exceder a 1 hora.

As mitocôndrias tendem a concentrar-se em tecidos com elevados requerimentos energéticos, tais como: coração, rim, fígado e cérebro. E, visto o fígado ser dos órgãos mais activos bioquimicamente na metabolização de xenobióticos, o recurso a preparações mitocondriais hepáticas tem sido deste sempre utilizado como modelo para a avaliação dos mecanismos de toxicidade e definição dos alvos moleculares de determinado composto nos sistemas biológicos. No entanto, a elevada vulnerabilidade que o tecido cardíaco apresenta ao dano oxidativo por metais tóxicos (Jamall *et al.*, 1989; Tort e Madsen, 1991; Sarkar *et al.*, 1995; Limaye e Shaikh, 1999), tem sugerido este órgão como um bom modelo para o estudo dos efeitos tóxicos de determinados compostos na bioenergética mitocondrial.

4.1.7. Objectivos

Na presente secção pretende-se proceder ao isolamento de mitocôndrias intactas e funcionais de tecido cardíaco de peixe e tecido hepático de rato para posterior análise dos efeitos *in vitro* promovidos por soluções de vanadato na integridade funcional da mitocôndria. Com o objectivo de caracterizar a qualidade e pureza das preparações mitocondriais isoladas, procedeu-se à determinação de actividades mitocondriais específicas, tais como da F_0F_1 -ATPase e da desidrogenase de succinato, e à determinação de actividades ATPásicas (dependentes de Ca^{2+} ou Mg^{2+}) que denunciasses contaminações com retículo sarcoplasmático, respectivamente.

É objectivo do presente capítulo avaliar os efeitos da espécie decamérica e monomérica de vanadato nas funções mitocondriais de preparações de mitocôndrias hepáticas de rato e cardíacas de peixe. Nesse sentido, procedeu-se à comparação dos efeitos de duas soluções de vanadato (decavanadato e metavanadato, compostas essencialmente por espécies decámicas e monoméricas de vanadato, respectivamente) no consumo de oxigénio e despolarização da membrana mitocondrial. Mais ainda, tentou-se apurar o local e a natureza da acção das espécies oligoméricas de vanadato na cadeia transportadora de electrões através da determinação das alterações oxido-redutores induzidas nos citocromos da cadeia respiratória mitocondrial.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados, de elevado grau de pureza, foram adquiridos a empresas especializadas, nomeadamente: 2,4(α)-dinitrofenol (DPN) (Merck, Alemanha); ciclosporina A (CsA), dihidroetídio (DHE) e iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianeto (JC-1) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA); citocromo *c* (de coração de bovino) e rotenona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

4.2.2. Sacrifício e amostragem biológica

Para o isolamento de mitocôndrias cardíacas de peixe, sacrificaram-se douradas (*Sparus aurata*), pesando 400-600 g. Os animais foram adquiridos a duas aquaculturas locais (Algarve) e mantidos em tanques de 450 L, em água do mar arejada e com recirculação constante, sob condições de cativeiro controladas (20 °C, 35‰ e exposição a ciclos circadianos naturais) por períodos superiores a 2 semanas. Durante o período de aclimação às condições laboratoriais, os peixes foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial e privados de alimentação durante os 2 dias que antecederam o sacrifício, por sobredosagem com anestésico 2-fenoxietanol (banho).

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas a partir de ratos macho adultos (3 meses) da espécie *Rattus norvegicus*, pesando 200-250 g. Os animais, provenientes de uma linhagem consanguínea da estirpe *Wistar*, foram obtidos através do *Servicio de Animalario* da *Universidad de Extremadura*, Badajoz (Espanha), e mantidos com acesso livre a água e alimento (ração comum). Os espécimens foram privados de alimentação, mas mantidos com acesso livre a água, durante as 12 horas que antecederam o sacrifício por deslocação cervical.

Todas as experiências com animais respeitaram as directrizes estabelecidas no guia do *National Research Council* para o cuidado e uso de animais de laboratório.

4.2.3. Isolamento de fracções mitocondriais

O isolamento de fracções mitocondriais de tecido cardíaco de peixe e de tecido hepático de rato foi realizado a partir de homogenatos dos respectivos órgãos por centrifugação diferencial. Todos os procedimentos de isolamento foram realizados à temperatura de 0-4 °C.

*Isolamento de fracções mitocondriais de ventrículo de *Sparus aurata**

Após remoção do tecido cardíaco e registo dos respectivos dados morfométricos, homogeneizaram-se os ventrículos e isolaram-se mitocôndrias cardíacas por centrifugação diferencial, tal com anteriormente descrito [Chappell e Hansford, 1972; Soares *et al.*, 2007b]. Resumidamente, homogeneizaram-se os ventrículos de *S. aurata* em 3 períodos de 30 s à velocidade máxima em 10 ml de solução de homogeneização A (5 mM Tris-HCl, pH 7.4; 300 mM sacarose; 1 mM EGTA; 20 mM manitol) por grama de tecido e centrifugaram-se a 460 g durante 10 min; centrifugou-se o sobrenadante a 10000 g durante 30 min; ressuspendeu-se o centro da camada mais espessa e escura em 5 ml de solução de homogeneização e sujeitou-se a nova centrifugação (10000 g durante 30 min); por último, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento (mitocôndrias) na mesma solução de homogeneização. As amostras mitocondriais foram conservadas a -80 °C até ao momento dos ensaios.

Isolamento de fracções mitocondriais de fígado de rato

Após remoção do tecido hepático e registo dos seus dados morfométricos, isolaram-se mitocôndrias hepáticas de rato a partir do procedimento anteriormente descrito por Johnson e Lardy [1967] e Soares *et al.* [2007c]. Resumidamente, homogeneizaram-se 10 g de fígado de rato em 30 ml de solução de homogeneização B (5 mM Tris-HCl, pH 7.4; 250 mM sacarose; 1 mM EGTA) com um homogeneizador do tipo *Potter-Elvehjem* e, posteriormente, centrifugou-se o homogenato a 460 g durante 10 min; o sobrenadante foi novamente centrifugado (12500 g durante 7 min); a parte central da camada mais espessa e escura, ressuspensa em aproximadamente 40 ml de solução de homogeneização B e sujeita a nova centrifugação (12500 g durante 7 min); desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento (mitocôndrias) na mesma solução. As amostras mitocondriais foram conservadas a -80 °C por períodos não superiores a 2 semanas, de modo a prevenir o envelhecimento *in vitro*.

4.2.4. Quantificação proteica

A determinação do conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de Bradford [1967], usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão de proteína.

4.2.5. Caracterização de fracções mitocondriais de coração de peixe e fígado de rato

A qualidade das preparações mitocondriais é afectada por possíveis contaminações com outros organelos (lisossomas e peroxissomas, por exemplo) e/ou pela integridade funcional das mitocôndrias [Cain e Skilleter, 1987]. Este último factor, de maior importância, só pode ser avaliado através da determinação de várias funções metabólicas, tais como as actividades da F_0F_1 -ATPase e da desidrogenase de succinato.

As actividades ATPásicas das preparações mitocondriais foram determinadas usando-se o método contínuo (cinética), monitorizando-se a mudança de absorvência continuamente no meio de reacção (e não, através de um método descontínuo – tempo fixo – em que são retiradas amostras do meio de reacção ao longo do tempo e analisadas pela técnica adequada).

Actividade da F_0F_1 -ATPase

Determinou-se a actividade da F_0F_1 -ATPase (actividade ATPásica inibida por 5 mM de azeto de sódio) através da medida da actividade ATPásica [García-Martín e Gutiérrez-Merino, 1990], a 25 °C (mitocôndrias cardíacas de peixe) ou 37 °C (mitocôndrias hepáticas de rato), na ausência e presença de 5 mM de azeto de sódio, num meio de ensaio contendo: 50 mM Tes-KOH, pH 7.4; 0.1 M KCl; 2.5 mM $MgCl_2$; 40 mM NaCl; 2 mM ATP, 50 μ M $CaCl_2$, 5 mM EGTA, 0.42 mM fosfoenolpiruvato, 0.25 mM NADH, cinase de piruvato 7.5 IU, desidrogenase de lactato 18 IU e 15 μ g proteína mitocondrial/ml. Este método rege-se pelo princípio que, os iões azeto inibem a hidrólise de ATP e o bombeio de H^+ , por F_0F_1 -ATPases de origens variadas [Linnette Beechey, 1979], assim como inibem a hidrólise de ATP por F_1 solubilizada [Pedersen, 1975]. Calculou-se a actividade da F_0F_1 -ATPase usando o coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm ($\epsilon_{NADH} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressou-se a actividade em nmol NADH oxidado/min/mg proteína.

Actividade da desidrogenase de succinato

A actividade da desidrogenase de succinato foi determinada, a 25 °C (mitocôndria cardíaca de peixe) ou 37 °C (mitocôndria hepática de rato), a partir da redução do ferricianeto de potássio [Veeger *et al.*, 1969] num meio de ensaio contendo: 0.1 M

fosfato; 1 mM EDTA; 1 mM KCN; 40 mM succinato; 0.1% BSA; ferricianeto de potássio 1 mM e 20 µg proteína mitocondrial/ml. Calculou-se a actividade da desidrogenase de succinato usando o coeficiente de extinção molar do ferricianeto de potássio a 420 nm ($\epsilon_{K_3Fe_2(CN)_6} = 1.05 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressou-se a actividade em nmol succinato oxidado/min/mg proteína. Note-se que por cada duas moléculas de ferricianeto reduzidas oxida-se uma molécula de succinato.

Actividades ATPásicas dependentes de Ca^{2+} ou Mg^{2+}

Em simultâneo com a determinação espectrofotométrica da actividade da F_0F_1 -ATPase, procedeu-se ao cálculo das actividades ATPásicas dependentes de Ca^{2+} ou Mg^{2+} nas amostras mitocondriais usando um sistema de enzimas acopladas baseado na interconversão de NAD^+ / $NADH$. Ambas as formas reduzida e oxidada destes dois nucleótidos absorvem a 260 nm, mas apenas a forma reduzida absorve a 340 nm. Neste tipo de ensaios, a enzima a monitorizar está acoplada a uma outra que utilize o sistema NAD^+ / $NADH$, através dos intermediários formados. No presente estudo, usou-se o ensaio de enzimas acopladas cinase de piruvato/desidrogenase de lactato [Cuenda *et al.*, 1990] (Fig. 4.1).

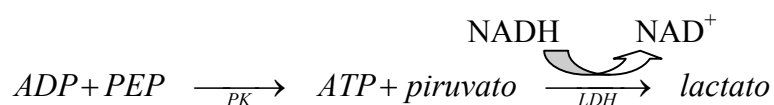


Figura 4.1 – Esquema da reacção do método de enzimas acopladas cinase de piruvato (PK)/desidrogenase de lactato (LDH).

Uma vez que estas enzimas estão em excesso, a velocidade de conversão do $NADH$, monitorizada pela variação da absorvência a 340 nm, será limitada pela produção de ADP e Pi pela amostra. O ATP é regenerado e por isso a sua concentração

inicial é mantida. Este método é muito sensível, uma vez que o coeficiente de extinção molar do NADH a 340 é de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o que significa que a conversão de 1 μmol de substrato/ml é indicada por uma variação em absorvência de 6.22 DO.

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições de determinação da actividade da F_0F_1 -ATPase, a actividade da Mg^{2+} -ATPase foi obtida através do declive após subtracção da linha de base correspondente à auto-oxidação do NADH e a actividade da Ca^{2+} -ATPase foi determinada através do declive após subtracção da actividade na presença de um agente quelante de Ca^{2+} (100 μM EGTA). A actividade das enzimas ATPásicas foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressa em nmol NADH/min/mg proteína. Este ensaio teve como objectivo apurar o grau de contaminação das preparações com retículo sarcoplasmático.

4.2.6. Actividades enzimáticas mitocondriais

Determinou-se o efeito das soluções de vanadato na actividade mitocondrial F_0F_1 -ATPásica, com concentrações de espécies decaméricas e monoméricas de vanadato até 20 μM (vanádio total), de modo a evitar a oxidação não-enzimática de NADH, observada na presença de concentrações de vanádio superiores a 50 μM (*dados não apresentados*). A actividade da F_0F_1 -ATPase foi determinada espectrofotometricamente através do recurso ao ensaio enzimático acoplado cinase de piruvato/desidrogenase de lactato (Secção 4.2.5.), anteriormente descrito por Cuenda *et al.* [1990].

O efeito das soluções de decavanadato e metavanadato na actividade da oxidase do citocromo *c* da mitocôndria foi analisado através do método espectroscópico de Smith [1955]. Tal como descrito no protocolo adoptado, após redução de 0.1% de citocromo *c* a ferrocitocromo *c*, com ascorbato de potássio, removeu-se o excesso de

ascorbato por diálise contra 10 mM tampão fosfato (pH 7.0), durante 12 horas com 2 trocas de meio. A taxa de oxidação do citocromo *c* foi determinada através da monitorização do decréscimo de absorvência da sua banda α a 550 nm [Wharton e Tzagoloff, 1967]. A cinética decorreu em meio reaccional contendo 10 mM tampão fosfato (pH 7.0) e 14% de ferrocitocromo *c* e as alterações dos valores de absorvência a 550 nm ($\epsilon_{K_3Fe_2(CN)_6} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foram determinadas a 37 °C (mitocôndria hepática de rato) ou 25 °C (mitocondria cardíaca de peixe), na ausência e presença de vanadato, após adição de 200 μg de proteína mitocondrial/ml.

4.2.7. Determinação do consumo de oxigénio mitocondrial

O consumo de oxigénio pela mitocôndria foi determinado polarograficamente com um eléctrodo de oxigénio *Hansatech* tipo *Clark* acoplado a um registador potenciométrico.

Determinou-se a respiração de mitocôndrias recém-isoladas, numa concentração final de 2 mg/ml, a 37 °C (fígado de rato) e 25 °C (coração de peixe), em tampão de respiração mitocondrial (0.2 M sacarose; 5 mM KH_2PO_4 ; 10 mM KCl; 5 mM MgCl_2 e 10 mM Tris, pH 7.4) suplementado com a seguinte combinação de substratos: 0.5 mM malato e 5 mM piruvato. Todas as adições ao meio de ensaio foram realizadas por injeção directa na câmara de medição (volume total: 2 ml) com seringas *Hamilton*. A taxa respiratória foi determinada na ausência e presença de 200 μM ADP. Os efeitos das espécies decamérica e monomérica de vanadato na respiração mitocondrial foram analisados após incubação das preparações mitocondriais com as respectivas soluções de vanadato (numa concentração inferior a 25 μM vanádio total).

No final de cada ensaio, adicionou-se um inibidor da cadeia transportadora de electrões da mitocôndria – 40 μM rotenona – e uma nova taxa respiratória foi determinada. Na presença de rotenona, o consumo de oxigénio obtido foi nulo. A

concentração de oxigénio determinada no tampão de respiração, após calibração padrão em água, foi de 219 e 253 nmol O₂/ml, a 37 e 25 °C, respectivamente. Expressaram-se as taxas de consumo de oxigénio em nmol O/min/mg proteína e determinaram-se as razões do controlo respiratório (RCR) [Chance e Williams, 1956] e ADP/O [Cain e Skilleter, 1987], tal como descritas em publicações anteriores.

4.2.8. Determinação do potencial da membrana mitocondrial

Procedeu-se ao estudo dos efeitos das soluções de vanadato no potencial da membrana mitocondrial monitorizando-se o potencial da membrana mitocondrial, usando o indicador fluorescente de potencial de membrana iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina (JC-1), na presença de concentrações de vanadato até 50 µM (vanádio total). O JC-1 é um derivado de carbocianina carregado positivamente que é capaz de penetrar a membrana mitocondrial através do potencial de membrana estabelecido.

Marcaram-se mitocôndrias (15 µg proteína/ml) com 0.6 µM JC-1, por incubação a 37 °C (mitocôndria hepática de rato) ou 25 °C (mitocôndria cardíaca de peixe) durante 15 min [Smiley *et al.*, 1991] e realizaram-se os estudos de fluorescência sob agitação constante num espectrofluorímetro *Perkin-Elmer 650-40* (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). A fluorescência do monómero de JC-1 (verde) foi determinada por excitação a 490 nm, registando-se a sua emissão a 532 nm. A fluorescência do agregado de JC-1 (vermelho) foi determinada por excitação a 490 nm, registando-se a sua emissão a 595 nm.

Os ensaios foram padronizados com o recurso a um agente desacoplador da fosforilação oxidativa, 1 mM 2,4(α)-Dinitrofenol (DNP). Através da determinação da razão entre as intensidades de JC-1 agregado e monomérico e procedeu-se à estimação

do grau de despolarização da membrana mitocondrial induzida por vanadato (Equação 4.1). O valor da razão das intensidades do monómero de JC-1 a 595 e 532 nm (F595/F532), que corresponde à completa despolarização da membrana mitocondrial, foi estimado em 1.32 ± 0.31 . Um aumento desta razão, numa situação de potencial de repouso (Controlo), é indicativo de um aumento do potencial de membrana (hiperpolarização), enquanto que uma diminuição na razão indica um decréscimo do potencial de membrana (despolarização) [Trojan *et al.*, 1997].

$$\text{Despolarização(\%)} = \frac{R_t - R_0}{R_0 - R_{+DNP}} \times 100 \quad [\text{Eq. 4.1}]$$

R_t = razão entre as intensidades de JC-1 agregado e monomérico após incubação com vanadato (60 min)

R_0 = razão inicial entre as intensidades de JC-1 agregado e monomérico (tempo = 0 min)

R_{+DNP} = razão entre as intensidades de JC-1 agregado e monomérico 1 hora após adição de DNP

Repolarização

Sabendo-se que, numa concentração fisiológica, a glutathiona (GSH) não só estabiliza o potencial da membrana mitocondrial como induz a repolarização *in vitro* em mitocôndrias despolarizadas (meio-tempo estimado em aproximadamente 5 min) [Soares *et al.*, 2007c], pretendeu-se estudar o efeito do decavanadato na repolarização do potencial da membrana mitocondrial induzida por GSH (5 mM). Para tal, procedeu-se à despolarização de mitocôndrias hepáticas de rato, por incubação em tampão de respiração mitocondrial na ausência de GSH (60 min), monitorizando-se de seguida o efeito de 1 μM de espécie decamérica de vanadato e 100 μM de vanadato monomérico na repolarização mitocondrial induzida por GSH.

Efeito de ciclosporina A

O antibiótico ciclosporina A (CsA), tem a capacidade de prevenir a despolarização da membrana mitocondrial bloqueando a libertação de proteínas apoptóticas, tais como o citocromo *c* da mitocôndria [Ganote e Armstrong, 2003; Sharov *et al.*, 2005]. Também o ácido bongkreico é um agente anti-apoptótico que inibe a translocase de nucleótidos adenina, um componente do complexo do poro de transição da membrana mitocondrial, bloqueando a libertação de citocromo *c* da mitocôndria.

No presente estudo, analisou-se também o efeito protector da CsA contra a despolarização da membrana mitocondrial induzida pelas soluções e vanadato, assim como o seu efeito na reversão (repolarização) da despolarização da membrana mitocondrial induzida pelo vanadato decamérico.

4.2.9. Determinação de NADH mitocondrial

Determinou-se o conteúdo em NADH em mitocôndrias expostas a concentrações de vanadato até 20 μM (vanádio total), através da determinação fluorimétrica de NADH em extractos mitocondriais alcalinos neutralizados [Martin-Romero *et al.*, 2004]. Resumidamente, após determinação da taxa de respiração mitocondrial (Secção 4.2.7.), adicionou-se às amostras mitocondriais 1 M KOH após o que, foram aquecidas a 55 °C durante 1 min, arrefecidas e o pH acertado a 8.4. Posteriormente, centrifugaram-se as amostras a 2500 g durante 10 min a 4 °C e recolheu-se o sobrenadante.

Os sinais de fluorescência foram registados (λ excitação: 340 nm; λ emissão: 460 nm), num meio contendo 0.1 M fosfato (pH 7.5) suplementado com 0.1 M KCl, 1 mM piruvato e 1.375 UI desidrogenase de lactato, e a concentração de NADH calculada com recurso a uma curva de calibração de intensidades de fluorescência obtida com concentrações conhecidas deste nucleótido de piridina.

4.2.10. Produção de espécies reactivas de oxigénio

O efeito de vanadatos na produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), nomeadamente anião superóxido (O_2^-), foi determinado a pH 7.4 e 37 °C (mitocôndria hepática de rato) ou 25 °C (mitocôndria cardíaca de peixe), usando o marcador fluorescente dihidroetídeo (DHE), tal como descrito em Budd *et al.* [1997]. O efeito de um dador de electrões (NADH) na produção de ROS foi testado separadamente, na ausência e presença de vanadato (concentrações até 50 μ M vanádio total). A produção de O_2^- foi determinada através do registo da fluorescência emitida por 10 μ M DHE (λ excitação: 473 nm; λ emissão: 600 nm) na presença de 0.5 mM malato e 5 mM piruvato ou 250 μ M NADH.

4.2.11. Determinação do estado oxido-reduzido do citocromo *b*

Adquiriu-se o espectro total da mitocôndria por espectroscopia diferencial num espectrofotómetro *Hewlett Packard 8451A* com matriz de diodo, de feixe único, controlado por um microprocessador. A leitura das absorvências, a todos os comprimentos de onda da totalidade do espectro (cada 2 nm de 400 a 600 nm), foi adquirida em simultâneo em meio de incubação contendo tampão de respiração mitocondrial, 0.5 mM malato e 5 mM piruvato e 1 mg proteína mitocondrial/ml. O espectro da cadeia electrónica e as alterações do seu estado oxido-reduzido, após incubação com soluções de decavanadato e metavanadato, foi comparado com uma situação controlo (na ausência de vanadato).

4.2.12. Isolamento e purificação de citocromo *b* de mamífero

Procedeu-se ao isolamento e purificação de citocromo *b* de mitocôndrias de rato seguindo o protocolo definido por Goldberger *et al.* [1961], para posterior

caracterização das alterações permanentes no estado oxido-reduzido do citocromo *b* induzidas pelo vanadato decamérico.

Remoção de citocromo a

Após descongelamento, homogenizaram-se as mitocôndrias a baixa velocidade, adicionaram-se 0.45 mg de desoxicolato potássio por mg de proteína e centrifugou-se a suspensão durante 1 hora a 80000 g. Desprezou-se o sedimento verde-acastanhado (contendo a quase totalidade de citocromo *a* existente nas mitocôndrias) e conservou-se o sobrenadante (contendo a maior parte dos citocromos vermelhos e uma pequena quantidade de citocromo *a*).

Remoção de citocromo c

Adicionaram-se ao sobrenadante, pela ordem apresentada: 1 mg de colato de potássio por mg de proteína; 2% SDS (massa/volume); e sulfato de amónia sólido a 30% de saturação, e centrifugou-se a suspensão (15 min a 10000 g) e desprezou-se o sedimento (contendo essencialmente hemoproteínas). Adicionou-se sulfato de amónia sólido ao sobrenadante até 50% de saturação e centrifugou-se a suspensão (20 min a 10000 g), desprezando o sobrenadante (maioritariamente composto por citocromo *c*).

Remoção de proteínas estranhas

Após dissolução do sedimento vermelho-castanho em tampão fosfato a 0.1 M, pH 7.4, diluiu-se a solução para uma concentração final de 15 mg de proteína por ml e aqueceu-se a solução a 40 °C, durante 5 min. Removeu-se o sedimento formado durante o aquecimento por centrifugação (15 min a 10000 g) e desprezou-se. Após o que, adicionou-se sulfato de amónia (10.6 g/100 ml) ao sobrenadante e aqueceu-se a

suspensão ligeiramente turva a 35 °C durante 5 min. Por fim, removeu-se o sedimento formado durante o aquecimento por centrifugação (15 min a 10000 g) e desprezou-se.

Purificação de citocromo b

Por fim, adicionaram-se, ao sobrenadante vermelho escuro obtido no aquecimento a 35° C, 30 mg de colato de potássio por mg de proteína e um volume suficiente de uma solução concentrada de sulfato de amónia para tornar a solução ligeiramente turva (aproximadamente 15 ml/100 ml). Aqueceu-se a suspensão a 40 °C e manteve-se a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, recuperou-se o precipitado floculado de citocromo *b* parcialmente purificado, formado durante este processo, como um sedimento vermelho-sangue por centrifugação (5 min a 5000 g). Homogenizou-se o precipitado em sacarose a 0.25 M, pH 7.5 e diluiu-se a solução para uma concentração proteica de 10 mg por ml. Neste ponto do procedimento, a suspensão contém 40% do citocromo *b* presente inicialmente e encontra-se livre de contaminação por outras hemoproteínas [Goldberger *et al.*, 1961].

Análise dos efeitos de vanadato no estado oxido-reductor de citocromo b

Com o objectivo de avaliar se o decavanadato (e também o monovanadato) afecta a cinética de redução e/ou oxidação do citocromo *b*, levando a uma alteração permanente do estado oxido-reduzido do citocromo, monitorizou-se a absorção do citocromo *b* a 562 e 572 nm. Este procedimento teve como base, o conhecimento que a redução do citocromo *b* produz um forte aumento da absorvência a 562 nm, com um ponto isosbético a 572 nm. Deste modo, a diferença das leituras de absorvência (562 nm - 572 nm) podem ser usadas para monitorizar esta redução.

4.2.13. Análise estatística

Todos os parâmetros estudados são apresentados como média e desvio padrão (média \pm desvio) das determinações realizadas, no mínimo, em três ensaios separados. A significância estatística dos dados foi determinada através do uso do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*. As diferenças, relativamente ao controlo, foram consideradas significativas para um nível de significância de $p < 0.05$.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tem sido recentemente descrito que os efeitos toxicológicos induzidos por vanadato dependem da presença de determinados oligovanadatos, tais como a espécie decamérica [Aureliano *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a; Soares e Aureliano, 2007]. Na presente secção, descreve-se que a espécie decamérica de vanadato despolariza fortemente o potencial da membrana mitocondrial e inibe o consumo de oxigénio na mitocôndria hepática de rato [Soares *et al.*, 2007c] e cardíaca de peixe [Soares *et al.*, 2007b], em comparação com a espécie monomérica, aparentemente por interacção com o citocromo *b*. Este capítulo evidencia a importância de ter em consideração a contribuição do vanadato decamérico nos efeitos biológicos do vanadato na mitocôndria.

4.3.1. Isolamento e caracterização de fracções mitocondriais de tecido cardíaco de peixe e de tecido hepático de rato

As preparações mitocondriais de fígado de rato obtidas apresentaram concentrações proteicas (22.6 ± 5.5 mg proteína/ml) cujos valores estão de acordo com os indicados no protocolo adoptado (30 mg proteína/ml) [Johnson e Lardy, 1967]. Do mesmo modo, os isolamentos de mitocôndrias hepáticas apresentaram elevados rendimentos (56.5 ± 3.0 mg proteína/rato), tal como previsto para o protocolo em questão (60 mg proteína/rato) [Johnson e Lardy, 1967].

Face ao reduzido rendimento dos métodos de isolamento, no caso das preparações mitocondriais de coração de peixe, optou-se pelo isolamento das mitocôndrias a partir de grupos de 3 indivíduos, com o objectivo de aumentar o rendimento dos isolamentos. Deste modo, obtiveram-se preparações de mitocôndrias

cardíacas (18.1 ± 4.8 mg proteína/preparação; 19.1 ± 2.5 mg proteína/ml) com o rendimento proteico esperado (20 mg proteína/ml) [Johnson e Lardy, 1967].

As funções desempenhadas pela mitocôndria estão inteiramente dependentes da fosforilação oxidativa, sendo a capacidade da mitocôndria para desempenhar este processo afectada pela qualidade e pureza das preparações mitocondriais [Cain e Skilleter, 1987]. Assim sendo, a melhor forma de avaliar a pureza e qualidade das preparações recai na monitorização de diversas funções metabólicas.

Deste modo, no presente estudo, determinaram-se duas das mais importantes reacções mitocondriais – a actividade da F_0F_1 -ATPase e da desidrogenase de succinato – com o objectivo de caracterizar a integridade funcional das mitocôndrias usadas. Apurou-se que as actividades mitocondriais específicas (Tabela 4.1), determinadas na mitocôndria cardíaca (actividade da F_0F_1 -ATPase: 1725 ± 126 nmol NADH oxidado/min/mg proteína mitocondrial; actividade da desidrogenase de succinato: 250 ± 13 nmol succinato oxidado/min/mg proteína mitocondrial) e na mitocôndria hepática (1115 ± 64 nmol NADH oxidado/min/mg proteína mitocondrial, actividade da F_0F_1 -ATPase; 2120 ± 453 nmol succinato oxidado/min/mg proteína mitocondrial, actividade da desidrogenase de succinato), exibiram valores de acordo com os estabelecidos para a actividade destas enzimas, tanto na mitocôndria de peixe [Greco *et al.*, 1982] como na de mamífero [Monroy e Pullman, 1967]. Paralelamente, apurou-se que as preparações apresentavam um elevado grau de pureza, sem contaminações significativas de retículo sarcoplasmático, devido aos reduzidos valores de actividade ATPásica dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} registados (Tabela 4.1).

Relativamente à contaminação com outros organelos subcelulares, é de se salientar que, apesar da densidade das mitocôndrias e dos lisossomas ser bastante semelhante (o que ocasiona inevitáveis contaminações cruzadas aquando da realização

de centrifugações diferenciais), o grau de contaminação das preparações irá depender da origem do tecido, visto a proporção da massa mitocondrial relativamente à massa celular variar em função do órgão em questão [Cain e Skilleter, 1987]. Deste modo, uma vez que no coração as células estão repletas de mitocôndrias, mas contém poucos lisossomas, as preparações mitocondriais cardíacas podem considerar-se virtualmente livres de contaminações. O fígado, por sua vez, ao possuir em proporção mais lisossomas irá consequentemente dar origem a preparações mitocondriais com algum grau de contaminação.

Tabela 4.1 – Valores médios das actividades ATPásicas (F_0F_1 -ATPase; desidrogenase do succinato, SDH; Ca^{2+} - e Mg^{2+} -ATPase) determinadas nas preparações mitocondriais de coração de peixe e fígado de rato.

	F_0F_1 -ATPase nmol NADH/min/mg	SDH nmol succinato/min/mg	Ca^{2+} -ATPase nmol NADH/min/mg	Mg^{2+} -ATPase nmol NADH/min/mg
Peixe (coração)	1725 ± 126	250 ± 13	42 ± 14	149 ± 23
Rato (fígado)	1115 ± 64	2120 ± 453	22 ± 5	124 ± 35

Estas eventuais contaminações não apresentam nenhum impedimento à determinação dos efeitos *in vitro* de um inibidor na função mitocondrial, uma vez que é de maior relevância preservar a integridade funcional da mitocôndria, sendo a duração do processo de isolamento um factor chave.

A conservação das preparações mitocondriais a -80 °C por um período não superior a 2 semanas, demonstrou ser crucial na manutenção de mitocôndrias funcionais sem indício de processos de envelhecimento *in vitro*, caracterizados pela diminuição progressiva dos valores das actividades mitocondriais específicas estimadas para cada tipo de preparação (em função da natureza do órgão e do tecido).

4.3.2. Efeito de decavanadato nas actividades mitocondriais de F_0F_1 -ATPase e citocromo *c* oxidase

Para concentrações de vanadato até 20 μM , não se registaram alterações na actividade mitocondrial da F_0F_1 -ATPase (1115 ± 64 e 1725 ± 126 nmol/min/mg proteína no tecido hepático e cardíaco, respectivamente) das preparações mitocondriais usadas no presente estudo (Fig. 4.2). Este resultado encontra-se de acordo com o observado em vários estudos com concentrações superiores de vanadato (100 μM vanádio total) [Bowman *et al.*, 1978; O'Neal *et al.*, 1979].

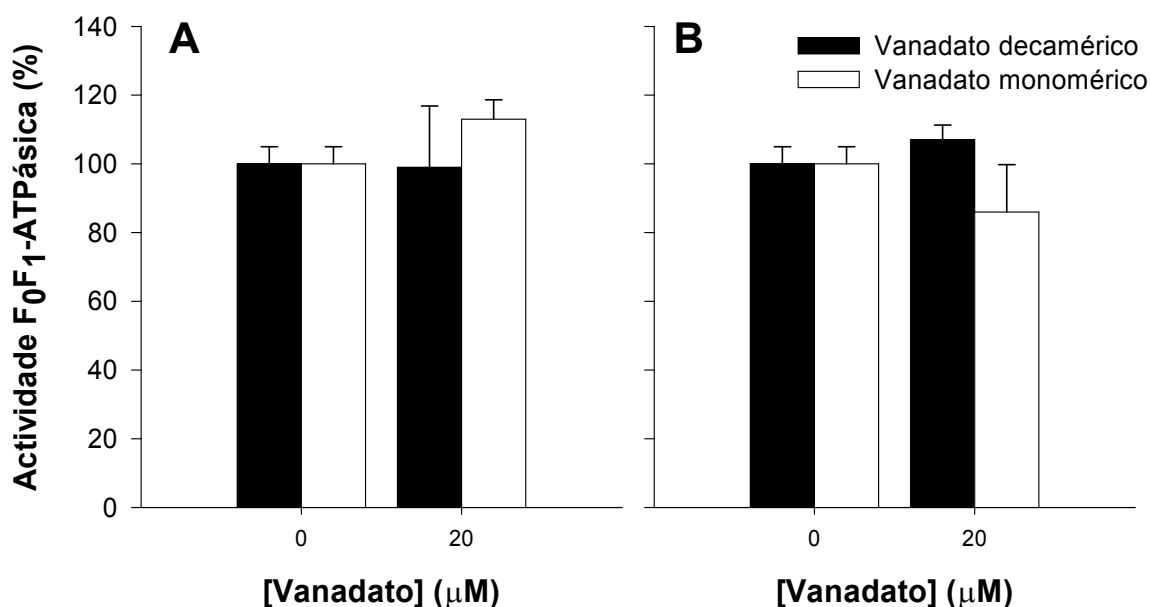


Figura 4.2 – Efeito do vanadato decamérico e monomérico na actividade da F_0F_1 -ATPase da mitocôndria. Efeito da espécie decamérica e monomérica de vanadato (20 μM vanádio total, nomeadamente 2 μM espécie decamérica de vanadato) na actividade F_0F_1 -ATPásica (%) da mitocôndria hepática de rato (A) e cardíaca de peixe (B) (15 μg proteína/ml). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).

Para testar experimentalmente, a possibilidade de que o vanadato decamérico inibe a cadeia transportadora de electrões através de um mecanismo de inibição do

complexo IV, analisou-se o efeito da espécie decamérica de vanadato no estado oxido-reduzido do ferrocitocromo *c* purificado. Com efeito, foi observado que a pH 7.0, nem o vanadato decamérico nem o monomérico induziram alterações ao nível do estado oxido-reduzido do citocromo *c* reduzido. Mais ainda, nenhuma das espécies oligoméricas de vanadato induziram alterações na actividade da oxidase do citocromo *c* de fígado de rato ou coração de peixe (*não apresentado*). Uma vez mais, este resultados estão de acordo com a principal conclusão obtida por Kalyani e Ramasarma [1993], nomeadamente, que a oxidação do citocromo *c* reduzido durante a oxidação do NADH estimulada por vanadato requer a presença de vanadato e peróxido de hidrogénio (H₂O₂), uma vez que ocorre por acção dos radicais hidroxilo formados na mistura vanadato/H₂O₂.

