

**INTERAÇÃO DE OXOMETALATOS DE VANÁDIO, NIÓBIO,  
TUNGSTÊNIO E MOLIBDÉNIO COM A Ca<sup>2+</sup>-ATPase DE RETÍCULO  
SARCOPLASMÁTICO: UM ALVO DE AÇÃO DE FÁRMACOS**

**Gil Vicente da Conceição Fraqueza**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas, especialidade  
em Bioquímica Inorgânica

Trabalho efetuado sob a orientação de: Prof. Doutor Manuel Aureliano Pereira  
Martins Alves

**2013**



**INTERAÇÃO DE OXOMETALATOS DE VANÁDIO, NIÓBIO,  
TUNGSTÊNIO E MOLIBDÉNIO COM A Ca<sup>2+</sup>-ATPase DE RETÍCULO  
SARCOPLASMÁTICO: UM ALVO DE AÇÃO DE FÁRMACOS**

**Gil Vicente da Conceição Fraqueza**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas, especialidade  
em Bioquímica Inorgânica

Trabalho efetuado sob a orientação de: Prof. Doutor Manuel Aureliano Pereira  
Martins Alves

**2013**

**“ Interação de oxometalatos de vanádio, nióbio, tungstênio e molibdênio com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático: um alvo de ação de fármacos “**

“Declaração de autoria de trabalho”

“Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.”

*Gil Vicente da Conceição Fraqueza*

---

“ Copyright” por Gil Vicente da Conceição Fraqueza

“ A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

*A Ciência será sempre uma busca e jamais uma descoberta.*

*É uma viagem, nunca uma chegada.*

*Karl Popper*

## Agradecimentos

O homem para realizar as suas tarefas não o faz isoladamente. Só com o apoio de outros se consegue aquilo a que nos propomos fazer. Assim este doutoramento, apesar de ser uma tarefa individual, só foi possível devido ao incentivo, ao apoio daqueles que estiveram ligados ao meu percurso científico e pessoal durante estes anos. É a todos os que ficaram ligados à minha experiência neste período que eu quero expressar o meu profundo e sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, ao Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves, meu orientador, o meu agradecimento pela forma como me recebeu desde o início, aceitando ser meu orientador, sempre com um incentivo, com um espírito crítico saudável, com uma disponibilidade inexcedível, ajudando e proporcionando-me todas as condições para a realização das diversas tarefas, abrindo-me as portas necessárias de modo a terminar os meus estudos e ainda pela revisão cuidadosa desta dissertação. Além, disso o meu agradecimento estende-se principalmente porque considero que é um amigo que ganhei e a amizade de alguém é um bem inestimável.

Ao Dr. Hélio Martins, técnico superior da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, um amigo já conhecido há longos anos, quero agradecer pela sua disponibilidade e sabedoria na execução das análises de vanádio por espectroscopia de absorção atómica, pelos diálogos enquanto as câmaras de grafite iam sendo gastas e pelos conselhos que me deu.

À Dr.<sup>a</sup> Maria do Rosário Caras Altas, fica o meu agradecimento pela excelente assistência técnica na *obtenção dos espectros* de RMN, no Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

À Dr.<sup>a</sup> Luísa Maia, expreso agradecimento pela preciosa e indispensável contribuição na obtenção e análise dos espectros de RPE no Departamento de Química (REQUIMTE) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Ao Prof. Doutor Luís Carvalho agradeço a forma simpática e a sua disponibilidade extraordinária na obtenção dos espectros de Raman, na Unidade de Investigação e Desenvolvimento Química-Física Molecular da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Paula Marques, agradeço a sua receção, a sua cordialidade e o seu conhecimento durante a estadia em Coimbra, no período de tempo dos estudos por espectroscopia de Raman.

Aos meus colegas do Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve quero também expressar o meu agradecimento. Entre eles, à Prof.<sup>a</sup> Doutora Nelma Gaspar Rolle pelo seu incentivo ao início destes estudos. Ao Prof. Doutor Eduardo Esteves pelos seus conselhos e ajuda no tratamento estatístico dos resultados. Ao Doutor Rui Cruz pela amizade e pela disponibilidade em resolver as minhas questões informáticas na elaboração da dissertação.

Também pelo incentivo e amizade o meu agradecimento às colegas Prof<sup>a</sup> Doutora Ana Cristina Figueira e Prof<sup>a</sup> Doutora Margarida Vieira.

Ao pessoal do laboratório 3.31, (Laboratório de Bioquímica – Bioenergética) nomeadamente à Doutora Teresa Tiago pela forma como me recebeu, pelo seu ensinamento inicial na introdução às técnicas a utilizar nos estudos e na disponibilidade que sempre demonstrou para ajudar quando o solicitei, o meu sincero agradecimento. Aos alunos que passaram pelo laboratório, Rosa Brissos, Fábio Fontes, Emilie Rito e Dina Rochate agradeço pela companhia, pelas conversas que fomos tendo, fizeram com que o tempo passado fosse mais agradável.

Agradeço à Fundação para a Ciência e Tecnologia, pela bolsa concedida em 2010 através do programa PROTEC, permitindo-me uma disponibilidade para um avanço decisivo na conclusão dos meus estudos.

Quero também agradecer ao CCMar (Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve) pela disponibilização dos seus meios, na aquisição de materiais e reagentes e na ajuda para tornar possível a minha presença no 22<sup>nd</sup> IUBMB & 37<sup>th</sup> FEBS Congress em Sevilha.

Finalmente, quero fazer um agradecimento especial aos meus filhos, Carolina e Pedro, e a minha mulher Fátima, pela paciência com que me tiveram que aturar, por terem passado sem a minha ajuda durante parte do tempo que eu dediquei a esta tarefa mas que me ajudaram a concluir, pois foram a minha fonte de motivação, a minha fonte de energia, para recuperar dos momentos de desânimo e continuar a trabalhar para concretizar este estudo.

## Apresentação da dissertação

Os estudos apresentados nesta dissertação, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, com especialidade em Bioquímica Inorgânica, resultaram do trabalho de investigação desenvolvido entre 2007 e 2012. A parte experimental dos estudos foi realizada no Laboratório de Bioquímica – Bioenergética, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, sob a orientação do Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves, do Departamento de Ciências Biológicas e Bioengenharia. Alguns estudos espectroscópicos foram realizados no departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, nomeadamente os estudos por ressonância magnética nuclear e ressonância paramagnética eletrónica. Relativamente aos estudos por espectroscopia de Raman, foram efetuados na Unidade de Investigação e Desenvolvimento Química-Física Molecular da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Estes estudos foram apoiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, através do programa de formação avançada de docentes do Ensino Superior Politécnico (PROTEC) em 2010, tendo sido aprovada a bolsa da candidatura com a referência SFRH/PROTEC/67781/2010.

Nesta tese, cujo tema, consiste no estudo das interações de oxometalatos de vanádio, nióbio, tungsténio e molibdénio com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, foram avaliados os efeitos da interação de oxometalatos com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase através de estudos cinéticos combinados com estudos espectroscópicos.

A dissertação que se apresenta encontra-se dividida em nove capítulos. No primeiro capítulo é feita uma introdução geral para contextualizar o tema proposto, em que se faz referência aos efeitos toxicológicos e potenciais aplicações terapêuticas dos oxometalatos, com especial incidência nos oxometalatos contendo vanádio. Além disso, faz-se uma abordagem ao conhecimento sobre a estrutura e função da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e sua importância biológica. No capítulo 2, apresentam-se os objetivos e propostas de estudo para concretização dos objetivos. Seguidamente, no capítulo 3 descrevem-se os materiais e métodos usados nos estudos. No capítulo 4, apresentam-se sistematizados os resultados obtidos, fazendo-se a sua análise crítica no capítulo 5, designado por discussão. No capítulo 6 apresentam-se as conclusões após o qual se incluiu um capítulo 7, no qual realizou-se uma análise comparativa do modo de ação de fármacos e oxometalatos em bombas iónicas, incluindo a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, como alvos da ação terapêutica. Finalmente, no capítulo 8 são apresentadas as conclusões finais dos estudos apresentados nesta dissertação e as perspetivas de futuras abordagens ao

tema e no capítulo 9, incluem-se as referências bibliográficas que foram utilizadas para contextualizar o tema em estudo, para o estabelecimento das técnicas e protocolos utilizados e para se fazer a análise, interpretação e discussão dos resultados obtidos.

Dos estudos efetuados foram publicados dois artigos, encontrando-se um artigo submetido:

- **Fraqueza, G.**; Ohlin, C.A.; Casey, W. H.; Aureliano, M. (2012). Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interactions with decaniobate, decavanadate, vanadate, tungstate and molybdate. *J. Inorg. Biochem.* 107: 82-89.
- **Fraqueza, G.**; Batista de Carvalho, L.A.E.; Marques, M.P.; Maia, L.; Ohlin, C.A.; Casey, W.H.; Aureliano, M. (2012). Decavanadate, decaniobate, tungstate and molybdate interactions with sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: quercetin prevents cysteine oxidation by vanadate but does not reverse ATPase inhibition. *Dalton Trans.* 41:12749-12758.
- Aureliano, M.; **Fraqueza, G.** (2012). Ionic pumps inhibitors: recent insights into oxometalates interactions with E1E2-ATPases. Submetido para publicação.

Os resultados descritos nesta dissertação, além de publicados em revistas internacionais, também foram divulgados em congressos científicos sob a forma de comunicações em painel e comunicação oral, que se enumeram seguidamente:

### Comunicações orais

- Aureliano, M.; **Fraqueza, G.**; Ohlin, C.A.; Casey, W.H.; Marques, M.P.M.; Carvalho, L.A.E. (2012). Interaction of vanadate, niobate, molybdate and tungstate oxometalates with calcium pump from sarcoplasmic reticulum:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase conformational changes. *Acta of the International Symposia on Metal Complexes – ISMEC. Volume 2. June 18<sup>th</sup>–22<sup>nd</sup>. Lisbon. Symposium Edition: XXIII. OC44. 142-143. ISSN: 2239-2459.*

### Comunicações em poster

- Brissos, R.S.; Fontes, F.L.; Martins, H.; **Fraqueza, G.**; Tiago. T.; Martins, J.; Duarte, R.O.; Moura, J.J.G. and Aureliano, M. (2008). - Vanadium interactions with calcium pump ATPase: an overview. 6th International Vanadium Symposium – Lisboa – 17 a 19 de julho. P44.
- **Fraqueza, G.**; Rito, E.; Brissos, R.S.; Tiago. T.; Martins, J.; Duarte. R.O.; Moura, J.J.G. and Aureliano, M. (2008). - Differential interaction of Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase with Mo.V and W Oxometalates. 6th International Vanadium Symposium – Lisboa – 17 a 19 de julho. P46.
- **Fraqueza, G.**; Carvalho, L.; Marques, P.; Ohlin, C.A.; Casey, W.; Aureliano, M. (2012). Functional and structural interactions of Nb, V, Mo and W oxometalates with the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase reveal new insights into inhibition processes: a combination of NMR, Raman, AA and EPR spectroscopie with kinetic studies. (P20-106). **The FEBS Journal. 279. Suppl. 1. 2012. 52–576.** Abstracts of the 22<sup>nd</sup> IUBMB & 37<sup>th</sup> FEBS Congress Seville, September 4–9. ISSN 1742-464X (Print). ISSN 1742-4658 (Online).

---

**Resumo**

Os oxometalatos são compostos que têm sido descritos por apresentarem propriedades insulino-miméticas, antitumorais, antibióticas, além de serem inibidores das ATPases, nomeadamente a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Contudo, os efeitos da interação dos oxometalatos com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, não é um assunto completamente esclarecido.

Este estudo teve como objetivo, esclarecer o modo de atuação de oxometalatos de vanádio, nióbio, tungstênio e molibdênio na função e estrutura da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS, combinando-se estudos cinéticos com técnicas espectroscópicas. Verificou-se que os oxometalatos estudados inibem a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, sendo o inibidor mais potente o decavanadato com um  $\text{IC}_{50}$  de 15  $\mu\text{M}$ . Foi observado que decavanadato e decaniobato inibem a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de modo não competitivo. Por EAA, observou-se que  $\text{V}_{10}$  liga-se às conformações E1, E1P, E2 e E2P, enquanto foi confirmado que  $\text{V}_1$  liga-se preferencialmente às conformações E2 e E2P. Por outro lado, o vanadato e o decavanadato induzem a oxidação de cisteínas na proteína. A presença do antioxidante quercetina previne a oxidação das cisteínas, mas não a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase por vanadato ou decavanadato. O sinal de V(IV), observado no espectro de RPE de decavanadato na presença  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático e ATP, sugere uma redução de vanadato, devido à interação de  $\text{V}_{10}$  com a proteína. Estes resultados sugerem que a maior capacidade do  $\text{V}_{10}$  para inibir a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pode estar, pelo menos em parte, relacionada com o processo de redução do vanadato associada à oxidação das cisteínas na proteína. Finalmente estes resultados contribuem para a compreensão e aplicação de oxometalatos e polioxometalatos como moduladores eficazes de muitos processos biológicos, particularmente aqueles associados com homeostasia do cálcio. De facto os oxometalatos, em especial os polioxometalatos apresentam capacidade inibitória sobre as bombas iónicas, em especial na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, semelhante a fármacos que têm como alvo de ação terapêutica estas bombas iónicas. Sendo por isso de considerar em estudos, a inclusão deste tipo de oxometalatos em fármacos com aplicação terapêutica.

Palavras-chave: decavanadato, decaniobato,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, polioxometalatos, retículo sarcoplasmático.

**Abstract**

The oxometalates are compounds that have been described with insulin-mimetic, anti-tumor, antibiotic, properties, and it has been reported that these compounds are ATPase inhibitors, in particular  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitors. However, the effects of the interaction of oxometalates with  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, is not a subject completely clarified. In this sense, in this dissertation was deepened the study on the mode of action of oxometalates of vanadium, niobium, tungsten and molybdenum in structure and function of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of RS, combining kinetic and spectroscopy studies.

It was demonstrated that decavanadate ( $\text{V}_{10}$ ) ion is a stronger  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor ( $\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$ ) than the other oxometalates, such as decaniobate ion, and than vanadate, tungstate and molybdate monomer ions. The  $\text{V}_{10}$  interaction with the protein is not affected by any of the protein conformations (E1, E1P, E2 and E2P) that occur during the process of calcium translocation. It was observed that decavanadate and decaniobate are both non-competitive inhibitors of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Moreover, decavanadate and vanadate induce protein cysteine oxidation whereas no effects were detected for decaniobate, tungstate or molybdate ions. The presence of the antioxidant quercetin prevents cysteine oxidation, but not ATPase inhibition, by vanadate or decavanadate. Definitive V(IV) EPR spectra were observed for decavanadate in the presence of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, indicating a vanadate reduction at some stage of the protein interaction. Putting it all together, we suggest that the ability of  $\text{V}_{10}$  to inhibit the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase may be, at least in part, due to the process of vanadate reduction and associated protein cysteine oxidation. In conclusion, the different oxometalates and polyoxometalates studied have different capabilities as modulators of calcium homeostasis. In fact the oxometalates, in particular the polyoxometalates exhibit inhibitory capacity on the ionic pumps, in special in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, similar to drugs which target of therapeutic action are these ionic pumps. The inclusion of this type of oxometalates in drugs with therapeutic application once that have different mechanisms of action, should not be excluded.

Keywords: decavanadate, decaniobate,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, polyoxometalates, sarcoplasmic reticulum

---

**Índice de matérias**
**Capítulo 1**

Introdução geral.....	28
1.1 Introdução.....	29
1.2 Vanádio: aspetos gerais e atividades biológicas.....	30
1.3 Ocorrência e toxicocinética dos compostos de vanádio.....	32
1.3.1 Toxicocinética.....	33
1.4 Química de vanádio em solução.....	36
1.4.1 Vanádio(V): Vanadato.....	37
1.4.2 Vanádio(IV): Vanadilo.....	39
1.5 Efeito de Vanádio na atividade da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.....	40
1.6 Efeitos fisiológicos e toxicológicos de vanádio.....	43
1.6.1 Efeitos tóxicos do vanádio mediados por decavanadato.....	47
1.6.2 Toxicidade de vanádio e stresse oxidativo.....	48
1.7 Compostos de vanádio e suas potenciais aplicações terapêuticas.....	51
1.7.1 Vanádio e diabetes.....	53
1.7.2 Vanádio e tumores.....	59
1.7.3 Efeitos do vanádio no tecido ósseo.....	61
1.7.4 Compostos de vanádio: Efeitos cardioprotetores.....	62
1.7.5 Outros metais: Tungsténio, molibdénio e nióbio.....	63
1.8 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático.....	64
1.8.1 Importância biológica da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.....	66
1.8.2 Estrutura da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.....	67
1.8.3 Mecanismo e ciclo catalítico da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.....	71
1.8.3.1 A Ligação do $\text{Ca}^{2+}$ : $\text{E2} \rightarrow \text{E1} \rightarrow \text{E1} \cdot 2 \text{Ca}^{2+}$ .....	75
1.8.3.2 Formação do estado de transição: $\text{E1} \cdot 2\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{E1} \cdot \text{P}$ .....	76
1.8.3.3 Libertação do $\text{Ca}^{2+}$ para o lúmen do RS: $\text{E1} \cdot \text{P} \rightarrow \text{E2} \cdot \text{P}$ .....	76
1.8.3.4 Hidrólise do aspartilfosfato: $\text{E2} \cdot \text{P} \rightarrow \text{E2}$ .....	77
1.8.4 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase um alvo de ação de fármacos.....	79

**Capítulo 2**

Objetivos.....	81
----------------	----

**Capítulo 3**

Materiais e métodos.....	84
3.1 Reagentes.....	85
3.2 Preparação de soluções de oxometalatos.....	85
3.2.1 Soluções de vanadato.....	85
3.2.2 Soluções de molibdato.....	86
3.2.3 Soluções de tungstato.....	86
3.2.4 Soluções de decaniobato.....	86
3.3 Isolamento de vesículas de retículo sarcoplasmático (VRS) de músculo-esquelético de coelho.....	86
3.4 Caracterização da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS.....	89
3.4.1 Quantificação do teor em proteína nas VRS expresso em quantidade de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pelo método de Bradford.....	89
3.4.2 Eletroforese em condições desnaturantes SDS-PAGE.....	91
3.4.3 Estudo da atividade da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS.....	94
3.5 Estudo da variação de atividade da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase com a incubação em diferentes soluções de oxometalatos.....	96
3.6 Determinação de resíduos de cisteína reduzidos.....	97
3.7 Estudos por espectroscopia de absorção atômica da interação de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase com oxometalatos de vanádio.....	97
3.7.1 Determinação de limites de deteção e quantificação.....	98
3.7.2 Preparação das amostras para quantificação do conteúdo em vanádio.....	98
3.7.3 Validação do método.....	100
3.7.4 Análise da interação das diferentes conformações da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS com oxometalatos por EAA.....	101
3.7.5 Determinação da estequiometria da ligação do decavanadato à $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS.....	101
3.7.6 Determinação da constante de dissociação $K_d$ entre decavanadato e $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS pelo método de Scatchard.....	102