4.3.3. Efeito de decavanadato no consumo de oxigénio mitocondrial

A taxa de respiração basal, usando piruvato e malato como substratos, das mitocôndrias hepáticas de rato isoladas foram de 139 e 20 ng átomo de O/min/mg proteína no estado 3 e 4, respectivamente. Valores muito semelhantes foram obtidos para as preparações de mitocôndrias cardíacas de peixe: 130 e 26 ng átomo de O/min/mg proteína no estado 3 e 4, respectivamente. Observou-se que o vanadato decamérico inibe a respiração mitocondrial ao nível do estado 3 (estimulada por ADP), tal como representado pelo decréscimo do consumo de oxigénio registado em as ambas preparações mitocondriais (Fig. 4.3A e 4.3B). A espécie decamérica de vanadato aparentou ser cerca de 100 vezes mais potente que a monomérica como inibidor do consumo de oxigénio na mitocôndria hepática, tal como indicado pelos valores de IC₅₀, 98.5 ± 5.1 nM para o vanadato decamérico e 9.7 ± 1.4 µM para a espécie monomérica (Fig. 4.3A). De igual modo, a espécie decamérica de vanadato inibiu o consumo de oxigénio na mitocôndria cardíaca

de peixe, mais fortemente que a espécie monomérica, com um IC_{50} de aproximadamente 400 nM, enquanto que se determinou um valor superior para o monovanadato (23 μ M) (Fig. 4.3B).

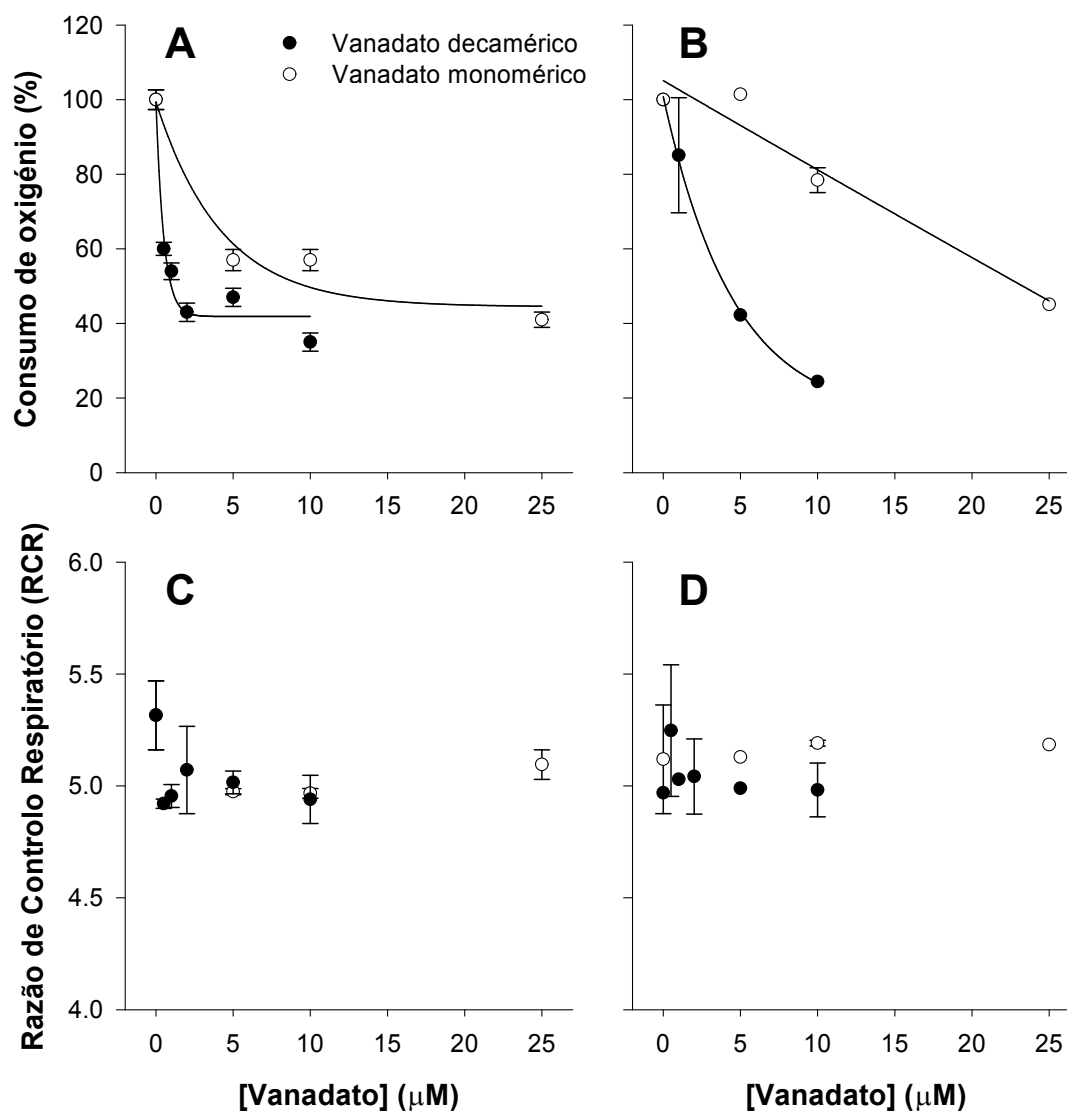


Figura 4.3 – Efeitos inibitórios da espécie decamérica (●) e monomérica (○) de vanadato (até 25 μ M vanádio total, nomeadamente 2.5 μ M espécie decamérica de vanadato) na respiração mitocondrial hepática de rato (A) e cardíaca de peixe (B) (2 mg proteína/ml) em piruvato e malato. Consumo de oxigénio (%) (A e B) e razão de controlo respiratório (RCR) (C e D) em mitocôndria hepática (C) e cardíaca (D) em tampão de respiração (Secção 4.2.7.) suplementado com 5 mM piruvato e 0.5 mM malato, como substratos. Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).

Ambas as soluções de vanadato promoveram inibição da respiração mitocondrial sem desacoplar a mitocôndria, uma vez que a razão do controlo respiratório (RCR) não foi afectado (Fig. 4.3C e 4.3D). Os valores de RCR determinados para as mitocôndrias acopladas de fígado de rato (Fig. 4.3C) e coração de peixe (Fig. 4.3D), respirando em piruvato e malato, foram de 5.1 ± 0.1 e 5.0 ± 0.1 , respectivamente, na ausência ou presença de ambas as espécies de vanadato. Estes resultados estão de acordo com DeMaster e Mitchell [1973], que referiu não existir desacoplamento da fosforilação oxidativa, mas um diminuto aumento da razão ADP/O, em mitocôndrias hepáticas de rato, devido a uma inibição da actividade da cinase de adenilato pelo decavanadato (1 mM). Note-se que, as preparações mitocondriais usadas neste estudo apresentaram razões de ADP/O, para piruvato e malato como substratos, na ordem de 2.4 ± 0.7 e 3.8 ± 0.7 para mamífero e peixe, respectivamente – quer na ausência quer na presença de vanadato decamérico ou monomérico – valores análogos ao valor teórico de 3 [Cain e Skilleter, 1987].

4.3.4. Efeito de decavanadato no potencial da membrana mitocondrial

Na ausência de glutathione reduzida (GSH), o potencial de membrana de ambas as preparações mitocondriais, permaneceu estável durante 10-15 min e diminuiu gradualmente após este período de tempo (Fig. 4.4A), tendo-se estimado um tempo de meia-vida da manutenção do potencial de membrana superior a 90 min. Deste modo, procedeu-se à monitorização dos efeitos promovidos pela espécie decamérica e monomérica de vanadato no potencial da membrana mitocondrial na presença de uma concentração fisiológica de GSH (5 mM), com o objectivo de estabilizar o potencial de membrana.

Figura 4.4 – Despolarização da membrana mitocondrial induzida por espécies decaméricas e monoméricas de vanadato. Despolarização da membrana mitocondrial em função do tempo de incubação (A) na ausência de uma concentração fisiológica de glutathiona (GSH); despolarização da membrana mitocondrial (%) induzida por espécies decaméricas (●) e monoméricas (○) de vanadato em mitocôndria hepática de rato (B) e cardíaca de peixe (C) (15 µg proteína/ml), na presença de 5 mM GSH. Valores apresentados como média ± desvio ($n = 3$).

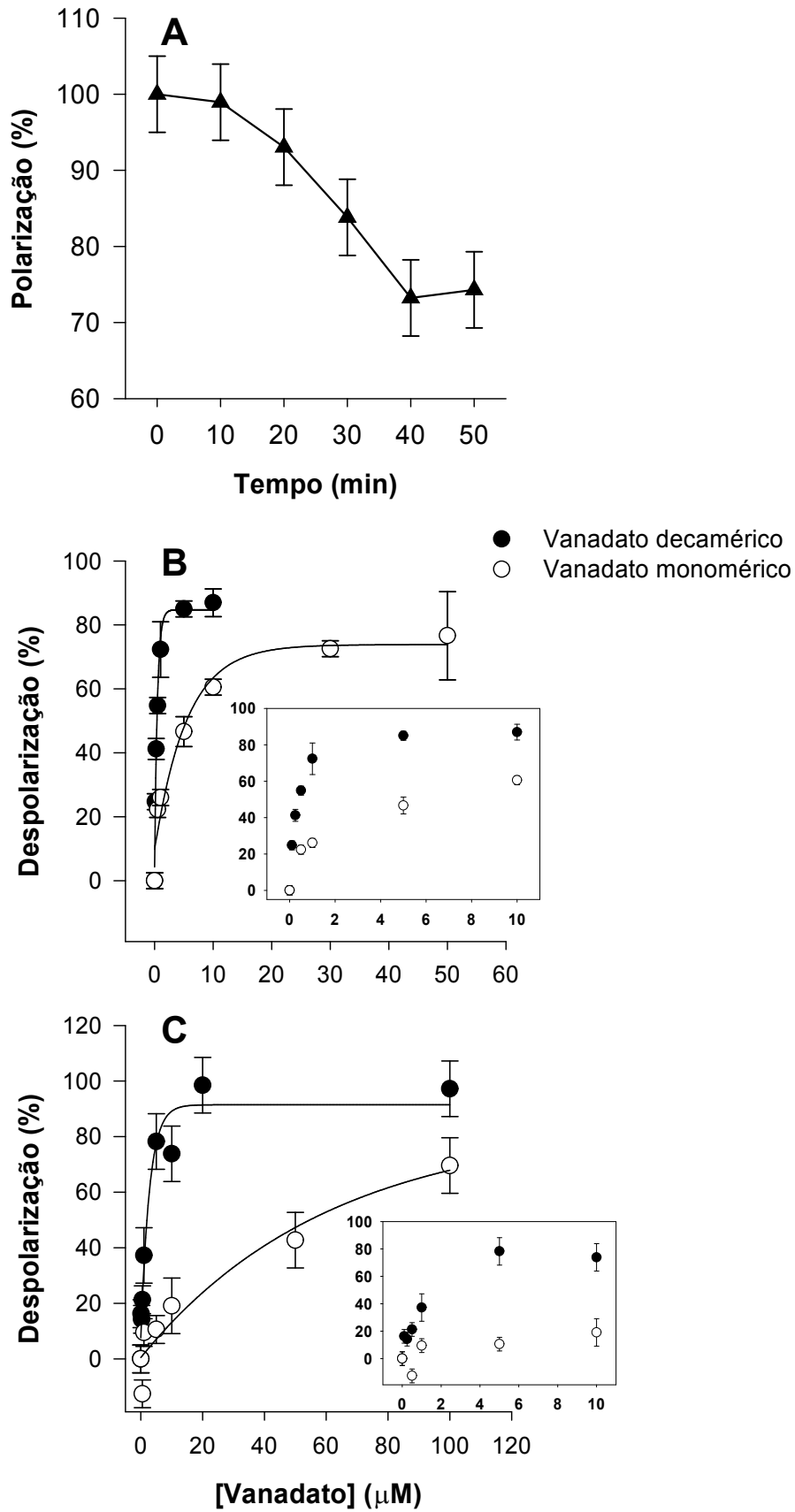


Figura 4.4 – Ver legenda na página anterior.

Verificou-se que, 10 min de exposição a concentrações crescentes de vanadatos induzem um aumento da despolarização mitocondrial: a espécie decamérica de vanadato induziu a despolarização mitocondrial, na mitocôndria hepática de rato, em concentrações muito baixas, com um valor de IC_{50} de 38.7 ± 10.2 nM, enquanto que foi necessário 5.4 ± 2.5 μ M de vanadato monomérico para induzir 50% de despolarização na mitocôndria de fígado de rato (Fig. 4.4B).

Do mesmo modo, a espécie decamérica de vanadato induziu despolarização da mitocôndria cardíaca de peixe a concentrações muito baixas, com um IC_{50} de 196 nM, enquanto que 55 μ M de monovanadato induziu uma despolarização de 50% (Fig. 4.4C).

Efeito de decavanadato na repolarização do potencial da membrana mitocondrial induzida por GSH

Verificou-se que a adição de uma concentração fisiológica de GSH (5 mM) a mitocôndrias hepáticas de rato previamente incubadas em tampão de respiração mitocondrial (60 min) – para promoção de despolarização mitocondrial – induziu repolarização da membrana mitocondrial *in vitro* com um meio-tempo de aproximadamente 5 min, alcançando um patamar aproximadamente 10 min após a adição de GSH (Fig. 4.5). Saliente-se ainda que, o potencial da membrana mitocondrial é tampão de respiração é estabilizado na presença de GSH (*dados não apresentados*).

Determinaram-se os efeitos induzidos pelas soluções de vanadato na repolarização da membrana mitocondrial apartir do patamar obtido pelo controlo (~2.75) e na presença das espécies decamérica (~2.0) e monomérica de vanadato (~3.0), considerando o valor basal de aproximadamente 1.25 ao tempo zero (momento de adição de GSH). Os resultados mostram que 1 μ M de espécie decamérica de vanadato diminui a repolarização induzida por GSH em quase 50%, enquanto que na presença de

100 μM de vanadato monomérico a repolarização mitocondrial foi de aproximadamente 110% do resultado obtido na situação controlo (Fig. 4.5). Em virtude de se ter provado que a espécie decamérica de vanadato afecta a repolarização da membrana mitocondrial ($\text{IC}_{50} \sim 1 \mu\text{M}$ vanadato decamérico, ou seja, 10 μM vanádio total) e uma vez que, a hiperpolarização da membrana mitocondrial tem sido descrita como uma resposta precoce da mitocôndria durante fenómenos apoptóticos [Zurgil *et al.*, 2002; Matarrese *et al.*, 2003], estes resultados sugerem que se explore a aplicação do vanadato decamérico como agente anti-apoptótico em estudos futuros.

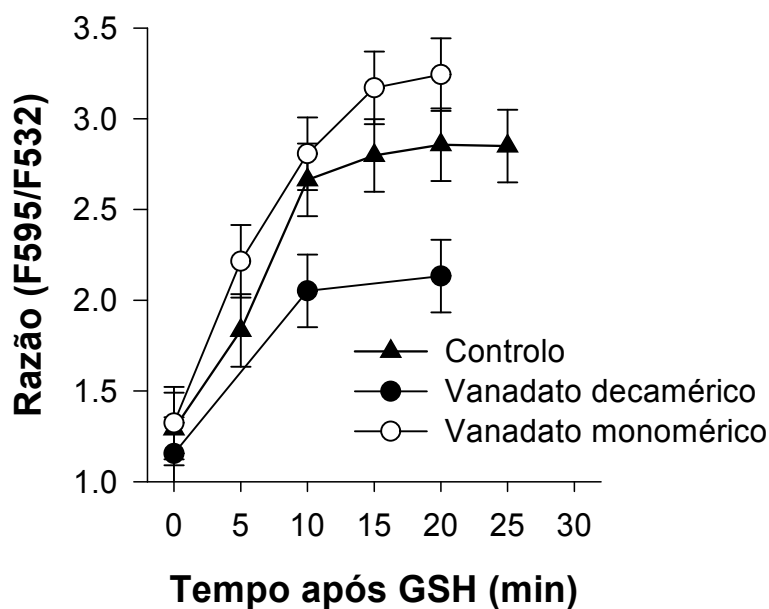


Figura 4.5 – Cinéticas de repolarização da membrana mitocondrial. Cinéticas de repolarização da membrana mitocondrial com uma concentração fisiológica (5 mM) de glutathiona (GSH) (▲); repolarização – após indução de despolarização da membrana mitocondrial (15 μg proteína mitocondrial hepática/ml) – na presença de 1 μM de espécie decamérica de vanadato (●) ou 100 μM de vanadato monomérico (○), em tampão de respiração mitocondrial (Secção 4.2.7.) suplementado com 5 mM GSH. Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).

Efeito de ciclosporina A

Verificou-se que numa concentração até 10 μM o antibiótico ciclosporina A (CsA) não protegeu a mitocôndria contra a despolarização induzida pela espécie decamérica de vanadato (vanádio total: 5 μM e 0.5 μM – aproximadamente o valor de IC_{50}), não se verificando uma protecção efectiva da CsA após uma pré-incubação de 15 min (antes da exposição à solução de decavanadato) das mitocôndrias com o inibidor do poro de transição da membrana mitocondrial (MMTP) [Ganote e Armstrong, 2003; Sharov *et al.*, 2005]. Conclui-se deste modo que, em mitocôndrias isoladas, a despolarização da membrana mitocondrial induzida pelo vanadato decamérico não se deve à abertura do MMTP. Consequentemente, a registar-se um eventual efeito protector da CsA nas culturas de cardiomiócitos (Secção 5), indicará que o efeito da espécie decamérica de vanadato na mitocôndria não ocorre por via directa, mas sim por mediação.

Para concentrações até 10 μM , a CsA não se mostrou também eficaz em reverter a despolarização da membrana mitocondrial induzida por 0.5 μM (5 μM vanádio total) de vanadato decamérico (~76% de despolarização), após incubações até 30 min. O facto da CsA não ser capaz de promover a repolarização sugere, uma vez mais, que em mitocôndrias isoladas, a despolarização induzida pelo vanadato decamérico não está relacionada com a abertura do MMTP.

4.3.5. Efeito de decavanadato nos níveis de NADH

Os níveis de NADH na mitocôndria hepática de rato, não foram alterados por exposição a concentrações de espécies oligoméricas de vanadato tão elevadas como 20 μM vanádio total ($7.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$ NADH/mg proteína mitocondrial). Apesar de, na mitocôndria cardíaca de peixe, também não se verificarem efeitos no conteúdo em NADH para concentrações de vanadato até 10 μM ($7.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$ NADH/mg proteína

mitocondrial); no entanto, 20 μM (vanádio total) de ambas as soluções de vanadatos promoveram uma aumento de aproximadamente 40% no conteúdo em NADH (Fig. 4.6). Assim sendo, comprova-se não existir um efeito significativo do vanadato decamérico (nem do monomérico), na gama de concentrações em que induz alterações no potencial da membrana mitocondrial (nM) e no consumo de oxigénio da mitocôndria (μM).

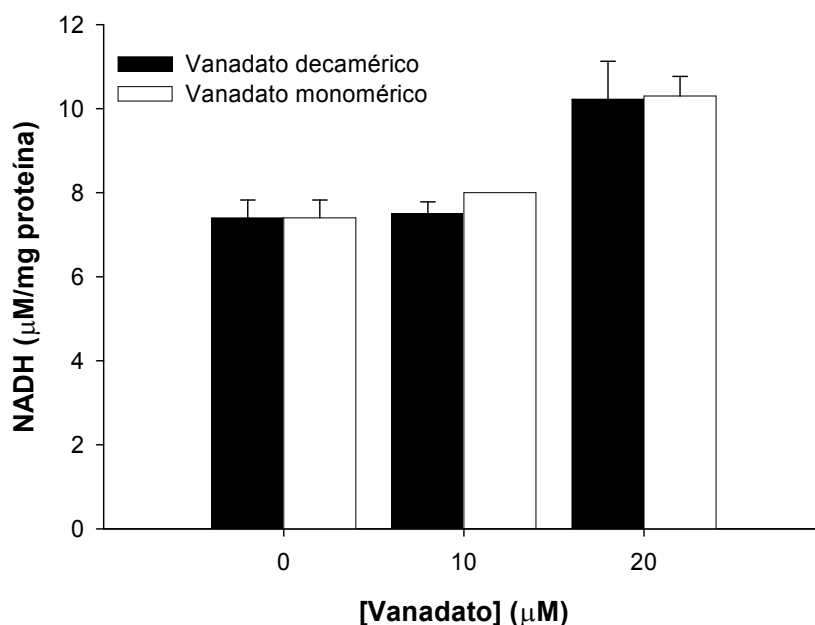


Figura 4.6 – Efeito de oligómeros de vanadato nos níveis de NADH mitocondrial. Conteúdo em NADH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína) na mitocôndria cardíaca de peixe (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) na presença de vanadato decamérico e monomérico (até 20 μM vanádio total). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).

4.3.6. Efeito de decavanadato na produção de espécies reactivas de oxigénio

Aparentemente, ambas as espécies oligoméricas de vanadato não têm efeito na produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), nomeadamente anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), na mitocôndria hepática de rato (Fig. 4.7A), excepto quando se usou NADH como substrato da cadeia transportadora de electrões (Fig. 4.7C). Nesta última situação experimental, o vanadato decamérico diminui a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ na mitocôndria

hepática em 40% (5 μM), enquanto que foi necessário uma concentração 10 vezes superior de vanadato monomérico para promover uma inibição semelhante (Fig. 4.7C). Também na mitocôndria cardíaca de peixe, a espécie decamérica exibe uma acção antioxidante, inibindo a produção de O_2^- na ausência ($\text{IC}_{50} = 610 \text{ nM}$; Fig. 4.7B) e na presença de NADH ($\text{IC}_{50} = 15 \text{ nM}$; Fig. 4.7D), mais potentemente que o monovanadato (Fig. 4.7D). Na presença de NADH, a espécie monomérica de vanadato induziu um inibição da formação de O_2^- na ordem dos 50% (237 nM; Fig. 4.7D), enquanto que não se registou nenhum efeito na sua ausência (Fig. 4.7B).

Este decréscimo na formação de O_2^- é, pelo menos em parte, devido à inibição da respiração mitocondrial registada (Secção 4.3.4.), uma vez que está provado que o O_2^- originado pela respiração mitocondrial é um precursor estequiométrico de H_2O_2 mitocondrial. Recentemente, foi descrito que mesmo um pequeno decréscimo no potencial de membrana da mitocôndria de cérebro de rato, que por sua vez diminui a respiração mitocondrial, inibe fortemente a formação de ROS [Votyakova e Reynolds, 2001]. Deste modo, a formação de ROS depende também do potencial da membrana mitocondrial. Visto, a espécie decamérica de vanadato despolarizar fortemente a mitocôndria, era de se esperar que diminuísse também a produção de O_2^- e, de facto, os resultados obtidos após exposição da mitocôndria isolada ao decavanadato corroboraram esta suposição. Em suma, tanto a despolarização mitocondrial (Secção 4.3.5.) como a decréscimo no consumo de oxigénio mitocondrial (Secção 4.3.4.) induzido por esta espécie oligomérica de vanadato podem contribuir para o seu efeito antioxidante, monitorizado como uma inibição parcialmente da produção de ROS (Fig. 4.7).

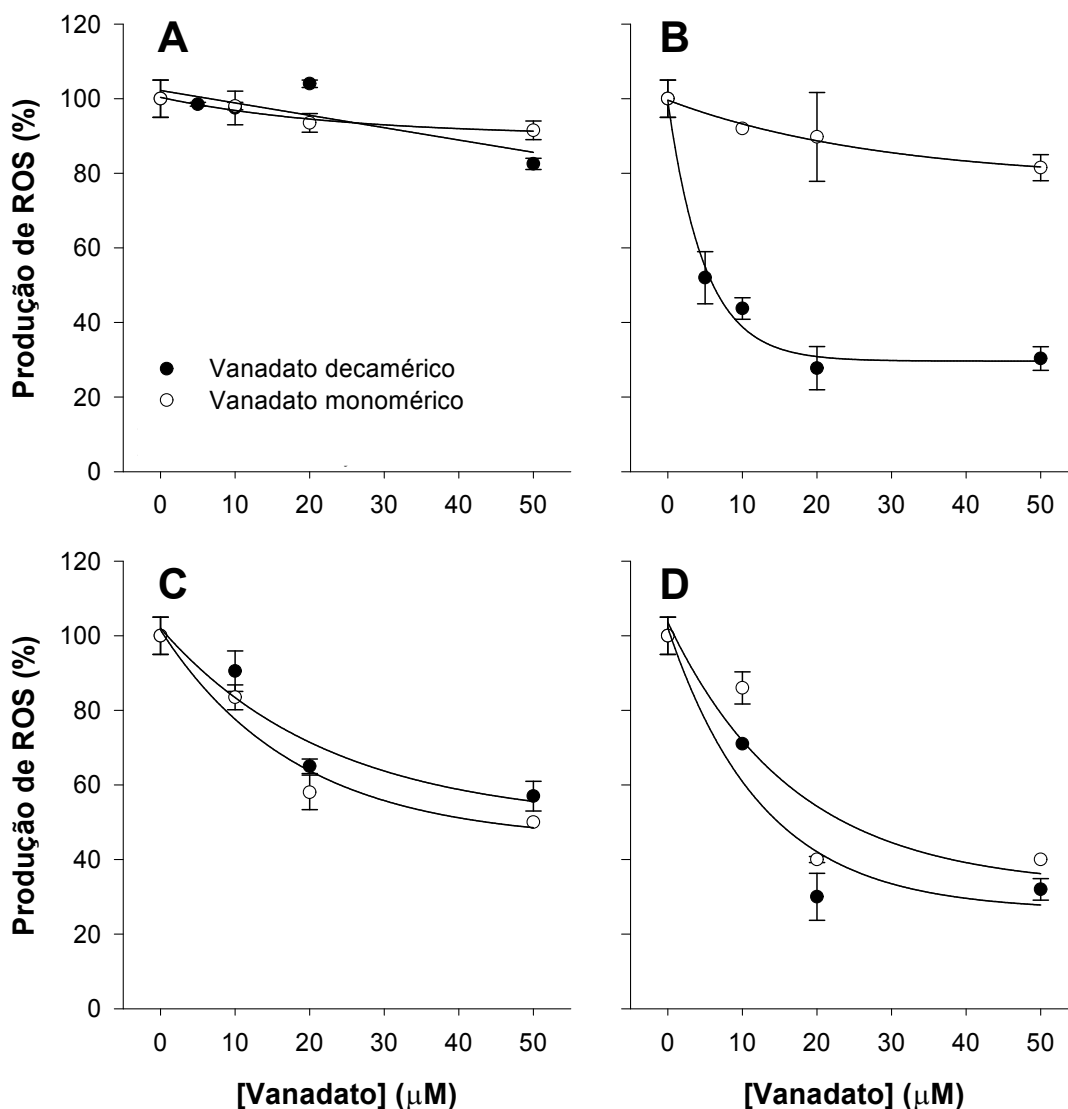


Figura 4.7 – Taxa de produção de espécies reactiva de oxigénio, nomeadamente anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), após exposição à espécie decamérica (●) e monomérica (○) de vanadato (até 50 μ M vanádio total), na ausência (A e B) e presença de NADH (C e D) na mitocôndria hepática (A e C) e cardíaca (B e D) (15 μ g proteína/ml). Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).

4.3.7. Efeito de decavanadato no estado oxidado-reduzido do citocromo *b*

Uma vez excluída a hipótese de que a despolarização mitocondrial e a inibição do consumo de oxigénio promovida pelo vanadato decamérico pudesse resultar da inibição da oxidase do citocromo (Secção 5.3.3.), considerou-se a possibilidade de que o estado

oxido-reduzido do citocromo *b* mitocondrial pudesse ser afectado pelo decavanadato. Com este objectivo, registaram-se os efeitos de vanadato decamérico e monomérico (20 μM vanádio total) no espectro diferencial da mitocôndria hepática e cardíaca na presença e ausência dos substratos respiratórios (piruvato e malato) (Fig. 4.8).

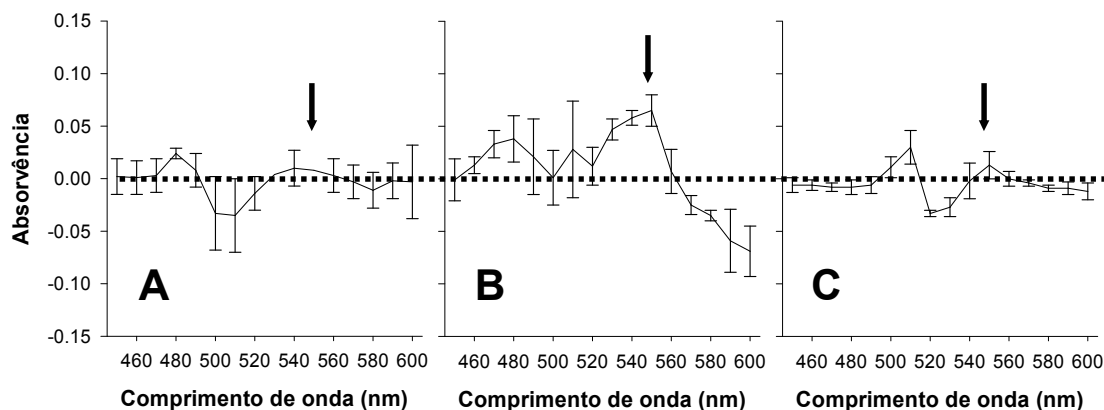


Figura 4.8 – Alterações oxido-reductoras induzidas por vanadatos no espectro dos citocromos da cadeia respiratória. As figuras representam espectros diferenciais de mitocôndria hepática de rato (1 mg proteína/ml) em tampão de respiração mitocondrial (Secção 4.2.7.) na presença de substratos respiratórios (5 mM piruvato + 0.5 mM malato), após subtração dos espectros na ausência de substratos respiratórios (controlo, A). Todos os espectros foram adquiridos num espectrofotómetro de feixe único após incubação das preparações mitocondriais com 20 μM (vanádio total) vanadato decamérico (B) ou monomérico (C). As setas indicam os comprimentos de onda dos picos de absorvência do citocromo *b* mitocondrial (500-550 nm) [Feldman e Wainio, 1960]. Valores apresentados como média \pm desvio ($n = 3$).

As alterações registadas na gama de comprimentos de onda entre 500-550 nm, induzidas pela espécie decamérica de vanadato na mitocôndria de fígado de mamífero, indicaram que o vanadato decamérico, mas não o monomérico, altera o estado oxido-reduzido do citocromo *b* (Fig. 4.8), sugerindo que o complexo III da mitocôndria é um alvo de decavanadato. Ou seja, o vanadato decamérico induz uma inibição na cadeia respiratória da mitocôndria hepática semelhante à promovida pela antimicina-A

(inibidor específico do complexo III). Deste modo, a redução do citocromo *b* é uma consequência do bloqueio induzido pelo vanadato decamérico na cadeia respiratória. No entanto, na mitocôndria cardíaca de peixe, não se verificaram alterações no estado oxido-reduzido deste citocromo após incubação com ambas as soluções de vanadato (*dados não apresentados*).

4.3.8. Efeito de decavanadato no estado oxidado-reduzido do citocromo *b* purificado de mamífero

Anteriormente, havia se verificado que os vanadatos não induziam efeitos no estado oxido-reduzido do citocromo *c* (Secção 4.3.2.). Consequentemente, após exclusão do efeito de decavanadato ao nível do citocromo *c*, apuraram-se os seus efeitos no citocromo *b*.

Na sequência da observação de um aumento na absorvência a 562 nm (indicativo da redução do citocromo *b*), apurou-se que a inibição promovida pelo decavanadato na cadeia transportadora de electrões ocorre por intermédio da redução deste citocromo (tendo-se verificado um aumento de ~90% na diferença das leituras da absorvência, 562 nm - 572 nm). Sugere-se que a acção de vanadato na cadeia transportadora de electrões corresponde a uma redução deste citocromo mitocondrial, quando incubado com vanadato decamérico. A espécie decamérica de vanadato parece induzir uma inibição semelhante à promovida pela antimicina-A: os componentes da cadeia respiratória a jusante do bloqueio inibidor apresentam-se oxidados, enquanto que a parte da cadeia a montante do local de inibição permanece reduzida.

4.4. CONCLUSÕES

O método de isolamento de mitocôndrias usado no presente estudo permitiu a obtenção de preparações mitocondriais com um elevado rendimento e a preservação da integridade funcional das mesmas, facto comprovado pelos valores das actividades mitocondriais específicas obtidos (F_0F_1 -ATPase e desidrogenase de succinato), o que permitiu a sua utilização para o estudo do efeito *in vitro* de vanadatos em vários parâmetros bioenergéticos da mitocôndria.

Os estudos *in vivo* realizados anteriormente haviam sugerido a mitocôndria como alvo subcelular de vanadato, especialmente quando o vanádio é administrado na forma da solução de decavanadato [Aureliano *et al.*, 2002; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a]. Na presente secção, são apresentadas evidências de que a espécie decamérica de vanadato é 10 a 100 vezes mais potente que o vanadato monomérico, tanto como agente despolarizador da membrana mitocondrial e como inibidor do consumo de oxigénio pela mitocôndria hepática [Soares *et al.*, 2007c] e cardíaca [Soares *et al.*, 2007b].

Uma vez mais, os modelos piscícolas pareceram ser adequados ao estudo dos efeitos da espécie decamérica de vanadato nos sistemas biológicos. Apesar do interesse no uso de modelos piscícolas em estudos toxicológicos na área da biomedicina, devido a apresentarem maior sensibilidade à toxicidade por metais pesados do que os mamíferos, os peixes têm-se revelado de extrema utilidade no estudo dos efeitos biológicos/toxicológicos do vanadato decamérico uma vez que, à temperatura fisiológica destes organismos, a espécie decamérica permanece estável por um período de tempo suficiente para induzir efeitos diferentes daqueles promovidos pela espécie monomérica de vanadato [Aureliano *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; Soares *et al.*,

2003; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a; 2007b; 2007c; Soares e Aureliano, 2007].

Mais ainda, a despolarização mitocondrial induzida pelo vanadato decamérico foi registada em concentrações inferiores à requeridas para produção de uma inibição significativa do consumo de oxigénio pela mitocôndria. Para além de um forte agente despolarizador da membrana mitocondrial, a espécie decamérica de vanadato compromete também a repolarização da membrana induzida por concentrações fisiológicas de GSH . Uma vez que, a hiperpolarização da membrana mitocondrial tem sido descrita como uma resposta mitocondrial precoce à apoptose [Zurgil *et al.*, 2002; Matarrese *et al.*, 2003], estes resultados sugerem que de futuro se possa investigar a utilidade do vanadato decamérico como agente anti-apoptótico. Os efeitos da espécie decamérica de vanadato devem-se, aparentemente, às alterações no estado oxidado-reduzido do citocromo *b* (complexo III) induzidas por este oligovanadato, uma vez que não se registaram alterações significativas quer nos níveis de NADH mitocondriais, quer na actividade da oxidase do citocromo ou da F_0F_1 -ATPase após incubação com a espécie decamérica de vanadato.

Conclui-se ainda que a espécie decamérica de vanadato afecta fortemente a bioenergética mitocondrial através de mecanismos de toxicidade diferentes dos utilizados pelo vanadato monomérico e que contribui, pelo menos em parte, para os efeitos biológicos do vanadato na mitocôndria.