3.7.7 Efeito de decaniobato e heparina na interação entre $V_{10}$ e $Ca^{2+}$ -ATPase de RS.....	102
3.7.8 Análise de resultados.....	103
3.8 Espetroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	103
3.8.1 Caracterização das soluções de vanadato e estudos de interação de $V_{10}$ com a $Ca^{2+}$ -ATPase de RS por $^{51}V$ -RMN.....	106
3.9 Ressonância paramagnética eletrônica.....	107
3.9.1 Análise da formação de vanadilo por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica.....	108
3.10 Espetroscopia de Raman.....	108
3.11 Análise estatística.....	109
<b>Capítulo 4</b>	
Resultados.....	111
4.1 Isolamento e caracterização da $Ca^{2+}$ -ATPase de vesículas de retículo sarcoplasmático (VRS) de músculo-esquelético de coelho.....	112
4.1.1 Quantificação do teor em proteína presente nas vesículas do retículo sarcoplasmático de músculo-esquelético de coelho.....	112
4.1.2 Análise do grau de pureza da $Ca^{2+}$ -ATPase de VRS de coelho por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	112
4.1.3 Estudos de avaliação da atividade da $Ca^{2+}$ -ATPase.....	113
4.2 Interações dos oxometalatos de vanádio (V), nióbio (Nb), molibdênio (Mo) e tungstênio (W) com a $Ca^{2+}$ -ATPase de RS.....	114
4.2.1 Inibição da atividade da $Ca^{2+}$ -ATPase por oxometalatos de V, W e Mo e polioxometalatos de V e Nb.....	115
4.2.2 Inibição da $Ca^{2+}$ -ATPase em função do tempo de incubação com os oxometalatos.....	118
4.2.3 Tipo de inibição da $Ca^{2+}$ -ATPase por decavanadato, decaniobato e tungstato	121
4.2.4 Estudos de oxidação de cisteínas e efeitos de agentes antioxidantes na reversão da oxidação e na inibição da $Ca^{2+}$ -ATPase induzida pelos oxometalatos.....	124
4.2.4.1 Oxidação de cisteínas por oxometalatos e reversão por antioxidantes...	124
4.2.4.2 Análise da redução de decavanadato por espectroscopia de RPE.....	126

4.2.4.3 Efeito de agentes antioxidantes na reversão da inibição da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase induzida pelos oxometalatos.....	127
4.2.5 Estudos da interação de vanadato e decavanadato com a $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS por espectroscopia de absorção atômica.....	129
4.2.5.1 Interação de vanadato e decavanadato com a $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS nas suas diferentes conformações por EAA.....	129
4.2.5.2 Determinação da estequiometria de ligação $\text{V}_{10}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS e da constante de dissociação ( $K_d$ ) por EAA.....	132
4.2.5.3 Análise por EAA do efeito de heparina e de decaniobato na interação $\text{V}_{10}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.....	135
4.2.6 Estudos da interação decavanadato com a $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS por espectroscopia de RMN.....	136
4.2.7 Estudos estruturais por Espectroscopia Raman.....	139
<b>Capítulo 5</b>	
Discussão.....	146
5.1 Inibição da atividade da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase por oxometalatos de vanádio, nióbio, tungstênio e molibdênio.....	147
5.2 Oxidação de cisteínas e análise da redução de decavanadato por espectroscopia de RPE. Efeitos de agentes antioxidantes na reversão da oxidação e na inibição da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase induzida por oxometalatos.....	151
5.3 Interação de oxometalatos com a $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase por espectroscopia de absorção atômica (EAA), espectroscopia de $^{51}\text{V}$ -RMN e espectroscopia Raman.....	154
<b>Capítulo 6</b>	
Conclusões.....	160
<b>Capítulo 7</b>	
As bombas iônicas como alvos de ação de fármacos e oxometalatos.....	163
7.1 Introdução.....	164
7.2 Inibidores de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase.....	166
7.3 Inibidores de $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase.....	168
7.4 Inibidores de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.....	174

7.5 Conclusões.....	176
<b>Capítulo 8</b>	
Conclusões finais e perspectivas futuras.....	179
<b>Capítulo 9</b>	
Referências bibliográficas.....	182

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Transporte de vanádio para a célula, sua metabolização e efeitos em processos intracelulares (Adaptado de Zaporowska e Scibor, 1998a).....	35
<b>Figura 1.2</b> - Geometrias de complexos de vanádio com diferentes números de coordenação, em que L é o ligando e, V o vanádio. (a) tetraédrica, (b) pirâmide quadrangular, (c) bipiramidal trigonal, (d) octaédrica e (e) bipiramidal pentagonal (Adaptado de Crans et al., 1998).....	36
<b>Figura 1.3</b> - Espécies de vanadato (V(V)) predominantes em solução aquosa em função do pH. (Adaptado de Chasteen, 1983).....	37
<b>Figura 1.4</b> - Espécies de vanadato em solução aquosa: oxovanadatos. (Aureliano e Crans, 2009).....	39
<b>Figura 1.5</b> - Efeito do vanadato monomérico ( $V_1$ ) no mecanismo de translocação do cálcio pela $Ca^{2+}$ -ATPase, bloqueando a enzima na conformação E2.....	42
<b>Figura 1.6</b> - 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 aniônicos (CA) e/ou interatue com proteínas membranares, assim como se forme após acidificação intracelular; indica-se também a redução do vanadato monomérico ( $V_1$ ) por ação 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; indica-se a possibilidade do vanádio originar ROS e consequente ação em diversos processos biológicos, propõe-se a acumulação de $V_{10}$ em organelos subcelular, como a mitocôndria, afetando a sua função e o efeito do $V_{10}$ no sistema contrátil e na atividade da $Ca^{2+}$ -ATPase com consequência na homeostasia do cálcio (Adaptado de Aureliano e Gândara, 2005; Aureliano, 2011).....	48
<b>Figura 1.7</b> - Vias de formação de ROS nas células mediadas por vanádio. O vanádio entra nas células e como resultado de reações com antioxidantes intracelulares encontra-se predominantemente no estado de oxidação (+4) (Aureliano e Gândara, 2005; Kordowiak e Holko, 2009). Os compostos de vanádio no estado de oxidação (+4) são oxidados pelo oxigénio ao estado de oxidação (+5) originando o radical do anião superóxido, estes por sua vez podem complexar num radical peroxovanádio (+4) que é reduzido pelo NADPH e origina o peróxido de hidrogénio. Na reação de Fenton o vanádio no estado de oxidação (+4) é oxidado pelo peróxido de hidrogénio e origina a formação do radical hidroxilo (Cuesta et al., 2011) (Korbecki et al., 2012).....	49
<b>Figura 1.8</b> - Mecanismos de ação antidiabética possíveis para os compostos de vanádio. Os compostos de vanádio podem inibir a PTP1B o que impede a desfosforilação do recetor da insulina (IR). Outra via de atuação refere que os compostos de vanádio ativam o recetor da insulina (IR) que é uma tirosina quinase que catalisa a fosforilação da proteína celular IRS1 que ativa a PKB/Akt que por sua vez além de outras atividades ativa a proteína transportadora de glucose GLUT4 que transporta para célula a glucose (Adaptado de Sakurai et al., 2008).....	57

<b>Figura 1.9</b> - Modelo dos efeitos da combinação substratos de SSAO (benzilamina) e vanadato na homeostasia da glucose (Zorzano et al., 2009).....	58
<b>Figura 1.10</b> - Vias de ação dos compostos de vanádio de modo a exercerem atividades farmacológicas (Adaptado de Barrio e Etcheverry, 2010).....	63
<b>Figura 1.11</b> - Mecanismo cinético do transporte ativo de cálcio por $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (Adaptado de Voet e Voet, 2011).....	65
<b>Figura 1.12</b> - Esquema do acoplamento excitação-contração. Um estímulo permite a entrada de cálcio extracelular e liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, o cálcio liga-se à fibra muscular e produz-se a contração muscular. O relaxamento ocorre quando o cálcio é transportado para o lado extracelular ou para o lúmen do retículo sarcoplasmático pelas $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (Adaptado de Mundiña-Weilennann, et al., 2001)..	66
<b>Figura 1.13</b> -Translocação reversível de cálcio pela $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS, ocorrendo síntese ou hidrólise de ATP (Adaptado de Aureliano, 2011).....	68
<b>Figura 1.14</b> - Estrutura da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático. As hélices $\alpha$ encontram-se representadas por cilindros, as folhas $\beta$ por setas. Os domínios citoplasmáticos A, P, N encontram-se coloridos de azul, amarelo e verde, respetivamente. As quatro hélices $\alpha$ envolvidas na ligação do $\text{Ca}^{2+}$ encontram-se destacadas da seguinte maneira: M4 amarelo, M5 lilás, M6 verde e M8 azul. Um dos dois iões de cálcio (esfera laranja) é visível nesta representação (Lee e East, 2001).....	69
<b>Figura 1.15</b> - Locais de alta afinidade para a ligação do $\text{Ca}^{2+}$ na $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. O local I é constituído por ligandos correspondentes às hélices M5, M6 e M8, já os ligandos do local II são predominantemente da hélice M4. O Asp800 coordena a ligação de ambos os catiões de $\text{Ca}^{2+}$ (representados por esferas de coloração amarela) (Lee e East, 2001)...	71
<b>Figura 1.16</b> - Ciclo catalítico da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Inicialmente ocorre a interação de dois iões $\text{Ca}^{2+}$ e uma molécula de ATP com a conformação E1 da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase no citoplasma (reações 1 e 2). Segue-se então a fosforilação da enzima pela molécula de ATP, sendo os iões ligados aos respetivos locais de ligação (reação 3), passando a enzima para a conformação E1PCa <sub>2</sub> . A reação 4, é caracterizada pela transformação da conformação E1PCa <sub>2</sub> na conformação E2PCa <sub>2</sub> , na qual há uma perda de afinidade pelo ADP sendo esta acompanhada pela perda de afinidade para os iões $\text{Ca}^{2+}$ . Estes são então libertados para espaço lumenal (reação 5). Segue-se então a hidrólise do enzima libertando o Pi (reação 6) para o citoplasma em que a enzima adota a conformação E2 e pode finalizar o ciclo originando a conformação E1. (Adaptado de Martinosi e Pikula, 2003; Daiho et al., 2003).....	73
<b>Figura 1.17</b> - Ciclo catalítico e estrutura da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas quatro conformações diferentes do ciclo catalítico com esquema reacional simplificado (cada conformação é identificada por uma cor diferente). As estruturas que representam a $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E1P, E2P e E2 foram obtidas por cristalização com substratos análogos $\text{Mg}^{2+}$ -ADP, $\text{AlF}_4^-$ , $\text{BF}_3^-$ e TG, respetivamente. Os iões de cálcio que se encontram ligado à estrutura encontram-se representados por esferas roxas numeradas e estão circunscritos para uma melhor visualização dos mesmos. Na figura estão evidenciados	

- alguns resíduos importantes, nomeadamente E183 (Domínio A), F487 e R560 (Domínio N, auxiliam na ligação do ATP), D351 (local de fosforilação), D627 e D703 (Domínio P). As setas que se encontram nas conformações indicam o movimento dos domínios resultante do funcionamento da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Toyoshima, 2008)..... 74
- Figura 1.18** - Desenho ilustrativo das modificações estruturais da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase durante o ciclo catalítico (Toyoshima, 2008)..... 78
- Figura 4.1** - Estruturas de decavanadato, decaniobato e das espécies monoméricas de vanadato, tungstato e molibdato..... 115
- Figura 4.2** - Efeitos do vanadato ( $\text{V}_1$ ) (■), decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) (●) e tungstato (W) (▲) na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (RS). Os ensaios foram realizados com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de vesículas de retículo sarcoplasmático contendo  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase incubadas num meio contendo 25 mM HEPES (pH 7.0), 100 mM KCl, 5.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 0.42 mM fosfoenolpiruvato, 0.25 mM NADH e concentrações crescentes dos diferentes oxometalatos indicadas no eixo das abcissas. Após incubação adicionou-se desidrogenase de lactato 18 UI, cinase de piruvato 7,5 UI e ATP 2.5mM. Após a adição do ATP iniciou-se a medição da reação e após 2 minutos adicionou-se 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de A23187 monitorizando-se a reação por mais 5 minutos. As curvas foram obtidas pelas médias correspondentes a seis experiências independentes relativas a seis concentrações diferentes de cada oxometalato. A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental..... 116
- Figura 4.3** - Efeito de molibdato na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (RS). A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental..... 117
- Figura 4.4** - Efeitos de decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) (●) e decaniobato ( $\text{Nb}_{10}$ ) (■), na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (RS). A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental..... 118
- Figura 4.5** - Atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em função do tempo de incubação com  $\text{V}_1$ ,  $\text{V}_{10}$ , W e Mo. A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi determinada e calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. As concentrações dos oxometalatos usadas nos ensaios foram as concentrações dos  $\text{IC}_{50}$  respetivos. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental..... 119
- Figura 4.6** - Efeitos comparativos dos oxometalatos na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, após 60 minutos de incubação sem e com DTT (1mM). A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi determinada e calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. As concentrações dos oxometalatos usadas nos ensaios foram as concentrações dos  $\text{IC}_{50}$  respetivos. Nos ensaios com DTT adicionou-se 1 mM antes de se proceder à incubação. Os resultados

- experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental. \*Significativamente diferente do controlo ( $p < 0,05$ )..... 120
- Figura 4.7** - Efeitos comparativos dos oxometalatos na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, após 120 minutos de incubação sem e com DTT (1mM). A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi determinada e calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. As concentrações dos oxometalatos usadas nos ensaios foram as concentrações dos  $\text{IC}_{50}$  respetivos. Nos ensaios com DTT adicionou-se 1 mM antes de se proceder à incubação. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental. \*Significativamente diferente do controlo ( $p < 0,05$ )..... 120
- Figura 4.8** - Representação de Lineweaver-Burk da inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS pelo decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ). A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP foi determinada e calculada de acordo com a equação 3.3. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental..... 121
- Figura 4.9** - Representação de Lineweaver-Burk da inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS pelo decaniobato ( $\text{Nb}_{10}$ ). A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP foi determinada e calculada de acordo com a equação 3.3. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultaram da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental..... 122
- Figura 4.10** - Representação de Lineweaver-Burk da inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS pelo tungtato. A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP foi determinada e calculada de acordo com a equação 3.3. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultaram da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental..... 123
- Figura 4.11** - Determinação do conteúdo em cisteínas reduzidas na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS após incubação com oxometalatos. Os grupos tiol acessíveis foram medidos, na ausência de agentes desnaturantes, como indicado na secção 3.6. Os dados são representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Os resultados apresentados são a média de ensaios em triplicado. A titulação do conteúdo em cisteína foi realizada em HEPES (pH 7,0), 100 mM de KCl, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 55 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,2), após 5 minutos de incubação de 0,2 mL  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS (1 mg/mL) com vanadato (1mM), decavanadato (0,3 mM), decaniobato (0,035 mM), tungstato (8 mM) ou molibdato (45 mM) , na ausência ou na presença dos seguintes antioxidantes: glutathiona reduzida (GSH) (1 mM), a quercetina (100  $\mu\text{M}$ ) ou canferol (100  $\mu\text{M}$ ). O aumento da absorvência, a 412 nm, foi continuamente registado durante 5 min; até um valor de equilíbrio foi atingido. \*Significativamente diferente do controlo ( $p < 0,05$ )..... 125
- Figura 4.12** - Espetros de RPE da banda X, obtidos a 9624 GHz e a uma temperatura de 77K, de soluções contendo 5 mM decavanadato (vanádio total) em 25 mM HEPES (pH 7,0), 100 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, na ausência (A) e na presença 2,5 mM ATP (B). Os espetros foram adquiridos como descrito na secção 3.9.1. Após a adição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase são observados os sinais típicos do vanádio(IV)..... 126

- Figura 4.13** - Espectro de RPE experimental da amostra contendo  $V_{10}$ ,  $Ca^{2+}$ -ATPase e ATP (linha preta), espectro experimental corrigido (linha azul) e simulação possível do espectro experimental (linha vermelha)..... 127
- Figura 4.14** - Efeito da glutathiona reduzida (GSH) na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, em presença de concentrações de  $IC_{50}$  dos oxometalatos. A atividade foi medida como indicado na secção 3.4.3 e calculada de acordo com as equações 3.3 e 3.4. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão, de ensaios em triplicado..... 128
- Figura 4.15** - Efeito dos antioxidantes quercetina e canferol na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, em presença de concentrações de  $IC_{50}$  dos oxometalatos de vanádio  $V_1$  e  $V_{10}$ . A atividade foi medida como indicado na secção 3.4.3 e calculada de acordo com as equações 3.3 e 3.4. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão, de ensaios em triplicado..... 128
- Figura 4.16** - Análise das espécies de vanádio  $V_1$  e  $V_{10}$  ligadas nas diferentes conformações da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS por espectroscopia de absorção atômica (EAA). Amostras contendo Vanadato ( $V_1$ ) ou decavanadato ( $V_{10}$ ) com a concentração de  $1 \mu M$  para ambas as espécies de vanádio e igual concentração de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS ( $1 \mu M$ ), num meio contendo: KCl 0,1 M, HEPES 25 mM pH 7,0 e  $MgCl_2$  5 mM e a)  $CaCl_2$   $50 \mu M$  (+Ca/-ATP); b)  $CaCl_2$   $50 \mu M$  e ATP 2,5 mM (+Ca/+ATP); c) EGTA 0,5 mM (+EGTA); d) EGTA 50 mM e fosfato 5 mM (+EGTA/+Pi), foram centrifugadas de acordo com o descrito na secção 3.7.7 e os sobrenadantes foram analisados no seu conteúdo em vanádio. Amostras controlo de  $V_1$  e  $V_{10}$  com a mesma concentração,  $1 \mu M$ , na ausência de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS foram tratadas nas mesmas condições e nos diferentes meios. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental. \*Significativamente diferente do controlo ( $p < 0,05$ )... 130
- Figura 4.17** - Análise da ligação  $V_{10}$ - $Ca^{2+}$ -ATPase de RS nas conformações E1 e E1P, após incubação com proporções metal proteína (1:2; 1:1; 2:1;10:1) em  $\mu M$ , por EAA num meio contendo: KCl 0,1 M, HEPES 25 mM pH 7,0 e  $MgCl_2$  5 mM e a)  $CaCl_2$   $50 \mu M$  (+Ca/-ATP); b)  $CaCl_2$   $50 \mu M$  e ATP 2,5 mM (+Ca/+ATP). As amostras foram centrifugadas de acordo com o descrito na secção 3.7.7 e os sobrenadantes foram analisados no seu conteúdo em vanádio. Amostras controlo de  $V_{10}$  com a mesma concentração,  $1 \mu M$ , na ausência de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS foram tratadas nas mesmas condições e nos diferentes meios. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental..... 131
- Figura 4.18** - Análise da ligação  $V_{10}$ - $Ca^{2+}$ -ATPase de RS nas conformações E2 e E2P, após incubação com proporções metal:proteína (1:2; 1:1; 2:1;10:1) em  $\mu M$ , por EAA num meio contendo: a) KCl 0,1 M, HEPES 25 mM pH 7,0,  $MgCl_2$  5 mM e EGTA 0,5mM (+EGTA); b) EGTA 50 mM e fosfato 5 mM (+EGTA/+Pi). As amostras foram centrifugadas de acordo com o descrito na secção 3.7.7 e os sobrenadantes foram analisados no seu conteúdo em vanádio. Amostras controlo de  $V_{10}$  com a mesma concentração,  $1 \mu M$ , na ausência de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS foram tratadas nas mesmas condições e nos diferentes meios. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental..... 132

- Figura 4.19** - Determinação da estequiometria de ligação  $V_{10}:Ca^{2+}$ -ATPase de RS pelo método de Job modificado. Foram incubadas amostras  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS contendo  $1\mu M$  com concentrações de  $V_{10}$  entre 0 e  $2\mu M$ , num meio contendo KCl  $0,1 M$ , HEPES  $25 mM$  pH  $7,0$ ,  $MgCl_2$   $5 mM$  e  $CaCl_2$   $50\mu M$ . Após centrifugação de acordo com o descrito na secção 3.7.7, os sobrenadantes foram analisados no seu conteúdo em vanádio por EAA. Amostras controlo de  $V_{10}$  com as mesmas concentrações, na ausência de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, foram tratadas nas mesmas condições. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental..... 133
- Figura 4.20** - Determinação da estequiometria de ligação  $V_{10}:Ca^{2+}$ -ATPase de RS pelo método de Job. Foram incubadas amostras  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS contendo entre 0 e  $1\mu M$  com concentrações de  $V_{10}$  entre 0 e  $1\mu M$  e nas seguintes proporções  $V_{10}$ :proteína ( $\mu M$ ) (1:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:1) num meio contendo KCl  $0.1 M$ , HEPES  $25 mM$  pH  $7,0$ ,  $MgCl_2$   $5 mM$  e  $CaCl_2$   $50\mu M$ . Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental..... 133
- Figura 4.21** - Análise da interação entre  $V_{10}$  e  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS pelo método de Scatchard. Os ensaios foram realizados com as seguintes razões entre metal e proteína ( $\mu M$ ): 1:4, 1:2, 1:1 2:1,10:1 e 20:1 num meio contendo KCl  $0,1 M$ , HEPES  $25 mM$  pH  $7,0$ ,  $MgCl_2$   $5 mM$  e  $CaCl_2$   $50\mu M$ . Após centrifugação de acordo com o descrito na secção 3.7.7, os sobrenadantes foram analisados no seu conteúdo em vanádio por EAA. Amostras controlo de  $V_{10}$  com as mesmas concentrações, na ausência de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, foram tratadas nas mesmas condições. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental..... 134
- Figura 4.22** - Análise de vanádio por espectrofotometria de absorção atómica (EAA) de amostras contendo  $V_{10}$  ( $1\mu M$ ) após adição de uma concentração igual de  $Ca^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático ( $1\mu M$ ), na presença de heparina ou decaniobato. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante analisado por EAA como o descrito na secção 3.7.2. Os resultados são representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Os resultados apresentados são a média de ensaios em triplicado. \*Significativamente diferente do controlo ( $p < 0,05$ )..... 135
- Figura 4.23** - Espetros de RMN do isótopo 51 de vanádio ( $105,2 MHz$ ), à temperatura ambiente, de decavanadato ( $5 mM$  vanadato total) em  $25 mM$  HEPES (pH  $7,0$ ),  $100mM$  KCl,  $5 mM$   $MgCl_2$ ,  $50\mu M$   $CaCl_2$  (a) e após adição sucessiva de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS (b),  $2,5 mM$  de ATP (c) e decaniobato ( $1mM$ ) (d)..... 136
- Figura 4.24** - Espetros de RMN do isótopo 51 de vanádio ( $105,2 MHz$ ), à temperatura ambiente, de decavanadato ( $5 mM$  vanadato total) em  $25 mM$  HEPES (pH  $7,0$ ),  $100mM$  KCl,  $5 mM$   $MgCl_2$ ,  $50\mu M$   $CaCl_2$  (a) e após adição sucessiva de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS (b), decaniobato ( $1 mM$ ) (c) e decaniobato ( $0,5 mM$ ) (d)..... 137
- Figura 4.25** - Espetros de Raman da  $Ca^{2+}$ -ATPase nas conformações E1 e E1P..... 139

---

<b>Figura 4.26</b> - Espectros de Raman da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E1 e E2.....	140
<b>Figura 4.27</b> - Espectros de Raman da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase na conformação E2 e após fosforilação na conformação E2P.....	140
<b>Figura 4.28</b> - Espectros de Raman de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E1, E1P e na presença de molibdato (acima, A) ou tungstato (abaixo, B).....	141
<b>Figura 4.29</b> - Espectros de Raman de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E1, E1P e na presença de decavanadato.....	142
<b>Figura 4.30</b> - Espectros de Raman de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E1, E1P e na presença de decaniobato.....	142
<b>Figura 4.31</b> - Espectros de Raman de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E1, E1P e na presença de vanadato.....	143
<b>Figura 4.32</b> - Espectros de Raman de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E2, E2P e na presença de decavanadato.....	143
<b>Figura 4.33</b> - Espectros de Raman de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E2, E2P e na presença de decaniobato.....	144
<b>Figura 4.34</b> - Espectros de Raman de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E2, E2P e na presença de vanadato.....	144
<b>Figura 4.35</b> - Espectros de Raman de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E2, E2P e na presença de tungstato.....	145
<b>Figura 4.36</b> - Espectros de Raman de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E2, E2P e na presença de molibdato.....	145
<b>Figura 7.1</b> - A ligação dos inibidores esteroides cardiotônicos (CTS) na $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase localiza-se na zona extracelular junto à entrada do canal de saída dos íons (Adaptado de Yatime et al., 2009).....	167
<b>Figura 7.2</b> - Eventuais modos de ação de fármacos e compostos de vanádio ( $\text{V}_{10}$ ) com as bombas iônicas de $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Na}^+/\text{K}^+$ e $\text{H}^+/\text{K}^+$ ATPase. Estas bombas iônicas transportam cátions contra o gradiente e são alvos específicos de medicamentos ou fármacos e também de decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) em locais específicos de ligação. A maioria dos fármacos ligam-se do lado extracelular perto a entrada dos sítios de ligação dos cátions, na região transmembranar dentro da bicamada, enquanto o decavanadato liga-se a uma região formada pelos três domínios da proteína no lado citoplasmático.....	177

---

---

**Índice de Tabelas**

<b>Tabela 3.1</b> - Condições para determinação da curva de calibração para determinar o teor em proteína pelo método de Bradford.....	90
<b>Tabela 3.2</b> - Condições de análise para determinação do teor em proteína nas amostras de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.....	90
<b>Tabela 3.3</b> - Reagentes e volumes utilizados na preparação dos géis de separação e concentração.....	92
<b>Tabela 3.4</b> - Marcadores moleculares utilizados na SDS-PAGE.....	94
<b>Tabela 3.5</b> - Caracterização das condições operatórias, parâmetros da câmara de grafite e parâmetros de amostragem utilizados na EAA eletrotérmica.....	99
<b>Tabela 3.6</b> - Parâmetros de programação da câmara de grafite utilizados para a determinação da concentração de vanádio por EAA eletrotérmica, no espectrofotómetro de absorção atômica GBC Avanta.....	100
<b>Tabela 3.7</b> - Valor do fator de rendimento do MRC utilizado segundo o teste “Z-scores” e valor certificado do MRC para o vanádio.....	101
<b>Tabela 3.8</b> - Valores de largura a meia altura ( $\Delta_{1/2}$ ) obtidos em vários tipos de coordenação de átomos de vanádio. (Adaptado de Rehder, 1982).....	105
<b>Tabela 3.9</b> - Fórmulas, valores de pKa, desvios químicos, cor e estrutura das principais espécies de oxovanadatos em solução aquosa. (Adaptado de Crans et al.,1990).....	105
<b>Tabela 4.1</b> - Valores de $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$ na ausência ou na presença de 10 e 50 $\mu\text{M}$ de $\text{V}_{10}$ ....	122
<b>Tabela 4.2</b> - Valores de $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$ na ausência ou na presença de 10 e 50 $\mu\text{M}$ de $\text{Nb}_{10}$ ....	123
<b>Tabela 4.3</b> - Valores de $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$ na ausência ou na presença de 100, 300 e 500 $\mu\text{M}$ de tungstato.....	124
<b>Tabela 4.4</b> - Parâmetros espectrais de RMN, à temperatura ambiente, nomeadamente desvio químico ( $\delta$ ), largura a meia altura ( $\Delta v_{1/2}$ ) e fator de alargamento da largura a meia altura ( $f$ ) que é definido como o coeficiente entre o valor da $\Delta v_{1/2}$ na ausência e na presença de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS (5 mg/mL) das espécies de vanadato monomérico ( $\text{V}_1$ ), dimérico ( $\text{V}_2$ ), tetramérico ( $\text{V}_4$ ) e decamérico ( $\text{V}_{10}$ ) presentes em solução de decavanato 5 mM de vanádio total, correspondente a 0,5 mM de $\text{V}_{10}$ em diferentes condições experimentais.....	138
<b>Tabela 7.1</b> - Valores de $\text{IC}_{50}$ , $K_d$ e aplicações terapêuticas de compostos inibidores de ATPases do tipo P.....	169

---

**Abreviaturas e Símbolos**

Å	angströms
A23187	calcimicina
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADP	adenosina 5'-difosfato
AlF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	tetrafluoroaluminato
Ar	árgon
Arg (R)	arginina
Asp (D)	ácido aspártico
Asn (N)	asparagina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
ATPase	adenosina 5'-trifosfatase
BEOV	bis(etilmaltolato)oxovanádio(IV)
BF <sub>3</sub> <sup>-</sup>	trifluoroborato
BHQ	2,5-di-( <i>t</i> -butil)-dihidroxiquinona
BHT	butil-hidroxitolueno
BMOV	bis(maltolato)oxovanádio(IV)
2,3-BPG	2,3-bifosfoglicerato
BSA	albumina de soro bovino
°C	grau Celsius
CA	canal aniónico
CLQ	cloroquina
CPA	ácido ciclopiazónico
CPZ	cloropromazina
CTS	esteroides cardiotónicos
Cys (C)	cisteína
DAS	diacetil scopadol
DMO	densidade mineral óssea
DO	densidade ótica
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
DTT	ditiotreitól
EAA	espectroscopia de absorção atómica

---

EGTA	ácido etilenoglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter) <i>N,N,N',N'</i> -tetra-acético
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	força da gravidade
Glu (E)	ácido glutâmico
GLUT4	transportador de glucose tipo 4
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
GSK3	glicogénio sintetase cinase 3
Gly (G)	glicina
HbA1c	hemoglobina glicosilada
HEPES	ácido ( <i>N</i> -2-hidroxietil) piperazina- <i>N'</i> -2-etanosulfónico
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HMW	padrões de alta massa molecular
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogénio
Hz	ciclos por segundo (hertz)
IC <sub>50</sub>	concentração inibitória, 50%
Ile (I)	isoleucina
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trifosfato
IR	recetor de insulina (proteína tirosina quinase)
IRS	substrato do recetor de insulina
ISO	Organização Internacional de Normalização
K	Kelvin
K <sub>d</sub>	constante de dissociação
kDa	quiloDalton
K <sub>M</sub>	constante de Michaelis
L	ligando
LMW	padrões de baixa massa molecular
Lys (K)	lisina
M	molaridade (mol/L)
mA	miliampere
METVAN	[bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sulfato-oxovanádio(IV)]
min	minuto
MRC	material de referência certificado

---

---

MΩ	megaohm
NADH	nucleótido de nicotinamida adenina (forma reduzida)
NADPH	nucleótido de nicotinamida da adenina fosfato (forma reduzida)
Nb <sub>10</sub>	decaniobato
NF-kB	fator nuclear kB
nm	nanometros
NO	óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anião superóxido
OH <sup>·</sup>	radical hidroxilo
PCAB	bloqueadores ácidos competitivos do potássio
PEP	fosfoenolpiruvato
pH	potencial de hidrogénio
Phe (F)	fenilalanina
P <sub>i</sub>	ortofosfato (sem especificar o estado de protonação)
PI3K	PI3K - fosfatidilinositol-3-cinase
pK <sub>a</sub>	constante de acidez expressa em logaritmo negativo de base decimal
PKB, AKt	proteína cinase B
PMCA	ATPase de cálcio de membrana plasmática
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo
ppb	partes por bilião
PP <sub>i</sub>	pirofosfato
PPI	inibidores da bomba de protões
ppm	partes por milhão
PSA	persulfato de amónio
PTP	proteína fosfatase de tirosina
PTX	palatoxina
RE	retículo endoplasmático
RMN	ressonância magnética nuclear
ROS	espécies reativas de oxigénio
RPE	ressonância paramagnética eletrónica
rpm	rotações por minuto
RS	retículo sarcoplasmático
SA-B	ácido scopadúlcico B

---

---

SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
SERCA	ATPase de cálcio do retículo sarco(endo)plasmático
SERCA1	ATPase de cálcio do retículo sarco(endo)plasmático, isoforma de músculo-esquelético.
SOD	dismutase do superóxido
SSAO	amino-oxidases sensíveis a semicarbazidas
STZ	estreptozotocina
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butil-hidroperóxido
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilenodiamina
TG	tapsigargina
Thr (T)	treonina
TNB	2-nitro-5-tiobenzoato
TORT-2	material de referência marinho para metais vestigiais
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
u.a.	unidades arbitrárias
UI	unidade internacional de atividade enzimática
V <sub>1</sub>	vanadato monomérico
V <sub>10</sub>	decavanadato
V <sub>x</sub>	outras espécies oligoméricas de vanádio
<sup>50</sup> V	isótopo de vanádio de massa atômica 50
<sup>51</sup> V	isótopo de vanádio de massa atômica 51
VAC	acetilacetato de vanadilo
V <sub>máx</sub>	velocidade máxima
VRS	vesículas de retículo sarcoplasmático

# Capítulo 1

---

## Introdução geral

---

## 1.1 Introdução

O uso de metais com aplicações terapêuticas tem aumentado a sua importância no último par de décadas. Oxometalatos de vanádio (V), tungstênio (W) e molibdênio (Mo) têm sido usados para a preparação de numerosas substâncias farmacologicamente ativas e para a determinação de diferentes parâmetros bioquímicos (Stankov, *et al.*, 2007). Também tem sido mostrado, que este tipo de oxometalatos, atuam em sistemas enzimáticos celulares que conduzem à normalização da pressão sanguínea, bem como à normalização dos níveis de glucose e de lípidos no soro sanguíneo (Nomiya, *et al.*, 2001; Stankov, *et al.*, 2007). O efeito insulino-mimético de oxometalatos de vanádio(V) tem sido associado a uma regulação específica dos recetores de proteína-cinases incluindo o recetor de insulina tirosina-cinase (Matsumoto, 1994; Ahmad, *et al.*, 2006). Também, tungstato(VI) e molibdato(VI) apresentam efeitos insulino-miméticos em adipócitos e hepatócitos de ratos (Matsumoto, 1994).

Uma vez que estes oxometalatos existem naturalmente nos organismos vivos, a terapia com oxometalatos poderá ser uma via de tratamento da diabetes se houver disponibilidade destes oxometalatos para administração oral como substitutos da insulina (Nomiya, *et al.*, 2001). Então a administração oral de vanadato, molibdato ou tungstato podem ser uma alternativa viável para quimioterapia em muitas doenças, além da diabetes mellitus, uma vez que várias cinases e/ou fosfatases de tirosina estão envolvidas numa variedade de doenças (Matsumoto, 1994). Avanços em química bioinorgânica, são necessários para entender os mecanismos de ação e para reduzir os efeitos tóxicos (Ahmad, *et al.*, 2006). Recentemente, têm sido referidos alguns compostos orgânicos de vanádio que, tal como os oxometalatos inorgânicos, alguns com propriedades insulino-miméticas, inibem a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático e também têm ação de regular o processo de contração muscular (Aureliano *et al.*, 2008).

Neste sentido, no presente trabalho estudou-se os efeitos de oxometalatos em sistemas sub-celulares que interatuam com metais de modo a aprofundar conhecimentos que poderão ter utilidade no potencial uso destes compostos com atividade terapêutica. As bombas iônicas, alvos de fármacos, tal como a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, representam modelos para o estudo da interação com os oxometalatos. Esta ATPase possui vários locais de interação com metais e como tal podem estar envolvidos no mecanismo de inibição. Sabendo-se que o vanadato induz um estado de transição análogo a quando a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é fosforilada, bloqueando a conformação E2 da proteína (deMeis e Vianna, 1979). Além do vanadato ( $\text{V}_1$ ), outros oligômeros de vanádio, por exemplo o decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ), também inibem a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Aureliano e

Madeira, 1994a). Contudo, o mecanismo de ação, dos oxometalatos de vanádio bem como de outros metais, ainda não está completamente elucidado. Por isso, trabalhos que mostrem como atuam os oxometalatos nas bombas iônicas podem dar um contributo para que estes compostos, com propriedades terapêuticas, possam ser incluídos na categoria de fármacos. Sendo conhecidos diversos fármacos no tratamento de várias patologias, que têm como alvo bombas iônicas, entre as quais a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. A comparação do modo de interação destes fármacos com o modo de interação dos oxometalatos nas bombas iônicas poderá contribuir para a integração dos oxometalatos em fármacos com uso terapêutico.

## 1.2 Vanádio: aspetos gerais e atividades biológicas

As primeiras referências a um novo elemento metálico, semelhante ao crómio e urânio, foram feitas em 1802 pelo professor de mineralogia espanhol Andrés Manuel del Rio que sugeriu a hipótese de ter encontrado um novo elemento. Designou-o por pancrómio, devido à gama de cores que os sais do metal apresentam de acordo com os estados de oxidação. Mais tarde denominou-o por eritrónio, devido à coloração vermelha que os seus sais apresentam quando tratados com ácido. Porém, a hipótese foi descartada uma vez que havia algumas semelhanças com o crómio. Em 1831, Nils Gabriel Sefstrom purificou este elemento sobre a forma de óxido dando-lhe a nomenclatura de vanádio em honra à lendária deusa da mitologia escandinava, Vanadis, que representa a beleza e o amor, devido à gama de cores que as várias formas do metal apresentam (Nriagu, 1998a; Barceloux, 1999). Depois de Sefstrom ter anunciado a sua descoberta de vanádio, Wohler reanalisou o metal que Del Rio enviara para a Europa, e mostrou que o metal que Del Rio enviou realmente continha vanádio em vez de crómio.

O vanádio, é um metal sólido à temperatura ambiente e resistente à corrosão que pode ser encontrado na crosta terrestre e também em seres vivos variando os seus estados de oxidação de -1 a +5, por vezes encontrando-se o vanádio no estado -3 (Chasteen, 1983; Goc, 2006). Este não se encontra na natureza sobre a forma metálica, e os estados de oxidação mais comuns são o III, IV e V. É um elemento vestigial na maior parte dos organismos e tem vindo a ser descrito como um dos possíveis elementos vestigiais essenciais ao desenvolvimento e crescimento no ser humano, porém é um elemento essencial a uma grande variedade de seres vivos. Apesar de a sua função não ter sido ainda suficientemente clarificada sabe-se que em baixas concentrações, em mamíferos, a sua deficiência pode prejudicar processos essenciais à

reprodução e desenvolvimento, nomeadamente inibe o crescimento, mineralização dos ossos, causando inúmeras malformações e alterar o metabolismo lipídico (Goc, 2006).