Capítulo 5

ESTUDO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS A DECAVANADATO



Capítulo 5

ESTUDO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS A DECAVANADATO

5.1. INTRODUÇÃO

A criação de estratégias que promovam a protecção do tecido cardíaco, assim como, o tratamento das patologias associadas ao sistema cardiovascular requer, por parte dos investigadores, a compreensão dos mecanismos implicados no funcionamento normal deste sistema. Os modelos experimentais mais utilizados para a investigação na área da cardiologia são o coração, propriamente dito, e as culturas de células cardíacas. No entanto, o uso de culturas de células tem adquirido um crescente interesse devido à sua versatilidade, economia e às metodologias a elas aplicadas, quando comparado com ensaios realizados em animais. Para além disso, os estudos em modelos *in vitro* permitem uma abordagem mais abrangente, ao nível bioquímico, fisiológico, farmacológico, morfológico e electrofisiológico do coração.

O coração dos mamíferos é composto por vários tipos de células, sendo que cerca de 25% das células presentes neste órgão correspondem a células do miocárdio (músculo cardíaco), também conhecidas como cardiomiócitos. A proliferação de cardiomiócitos ocorre nas primeiras etapas de desenvolvimento embrionário, no entanto, imediatamente antes do nascimento, a citocinese, mitose e síntese de ADN cessam quase por completo. Deste modo, o aumento da massa cardíaca registada após o nascimento, deve-se à expansão do tamanho das células do miocárdio e não a um aumento do seu número. No entanto, e apesar do seu número reduzido, os cardiomiócitos preenchem a maior parte do volume do coração [Chein, 1990].

Muitos dos aspectos estruturais e funcionais dos cardiomiócitos são mantidos em culturas celulares [Chein, 1990]. Quando cultivados na presença de soro, os cardiomiócitos (de fetos ou ratos recém-nascidos) mantêm a sua capacidade de contracção espontânea e sincronizada, proporcionando um excelente modelo para o estudo *in vitro* de vários mecanismos moleculares do coração, nomeadamente factores reguladores da contracção [Souren *et al.*, 1992] e efeitos da hipertrofia na contracção [Simpson, 1985].

Apesar das inúmeras vantagens no uso de culturas de cardiomiócitos, alguns factores limitam a sua funcionalidade. Devido aos cardiomiócitos, tal como as células neuronais, não possuem capacidade de proliferação, o seu uso para investigação limita-se a culturas primárias (sem possibilidade de criar linhas celulares contínuas). Por seu lado, as culturas primárias tendem a ser mais sensíveis às técnicas de cultivo e aos tratamentos. O tecido cardíaco recém-nascido é, por exemplo, extremamente sensível à digestão enzimática. Uma digestão excessiva ou o uso de enzimas não adequadas, pode ocasionar nos cardiomiócitos a incapacidade de aderirem às placas de cultivo ou de contraírem [Chlopcikova *et al.*, 2001]. Esta sensibilidade parece ser dependente da idade do tecido, uma vez que, a composição da matriz extracelular do coração muda drasticamente imediatamente antes e após o nascimento, o que resulta na alteração das enzimas requeridas para a digestão tecidular.

5.1.1. Contaminações em culturas de cardiomiócitos

Outro problema usualmente registado nas culturas de cardiomiócitos é a contaminação com fibroblastos. A proliferação de fibroblastos pode rapidamente superar os miócitos cultivados e influenciar a sua diferenciação [Simpson e Savion, 1982a]. O pré-plaqueamento da suspensão celular pode eliminar este problema temporariamente

(devido aos fibroblastos apresentarem a característica de aderirem mais rapidamente à base das placas de cultivo que os cardiomiócitos). Este procedimento, promove um enriquecimento na pureza da suspensão de cardiomiócitos, no entanto, aquando da manutenção das culturas por um período de tempo mais prolongado deve-se recorrer a tratamentos químicos com inibidores mitóticos [Simpson e Savion, 1982a]. Existem também indicações que o uso de diferentes soros, tal como o de bovino, pode reduzir a taxa de proliferação dos fibroblastos e estimular a contracção dos cardiomiócitos [Simpson e Savion, 1982b].

Por último, a densidade de cultivo é um factor crucial para a manutenção da integridade estrutural e funcional dos cardiomiócitos em cultura. Tanto quanto se sabe, a contracção dos cardiomiócitos depende do contacto célula-célula, no entanto, a formação de uma monocamada confluyente de células é extremamente difícil (devido à sua elevada dimensão celular e variedade de formas, após adesão às placas de cultivo, os cardiomiócitos deixam espaços intercelulares demasiado pequenos para serem ocupados por outros miócitos). Estas células requerem mais espaço de cultivo, comparativamente a outro tipo de células, para a sua contracção. Adicionalmente, o estudo de células individuais, assim como a distinção entre cardiomiócitos e não-cardiomiócitos, torna-se mais difícil em culturas de elevada densidade celular [Simpson e Savion, 1982b].

5.1.2. Cultivos primários de cardiomiócitos de rato

De todas as preparações de células cardíacas isoladas a partir de pequenos mamíferos, o rato reúne os requisitos necessários para ser considerado o modelo mais indicado para investigação experimental. Os ratos são animais de fácil obtenção, de reduzido custo monetário e não requerem as condições de manutenção das espécies de maiores

dimensões, para além disso, existe uma extensa bibliografia científica disponível sobre este modelo. O uso experimental de ratos permite também contornar as restrições regulamentares impostas ao uso de mamíferos de maiores dimensões [Chlopikova *et al.*, 2001].

O uso de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos como modelo tem sido útil no estudo: (i) do transporte e toxicidade de drogas, permitindo a determinação da dose adequada para administração em humanos; (ii) do efeito protector de compostos terapêuticos; (iii) da privação de oxigénio ou volume, condições precursoras de anóxia ou isquémia celular; (iv) da atenuação do dano oxidativo no miocárdio por acção de potenciais agentes terapêuticos; (v) de fenómenos patológicos, tais a hipertrofia muscular cardíaca; e, (vi) da morfologia, trocas iónicas, metabolismo, actividade contráctil, conexões mutuas, expressão de proteínas e regulação da sua expressão (efeito de drogas) em células do miocárdio, entre outros.

No entanto, aquando do estabelecimento de um protocolo adequado ao tema em estudo, uma questão se coloca: devem ser usadas culturas de células cardíacas provenientes de ratos recém-nascidos ou de ratos adultos?

5.1.3. Cardiomiócitos de ratos recém-nascidos *versus* cardiomiócitos de ratos adultos

As células cardíacas podem ser isoladas a partir de ratos recém-nascidos ou adultos. Contudo, com uma ninhada típica (10-20 ratos) obtém-se material biológico suficiente para a realização de uma preparação e é menos dispendiosa monetariamente do que os isolamentos a partir de ratos adultos. A segunda vantagem do uso de ratos recém-nascidos reside na facto destes miócitos serem menos sensíveis à concentração de Ca^{2+} no meio e a situações de hipóxia-reoxigenação que os cardiomiócitos de ratos adultos e,

consequentemente o seu processo de isolamento mais simples. Pelas razões acima mencionadas, recomenda-se o uso de ratos com 1-5 dias de idade para o isolamento de cardiomiócitos [Chlopcikova *et al.*, 2001].

5.1.4. Preparação de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos

Os protocolos de isolamento e cultivo de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos publicados ao longo dos últimos quarenta anos, são modificações do método originalmente descrito por Harary e Farley [1963]. Nestes protocolos, após remoção e lavagem (para remoção de sangue e fracções tecidulares) dos corações de ratos recém-nascidos, os ventrículos ou, nalguns casos, a totalidade do coração são fragmentados e dissociados em células individuais pela acção de enzimas proteolíticas (em repetidas digestões com agitação). As células assim obtidas são suspensas em meio de crescimento contendo soro (para desactivação das enzimas proteolíticas), contadas e diluídas para a concentração desejada. Posteriormente, os cardiomiócitos são semeados em placas de plástico e mantidos num incubador sob atmosfera definida.

Ainda que se possua um protocolo otimizado para o isolamento e cultivo primário de cardiomiócitos, urge estar alerta durante todas as etapas da preparação, no sentido de identificar e/ou evitar a ocorrência de possíveis falhas e identificar eventuais problemas, tais como contaminações e digestões enzimáticas não eficientes.

5.1.5. O vanádio como agente modulador do sistema cardiovascular

Vários estudos têm descrito a capacidade que os compostos inorgânicos e orgânicos de vanádio apresentam na modulação da função cardiovascular e da sua potencial utilidade como agentes protectores contra o dano da isquémia/reperfusão no tecido cardíaco [Conde *et al.*, 1997; Mackay e Mochly-Rosen, 2000; Takada *et al.*, 2004].

Os estudos sobre os efeitos biológicos do vanadato e de outros compostos contendo vanádio em células cardíacas relacionam-se maioritariamente com as suas características insulino-miméticas [Josephson e Cantley, 1977; Barbagallo *et al.*, 2001] e a sua capacidade de aumentar a força contráctil do músculo cardíaco (efeito inotrópico) [Gerrard *et al.*, 1993; Fawcett *et al.*, 1996; 1997]. No entanto, foram vários os estudos que demonstraram que os efeitos do vanadato podem variar desde a estimulação do crescimento das células à indução de morte celular [Yin *et al.*, 1992; Stern *et al.*, 1993; Bay *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1999; Capella *et al.*, 2000; 2002]. Mais ainda, na maioria dos casos, registou-se um efeito bifásico do vanadato na proliferação celular, sendo citotóxico num intervalo de concentrações entre 50 a 100 μM [Etcheverry e Cortizo, 1998]. Provavelmente devido à complexidade química das soluções de vanadato, os principais objectivos destes estudos foram analisar a expressão genética induzida pelo vanadato, assim como, danos oxidativos, alterações no cálcio citosólico e modificações ao nível do citoesqueleto, sem prestar especial atenção aos efeitos dos tratamentos de vanádio na viabilidade celular [Josephson e Cantley, 1977; Trudel *et al.*, 1991; Volberg *et al.*, 1992; Secrist *et al.*, 1993]. Consequentemente, não está devidamente esclarecido se efeitos observados nas células estão relacionados com a toxicidade do vanadato.

5.1.6. A mitocôndria cardíaca como alvo da toxicidade do vanadato

Willsky e Dosh [1986] demonstraram a importância da função mitocondrial (fosforilação oxidativa) no metabolismo do vanádio, ao mostrarem que estirpes de fungos com deficiências respiratórias acumulam elevadas quantidades de compostos de vanadato. Mais recentemente, estudos anteriores com animais tratados com injeções de soluções de decavanadato e monovanadato provaram que a mitocôndria, hepática e

cardíaca, é o organelo subcelular com maior conteúdo em vanádio [Aureliano *et al.*, 2002; Aureliano e Gândara, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a].

Nos sistemas biológicos, os diferentes oligómeros de vanadato promovem diferentes efeitos *in vitro* [Tiago *et al.*, 2004; Aureliano e Gândara, 2005; Aureliano *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2006] e *in vivo* [Aureliano *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Tiago *et al.*, 2004; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a; 2007b; 2007c; Soares e Aureliano, 2007]. No entanto, não estão perfeitamente esclarecidas quais as vias de acção das diferentes formas oligoméricas. A forma de vanádio predominante nos fluídos biológicos a pH 4-8 é o monovanadato [Nechay, 1984]. No entanto, formas oligoméricas de vanadato maiores, ainda que não estejam presentes em concentrações fisiológicas, podem ocorrer em concentrações tóxicas em compartimentos celulares onde a acumulação deste elemento tenha lugar. Vários estudos têm referido o vanadato decamérico – segundo Stankiewicz *et al.* [1995], o oligómero de vanadato com maior importância bioquímica – como mais potente na inibição de várias enzimas do que outros oligovanadatos [Aureliano e Gândara, 2005]. Apesar de já ter sido sugerido que a ligação do vanadato decamérico a proteínas específicas pode prevenir a sua desoligomerização [Ramos *et al.*, 2006], são poucos os estudos que exploraram os efeitos biológicos do vanadato decamérico em condições fisiológicas.

Devido à sua estabilidade em condições fisiológicas, a espécie decamérica de vanadato não desoligomeriza completamente antes de induzir alterações em vários marcadores de stresse oxidativo [Aureliano *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2007a; 2007b; 2007c]. De facto, demonstrou-se anteriormente que o vanadato decamérico induz efeitos de stresse oxidativo no tecido cardíaco mais fortemente que o monovanadato, diminuindo a

actividade das enzimas antioxidantes e aumentando a peroxidação lipídica [Aureliano *et al.*, 2002; Aureliano *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2007a].

Como análogos do fosfato [Gresser e Tracey, 1990], os oligómeros de vanadato têm apresentado a capacidade de inibir ou estimular a actividade de diversas enzimas do metabolismo do fosfato, tais com ATPases, fosfatases e cinases [Cortizo *et al.*, 1994; Crans, 1994].

5.1.7. Objectivos

No âmbito deste estudo, teve-se por objectivo a determinação das condições óptimas para a obtenção de culturas primárias de cardiomiócitos (ventrículo) de ratos recém-nascidos, maximizando-se o rendimento e a pureza das preparações. Ao mesmo tempo, pretendeu-se também caracterizar qualitativa e quantitativamente as contaminação registada por células não musculares (fibroblastos) por contagem celular, imunodeteção da cadeia pesada de miosina e deteção imunohistoquímica de fibroblastos.

Foi objectivo desta secção explorar a contribuição dos diferentes oligómeros de vanadato na citotoxicidade cardíaca, avaliando a morte celular induzida por vanadato em miócitos de ventrículos de ratos recém-nascidos. Os estudos realizados concentraram-se na determinação dos efeitos dos diferentes oligómeros de vanadato (vanadato decamérico e monomérico) na: (i) viabilidade celular, (ii) acumulação de vanádio pelas células, (iii) cálcio intracelular, (iv) produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), e (v) potencial da membrana mitocondrial em culturas primárias de cardiomiócitos de rato.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo de cultura celular adotado foi uma modificação do previamente descrito por Chlopčikova *et al.* [2001]. A cultura de miócitos cardíacos de ratos recém-nascidos baseia-se na obtenção destas células a partir de ventrículos de ratos (*Rattus norvegicus*, do tipo Wistar) com 2-3 dias de nascimento. Os cardiomiócitos são maturados em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 5% (v/v) soro fetal de bovino, 10% (v/v) soro de cavalo, 20% (v/v) meio 199 modificado com HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 U/ml estreptomicina. Ao segundo dia *in vitro* (2 DIV) muda-se o meio e adiciona-se um inibidor mitótico (citosina- β -D-arabinofuranosido, Ara-C). As células continuam os seu processo de maturação nestas condições até ao dia em que são realizadas as experiências (em meio livre de soro).

5.2.1. Meios de cultura, suplementos, anticorpos, reagentes e soluções

Os meios de cultivo, suplementos e anticorpos utilizados na preparação, manutenção e caracterização dos cultivos de miócitos de ratos recém-nascidos, foram adquiridos a empresas especializadas, nomeadamente: Ara-C (Cat. C-1768); DMEM (Cat. D-5671); meio 199 modificado com HEPES (Cat. M-2520); soro fetal de bovino termicamente inativado, FCS (Cat. F-9665); soro de cavalo termicamente inativado, HS (Cat. H-1138); pancreatina (Cat. P-3292) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); colagenase tipo II (Cat. 17101-015) (Gibco, Paisley, Reino Unido); anticorpos IgG anti-rato (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); substrato quimioluminescente *SuperSignal*[®] (Cat. 37071) (Pierce, Rockford, IL, EUA); anticorpo Vimentina Ab-2 (clone V9) (Cat. MS-129-P0) (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA); marcador de elevada massa molecular para *SDS-PAGE*, HMW (Cat. 161-0303) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Do mesmo modo, os reagentes utilizados nos ensaios experimentais, também de elevado grau de pureza, foram adquiridos a empresas especializadas, nomeadamente: solução de azul de tripano (0.4%), bis-benzimida (*Hoechst* 33258), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), ácido ciclopiazónico (CPA), ciclosporina A (CsA), desidrogenase de glucose-6-fosfato (G6PDH), fosfoenolpiruvato (PEP), hexocinase (HK), iodeto de propídio, leupeptina, miocinase, pepstantina-A, redutase da glutatona (GR) e taspigargina (TG) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); cinase de piruvato (PK) de coelho e desidrogenase de lactato (LDH) de músculo de porco (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha); dihidroetídio (DHE), Fura-2 acetoximethyl éster (Fura-2 AM), iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianeto (JC-1), éster de etil tetrametilrodamina (TMRE) e plurónico F-127 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA); diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) (Molecular Probes, Groningen, Holanda); teste para determinação da actividade da caspase-3 (Calbiochem, San Diego, CA, USA); solução concentrada de vanádio (998 ± 5 mg/l, determinado por ICP-OES) (Merck,); material de referência marinho para metais vestigiais: hepatopâncreas de lagosta (TORT-2), 1.64 ± 0.19 mg vanádio/kg (National Research Council of Canada).

Tampão salino PBS: 137 mM NaCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 0.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4.

Tampão *Locke* K5: 154 mM NaCl, 4 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose e 10 mM HEPES (pH 7.4).

5.2.2. Culturas primárias de miócitos cardíacos (ventrículo) de ratos recém-nascidos

Os ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) com 2-3 dias de idade utilizados na preparação das culturas primárias de miócitos cardíacos realizadas no presente estudo foram obtidos através do *Servicio de Animalario* da *Universidad da Extremadura*, Badajoz (Espanha). Durante o período de permanência no biotério, os animais foram mantidos sob condições de temperatura (22-25%), humidade (60-70%) e luz controladas (12 horas de luz e 12 horas de escuridão). Os ratos (com 2-3 dias de idade) foram retirados do seu ambiente normal com uma antecedência nunca superior a 1 h, relativamente à preparação da cultura.

Sacrifício e dissecação

Os animais foram sacrificados por decapitação e o coração extraído através de um corte central na caixa torácica até ao diafragma (evitar perfurar o estômago ou outros órgãos internos – potenciais fontes de contaminação bacteriana). Para remoção de sangue e fracções tecidulares, lavou-se o coração em tampão Ads contendo 582 mM NaCl, 100 mM HEPES (pH 7.35), 4 μ M NaH₂PO₄, 28 mM glucose e 27 mM KCl e removeu-se o terço superior do órgão, correspondendo aproximadamente às aurículas. Realizaram-se pequenos cortes no tecido ventricular, aquando da sua imersão em Ads, para expor uma maior extensão de área ao tampão, reduzindo deste modo a ocorrência de dano isquémico e coagulação.

Isolamento de miócitos cardíacos

Fragmentaram-se os ventrículos em pedaços com um volume de cerca de 1 mm³, adicionou-se cerca de 10 ml de solução enzimática (24 mg pancreatina e 24 mg

colagenase em 50 ml solução de Ads) para dissociação do tecido ventricular e deixou-se incubar durante 5 min a 37 °C, sob agitação horizontal (não se devem usar movimentos rotacionais para evitar o dano provocado nas células resultante da força centrífuga gerada), para remoção de células sanguíneas e outros fragmentos tecidulares.

Homogeneizou-se a preparação, deixou-se repousar para sedimentação das células e desprezou-se o sobrenadante (contendo resíduos celulares e fragmentos tecidulares). De seguida, adicionaram-se 10 ml de solução enzimática e repetiu-se a incubação sob agitação durante 20 min (Recolha 1). Realizou-se o procedimento de digestão enzimática para isolamento celular em 5 etapas de recolha de células (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Etapas do procedimento de isolamento e recolha de células.

1	2	3	4	5
10 ml solução enzimática (20 min)	8 ml solução enzimática (25 min)	8 ml solução enzimática (25 min)	6 ml solução enzimática (15 min)	6 ml solução enzimática (20 min)
<i>Recolha 1</i>	<i>Recolha 2</i>	<i>Recolha 3</i>	<i>Recolha 4</i>	<i>Recolha 5</i>

Homogeneizou-se a preparação, deixou-se repousar para sedimentação do tecido, transferiu-se o sobrenadante (contendo células isoladas) para 2 ml de FCS e reservou-se (Recolha 1) – como o soro inactiva a acção das enzimas, as células estão desta forma protegidas contra a sua destruição. Seguidamente, adicionaram-se 8 ml de solução enzimática e repetiu-se a incubação sob agitação durante 25 min. Centrifugou-se a Recolha 1 durante 5 min a 200 g, desprezou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 10 ml de meio de crescimento (DMEM suplementado com 10% HS, 5% FCS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 U/ml estreptomicina),

colocando-as de seguida no incubador com atmosfera controlada (permitiu-se sempre a troca gasosa entre as células e a atmosfera envolvente).

Homogeneizou-se a preparação como anteriormente e deixou-se o tecido sedimentar. Transferiu-se o sobrenadante (Recolha 2) para 2 ml de FCS e centrifugou-se durante 5 min a 200 g. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 5 ml de meio de crescimento. Adicionaram-se estas células às previamente isoladas e colocaram-se no incubador.

Voltou-se a repetir o ciclo de isolamento: adicionaram-se 8 ml de solução enzimática; incubou-se sob agitação durante 25 min; homogeneizou-se a preparação e transferiu-se o sobrenadante (Recolha 3) para o FCS; centrifugaram-se as células e ressuspenderam-se em 5 ml de meio de crescimento; por último, adicionaram-se as células às anteriormente isoladas.

Adicionaram-se 6 ml de solução enzimática e incubou-se sob agitação durante 15 min. Transferiu-se o sobrenadante (Recolha 4) para o FCS, centrifugaram-se as células e ressuspenderam-se em 5 ml de meio de crescimento. Adicionou-se o produto desta etapa às células já isoladas.

Repetiu-se a etapa anterior (mas incubando durante 20 min) para proceder à última recolha do isolamento (Recolha 5). As células foram tratadas como anteriormente mencionado.

Nas sucessivas recolhas, a quantidade de tecido cardíaco foi reduzindo à medida que as enzimas iam digerindo a matriz extracelular e as células iam sendo libertadas. Deste modo, tal como esperado, o sedimento obtido no final de cada centrifugação era progressivamente menor. Estas 5 etapas de isolamento foram suficientes para a libertação do maior número possível de células, alcançando-se na última digestão um estado em que já não era possível o isolamento de mais células cardíacas.

Pré-plaqueamento para remoção de fibroblastos

As células isoladas a partir de corações de ratos recém-nascidos, são compostas por uma mistura de células musculares e mesenquimais. As células mesenquimais dividem-se mais rápido que os miócitos, ocupando toda a superfície de cultivo e consumindo os substratos adicionados às culturas de cardiomiócitos. A eliminação destas células não musculares baseia-se nas características diferenciais que apresentam relativamente às células do músculo, tais como velocidade de adesão à base da placa de cultivo, densidade celular e taxa de proliferação [Chlopcikova *et al.*, 2001].

No presente estudo adoptou-se um método simples, descrito por Blondel *et al.* [1971], para o aumento da proporção de células musculares nas culturas. Esta técnica de pré-plaqueamento (1-3 h) baseia-se na rápida taxa de adesão das células mesenquimais à superfície das placas e consiste no método mais usual para eliminação de células não musculares, resultando em culturas celulares com 97-99% cardiomiócitos [Chlopcikova *et al.*, 2001]. No entanto, é sempre recomendável o recurso a uma combinação de técnicas, tal como o recurso a inibidores mitóticos, para assegurar o aumento da percentagem de cardiomiócitos nos cultivos.

Neste estudo, após a última recolha, centrifugaram-se os cerca de 30 ml de meio contendo as células cardíacas isoladas, durante 5 min a 200 g. Eliminou-se o sobrenadante (meio) e ressuspenderam-se as células em 20 ml de meio de crescimento. Este volume foi posteriormente dividido por duas placas de cultura (100 x 20 mm, Corning Cat. 430167) – passando previamente por um crivo (porosidade de 70 µm) para remoção de fragmentos de tecido – que foram mantidas no incubador por 1 ou 2 h. Com base no facto dos fibroblastos aderirem muito rapidamente a superfícies plásticas recorreu-se a esta característica para a remoção de eventuais fibroblastos contaminantes das preparações de miócitos cardíacos.

Após o período de pré-plaqueamento, removeu-se o meio das placas (com células em suspensão) – evitaram-se movimentos bruscos para evitar a ressuspensão das células não muscular aderidas à base das placas e para minimizar a indução de stresse nas células cardíacas – lavaram-se as mesmas com meio e procedeu-se ao plaqueamento dos miócitos isolados.

Sempre que os fibroblastos foram necessários para outras experiências (controlo positivo na detecção imunohistoquímica de fibroblastos, ver Secção 5.2.5.), as placas de pré-plaqueamento foram suplementadas com meio de cultivo e colocadas no incubador. Caso contrário, eliminaram-se as placas.

Contagem de células

A contagem de células viáveis foi realizada em câmara de *Newbauer*. A percentagem de células cardíacas viáveis foi determinada pelo método de coloração com azul de tripano, que se baseia no princípio de que as células viáveis não incorporam este corante, ao contrário das células mortas.

Adicionaram-se 10 µl de solução azul de tripano 0.4% a 40 µl de suspensão celular e contaram-se as células viáveis. O número de miócitos viáveis (as maiores células observadas) foi multiplicado por 1.25, para corrigir o factor de diluição, e por 10^4 , para determinar a densidade celular em número de células por ml (Equação 5.1). Após a contagem, realizaram-se as diluições necessárias de modo a obter-se uma densidade celular de 1×10^6 células/placa.

$$\text{células / ml} = \text{células} \times 1.25 \times 10000 \quad [\text{Eq. 5.1}]$$

Cultivo celular

A suspensão resultante (composta maioritariamente por miócitos cardíacos) foi transferida para placas de cultivo de 35 x 10 mm (*Corning*, Cat. 430165) revestidas com 1% (m/v) gelatina ou 20 % (m/v) poli-L-lisina estéreis – a gelatina ou a poli-L-lisina permitiram às células aderirem à base das placas – numa densidade de aproximadamente 1×10^6 células/placa. Durante as primeiras 48 h do cultivo adicionou-se Ara-C (10 ou 20 μ M) para prevenir a proliferação de fibroblastos/células não musculares. O Ara-C é um inibidor mitótico que tem como objectivo eliminar células que não sejam cardiomiócitos, por exemplo fibroblastos.

O uso de meios de crescimento suplementados com compostos que possuam a capacidade de reduzir o crescimento de células não musculares, inibindo a sua proliferação (tais como, Ara-C e 5-bromo-2'-desoxiuridina) tem apresentado uma elevada taxa de sucesso na manutenção de culturas de cardiomiócitos livres de contaminações. Por contrário, culturas celulares maturadas na ausência de inibidores de proliferação apresentam um aumento no número de fibroblastos de 40-65% entre 1 e 5 DIV [Chlopcikova *et al.*, 2001].

Após 48 h em meio de crescimento (37 °C) numa atmosfera com 5% CO₂/95% ar, transferiram-se os cardiomiócitos para DMEM com soro (10% HS e 5% FCS) suplementado com 50 U penicilina/ml e 50 U estreptomicina/ml antes da realização dos tratamentos com as soluções de vanadato (Secção 5.2.6.). Todas as manipulações experimentais às culturas foram realizadas após 3-4 DIV.

Determinação da concentração proteica

Determinou-se a concentração de proteínas nos cultivos de cardiomiócitos através do método de Bradford [1976]. A concentração de proteínas foi determinada com recurso a

uma recta de calibração com concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA), no intervalo de 0 a 8 µg.

5.2.3. Coloração de cardiomiócitos com hematoxilina e eosina

A coloração com hematoxilina e eosina tem sido usada como método para a diferenciação não específica de constituintes celulares. A hematoxilina é um corante básico que cora as estruturas ácidas (tais como a cromatina nuclear) de azul. Deste modo, o núcleo, ribossomas e retículo sarcoplasmático rugoso têm grande afinidade para este corante, por possuírem grandes quantidades de ADN e ARN. Em contraste, a eosina é um corante ácido que cora as estruturas básicas. Os dímeros de eosina penetram no citoplasma da maioria das células e ligam-se às proteínas aí existentes; o citoplasma e o colagéio adquirem diferentes tonalidades de rosa.

Fixação e desidratação

As placas de cultivo foram lavadas com PBS frio e fixou-se o cultivo por incubação com metanol a 100% frio, durante 10 min a -20°C.

Rehidratação

Após fixação da cultura, procedeu-se à rehidratação progressiva das células com soluções de etanol de concentração decrescente. As primeiras lavagens foram realizadas com etanol a 100%, utilizando-se de seguida soluções mais diluídas (95, 90, 80, 70, 50 e 30%). Por último, realizaram-se lavagens com água destilada.

Coloração

Seguidamente, coraram-se as células com hematoxilina de *Mayer* – corante basófilo – durante 1 min à temperatura ambiente. Após esse tempo, lavaram-se as placas com água destilada, adicionando-se algumas gotas de hidróxido de amónia a 30% (azulante), com o objectivo de aumentar o valor de pH e, conseqüentemente, mudar o coloração do corante para um azul mais intenso, estabilizando a fixação. Após coloração com hematoxilina, adicionou-se eosina de *Putt* – corante acidófilo – durante 12 min à temperatura ambiente, para corar o citoplasma das células. Por último, retirou-se o excesso de corante com água destilada, estando a coloração preparada para observação ao microscópio.

As preparações foram observadas sob lamela, num microscópio *Nikon Eclipse E600* equipado com *Nikon Super High Pressure Mercury Lamp Power Supply*. As imagens microscópicas foram adquiridas com uma ampliação de 400x (ocular: 10x/22; objectiva: 40x/0.75), registadas por uma câmara *Zeiss AxioCam HRc* e processadas com o programa *Axion Vision Ac*.

5.2.4. Imunodeteção da cadeia pesada de miosina em culturas de cardiomiócitos

Procedeu-se à imunodeteção da cadeia pesada de miosina em extractos proteicos de cardiomiócitos, de fibroblastos Swiss 3T3 (controlo negativo) e em vesículas de retículo sarcoplasmático (RS) de músculo esquelético (controlo positivo) por *Western blotting*.

Obtenção de extractos proteicos de lisados de cardiomiócitos

Lisaram-se células provenientes de culturas primárias de cardiomiócitos de rato (CM) e os fibroblastos isolados durante o pré-plaqueamento (FB) em tampão contendo 20 mM HEPES (pH 7.4), 250 mM sacarose, 0.2 mM PMSF, 5 µg/ml pepstantina e 5 µg/ml

leupeptina. Os lisados (12 µg proteína) foram submetidos a electroforese em gel de poliacrilamida a 7.5% e, posteriormente, transferidos para uma membrana de nitrocelulose de 0.45 µm de porosidade.

Electroforese em gel de poliacrilamida

Realizaram-se electroforeses utilizando o sistema descontínuo em camadas descrito por Laemmli [1970]. Neste método, preparam-se verticalmente um gel concentrador e um gel separador, sendo que a elevada porosidade do gel concentrador permite uma maior mobilidade da amostra que no gel separador. O tratamento que se aplica às amostras (pH neutro, SDS e β-mercaptoetanol) por sua vez, faz com que as proteínas percam a sua estrutura secundária, comportando-se de igual forma e com uma relação carga/massa idênticas. Uma vez que, a quantidade de SDS ligado por unidade de massa proteica é constante (1.4 g SDS/g proteína), as proteínas ficam com uma carga negativa uniforme, isto é, com densidade de carga constante, dependendo a mobilidade da proteína do coeficiente de fricção intrínseca, directamente proporcional à massa molecular, e não da sua carga [Alface, 1997].

Preparou-se um gel de poliacrilamida separador a 7.5%: 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 mM EGTA, 0.1% (m/v) SDS, 0.05% (v/v) TEMED, 0.075% (m/v) persulfato de amónia e 7.5% (m/v) acrilamida, imediatamente antes de ser usado; e, um gel concentrador: 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% (m/v) acrilamida, 0.1% (m/v) bisacrilamida, 0.05 mM EGTA, 0.1% (m/v) SDS, 0.06% (v/v) TEMED e 0.15% (m/v) persulfato de amónia.

Dissolveram-se as amostras (CM, FB e RS) em tampão amostra contendo 62 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 1.25% β-mercaptoetanol, 20% azul de bromofenol e 8 M ureia. Posteriormente, as amostras foram desnaturadas por aquecimento a 100 °C,

durante 3 min, e depositadas nos poços do gel (12 µg proteína), juntamente com um marcador de elevada massa molecular. A mobilidade das amostras ocorreu sob aplicação de corrente eléctrica de intensidade constante (20-25 mA) em tampão de transferência contendo 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.192 M glicerol e 0.1% SDS.

Transferência e imunodeteção de proteínas por Western blotting

A partir do gel de poliacrilamida, sobre o qual se separaram as amostras, tal como referido acima, transferiram-se as amostras para uma membrana de nitrocelulose usando um sistema de transferência húmida em tampão composto por 25 mM Tris (pH 7), 190 mM glicerol e metanol a 20%. Após transferência *overnight* a 4 °C, com uma diferença de potencial eléctrico de 50 V, extraiu-se a membrana de celulose e comprovou-se a transferência das proteínas, corando a membrana com solução de *Ponceau* a 0.1% e ácido acético a 5%, tendo as proteínas ficado visivelmente coradas. A membrana de nitrocelulose foi posteriormente descorada com PBS + 0.05% Tween-20 e procedeu-se à imunodeteção da cadeia pesada de miosina.

A membrana foi bloqueada durante 2 h em PBS + 0.05% Tween-20 contendo 20% (m/v) de leite magro e incubada com anticorpo primário anti-miosina (diluição 1:100) em PBS + 0.05% Tween-20 contendo 1% (m/v) de leite magro, durante 3 h à temperatura ambiente, lavada com PBS + 0.05% Tween-20 e incubada com anticorpo secundário IgG anti-rato (diluição 1:10000) em PBS + 0.05% Tween-20 contendo 1% (m/v) de leite magro, durante 1 h à temperatura ambiente. Por último, depois de lavada com PBS + 0.05% Tween-20 e PBS, adicionou-se o substrato luminol (*SuperSignal*[®], Pierce) – que funciona como solução reveladora – à membrana, durante 3 min.

Após o período de reacção, a membrana foi exposta durante 30 min a uma película de imagem quimioluminescente (Kodak) e a película revelada com *Molecular*

Imager FX System (Bio-Rad). A quantificação dos sinais ocorreu mediante a utilização do programa *Quantity One* (Bio-Rad).