Este elemento pode ser extraído a partir de combustíveis fósseis, nomeadamente o petróleo e derivados como a gasolina, carvão, fósseis carbonáceos em que a quantidade de vanádio na forma de porfirinas de vanadilo é muito elevada (Mamane e Pirrone, 1998). Também pode-se encontrar vanádio em subprodutos de alguns metais em particular nos minerais ferrosos, onde a extração pode conduzir ao aparecimento de ligas ricas neste metal (liga de ferrovanádio) ou nas cinzas formadas pela produção de ligas ferrosas além de poder estar presente em subproduto de minérios não ferrosos, como por exemplo, de alumínio, titânio ou urânio (Chasteen, 1983; Barceloux, 1999). Este metal tornou-se um elemento fundamental na tecnologia industrial moderna, em especial na indústria militar, devido à dureza que confere às ligas metálicas no qual está presente. O vanádio tem também outras utilizações industriais importantes. Encontram-se aplicações dos compostos contendo vanádio pela indústria química, na síntese de polímeros e compostos orgânicos, na agricultura pela presença em pesticidas e fungicidas, na produção de ligas metálicas, em especial as ligas de aço e ligas não ferrosas, na produção de baterias e vidros, na indústria nuclear e na tecnologia espacial. (Nriagu, 1998a; Barceloux, 1999). Por outro lado, a vasta utilização dos compostos de vanádio na indústria química, bem como a sua presença em combustíveis fósseis e a sua combustão, contribuíram para o aumento significativo deste elemento no meio ambiente (Domingo *et al.*, 1993). Além disso, temos a contribuição da erosão da crosta terrestre e atividade vulcânica a contribuir para a presença de compostos de vanádio nas águas oceânicas e os efluentes domésticos e industriais como fontes adicionais de vanádio (Miramand e Fowler, 1998). Todos estes fatores contribuem para a disseminação do vanádio na natureza, podendo estar presente nos solos, no ar e na água dos oceanos, dos rios ou lagos, onde o vanádio pode ser rapidamente solubilizado ou depositado em sedimentos e ficar disponível para a transferência para a cadeia alimentar (Edel e Sabbioni, 1993). Admite-se contudo que a população está exposta ao elemento principalmente pela combustão de petróleo, carvão e ramas petrolíferas utilizados na produção de eletricidade e calor (Barceloux, 1999).

Nas últimas décadas, os compostos de vanádio tem revelado o potencial biológico deste elemento para uso terapêutico e farmacológico (Nriagu, 1998a), tendo este elemento revelado inúmeras propriedades biomédicas uma vez que interatua com inúmeros mecanismos bioquímicos e fisiológicos, entre eles, aumenta o metabolismo da glucose e influência a atividade enzimática (Aureliano e Gandara, 2005; Goc, 2006). Devido ao seu efeito insulino-

mimético o vanádio tem sido estudado essencialmente no tratamento de diabetes (Brichard e Henquin, 1995; Li *et al.*, 1996; Crans, 2000; Goldwaser *et al.*, 2000a; Kiss *et al.*, 2000; Willsky *et al.*, 2001; Crans *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009), também se conhece a sua utilização na prevenção e tratamento do cancro (Ghosh, 2000; Evangelou, 2002).

Devido à sua química complexa o vanádio tem um largo espectro de atuação a nível biológico, conseqüentemente torna-se essencial que seja estudado minuciosamente de modo a que todas as suas aplicações sejam devidamente fundamentadas.

Este metal versátil tem assumido um papel relevante e têm vindo a ser desenvolvidos inúmeros estudos que visam uma melhor compreensão da química e bioquímica de compostos contendo este metal, nomeadamente os das espécies contendo oxovanadatos uma vez que são análogas do fosfato e podem deste modo regular e interferir com um elevado número de processos bioquímicos (Crans, 2000; Crans *et al.*, 2004). Para além do vanadato monomérico, divanadatos, tetravanadatos e particularmente a espécie decamérica, decavanadato, apresentam diversas atividades biológicas (Aureliano e Gândara, 2005; Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009).

### 1.3 Ocorrência e toxicocinética dos compostos de vanádio

O vanádio é um elemento que se pode encontrar na crosta terrestre numa concentração de 100 a 200 ppm, sendo o quinto metal de transição mais abundante, podendo ser encontrado maioritariamente em rochas, solos, plantas, animais, água, combustíveis fósseis e numa menor extensão na água, onde os seus níveis raramente excedem 0,1 ppb (Greenwood e Earnshaw, 1997). O vanádio encontra-se presente em concentrações muito baixas, na ordem de nM, em todas as células de animais e plantas, apresentando propriedades benéficas a baixas concentrações e sendo por isso considerado um elemento essencial para o Homem. As atividades fisiológicas e bioquímicas no corpo humano requerem uma quantidade de vanádio total que varia entre 100 a 200 µg (Srivastava e Mehdi, 2005), estimando-se que o consumo diário deste elemento é de cerca de 10 a 60 µg por dia (Barceloux, 1999; Goc, 2006). Pode ser encontrado também em alimentos consumidos pelo homem, em que as principais fontes alimentares incluem a salsa (1,8 µg/g), cereais, peixes, mariscos, sementes de endro, frutas frescas, vegetais (espinafres 0,5-0,8 µg/g), cogumelos (0,05-2 µg/g) e pimenta preta (<1ng/g), pode também ser encontrado nas gorduras e óleos mas quantidade deste elemento é bastante menor, sendo a alimentação a fonte essencial para a obtenção deste elemento. O tabaco pode

ser uma fonte importante no aporte de vanádio uma vez que apresenta elevadas concentrações do elemento, contendo o fumo do tabaco cerca de 1-8 ppm de vanádio (Chasteen, 1983; Nielsen, 1991; Barceloux, 1999).

Na natureza, os compostos de vanádio existem naturalmente em muito poucos organismos vivos, entre estes destacam-se os tunicados que podem concentrar vanádio na forma reduzida, V(III), até 1 mM em células sanguíneas denominadas por vanadóцитos (Chasteen, 1983; Kustin e McLeod, 1983; Nose *et al.*, 1997). Esta concentração de vanádio nos tunicados é  $10^5$  vezes superior à concentração de vanádio nos oceanos (Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Wilkins e Wilkins, 1997), uma vez que a concentração referida nos oceanos para o vanádio é de cerca de 10 nM (Chasteen, 1983; Wilkins e Wilkins, 1997; Miramand e Fowler, 1998) onde o vanádio está presente como ião vanadato, principalmente através da presença da espécie  $\text{HVO}_4^{2-}$  e  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  (Kustin e McLeod, 1983). Por seu turno, as plantas marinhas e os invertebrados podem bioacumular vanádio em concentrações superiores ao observado em animais e plantas terrestres (Bewers *et al.*, 1987). Nos cogumelos do género *Amanita*, o vanádio encontra-se presente numa molécula denominada amavadina que tem sido extraída a partir de cogumelos da espécie *Amanita muscaria* (Silva e Williams, 2001). Em leveduras de *Sacharomyces cerevisiae* e na minhoca *Pseudopotamilla ocellata* encontra-se vanádio no estado de oxidação +4 ( $\text{VO}^{2+}$ ) (Bode *et al.*, 1990; Silva e Williams, 2001). Além destes conhecem-se outros organismos, tais como fungos e bactérias, onde o vanádio atua como cofactor em várias enzimas. Por exemplo, as haloperoxidases (enzimas que catalisam a oxidação de halogenetos na presença de peróxido de hidrogénio podendo ser cloroperoxidases, bromoperoxidases e iodoperoxidases) ou as nitrogenases, (enzimas que catalisam a redução de  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$  sendo assim envolvidas no ciclo do  $\text{N}_2$ ) (Crans *et al.*, 1998). Existem também uma nova classe de proteínas contendo vanádio que tem sido propostas como proteínas transportadoras, as vanabinas (Crans *et al.*, 2004). Nos humanos, verifica-se que a quantidade de vanádio existente em condições fisiológicas normais é cerca de 100  $\mu\text{g}$  (Etcheverry e Cortizo, 1998a).

### 1.3.1 Toxicocinética

A absorção e distribuição dos compostos de vanádio dependem da taxa de entrada, da solubilidade dos derivados de vanádio nos fluídos corporais biológicos e do valor de pH dos mesmos. A absorção do vanádio tem lugar através de diferentes vias, sendo as principais a via inalatória e via trato gastrointestinal. Os compostos de vanádio são caracterizados pela baixa

taxa de absorção pelo sistema digestivo, apenas 10 % do vanádio é absorvido ao nível gastrointestinal, reduzindo assim os efeitos toxicológicos (Nriagu, 1998b).

No estômago, muitos dos complexos de vanádio são transformados na sua forma catiónica, vanadilo, sendo absorvidos pela mucosa intestinal através de canais transportadores de íons, seguindo para a corrente sanguínea, onde cerca de 90 % é transportado pela transferrina ou albumina, estabilizando assim os complexos que se oxidam espontaneamente originando aniões vanadato (Chasteen, 1983; Nriagu, 1998a; Goc, 2006). O transporte membranar não está elucidado, porém sabe-se que as espécies de vanádio são distribuídas pelo corpo, sendo acumulado principalmente nos ossos, fígado, baço e rins. (Knudson, 1979; Zaporowska e Scibor, 1998a; Mukherjee *et al.*, 2004).

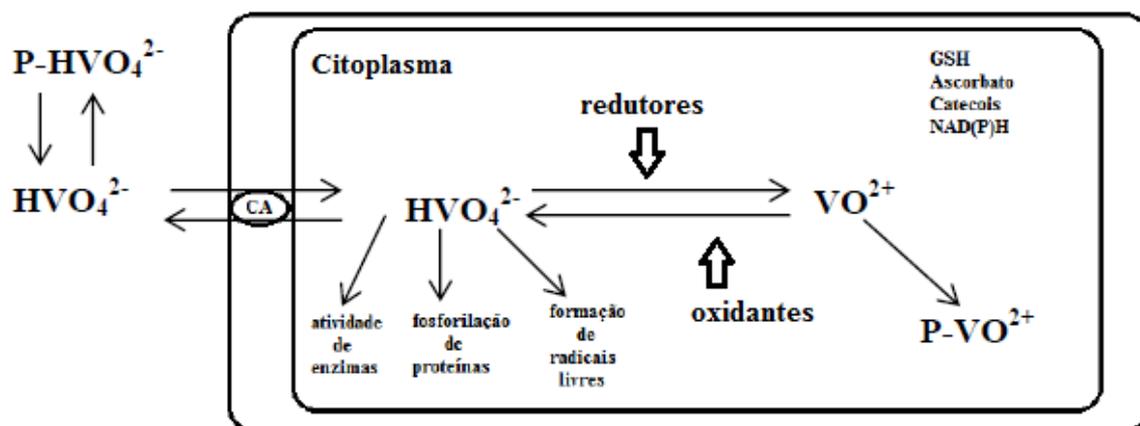
Os tecidos em que se verifica uma acumulação residual ou praticamente nula incluem o cérebro, o músculo e as gonadas (Zaporowska e Scibior, 1988a). Sabe-se que os ossos e os dentes dos mamíferos, zonas onde ocorre a mineralização, podem acumular vanádio em concentração elevada enquanto as células hepáticas de cultivo incubadas com meios contendo diferentes compostos de vanádio acumulam o elemento sobretudo nas mitocôndrias e no núcleo (Zaporowska e Scibior, 1988b).

Nos peixes, o padrão de acumulação é semelhante aos mamíferos (Edel e Sabbioni, 1993) observando-se concentrações mais elevadas no rim e fígado (Knudson, 1979), relativamente ao observado no músculo cardíaco. Porém, estudos realizados com *Halobatrachus didactylus* sugerem que a acumulação de vanádio depende do modo de administração e das espécies de vanadato que são administradas, além de outros fatores (Soares *et al.*, 2006).

A excreção dos compostos de vanádio tem como vias principais, a via urinária seguida da via fecal (Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Barceloux, 1999) se for administrado por via parenteral. Em caso de administração por via endovenosa a principal via de excreção é a urinária sendo que a bÍlis pode desempenhar neste caso um papel importante na excreção fecal quando se atingem níveis plasmáticos elevados de vanádio (Etcheverry e Cortizo, 1998a; Barceloux, 1999; Mukherjee *et al.*, 2004).

O metabolismo do vanádio, no corpo humano, ainda não está suficientemente elucidado, porém muitos estudos *in vitro e in vivo*, tem vindo a clarificar algumas hipóteses (Orvig *et al.*, 1995; Barceloux, 1999). Pensa-se que o vanádio nos fluídos extracelulares, existe predominantemente no estado de oxidação pentavalente (vanadato). O vanádio entra posteriormente no interior das células através de canais iônicos não específicos e sofre reações

de oxidação redução com alguns enzimas ou compostos redutores, por exemplo a glutatona, catecois, NADPH, NADH, cisteínas, ácido L-ascórbico e glutatona redutase podendo interconverter-se entre vanádio pentavalente e vanádio tetravalente (Fig. 1.1) (Zaporowska e Scibor, 1998a; Baran, 2000).



**Figura 1.1** – Transporte de vanádio para a célula, sua metabolização e efeitos em processos intracelulares (Adaptado de Zaporowska e Scibor, 1998a).

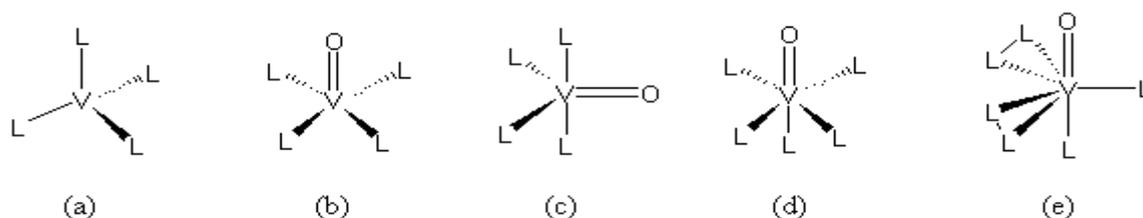
Pensa-se que a redução de vanádio(V) a vanádio(IV) seja o processo natural de destoxificação do organismo uma vez que o ião vanadilo é menos tóxico para a célula. No entanto, outros processos contribuem para a diminuição da toxicidade intracelular, como é o caso da complexação do vanadilo com catecolaminas, glutatona (GSH) e pequenos péptidos enquanto no soro ou plasma complexa com a albumina do soro ou com outras proteínas, tais como: transferrina, ferritina ou hemoglobina. Neste caso, diminui-se a posterior reoxidação a vanadato e prevenindo a acumulação de vanadato nos sistemas biológicos, diminuindo deste modo os efeitos celulares resultantes da sua ação inibitória. Adicionalmente, a ligação a moléculas lipídicas nas células também contribui para uma menor disponibilidade do elemento para exercer os seus efeitos tóxicos, quer pela inibição de enzimas, quer pela indução de stresse oxidativo. Assim, nas células, o vanádio pode provocar várias respostas celulares ou bioquímicas uma vez que pode afetar a fosforilação e desfosforilação de proteínas e modular a atividade de enzimas ou participar na formação de radicais livres. O vanádio inibe a maioria das ATPases e fosfatases, afetando muitas atividades celulares como o transporte e metabolização da glucose, a síntese de glicogénio, entre outras (Etcheverry e Cortizo, 1998a; Zaporowska e Scibor, 1998a).

### 1.4 Química de vanádio em solução

O vanádio é um metal de transição do grupo 5 da tabela periódica, sólido à temperatura ambiente apresentando uma coloração prateada e ocorre nas suas formas isotópicas naturais  $^{50}\text{V}$  e  $^{51}\text{V}$ . O vanádio não ocorre na natureza como metal livre, mas associado a diferentes metais, sendo conhecidos cerca de 70 minerais aos quais o metal se encontra associado, nomeadamente sobre a forma de óxidos de vanádio ou vanadatos, a urânio, cobre, chumbo, zinco, fosfatos, titânio ferroso e outros (Silva e Williams, 2001; Crans *et al.*, 2004).

O vanádio tem uma massa molecular de 50,94 e sua configuração eletrónica  $[\text{Ar}] 3d^3 4s^2$  atribui-lhe uma química bastante vasta e extremamente complexa em solução aquosa. Este elemento metálico pode existir sobre diversos estados de oxidação desde -1 a +5. Em solução aquosa, os estados mais comuns e estáveis são de +2 a +5, e apresentam uma diversidade de colorações diferentes de acordo com o estado de oxidação. De entre os estados de oxidação do elemento, +5 (vanadato – V(V)), +4 (vanadilo – V(IV)) e +3 (vanádico – V(III)) são os que se podem encontrar naturalmente no meio ambiente e os que têm importância biológica (Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Harland e Harden-Williams, 1994; Crans *et al.*, 1998; Barceloux, 1999; Aureliano e Crans, 2009). Contudo, como o ião vanádico V(III) apenas foi identificado nos vanadócitos existentes na hemolinfa dos tunicados, o vanádio nos mamíferos é encontrado em condições fisiológicas maioritariamente nos estados de oxidação +4 (vanadilo) ou +5 (vanadato) (Chasteen, 1983; Kustin e McLeod, 1983; Wilkins e Wilkins, 1997).

A química extremamente complexa e variada que este metal exhibe deve-se, além da sua capacidade redox, ao facto de assumir diferentes números e geometrias de coordenação, as quais dependendo do estado de oxidação do vanádio e do tipo de ligando coordenador, podem ser alteradas mediante simples variações de pH, concentração ou da quantidade de agentes oxidantes, redutores, e quelantes presentes no meio, verificando-se várias geometrias em complexos diferentes (Fig. 1.2) (Greenwood e Earnshaw, 1997; Crans *et al.*, 1998).

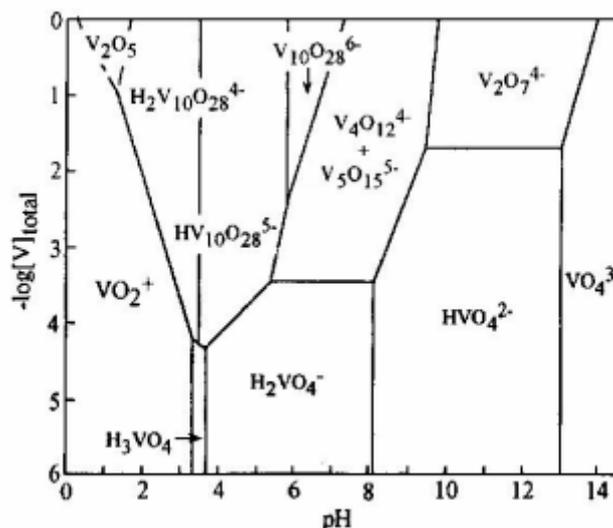


**Figura 1.2** – Geometrias de complexos de vanádio com diferentes números de coordenação, em que L é o ligando e, V o vanádio. (a) tetraédrica, (b) pirâmide quadrangular, (c) bipiramidal trigonal, (d) octaédrica e (e) bipiramidal pentagonal (adaptado de Crans *et al.*, 1998).

### 1.4.1 Vanádio(V): Vanadato

A espécie de vanádio pentavalente V(V), é a forma que apresenta o estado de oxidação mais estável na gama de valores de pH habitualmente encontrados nos sistemas aquosos. As soluções aquosas da espécie de vanadato são incolores e contêm uma mistura de diferentes oligômeros em diferentes estados de protonação que dependem do pH, da concentração total de vanádio e da força iônica (Crans *et al.*, 1998). Nas espécies de vanádio pentavalente podem-se encontrar espécies que contêm: a unidade  $\text{VO}_3^-$  e que se designam por metavanadatos, a unidade  $\text{VO}_4^{3-}$  e designam-se por ortovanadatos e a unidade  $\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$  designam-se por pirovanadatos (Nechay, 1984; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999).

Em condições próximas da neutralidade e na gama de concentrações da maior parte dos estudos biológicos (de  $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$ ), as formas que predominam das espécies de vanadato são os monómeros ( $\text{V}_1 - \text{VO}_4^{3-}$ ), que podem oligomerizar e formar dímeros ( $\text{V}_2 - \text{V}_2\text{O}_7^{4-}$ ) que podem coexistir em várias formas protonadas ( $\text{HV}_2\text{O}_7^{3-}$ ,  $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$  e  $\text{H}_3\text{V}_2\text{O}_7^-$ ) dependentes do pH do meio e que apresentam uma analogia estrutural com o pirofosfato (PPi). Após a formação do  $\text{V}_2$ , podem surgir os tetrâmeros cíclicos ( $\text{V}_4 - \text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ ) e os pentâmeros cíclicos ( $\text{V}_5 - \text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$ ). Se ocorrer acidificação da solução de vanadato podem formar-se os decâmeros ( $\text{V}_{10} - \text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$ ), conhecidos por apresentarem várias atividades biológicas (Aureliano e Gândara, 2005; Aureliano e Crans, 2009) (Fig. 1.3).