5.2.5. Detecção imunocitoquímica de fibroblastos

Procedeu-se à determinação da possível taxa de contaminação das culturas de cardiomiócitos com fibroblastos por imunocitoquímica com um anticorpo anti-Vimentina, um anticorpo específico para a principal proteína dos filamentos intermédios do citoesqueleto de células mesenquimais (Vimentina), que foi previamente testado em fibroblastos Swiss 3T3. Durante este procedimento, aspirou-se o meio de crescimento das placas de cultivo e procedeu-se à sua lavagem com PBS frio. O cultivo foi posteriormente fixado por incubação com metanol frio durante 10 min a -20 °C. Após o período de fixação, aspirou-se o metanol e delimitou-se a área pretendida para a reacção imunocitoquímica com uma *pap-pen* (marcador hidrófobo para procedimentos de coloração). Uma vez mais, a placa foi lavada com PBS frio (2 lavagens de 5 min cada) e PBS + 0.05% Triton X-100 (1 lavagem de 10 min). Posteriormente, procedeu-se ao bloqueio da placa com PBS + 0.05% Triton X-100 + 2% BSA (m/v) + 10% soro de cabra, durante 30 min à temperatura ambiente. A incubação com anticorpo primário anti-Vimentina (Vimentina Ab-2, anticorpo monoclonal de rato) numa diluição 1:50 em PBS + 0.05% Triton X-100 + 2% BSA (m/v) + 10% soro de cabra, a 4 °C *overnight* em atmosfera húmida. Após incubação com anticorpo primário, as placas foram lavadas com PBS + 0.05% Triton X-100 (4 lavagens de 10 min) e incubadas com anticorpo secundário (IgG-FITC de cabra anti-rato) numa diluição 1:25 em PBS + 0.05% Triton X-100 + 2% BSA (m/v) + 10% soro de cabra, à temperatura ambiente durante 1 h e ao abrigo da luz. Por último, as placas foram lavadas com PBS + 0.05% Triton X-100

(4 lavagens de 10 min) e incubadas com DAPI durante 2 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

As preparações foram observadas sob lamela, num microscópio *Nikon Eclipse E600* equipado com *Nikon Super High Pressure Mercury Lamp Power Supply*. As imagens microscópicas foram adquiridas com uma ampliação de 400x (ocular: 10x/22; objectiva: 40x/0.75), registadas por uma câmara *Zeiss AxioCam HRc* e processadas com o programa *Axion Vision Ac*.

5.2.6. Tratamento de culturas primárias de cardiomiócitos com vanadato

As culturas de cardiomiócitos, isolados a partir de ventrículos de ratos recém-nascidos (Secção 5.2.2.), foram tratadas com soluções de decavanadato e metavanadato numa gama de concentrações até 50 μM (vanádio total).

Após 3 dias *in vitro* (DIV) o meio de crescimento DMEM suplementado com soro fetal de bovino, soro de cavalo, meio 199 modificado com HEPES, L-glutamina, penicilina e estreptomocina, em que os cardiomiócitos tinham maturado a 37 °C em atmosfera húmida controlada (5% CO₂/95% ar), foi substituído por DMEM sem soro, suplementado com 20% (v/v) meio 199 modificado com HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 U/ml estreptomicina. Os tratamentos com vanadato foram realizados após 3 DIV e todas as experiências foram realizadas aos 3-4 DIV (incubações de 12 e 24 h, respectivamente).

5.2.7. Estudo da viabilidade celular

A percentagem de cardiomiócitos viáveis após exposição de 12 ou 24 h às soluções de decavanadato e metavanadato (até 50 μM vanádio total) foi determinada por três

métodos distintos: (i) coloração com azul de tripano, (ii) ensaio de MTT e (iii) coloração com iodeto de propídio.

Coloração com azul de tripano

Tal como referido anteriormente (Secção 5.2.2.), a exclusão de células não viáveis por coloração com azul de tripano, baseia-se no princípio de que este corante é incorporado por células mortas e não por células viáveis.

Após o respectivo período de incubação com as soluções de vanadato, eliminou-se o meio de cultivo e adicionou-se 1 ml de solução corante azul de tripano a 0.4% em PBS a cada placa. Passados 3 min de incubação à temperatura ambiente, eliminou-se o corante e efectuou-se a contagem microscópica de células viáveis e não viáveis. Para a validação estatística dos resultados de viabilidade, procurou-se que o número mínimo de células contadas (viáveis e não viáveis) fosse superior a 500.

Ensaio de MTT

A redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazan, é uma reacção catalisada pela actividade desidrogenase das células viáveis [Mossmann, 1983; Martín-Romero *et al.*, 2000; Samhan-Arias *et al.*, 2004] e tem sido rotineiramente utilizada como método de determinação de viabilidade celular.

Antes de se proceder à estimação da viabilidade celular pelo método da redução do MTT, procedeu-se à determinação do tempo óptimo de reacção (Fig. 5.1). Com esse objectivo, eliminou-se o meio de cultivo das placas e após lavagem com PBS, adicionaram-se 2 ml de solução *Locke* K5 e 60 µl de MTT 5 mg/ml (em *Locke* K5) e mantiveram-se as placas no incubador a 37 °C por períodos de tempo variáveis (entre 5 e 60 min). Decorrido o respectivo período de incubação, eliminou-se o sobrenadante e

adicionou-se 1 ml de DMSO. A formação de formazan foi determinada espectrofotometricamente através da diferença entre as absorvências registadas a 490 nm (absorção máxima) e 700 nm (linha de base do espectro de absorção) [Mossmann, 1983].

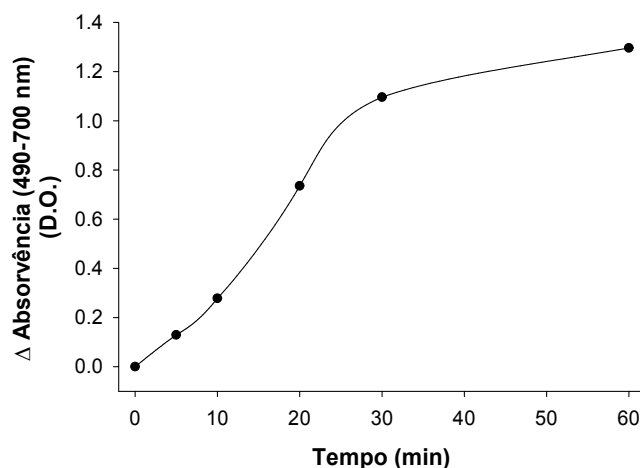


Figura 5.1 – Cinética de redução de MTT a formazan na presença de cardiomiócitos não tratados (3 DIV). Sempre que a absorvência superou o valor 2.0 D.O. diluiu-se a amostra para obtenção de um valor fiável, representando-se no gráfico o valor da medida corrigido pelo factor de diluição utilizado.

Uma vez estimada a curva de produção de formazan em função tempo de reacção, para uma densidade de células constante, seleccionou-se o período óptimo de reacção (localizado na zona linear da curva). A redução de MTT apresentou linearidade até aos 30 min de reacção e o tempo óptimo de incubação com MTT estimado, para a determinação da viabilidade celular em culturas de cardiomiócitos, foi de 20 min (Fig. 5.1).

Coloração de cardiomiócitos com bis-benzimida (Hoechst 33258) e iodeto de propídio

Adicionalmente, procedeu-se à estimação directa de cardiomiócitos viáveis através de uma modificação da técnica de dupla marcação descrita por Abu-Shakra [1997],

utilizando como sondas: bis-benzimida (*Hoechst 33258*) e iodeto de propídio. O *Hoechst 33258* é um fluorocromo capaz de penetrar todas as células, corando o seu material genético. Esta sonda, apresenta um máximo de absorção a 356 nm e de emissão a 492 nm. Para discriminar as células mortas, procedeu-se a uma segunda coloração com iodeto de propídio – um fluorocromo não permeável através da membrana plasmática – que apresenta um máximo de absorção a 530 nm e de emissão a 617 nm, aumentando a sua emissão após união com ácidos nucleicos.

Após incubação com as soluções de vanadato, eliminou-se o meio de cultivo, lavaram-se as células com PBS e incubaram-se durante 30 min, a 37 °C, com *Hoechst 33258* em *Locke K5* numa concentração de 0.3 mg/ml. Após incubação, lavaram-se as placas de cultivo com PBS e adicionaram-se 10 µg/ml de iodeto de propídio. Após 5 min de incubação a 37 °C, as placas voltaram a ser lavadas com PBS para eliminar o excesso de fluorocromo unido. Os cultivos foram observados por microscopia de fluorescência e fotografados num microscópio invertido *Nikon Diaphot 300* mediante exposição dupla aos comprimentos de onda adequados a cada sonda (para a fluorescência da bis-benzimida usaram-se filtros a 420-505 nm e para o iodeto de propídio a 550 nm).

A morte celular induzida por exposição aos vanadatos foi determinada em ressuspensões celulares coradas com iodeto de propídio. A fluorescência desta sonda (específica para células necróticas) foi monitorizada num espectrofluorímetro *Perkin-Elmer 650-40*, equipado com célula termostaticada, sob agitação magnética contínua. A intensidade de fluorescência do iodeto de propídio ($\lambda_{\text{excitação}} = 535 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 617 \text{ nm}$) foi registada após adição de 0.1% de Tween-20, tendo-se adicionado no final 5 mg/ml de iodeto de propídio como controlo positivo (calibração interna).

5.2.8. Acumulação de vanádio em extractos celulares

Após incubação dos cardiomiócitos com diferentes concentrações de vanádio (sob a forma de espécies monoméricas ou decaméricas), determinou-se a acumulação de vanádio nos extractos celulares, tal como anteriormente descrito (Secção 3.2.5.).

Após o respectivo tempo de exposição (12 ou 24 h), eliminou-se o meio de cultivo das placas de cardiomiócitos e lavaram-se as células em tampão *Locke* K5, para eliminar o vanádio que pudesse estar aderido à membrana celular e não acumulado intracelularmente (sobrestimando deste modo a quantificação de metal acumulado). As células foram ressuspendidas e digeridas em HNO₃ a 65% a 100 °C e, após a digestão, ressuspendeu-se o resíduo resultante em 500 µl de HCl a 10%. A concentração de vanádio no extracto celular (atribui-se a designação de “vanádio no extracto celular” à quantidade de metal maioritariamente acumulada intracelularmente e à eventual porção de vanádio que possa ter ficado aderido à membrana celular, mesmo após a realização das lavagens das culturas) foi posteriormente determinada por espectroscopia de absorção atómica (EAA) num espectrofotómetro de absorção atómica *GBC Avanta*, equipado com um sistema de forno de grafite *GBC GF 3000*, com um amostrador automático *GBC PAL 3000*, operando sob os parâmetros anteriormente referidos (Secção 3.2.5.). O equipamento foi calibrado com uma série de soluções contendo 5, 10, 15 e 20 ppb de vanádio, obtidas através de diluições sucessivas de uma solução de vanádio concentrada (1002 ± 2 mg/L, *Merck*). Os limites de detecção e quantificação do equipamento registados, nas condições de análise utilizadas no presente estudo, foram de 5 ± 1 e 14 ± 3 ppb, respectivamente (Secção 3.2.5.).

Uma vez mais, a exactidão do método foi avaliada através da análise de material de referência certificado (TORT-2, conteúdo de vanádio certificado: 1.64 ± 0.19 mg vanádio/kg), tendo a taxa de recuperação variado entre 92 e 110% do valor certificado.

Considerou-se a precisão do método aceitável numa gama de 8 a 10%, relativamente ao desvio padrão previsto.

5.2.9. Determinação da carga energética celular

A carga energética (C.E.) constitui uma estimativa quantitativa do estado bioenergético da célula [Perret, 1986]. Para a sua determinação é necessário proceder à quantificação dos nucleótidos ATP, ADP e AMP (Equação 5.2). O protocolo para determinação destes nucleótidos [Estabrook *et al.*, 1967] pode ser dividido em duas partes: (i) obtenção de nucleótidos e (ii) determinação da concentração dos respectivos nucleótidos.

$$C.E. = (ATP + 0.5 ADP) / (ATP + ADP + AMP) \quad [\text{Eq. 5.2}]$$

Obtenção de nucleótidos

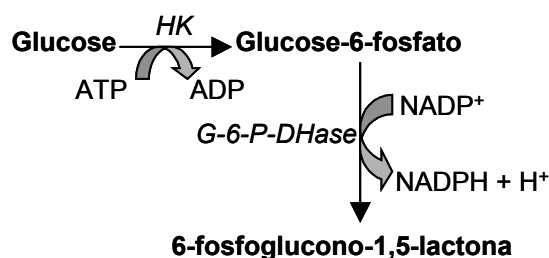
Os nucleótidos são rapidamente degradados por enzimas intracelulares a nucleósidos e, por último, a bases nitrogenadas. Por isso, o método adoptado para a extracção de nucleótidos deve ser reprodutível e compatível com o método utilizado para a detecção dos mesmos. No presente estudo, realizou-se uma desproteinização com ácido perclórico (PCA) seguida de neutralização com KOH [Martin-Romero, 1998].

Para a realização deste ensaio, utilizaram-se 2 placas de cultivo por tratamento. Após eliminação do meio de cultivo de cada placa, procedeu-se à sua lavagem com PBS frio e procedeu-se à ressuspensão dos miócitos cardíacos por adição de 0.3 ml de tampão TE frio (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA) por placa. Seguidamente, homogeneizaram-se os lisados (através de várias passagens por uma agulha de 25G, 0.5 mm de diâmetro) e recolheu-se uma alíquota para determinação da concentração proteica [Bradford, 1976], após o que, se adicionou 3.3% PCA para eliminação das

proteínas do lisado. Após agitação vigorosa (25-30 s), centrifugaram-se as amostras a 10000 g durante 10 min para eliminação do sedimento proteico. Procedeu-se à neutralização (pH 7.0-7.5) do sobrenadante e eliminou-se o precipitado formado (perclorato de potássio) por centrifugação a 10000 g durante 20 min, a 4 °C. Recolheu-se o sobrenadante, confirmou-se que o pH se situava no intervalo de valores pretendido (pH 7.0-7.5) e congelaram-se as amostras a -80 °C por um período mínimo de 15 min. Após descongelamento, centrifugaram-se as amostras a 13800 g durante 10 min e recolheu-se o sobrenadante para determinação da concentração de nucleótidos.

Determinação da concentração de ATP, ADP e AMP intracelular

A concentração de ATP foi determinada através do método descrito por Estabrook *et al.* [1967], utilizando o sistema de enzimas acopladas hexocinase/desidrogenase de glucose-6-fosfato (HK/G6PDH) numa mistura de reacção contendo 50 mM Tes/KOH (pH 7.4), 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10 mM glucose, 0.2 mM NADP e 2 µg G6PDH. A determinação espectrofotométrica realizou-se a uma comprimento de onda de 340 nm e 25 °C num espectrofotómetro *Koron (Shimadzu)*, após adição de 0.1 ml de amostra e 1 µg de HK à mistura de reacção, determinando-se o aumento de absorvência correspondente à transformação de NADP⁺ em NADPH mediante as seguintes reacções enzimáticas:



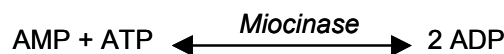
Por cada mol de ATP consumido forma-se 1 mol de NADPH que se pode detectar espectrofotometricamente. Para calibrar o sinal produzido pela amostra, construiu-se uma recta padrão com quantidades conhecidas de ATP (1, 2 e 5 nmoles).

A determinação da concentração de ADP intracelular ocorreu numa mistura de reacção contendo 50 mM Tes/KOH (pH 7.4), 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.42 mM fosfoenol-piruvato (PEP), 250 μM NADH, 15 μg cinase do piruvato (PK), 10 μg de desidrogenase do lactato (LDH), após a adição de 0.4 ml de amostra. Determinou-se a oxidação de NADH, registando-se as alterações na absorvência a 340 nm, produzidas durante as seguintes reacções enzimáticas:



Por cada mol de ADP, consome-se uma 1 de NADH.

Para a determinação de AMP intracelular utilizou-se a mesma mistura de reacção que a usada para quantificar ADP, mas neste ensaio a reacção foi iniciada com a adição de 1.5 ml de miocinase (cinase de adenilato), uma enzima com capacidade para catalizar tanto a produção de AMP, como a fosforilação deste nucleótido a ADP. No presente ensaio, utilizou-se o AMP presente na amostra para sintetizar ADP que será, por sua vez, utilizado no ciclo de reacções anteriormente descrito.



Uma vez que a miocinase catalisa a formação de 2 moles de ADP, consumindo 1 mol de AMP (e outra de ATP), a metade do aumento de absorvência detectado corresponderá à quantidade de AMP presente na amostra.

5.2.10. Determinação da actividade da caspase-3

A caspase-3 é uma protease activada durante a apoptose mediante cascatas de sinalização que medeiam, também, a activação da caspase-6, caspase-8 [Srinivasula *et al.*, 1996] e da granzima B derivada de células T citotóxicas [Darmon *et al.*, 1995]. Foram encontradas dianas de caspase-3 nas quais se incluem a poli-(ADP-ribose)polimerase (PARP) [Schlegel *et al.*, 1996], a laminina nuclear [Lazebnik *et al.*, 1995] e a gelsolina [Kothakota *et al.*, 1997] entre outras.

Monitorizou-se a eventual indução de apoptose por exposição ao vanadato através da determinação da actividade da caspase-3 na fracção citosólica de extractos celulares de cardiomiócitos de rato expostos a diferentes concentrações de vanadato, tal como descrito por Samhan-Arias *et al.* [2004]. Para tal, eliminou-se o meio das placas de cultivo, lavaram-se com PBS e lisaram-se as células com tampão de lise 3 (50 mM HEPES, pH 7.4; 1 mM DTT; 0.1 mM EDTA; 0.1% CHAPS). De seguida, centrifugaram-se os lisados a 9300 g durante 10 min a 4 °C, para eliminar fragmentos não homogeneizados e recolheu-se o sobrenadante. Adicionou-se esta fracção à reacção, juntamente com o tampão de ensaio (50 mM HEPES, pH 7.4; 100 mM NaCl; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 10% glicerol; 0.1% CHAPS) e o substrato colorimétrico da caspase-3 (0.2 mM Ac-DEVD-*p*NA), e mediu-se a absorção da amostra a 405 nm, durante 2 h a 37 °C ($\epsilon_{p\text{-nitroanilina}} = 10500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Por último, adicionou-se 0.1 μM Ac-DEVD-CHO, um inibidor específico da caspase-3 ($\text{IC}_{50} = 200 \text{ pM}$). Utilizou-se caspase-3 HR como controlo positivo.

5.2.11. Determinação de Ca^{2+} intracelular em cardiomiócitos

A concentração de Ca^{2+} livre intracelularmente ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) pode ser determinada com recurso a dois tipos de indicadores: (i) indicadores de comprimento de onda simples

(indicadores que são excitados por luz visível e que não têm associados, às alterações de intensidade registadas nos seus espectros de emissão ou excitação, deslocamentos nos máximos de excitação ou emissão) entre os quais se podem destacar o Fluo-3 e o Quim-2; e, (ii) indicadores de comprimento de onda dupla ou ratiométricos (indicadores que são excitados por luz ultravioleta e cujas intensidades variam não só em função da concentração de Ca^{2+} , como apresentam espectros distintos conforme se encontram livres ou unidos a Ca^{2+}) sendo os mais utilizados o Fura-2 e Indo-1.

No caso dos indicadores do primeiro tipo, devido à intensidade de fluorescência ser monitorizada num único comprimento de onda, as alterações de intensidade podem apresentar interferências devido a factores não relacionados com a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (alterações na espessura celular, perda de indicador pela célula). Tais factores, podem alterar as intensidades de fluorescência e conduzir a conclusões erróneas. Os indicadores do segundo tipo, por contrário, apresentam picos espectrais a diferentes comprimentos de onda para as formas livre e unida, permitindo determinar as relações entre os dois comprimentos de onda, minimizando as alterações não relacionadas com as variações de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

No presente estudo, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi determinada com o indicador Fura-2, que apresenta um espectro de excitação variável em função da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ com um máximo a 340 nm, que corresponde à forma unida a Ca^{2+} (Fura-2- Ca^{2+}) e outro a 380 nm que corresponde à forma livre (Fura-2) a um comprimento de onda de emissão de 510 nm (Fig. 5.2). Devido à constante de dissociação (K_d) do Fura-2/ Ca^{2+} ser 224 nM, esta sonda é especialmente indicada para determinar valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se situem entre 20 nM e 1 μM [Thomas e Delaville, 1991].

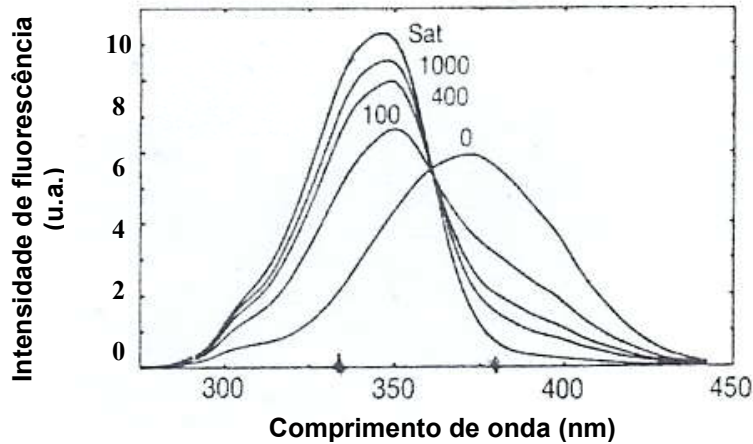


Figura 5.2 – Espectro de excitação do Fura-2 na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} livre ($\lambda_{\text{emissão}}$: 510 nm). Os espectros foram registados na presença de concentrações de saturação de Ca^{2+} , 1000, 400, 100 nM e na ausência de Ca^{2+} . [Adaptado de Thomas e Delaville (1991)].

Determinação da fluorescência de Fura-2 em cardiomiócitos

Para se proceder à determinação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o indicador Fura-2, assim como os do seu tipo, têm de ser introduzidos nas células. O Fura-2, por ser um anião carboxilato, não atravessa a bicamada lipídica, pelo que a forma mais eficaz de o introduzir intracelularmente é através de incubação das células com soluções diluídas de Fura-2 ou mediante a dispersão do grupo acetoximetiléster do indicador. Os grupos carboxílicos do indicador são essenciais para que o indicador seja sensível ao Ca^{2+} , pelo que os grupos esterificados devem ser eliminados após a penetração do indicador nas células. Esta acção é realizada por esterases intracelulares capazes de libertar a forma de policarboxilato sensível ao Ca^{2+} . Os cardiomiócitos usados no presente estudo foram carregados com 5 μg Fura-2-acetoximetiléster (Fura-2 AM)/ml durante 90 min a 37 °C.

No entanto, devido à reduzida solubilidade em solução aquosa do grupo acetoximetiléster do indicador, é recomendada a utilização de um agente surfactante suave não iónico que facilite a dispersão do mesmo. Por este motivo, a efectividade da

marcação pelo Fura-2 AM foi assegurada através da incubação dos cardiomiócitos com a referida sonda na presença de 0.025% plurónico F-127 (m/v).

Outro problema que se coloca face à utilização de grupos acetoximetiléster nos cultivos celulares, é a compartimentalização do indicador, pelo que é necessário estimar a percentagem de indicador nos compartimentos subcelulares através de um método semi-quantitativo simples que consiste na observação da quantidade de sonda libertada após tratamento das células com digitonina, que solubiliza a membrana plasmática, e, posteriormente, com Triton X-100 reduzido que permite a saída do indicador contido nos organelos subcelulares.

No presente estudo, a $[Ca^{2+}]_i$ foi determinada como previamente referido noutras publicações [García-Martín *et al.*, 1995; Guerini *et al.*, 1999; Samhan-Arias *et al.*, 2004]. A fluorescência da sonda, no interior de cardiomiócitos previamente marcados com 5 μ g Fura-2 AM/ml e 0.025% plurónico durante 90 min a 37 °C em tampão *Locke* K25, foi monitorizada num microscópio invertido *Nikon Diaphot 300* com controlo termostático (Warner Instrument Co., Hamden, CT, USA), equipado com um anexo epifluorescente e filtro de excitação. Os valores de fluorescência foram obtidos com filtros de excitação a 340 e 380 nm, espelho dicróico DM510 e filtro de absorção (emissão) de 520 nm. O registo da emissão da fluorescência é composta por três registos simultâneos: (i) registo da emissão de fluorescência, utilizando uma excitação de 340 nm (F_{340}); (ii) utilizando uma excitação de 380 nm (F_{380}) e (iii) registo do coeficiente (relação de fluorescência, $R = F_{340}/F_{380}$) entre a emissão da fluorescência, com um comprimento de onda de excitação de 340 nm, e a emissão da fluorescência com um comprimento de onda de 380 nm.

Após aquisição da sequência de imagens digitais pela câmara *Hamamatsu Hisca CCD* (com controlador do filtro *Lambda 10-2*) e do seu processamento com o programa

Hamamatsu Argus/Hisca, procedeu-se à análise das amostras, calculando o valor da razão 340/380.

Calibração da intensidade de fluorescência

As sondas que, tal como o Fura-2, apresentam variações no seu espectro de fluorescência (quer seja de excitação ou de emissão) permitem registar as alterações das intensidades de fluorescência a dois comprimentos de onda para obter sinais proporcionais à concentração de indicador unido a Ca^{2+} e de indicador livre.

A concentração de Ca^{2+} livre intracelularmente foi determinada como indicado por Grynkiewicz *et al.* [1985]. O coeficiente F_{340}/F_{380} , denominado R, está directamente relacionado com a relação entre estas duas formas da sonda, pelo que pode ser utilizado na calibração do sinal de fluorescência para determinação da concentração de $[Ca^{2+}]_i$ (Equação 5.3). Uma vez que, R é independente da concentração da sonda ou da dispersão de luz, não é necessário que estes parâmetros permaneçam constantes ao longo dos ensaios [Thomas e Delaville, 1991].

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \times K_d \times Q \quad [\text{Eq. 5.3}]$$

A $[Ca^{2+}]_i$ calculada a partir do sinal de fluorescência de Fura-2, foi determinada através da aplicação de uma equação (Equação 5.3) onde R_{\max} e R_{\min} são valores de R sob condições de saturação e livres de Ca^{2+} , respectivamente, sendo Q o coeficiente dos valores de fluorescência a 380 nm para o indicador livre de Ca^{2+} e saturado com Ca^{2+} . O valor de R_{\max} (2.8 ± 0.2) foi determinado experimentalmente utilizando cardiomiócitos marcados com Fura-2 e após adição de BrA_{23187} (5 $\mu\text{g/ml}$) ou ionomicina (45 $\mu\text{g/ml}$), como agentes permeabilizantes da membrana ao Ca^{2+} . De igual modo, após adição de

10 mM EGTA o valor de R_{\min} foi estimado em 0.2 ± 0.02 . Nestas condições experimentais, e após registo da fluorescência a $\lambda_{\text{excitação}}$ de 380 da sonda saturada e livre de Ca^{2+} , o valor do parâmetro Q foi determinado em 1.85 ± 0.15 .

5.2.12. Determinação de stresse oxidativo intracelular

Neste trabalho avaliou-se o stresse oxidativo induzido nos miócitos cardíacos por exposição às soluções de vanadato, com a forma esterificada da sonda fluorescente diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA). A H_2DCFDA penetra a membrana celular, é desacetilada pela acção das esterases intracelulares e, uma vez no citosol, a sonda não fluorescente é oxidada a diclorofluoresceína (DCF). Este produto oxidado altamente fluorescente é considerado um marcador citosólico sensível ao stresse oxidativo. Paralelamente, determinou-se a formação do radical anião superóxido (O_2^-) através do uso de uma sonda fluorescente específica para a detecção deste radical, o dihidroetídio (DHE).

Uso do indicador fluorescente H_2DCFDA para a determinação de stresse oxidativo

O stresse oxidativo intracelular foi monitorizado através do uso da sonda fluorescente diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA) [Greenland *et al.*, 1995; Keller *et al.*, 2004]. Após 3 DIV, trocou-se o meio de cultivo dos cardiomiócitos para tampão *Locke* K5 e 12 ou 24 h após a adição das respectivas soluções de vanadato (0-50 μM vanádio total), incubaram-se as células com 10 μM H_2DCFDA durante 10 min, a 37 °C. A fluorescência das células marcadas com H_2DCFDA foi monitorizada com uma câmara *Hamamatsu Hisca CCD* acoplada a um microscópio invertido *Nikon Diaphot 300*. A sonda fluorescente foi excitada a 470 nm e a emissão da fluorescência

selecionada através de um espelho dicróico DM510 e filtro. As imagens adquiridas foram analisadas com recurso ao programa *Hamamatsu Argus/Hisca*.

Uso de indicador fluorescente específico para a detecção de O_2^- (DHE)

A formação do radical anião superóxido (O_2^-) foi determinada através do uso de uma sonda fluorescente específica para a detecção deste radical, o dihidroetídio (DHE) [Budd *et al.*, 1997]. Após incubação com diferentes concentrações de vanadato (0-50 μ M vanádio total) durante 12 ou 24 h, as células foram marcadas com 10 μ M DHE (em DMSO) durante 10 min, a 37 °C, em tampão *Locke*, após o que, foram lavadas com PBS. As imagens de fluorescência dos cardiomiócitos tratados com vanadato, foram adquiridas por uma câmara *Hamamatsu Hisca CCD* acoplada a um microscópio invertido *Nikon Diaphot 300*, com um filtro de excitação a 470 nm, e espelho dicróico DM580, e um filtro de emissão a 490 nm e, posteriormente, analisadas com recurso ao programa *Hamamatsu Argus/Hisca*.

Note-se que todos os ensaios decorreram a 37 °C e a intensidade de fluorescência foi calculada através da determinação da média das intensidades das áreas de, pelo menos, 100 células. Para cada condição descrita, foram adquiridas, pelo menos, 3 imagens de células diferentes e os ensaios foram realizados, no mínimo, em triplicado.

5.2.13. Determinação do potencial da membrana mitocondrial com os indicadores fluorescentes JC-1 e TMRE

O potencial da membrana mitocondrial, após exposição dos cardiomiócitos a diferentes concentrações das espécies decaméricas e monoméricas de vanadato, foi monitorizado com duas sondas fluorescentes: (i) iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianeto (JC-1) e (ii) éster de etil tetrametilrodamina (TMRE).

Monitorização do potencial da membrana mitocondrial com a sonda JC-1

Após marcação dos cardiomiócitos com 2 μ M JC-1 durante 30 min, a 37 °C, as células foram lavadas com solução PBS e foi-lhes adicionado tampão *Locke* K5 [Mathur *et al.*, 2000]. As imagens de fluorescência das células tratadas com vanadato, foram adquiridas por uma câmara *Hamamatsu Hisca CCD* acoplada a um microscópio invertido *Nikon Diaphot 300* e, posteriormente, analisadas com o programa *Hamamatsu Argus/Hisca*.

A distribuição do JC-1 nos seus estados monomérico e agregado foi quantificada através de imagens da intensidade da fluorescência verde e vermelha, adquiridas com um filtro de excitação de 470 nm e uma programação para o espelho dicróico e filtro de 510/520 nm e 580/590 nm, respectivamente. Determinou-se a razão entre as intensidades do JC-1 agregado e monomérico, interpretando-se um decréscimo na razão como uma perda de potencial de membrana, enquanto que um aumento no valor estimado foi interpretado como uma subida do potencial de membrana [Xu *et al.*, 2001].

Todos os ensaios foram realizados em triplicado com, no mínimo, três cultivos primários de cardiomiócitos e os tratamentos foram efectuados com diferentes soluções de vanadato. Os valores apresentados resultam da média das intensidades registadas para $n > 100$ células.

Monitorização do potencial da membrana mitocondrial com a sonda TMRE

Adicionalmente, marcaram-se os cardiomiócitos com TMRE, por incubação com 5 μ M TMRE e 0.01% de plurónico durante 15 min. As imagens foram adquiridas como anteriormente referido para a fluorescência vermelha do JC-1 (filtro de excitação a 470 nm; espelho dicróico a 580; e, filtro de emissão a 590 nm).

5.2.14. Análise estatística

Todos os dados apresentados nesta secção foram obtidos, no mínimo, em três ensaios independentes com três ou mais replicados de cada condição experimental. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (desvio). A análise estatística foi efectuada com recurso ao teste não-paramétrico *Mann-Whitney*, com um nível de significância de $p < 0.05$.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer da otimização das condições de cultivo primário de miócitos cardíacos, apurou-se que na presença de 1% gelatina os cardiomiócitos apresentam maior taxa de viabilidade do que quando cultivados em placas tratadas com 20% poli-L-lisina. Relativamente à inibição da proliferação de células não musculares, constatou-se que o pré-plaqueamento deverá ter uma duração de 2 h e que a utilização de 20 μM Ara-C (*versus* 10 μM) induz uma reduzida taxa de contaminação de fibroblastos.

5.3.1. Cultivo primário de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos

Por cada preparação de cardiomiócitos utilizaram-se em média 13 ± 2 ratos com 2-3 dias, tendo-se obtido por cada preparação $38.2 \times 10^6 \pm 8.5 \times 10^6$ células (rendimento: $3.1 \times 10^6 \pm 0.6 \times 10^6$ células/rato). Sempre que o número de indivíduos por preparação era inferior a 10, teve-se o cuidado de reduzir a concentração da solução enzimática proporcionalmente afim de evitar uma digestão excessiva do tecido.

Nos cardiomiócitos, o método de exclusão de células não viáveis com azul de tripano (Secção 5.2.2.) não se mostrou eficaz. No presente estudo, consideraram-se as maiores células individualizadas observadas (arredondadas) como cardiomiócitos viáveis, excluindo-se as que se apresentavam fragmentadas, agrupadas ou sem a sua forma arredondada característica. Após o pré-plaqueamento, a percentagem de cardiomiócitos estimada em cada preparação foi de $86 \pm 8 \%$, a partir do número total de células isoladas (contagem realizada antes do pré-plaqueamento).

5.3.2. Coloração de cardiomiócitos com hematoxilina e eosina

Os cardiomiócitos foram facilmente identificados microscopicamente pela sua característica capacidade de contraírem espontânea e sincronizadamente (observável

após 1 DIV) e pela sua morfologia. Por outro lado, as células cardíacas cultivadas tendem a formar monocamadas, ainda que alguns miócitos permaneçam isolados quando a densidade celular do cultivo é baixa. Os miócitos cardíacos (Fig. 5.3) apresentam núcleos esféricos centralmente localizados e rodeados por miofibrilhas bem delineadas [Lascano *et al.*, 1988].

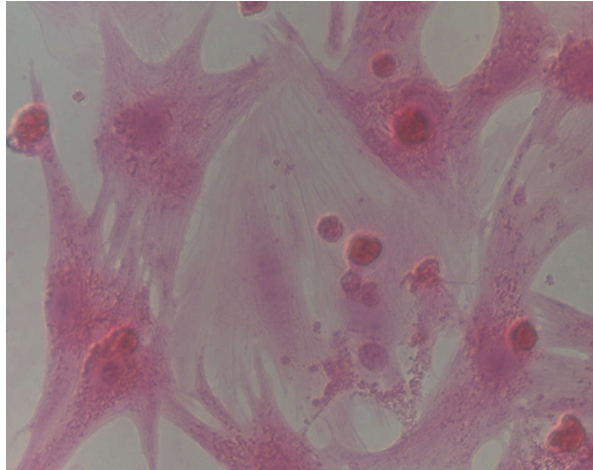


Figura 5.3 – Cardiomiócitos de ratos recém-nascidos (3 DIV) corados com hematoxilina-eosina, que cora núcleo e citoplasma, respectivamente (ampliação 400x).

5.3.3. Imunodeteção da cadeia pesada de miosina em culturas de cardiomiócitos

As células isoladas no presente estudo foram caracterizadas como miócitos cardíacos através da detecção de uma proteína característica do músculo cardíaco, a miosina. A presença da cadeia pesada de miosina (200 kDa), no lisado celular da cultura primária de miócitos cardíacos, e a sua ausência (fibroblastos isolados durante o pré-plaqueamento) foi determinada por *Western blotting*. A banda correspondente à cadeia pesada de miosina do citoplasma das células musculares esqueléticas (200 kDa) presente no padrão de alta massa molecular (HMW), foi também detectada nos lisados celulares de cardiomiócitos (CM) e em amostras de vesículas do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético (SR) – controlo positivo (Fig. 5.4). No lisado de fibroblastos (FB) quase não se detectou a referida banda a 200 kDa, indicando que se

perde um reduzido número de cardiomiócitos aquando do pré-plaqueamento para eliminação de fibroblastos (Fig. 5.4).

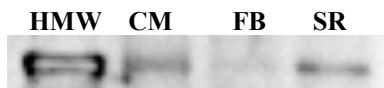


Figura 5.4 – Detecção da banda correspondente à cadeia pesada de miosina (200 kDa) por imunodeteção em: marcador de elevada massa molecular (HMW) da *Bio-Rad*; lisados de cardiomiócitos (CM) e fibroblastos isolados (FB). Anticorpo anti-cadeia pesada da miosina sarcomérica (diluição 1:100) foi usado como anticorpo primário e peroxidase IgG anti-rato (diluição 1:10000), como anticorpo secundário.

As intensidades registadas foram de 3251, 1142, 128 e 903 para o padrão (HMW), CM, FB e SR, respectivamente. Correspondendo os sinais dos CM e FB a 126% e 14% do sinal do controlo positivo (SR), respectivamente.

5.3.4. Detecção imunocitoquímica de fibroblastos em culturas de cardiomiócitos

Com o objectivo de se determinar a possível taxa de contaminação das culturas de cardiomiócitos com fibroblastos, procedeu-se à detecção das mesmas por imunocitoquímica com um anticorpo anti-Vimentina. Na coluna A da figura 6.3 observam-se imagens adquiridas em contraste de fase de 4 campos de cultivo, onde se podem identificar as células existentes no campo de observação, não sendo possível proceder à discriminação entre cardiomiócitos e células não musculares; na coluna B mostram-se imagens dos mesmos campos (apresentados na coluna A), onde se observa a presença de pequenas zonas que apresentam fluorescência, correspondendo ao citoplasma celular marcado com anticorpo anti-Vimentina, indicando a presença de fibroblastos na cultura; a coloração com DAPI (coluna C) permite identificar todos os núcleos celulares presentes neste campo de imagem; graças à dupla coloração realizada

e por sobreposição de ambas as imagens (coluna D), é possível determinar quais dos núcleos celulares assinalados com DAPI correspondem a fibroblastos. Com base nesta observação, e após contagem do número de células assinaladas em cada condição de marcação, é possível referir que 90% das células isoladas são cardiomiócitos.

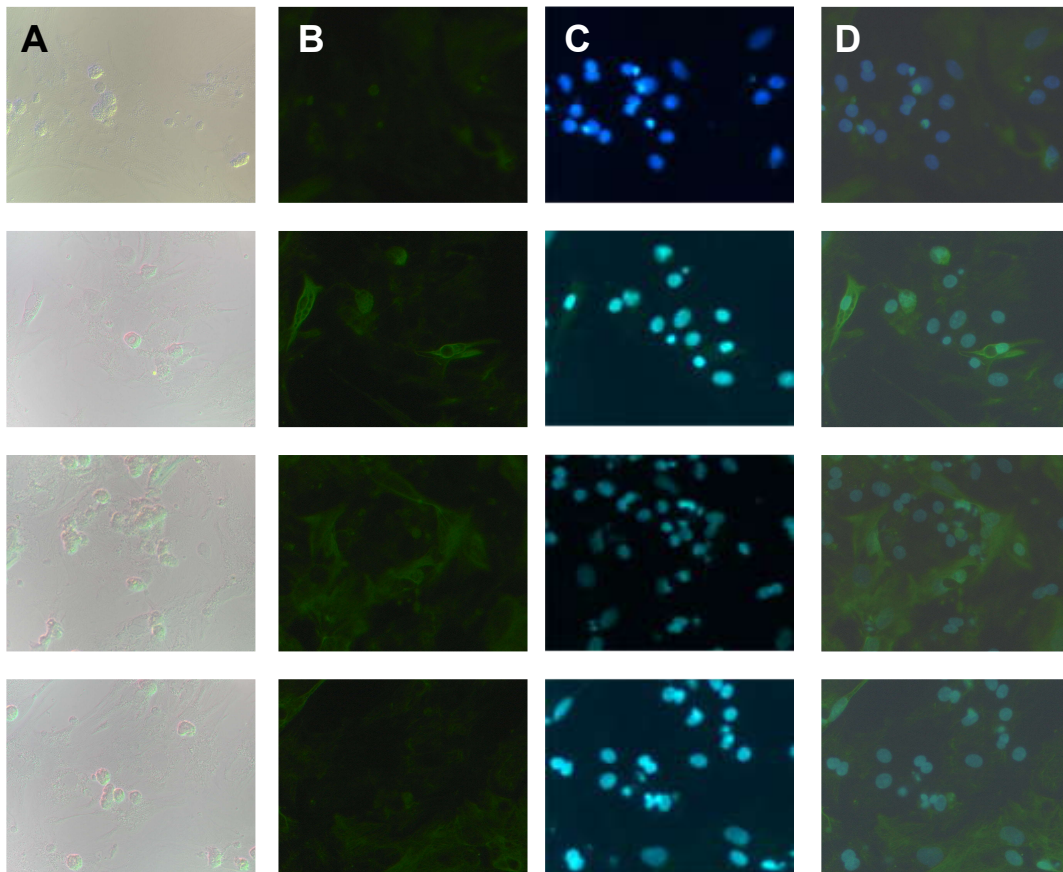


Figura 5.5 – Imunodeteção de fibroblastos em cultivos de cardiomiócitos com anticorpo anti-Vimentina. Imagens de contraste de fase (A); coloração com anti-Vimentina realizada na presença de 10% soro de cabra (agente bloqueador), Vimentina Ab-2 (clone V9), numa diluição 1:50, como anticorpo primário e IgG-FITC de cabra anti-rato, numa diluição 1:25, como anticorpo secundário (B); coloração de núcleos com DAPI (C); na coluna D apresentam-se as imagens resultantes da sobreposição das imagens das colunas B e C (ampliação 400x). Aproximadamente 90% das células, identificadas através de coloração nuclear com DAPI (C) correspondem a cardiomiócitos (D). Todos os campos registados são representativos de 3 campos tomados em 3 preparações diferentes de cardiomiócitos.

Os fibroblastos contaminantes, para além de identificados imunohistoquimicamente com o anticorpo Vimentina Ab-2 (testado previamente em fibroblastos Swiss 3T3), foram também facilmente detectados devido aos seus núcleos fusiformes, assim como pela ausência de miofibrilhas.

5.3.5. Toxicidade das soluções de decavanadato e metavanadato nas culturas de cardiomiócitos

Determinou-se a toxicidade induzida pelas soluções de decavanadato ou metavanadato nas culturas primárias de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos, monitorizando-se a viabilidade celular após 12 ou 24 h de exposição às respectivas espécies oligoméricas de vanadato.

O método de exclusão de células não viáveis com azul de tripano não mostrou ser o mais adequado para a monitorização dos efeitos dos vanadatos na viabilidade celular em miócitos cardíacos. Este tipo de células, não só cresce à superfície da matriz utilizada para a sua maturação (1% gelatina), como tem a capacidade de se desenvolver no interior da matriz. Por este motivo, o corante azul de tripano apresentou dificuldade em penetrar na matriz de gelatina, corando deficientemente as células não viáveis que se encontravam no seu interior. Verificou-se portanto, que os dados de viabilidade baseados na contagem de células pelo método de azul de tripano subestimavam a real perda de viabilidade induzida pelo vanadato nesta culturas celulares e que foram, posteriormente, determinadas através do ensaio de MTT e pela fluorescência do iodeto de propídio, tal como referido nos Materiais e Métodos (Secção 5.2.7.).

Ensaio de MTT

Através da avaliação da viabilidade celular, pelo ensaio de MTT, em cardiomiócitos tratados com espécies decaméricas e monoméricas de vanadato, verificou-se que ambas as soluções de vanadato induziram uma diminuição da viabilidade celular (Fig. 5.6). A espécie decamérica de vanadato revelou ser apenas ligeiramente mais potente na indução de morte celular ($LD_{50} = 10 \mu\text{M}$ vanádio total, 24 h após tratamento), do que a monomérica ($10 \mu\text{M}$ vanádio total induz 30% de morte celular após 24 h de exposição à solução de metavanadato) (Fig. 5.6B). Uma vez que, 1 mole de espécies decaméricas de vanadato contém 10 moles de vanádio total, isto significa que $1 \mu\text{M}$ vanadato decamérico produz morte celular em cerca de 50% dos cardiomiócitos.

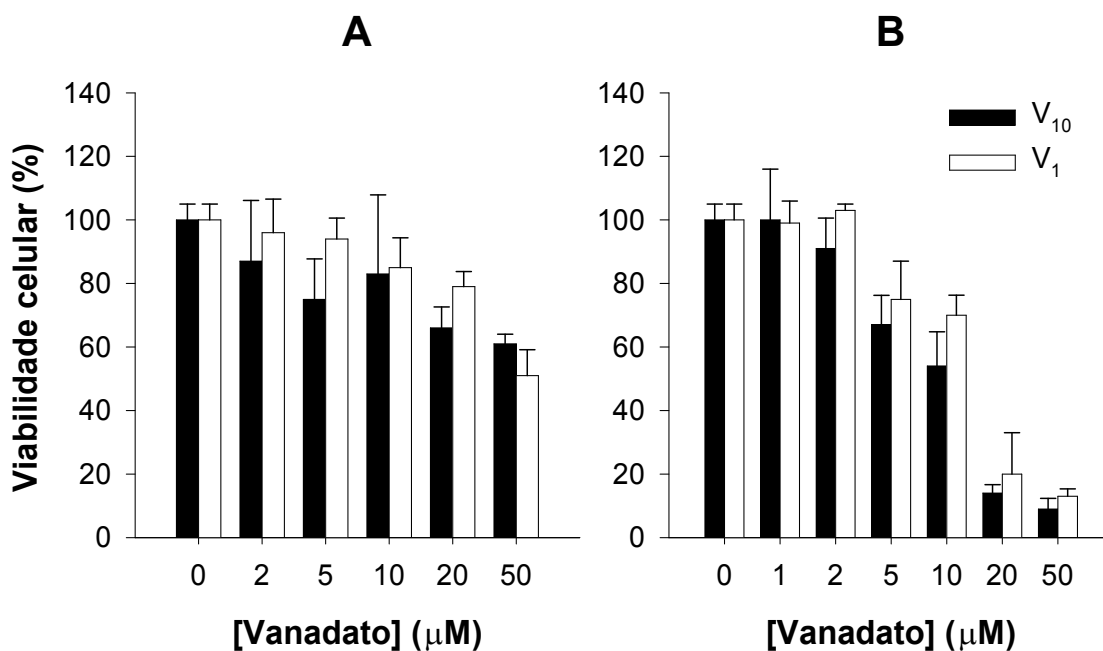


Figura 5.6 – Viabilidade celular estimada pelo ensaio de MTT, em cardiomiócitos (3 DIV) após 12 (A) e 24 h (B) de exposição a espécies decaméricas (V_{10}) e monoméricas (V_1) de vanadato numa gama de concentrações de 0-50 μM vanádio total (média \pm desvio).

No entanto, as diferenças observadas na diminuição de viabilidade celular, após 24 h de tratamento, com as soluções de decavanadato e metavanadato (Fig. 5.6B) não parecem ser significativas. Esta conclusão baseia-se não apenas no resultado da análise estatística ($p > 0.05$), mas também no facto da diminuição de viabilidade celular registada após 12 h de exposição dos cardiomiócitos a ambas as soluções de vanadato ser semelhante para a mesma concentração de vanádio total (Fig. 5.6).

Uma vez que a ciclosporina A (CsA), bloqueia a abertura do poro de transição da membrana mitocondrial (MMTP), responsável pela libertação de citocromo *c* e Ca^{2+} [Ganote e Armstrong, 2003; Sharov *et al.*, 2005], conferindo protecção contra despolarização da mitocôndria, avaliou-se o efeito deste antibiótico na viabilidade celular de cardiomiócitos expostos às soluções de vanadato. No entanto, 1 μM CsA não conferiu protecção contra a morte celular induzida pelas diferentes espécies oligoméricas de vanadato, registando-se valores de viabilidade celular semelhantes na ausência (Fig. 5.6) e na presença de CsA (*dados não apresentados*). O facto do bloqueio do MMTP não afectar a perda de viabilidade celular indicia a ocorrência de morte apoptótica e não necrótica (dependente da estabilidade do MTPP).

Coloração com bis-benzimida (Hoechst 33258) e iodeto de propídio

Como se pode observar, a capacidade redutora das células tratadas com vanadato apresentou uma ligeira diminuição, reflectida na concentração de formazan detectada, relativamente às células controlo, possivelmente devido ao stresse provocado pela presença de vanádio no meio extracelular. Para confirmar os efeitos observados na viabilidade com o método indirecto da redução de MTT, assegurando que os resultados observados não se devem a uma redução do MTT pelo vanadato, facto que iria falsear a interpretação dos resultados, foi necessário aplicar um método de medida de viabilidade

directo como é o de marcação dupla descrito por Abu-Shakra *et al.* [1997] em que se utiliza Hoechst 33258 e iodeto de propídio como sondas marcadoras de células. Como se pode observar no cultivo de cardiomiócitos controlo (24 h em meio sem soro), a relação entre células vivas (coradas de azul) e mortas (marcadas com iodeto de propídio, por isso coradas de cor vermelha) – os resultados de viabilidade obtidos mediante o método de coloração dupla com fluorocromo apresenta uma elevada correlação com os dados de viabilidade determinados pelo método de redução do MTT (Fig. 5.7).

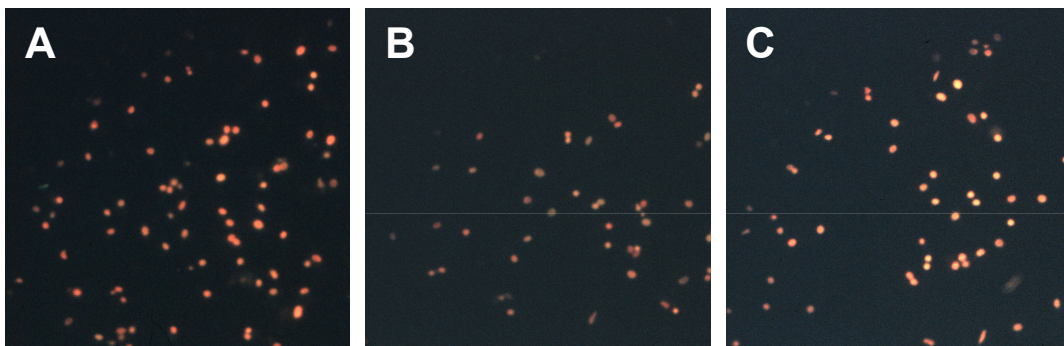


Figura 5.7 – Imagens pseudocoloridas representativas de cardiomiócitos marcados com Hoechst 33258, representando células controlo (A) e tratadas durante 24 h com 20 μ M (vanádio total) com espécies decaméricas (B) e monoméricas (C) de vanadato.

A coloração com Hoechst 33258 revelou uma grande variabilidade na quantidade de ADN extraído dos cardiomiócitos tratados com vanadato. Esta variabilidade de densidade celular, registada entre células tratadas e não tratadas, deve-se ao facto dos cardiomiócitos mortos se destacarem das placas aquando da eliminação do meio de cultivo ou da lavagem das células com PBS, ou outra solução tampão. Por este motivo, todos os resultados serão normalizados, tendo em conta a concentração de proteína presente em cada placa de cultivo.

A perda de viabilidade induzida por exposição às soluções de decavanadato e metavanadato, monitorizada por marcação com iodeto de propídio (Fig. 5.8), revelou

que tanto o vanadato decamérico como o monomérico induzem morte celular por necrose. As alterações na viabilidade celular, ocorridas após exposição às soluções de decavanadato e metavanadato numa gama de concentrações de 0-50 μM de vanádio total, indicam que ambos os oligovanadatos promovem uma extensão de morte celular semelhante: 24 h após tratamento com 1 μM de espécies decaméricas (10 μM vanádio total) 62% dos cardiomiócitos permaneceram viáveis, enquanto que apenas 43% de células vivas foram observadas após tratamento com a mesma concentração de espécies monoméricas de vanadato (Fig. 5.8).

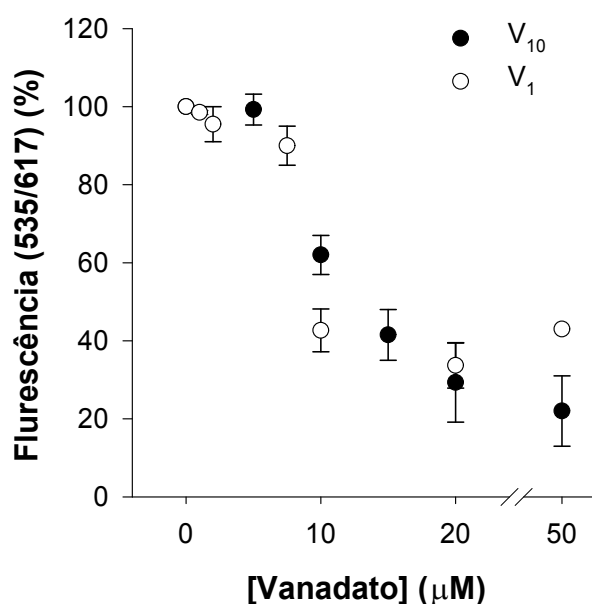


Figura 5.8 – Viabilidade celular estimada por coloração com iodeto de propídio, em cardiomiócitos (3 DIV) após 24 h de exposição a espécies decaméricas (V_{10}) e monoméricas (V_1) de vanadato numa gama de concentrações de 0-50 μM vanádio total (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$).

Comprovou-se também que, a exposição dos cardiomiócitos a diferentes formas oligoméricas de vanadato (monomérica e decamérica) apresenta efeitos tóxicos semelhantes, apresentando a morte celular induzida por exposição à solução de decavanadato um valor de IC_{50} aproximadamente 20% superior que o obtido com as

soluções de metavanadato, contendo maioritariamente espécies monoméricas de vanadato.

Devido aos potenciais efeitos tóxicos dos compostos de vanádio, não se recomenda o seu uso como suplemento nas dietas de atletas [Gerrard *et al.*, 1993; Fawcett *et al.*, 1996; 1997], apesar deste metal estar presente na maioria dos produtos alimentares que compõem a dieta humana [Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999]. Note-se que, o vanádio uma vez incorporado intracelularmente nos mamíferos apresenta uma taxa de eliminação muito lenta, levando a uma progressiva acumulação ao longo da vida [Thompson *et al.*, 1998; Anke *et al.*, 2000].

O vanadato é normalmente reduzido a vanadilo sob condições fisiológicas [Rehder, 1995] e uma vez que o vanadato parece ser mais tóxico para os sistemas biológicos, a conversão a vanadilo tem sido proposta como mecanismo de desintoxicação [Sabbioni *et al.*, 1991; 1993].

5.3.6. Acumulação de vanádio nos extractos celulares

No presente trabalho, avaliou-se se a acumulação de vanádio pelos cardiomiócitos era dependente do estado de oligomerização do vanadato quantificando, por EAA, a quantidade de metal acumulada nos extractos celulares.

Com este objectivo, após incubação dos miócitos cardíacos com soluções de decavanadato e metavanadato, nas concentrações em que se registou uma perda significativa de viabilidade celular (10-50 μM vanádio total) (Secção 5.3.5.), o meio extracelular foi removido e as células lavadas com *Locke* K5 para eliminar o vanádio que eventualmente se encontrasse aderido à membrana celular dos cardiomiócitos. No entanto, como não se pode excluir a possibilidade de parte do vanádio quantificado por EAA corresponder a uma eventual porção de vanádio que possa ter ficado aderido à

membrana celular, mesmo após a realização das lavagens das culturas, atribui-se a designação de “vanádio no extracto celular” à quantidade de metal maioritariamente acumulada intracelularmente e à eventual contribuição de vanádio extracelular.

Registou-se um valor basal de vanádio na ordem dos 4.341 ± 0.297 ppb/mg proteína no extracto celular dos cardiomiócitos de ratos recém-nascidos dos grupos Controlo (sem tratamento com vanadato). A acumulação de vanádio nos extractos celulares aumentou com o aumento da concentração de vanadato total presente no meio de crescimento (Fig. 5.9). Após 24 h de tratamento com $10 \mu\text{M}$ (vanádio total) de soluções de decavanadato ou metavanadato, o conteúdo em vanádio nos cardiomiócitos aumentou significativamente para 45 ± 4 e 60 ± 6 ppb/mg proteína, respectivamente. Este resultado sugere que a espécie monomérica de vanadato (semelhante ao fosfato) é acumulada nos extractos celulares. Também se observou que acima de $10 \mu\text{M}$, a acumulação de vanádio não depende do estado de oligomerização do vanádio em solução: após 24 h de tratamento com ambas as soluções de vanadato, os extractos celulares dos cardiomiócitos acumularam igualmente ambas as espécies oligoméricas de vanadato (Fig. 5.9). Tratamentos com $20 \mu\text{M}$ (vanádio total) induziram um aumento do conteúdo em vanádio de cerca de +1400%, enquanto que se verificou um aumento de aproximadamente +2000% na quantidade de vanádio detectada em cardiomiócitos tratados com $50 \mu\text{M}$ vanadato, com respeito às células Controlo (não tratadas com vanádio) (Fig. 5.9).

Apesar da diferença estrutural entre as espécies decamérica (a espécie oligomérica de vanádio predominante nas soluções de decavanadato usadas no presente estudo) e monomérica de vanadato (espécie de vanádio predominante nas soluções de metavanadato, nas concentrações de vanadato usadas no presente estudo), a quantidade de vanádio incorporado nos extractos celulares foi semelhante após 24 h de incubação

dos cardiomiócitos com as soluções de decavanadato e metavanadato. Devido à decomposição lenta das espécies decaméricas no meio de cultivo usado (DMEM), com um tempo de meia-vida de aproximadamente 2 h (Secção 2.3.2.), e tendo em conta que se desconhece a existência de sistemas de transporte na membrana plasmática para o vanadato decamérico, a explicação mais plausível para os semelhantes níveis de vanádio acumulado pelos cardiomiócitos após 24 h de incubação com as soluções de decavanadato e metavanadato, é que a incorporação de vanádio nas células ocorre por transporte do vanadato monomérico através da membrana plasmática, uma vez que este oligovanadato apresenta a capacidade de atravessar a membrana das células de mamíferos através dos sistemas de transporte do fosfato [Rehder, 1995].

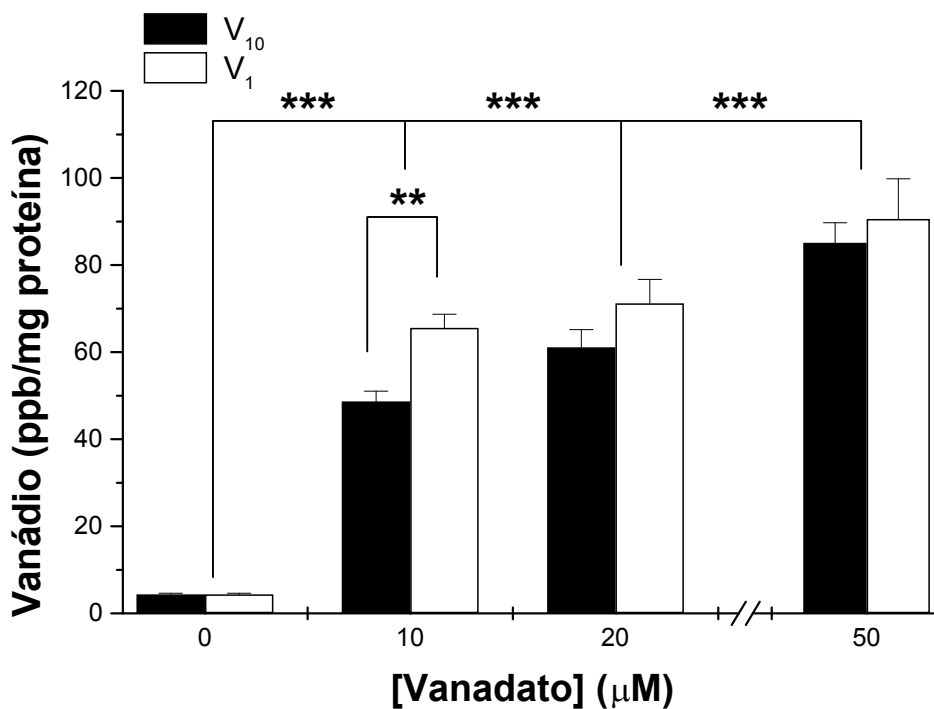


Figura 5.9 – Concentração de vanádio (ppb/mg proteína) em cardiomiócitos de ratos recém-nascidos, 24 h após tratamento com soluções de decavanadato (V₁₀) e metavanadato (V₁) numa gama de concentrações de 10-50 µM vanádio total (média ± desvio). **Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.01$). *** Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.001$).

5.3.7. Determinação de morte celular por exposição ao vanadato

No presente estudo, utilizaram-se dois métodos universalmente aceites – ensaio de MTT e marcação com iodeto de propídio – para a monitorização da perda de viabilidade celular registada nas culturas de cardiomiócitos, após exposição à soluções de decavanadato e metavanadato. No entanto, visto o uso do iodeto de propídio ser amplamente aceite como marcador para a morte celular por necrose, esta possibilidade foi confirmada pela determinação da perda de carga energética celular após exposição dos cardiomiócitos a soluções de decavanadato.

Deste modo, no presente estudo, caracterizou-se a natureza da diminuição de viabilidade celular registada após exposição a soluções de vanadato. Neste sentido, procedeu-se à monitorização da activação da caspase-3 e à determinação do estado bioenergético dos miócitos cardíacos com o objectivo de caracterizar a morte celular registada como sendo desencadeada por um processo apoptótico ou necrótico, respectivamente.

Actividade da caspase-3

Apesar de se ter observado que tratamentos com vanadato, em cardiomiócitos de rato, inibem a activação da caspase-3 por isquemia, inibindo consequentemente a apoptose [Takada *et al.*, 2004], não se deve excluir a hipótese de uma eventual contribuição de processos apoptóticos para a morte celular registada após exposição dos cardiomiócitos à soluções de decavanadato e metavanadato (Secção 5.3.5.).

No entanto, na presença de espécies decaméricas ou monoméricas de vanadato (20 μ M vanádio total), não se observou uma activação significativa da caspase-3, indicando que estes oligovanadatos não induzem morte celular por apoptose (Fig. 5.10).

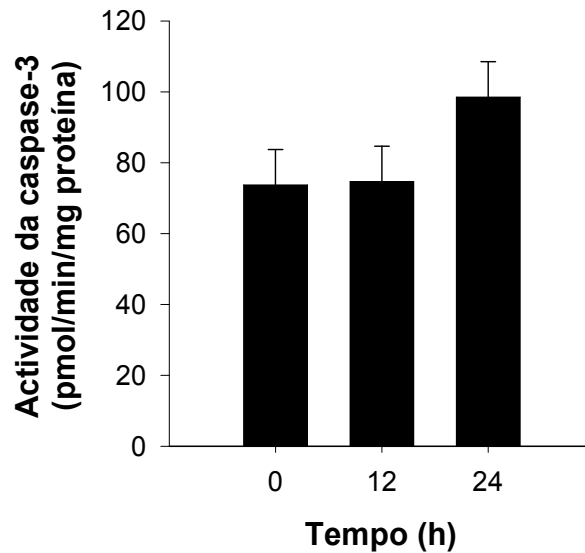


Figura 5.10 – Efeito da exposição a 2 μM espécies decaméricas de vanadato (20 μM vanádio total) na actividade da caspase-3 dos cardiomiócitos, 24 h após tratamento com solução de decavanadato (média \pm desvio). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$).

Estado bioenergético celular

Adicionalmente, registou-se uma diminuição significativa da carga energética (C.E.) dos miócitos cardíacos, após 24 h de exposição às espécies decaméricas de vanadato: 10 e 20 μM (vanádio total) reduzem a C.E. celular em -36% e -39%, respectivamente; enquanto que, 24 h de exposição à mesma concentração de vanádio total na forma de vanadato monomérico induz uma diminuição um pouco menor: -(10-15)% e -(15-20)%, respectivamente (Fig. 5.11). Desta forma, a morte celular monitorizada com iodeto de propídio (Fig. 5.8) – característica de estados necróticos – e o decréscimo registado na C.E. dos cardiomiócitos, permitem afirmar que a perda de viabilidade celular observada após exposição à solução de decavanadato deve-se maioritariamente à morte celular por necrose [Soares *et al.*, 2007d].

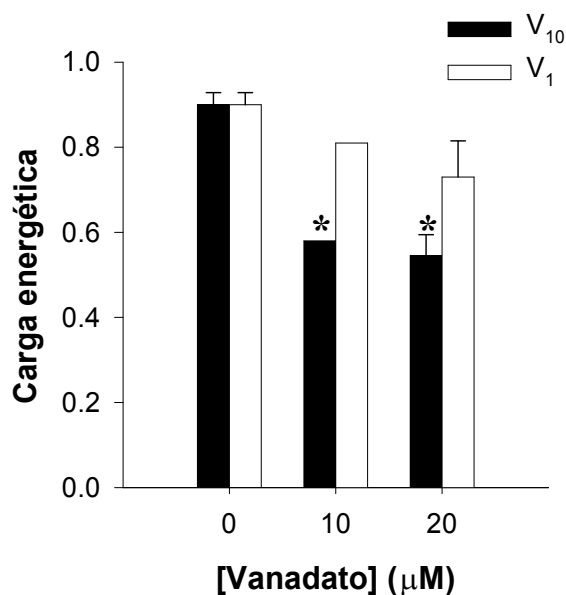


Figura 5.11 – Efeito da exposição a espécies decaméricas e monoméricas de vanadato nas variações da carga energética dos cardiomiócitos, 24 h após tratamento com concentrações de vanadato decamérico (V₁₀) e monomérico (V₁) de 0-20 μM vanádio total (média ± desvio). *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$).

5.3.8. Efeitos de vanadato decamérico e monomérico na homeostasia de Ca²⁺ intracelular em cardiomiócitos

Verificou-se que os cardiomiócitos Controlo (células não tratadas com vanádio) apresentaram uma [Ca²⁺]_i normalmente baixa na gama de 60 ± 10 nM (razão 340/380 nm: ~0.5) e que é alternada com picos de [Ca²⁺]_i associados às contracções espontâneas (Fig. 5.12A). Observou-se também que, os cardiomiócitos tratados com ambas as soluções de vanadato (10 μM vanádio total; LD₅₀) apresentam uma elevada [Ca²⁺]_i basal (cerca de 4x superior à das células Controlo), entre 200 e 250 nM (razão 340/380: ~1.2), sendo a amplitude dos seus picos de [Ca²⁺]_i, associados às contracções espontâneas, amplamente reduzidas quando comparadas com cardiomiócitos Controlo (não tratados com vanádio) (Fig. 5.12A). Estes resultados evidenciam que a exposição a ambas as

soluções de vanadato afecta o balanço entre a acumulação e a libertação de cálcio, favorecendo o esvaziamento parcial das reservas intracelulares de cálcio.

A concentração basal de Ca^{2+} citosólico das células sobreviventes (aquelas que exibiram contracções espontâneas) subiu de 60 ± 10 nM a 200-250 nM após 24h de incubação com 10 μM (vanádio total) de vanadato decamérico ou monomérico, um valor que se encontra próximo das concentrações de Ca^{2+} citosólico alcançado durante as contracções espontâneas dos cardiomiócitos Controlo (25-300 nM) (Fig. 5.12). Tal como esperado, nos cardiomiócitos incubados com as soluções de decavanadato ou metavanadato a amplitude das ondas de Ca^{2+} sofreu uma forte atenuação. A elevada sensibilidade da bomba de Ca^{2+} da membrana ao monovanadato está bem documentada ($K_i = 0.5 \pm 0.1$ μM) [Caroni e Carafoli, 1981] e justifica o aumento sustentado da concentração basal de Ca^{2+} intracelular após incubação com as soluções de vanadato. Estes resultados estão também de acordo com estudos mais recentes que demonstraram que o vanadato aumenta o Ca^{2+} intracelular nas culturas de células de músculo liso da aorta, afectando conseqüentemente o tónus vascular [Sandirasegarane e Gopalakrishnan, 1995]. Foi também descrito que o vanadato activa a ciclase de adenilato em diferentes tipos de células. No coração, o aumento da concentração de monofosfato de adenosina 3'-5'-cíclico (cAMP) provoca a libertação das reservas de Ca^{2+} intracelular, levando a um aumento da taxa cardíaca e do inotropismo cardíaco [Carmignani *et al.*, 1996; Nechay *et al.*, 1986; Willenbacher *et al.*, 1992; Braunwald, 1994].

A suposição de um esvaziamento parcial das reservas intracelulares induzido por vanadato são uma conclusão lógica dos resultados observados, nomeadamente o aumento de Ca^{2+} intracelular e a despolarização da membrana mitocondrial (Secção 5.3.10.), no entanto merece especial atenção a avaliação dos efeitos promovidos pelas diferentes espécies oligoméricas de vanadato nos mecanismo de libertação de cálcio.

Figura 5.12 – Efeito da exposição dos cardiomiócitos às soluções de decavanadato e metavanadato (10 μM vanádio total) na homeostasia de Ca^{2+} citosólico (A) e na descarga, induzida por EGTA, das reservas intracelulares de Ca^{2+} (B). Os resultados apresentados (média \pm desvio) representam a média de ensaios em triplicado ($n \geq 20$ células).