**Figura 1.3** – Espécies de vanadato (V(V)) predominantes em solução aquosa em função do pH. (Adaptado de Chasteen, 1983).

Grande parte da atividade biológica dos compostos contendo vanádio, em seres humanos, está associada aos vanadatos, em especial ao monómero ( $\text{VO}_4^{3-}$ ), uma vez que o

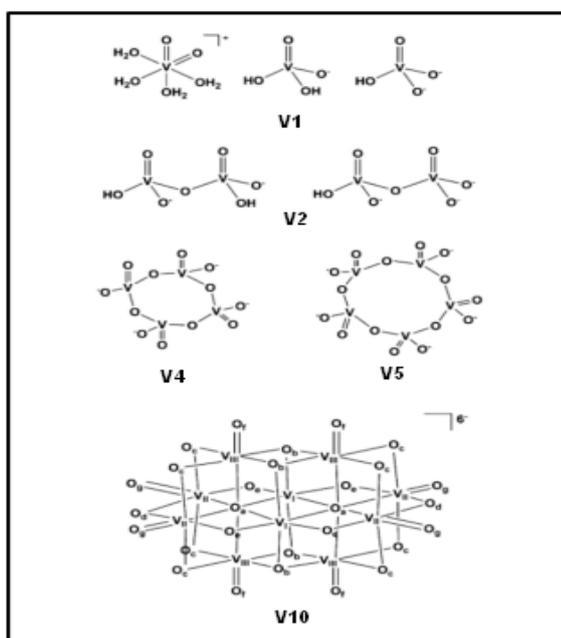
ortovanadato apresenta-se como uma molécula isoestrutural e isoeletrónica do ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Chasteen, 1983). Do mesmo modo as espécies que resultam da protonação do  $\text{VO}_4^{3-}$ , como são as espécies,  $\text{HVO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  e  $\text{H}_3\text{VO}_4$ , são previsivelmente análogos dos derivados de fosfato correspondentes. Todas estas espécies de vanadato podem ser capazes de interatuar com as enzimas de modo análogo ao fosfato nas reações químicas, podendo coordenar tetraedricamente ou apresentar geometria bipiramidal trigonal, tal como o estado de transição do fosfato (Chasteen, 1983; Crans, 1994; Barceloux, 1999). A pH fisiológico V(IV) é oxidado a V(V), pois o V(IV) apenas é estável em meios ácidos e parece que os compostos pentavalentes são geralmente mais tóxicos (Barceloux, 1999).

Nas células, o vanádio(V) é reduzido por compostos como o ácido ascórbico, glutatona e cisteína a vanádio(IV). O vanádio(V), vanadato, é análogo estrutural e eletrónico de fosfato, com reações de protonação bastante semelhantes (Crans *et al.*, 2004). Semelhanças entre os  $\text{pK}_a$  das formas tetraédricas trianiónicas documentam também esta analogia, sendo que o ácido vanádico ( $\text{H}_3\text{VO}_4$ ) com um  $\text{pK}_{a1} = 3,5$ ,  $\text{pK}_{a2} = 7,8$  e  $\text{pK}_{a3} = 12,5$  e ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) com um  $\text{pK}_{a1} = 1,7$ ,  $\text{pK}_{a2} = 6,5$  e  $\text{pK}_{a3} = 12,1$ , indicia que sendo o ácido vanádico mais fraco que o ácido fosfórico, pode ser uma evidência para que os vanadatos se liguem preferencialmente a enzimas (Chasteen, 1993).

Uma das diferenças entre fosfatos e vanadatos deve-se ao facto de, a pH neutro, os monómeros de vanadato existirem como mono aniões  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ , enquanto os fosfatos existem sobre a forma de dianião  $\text{HPO}_4^{2-}$ . A este pH, tanto os aniões  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  como  $\text{HVO}_4^{2-}$  podem oligomerizar e além das espécies monoméricas ( $\text{V}_1$ ), podem formar as diméricas ( $\text{V}_2$ ), as tetraméricas ( $\text{V}_4$ ) e as pentaméricas ( $\text{V}_5$ ) (Crans *et al.*, 2004) com estruturas moleculares na figura 1.4, sendo estes os oligómeros mais frequentes em solução aquosa (Crans, 1994). Pode formar-se também a espécie decamérica ( $\text{V}_{10}$ ), uma espécie com bastante relevância a nível bioquímico e que surge quando a concentração total de vanádio é superior a 100  $\mu\text{M}$  e soluções moderadamente ácidas (pH 2-6) (Stankiewicz *et al.*, 1995) (Fig.1.4). As espécies decaméricas de vanádio, denominadas em geral por decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) e as suas formas protonadas,  $(\text{HV}_{10}) \text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$  e  $(\text{H}_2\text{V}_{10}) \text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{4-}$  surgem a valores de pH compreendidos entre 2,5 e 7,0 e as soluções contendo estas espécies apresentam uma cor amarelo-alaranjada (Crans *et al.*, 1998).

Outra diferença bastante importante reside no facto de que as espécies de vanádio, a pH fisiológico podem sofrer reações redox enquanto os fosfatos não, uma vez que são cineticamente inertes (Crans *et al.*, 2004). A forma decamérica ( $\text{V}_{10}$ ) é termodinamicamente

instável a valores de pH neutros e básicos, pelo que os estudos com esta espécie devem ter em conta determinadas condições (Crans, 1994). As espécies de vanádio predominantes em solução aquosa dependem do pH e da concentração total de vanádio (Fig. 1.3). As soluções aquosas de vanadato que consistem numa mistura em equilíbrio de diferentes oligómeros de vanadato (Fig. 1.4), devido ao vanadato reagir espontaneamente para formar uma variedade de oligómeros. Além disso, o vanadato pode coordenar-se com fosfato ou formar complexos com várias moléculas originando compostos com interesse biológico ou químico, estas espécies oligoméricas de vanádio, embora muitas vezes não sejam consideradas, também afetam a atividade de enzimas (Aureliano, 2000; Crans *et al.*, 2004; Aureliano e Crans, 2009).



**Figura 1.4** - Espécies de vanadato em solução aquosa: oxovanadatos. (Aureliano e Crans, 2009).

Dada a facilidade de interconversão das espécies de vanádio em condições fisiológicas, os estudos que envolvam compostos de vanádio devem ter em conta a química destes compostos e as limitações experimentais determinadas pela facilidade da sua interconversão (Crans, *et al.*, 1998).

### 1.4.2 Vanádio(IV): Vanadilo

Relativamente à outra forma de vanádio importante em termos celulares ou biológicos, o vanádio tetravalente, temos o ião vanadilo ( $\text{VO}^{2+}$ ) que em solução aquosa exibe uma cor azulada. O ião vanadilo é estável a valores de pH na zona ácida mas pode ser rapidamente oxidado a vanadato (Chasteen, 1983). O vanádio entra nas células geralmente na forma de

vanadato ( $\text{VO}_3^-$ ) pelos sistemas de transporte aniônico, uma vez presente nos fluidos intracelulares onde podem existir diversos agentes redutores, nomeadamente, ácido L-ascórbico, glutathiona (GSH), catecol, cisteína, NADH ou NADPH o vanadato pode ser biorreduzido a vanadilo ( $\text{VO}^{2+}$ ) o que indica ser o estado de oxidação +4 do vanádio o que prevalece nos organismos vivos. O ião  $\text{VO}^{2+}$  aparentemente é pouco reativo devido à facilidade com que pode formar complexos com ligandos como o ATP, o pirofosfato, as catecolaminas e os aminoácidos livres e também à elevada afinidade para formar complexos com proteínas celulares tais como hemoglobina ou transferrina. Além disso, o ião vanadilo pode competir com outros iões metálicos pela ligação a metaloproteínas enquanto o ião  $\text{VO}_3^-$  geralmente não complexa com compostos orgânicos (Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Harland e Harden-Williams, 1994; Zaporowska e Scibior, 1998a; Barceloux, 1999). A possibilidade complexar a pequenos ligandos e a alta afinidade do vanadilo para ligar a proteínas protegem a sua oxidação a vanadatos e tornam pouco provável que o catião  $\text{VO}^{2+}$  possa existir livre nos sistemas biológicos, com exceção de sistemas em que o ambiente é ácido como acontece em vacúolos ácidos como os lisossomas. A redução do vanadato a vanadilo é provavelmente um mecanismo de destoxificação que os organismos vivos apresentam pois o vanadilo é uma forma menos tóxica para as células do que o vanadato (Baran, 1998).

### 1.5 Efeito de vanádio na atividade da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

Um dos efeitos mais conhecidos dos compostos de vanádio é ao nível da acumulação e transporte do cálcio celular uma vez que o vanádio promove o aumento da concentração de iões cálcio no citosol. O transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático ou sarcoplasmático não ocorre uma vez que o vanádio é um inibidor potente das  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases presentes nas membranas plasmáticas, endoplasmáticas ou do retículo sarcoplasmático. O efeito inibitório do vanádio sobre a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarco ou endoplasmático (SERCA1) já foi descrito anteriormente e tem sido evidenciado em várias publicações (Aureliano e Madeira, 1994b; Aureliano, 2000; Aureliano *et al.*, 2005; Aureliano *et al.*, 2008; Aureliano e Crans, 2009). A maioria dos estudos atribuem esta inibição à espécie monomérica de vanadato, o ortovanadato ( $\text{VO}_4^{3-}$ ), que é quimicamente semelhante ao ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) que se sabe que interatua com enzimas envolvidas em reações de transferência de grupos fosfato, tais como, as fosfotransferases e fosfohidrolases (Nechay, 1994). No entanto, outras espécies de vanádio afetam esta atividade enzimática (Varga *et al.*, 1985; Aureliano e Madeira, 1994a e 1994b; Aureliano e Madeira, 1998).

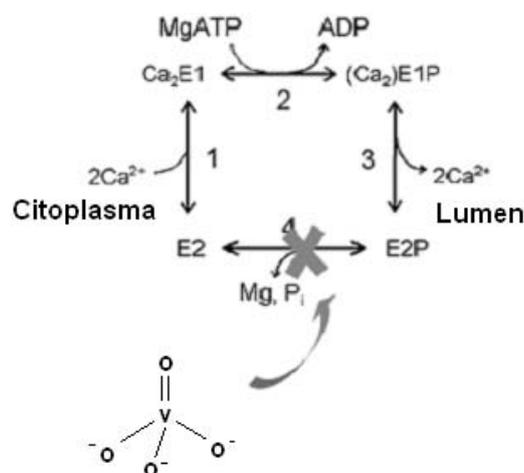
Este tipo de enzimas, podem aceitar o ortovanadato como análogo do fosfato e formar-se um complexo enzima-vanadato em que o vanadato adota uma estrutura bipiramidal trigonal idêntica ao ortofosfato semelhante à estrutura formada pelo ortofosfato no intermediário ADP·P, que ocorre nas reações de fosforilação. Assim, pode ocorrer a formação de complexos ADP·V ou ATP·V que competem com o ATP pelo local catalítico da enzima, desta forma o ortovanadato inibe as ATPases do tipo P, entre as quais temos a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS (Medda e Hasselbach, 1983; Aureliano, 1995). Encontra-se referido que a espécie monomérica de vanadato ocupa o local do fosfato, mas não impede a ligação do ATP ao local ativo da enzima (Pick, 1982). Outros estudos sugerem que a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é fortemente inibida por espécies oligoméricas de vanadato mas com sensibilidades diferentes (Varga *et al.*, 1985; Aureliano e Madeira, 1998).

Também foi demonstrado que as espécies diméricas ( $V_2$ ), tetraméricas ( $V_4$ ) e decaméricas ( $V_{10}$ ) apresentam uma afinidade superior para a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS relativamente à espécie monomérica ( $V_1$ ) de vanádio (Csermely *et al.*, 1985a). Estes polioxometalatos de vanádio, são também responsáveis pela inibição dos processos catalisados pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Aureliano e Madeira, 1994a). Por outro lado, a elevada afinidade que as espécies  $V_2$ ,  $V_4$  e  $V_{10}$  exibem para a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase apresenta-se como uma ferramenta útil em estudos que envolvem a cristalização da proteína pois estas espécies podem ser responsáveis pelo aumento da velocidade de cristalização da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase induzida por soluções de decavanadato (Varga *et al.*, 1985).

Verificando-se que a inibição pelo vanadato depende do estado conformacional da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e das espécies de vanadato presentes no meio reacional e pensa-se que a interação dos vanadatos é favorecida quando a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase se encontra na conformação E2, ocorrendo um bloqueio que impede a formação do intermediário fosfo-enzimático. Assim, há uma estabilização de conformação E2 (Fig.1.5) e uma redução da afinidade da enzima pelos íons cálcio, uma vez que o mecanismo fica bloqueado. (Aureliano e Madeira, 1998; Aureliano, 2007). No entanto, existem evidências de uma interação com a conformação na forma E1 para o caso particular da espécie decamérica. (Aureliano e Madeira, 1994a; Aureliano e Madeira, 1998).

Relativamente à espécie decamérica, considera-se que o local de interação desta espécie com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS corresponde ao local de ligação do ATP, no sítio de ligação nucleótido, em especial na conformação E2, formando-se um aduto E2-V. Também se

considera que  $V_{10}$  se possa fixar num local formado por três domínios: domínio nucleótido, domínio atuador e local de fosforilação (Hua *et al.*, 2000).



**Figura 1.5** - Efeito do vanadato monomérico ( $V_1$ ) no mecanismo de translocação do cálcio pela  $Ca^{2+}$ -ATPase, bloqueando a enzima na conformação E2.

Além disso, também é considerada a possibilidade do  $V_{10}$  poder ligar-se ao sítio de fosforilação, bloqueando desta forma o local ativo e impedindo a formação do intermediário fosforilado. No entanto, foi descrito que  $V_{10}$  não se comporta como um análogo do fosfato (Varga *et al.*, 1985; Csermely *et al.*, 1985a; Aureliano e Madeira, 1998). Ao contrário do vanadato monomérico, o decavanadato também pode interagir com outras conformações da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS como as conformações E1, E1-P, e E2-P, tal como descrito por espectroscopia de <sup>51</sup>V-RMN (Aureliano e Madeira, 1994a; Aureliano e Madeira, 1998).

A diferença na resposta do decavanadato em comparação com o vanadato monomérico foi ilustrada pela capacidade de  $V_{10}$  para inibir a acumulação de cálcio acoplada com a hidrólise de ATP em vesículas RS (Aureliano e Madeira, 1994b; Aureliano e Madeira, 1998). Assim, sugeriu-se que o vanadato monomérico inibe a atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase (Pick, 1982), mas não a acumulação de cálcio (Aureliano e Madeira, 1994b). Os vanadatos interagem particularmente com a conformação E2 da enzima (Csermely *et al.*, 1985a) mas o  $V_{10}$  pode interagir com a conformação E1 (Aureliano e Madeira, 1994a). Resumidamente, só o decavanadato induz a cristalização de  $Ca^{2+}$ -ATPase (Dux e Martinosi, 1983; Maurer e Fleisher, 1984) e previne a acumulação de cálcio pela  $Ca^{2+}$ -ATPase (Aureliano e Madeira, 1994b; Aureliano e Madeira, 1998).

A espécie tetramérica ( $V_4$ ), considera-se que pode ligar-se perto do local de fosforilação, possivelmente a resíduos de aminoácidos carregados positivamente como os

resíduos de lisina (Lys) ou resíduos de arginina (Arg), em especial quando a proteína está na conformação E2 (Varga *et al.*, 1985; Aureliano e Madeira, 1994b). Muitos dos efeitos que tendem a ser atribuídos à espécie monomérica podem ter como responsável esta espécie V<sub>4</sub>, presente nas soluções de vanádio de concentração mM (Aureliano, 1995). A presença de ligandos naturais da enzima como o ATP também influencia estas interações, induzindo conformações específicas para determinados oligovanadatos (Aureliano, 2000; Aureliano *et al.*, 2008).

### 1.6 Efeitos fisiológicos e toxicológicos de vanádio

A utilização de vanádio é conhecida pouco depois da sua descoberta mesmo quando pouco se sabia sobre a sua toxicidade ou efeitos farmacológicos, Jackson, em 1912 que descreveu que o maior efeito do vanádio era induzir vasoconstrição intensa no baço, rim e intestino, com aumento na pressão sanguínea. Em 1917, Proescher *et al.*, conduziram estudos de toxicidade de vários sais de vanádio, em animais de experimentação grandes e pequenos e afirmou que injeções intramusculares e intravenosas de hexavanadato de sódio eram efetivas na cura para a sífilis (Nriagu, 1998b). Deste modo o vanádio entrou para a farmacopeia europeia pouco depois da sua descoberta, desde 1920, já os médicos franceses recorriam ao uso de metavanadato de sódio, em doses até 5 mg em 24 horas, para tratamento de anemia, tuberculose, reumatismo crônico e diabetes, ou ao uso de hexavanadato de sódio, por administração intramuscular ou intravenosa, para tratamento da sífilis (Nriagu, 1998b). Para concentrações mais elevadas este elemento torna-se tóxico. (Nechay *et al.*, 1986).

A toxicidade do vanádio depende claramente do seu estado de oxidação, quando este aumenta, aumenta também a sua toxicidade (Barceloux, 1999). Entre outras reações, os efeitos toxicológicos do vanádio refletem-se na irritação dos olhos e mucosas do trato respiratório superior, hemorragias nasais, distúrbios gastrointestinais, câibras, anemia, bronquite, pneumonia e depressão (Barceloux, 1999; Goc, 2006).

Contudo, enquanto o vanádio é considerado um nutriente essencial para certas plantas, animais e micro-organismos (*Saccharomyces cerevisiae*), nos humanos o seu papel está pouco esclarecido uma vez que não existem evidências de patologias humanas associadas a deficiências nutricionais de vanádio, em que se estima uma dieta diária de 10 µg ser suficiente (Nechay, 1984; Nielsen, 1991; French e Jones, 1993; Boscolo *et al.*, 1994; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999), apesar de não se conhecerem proteínas ou enzimas que

contenham vanádio em animais ou humanos (Sakurai e Tsuji, 1998). No entanto, existem alguns estudos que relacionam o aparecimento de deficiências em galinhas, ratos e caprinos, frangos e ratos, tais como crescimento retardado, malformações ósseas e diminuição da fertilidade associados a uma alimentação deficiente em vanádio (Erdman *et al.*, 1984; Nechay, 1984; Nielsen, 1991).

São conhecidos vários efeitos fisiológicos que o vanádio exerce nos organismos vivos, entre os quais se contam um papel no metabolismo do cálcio, como coadjuvante da mineralização dos ossos e dos dentes; na biossíntese de lípidos, inibindo a sua deposição nos vasos sanguíneos e sistema nervoso central; no metabolismo da glucose, estimulando o consumo de glucose bem como na síntese de glicogénio (Chasteen, 1983; Etcheverry e Cortizo, 1998b). O vanádio pode exercer efeitos benéficos quando utilizado em concentrações vestigiais, na ordem de 1 a 10 nM.

A via de administração condiciona a toxicidade do vanádio. Deste modo, quando administrado por via oral o vanádio tem toxicidade baixa, administrado por via inalatória a sua toxicidade é moderada e administrado por via intramuscular ou via endovenosa a sua toxicidade é elevada (Baran, 1998; Stipriga e Somchai, 1998). A sensibilidade ao vanádio varia de espécie para espécie, sendo mais elevada nos humanos e animais de grande porte e menor em ratos e o vanádio apresenta maior toxicidade quando na forma pentavalente (V(V)) (Nechay, 1984; Barceloux, 1999).