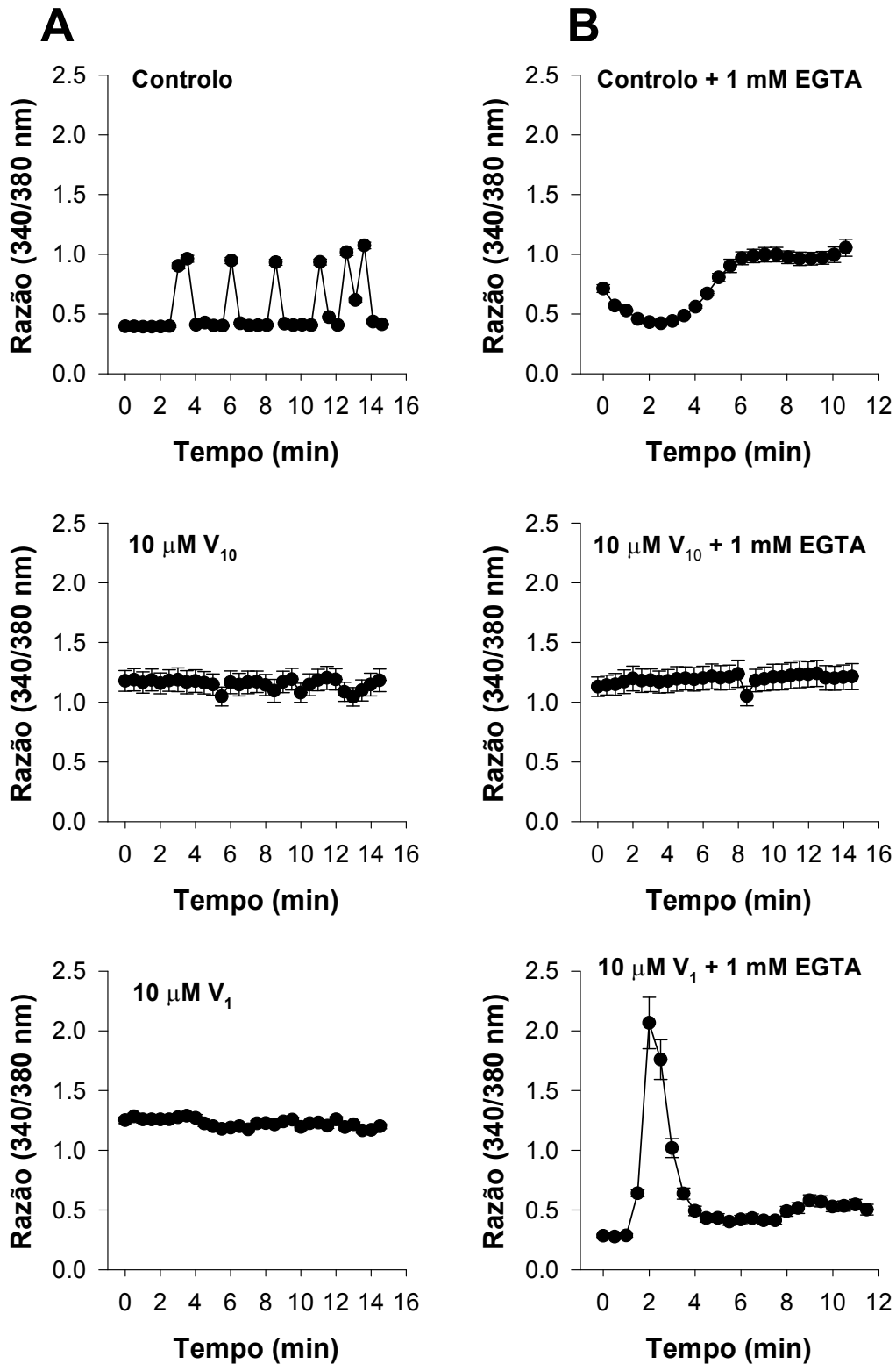


Figura 5.12 – Ver legenda na página anterior.

Uma vez que ambas as soluções de vanadato promovem um aumento da $[Ca^{2+}]_i$ é de se supor que as espécies oligoméricas de vanadato estejam (i) a inibir a acumulação de Ca^{2+} pelas reservas intracelulares (retículo sarcoplasmático, RS, e mitocôndria), inibindo a bomba de Ca^{2+} ou (ii) a induzir o esvaziamento parcial das reservas intracelulares Ca^{2+} , tendo capacidade para estimular canais de Ca^{2+} sensíveis à rianodina e ao inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Deste modo pretendeu-se avaliar o efeito dos oligovanadatos nas descargas de Ca^{2+} das reservas intracelulares, na presença de EGTA (Fig. 5.12B).

Saliente-se que, só na presença de monovanadato se produz-se uma descarga de $[Ca^{2+}]_i$ associada à adição de EGTA e plurónico F-127 ao meio extracelular (Fig. 5.12B), resultante do esvaziamento das reservas intracelulares de Ca^{2+} [Diaz *et al.*, 2001]. A acção do monovanadato, inibindo a acumulação de Ca^{2+} pelas reservas intracelulares foi também comprovada com recurso a inibidores da acumulação de Ca^{2+} . Provou-se deste modo, com 2 μM de tapsigargina (TG) e 10 μM de ácido ciclopiazónico de *Penicillium cyclopium* (CPA) – inibidor específico da Ca^{2+} -ATPase do RS – que o vanadato monomérico tem um efeito inotrópico, relacionado com a hiperpolarização das mitocôndrias, enquanto que a espécie decamérica pode estar a inibir essa saída através dos canais de Ca^{2+} sensíveis à rianodina e ao IP_3 , sendo que a hipótese mais provável é a da inibição da descarga de Ca^{2+} induzida por IP_3 , visto o vanadato decamérico ser um polianião, tal como o IP_3 . Esta possibilidade poderá ser futuramente confirmada em células permeabilizadas com digitonina. No entanto, estudos anteriores demonstraram que a espécie decamérica de vanadato induz um inibição reversível ($IC_{50} \sim 0.5 \mu M$) da sensibilidade do canal de Ca^{2+} ao IP_3 , revelando que a ligação do IP_3 ao local de elevada afinidade do receptor de células acinar pancreáticas ($K_d \sim 1.2 \text{ nM}$) e de microsomas do córtex adrenal ($K_d \sim 1.4 \text{ nM}$) pode ser

bloqueada pelo vanadato decamérico e não por outros oligovanadatos [Fohr *et al.*, 1989; 1991]. Estes resultados sugerem que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ registada no presente estudo resulta da acção inibitória da espécie decamérica de vanadato no canal sensível ao IP_3 , sendo uma consequência do seu efeito na ligação do IP_3 ao seu receptor. Deste modo, o vanadato decamérico parece actuar como a heparina: não tem efeito directo na acumulação de cálcio pelo RS, mas afecta a sua libertação inibindo o receptor IP_3 e activando o receptor de rianodina [Ehrlich *et al.*, 1994].

Bloqueando, por sua vez, o MMTP com 1 mM CsA [Ganote e Armstrong, 2003; Sharov *et al.*, 2005] será possível analisar em profundidade a descarga de Ca^{2+} induzida na presença de EGTA. Na presença de CsA, verificou-se uma alteração completa no padrão da dinâmica de Ca^{2+} : atenuação das oscilações e inibição das descargas induzidas por EGTA. Ao bloquear a libertação de Ca^{2+} pelo MMTP, a CsA indica que é a mitocôndria que desempenha a principal função na libertação de Ca^{2+} , no entanto, para excluir a acção inibidora da fosfatase calcineurina há que comparar estes resultados com outros bloqueadores do MMTP, nomeadamente 1 μ M de NIM811 (análogo não imunossupressivo da CsA). Note-se que, nestes ensaios a libertação de Ca^{2+} do RS não foi induzida, facto que poderá ser realizada futuramente, por acção de caféina.

Regra geral, a descarga de Ca^{2+} das reservas intracelulares dos miócitos cardíacos ocorreu em duas descargas parciais de Ca^{2+} que parecem estar relacionadas com duas reservas de Ca^{2+} distintas (RS e mitocôndria) e não com dois momentos de libertação de Ca^{2+} . Este resultados sugerem que a exposição dos miócitos cardíacos a ambas as soluções de vanadato – decavanadato e metavanadato – afectam o balanço entre a acumulação de Ca^{2+} e a sua libertação pelas reservas intracelulares de Ca^{2+} , favorecendo a acumulação de Ca^{2+} no citosol.

O estudo das alterações da homeostasia de Ca^{2+} induzidas por vanadato, poderá ser aprofundado futuramente com um fluorímetro de monitorização unicelular, que permitirá detectar os efeitos induzidos célula a célula para períodos de exposição na ordem dos 50 ms.

5.3.9. Efeitos do tratamento com decavanadato ou metavanadato no stresse oxidativo intracelular

O anião superóxido (O_2^-) pode ser considerado um produto paralelo da respiração mitocondrial [Budd *et al.*, 1997; Boveris e Cadenas, 1975] e o DHE tem se apresentado como uma sonda fluorescente adequada para a determinação da produção mitocondrial de O_2^- [Budd *et al.*, 1997].

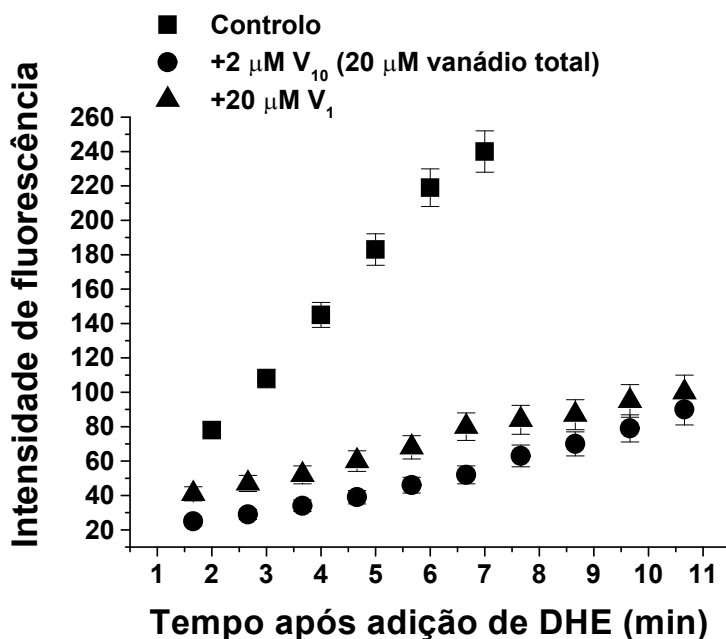


Figura 5.13 – Cinética de oxidação do DHE (A) por cardiomiócitos Controlo (■) e após 24 h de tratamento com vanadato decamérico, V_{10} (●) e monomérico, V_1 (▲). Os dados cinéticos representam a média de ensaios em triplicado ($n \geq 100$ células, média \pm desvio).

Após exposição das culturas de cardiomiócitos a ambas as soluções de vanadato, registou-se uma atenuação do stresse oxidativo intracelular, determinado por marcação com DHE (Fig. 5.13). O DHE tem mostrado ser mais sensível ao O_2^- do que a outras espécies reactivas de oxigénio (ROS) [Budd *et al.*, 1997]. No geral, 24 h após tratamento dos miócitos cardíacos com ambas as soluções de vanadato (20 μ M vanádio total) verificou-se uma diminuição na produção de O_2^- de cerca de $70 \pm 5\%$, não se registando diferenças significativas entre os tratamentos com a solução de decavanadato ou metavanadato.

No entanto, tem sido descrito que a mitocôndria desempenha um importante papel na produção de ROS em cardiomiócitos viáveis [Aon *et al.*, 2003]. Confirmou-se esta hipótese, marcando as culturas de cardiomiócitos com H_2DCFDA , uma sonda para ROS com menor especificidade que o DHE [Keller *et al.*, 2004]. O padrão de fluorescência intracelular observado após oxidação da H_2DCFDA nos cultivos de cardiomiócitos demonstrou inequivocamente a implicação da mitocôndria na produção de ROS, devido à sobreposição da localização da fluorescência intracelular da sonda com a localização espacial da fluorescência do marcador de potencial da membrana mitocondrial, JC-1 (Fig. 5.14). Esta constatação corrobora os resultados obtidos por Swift e Sarvazyan [2006], com o marcador mitocondrial *MitoTracker Red*, que demonstraram que, como sonda para detecção de stresse oxidativo no músculo cardíaco, a H_2DCFDA apresenta uma localização preferencial na fluorescência da oxidação do marcador na mitocôndria. Comprovou-se também que, o tratamento dos cardiomiócitos com 5 μ M FCCP, um agente eficaz na despolarização da mitocôndria de cardiomiócitos [Brennan *et al.*, 2006], induz um bloqueio de aproximadamente 90% na taxa de oxidação da H_2DCFDA intracelular.

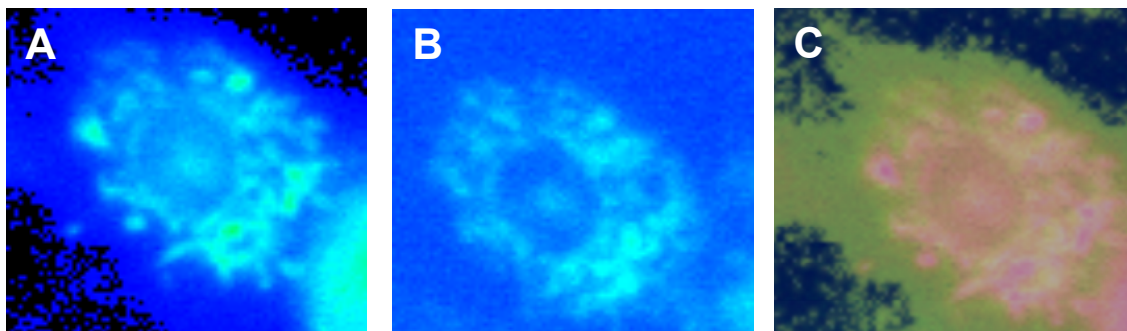


Figura 5.14 – Localização da produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em cardiomiócitos marcados com 10 μM H_2DCFDA (A), 2 μM JC-1 (B) e sobreposição das duas imagens (C), denotando produção de ROS (maioritariamente peróxidos de hidrogénio) na mitocôndria.

O O_2^- é um produto da redução de um electrão do oxigénio molecular, e como tal, este efeito antioxidante observado na presença das espécies decaméricas e monoméricas de vanadato está de acordo com a inibição do consumo de oxigénio induzida por ambos os oligovanadatos previamente registada na mitocôndria hepática e cardíaca [Soares *et al.* 2007b; 2007c]. Deste modo, e uma vez que se observa o mesmo “anel” de fluorescência em torno do núcleo (Fig.5.14) que o registado nos estudos de despolarização da membrana mitocondrial, pode-se sugerir que a diminuição da produção de ROS é devida à inibição da respiração mitocondrial promovida pelas soluções de vanadato, tal como anteriormente referido (Secção 4.3.4.) [Soares *et al.*, 2007b; 2007c]. Um decréscimo na quantidade de O_2^- formado irá por sua vez diminuir a produção de H_2O_2 , visto o O_2^- ser considerado o seu precursor metabólico [Chance *et al.*, 1979].

5.3.10. Determinação do potencial da membrana mitocondrial de cardiomiócitos tratados com vanadato

A manutenção do potencial da membrana mitocondrial é essencial para a manutenção e sobrevivência de células com elevados requerimentos energéticos, tais como os cardiomiócitos. O potencial da membrana mitocondrial desempenha uma função principal na modulação da acumulação e libertação de cálcio pela mitocôndria em miócitos de ventrículo de rato [Saotome *et al.*, 2005]. Adicionalmente, a despolarização mitocondrial, com o protonóforo FCCP, resultou numa elevada diminuição na produção de ROS pelos cardiomiócitos (Secção 5.3.9.).

Neste estudo, o potencial da membrana mitocondrial foi inicialmente determinado em miócitos ventriculares marcados com o indicador fluorescente JC-1. As imagens de cardiomiócitos marcados com JC-1 (Fig. 5.15) mostraram uma heterogeneidade na marcação das células Controlo, com zonas do citoplasma exibindo fluorescência vermelha (mitocôndrias polarizadas) e verde (mitocôndrias despolarizadas), em simultâneo na mesma célula (Fig. 5.15A). Note-se que, a fluorescência vermelha foi detectada maioritariamente em estruturas granulares de aspecto arredondado distribuídas pelo citoplasma, facto consistente com a localização das mitocôndrias. A fluorescência verde apresentou o mesmo padrão de distribuição, ainda que, no geral, exibisse uma imagem mais difusa, sugerindo também uma distribuição extra-mitocondrial. A sobreposição das imagens de fluorescência vermelha e verde revelou uma elevada extensão coincidente (coloração amarelo-alaranjada). Um reduzido número de mitocôndrias exibiu unicamente fluorescência verde, sendo mais visível nas áreas de citoplasma em redor do núcleo. O tratamento dos cardiomiócitos; durante 24 h, com 1 μM espécies decaméricas (10 μM vanádio total) induziu um efeito drástico na fluorescência vermelha, que se tornou mais ténue (Fig. 5.15B). Ao contrário,

na fluorescência verde registou-se um aumento ligeiro, mas significativo, da intensidade de fluorescência, sem se verificarem alterações na sua distribuição.

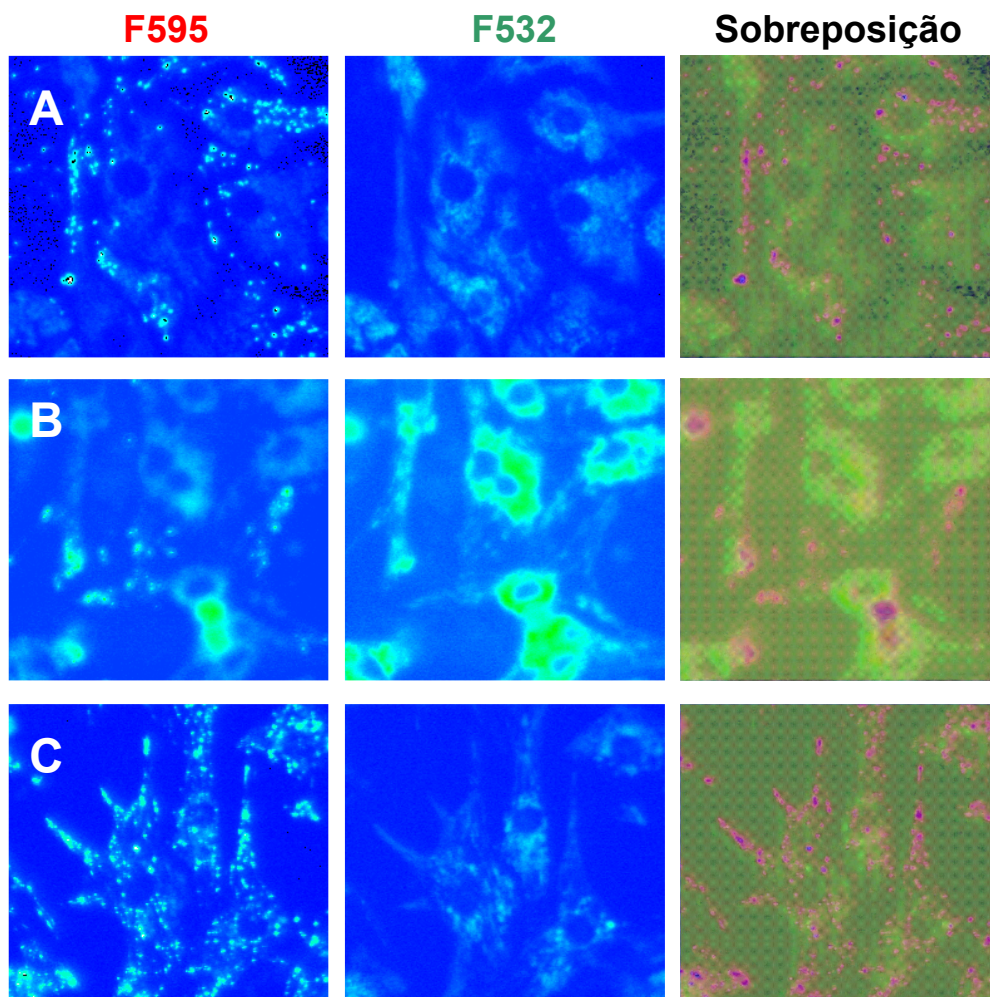


Figura 5.15 – Efeito das soluções de decavanadato (B) e metavanadato (C) na fluorescência de cardiomiócitos marcados com JC-1. Os painéis da esquerda e centro representam imagens de fluorescência da sonda agregada (vermelho) e do monómero (verde), respectivamente, no mesmo campo de cultivo; os painéis da direita representam a sobreposição das duas imagens anteriores, nesta situação, a coloração amarelo/laranja-avermelhado indica a co-localização dos sinais de fluorescência vermelha e verde.

Como resultado, a sobreposição das imagens evidenciou que apenas algumas mitocôndrias exibiram fluorescência laranja, após o tratamento com espécies decaméricas de vanadato, apresentando a maioria fluorescência amarelo-esverdeada ou

verde. Obtiveram-se resultados semelhantes com a espécie monomérica de vanadato (Fig. 5.15C), ainda que com concentrações superiores de vanadato (20 a 50 μM).

Devido à elevada heterogeneidade observada nos cardiomiócitos marcados com JC-1 (Fig. 5.16), recorreu-se à marcação dos miócitos com TMRE para uma quantificação mais fiável dos efeitos promovidos pelo vanadato decamérico e monomérico na despolarização da membrana mitocondrial.

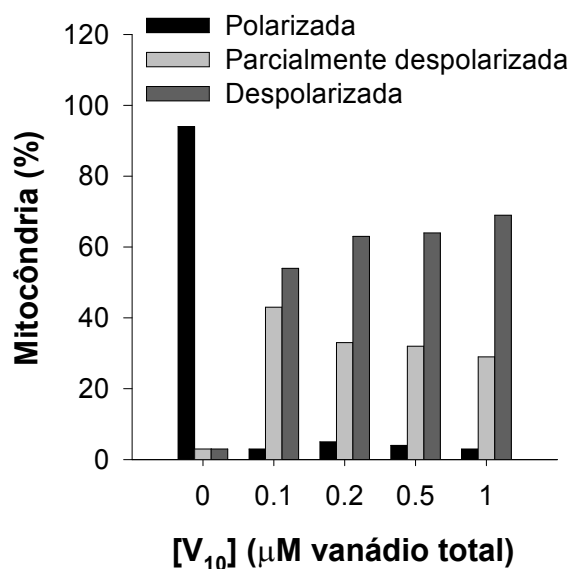


Figura 5.16 – Quantificação (média \pm desvio) do número de *pixels* coloridos das imagens de sobreposição, tal como apresentado na Fig. 5.15 ($n \geq 100$ células, ensaios realizados em triplicado). Os *pixels* vermelhos foram seleccionados a partir de mitocôndrias polarizadas, os amarelo-alaranjados de mitocôndrias parcialmente despolarizadas e os *pixels* verdes de mitocôndrias despolarizadas. *Significativamente diferente do Controlo ($p < 0.05$).

Os cardiomiócitos marcados com TMRE exibiram uma resposta mais homogênea às soluções de decavanadato e metavanadato (Fig. 5.17) e a dependência da média da fluorescência do TMRE em função da concentração das espécies oligoméricas de vanadato (Fig. 7.18), demonstraram claramente que após 24 h de incubação, ambas as espécies oligoméricas apresentam uma correlação positiva entre a concentração de

vanádio e a indução de despolarização da mitocôndria. A incubação dos cardiomiócitos com as soluções de decavanadato e metavanadato induz um colapso do potencial da membrana mitocondrial com o mesmo valor de IC_{50} ($6.5 \pm 1 \mu\text{M}$ vanádio total) para ambas as espécies oligoméricas ($0.65 \pm 0.1 \mu\text{M}$ vanadato decamérico ou $6.5 \pm 1 \mu\text{M}$ vanadato monomérico). Deste modo, o valor de IC_{50} estimado para a despolarização da membrana mitocondrial induzida por vanadato é apenas ligeiramente inferior que o valor obtido para a perda de 50% de viabilidade celular na presença de ambas as soluções de vanadatos ($LD_{50} = 10 \mu\text{M}$ vanádio total). Verifica-se também que, para concentrações até $2 \mu\text{M}$ vanádio total, após 24 h de tratamento, as soluções de vanadato utilizadas (decavanadato e metavanadato) não produzem uma despolarização significativa das mitocôndrias.

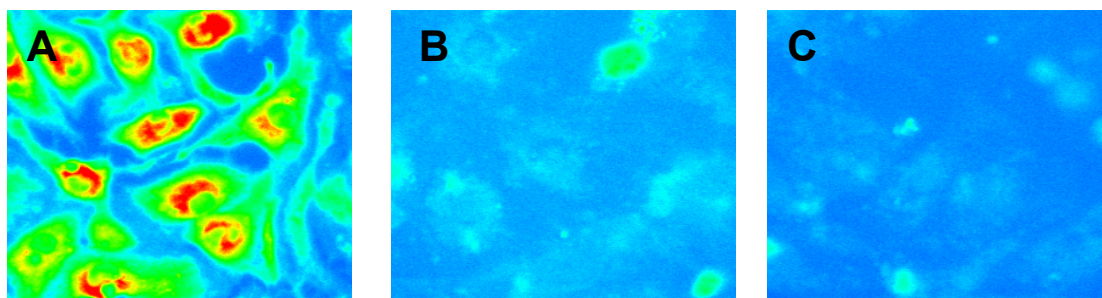


Figura 5.17 – Efeito das soluções de vanadato na fluorescência de cardiomiócitos marcados com TMRE: imagens representativas de cardiomiócitos Controle (A) e após 24 h de tratamento com $20 \mu\text{M}$ (vanádio total) de vanadato decamérico (B) e monomérico (C).

Ambas as sondas, TMRE e JC-1, têm sido usadas para monitorizar o colapso do potencial da membrana mitocondrial em culturas celulares [Mathur *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 2001]. Os resultados obtidos com a marcação com JC-1 sugerem que o vanadato decamérico apresenta ser um agente despolarizador da mitocôndria mais potente que o vanadato monomérico, no entanto, os resultados obtidos com TMRE não

indicam diferenças significativas entre a exposição à mesma concentração de vanádio total, sob a forma de vanadato decamérico ou monomérico [Soares *et al.*, 2007d].

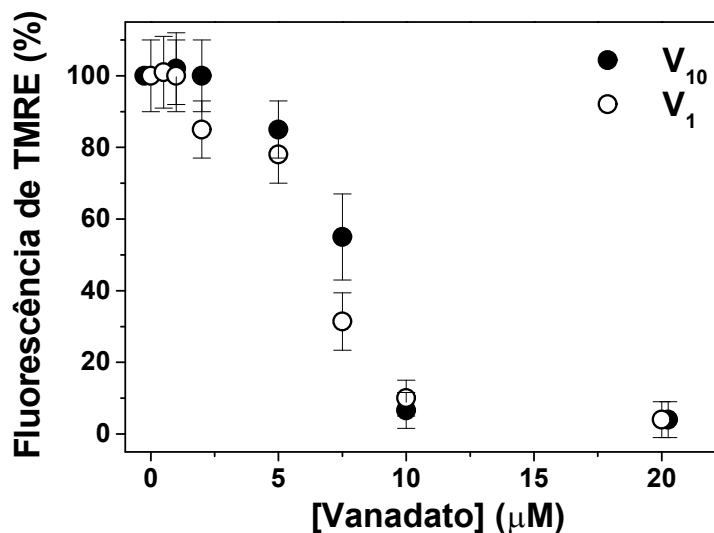


Figura 5.18 – Variação da intensidade de fluorescência das células marcadas com TMRE em cardiomiócitos previamente tratados, durante 24 h, com espécies decaméricas (●) e monoméricas (○) de vanadato. Os resultados representam a média (média ± desvio) dos ensaios em triplicados ($n \geq 100$ células).

Como as disfunções mitocondriais podem ser letais para células cujos metabolismos apresentem elevadas exigências energéticas – tais como os cardiomiócitos – e foi previamente demonstrado que a despolarização mitocondrial associada à abertura do poro de transição mitocondrial é um evento precoce de morte celular [Duchen *et al.*, 1993; Ganote e Armstrong, 2003], o efeito da incubação com soluções de decavanadato e metavanadato no potencial da membrana mitocondrial dos cardiomiócitos merece ser avaliado.

5.4. CONCLUSÕES

No decorrer do presente estudo, apuraram-se as condições óptimas de cultivo para a obtenção de culturas primárias de cardiomiócitos viáveis de ratos recém-nascidos (1-2 dias) e com uma contaminação reduzida de fibroblastos (aproximadamente 10%), nomeadamente: uso de gelatina para o tratamento das placas de cultivo, 2 h de pré-plaqueamento e a utilização de 20 μ M Ara-C, para inibir a proliferação de células não musculares.

Os cultivos primários de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos apresentaram elevada pureza (aproximadamente 80% de cardiomiócitos na cultura), verificando-se um consenso na percentagem de miócitos estimada por contagem celular, imunodeteção da cadeia pesada de miosina e deteção imunohistoquímica de fibroblastos, comprovando que qualquer uma das técnicas é adequada à avaliação do grau de pureza dos cultivos. A percentagem de cardiomiócitos viáveis (apresentando contracções ritmadas e em sincronismo) das preparações utilizadas encontrou-se de acordo com a gama de valores indicados por outros autores (80-90%) [Chlopcikova *et al.*, 2001]. No entanto, o método de exclusão de células não viáveis com azul de tripano não se mostrou adequado na identificação de células não viáveis, tendo sido identificadas como viáveis as células arredondadas de maiores dimensões.

Os cardiomiócitos foram facilmente identificados pela capacidade de se contraírem espontânea e sincronizadamente. Nas condições do presente estudo, tal característica foi observada a partir das 24 h de cultivo, enquanto que os resultantes estudo referem o início das contracções ritmadas após 3 DIV [Chlopcikova *et al.*, 2001]. Apesar de se ter confirmado que a proteína dos filamentos intermédios do citoesqueleto, vimentina, é indicada para a deteção imunohistoquímica de fibroblastos (resultados positivos nos testes realizados com fibroblastos Swiss 3T3), a morfologia característica

dos miócitos – núcleos esféricos centralmente localizados e rodeados por abundante citoplasma repleto de miofibrilhas [Lascano *et al.*, 1988] – permitiu também uma rápida distinção entre as células contaminantes observadas (fibroblastos, com núcleos fusiformes e ausência de miofibrilhas) e os miócitos cultivados.

Os resultados apresentados nesta secção, mostram claramente que a exposição a concentrações micromolares de soluções de vanadato é prejudicial à sobrevivência dos cardiomiócitos: uma exposição de 24 h de miócitos cardíacos de ventrículo de rato é suficiente para induzir uma morte celular com um valor de IC_{50} de aproximadamente 10 μ M vanádio total. Verificando-se, no entanto, a indução de uma morte celular relevante para concentrações submicromolares de vanadato decamérico. Deste modo, os resultados agora apresentados reforçam o potencial risco inerente ao uso de compostos de vanádio como suplemento desportivo para atletas [Gerrard *et al.*, 1993; Fawcett *et al.*, 1997] e também na quimioterapia de tumores multi-resistentes, como sugerido por alguns autores [Stern *et al.*, 1993; Colin *et al.*, 1994; Cruz *et al.*, 1995].

A ausência de activação da caspase-3 nos cardiomiócitos, durante a morte celular induzida por vanadato, permite concluir que a morte celular por apoptose não contribui significativamente para a morte celular registada. Apurou-se também que a incubação dos cardiomiócitos com soluções de decavanadato e metavanadato induz alterações nos principais marcadores bioenergéticos desta células: (i) concentração basal de Ca^{2+} citosólico e (ii) produção de anião superóxido pela mitocôndria.

Neste estudo registou-se, 24 h após incubação com qualquer uma das soluções de vanadato utilizadas, um aumento na $[Ca^{2+}]_i$, resultante do esvaziamento parcial das principais reservas intracelulares de Ca^{2+} nos cardiomiócitos. Aparentemente, o vanadato monomérico afecta a acumulação de cálcio, inibindo a actividade da Ca^{2+} -ATPase, enquanto que adicionalmente o vanadato decamérico parece bloquear os

canais de libertação de cálcio sensíveis ao IP₃, exibindo um modo de acção semelhante à heparina [Ehrlich *et al.*, 1994]. Estudos anteriores, demonstraram que a acumulação de vanádio na mitocôndria é superior à registada noutros organelos subcelulares do tecido cardíaco e hepático de animais injectados com soluções de decavanadato e metavanadato [Aureliano *et al.*, 2002; Aureliano e Gândara, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a]. Nos cardiomiócitos, a mitocôndria é a principal reserva de Ca²⁺ intracelular [Mackenzie *et al.*, 2004], funcionando também como principal local de produção de anião superóxido e ROS nestas células [Zorov *et al.*, 2006].

De facto, no presente estudo, descreve-se que 24 h após incubação dos cardiomiócitos com 20 µM (vanádio total) espécies decaméricas e monoméricas de vanadato a taxa de produção de O₂⁻ nos miócitos cardíacos é apenas 30 ± 5% da registada nas células Controlo, sendo este resultado consistente com a inibição do consumo de oxigénio, registada em mitocôndrias hepáticas de rato e cardíacas de peixe, após adição de soluções de decavanadato e metavanadato ao tampão de respiração [Soares *et al.*, 2007b; 2007c].

Os resultados obtidos com a marcação com JC-1 sugerem que o vanadato decamérico apresenta ser um agente despolarizador da mitocôndria mais potente que o vanadato monomérico, apesar dos resultados obtidos com TMRE não indicarem diferenças significativas entre a exposição à mesma concentração de vanádio total, sob a forma de vanadato decamérico ou monomérico. No entanto, crê-se a despolarização da membrana mitocondrial esteja na origem do aumento do Ca²⁺ basal observado no citosol e na exaustão parcial das reservas intracelulares de Ca²⁺, nomeadamente mitocondriais, após incubação dos cardiomiócitos com as soluções de decavanadato e metavanadato, uma vez que a despolarização da membrana mitocondrial leva a uma libertação do Ca²⁺ das mitocôndrias [O'Reilly *et al.*, 2004] e também do retículo

endoplasmático dos cardiomiócitos, através do canal de cálcio sensível a IP_3 [Poindexter *et al.*, 2001]. Os resultados obtidos, sugerem então, que a despolarização da membrana mitocondrial é um evento fundamental na morte celular induzida por decavanadato e metavanadato, que se torna mais evidente após 24 h de incubação com 10 μ M vanádio total (1 μ M vanadato decamérico ou 10 μ M vanadato monomérico) [Soares *et al.*, 2007d].

Conclui-se então que, a exposição a concentrações micromolares de vanadato (na forma de soluções de decavanadato ou metavanadato) induz morte celular em cardiomiócitos de ventrículos de ratos recém-nascidos através de um mecanismo de toxicidade semelhante, levando à despolarização da membrana mitocondrial e resultando em morte celular necrótica.

Capítulo 6

CONCLUSÕES GERAIS



Capítulo 6

CONCLUSÕES GERAIS

6.1. CONCLUSÃO

São escassos os estudos biológicos *in vivo* que consideram a contribuição da espécie decamérica de vanadato para os efeitos biológicos promovidos pelo vanádio. Desde 1999, o nosso grupo de investigação tem desenvolvido estudos sobre a administração *in vivo* de diferentes soluções de vanadato (decavanadato e metavanadato) no sentido de compreender a contribuição do vanadato decamérico para os efeitos tóxicos promovido pelo vanadato [Aureliano *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares e Aureliano, 2007]. No presente estudo, apresentam-se resultados que evidenciam o facto da espécie decamérica de vanadato apresentar diferentes vias de acção e induzir efeitos distintos dos promovidos pelo monovanadato no tecido cardíaco, não só *in vitro*, mas também *in vivo*.

No entanto, o estudo dos efeitos dos oligovanadatos nos sistemas biológicos pode ser comparado a um *iceberg*: existe uma parte invisível, que provavelmente não é a mais interessante, mas é certamente a mais importante [Aureliano e Gândara, 2005]. Deste modo, é de extrema importância a correcta caracterização das espécies de vanadato presentes nas condições experimentais adoptadas e das suas interacções com o sistema em estudo no sentido de se estabelecer uma relação entre a(s) espécie(s) de vanadato presente(s) nas soluções usadas e os efeitos promovidos por estas nos sistemas biológicos em estudo.

6.1.1. A ocorrência da espécie decamérica de vanadato e a sua estabilidade em solução

A ocorrência em simultâneo de diferentes espécies oligoméricas de vanadato em equilíbrio, nas soluções aquosas, justifica a importância de se proceder a uma análise prévia da composição oligomérica das soluções de decavanadato e metavanadato nas condições experimentais dos ensaios a realizar.