São conhecidos alguns sinais de toxicidade em humanos de que se destacam a descoloração da língua, denominado como síndrome da língua verde, irritações da pele e mucosas, hemorragias nasais e tosse além de redução da pressão intraocular (Nechay, 1984; Nechay *et al.*, 1986), ou lesões neurológicas focais (Barceloux, 1999). Diversos trabalhos têm evidenciado efeitos tóxicos quer ao nível de órgãos e sistemas quer ao nível celular em processos bioquímicos ou metabólicos em que intervêm diversas enzimas. Deste modo, tem sido associado à exposição a vanádio alguns efeitos cardiovasculares, como efeitos inotrópicos positivos e negativos e hipertensão, toxicidade renal e hepática, vasoconstrição em vários órgãos, nomeadamente no baço, no rim e no fígado (Simons, 1979; Akera *et al.*, 1983; Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Boscolo *et al.*, 1994; Harland e Harden-Williams, 1994; Stohs e Bagchi, 1995; Carmignani *et al.*, 1998), sendo também referido que o vanádio tem ação cancerígena e revela atividade mutagénica promovendo danos no ADN e estimulando a proliferação e/ ou apoptose celular em ensaios *in vitro* (Léonard e Gerber, 1994, Stohs e Bagchi, 1995). Outros efeitos referenciados em estudos que utilizaram modelos animais

incluem-se: distúrbios gastrointestinais, diarreia, câibras, desidratação, diminuição do peso corporal, anemia, bronquite, pneumonia e depressão (Barceloux, 1999; Goc, 2006). No entanto, alguns destes efeitos podem ser revertidos por adição de NaCl, ajuste do pH da solução à neutralidade e administração de ácido ascórbico ou outros compostos que reduzam o vanádio a um estado de oxidação mais baixo (Barceloux, 1999; Srivastava e Mehdi, 2005; Goc, 2006).

O tempo de administração também tem influência, tendo-se verificado que a administração em ratos, de sulfato de vanadilo em água, com uma concentração de 0,75 mg/L, em ensaios curta e longa duração, revelaram uma variedade de efeitos tóxicos ao nível hematológico e bioquímico, contudo, verificou-se que em administrações com as mesmas concentrações e ensaios com maior tempo de duração não demonstraram qualquer efeito dos mencionados tendo-se observado a diminuição da pressão sanguínea e elevação dos níveis de insulina (Goc, 2006). Neste âmbito também se revelou que compostos orgânicos de vanádio são muito mais seguros como agentes antidiabéticos do que sais inorgânicos de vanádio (Srivastava e Mehdi, 2005).

A nível celular o vanadato pode intervir em processos fisiológicos e afetar: processos de fosforilação e desfosforilação de proteínas provavelmente devido à semelhança com o fosfato (Simons, 1979; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999); a atividade de diversos enzimas nomeadamente sistemas transportadores de iões devido à sua potente atividade inibitória, sendo referenciada a sua ação na bomba de sódio (Simons, 1979; Chasteen, 1983; Nechay, 1984; Nielsen, 1991; Boscolo *et al.*, 1994; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999), bem como na ação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase alterando a translocação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Aureliano e Madeira, 1994b; Aureliano e Madeira, 1998). Outros efeitos são referidos como a alteração do metabolismo da tiroide, a ação nos sistemas de defesa antioxidante com diminuição de antioxidantes celulares e a indução de stresse oxidativo com peroxidação lipídica por geração de radicais livres (Simons, 1979; Chasteen, 1983; Nielsen, 1991; Serra *et al.*, 1992; Harland e Harden-Williams, 1994; Barceloux, 1999). Também existem claras evidências da ação do vanádio sobre outros processos metabólicos como a inibição da biossíntese de colesterol em animais, incluindo no Homem bem como a ação no metabolismo da glucose em que mimetiza a ação da insulina ou interferência no crescimento mimetizando fatores de crescimento (Chasteen, 1983; Nielsen, 1991; Hamel *et al.*, 1993; Harland e Harden-Williams, 1994).

No sistema e células sanguíneas tem sido referidos diversos sinais de toxicidade, assim e apesar de o tempo de semivida no sangue ser inferior a 1 hora (Nechay, 1984), o vanádio, induz peroxidação lipídica nos eritrócitos e diminuição do número de eritrócitos, do nível de hemoglobina e do valor de hematócrito enquanto se pode por outro lado se observa um aumento de metahemoglobina no sangue (Zaporowska *et al.*, 1993; Zaporowska e Scibior, 1998a; Soares *et al.*, 2003). Estudos em que foram incubados eritrócitos *in vitro* com compostos de vanádio observou-se uma diminuição do nível de 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) que é um importante regulador da afinidade da hemoglobina para o oxigênio. Deste modo, a eficiência do transporte de oxigênio pela hemoglobina depende da concentração de 2,3-BPG nos eritrócitos e por isso o vanádio tem influência no transporte de oxigênio pela hemoglobina, pois o vanádio afeta o metabolismo da glucose nos eritrócitos (Zaporowska e Scibior, 1998a). Outros estudos, *in vivo*, com eritrócitos expostos ao vanádio revelaram que estes tornam-se mais suscetíveis à hemólise, a qual se deve a uma alteração da permeabilidade na sua membrana, que provoca alterações na pressão osmótica intracelular (Hogan, 1990). Também foram observadas alterações em células do sistema leucocitário devido à exposição a compostos de vanádio tendo-se descrito uma diminuição da atividade fagocitária dos macrófagos bem como efeitos ao nível da atividade anticoagulante em que o vanádio promove a inibição da atividade dos fatores de coagulação com conseqüente inibição da agregação dos trombócitos (Zaporowska e Scibior, 1998b).

Também se encontram referidos efeitos tóxicos a nível celular induzidos por sais de vanádio como a hepatotoxicidade, a nefrotoxicidade, a teratogenicidade assim como toxicidade reprodutiva/desenvolvimento (Domingo *et al.*, 1995; Domingo, 2002). A observação de que sais de vanádio estimulam a mitogênese e a proliferação celular em células de rato em cultura, podem induzir que estes compostos podem ter o potencial para exercer atividade tumorogénica/carcinogénica (Djordjevic, 1995)

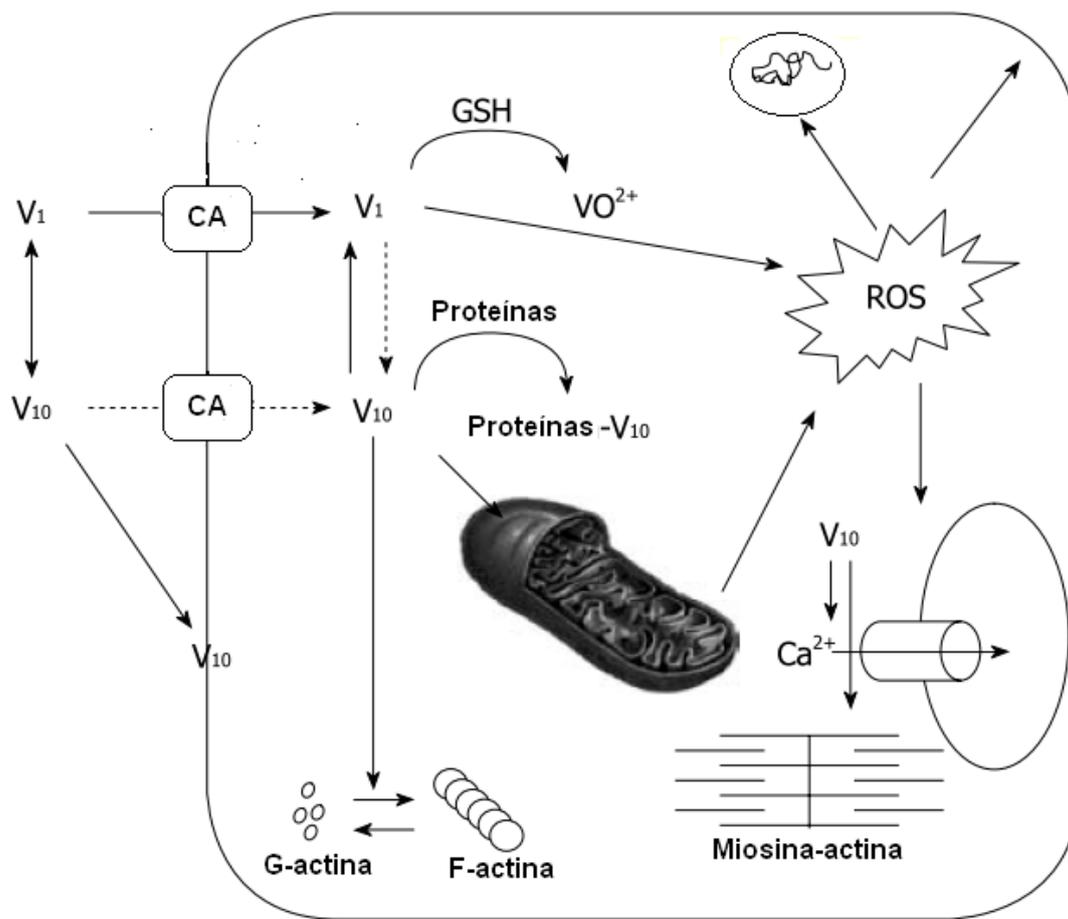
Muitas das questões sobre a toxicidade do vanádio não têm sido objeto de consenso nomeadamente entre os autores (Domingo, 1999; McNeill, 2000). Contudo, é focada a importância de investigações mais detalhadas para avaliar a toxicidade dos vários compostos de vanádio com possíveis aplicações terapêuticas antes de se proceder ensaios clínicos de longa duração em humanos.

### 1.6.1 Efeitos tóxicos do vanádio mediados por decavanadato

Um dos aspetos a ter em conta, sobre os efeitos biológicos do decavanadato, reside no facto de que 98 % do vanádio intracelular está presente como vanadilo, o que se traduz em concentrações de vanadato demasiado baixas para permitir a formação de diferentes espécies oligoméricas. Por isso, muitos estudos toxicológicos *in vivo* e *in vitro* não têm em conta os efeitos promovidos pelos diferentes oligovanadatos nos sistemas biológicos. Contudo, em 1973, foram realizados estudos sobre a interação do vanadato decamérico com ribonucleases. Posteriormente, outros estudos de interação de proteínas com a espécie decamérica indicaram que esta é potencialmente responsável pelos efeitos exercidos nas atividades enzimáticas (DeMaster e Mitchell, 1973; Chasteen, 1983). Isto significa que o vanadato decamérico pode apresentar diferentes alvos, vias de ação ou efeitos distintos das outras espécies de vanadato. De facto, a presença de decavanadato no meio celular pode ser viabilizada uma vez que a biorredução do vanadato depende da razão entre agentes redutores e oxidantes presentes na célula (Zaporowska e Scibior, 1998a).

Existem, por outro lado, evidências de que a espécie decamérica de vanadato é estabilizada após interação com proteínas do citoesqueleto e membranares (Ramos *et al.*, 2006). Isto faz com que, a presença de oligómeros de vanadato, nomeadamente a espécie decamérica, possam impedir a redução do vanadato. Adicionalmente a oligomerização do vanadato pode acontecer após acidificação intracelular, por várias razões, e formar-se a espécie decamérica. Deste modo, o decavanadato pode interatuar intracelularmente com proteínas e induzir respostas celulares distintas das promovidas por outros oligovanadatos (Fig. 1.6).

Foi recentemente sugerido que a espécie decamérica de vanadato possa contribuir para os efeitos toxicológicos promovidos pelo vanadato nos sistemas biológicos (Aureliano e Gândara, 2005; Soares *et al.* 2007a), pois afeta a polimerização da actina, a contração muscular, a homeostasia do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) e a atividade mitocondrial (Fig. 1.6).



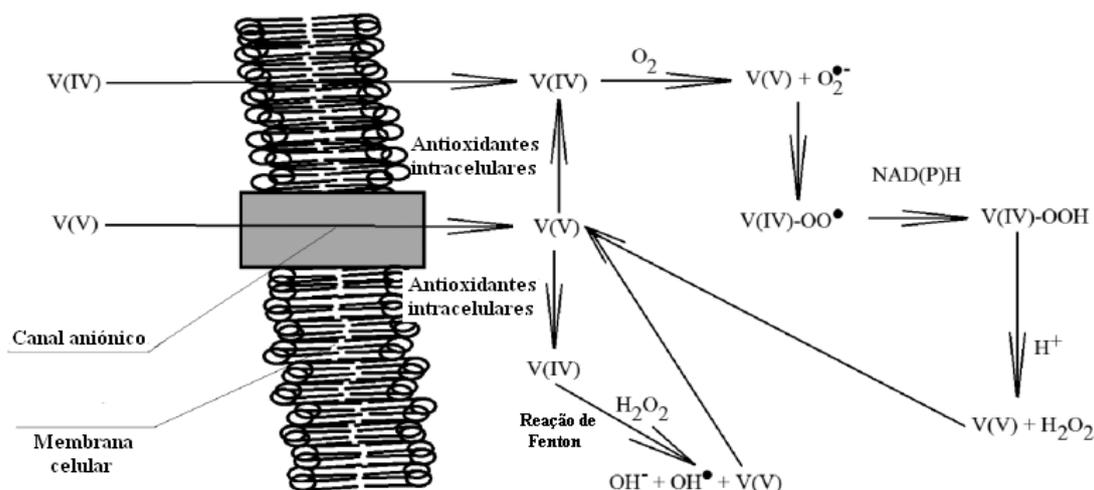
**Figura 1.6** - Esquema proposto para os alvos celulares do vanadato decaamérico ( $V_{10}$ ): sugere-se que o  $V_{10}$  seja transportado para o meio intracelular através de canais aniônicos (CA) e/ou interatue com proteínas membranares, assim como se forme após acidificação intracelular; indica-se também a redução do vanadato monomérico ( $V_1$ ) por ação 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; indica-se a possibilidade do vanádio originar ROS e consequente ação em diversos processos biológicos, propõe-se a acumulação de  $V_{10}$  em organelos subcelular, como a mitocôndria, afetando a sua função e o efeito do  $V_{10}$  no sistema contrátil e na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase com consequência na homeostasia do cálcio (Adaptado de Aureliano e Gândara, 2005; Aureliano, 2011).

### 1.6.2 Toxicidade de vanádio e stresse oxidativo

O vanádio é um metal conhecido pela sua capacidade pró-oxidante (Zaporowska e Scibior, 1998a). Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel importante como mediadores e reguladores do metabolismo. As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem estimular o transporte de glucose para as células, e podem ser mensageiros secundários no crescimento e morte de células (Goc, 2006). Um aumento de ROS e a consequente exaustão da reserva antioxidante das células é uma situação conhecida por stresse oxidativo. Várias doenças crônicas, tais como doenças inflamatórias, cancro,

doenças cardiovasculares ou doenças metabólicas, estão associadas a um aumento do stresse oxidativo, um processo caracterizado por um excesso, moléculas altamente reativas, ou ROS, tais como o radical do anião superóxido, o peróxido de hidrogénio e o radical hidróxido (Packer, 1993; Łacka e Grzeszczak, 1997).

Semelhante a outros metais tóxicos conhecidos por poderem atuar como catalizadores na deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas, o vanádio pode também produzir espécies reativas de oxigénio (ROS) que participam na peroxidação de lípidos e agir sobre os componentes do sistema de defesa antioxidante, principalmente na atividade de enzimas antioxidantes (Stohs e Bagchi, 1995). Assim, a capacidade do vanádio para gerar radicais livres, por exemplo, radicais hidroxilo através de reações de Fenton (Fig. 1.7) ou de Haber-Weiss (Liochev e Fridovich, 1991; Leonard *et al.*, 2004; Goc, 2006; Cuesta *et al.*, 2011), pode deste modo diminuir a concentração de compostos celulares biologicamente importantes o que enfraquece de sistema antioxidante, e torna as células mais vulneráveis a danos oxidativos (Deng *et al.*, 2012).



**Figura 1.7** - Vias de formação de ROS nas células mediadas por vanádio. O vanádio entra nas células e como resultado de reações com antioxidantes intracelulares encontra-se predominantemente no estado de oxidação (+4) (Aureliano e Gândara, 2005; Kordowiak e Holko, 2009). Os compostos de vanádio no estado de oxidação (+4) são oxidados pelo oxigénio ao estado de oxidação (+5) originando o radical do anião superóxido, estes por sua vez podem complexar num radical peroxovanádio (+4) que é reduzido pelo NADPH e origina o peróxido de hidrogénio. Na reação de Fenton o vanádio no estado de oxidação (+4) é oxidado pelo peróxido de hidrogénio e origina a formação do radical hidroxilo (Cuesta *et al.*, 2011) (Korbecki *et al.*, 2012).

A produção de ROS pelos iões de vanádio pode implicar na peroxidação lipídica das membranas biológicas e lipoproteínas, resultando numa agregação proteica, ativação de processos de mutagénese, degradação de ADN ou indução da apoptose (Lapenna *et al.*, 2002;

Goc, 2006). Alguns estudos comprovaram a ação do vanádio na produção de ROS. Assim, verificou-se em estudos *in vitro* com linhas celulares de osteoblastos 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, 1984; Viarengo, 1989; Stohs e Bagchi, 1995). Outros estudos têm referido a capacidade evidenciada por compostos de vanádio em produzir ROS, promovendo stresse oxidativo e induzindo peroxidação lipídica e alterações na atividade de diversas enzimas antioxidantes, nomeadamente a dismutase do superóxido (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase, entre outras alterações em agentes antioxidantes (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; Soares *et al.*, 2007b e Soares *et al.*, 2008a; Aureliano, 2009).

A par de estudos que envolvem a formação de espécies reativas de oxigénio, por compostos de vanádio, como responsáveis pela inibição do ciclo celular, pela indução de apoptose, na ativação de genes envolvidos na reparação celular ou na reparação de ADN, além de proteínas e genes relacionados com as vias de sinalização carcinogénica (Chen *et al.*, 1999; Assimakopoulos *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001; Zang *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2002; Zang *et al.*, 2004), tem sido referida a capacidade de complexos de vanádio em inibir a peroxidação de lípidos evitando assim a geração de ROS. Deste modo, a restauração do desequilíbrio na capacidade antioxidante, diminuindo deste modo o stresse oxidativo e a toxicidade do vanádio (Skula *et al.*, 2006; Francik *et al.*, 2011) que é fundamental para uma das potenciais utilizações dos compostos de vanádio no tratamento da diabetes.

No entanto, em Humanos, apesar de ser consensual que os efeitos tóxicos de vanádio dependem de várias condições experimentais, como concentração e modo de exposição, ainda não estão esclarecidos os seus mecanismos de toxicidade. Apesar disso, alguns estudos demonstraram que, em pacientes tratados com sais de vanádio, o desconforto gastrointestinal era o efeito tóxico mais comum (Srivastava e Mehdi, 2005). Contudo, a maioria dos estudos em humanos não são suficientes para clarificar os principais efeitos tóxicos em humanos uma vez que estes estudos têm sido realizados com doses mais baixas do que as utilizadas nas experiências com animais e são de curta duração (Zorzano *et al.*, 2009). Este facto é importante, uma vez que numa doença crónica como por exemplo a diabetes, o tratamento com compostos de vanádio envolve a sua administração ininterrupta e deste modo importa

saber quais são os efeitos a longo prazo de uma administração crônica de compostos de vanádio (Goc, 2006).

A descrição, em 2010, de um envenenamento fatal por vanádio numa mulher de 24 anos, na Argélia, revelou que a paciente apresentava sintomas de dor abdominal, vômitos, diarreia múltipla, hipoglicemia, uma severa falha renal aguda e que acabou por falecer num contexto de problemas respiratórios e asfixia tecidual, afetando todos os órgãos e levando à inibição dos processos respiratórios celulares em que as análises ao sangue revelaram uma concentração de 6,22 mg/L de vanádio no sangue, correspondendo a 6000 vezes mais alto que a concentração na população em geral (Boulassel *et al.*, 2011).

### 1.7 Compostos de vanádio e suas potenciais aplicações terapêuticas

Quando se descobriu, entre 1975 e 1980, que o vanádio inibia, em concentrações na ordem do nM, eficazmente várias fosfohidrolases, tais como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, o interesse nos compostos de vanádio aumentou relativamente às suas potenciais aplicações terapêuticas e farmacológicas (Shetcher *et al.*, 2003).

A utilização de vanádio como agente terapêutico não é consensual, uma vez que já foi referido que pode apresentar vários efeitos tóxicos. Deste modo, a comunidade científica parece estar dividida em pelo menos duas opiniões: uma favor da aplicação farmacêutica dos compostos de vanádio e outra contra (Nriagu, 1998b). Sendo que compostos contendo vanádio têm revelado possuir várias propriedades biomédicas, uma vez que interatua com inúmeros mecanismos bioquímicos e fisiológicos, e assim atuar como antidiabético, antitumoral, na reversão de resistência de microrganismos patogénicos, a drogas, entre outros efeitos (Crans *et al.*, 2004; Goc, 2006; Thompson e Orvig, 2006a; Thompson *et al.*, 2009).

Uma das aplicações biomédicas do vanádio remete-se ao efeito insulino-mimético do mesmo. Porém, o mecanismo de ação ainda não se encontra devidamente explicado, muito embora tenham sido efetuados vários estudos *in vitro* e *in vivo* com compostos de vanádio com vista a avaliar a capacidade destes no tratamento de diabetes do tipo 1 e diabetes do tipo 2. Devido a estas propriedades insulino-miméticas que os compostos de vanádio apresentam, ou seja, tal como a insulina, promovem a acumulação de glucose, e por isso tem sido amplamente estudados essencialmente no tratamento de diabetes (Poucheret *et al.*, 1998; Orvig *et al.*, 1995; Willsky *et al.*, 2001; Thompson e Orvig, 2006a; Thompson *et al.*, 2009). Vários estudos comprovaram que compostos de vanádio mimetizam o efeito da insulina, e tal como a hormona, influenciam a atividade das enzimas que participam no metabolismo dos

hidratos de carbono, estimulando a entrada de glucose nas células e inibindo os processos de glicogenólise e gliconeogénese enquanto no metabolismo dos lípidos estimulam a lipogénese. Além disso, podem afetar também o metabolismo de proteínas bem como afetar os processos de controlo da expressão de genes envolvidos nestes metabolismos, porém os mecanismos concretos continuam por esclarecer (Etcheverry e Cortizo, 1998b; Rehder, 2003; Shetcher *et al.*, 2003; Gog, 2006).

Muito embora se tenha demonstrado vários efeitos do vanádio *in vitro*, existem várias hipóteses para o mecanismo de ação *in vivo*. As propriedades inibitórias do vanadato sobre as fosfatases de tirosina específicas intracelulares podem ser um dos fatores a considerar uma vez que a ação da insulina está associada à ativação de uma tirosina cinase. Também tem sido referenciado, devido à semelhança entre vanadato e fosfato a possibilidade de o vanadato ativar a fosforilação do recetor da insulina. Além destas hipóteses, têm sido propostas outras, tais como o aumento de cálcio intracelular, a inibição  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, a alteração do pH intracelular ou intravesicular e a modificação dos transportadores da glucose (Caldeira *et al.*, 1997; Verma *et al.*, 1998; Mukherjee *et al.*, 2004). Porém, também existem indicações, em alguns trabalhos, que a base molecular da ação insulino-mimética do vanádio envolve a sua atividade em eventos pós-recetor na cascata de sinalização da hormona e não a sua atividade sobre o recetor da insulina (Etcheverry e Cortizo, 1998b; Mukherjee *et al.*, 2004).

Outra das propriedades importantes deriva da observação que o vanádio causava transformações neoplásicas em diferentes tipos de células (Goc, 2006). Posteriormente, verificou-se que o comportamento apresentado pelo vanádio era semelhante ao induzido por muitos fatores de crescimento e vários agentes tumorogénicos. Foi então sugerido que as alterações morfológicas estariam associadas com um aumento na fosforilação de tirosinas em numerosas proteínas intracelulares. Por outro lado, foi demonstrado experimentalmente que o vanádio administrado em ratos poderia ter um potencial anticarcinogénico contra a neoplasia hepática quimicamente induzida (Nriagu, 1998b). Constatou-se assim que o vanádio possuía uma atividade antitumoral, tendo sido demonstrada a ação pró e anti neoplásica *in vivo e in vitro* dos seus derivados e alguns compostos de vanádio. Por isso estes têm vindo a ser estudados na prevenção e tratamento do cancro devido à sua atividade antiproliferativa, atividade citostática/citotóxica, induzindo a morte celular por apoptose ou por necrose, e atividade antimetástases o que sugere a possibilidade do uso de compostos de vanádio na quimioterapia (Goc, 2006; Li *et al.*, 2010; Kassabova-Zhetcheva e Pavlova, 2011).

A capacidade do vanadato para reverter a resistência de microrganismos patogênicos a drogas é um efeito muito importante, uma vez que a resistência de microrganismos aos tratamentos de hoje, constitui um dos maiores obstáculos na medicina. Adicionalmente, foi descrita a possibilidade de compostos de vanádio exercerem uma atividade antiparasitária (Benítez *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 2012). Outras aplicações possíveis incluem atividades antiHIV (D'Cruz *et al.*, 2003; D'Cruz *et al.*, 2004) sendo também referida a possibilidade de serem utilizados como contraceptivos vaginais (D'Cruz e Uckun, 2005) e espermicidas (D'Cruz *et al.*, 1998a; D'Cruz *et al.*, 1998b).

### 1.7.1 Vanádio e diabetes

Os primeiros indícios de que os sais inorgânicos de vanádio apresentam efeitos insulino-miméticos surgiram em 1899 (Marx, 2002; Thompson e Orvig, 2006a). Mas só em 1979, com os estudos de Tolman e seus colaboradores, se despertou o interesse nos sais de vanádio; ao demonstrar os seus efeitos insulino-miméticos. Verificou-se que vários compostos de vanádio, de uma forma semelhante à insulina, estimulavam o transporte e a oxidação de glucose em adipócitos, aumentavam a síntese de glicogéneo no diafragma e em hepatócitos e inibiam a gluconeogénese em células do fígado (Tolman *et al.*, 1979). Posteriormente, outros estudos revelaram outros efeitos insulino-miméticos dos compostos de vanádio *in vitro* e *in vivo*, incluindo a lipogénese, a inibição da lipólise e gliconeogénese (Poucheret *et al.*, 1998; Lappena *et al.*, 2002; Thompson e Orvig, 2006a; Thompson *et al.*, 2009). Um marco importante na atenção que os compostos de vanádio poderiam ter um potencial relevante no tratamento da diabetes deve-se a trabalhos sobre as ações do vanádio *in vivo*, em que se demonstrou que o tratamento crónico com ortovanadato de sódio normalizava a hiperglicemia em ratos diabéticos STZ (Heyliger *et al.*, 1985; Meyerovitch *et al.*, 1987).

Os estudos sobre vanádio como insulino-mimético foram confirmados e expandidos, por várias outras investigações, tendo-se verificado, em modelos animais a redução significativa da hiperglicemia, diminuição de glicosúria e melhoria na tolerância à glucose (Chen *et al.*, 2009). Também se verificou que peróxidos de vanadato ou compostos de peroxovanádio apresentam atividade insulino-mimética ou antidiabética (Crans *et al.*, 2004). Além de sais inorgânicos de vanádio foram testados complexos orgânicos de vanádio, em adição aos sais inorgânicos, que também demonstraram exercer efeito em animais modelo de diabetes tipo 1 (Kajimoto e Kaneto, 2004; Chen *et al.*, 2009). Também se verificou o potencial antidiabético de vários compostos de vanádio em modelos animais de diabetes tipo

2, induzindo normoglicemia e normoinsulinemia (Srivastava e Mehdi, 2005). Foi também sugerido que os compostos de vanádio exerciam uma influência protetora nas células beta pancreáticas e reforçava o efeito residual da insulina (Srivastava e Mehdi, 2005). Ainda assim, o vanádio possivelmente devia a sua resposta antidiabética a combinação de ações insulino-miméticas e insulino-potenciadoras (Poucheret *et al.*, 1998; Srivastava e Mehdi, 2005).

A demonstração dos efeitos benéficos dos compostos de vanádio, em ambos animais modelo de diabetes tipo 1 e 2, encorajou vários investigadores a determinar benefícios clínicos da terapia do vanádio em sujeitos humanos com diabetes (Srivastava e Mehdi, 2005). Embora os primeiros ensaios de compostos inorgânicos de vanádio tenham sido realizados nos anos noventa, irritação gastrointestinal e alterações inconclusivas nos níveis de glucose no plasma deixaram algumas dúvidas relativamente à viabilidade destes compostos. De facto, os estudos tinham sido limitados e com doses de vanádio administradas durante curto período de tempo. Posteriormente, foram feitos em estudos de investigação com tratamento prolongado com doses de sulfato de vanadilo mais elevadas e num número significativamente maior de sujeitos, com diabetes tipo 2 (Goldfine *et al.*, 2000; Cusi *et al.*, 2001). Outros estudos, têm sido realizados, e a administração por duas semanas de metavanadato de sódio, a uma concentração de 125 mg/dia, permitiu verificar que, nos grupos de pacientes com diabetes tipo 1, não se observou teve qualquer efeito nos níveis de glucose, enquanto nos pacientes com diabetes tipo 2, o metavanadato de sódio, revela um aumento de sensibilidade à insulina, uma diminuição da glucose presente no plasma em jejum e uma diminuição da hemoglobina glicosilada (HbA1c) (Srivastava e Mehdi, 2005; Thompson e Orvig, 2006a), nestes estudos verificou-se como efeito secundário principal a ocorrência de diarreia. Noutro estudo, utilizando sulfato de vanadilo com a uma dose de 100 mg/dia durante três semanas em seis pacientes com diabetes tipo 2 registou-se uma redução da glucose no plasma (Goc, 2006).

Contudo, a utilização de compostos de vanádio para o tratamento da diabetes não tem tido por parte da indústria farmacêutica a atenção devida mesmo depois de descritos os efeitos fisiológicos atribuídos ao vanádio. De entre as razões pode-se enumerar: a toxicidade para o organismo que se sabe ser maior para o vanadato do que para o vanadilo; os receios de não ser bem recebido no mercado visto que se trata de um metal pesado o que tem conotação negativa; a acumulação do vanádio nos ossos na forma de vanadilo e o tempo de semivida ser de cerca de um mês. Contudo, a principal razão poderá residir na competição que fármacos

contendo vanádio poderiam ter com fármacos que sendo usados em tratamentos antidiabéticos e que sejam menos eficazes (Rehder, 2003). Apesar de se conhecerem estudos efetuados em humanos usando sais de vanádio em dose muito baixas para diminuir o risco de toxicidade (Goldwaser *et al.*, 2000b; Shechter *et al.*, 2003). Deste modo, os estudos para se obter um composto contendo vanádio com aplicação clínica no tratamento da diabetes estão concentrados na síntese, melhoramento e aplicação de compostos mais específicos e eficientes. Vanádio complexado por ligandos orgânicos, de forma a potenciar a sua eficácia insulino-mimética, sem aumentar a sua toxicidade ou que exibam níveis de toxicidade negligenciáveis, estão a ser sintetizados, deseja-se que a sua absorção seja mais efetiva por possuírem maior capacidade de passagem pelas membranas plasmáticas e seja potenciada a mobilidade intracelular do vanádio (Verma *et al.*, 1998).

Deste modo, o desenvolvimento de novos complexos de vanádio(V) e (IV), com diferentes ligandos orgânicos, tem sido um avanço importante na utilização potencial de compostos de vanádio com propriedades farmacológicas. O objetivo principal do desenvolvimento de complexos orgânicos de vanádio foi o de melhorar substancialmente a absorção gastrointestinal, a biodisponibilidade e o comportamento intracelular dos compostos de vanádio, reduzindo desse modo a dose necessária para obter os efeitos ótimos pretendidos (McNeill *et al.*, 1992). Algumas das características desejáveis incluem a sua estabilidade em solução, a sua carga neutra, a elevada solubilidade lipídica, de modo a apresentarem uma mais potente atividade inibitória sobre as proteínas fosfatases de tirosina (PTP), para que possam exercer efeitos farmacológicos mais potentes e eficazes (Thompson *et al.*, 1999). Assim, têm sido sintetizados diferentes complexos de vanádio e avaliada a sua ação como insulino-miméticos (McNeill *et al.*, 1992; Crans e Tracey, 1998; Thompson *et al.*, 1999; Reul *et al.*, 1999; Goldwaser *et al.*, 2000b; Thompson e Orvig, 2006b). Nos últimos anos, outras novas classes de complexos de vanádio foram sintetizados utilizando diferentes ligandos e diferentes estratégias. Deste modo, surgiram novos complexos de vanádio com diversos ligandos orgânicos tais como: citrato (Kaliva *et al.*, 2001; Salifoglou *et al.*, 2002; Tsaramyrsi *et al.*, 2001), sacarídeos (Barrio *et al.*, 2006), poliálcoois (Williams *et al.*, 2006), quercetina (Shukla *et al.*, 2006), ácido oxodiacético (Rivadeneira *et al.*, 2007),  $\alpha$ -furanocarboxilato (Niu *et al.*, 2007), hidrazida (Ashiq *et al.*, 2008), arilalquilamina (García-Vicente *et al.*, 2007; Zorzano *et al.*, 2009), de 4-amino-2,6-dipicolinato (Li *et al.*, 2009), cloro dipicolinatos (Smee *et al.*, 2009), 3-hidroxi-4-piridinonato (Rangel *et al.*, 2009), piridinona e salicilaldeído (Faneca *et al.*, 2009), salicilaldeído semicarbazona (Rivadeneira *et al.*, 2009) e anião

---

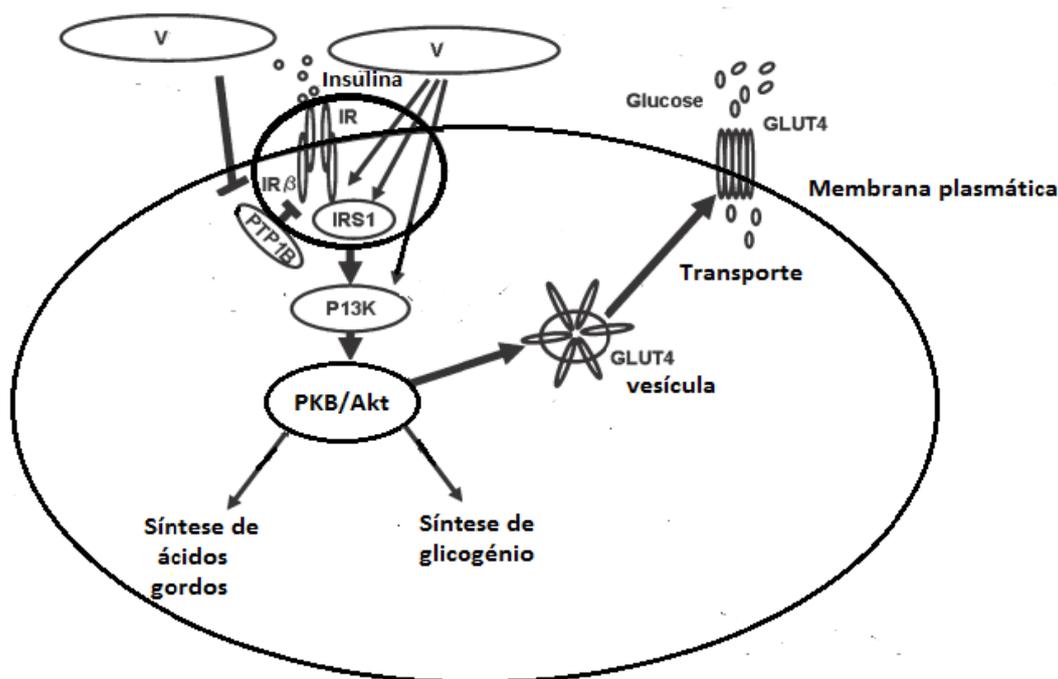
nitriлотriacetato (Arrambide *et al.*, 2010).

Dos complexos de vanádio sintetizados, as que têm sido mais estudados *in vivo*, tanto em modelos animais como em pacientes diabéticos foram o bis(maltolato)oxovanádio(IV) (BMOV) e o bis(etilmaltolato)oxovanádio(IV) (BEOV) (McNeill, 1992; Poucheret *et al.*, 1998; Thompson e Orvig, 2006a; Thompson *et al.*, 2009). Para o BMOV, ensaios em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) verificou-se a normalização dos níveis de glucose sanguínea e do metabolismo dos lípidos alimentares, bem como melhorou o controle da disfunção cardíaca sem que se tenha verificado qualquer aumento na circulação os níveis de insulina. (Poucheret *et al.*, 1998; Goc, 2006). O BMOV apresenta ainda uma potência de cerca de 50 % maior do que a de sulfato de vanadilo, bem como uma diminuição do tempo para que se observem efeitos. Além disso, não foram observados com BMOV alguns sinais de toxicidade, nomeadamente a desidratação, situação que se tem observado nos ensaios com sulfato de vanadilo (McNeill *et al.*, 1992; Yuen *et al.*, 1993a; Shukla *et al.*, 2006). Atualmente, dos compostos de vanádio com propriedades insulino-miméticas foram realizados os ensaios clínicos de Fase I para o complexo de vanádio bis-(etilmaltolato) oxovanádio(IV) (BEOV) (Orvig *et al.*, 2003; Thompson e Orvig, 2006 a; Thompson e Orvig, 2006 b; Thompson *et al.*, 2009) . O objetivo geral deste estudo clínico de Fase I foi avaliar a segurança e tolerabilidade do BEOV. Os resultados observados não revelaram efeitos adversos à saúde em qualquer um dos voluntários, enquanto os parâmetros bioquímicos ao nível sanguíneo apresentaram valores normais bem como as funções renal, hepática e gastrointestinal aparentemente não mostraram ser afetadas. Nestes ensaios, verificou-se que a biodisponibilidade relativa do vanádio proveniente do BEOV foi estimada em ser três vezes superior à biodisponibilidade de vanádio proveniente de uma dose equivalente de sulfato de vanadilo (Thompson e Orvig, 2006a).

Nos últimos dez anos alguns estudos, com compostos inorgânicos de vanádio e complexos orgânicos de vanádio, efetuados em modelos animais com diabetes induzida mostraram que estes compostos administrados durante ensaios de longa duração a par dos seus efeitos na normalização dos níveis de glucose, colesterol ou triacilgliceróis não apresentaram efeitos secundários considerados tóxicos (Yanardag *et al.*, 2003; Koyuturk *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Zorzano e colaboradores utilizando sais de vanádio compostos por séries de arilquilaminas combinadas com decavanadato, verificou que permitem a utilização de doses antidiabéticas efetivas de vanádio a níveis não tóxicos. Estes compostos são ativos oralmente e eficientes sob condições *in vivo*,

nas quais a insulina está ausente. Foram testados os sais de decavanadato,  $B_6V_{10}$ ,  $B_5V_{10}$  e  $B_4V_{10}$ , que mostraram uma forte ativação do transporte da glucose em adipócitos de rato. Sendo a resposta, *in vivo*, ao tratamento com estes sais também traduzida numa ação insulino-mimética marcada com redução da glicémia (García-Vicente *et al.*, 2007).