Uma análise por espectroscopia de UV/visível (UV/vis) e de ressonância magnética nuclear de ^{51}V (^{51}V -RMN) das soluções de vanadato diluídas nos meios de ensaio utilizados no presente estudo mostrou claramente que, contrariamente às espécies orto e metaméricas (V_1 , V_2 , V_4 e V_5), que se interconvertem muito rapidamente (na ordem dos milissegundos), a espécie decamérica de vanadato (V_{10}) apresenta uma cinética de desoligomerização lenta, com um tempo de meia-vida suficientemente longo (na ordem das horas), permitindo deste modo o estudo dos seus efeitos não só *in vitro* como também *in vivo* [Soares *et al.*, 2006; 2007a; 2007b; 2007c; 2007d]. Esta análise revelou também, após diluição das soluções de decavanadato nos respectivos meios de ensaio, a coexistência de espécies monoméricas e decaméricas de vanadato, pelo que os efeitos putativos da primeira deverão ser deduzidos e, posteriormente, subtraídos, sempre que se pretenda monitorizar os efeitos da segunda. No entanto, nas condições experimentais do presente estudo e para o intervalo de concentrações utilizado, a razão das espécies decamérica:monomérica aumenta linearmente com a concentração de vanádio total, sendo que a concentração de vanadato monomérico permanece aproximadamente constante [Ramos *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2007a].

Apesar de estar descrito que na presença de 3 mM de glutathiona (GSH) – aproximadamente a concentração de GSH existente na maioria dos tecidos – a totalidade do vanadato existente a pH fisiológico é reduzido a vanadilo [Macara *et al.*,

1980], os estudos de detecção de formas reduzidas de vanádio por ressonância paramagnética electrónica (RPE), na presença de 5 mM GSH, falharam na detecção e quantificação do conteúdo em vanadilo, nas condições experimentais do presente estudo (apesar de se ter assinalado a formação de produtos da redução de vanadato decamérico, por espectroscopia UV/vis, tal como anteriormente descrito por Ramasarma *et al.* [1981] e Patole *et al.* [1986], indicando que nas condições impostas pelos protocolos adoptados, a concentração da espécie vanadilo é de <10 µM (abaixo do limite de detecção do equipamento de RPE).

De facto, a caracterização da solução de decavanadato por ⁵¹V-RMN, na presença da mesma concentração de GSH, demonstrou um decréscimo na intensidade dos picos dos sinais do vanadato decamérico, devido à decomposição das espécies decaméricas de vanadato (tal como observado por espectroscopia UV/vis), sendo que a eventual presença de espécies reduzidas de vanádio em solução iria induzir um alargamento dos sinais de RMN, para além de um aumento da razão sinal/ruído (não observado).

6.1.2. A contribuição da espécie decamérica para os efeitos induzidos *in vivo* pelo vanadato

Apesar de a maioria dos estudos biológicos não ter em consideração a contribuição da espécie decamérica de vanadato, provou-se neste estudo que devido à sua longa estabilidade a pH fisiológico o vanadato decamérico não se decompõe totalmente em vanadato monomérico, induzindo alterações nos marcadores de stresse oxidativo distintas das promovidas pelo monovanadato [Soares *et al.* 2006; 2007a; 2007d; Soares e Aureliano, 2007].

Sugere-se no presente estudo que, o stresse oxidativo induzido pela espécie decamérica de vanadato não resulta directamente da indução da produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), mas sim da promoção da formação de anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o que sugere que a peroxidação dos lipídios das membranas registada *in vivo* não ocorre por estimulação de reacções *Fenton*, mas através de reacções *Haber-Weiss* [Soares *et al.*, 2007a; 2007d]. As alterações registadas na actividade de enzimas antioxidantes mitocondriais, na peroxidação lipídica e actividade pró-oxidante, após administração *in vivo* da solução de decavanadato, sugere que os efeitos da espécie decamérica de vanadato estejam relacionados com o aumento de vanádio celular registado. De facto, concluiu-se que a mitocôndria cardíaca é um alvo subcelular da acumulação de vanádio e que essa acumulação parece depender da presença de espécies decáméricas de vanádio [Soares *et al.*, 2006; 2007a].

Mais ainda, concluiu-se que as respostas do sistema antioxidante dependem da concentração total de vanádio administrada, da via de exposição e/ou varia entre diferentes espécies de peixe, para além de depender da composição oligomérica das soluções de vanadato [Soares *et al.*, 2007a; 2007d]. O uso de peixes como modelo biológico em estudos toxicológicos parece adequado ao estudo dos efeitos da administração de soluções de vanadato, não só devido à sua temperatura fisiológica, que confere estabilidade ao vanadato decamérico, mas também devido à sua elevada sensibilidade à toxicidade por metais [Palace e Klaverkamp, 1993].

Em virtude dos efeitos de uma exposição *in vivo* ao vanadato decamérico diferirem dos promovidos pelo monovanadato – devido a diferentes reactividades, resultantes dos diferentes mecanismos de acção dos vários oligovanadatos – evidencia-se a importância de ter em atenção a contribuição da espécie decamérica de vanadato

para a avaliação e interpretação dos efeitos da toxicidade *in vivo* do vanadato nos sistemas biológicos.

6.1.3. A mitocôndria como alvo da toxicidade das espécies oligoméricas de vanadato

Os estudos *in vivo* realizados anteriormente [Aureliano *et al.*, 2002; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a] haviam sugerido a mitocôndria como alvo subcelular do vanadato, quando este é administrado na forma decamérica. Os estudos *in vitro*, realizados em mitocôndrias isoladas de coração de peixe e fígado de rato, confirmaram estas evidências e mostraram que a espécie decamérica de vanadato é cerca de 10 a 100 vezes mais potente que o vanadato monomérico, como agente promotor de despolarização da membrana mitocondrial e como inibidor do consumo de oxigênio pela mitocôndria cardíaca [Soares *et al.*, 2007b] e hepática [Soares *et al.*, 2007c]. Verificou-se também que, o antibiótico ciclosporina A (CsA) – inibidor do poro de transição da membrana mitocondrial (MMTP) [Ganote e Armstrong, 2003; Sharov *et al.*, 2005] – não é eficaz na protecção da mitocôndria contra a despolarização da membrana mitocondrial induzida pelas oligoméricas de vanadato, assim como também não é capaz de promover a sua repolarização, concluindo-se deste modo que, em mitocôndrias isoladas, a despolarização da membrana mitocondrial induzida pelo vanadato decamérico não está relacionada com a abertura do MMTP.

Para além de induzir a despolarização da membrana mitocondrial, o vanadato decamérico compromete também a repolarização da membrana induzida por concentrações fisiológicas de GSH. Uma vez que, a hiperpolarização da membrana mitocondrial tem sido descrita como uma resposta mitocondrial precoce à apoptose [Zurgil *et al.*, 2002; Matarrese *et al.*, 2003], os resultados obtidos no presente estudo

sugerem que de futuro se possa investigar a utilidade do vanadato decamérico como agente anti-apoptótico.

Concluiu-se que a espécie decamérica de vanadato afecta fortemente a bioenergética mitocondrial, aparentemente, através de alterações no estado oxido-reduzido do citocromo *b* (complexo III da cadeia respiratória). Resumindo, o vanadato decamérico bloqueia a cadeia transportadora de electrões da mitocôndria através de mecanismos de toxicidade diferentes dos utilizados pelo vanadato monomérico e contribui, pelo menos em parte, para os efeitos biológicos do vanadato na mitocôndria.

6.1.4. A indução de morte necrótica em cardiomiócitos por exposição ao vanadato

As disfunções mitocondriais podem ser letais para as células cujos metabolismos apresentem elevadas exigências energéticas – tais como os cardiomiócitos – e, uma vez que foi anteriormente demonstrado que, a despolarização mitocondrial associada à abertura do MMTP é um evento precoce de morte celular [Duchen *et al.*, 1993; Ganote e Armstrong, 2003], o efeito dos diferentes oligavanadatos no potencial da membrana mitocondrial destas células merece ser avaliado.

No presente estudo mostra-se que, a exposição a concentrações micromolares de vanadato é prejudicial à sobrevivência de cardiomiócitos (IC₅₀ de ~10 µM, após 24 h de exposição), verificando-se, no entanto, a indução de uma morte celular relevante para concentrações nanomolares de vanadato decamérico. Deste modo, os resultados apresentados reforçam o potencial risco inerente ao uso de compostos de vanádio como suplemento desportivo para atletas [Gerrard *et al.*, 1993; Fawcett *et al.*, 1997] e também na quimioterapia de tumores multi-resistentes, como sugerido por alguns autores [Stern *et al.*, 1993; Colin *et al.*, 1994; Cruz *et al.*, 1995].

Devido a não se ter registado um efeito protector da CsA nas culturas de cardiomiócitos tratadas com as soluções de vanadato, sugere-se que o efeito da espécie decamérica de vanadato na mitocôndria ocorre por acção directa neste organelo, facto corroborado por estudos anteriores que referem que a acumulação na mitocôndria é superior à registada noutros organelos subcelulares do tecido cardíaco e hepático [Aureliano *et al.*, 2002; Aureliano e Gândara, 2005; Gândara *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006; 2007a].

A perda de viabilidade celular, monitorizada com iodeto de propídio, a ausência de activação da caspase-3 e as alterações observadas na carga energética destas células revelaram que a morte celular registada na presença de ambas as espécies oligoméricas de vanadato é de origem necrótica. Apurou-se também que, os oligovanadatos induzem alterações nos principais marcadores bioenergéticos dos miócitos cardíacos, nomeadamente na concentração de Ca^{2+} intracelular e na produção de anião superóxido pela mitocôndria. Nos cardiomiócitos, a mitocôndria é a principal reserva de Ca^{2+} intracelular [Mackenzie *et al.*, 2004], funcionando também como principal local de produção de O_2^- nestas células [Zorov *et al.*, 2006]. De facto, no presente estudo, descreve-se uma inibição da produção de O_2^- em miócitos tratados com vanadato, estando este resultado de acordo com a inibição do consumo de oxigénio registada em mitocôndrias isoladas [Soares *et al.*, 2007b; 2007c]. Para além da já descrita inibição da bomba de cálcio do RS induzida por vanadato [Aureliano e Madeira, 1994; 1998], a espécie decamérica de vanadato parece induzir um efeito semelhante à heparina, inibindo a saída de cálcio dos organelos intracelulares através do bloqueio dos canais sensíveis ao IP_3 [Ehrlich *et al.*, 1994].

Conclui-se deste modo que, a exposição a concentrações micromolares de ambas as espécies oligoméricas de vanadato (decamérica e monomérica) induz a perda de

viabilidade celular em cardiomiócitos de ventrículos de ratos recém-nascidos através de mecanismos de toxicidade semelhantes, levando à despolarização da membrana mitocondrial e resultando em morte celular necrótica.

6.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma vez que, nos últimos anos, se conseguiu provar que uma vez formada, em condições ácidas, a espécie decamérica de vanadato em solução aquosa apresenta um tempo de meia-vida suficientemente longo para permitir o estudo dos seus efeitos *in vitro* e *in vivo* nos sistemas biológicos, é de especial interesse não descartar a possibilidade da ocorrência da formação de vanadato decamérico no meio intracelular [Aureliano e Gândara, 2005], após a administração de compostos de vanádio, usualmente utilizados para fins terapêuticos (mimetizar a da acção da insulina, no tratamento da diabetes, e na quimioterapia de tumores multi-resistentes) e como suplementos desportivos.

No seguimento dos estudos agora apresentados, seria interessante aprofundar os efeitos inotrópicos e hipertróficos dos diferentes oligovanadatos em resultado da ocorrência de alterações na homeostasia de Ca^{2+} das células cardíacas, através do estudo de eventuais alterações no seu transporte e, deste modo, tentar relacionar os seus efeitos com problemas cardiovasculares. Deste modo, será importante apurar a eventual ligação do vanadato decamérico ao canal de Ca^{2+} sensível ao IP_3 , nas condições experimentais dos estudos celulares, tal como sugerido por Fohr *et al.*, [1991]. Uma vez que, o vanádio tem um longo período de permanência nos organismos, seria igualmente interessante, tentar estabelecer uma eventual relação entre dietas ricas em vanádio e incidência de distúrbios cardiovasculares no Homem. Deste modo, será igualmente interessante abordar os efeitos das diferentes espécies oligoméricas de vanadato na

contração do músculo cardíaco, quando se sabe que a formação de um intermediário miosina-MgADP·V₁₀ previne a alteração conformacional que induz o processo de transdução de energia, ao impedir a troca de ADP por ATP e conseqüentemente o início de um novo ciclo contráctil [Tiago *et al.*, 2002; 2004a; 2004b].

Com base num estudo recente, em que os oxovanadatos são apresentados como uma nova sonda para o estudo das interfaces lípido-água [Crans *et al.*, 2006], surge também a possibilidade de se administrarem *in vivo* espécies oligoméricas de vanadato inseridas em micelas (em ambiente ácido) e avaliar se o incremento da estabilidade da espécie decamérica nestas condições (que se crê ser na ordem dos dias) influencia os efeitos promovidos por esta espécie de vanadato.

O uso do vanadato decamérico, para o estudo da sua contribuição nos efeitos biológicos promovidos pelo vanádio, apresenta ainda muitas áreas por aprofundar, e a existência de alguns estudos que apresentam uma acção antioxidante deste oligovanadato [Soares *et al.*, 2007b; 2007c] não excluiu uma eventual função terapêutica desta espécie de vanadato ainda por apurar.

Capítulo 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Capítulo 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, S.A. (1998). Water quality criteria for vanadium with reference to impact studies on the freshwater teleost *Nuria denricus* (Hamilton). In: Nriagu, J.O. (Ed.). Vanadium in the environment, Part 1: Chemistry and Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 125-129.
- Abu-Shakra, S.; Alhalabi, M.S.; Nachtman, F.C.; Schemidt, R.A.; Brusilow, W.S. (1997). Anabolic steroids induce injury and apoptosis of differentiated skeletal muscle. *J. Neurosci. Res.* 47: 186-197.
- Akera, T.; Kyosuke, T.; Keisuke, T. (1983). Cardiac Actions of Vanadium. *Fed. Proc.* 42: 2984-2988.
- Aksnes, A.; Njaa, L.R. (1981). Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 893-896.
- Alface, J.I.S. (1997). Purificação e caracterização de proteínas. In: Halpern, M.J. (Ed.). *Bioquímica*. Lidel, Edições Técnicas, pp. 93-111.
- Alloway, B.; Ayres, D. (1993). *Chemical principles of environmental pollution*. Black Academic & Professional, Oxford, 395 p.
- Al-Saleh, I.; Shinwari, N. (2002). Preliminary report on the levels of elements in four fish species from the Arabian Gulf of Saudi Arabia. *Chemosphere* 48: 749-755.
- Amado, A.; Aureliano, M.; Ribeiro-Claro, P.J.; Teixeira-Dias, J. (1993). Combined Raman and ^{51}V NMR spectroscopic study of vanadium (V) oligomerization in aqueous alkaline solutions. *J. Raman Spect.* 24: 669-703.

- Anke, M.; Illing-Günther, H.; Güntler, H.; Holzinger, S.; Jaritz, M.; Anke, S.; Schäfer, U. (2000). Vanadium – An essential element for animals and humans? In: Roussel, A.M.; Anderson, R.A.; Favrier, A.E. (Eds.). Trace elements in man and animals, 10. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 221-225.
- Aon, M.A.; Cortassa, S.; Marban, E.; O'Rourke, B. (2003). Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 278: 44735-44744.
- Arufe, M.I.; Arellano, J.; Moreno, M.J.; Sarasquete, C. (2004). Toxicity of a commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream (*Sparus aurata* L.) larvae: a comparison with the Microtox test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59: 209-216.
- Atli, G.; Alptekin, Ö.; Tükel, S.; Canli, M. (2006). Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143: 218-224.
- Auclair, C.; Voisin, E. (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald, R.A. (Ed.). Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press Inc., Boca Raton – Florida, pp. 123-132.
- Aureliano, M.; Gândara, R.M.C. (2005). Decavanadate effects in biological systems. *J. Inorg. Biochem.* 99: 979-985.
- Aureliano, M.; Joaquim, N.; Sousa, A.; Martins, H.; Coucelo, J.M. (2002). Oxidative stress in toadfish (*Halobatrachus didactylus*) cardiac muscle: Acute exposure to vanadate oligomers. *J. Inorg. Biochem.* 90: 159-165.
- Aureliano, M.; Madeira, V.M.C. (1994). Interactions of vanadate oligomers with sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1221: 259-271.
- Aureliano, M.; Madeira, V.M.C. (1998). Energy transduction mechanisms as affected by vanadium(V) species: Ca^{2+} -pumping in sarcoplasmic reticulum. In: Nriagu,

- J.O. (Ed.). Vanadium in the environment, Part 1: Chemistry and Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 333-357.
- Aureliano, M.; Soares, S.S.; Tiago, T.; Ramos, S.; Gutiérrez-Merino, C. (2007). Biological effects of decavanadate: muscle contraction, mitochondrial toxicity and *in vivo* oxidative stress. ACS Symposium Series, *in press*.
- Baran, E.J. (1998). Vanadium detoxification. In: Nriagu, J.O. (Ed.). Vanadium in the environment, Part 2: Health effects. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 318-345.
- Barbagallo, M.; Dominguez, L.J.; Resnick, L.M. (2001). Insulin-mimetic action of vanadate: role of intracellular magnesium. *Hypertension* 38: 701-704.
- Barceloux, D.G. (1999). Vanadium. *Clin. Toxicol.* 37: 265-278.
- Bay, B.H.; Sit, K.H.; Paramanatham, R.; Chan, Y.G. (1997). Hydroxyl free radicals generated by vanadyl [IV] induce cell blebbing in mitotic human Chang liver cells. *Biometals* 10: 119-122.
- Benov, L.; Fridovich, I. (1998). Growth in iron-enrich medium partially compensates *E. coli* for the lack of Mn and Fe SOD. *J. Biol. Chem.* 273: 10313-10316.
- Bers, D.M. (2000). Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ. Res.* 87: 275-281.
- Bers, D.M. (2001). Na/Ca exchange and the sarcolemmal Ca-pump. In: Bers, D.M. (Ed.). Excitation- contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp.133-160.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205.
- Bewers, J.; Barry, P.; MacGregor, D. (1987). Distribution of cadmium in the environment. In: Nriagu, J.O.; Sprague, J. (Eds.). Cadmium in the aquatic environment. John Wiley & Sons, Inc., New York., pp. 1-18.

- Bishayee, A.; Oinam, S.; Basu, M.; Chatterjee, M. (2000). Vanadium chemoprevention of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinogenesis: probable involvement of representative hepatic phase I and II xenobiotic metabolising enzymes. *Breast Cancer. Res. Treat.* 63: 133-145.
- Blondel, B.; Roijem, I.; Cheneval, J.P. (1971). Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia* 27: 356-358
- Borgen, O.; Mahamoud, R.; Skauvik, I. (1977). A reinvestigation of the hydrolysis of pentavalent vanadium. *Acta Chim. Scand. A* 31: 329-339.
- Borges, G.; Mendonça, P.; Joaquim, N.; Aureliano, M.; Coucelo, J.M. (2003). Acute effects of vanadate oligomers on heart, kidney, and liver histology in the Lusitanian toadfish (*Halobatrachus didactylus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45: 415-422.
- Boscolo, P.; Carmignani, M.; Volpe, A.; Felaco, M.; del Rosso, G.; Porcelli, G.; Giuliano, G. (1994). Renal toxicity and arterial hypertension in rats chronically exposed to vanadate. *Occup. Environ. Med.* 51: 500-503.
- Boveris, A.; Cadenas, E. (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* 54: 311-314.
- Bowman, B.J.; Mainzer, S.E.; Allen, K.E.; Slayman, C.W. (1978). Effects of inhibitors on the plasma membrane and mitochondrial adenosine triphosphatases of *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* 512: 13-28.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Braunwald, E. (1994). Myocardial ischaemia, infarction, and failure: an odyssey. *Cardioscience* 5: 139-144.

- Brennan, J.P.; Southworth, R.; Medina, R.A.; Davidson, S.M.; Duchen, M.R.; Shattock, M.J. (2006). Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of K_{ATP} channel activation. *Cardiovasc. Res.* 72: 313-321.
- Brilla, C.; Janicki, J.S.; Weber, K.T. (1991). Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ. Res.* 69: 107-115.
- Bryan, G.; Langston, W.; Hummerstone, L.; Burt, G. (1985). A guide of assessment of heavy-metal contamination in estuaries using biological indicators, 4. Marine Biology Association of the United Kingdom, Plymouth, 92 p.
- Budd, S.L.; Castilho, R.F.; Nicholls, D.G. (1997). Mitochondrial membrane potential and hydroethidine-monitored superoxide generation in cultured cerebellar granule cells. *FEBS Lett.* 415: 21-24.
- Byczkowski, J.Z.; Kulkarni, A.P. (1998). Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium. In: Nriagu, J.O. (Ed.). *Vanadium in the environment, Part 1: Chemistry and Biochemistry.* John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 235-263.
- Byczkowski, J.Z.; Zychlinski, L.; Tluczkiewicz, J. (1979). Interaction of vanadate with respiratory chain of rat liver and wheat seedling mitochondria. *Int. J. Biochem.* 10: 1007-1011.
- Cain, K.; Skilleter, D.N. (1987). Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: Snell, K.; Mullok, B. (Eds.). *Biochemical toxicology: a practical approach.* IRL Press, Oxford, pp. 217-254.
- Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. (1980). *Biophysical chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function.* W.H. Freeman and company, New York, pp. 481-525.

Referências bibliográficas

- Capella, L.S.; Alcantara, J.S.M.; Moura-Neto, V.; Lopes, A. G.; Capella, M.A.M. (2000). Vanadate is toxic to adherent-growing multidrug-resistant cells. *Tumour Biol.* 21: 54-62.
- Capella, L.; Gefé, M.; Silva, E.; Affonso-Mitidieri, E.; Lopes, A.; Rumjanek, V.; Capella, M. (2002). Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Arch. Biochem. Biophys.* 406: 65-72.
- Carmignani, M.; Sabbioni, E.; Boscolo, P.; Pietra, E.; Ripanti, G. (1989). Cardiovascular effects of long-term exposure to vanadate in rats. In: Anke, M.; Baumann, W. (Eds.). *Sixth Trace Element Symposium (Mo, V)*. University of Jena Press, Jena, pp.106-113.
- Carmignani, M.; Boscolo, P.; Volpe, A.R.; Togna, G.; Masciocco, L.; Preziosi, P. (1991). Cardiovascular system and kidney as specific targets of chronic exposure to vanadate in the rat: Functional and morphological findings. *Arch. Toxicol.* 14: 124-127.
- Carmignani, M.; Preziosi, P.; Del Carmine, R.; Porcelli, G.; Volpe, A.R. (1992a). Kallikrein-kinin, enkephalin, renin aldosterone and catecholamine systems in the vanadate (as vanadyl)-induced arterial hypertension. *Agents Actions* 38: 243-247.
- Carmignani, M.; Volpe, A.R.; Porcelli, G.; Boscolo, P.; Preziosi, P. (1992b). Chronic exposure to vanadate as factor of arterial hypertension in the rat: Toxicodynamic mechanisms. *Arch. Toxicol.* 15: 117-120.
- Carmignani, M.; Volpe, A.R.; Masci, O.; Boscolo, P.; Di Giacomo, F.; Grilli, A.; Del Rosso, G.; Felaco, M. (1996). Vanadate as a factor of cardiovascular regulation by interactions with the catecholamine and nitric oxide systems. *Biol. Trace Elem. Res.* 51: 1-12.
- Carmignani, M.; Volpe, A.; Sabbioni, E.; Felaco, M.; Boscolo, P. (1998). Vanadium and the cardiovascular system: Regulatory effects and toxicity, in: Nriagu, J.O. (Ed.). *Vanadium in the environment. Part 2: Health effects*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 181-219.

- Caroni, P.; Carafoli, E. (1981). The Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma. Characterization, calmodulin dependence, and partial purification. *J. Biol. Chem.* 256: 3263-3270.
- Castro, A. (1997). Validação de métodos em análise química. III Seminário de Validação e Qualidade no Laboratório Químico – UNICAM, Lisboa.
- Chakraborty, A.; Selvaraj, S.; Sudarshan, M.; Dutta, R.K.; Ghugre, S.S.; Chintalapudi, S.N. (2000). Modulatory role of vanadium on trace element profile in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. Sect. B* 170: 156-162.
- Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
- Chance, B.; Williams, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 17: 65-134.
- Chappell, J.B.; Hansford, R.G. (1972). Preparation of mitochondria from animal tissues and yeasts. In: Bernie, G.D. (Ed.). *Subcellular components: Preparation and fractionation*. Butterworth, London, pp. 77-91.
- Chasteen, N.D. (1983). The biochemistry of vanadium. *Struct. Bonding* 53: 105-138.
- Cheeseman, K.H. (1993). Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol. Aspects Med.* 14: 191-197.
- Chein, S. (1990). Cardiovascular molecular biology in health and disease. In: Chein, S. (Ed.). *Molecular biology of the cardiovascular system*. Lea and Febigar, Philadelphia, pp. 221-242.
- Chlopcikova, S.; Psotova, J.; Miketova, P. (2001). Neonatal rat cardiomyocytes – A model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed. Papers* 145: 49-55.

- Clairborne, A. (1985). Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.). Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton - Florida, pp. 283-284.
- Clark, R.J.; Rodnick, K.J. (1998). Morphometric and biochemical characteristics of ventricular hypertrophy in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Zool. 201: 1541-1552.
- Coan, C.; Scales, D.J.; Murphy, A.J. (1986). Oligovanadate binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. J. Biol. Chem. 261: 10394-10403.
- Colin, M.; Madoulet, C.; Baccard, N.; Arsac, F.; Jardillier, J.C. (1994). Study of sodium orthovanadate as a reverser of multidrug resistance on lymphoblastic leukaemic CEM/VLB100 cells. Anticancer Res. 14: 2383-2388.
- Comporti, M. (1993). Lipid peroxidation. Biopathological significance. Mol. Aspects Med. 14: 199-207.
- Conde, A.G.; Lau, S.S.; Dillmann, W.H.; Mestril, R. (1997). Induction of heat shock proteins by tyrosine kinase inhibitors in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against simulated ischaemia. J. Mol. Cell Cardiol. 29: 1927-1938.
- Cortizo, A.M.; Bruzzone, L.; Molinuevo, S.; Etcheverry, S.B. (2000). A posible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. Toxicology 147: 89-99.
- Cortizo, A.M., Salice, V.C.; Etcheverry, S.B. (1994). Vanadium compounds. Their action on alkaline phosphate activity. Biol. Trace Elem. Res. 41: 331-339.
- Crans, D.C. (1994). Aqueous chemistry of labile oxovanadate: relevance to biological studies. Comments Inorg. Chem. 16: 1-33.

- Crans, D.C.; Amin, S.S.; Keramidas, A.D. (1998). Chemistry of relevance to vanadium in the environment. In: Nriagu, J.O. (Ed.). Vanadium in the environment, Part 1: Chemistry and Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 73-95.
- Crans, D.C.; Baruah, B.; Levinger, N.E. (2006). Oxovanadates: a novel probe for studying lipid-water interfaces. *Biomed. Pharmacother.* 60: 174-181.
- Crans, D.C.; Bunch, R.L.; Theisen, L.A. (1989). Interaction of trace levels of vanadium(IV) and vanadium(V) in biological systems. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 7597-7607.
- Crans, D.C.; Rithner, C.D.; Theisen, L.A. (1990). Application of time-resolved ^{51}V 2-D NMR for quantitation studies of kinetic exchange between vanadate oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 2901-2908.
- Cruz, T.F.; Morgan, A.; Min, W. (1995). *In vitro* and *in vivo* antineoplastic effects of orthovanadate. *Mol. Cell Biochem.* 153: 161-166.
- Cuenda, A.; Henao, F.; Gutiérrez-Merino, C. (1990). Distances between functional sites of $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -ATPase from reticulum using Co^{2+} as a spectroscopic ruler. *Eur. J. Biochem.* 194: 663-670.
- Darmon, A.J.; Nicholson, D.W.; Bleackley, R. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377: 446-448.
- DeMaster, E.G.; Mitchell, R.A. (1973). A comparison of arsenate and vanadate as inhibitors or uncouplers of mitochondrial and glycolytic energy metabolism. *Biochemistry* 12: 3616-3621.
- Diaz, M.E.; Trafford, A.W.; Eisner, D.A. (2001). The effects of exogenous calcium buffers on the systolic calcium transient in rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* 80: 1915-1925.
- Di Giulio, R.T.; Benson, W.H.; Sanders, B.M.; Van Veld, P.A. (1995). Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In: Rand, G.M. (Ed.).

- Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental fate, and Risk assessment. Taylor & Francis, pp. 523-561.
- Drakenberg, T. (1986). Nuclear magnetic resonance of less common quadrupolar nuclei. *Ann. Rep. NMR Spect.* 17: 231-283.
- Duchen, M.R.; McGuinness, O.; Brown, L.A.; Crompton, M. (1993). On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 27: 1790-1794.
- Edel, J.; Sabbioni, E. (1993). Accumulation, distribution and form of vanadate in the tissues and organelles of the mussel *Mytilus edulis* and the godfish *Carassius auratus*. *Sci. Total Environ.* 133: 139-151.
- Elberg, G.; Li, J.; Shechter, Y. (1998). Mechanisms of actions of vanadium in mediating the biological effects of insulin. In: Nriagu, J.O. (Ed.). *Vanadium in the environment, Part 2: Health effects*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 277-295.
- Ehrlich, B.E.; Kaftan, E.; Bezprozvannaya, S.; Bezprozvanny, I. (1994). The pharmacology of intracellular Ca^{2+} -release channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 15:145-149.
- Estabrook, R.W.; Williamson, J.R.; Frenkel, R.; Maitra, P.K. (1967). The fluorometric determination of mitochondrial adenine and pyridine nucleotides. In: Estabrook, R.N.; Pullman, M.E. (Eds.). *Methods in enzymology, X*. Academic Press, New York, pp. 474-482.
- Etcheverry, S.B.; Cortizo, A.N. (1998). Bioactivity of vanadium compounds on cells in culture. In: Nriagu, J.O. (Ed.). *Vanadium in the environment, Part 1: Chemistry and Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 359-395.
- Evangelou, A.M. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42: 249-265.

- Farrell, A.P. (1993). Cardiovascular system. In: Evans, D.H. (Ed.). *The Physiology of Fishes*. CRC Press Inc., Florida, pp. 219-250.
- Farrell, A.P.; Hammons, A.M.; Graham, M.S.; Tibbits, G.F. (1988). Cardiac growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Zool.* 66: 2368-2373.
- Farrell, A.P.; Jones, D.R. (1992). The heart. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Farrell, A.P. (Eds.). *Fish Physiology*. Academic Press Inc., London, pp. 1-88.
- Fawcett, J.P.; Farquhar, S.J.; Thou, T.; Shand, B.I. (1997). Oral vanadyl sulphate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol. Toxicol.* 80: 202-206.
- Fawcett, J.P.; Farquhar, S.J.; Walker, R.J.; Thou, T.; Lowe, G.; Goulding, A. (1996). The effect of oral vanadyl sulphate on body composition and performance in weight-training athletes. *Int. J. Sport Nutr.* 6: 382-390.
- Feldman, D.; Wainio, W.W. (1960). Isolation, purification, and some properties of mammalian cytochrome *b*. *J. Biol. Chem.* 235: 3635-3639.
- Ferrer, E.G.; Williams, P.A.M.; Baran, E.J. (1993). The interaction of the VO²⁺ cation with oxidized glutathione. *J. Inor. Biochem.* 50: 253-262.
- Fohr, K.J.; Scott, J.; Ahnert-Hilger, G.; Gratzl, M. (1989). Characterization of the inositol 1,4,5-triphosphate-induced calcium release from permeabilized endocrine cells and its inhibition by decavanadate and p-hydroxymercuribenzoate. *Biochem. J.* 262: 83-89.
- Fohr, K.J.; Wahl, Y.; Engling, R.; Kemmer, T.P.; Gratzl, M. (1991). Decavanadate displaces inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) from its receptor and inhibits IP3 induced Ca²⁺ release in permeabilized pancreatic acinar cells. *Cell Calcium* 12: 735-742.

- Force, T.; Haq, S.; Kilter, H.; Michael, A. (2002). Apoptosis signal-regulating kinase/nuclear factor- κ B. A novel signalling pathway regulates cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation* 105: 402-404.
- Fowler, J.; Cohen, L. (1990). *Practical statistics for field biology*. John Wiley & Sons, 227 p.
- French, R.; Jones, P. (1993). Role of vanadium in nutrition: Metabolism, essentiality and dietary considerations. *Life Sciences* 52: 339-346.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutase, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272: 18515-18517.
- Gamble, S.C.; Goldfarb, P.S.; Porte, C.; Livingstone, D.R. (1995). Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Mar. Environ. Res.* 39: 191-195.
- Gândara, R.M.C.; Soares, S.S.; Martins, H.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2005). Vanadate oligomers: *In vivo* effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers. *J. Inorg. Biochem.* 99: 1238-1244.
- Ganote, C.E.; Armstrong, S.C. (2003). Effects of CCCP-induced mitochondrial uncoupling and cyclosporin A on cell volume, cell injury and preconditioning protection of isolated rabbit cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35: 749-759.
- Gao, N.; Ding, M.; Zheng, J.; Zhang, Z.; Leonard, S.; Liu, K.; Shi, X.; Jiang, B. (2002). Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial-growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/AkT pathway and reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 277: 31963-31971.
- García-Martín, E.; Gutiérrez-Merino, C. (1990). Modulation of the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of synaptosomal plasma membrane by the local anesthetics dibucaine and lidocaine. *J. Neurochem.* 54: 1238-1246.

- García-Martín, E., Martín-Romero, F.J.; Gutiérrez-Merino, C. (1995). Intrasyntosomal free Mg^{2+} concentration measured with the fluorescent indicator mag-fura-2: modulation by Na^+ gradient and by extrasyntosomal ATP. *J. Neurochem.* 65: 2757-2764.
- Genet, S.; Kale, R.K.; Baquer, N.Z. (2002). Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mol. Cell. Biochem.* 236: 7-12.
- Gerrard, D.F.; Fawcett, J.P.; Farquhar, S.J. (1993). Vanadium use by athletes. *N. Z. Med. J.* 106: 259.
- Ghe, A.M.; Stefanelli, C.; Tsintiki, P.; Veschi, G. (1985). Influence of some metal ions on oxidation of NADH and on formation of the superoxide anion radical (O_2^-), during enzymatic catalysis by E.C. 1.2.3.2 xanthine oxidase. *Talanta* 32: 359-362.
- Gil, V.M.S.; Geraldes, C.F.G.C. (1987). Ressonância magnética nuclear. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Go, L.O.; Moschella, M.C.; Watras, J.; Handa, K.K.; Fyfe, B.S.; Marks, A.R. (1995). Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J. Clin. Invest.* 95: 888-894.
- Goldberger, R.; Smith, A.L.; Tisdale, H.; Bomstein, R. (1961). Studies of the electron transport system: XXXVII. Isolation and properties of mammalian cytochrome *b*. *J. Biol. Chem.* 236: 2788-2793.
- Gonçalves, M. (1996). Métodos instrumentais para a análise de soluções – Análise quantitativa. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Greco, G.; Martino, G.; Tota, B. (1982). Further characterization of two mitochondrial populations in tuna heart ventricle. *Comp. Biochem. Physiol. B* 71: 71-75.
- Greenberg, A.; Clesceri, L.; Eaton, A. (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, USA.

- Greenlund, L.J.S.; Deckwerth, T.L.; Jonson, E.M. (1995). Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*. 14: 303-315.
- Greenwood, N.; Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the elements*. Butterworth-Heinemann, 1001 p.
- Gresser, M.J.; Tracey, A.S. (1990). Vanadates as phosphate analogs in biochemistry. In: Chasteen, N.D. (Ed.). *Vanadium in biological systems*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 63-79.
- Guerini, D.; García-Martín, E.; Gerber, A.; Volbracht, C.; Leist, M.; Gutiérrez-Merino, C.; Carafoli, E. (1999). The expression of plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms in cerebellar granule neurons is modulated by Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 274: 1667-1676.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharm.* 49: 1341-1348.
- Hamel, F.G.; Solomon, S.S.; Jespersen, A.S.; Blotcky, A.; Rack, E.; Duckworth, W.C. (1993). Alteration of tissue vanadium content in diabetes. *Metabolism* 42: 1503-1505.
- Hamet, P.; Richard, L.; Dam, T.; Teiger, E.; Orlov, S.N.; Gaboury, L.; Gossard, F.; Tremblay, J. (1995). Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26: 642-648.
- Harary, I.; Farley, B. (1963). *In vitro* studies on single beating rat heart cells. *Exp. Cell. Res.* 29: 451-465.
- Harland, B.; Harden-Williams, B. (1994). Is vanadium of human nutritional importance yet? *J. Am. Diet. Assoc.* 94: 891-894.

- Hasspieler, B.; Behar, J.; Di-Giulio, R. (1994). Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 28: 82-90.
- Heath, E.; Howarth, O.W. (1981). Vanadium-51 and oxygen-17 nuclear magnetic resonance study of vanadate(V) equilibria and kinetics. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1105-1110.
- Hogan, G. (1990). Peripheral erythrocyte levels, hemolysis and three vanadium compounds. *Experientia* 46: 444-446.
- Howarth, O.W. (1990). Vanadium-51 NMR. *Progress NMR Spectrosc.* 22: 453-485.
- Howarth, O.W.; Jarrold, M. (1978). Protonation of the decavanadate (6-) ion: A vanadium-51 Nuclear Magnetic Resonance study. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 22: 503-506.
- Hoyt, K.R.; Gallagher, A.J.; Hastings, T.G.; Reynolds, I.J. (1997). Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons. *Neurochem. Res.* 22: 333-340.
- Huang, C.; Zhang, Z.; Ding, M.; Li, J.; Ye, J.; Leonard, S.; Shen, H.; Butterworth, L.; Lu, Y.; Costa, M.; Rojanasakul, Y.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; Shi, X. (2000). Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J.Biol. Chem.* 275: 32516-32522.
- Hunt, C.R.; Sim, J.E.; Sullivan, S.J.; Featherstone, T.; Golden, W.; Von Kapp-Herr, C.; Hock, R.A.; Gomez, R.A.; Parsian, A.J.; Spitz, D.R. (1998). Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res.* 58: 3986-3992.
- Ingrid, N.; Brito, F. (1959). Equilibrium studies of polyanions. VI. Polyvanadates in alkaline Na(Cl) medium. *Acta Chim. Scand.* 13: 1971-1996.

- Jamall, I.S.; Naik, M.; Sprowls, J.J.; Trombetta, L.D. (1989). A comparison of the effects of dietary cadmium on heart and kidney antioxidant enzymes: evidence for the greater vulnerability of the heart to cadmium toxicity. *J. Appl. Toxicol.* 9: 339-345.
- James, T.L. (1975). Nuclear magnetic resonance in biochemistry. Principles and applications. Academic Press, Inc., 413 p.
- Johnson, D.; Lardy, H. (1967). Isolation of liver and kidney mitochondria. In: Estabrook, R.W.; Pullman, M.E. (Eds.). *Methods in enzymology*, Vol. X. Academic Press Inc., London, pp. 94-101.
- Josephson, L.; Cantley, L.C. (1977). Isolation of a potent (Na-K)ATPase inhibitor from striated muscle. *Biochemistry* 16: 4572-4578.
- Kalyani, P.; Ramasarma, T. (1992). Polyvanadate-stimulated NADH oxidation by plasma membranes: the need for a mixture of deca and meta forms of vanadate. *Arch. Biochem. Biophys.* 297: 244-252.
- Kalyani, P.; Ramasarma, T. (1993). A novel phenomenon of burst of oxygen uptake during decavanadate-dependent oxidation of NADH. *Mol. Cell. Biochem.* 121: 21-29.
- Kalyani, P.; Vijaya, S.; Ramasarma, T. (1992). Characterization of oxygen free radicals generated during vanadate-stimulated NADH oxidation. *Mol. Cell Biochem.* 111: 33-40.
- Keller, A.; Mohamed, A.; Drose, S.; Brandt, U.; Fleming, I.; Brandes, R.P. (2004). Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic. Res.* 38: 1257-1267.
- Kelly, S.A.; Havrilla, C.M.; Brady, T.C.; Abramo, K.H.; Levin, E.D. (1998). Oxidative stress in toxicology. Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ. Health Perspect.* 106: 375-384.

- Kimura, Y.; Kurzydowski, K.; Tada, M.; MacLennan, D.H. (1997). Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J. Biol. Chem.* 272: 15061-15064.
- Knudtson, B. (1979). Acute toxicity of vanadium to two species of freshwater fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 95-99.
- Kothakota, S.; Azuma, T.; Reinhard, C.; Klippel, A.; Tang, J.; Chu, K.; McGarry, T.J.; Kirschner, M.W.; Koths, K.; Kwiatkowski, D.J.; Williams, L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-298.
- Krivanek, J.; Novakova, L. (1991). A novel effect of vanadium ions: inhibition of succinyl-CoA synthetase. *Gen. Physiol. Biophys.* 10: 71-82.
- Krivanek, J.; Novakova, L. (1992). Differential sensitivity of the brain ATP-dependent and GTP-dependent succinyl-CoA synthetase to vanadium ions. *Developmental aspects. Physiol. Res.* 41: 345-350.
- Kustin, K.; McLeod, G. (1983). Vanadium and other metal ions in the physiological ecology of marine organisms. *Structure and Bonding* 53: 139-160.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lascano, E.F.; Gomez, R.M.; Berria, M.I. (1988). A controlled silver impregnation method to characterize cultured cardiomyocytes. *Stain Technol.* 63: 221-227.
- Lawrence, C.L.; Billups, B.; Rodrigo, G.C.; Standen, N.B. (2001). The K_{ATP} channel opener diazoxide protects cardiac myocytes during metabolic inhibition without causing mitochondrial depolarization or flavoprotein oxidation. *Br. J. Pharmacol.* 134: 535-542.
- Lawrence, R.A.; Burk, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 952-958.

- Lazebnik, Y.A.; Takahashi, A.; Moir, R.D.; Goldman, R.D.; Poirier, G.G.; Kaufmann, S.H.; Earnshaw, W.C. (1995). Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9042-9046.
- Legrum, W. (1986). The mode of reduction of vanadate(+5) to oxovanadium(+4) by glutathione and cysteine. *Toxicology* 42: 281-289.
- Léonard, A.; Gerber, G. (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat. Res.* 317: 81-88.
- Limaye, D.A.; Shaikh, Z.A. (1999). Cytotoxicity of cadmium and characteristics of its transport in cardiomyocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154: 59-66.
- Linnett, P.E.; Beechey, R.B. (1979). Inhibitors of the ATP synthetase system. *Methods Enzymol.* 55: 472-518.
- Lledías, F.; Rangel, P.; Hansberg, W. (1998). Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 273: 10630-10637.
- Llobet, J.M.; Domingo, J.L. (1984). Acute toxicity of vanadium compounds in rat and mice. *Toxicol. Lett.* 23: 227-231.
- Macara, I.G.; Kustin, K.; Cantley Jr., L.C.C. (1980). Glutathione reduces cytoplasmic vanadate mechanism and physiological implications. *Biochim. Biophys. Acta* 629: 95-106.
- Mackay, K.; Mochly-Rosen, D. (2000). Involvement of a p38 mitogen-activated protein kinase phosphatase in protecting neonatal rat cardiac myocytes from ischemia. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32: 1585-1588.
- Mackenzie, L.; Roderick, H.L.; Berridge, M.J.; Conway, S.T.; Bootman, M.D. (2004). The spatial pattern of atrial cardiomyocytes calcium signalling modulates contraction. *J. Cell Sci.* 117: 6327-6337.

- Marks, A.R. (2000). Cardiac intracellular calcium release channels. Role in heart failure. *Circ. Res.* 87: 8-11.
- Martín-Romero, F.J. (1998). Regulación de la apoptosis inducida por la disminución de potasio extracelular en cultivos de neuronas granulares de cerebelo, in Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Universidad de Extremadura: Badajoz (España).
- Martin-Romero, F.J.; Gutiérrez-Martin, Y.; Henao, F.; Gutiérrez-Merino, C. (2004). Fluorescence measurements of steady state peroxynitrite production upon SIN-1 decomposition: NADH versus dihydrodichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123. *J. Fluoresc.* 14: 17-23.
- Martín-Romero, F.J.; Santiago-Josefat, B.; Correa-Bordes, J.; Gutiérrez-Merino, C.; Fernandez-Salguero, P. (2000). Potassium-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells involves cell-cycle blockade at the G1/S transition. *J. Mol. Neurosci.* 15: 155-165.
- Matarrese, P.; Gambardella, L.; Cassone, A.; Vella, S.; Cuda, R.; Malorni, W. (2003). Mitochondrial membrane hyperpolarization hijacks activated T lymphocytes towards the apoptotic-prone phenotype: homeostatic mechanisms of HIV protease inhibitors, *J. Immunol.* 170: 6006-6015.
- Matés, J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83-104.
- Mathur, A.; Hong, Y.; Kemp, B.K.; Barrientos, A.A.; Erusalimsky, J.D. (2000). Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 46: 126-138.
- Matsumoto, J. (1994). Vanadate, molybdate and tungstate for orthomolecular medicine. *Med. Hypotheses* 43: 177-182.
- McCord, J.M.; Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.

Referências bibliográficas

- Miramand, P.; Fowler, S.W. (1998). Bioaccumulation and transfer of vanadium in marine organisms. In: Nriagu, J.O. (Ed). Vanadium in the environment, Part 1: Chemistry and Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 167-197.
- Miramand, P; Fowler, S.W.; Guary, J.C. 1992. Experimental study on vanadium transfer in the benthic fish *Gobius minutus*. Mar. Biol. 67: 127-134.
- Monroy, G.C.; Pullman, M.E., 1967. Preparation properties of a naturally occurring inhibitor of mitochondrial ATPase. In: Estabrook, R.W.; Pullman, M.E. (Eds.). Methods in enzymology, Vol. X. Academic Press Inc., London, pp. 500-512.
- Mossmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65: 55-63.
- Mukherjee, B.; Patra, B.; Mahapatra, S.; Banerjee, P.; Tiwari, A.; Chatterjee, M. (2004). Vanadium – an element of atypical biological significance. Toxicol. Lett. 150: 135-143.
- Nadal-Ginard, B. (2001). Inducción de Nuevos Cardiomiocitos en el Corazón Adulto: Futuro de la Regeneración Miocárdica como Alternativa al Transplante. Rev. Espanola Cardiol. 54: 543-550.
- National Research Council (1996). Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, 125 p.
- Nechay, B.R. (1984). Mechanisms of action of vanadium. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 501-524.
- Nechay, B.R.; Nanninga, L.B.; Nechay, P.S. (1986). Vanadyl (IV) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl, and amino ligands: Calculations of cellular vanadium species distribution. Arch. Biochem. Biophys. 251: 128-138.

- Nemoto, S.; Takeda, K.; Yu, Z.X.; Ferrans, V.J.; Finkel, T. (2000). Role of mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7311-7318.
- Nielsen, F.H. (1991). Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel and arsenic: Current knowledge and speculation. *FASEB J.* 5: 2661-2667.
- Norma Portuguesa (NP) ISO 8466-1: 1990. Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function. Instituto Português da Qualidade.
- Nriagu, J.O. (1998). History, occurrence, and uses of vanadium. In: Nriagu, J.O. (Ed). *Vanadium in the environment, Part 1: Chemistry and Biochemistry.* John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 1-24.
- O'Donnel, S.E.; Pope, M.T. (1976). Applications of vanadium-51 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy to the study of iso- and hetero-polyvanadates. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2290-2297.
- O'Neal, S.G.; Rhoads, D.B.; Racker, E. (1979). Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and other ATPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 845-850.
- Opie, L.H. (2003). Heart cells and organelles. In: Opie, L.H. (Ed.). *Heart physiology. From cell to circulation.* Lippincott Williams & Wilkins, pp. 42-69.
- Opie, L.H.; Bers, D.M. (2003). Excitation-contraction coupling and calcium. In: Opie, L.H. (Ed.). *Heart physiology. From cell to circulation.* Lippincott Williams & Wilkins, pp. 159-185.
- Opie, L.H.; Lopaschuk, G.D. (2003). Fuels: Aerobic and anaerobic metabolism. In: Opie, L.H. (Ed.). *Heart physiology. From cell to circulation.* Lippincott Williams & Wilkins, pp. 306-354.

Referências bibliográficas

- Opie, L.H.; Sack, M.M. (2003). Signal systems : Coordinating life and death. In: Opie, L.H. (Ed.). Heart physiology. From cell to circulation. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 247-276.
- O'Reilly, C.M.; Fogarty, K.E.; Drummond, R.M.; Tuft Jr., R.A.; Walsh, J.V. (2004). Spontaneous mitochondrial depolarizations are independent of SR Ca²⁺ release. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286: 1139-1151.
- Palace, V.; Klaverkamp, J. (1993). Variation of hepatic enzymes in three species of freshwater fish from Precambrian shield lakes and the effects of cadmium exposure. Comp. Biochem. Physiol. 104C: 147-154.
- Palace, V.; Majewski, H.; Klaverkamp, J. (1993). Interactions among antioxidant defences in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50: 156-162.
- Pascual, P.; Pedrajas, J.R.; Toribio, F.; Lopez-Barea, J.; Peinado, J. (2003). Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). Chem. Biol. Interact. 145: 191-199.
- Patole, M.S.; Kurup, C.K.R.; Ramasarma, T. (1986). Reduction of vanadate by a microsomal redox system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 141: 171-175.
- Patole, M.S.; Kurup, C.K.R.; Ramasarma, T. (1987). NADH-dependent polyvanadate reduction by microsomes. Mol. Cell Biochem. 75: 161-167.
- Patole, M.S.; Sharada, G.; Ramasarma, T. (1988). Vanadate-stimulated NADH oxidation requires polymeric vanadate, phosphate and superoxide. Free Radic. Res. Common. 4: 201-207.
- Pedersen, P.L. (1975). Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria: separate sites involved in ATP hydrolysis and in the reversible, high affinity binding of ADP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 64: 610-614.

- Pedrajas, J.R.; Peinado, J.; Lopez-Barea, J. (1995). Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem. Biol. Interact.* 98: 267-282.
- Perrett, D. (1986). Nucleotides, nucleosides and bases, in HPLC of small molecules. In: Lim, C.K. (Ed.). IRL Press, Oxford, pp. 221-259.
- Pettersson, L.; Andersson, I.; Hedman, B. (1985). Multicomponent polyanions. 37. A potentiometric and ^{51}V -NMR study of equilibria in the H^+ - HVO_4^{2-} system in 3.0 M- $\text{Na}(\text{ClO}_4)$ medium covering the range $\leq -\lg[\text{H}^+] \leq 10$. *Chem. Scripta* 25: 309-317.
- Pillay, T.V.R. (1990). *Aquaculture. Principles and practices*. Fishing News Books, Cambridge, 575 p.
- Poindexter, B.J.; Smith, J.R.; Buja, L.M.; Bick, R.J. (2001). Calcium signalling mechanisms in dedifferentiated cardiac myocytes: Comparison with neonatal and adult cardiomyocytes. *Cell calcium* 30: 373-382.
- Pope, M.T. (1983). *Heteropoly and isopoly oxometalates*. Springer-Verlag, New York, 180 p.
- Pope, M.T.; Müller, A. (1994). *Polyoxometalates: From platonic solids to anti-retroviral activity*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 424 p.
- Pruell, R.J.; Engelhardt, F.R. (1980). Liver cadmium uptake, catalase inhibition and cadmium thionein production in the killifish (*Fundulus heteroclitus*) induced by experimental cadmium exposure. *Marine Environ. Res.* 3: 101-111.
- Ramasarma, T.; Mackellar, W.E.; Crane, F.L. (1981). Vanadate-stimulated NADH oxidation in plasma membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 646: 88-98.
- Ramasarma, T.; Rao, A.V.S. (2006). Decavanadate interacts with microsomal NADH oxidation system and enhances cytochrome *c* reduction. *Mol. Cell. Biochem.* 281: 139-144.

- Ramos, S.; Manuel, M.; Tiago, T.; Gândara, R.M.C.; Duarte, R.O.; Moura, J.J.G.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2006). Decavanadate interactions with actin: Inhibition of G-actin polymerization and stabilization of decameric vanadate. *J. Inorg. Biochem.* 100: 1734-1743.
- Rao, A.V.; Ramasarma, T. (2000). NADH-dependent decavanadate reductase, an alternative activity of NADP-specific isocitrate dehydrogenase protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1474: 321-330.
- Ray, S. (1994). Cadmium. In: Kiceniuk, J.; Ray, S. (Eds.). *Analysis of contaminants in edible aquatic resources*. VCH Publishers, USA, pp. 91-113.
- Rehder, D. (1982). A survey of ^{51}V NMR spectroscopy. *Bull. Magn. Reson.* 4: 33-83.
- Rehder, D. (1991). The bioinorganic chemistry of vanadium. *Chem. Int. Ed. Engl.* 30: 148-167.
- Rehder, D. (1992). Structure and function of vanadium compounds in living organisms. *BioMetals* 5: 3-12.
- Rehder, D. (1995). Inorganic considerations on the function of vanadium in biological systems. *Met. Ions Biol. Syst.* 31: 1-43.
- Rehder, D. (2003). Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorg. Chem. Commun.* 6: 604-617.
- Rinaldi, R.; Eliasson, E.; Swedmark, S.; Morgenstern, R. (2002). Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug Metab. Dispos.* 30: 1053-1058.
- Rodriguez-Ariza, A.; Toribio, F.; Lopez-Barea, J. (1994). Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 656: 311-318.

- Rodriguez- Ariza, A.; Alhama, J.; Diaz-Mendes, F.M.; Lopez-Barea, J. (1999). Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as a biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat. Res.* 438: 97-107.
- Rouessac, F.; Rouessac, A. (2001). *Chemical analysis: Modern instrumentation methods and techniques*. John Wiley & Sons, Inc., 300 p.
- Rubinson, J.; Rubinson, K. (1998). *Contemporary chemical analysis*. Prentice – Hall, Inc., 840 p.
- Sabbioni, E.; Pozzi, G.; Devos, S.; Pintar, A.; Casella, L.; Fischbach, M. (1993). The intensity of vanadium(V)-induced cytotoxicity and morphological transformation in BALB/3T3 cells is dependent on glutathione-mediated bio-reduction to vanadium(IV). *Carcinogenesis* 14: 2565-2568.
- Sabbioni, E.; Pozzi, G.; Pintar, A.; Casella, L.; Garattini, S. (1991). Cellular retention, cytotoxicity and morphological transformation by vanadium(IV) and vanadium(V) in BALB/3T3 cell lines. *Carcinogenesis* 12: 47-52.
- Saeki, K.; Nakajima, M.; Noda, K.; Loughlin, T.R.; Baba, N.; Kiyota, M.; Tatsukawa, R.; Calkins, D.G. (1999). Vanadium accumulation in pinnipeds. *Arch Environ Contam Toxicol.* 36: 81-86.
- Sakurai, H.; Tsuji, A. (1998). Antidiabetic action of vanadium complexes in animals: Blood glucose normalizing effect, organ distribution of vanadium, and mechanism for insulin-mimetic action. In: Nriagu, J.O. (Ed). *Vanadium in the environment, Part 2: Health effects*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 297-315.
- Samhan-Arias, A.K.; Martín-Romero, F.J.; Gutiérrez-Merino, C. (2004). Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 48-71.

Referências bibliográficas

- Sandirasegarane, L.; Gopalakrishnan, V. (1995). Vanadate increases cytosolic free calcium in rat aortic smooth muscle cells. *Life Sci.* 56: PL169-PL174.
- Saotome, M.; Katoh, H.; Satoh, H.; Nagasaka, S.; Yoshihara, S.; Terada, H.; Hayashi, H. (2005). Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca^{2+} in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: H1820-H1828.
- Sarkar, S.; Yadav, P.; Trivedi, R.; Bansal, A.K.; Bhatnagar, D. (1995). Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 9: 144-149.
- Sharov, V.G.; Todor, A.V.; Imai, M.; Sabbah, H.N. (2005). Inhibition of mitochondrial permeability transition pores by cyclosporine A improves cytochrome C oxidase function and increases rate of ATP synthesis in failing cardiomyocytes. *Heart Fail. Rev.* 10: 305-310.
- Schlegel, J.; Peters, I.; Orrenius, S.; Miller, D.K.; Thornberry, N.A.; Yamin, T.T.; Nicholson D.W. (1996). CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271: 1841-1844.
- Secrist, J.P.; Burns, L.A.; Karnitz, L.; Koretzky, G.A.; Abraham, R.T. (1993). Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events. *J. Biol. Chem.* 268: 5886-5893.
- Serra, M.; Pintar, A.; Casella, L.; Sabbioni, E. (1992). Vanadium effect on the activity of horseradish peroxidase, catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase *in vitro*. *J. Inorg. Biochem.* 46: 161-174.
- Shechter, Y. (1990). Perspective in diabetes: insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatments of diabetes. *Diabetes* 39: 1-5.
- Shi, S.J.; Preuss, H.G.; Abernethy, D.R.; Li, X.; Jarrell, S.T.; Andrawis, N.S. (1997). Elevated blood pressure in spontaneously hypertensive rats consuming a high

sucrose diet is associated with elevated angiotensin II and is reversed by vanadium. *J. Hypertension* 15: 857-862.

Sies, H. (1985). *Oxidative stress*. Academic Press, London, 507 p.

Simons, T.J. (1979). Vanadate – A new tool for biologists. *Nature* 281: 337-338.

Simpson, P. (1985). Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an α 1-adrenergic receptor and induction of beating through an α 1- and β 1- adrenergic receptor interaction. *Circ. Res.* 56: 884-894.

Simpson, P.; Savion, S. (1982a). Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. *Circ. Res.* 50: 101-116.

Simpson, P.; Savion, S. (1982b). Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ. Res.* 51: 787-801.

Sitprija, V.; Eiam-Ong, S. (1998). Vanadium and metabolic problems. In: Nriagu, J.O. (Ed). *Vanadium in the environment, Part 2: Health effects*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 91-120.

Skoog, D.; Holler, F.; Nieman, T. (1998). *Principles of instrumental analysis*. Saunders College Publishing, 960 p.

Smiley, S.T.; Reers, M.; Mottola-Hartshorn, C.; Lin, M.; Chen, A.; Smith, T.W.; Steele, G.D.; Chen, L.B. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3671-3675.

Smith, L. (1955). Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase. In: Glick, D. (Ed.), *Methods of biochemical analysis, Volume II*. Wiley (Interscience), New York, pp. 427-434.

Soares, S.S.; Aureliano, M. (2007). Decavanadate *in vivo* toxicity. *A ser submetido para publicação*.

- Soares, S.S.; Aureliano, M.; Joaquim, N.; Coucelo, J.M. (2003). Cadmium and vanadate oligomers effects on methaemoglobin reductase activity from Lusitanian toadfish: *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Inorg. Biochem.* 94: 285-290.
- Soares, S.S.; Duarte, R.O.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007g). Decavanadate reduction in mitochondrial studies. *A ser submetido para publicação.*
- Soares, S.S.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007b). Mitochondria as a target for decavanadate toxicity in *Sparus aurata* heart. *Aquatic. Toxicol. in press.*
- Soares, S.S.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007c). Decavanadate induces mitochondrial membrane depolarization and inhibits oxygen consumption. *J. Inorg. Biochem.* 101: 789-796.
- Soares, S.S.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007e). Decavanadate toxicity effects following *in vivo* administration. In: Aureliano, M. (Ed.), Vanadium compounds/vanadate oligomers in biological systems: Chemistry, Biochemistry and Biological effects, Research Signpost, India, *Aceite para publicação.*
- Soares, S.S.; Henao, F.; Aureliano, M.; Gutiérrez-Merino, C. (2007d). Vanadate-induced necrotic death in neonatal rat cardiomyocytes through mitochondrial membrane depolarization. *Submetido para publicação.*
- Soares, S.S.; Joaquim, N.; Coucelo, J.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007f). Vanadium and cadmium *in vivo* comparative effects in oxidative stress on the cardiac muscle. *Submetido para publicação.*
- Soares, S.S.; Martins, H.; Aureliano, M. (2006). Vanadium distribution following decavanadate administration. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 60-64.
- Soares, S.S.; Martins, H.; Duarte, R.O.; Moura, J.J.G.; Coucelo, J.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007a). Vanadium distribution, lipid peroxidation and oxidative stress markers upon decavanadate *in vivo* administration. *J. Inorg. Biochem.* 101: 80-88.

- Solchaga, M.; Montoro, R.; Guardia, M. (1986). Flame absorption spectroscopy determination of Cd, Cu, Fe, Pb and Zn in mussels. *J. Assoc. Anal. Chem.* 69: 874-876.
- Souren, J.E.M.; Verkleij, A.J.; Van Wijk, R. (1992). Factors controlling the rhythmic contractions of collagen gels by neonatal heart cells. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.* 28A: 199-204.
- Sousa, A. (2004). Interação de complexos vanádio-citrato com a bomba de retículo sarcoplasmático. Tese de Mestrado em Biotecnologia, Universidade do Algarve, Faro, 170 p.
- Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Fernandes-Alnemri, T.; Litwack, G.; Alnemri, E.S. (1996). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14486-14491.
- Stankiewicz, P.J.; Tracey, A.S.; Crans, D.C. (1995). Inhibition of phosphate-metabolizing enzymes by oxovanadium (V) complexes. In: Sigel, H.; Sigel, A. (Eds.). *Metal ions in biological systems: Vanadium and its role in life*. Marcel Dekker, New York, pp. 287-324.
- Stern, A.; Yin, X.; Tsang, S. S.; Davidson, A.; Moon, J. (1993). Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression. *Biochem. Cell Biol.* 71: 103-112.
- Stohs, S.J. (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *Life Sci. I.* 6: 205-228.
- Stohs, S.J.; Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 321-336.
- Storey, K.B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 1715-1733.

- Sugden, P.H.; Clerk, A. (1998). "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ. Res.* 83: 345-352.
- Sussman, M.A.; McCulloch, A.; Borg, T.K. (2002). Dance band on the *Titanic*. Biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 91: 888-898.
- Swift, L.M.; Sarvazyan, N. (2000). Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: Implications for assessment of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278 : H982-H990.
- Takada, Y.; Hashimoto, M.; Kasahara, J.; Aihara, K. ; Fukunaga, K. (2004). Cytoprotective effect of sodium orthovanadate on ischaemia/reperfusion – induced injury in the rat heart involves Akt activation and inhibition of fodrin breakdown and apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311: 1249-1255.
- Thomas, A.P.; Delaville, F. (1991). The use of fluorescent indicators for measurements of cytosol-free calcium concentration in cell populations and single cells. In: McCormack, J.G.; Cobbold, P.H. (Eds.). *Cellular calcium: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-54.
- Thompson, K.H.; Battell, M.; McNeill, J.H. (1998). Toxicology of vanadium in mammals. In: Nriagu, J.O. (Ed.). *Vanadium in the environment, Part 2: Health effects*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 21-37.
- Tiago, T.; Aureliano, M.; Duarte, R.O.; Moura, J.J.G. (2002). Vanadate oligomers interaction with phosphorylated myosin. *Inorg. Chim. Acta* 339C: 317-321.
- Tiago, T.; Aureliano, M.; Gutiérrez-Merino, C. (2004a). Decavanadate binding to a high affinity site near the myosin catalytic centre inhibits F-actin-stimulated myosin ATPase activity. *Biochemistry* 43: 5551-5561.
- Tiago, T.; Aureliano, M.; Moura, J.J.G. (2004b). Decavanadate as a biochemical tool in the elucidation of muscle contraction regulation. *Inorg. Biochem.* 98: 1902-1910.

- Tort, L.; Madsen, L. (1991). The effects of heavy metals cadmium and zinc on the contraction of ventricular fibres in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 99C: 353-356.
- Tracey, A.S.; Gresser, M.J. (1988). Vanadium(V) oxyanions: interactions of vanadate with 1,1,1-Tris (hydroxymethyl) ethane and with buffer Tris (hydroxymethyl) aminoethane. *Inorg. Chem.* 27: 1269-1275.
- Troyan, M.B.; Gilman, V.R.; Gay, C.V. (1997). Mitochondrial membrane potential changes in osteoblasts treated with parathyroid hormone and estradiol. *Exp. Cell Res.* 233: 274-280.
- Trudel, S.; Pâquet, M.R.; Grinstein, S. (1991). Mechanism of vanadate-induced activation of tyrosine phosphorylation and of the respiratory burst in HL60 cells. Role of reduced oxygen metabolites. *Biochem. J.* 276: 611-619.
- UNEP – *United Nations Environment Programme* (1990). Contamination monitoring programs using marine organisms: Qualitative assurance and good laboratory practice. *Reference Methods for Marine Pollution Studies* 57: 1-27.
- Uthus, E.; Seaborn, C. (1996). Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for dietary recommendations of the other trace elements. *J. Nutr.* 126: 2452S-2459S.
- Vaglio, A.; Landriscina, C. (1999). Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43: 111-116.
- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M.T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12: 1161-1208.
- Veeger, C.; DerVartanian, D.V.; Zeylemaker, W.P. (1969). Succinic dehydrogenase. In: Lowenstein, J.M. (Ed.). *Methods in enzymology*, Vol. XII. Academic Press Inc., New York, pp. 81-90.

Referências bibliográficas

- Velours, J.; Lavat, A.; Guerin, M.; Guerin, B. (1975). Vanadate inhibition of mitochondrial succinate dehydrogenase and dicarboxylate carrier. *Biochimie* 57: 975-978.
- Venkataraman, B.V.; Ravishankar, H.N.; Rao, A.V.; Kalyani, P.; Sharada, G.; Namboodiri, K.; Gabor, B.; Ramasarma, T. (1997). Decavanadate possesses alpha-adrenergic agonist activity and a structural motif common with trans-beta form of noradrenaline. *Mol. Cell. Biochem.* 169: 27-36.
- Viarengo, A. (1989). Biochemical effects of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.* 16: 153-158.
- Vijaya, S.; Crane, F.L.; Ramasarma, T. (1984). A vanadate-stimulated NADH oxidase in erythrocyte membrane generates hydrogen peroxide. *Mol. Cell. Biochem.* 62: 175-185.
- Volberg, T.; Zick, Y.; Dror, R.; Sabanay, I.; Gilon, C.; Levitzki, A.; Geiger, B. (1992). The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. *EMBO J.* 11: 1733-1742.
- Votyakova, T.V.; Reynolds, I.J. (2001). $\Delta\psi_m$ -Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 79: 266-277.
- Vyskocil, F.; Teisinger, J.; Dlouha, H. (1980). A specific enzyme is not necessary for vanadate-induced oxidation of NADH. *Nature* 286: 516-517.
- Wang, R.; Wang, X.T.; Wu, L.; Mateescu, M.A. (1999). Toxic effects of cadmium and copper on the isolated heart of dogfish shark, *Squalus acanthias*. *J. Toxicol. Environ. Health* 57: 507-519.
- Wharton, D.C.; Tzagoloff, A. (1967). Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol.* 10: 245-250.
- Wilkins, P.; Wilkins, R. (1997). *Inorganic chemistry in biology*. Oxford University Press, Oxford, 235 p.

- Willenbucher, R.F.; Xie, Y.N.; Eysselein, V.E.; Snape Jr., W.J. (1992). Mechanisms of camp-mediated relaxation of distal circular muscle in rabbit colon. *Am. J. Physiol.* 262: G159-G164.
- Wills, D. (1987). Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell, K.; Mullock, B. (Eds.). *Biochemical toxicology: A practical approach*. IRL Press, Oxford, pp. 127-152.
- Willsky, G.R.; Dosch, S.F. (1986). Vanadium metabolism in wild type and respiratory-deficient strains of *S. cerevisiae*. *Yeast.* 2: 77-85.
- Wittenkeller, L.; Abraha, A.; Ramasamy, R.; Mota de Freitas, D.; Crans, D.; Theisen, L. (1991). Vanadate interactions with bovine Cu,Zn-superoxide dismutase as probed by ^{51}V NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 7872-7881.
- Xu, M.; Wang, Y.; Ayub, A.; Ashraf, M. (2001). Mitochondrial K_{ATP} channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281: H1295-H1303.
- Yang, X.G.; Yang, X.D.; Yuan, L.; Wang, K.; Crans, D.C. (2004). The permeability and cytotoxicity of insulin-mimetic vanadium compounds. *Pharm. Res.* 21: 1026-1033.
- Ye, J.-P.; Ding, M.; Leonard, S.S.; Robinson, V.A.; Millecchia, L.; Zhang, X.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; Shi, X. (1999). Vanadate induces apoptosis in epidermal JB6 Pplus cells via hydrogen peroxide-mediated reactions. *Mol. Cell Biochem.* 202: 9-17.
- Yin, X.; Davidson, A.J.; Tsang, S.S. (1992). Vanadate-induced gene expression in mouse C127 cells: Roles of oxygen derived active species. *Mol. Cell Biochem.* 115: 85-96.
- Yuen, V.G.; Orvig, C.; Thompson, K.H.; McNeill, J.H. (1993). Improvement in cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats following chronic oral

administration of bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 270-276.

Zaporowska, H.; Scibior, A. (1998a). Vanadium and its significance in animal cell metabolism. In: Nriagu, J.O. (Eds.). *Vanadium in the environment, Part 2: Health effects*. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 121-133.

Zaporowska, H.; Scibior, A. (1998b). Hematological effects of vanadium on living organisms. In: Nriagu, J.O. (Ed.). *Vanadium in the environment, Part 2: Health effects*. John Wiley and Sons, New York, pp. 135-157.

Zaporowska, H.; Wasilewski, W. (1992). Haematological effects of vanadium on living organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 102C: 223-231.

Zaporowska, H.; Wasilewski, W.; Slotwinska, M. (1993). Effects of chronic vanadium administration in drinking water to rats. *BioMetals* 6: 3-10.

Zhang, Z.; Huang, C.; Li, J.; Leonard, S.S.; Lanciotti, R.; Butterworth, L.; Shi, X. (2001). Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 392: 311-320.

Zhang, Z.; Leonard, S.; Huang, C.; Vallyathan, V.; Castranova, V.; Shi, X. (2003). Role of reactive oxygen species and MAPKS in vanadate-induced G(2)/M phase arrest. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1333-1342.

Zikic, R.V.; Stajn, A.S.; Ognjanovic, B.I.; Saicic, Z.S.; Kostic, M.M.; Pavlovic, S.Z.; Petrovic, V.M. (1998). The effect of cadmium and selenium on the antioxidant enzyme activities in rat heart. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 17: 259-264.

Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J. (2006). Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 509-517.

Zurgil, N.; Shafran, Y.; Fixler, D.; Deutsch, M. (2002). Analysis of early apoptotic events in individual cells by fluorescence intensity and polarization measurements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 1573-1582.

Zychlinski, L.; Byczkowski, J.Z. (1990). Inhibitory effects of vanadium pentoxide on respiration of rat liver mitochondria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 138-142.