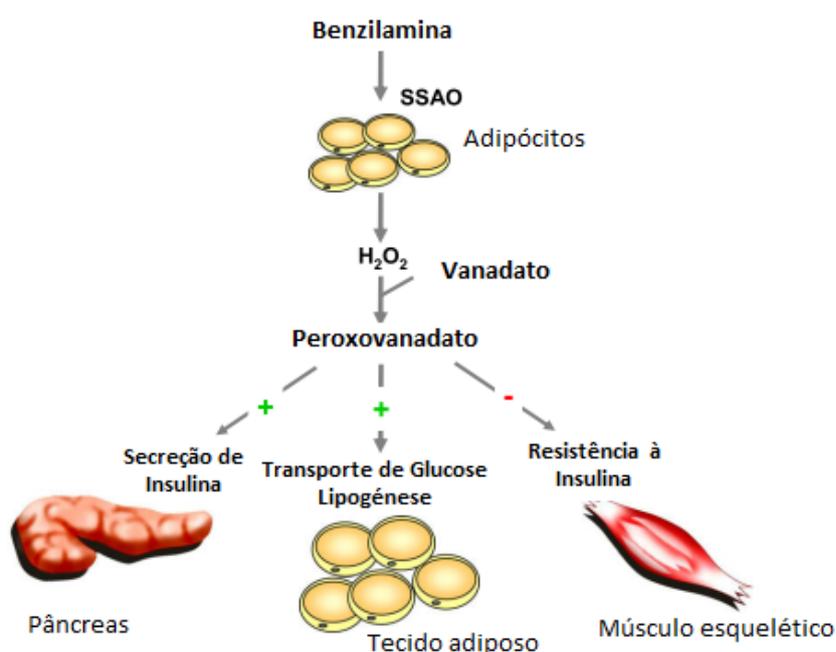
Muitos ensaios experimentais efetuados com pacientes diabéticos confirmaram o efeito terapêutico dos compostos de vanádio estudados, em que se verificou uma diminuição dos níveis de glucose no sangue com efeitos secundários negligenciáveis. (Thompson *et al.*, 2009). Os compostos de vanádio caracterizam-se por poderem reduzir os níveis de glucose sanguínea por diferentes vias (Vardatsikos *et al.*, 2009). Devido à similaridade estrutural com os aniões ortofosfato, o anião ortovanadato e os complexos orgânicos de vanádio são inibidores das proteínas fosfatases de tirosina (PTP) (Crans *et al.*, 2004). Uma das hipóteses tem em conta a inibição da PTP-1B (Fig. 1.8), enzima que é responsável pela desfosforilação dos recetores de insulina, que conduz à insulinoresistência (Scior *et al.*, 2009; Scior *et al.*, 2010). Os efeitos do vanádio na via de sinalização da insulina não está completamente esclarecido. Pensa-se que os compostos de vanádio causem a inibição da PTP-1B (Fig 1.8), e deste modo promovam a acumulação de glucose (Sakurai *et al.*, 2008).



**Figura 1.8** – Mecanismos de ação antidiabética possíveis para os compostos de vanádio. Os compostos de vanádio podem inibir a PTP1B o que impede a desfosforilação do recetor da insulina (IR). Outra via de atuação refere que os compostos de vanádio ativam o recetor da insulina (IR) que é uma tirosina quinase que catalisa a fosforilação da proteína celular IRS1 que ativa a PKB/Akt que por sua vez além de outras atividades ativa a proteína transportadora de glucose GLUT4 que transporta para célula a glucose (Adaptado de Sakurai *et al.*, 2008).

A inibição da PTP-1B mantém, a ativação da PKB/Akt que conduz a um aumento do transporte de glucose para as células através da proteína transportadora de glucose (GLUT4) (Fig. 1.8). Por outro lado, a ativação da PKB/Akt promove a fosforilação e inativação da cinase de glicogénio sintetase 3 (GSK3) que estimula a síntese do glicogénio a partir da glucose (Vardatsikos *et al.*, 2009), favorecendo por isso o aumento de concentração intracelular de glucose.

Recentemente, estudos que incluíram a combinação de benzilamina e decavanadato, em vários tipos de células de rato, revelaram que estes atuavam na IRS-1 e na PI3K. O mecanismo proposto de ação envolve a formação de peroxovanadatos que potenciam a secreção de insulina no fígado, o aumento de transporte da glucose e a lipogénese nos adipócitos, e previne a resistência à insulina nas células musculares (Fig. 1.9) (Zorzano *et al.*, 2009).



**Figura 1.9** - Modelo dos efeitos da combinação substratos de SSAO (benzilamina) e vanadato na homeostasia da glucose (Zorzano *et al.*, 2009).

Para além destes efeitos insulino-miméticos de complexos de decavanadato estão a ser desenvolvidos novos complexos de vanádio de decavanadato, no sentido de potenciar a sua ação insulinomimética, bem como potencial ação anticancerígena (Li *et al.*, 2010; Kassabova-Zhetcheva e Pavlova, 2011)

### 1.7.2 Vanádio e tumores

Existem algumas evidências que os compostos de vanádio possam ter propriedades anticancerígenas. Alguns estudos mostraram que em modelos animais, nos quais se induziram tumores por via química, os compostos de vanádio apresentaram propriedades quimio-preventivas por via da otimização das reações de fase I e fase II do processo de metabolização hepática dos xenobióticos (Bishayee *et al.*, 2000; Chakraborty *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2007). Em testes, utilizando modelos com células humanas tumorais, os compostos de vanádio inorgânicos e orgânicos revelaram resultados promissores para uma possível introdução na terapia devido aos efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos que se observaram a valores baixos de IC<sub>50</sub>, na ordem dos micromolar dependendo do tipo de célula e do composto de vanádio (Kordowiak *et al.*, 2007; Holko *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2008; Molinuevo *et al.*, 2008).

Por outro lado, os compostos de vanádio têm propriedades carcinogênicas e podem estimular o desenvolvimento de tumores. É o caso dos catiões vanadilo e pentóxido de vanádio que ao originarem o aparecimento de ROS podem causar danos no ADN, o que pode levar a mutações e por consequência levar ao desenvolvimento de tumores (Ehrlich *et al.*, 2008). Além disso os compostos de vanádio também podem ter propriedades antiapoptóticas devido à alteração na fosforilação da proteína 53 (p53) e deste modo os vanadatos causam distúrbios na apoptose. (Suzuki *et al.*, 2007; Morita *et al.*, 2010).

Os efeitos dos compostos de vanádio dependem de diversos fatores, nomeadamente, do tipo de célula, do tipo de composto de vanádio e da dose. As propriedades apoptóticas ou antiapoptóticas dependem principalmente do tipo de célula. A proteína p53 tem um papel importante nesta alteração de efeitos. Assim em células tumorais o gene que codifica esta proteína está danificado e os compostos de vanádio inibem o ciclo celular e induzem apoptose (Zhang *et al.*, 2002). Adicionalmente, os compostos de vanádio ao originarem ROS ativam o NF-kB e aumentam o efeito apoptótico (Parrondo, 2010). Pelo contrário, em células funcionais a alteração da fosforilação da p53 conduzirá à inibição da apoptose (Morita *et al.*, 2010).

Recentemente, tem sido dada maior atenção aos efeitos antiproliferativos que os compostos de vanádio apresentam. Deste modo têm sido investigados os efeitos antitumorais dos compostos de vanádio em modelos animais e vários tipos de linhas de células malignas (Barrio *et al.*, 2006; Holko *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2008). Assim, os compostos de vanádio podem exercer diferentes efeitos sobre a proliferação celular: por vezes verifica-se que eles

estimulam a mitogênese mas noutros casos, eles são agentes inibitórios do ciclo celular.

De facto, verificou-se que podem inibir a proliferação celular mesmo quando são utilizadas doses baixas (Hanuske *et al.*, 1987; Etcheverry e Cortizo, 1998b). Por isso, alguns compostos de vanádio podem apresentar efeitos antitumorais (Djordjevic, 1995; Evangelou, 2002). Vários mecanismos têm sido descritos para explicar a inibição do ciclo celular ou a indução da morte de células tumorais por compostos de vanádio. Um das hipóteses aponta para que a ação antitumoral dos compostos de vanádio seja mediada pela inibição de PTPases e pela geração de espécies reativas de oxigénio (ROS) que, por sua vez, causar uma série de efeitos celulares como a clivagem de ADN, causar danos em diferentes componentes celulares ou estruturas sub-celulares (Fig. 1.10). A inibição das PTPases regula diferentes vias de transdução que desencadeiam a apoptose, como sejam, a paragem do ciclo celular e a modulação de proteínas envolvidas na capacidade metastática das células tumorais. Alguns estudos revelaram a ação antiproliferativa de vários compostos inorgânicos de vanádio tais como o ortovanadato de sódio (Cruz e Morgan, 1995), o vanadato (Hamaguchi *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002) pervanadato (Faure *et al.*, 2003).

Entre os compostos orgânicos de vanádio testados como drogas antitumorais incluem-se os complexos entre o ião vanadilo e a fenantrolina de que se destaca o METVAN [bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)Sulfato-oxovanádio(IV); VO(SO<sub>4</sub>)(Me<sub>2</sub>-Phen)<sub>2</sub>] (Narla *et al.*, 2000; Narla *et al.*, 2001a). Estes compostos de vanádio têm uma atividade antiproliferativa em diversos tipos de células tumorais e a baixas concentrações induzem apoptose e inibem o ciclo celular (Narla *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2000). No caso do METVAN a atividade citotóxica, verifica-se contra muitas linhas de células tumorais, com IC<sub>50</sub> menor que 1µM, reduzindo a invasividade da leucemia através da inibição de metaloproteínases e danos na mitocôndria devido à produção de ROS, fatores que contribuem para a apoptose celular (Dong *et al.*, 2000; Narla *et al.*, 2001b; Narla *et al.*, 2001c). Os efeitos secundários observados foram a inibição da espermatogénese e a apoptose das células germinais masculinas (D’Cruz e Uckun, 2001) e verificou-se ser mais eficaz do que a cisplatina na inibição das células tumorais de testículo e ovário (D’Cruz e Uckun, 2002).

Estudos efetuados em modelos animais, nomeadamente em ratos, revelaram que compostos de vanádio adicionados na dieta revelaram potencial quimio-terapêutico ou quimio-protetor em animais com diversos tipos de tumores. (Thompson e Chasteen, 1984; Bishayee e Chatterjee, 1995a; Bishayee e Chatterjee, 1995b; Bishayee *et al.*, 2000; Basak *et al.*, 2000; Chakraborty e Selvaraj, 2000; Samanta *et al.*, 2008a; Samanta *et al.*, 2008b).

### 1.7.3 Efeitos de vanádio no tecido ósseo

O vanádio acumula-se preferencialmente nos tecidos esqueléticos, contudo o vanádio quando ingerido em doses dietéticas está presente nos ossos em concentrações da ordem de 10-26µg/g (Ramanadham *et al.*, 1991; Yuen *et al.*, 1993b; Dai *et al.*, 1994; Amano *et al.*, 1996). O osso pode acumular vanádio e outros metais, assim o vanádio tal como o estrôncio participam na primeira etapa do processo de mineralização. Deste modo, os iões vanadato podem ser incorporados na estrutura de hidroxiapatite como análogos de fosfato (Gresser *et al.*, 1990; Crans, 1994; Bhattacharyya e Tracey, 2001). Além disso, alguns trabalhos já realizados para determinar papel biológico de vanádio, sugeriram que as dietas deficientes em vanádio podem levar um inadequado crescimento esquelético (Uthus e Nielsen, 1990; Nielsen, 1995). Alguns estudos com os compostos de vanádio insulino-miméticos demonstraram que podem participar no crescimento, na formação e na reparação do tecido ósseo (Cortizo e Etcheverry, 1995; Lau *et al.*, 1988; Barrio *et al.*, 2006; Cortizo *et al.*, 2006). Estudos realizados utilizando fibroblastos em cultura demonstraram que compostos de vanádio estimularam a síntese de ADN e colagénio, sugerindo que o vanádio possa atuar como promotor da proliferação e da diferenciação de osteoblastos (Canalis, 1985; Lau *et al.*, 1988). Embora os dados sejam escassos, é referido que o vanádio pode inibir ou impedir a reabsorção como uma consequência da inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no osso (Krieger e Tashjian, 1983). Outros estudos indicam que os compostos de vanádio têm ação na diferenciação osteoblástica, induzindo alterações morfológicas e estimulando o consumo de glucose neste tipo de células (Etcheverry *et al.*, 1997; Salice *et al.*, 1999; Barrio *et al.*, 2003). Tem também sido demonstrado que os compostos de vanádio inibem a atividade da fosfatase alcalina (ALP), enzima envolvida no processo de mineralização (Cortizo e Etcheverry, 1995; Barrio *et al.*, 1997; Etcheverry *et al.*, 2001; Crans *et al.*, 2004).

Recentemente, experiências em células ósseas de peixes com 10 µM de metavanadato e decavanadato induziram um aumento da proliferação celular mas afetaram a mineralização da matriz extracelular (Tiago *et al.*, 2008). Outros estudos efetuados com bis-(etilmaltoato)-oxovanádio(IV) (BEOV) e acetilacetato de vanadilo (VAC), os resultados sugeriram que, relativamente ao BEOV, a melhoria do estado ósseo está relacionada com a melhoria do estado diabético (Facchini *et al.*, 2006). Relativamente ao BEOV, administrado em ratos diabéticos verificou-se a melhoria ou a normalização dos níveis plasmáticos de osteocalcina e da taxa de deposição mineral, no entanto, este tratamento não aumentou a densidade mineral

óssea (DMO) em ratos diabéticos (Zhang *et al.*, 2007). Ambos os estudos não sugerem a influência do BEOV ou VAC nos ossos de ratos normais.

#### 1.7.4 Compostos de vanádio: Efeitos cardioprotetores

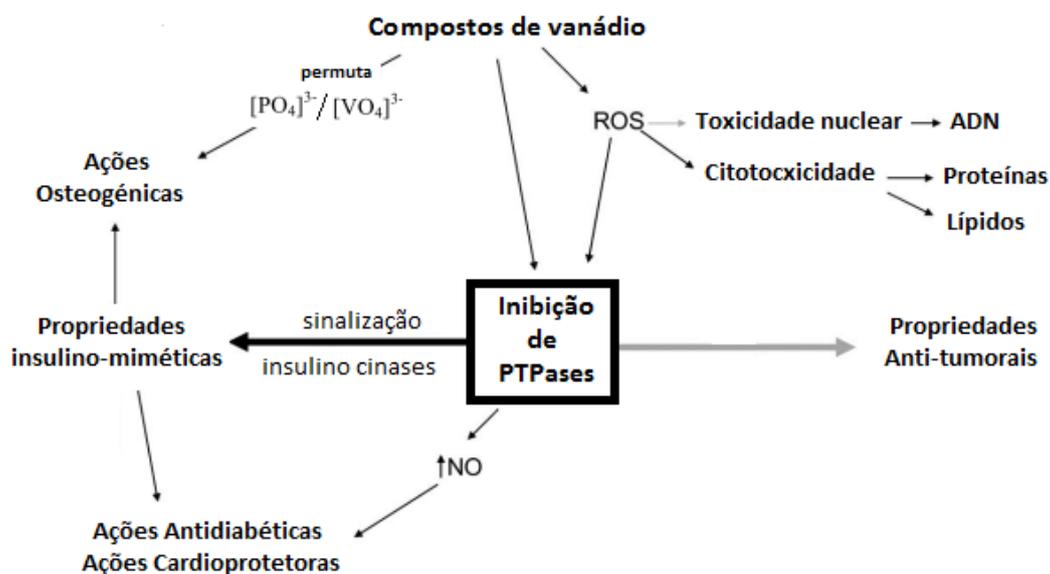
Os potenciais efeitos protetores dos compostos de vanádio no sistema cardiovascular têm sido estudados em paralelo com as ações insulino-miméticas dos compostos de vanádio. No entanto, é digno de mencionar que houve um aumento significativo no interesse das ações cardioprotetoras dos compostos de vanádio nos últimos anos (Verma *et al.*, 1998; Bhuiyan *et al.*, 2008a; Bhuiyan *et al.*, 2008b).

A ação cardioprotetora dos compostos de vanádio parece estar relacionada com a sua atividade anti-hipertensiva (Bhanot *et al.*, 1995), hipocolesterolémica (Goldfine *et al.*, 1995), hipoglicêmica e hipolipidêmica (Ramanadham *et al.*, 1989; Jelikić-Stankov *et al.*, 2007). Este efeito cardioprotetor pode estar relacionado com os efeitos dos compostos de vanádio como insulunomimético ou como antiapoptótico (Cortizo e Etcheverry, 1995; Verma *et al.*, 1998; Matsui *et al.*, 1999; Jelikić-Stankov *et al.*, 2007), estes efeitos podem ter uma função na inibição da hipertrofia cardíaca (Takada *et al.*, 2004) e sobre a contração da célula vascular pela indução da produção de óxido nítrico (Bhuiyan *et al.*, 2009).

Os efeitos cardioprotetores dos compostos de vanádio podem ser mediados através da inibição das PTPases (Cadene *et al.*, 1997; Theberge *et al.*, 2003; Carr *et al.*, 2004), pela produção de óxido nítrico (NO) (Verma *et al.*, 1998; Cortizo *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2006) e ativação da via PI3K/PKB (Bhuiyan *et al.*, 2008b).

Em experiências feitas com ratos para avaliar a relação entre hiperinsulinemia, insulinoresistência e hipertensão, os compostos de vanádio (sulfato de vanadilo e BEOV) mostraram uma atenuação da hiperinsulinemia e da hipertensão. (Bhanot *et al.*, 1994a; Bhanot *et al.*, 1994b). Alguns compostos de vanádio, como o bis-(1-oxi-2-piridinotiolato)oxovanádio(IV), (VO(OPT)) e o sulfato de vanadilo, foram associados à inibição da hipertrofia cardíaca e à recuperação da frequência cardíaca bem como da pressão arterial (Takada *et al.*, 2004; Bhanot *et al.*, 1994c). Sendo que a via de transdução intracelular PI3-K/PKB parece estar relacionada com a hipertrofia do miocárdio (Bhanot *et al.*, 1994c; Fujio *et al.*, 2000).

Em resumo, as propriedades dos compostos de vanádio são muito diversificadas e com potencialidades e aplicações terapêuticas que resultam da sua ação inibitória em diversas enzimas, onde a PTP tem um papel central (Fig. 1.10).



**Figura 1.10** - Vias de ação dos compostos de vanádio de modo a exercerem atividades farmacológicas (Adaptado de Barrio e Etcheverry, 2010).

### 1.7.5 Outros metais: Tungstênio, molibdênio e nióbio

Os oxometalatos de vanádio são dos compostos, contendo metais, mais estudados relativamente às suas propriedades biomédicas. Contudo, outros oxometalatos de molibdênio, tungstênio e nióbio, embora muito menos referenciados em estudos apresentam, alguns destes, propriedades biomédicas similares. Assim a sua importância biológica tem vindo a ser relatada por vários investigadores nomeadamente pela sua interação com as proteínas, sistemas enzimáticos e constituintes celulares (Kletzin e Adams, 1996; Mendel, 2001; Hille, 2002; Mendel e Bittner, 2006). Entre as atividades biomédicas que estes compostos possuem temos por exemplo a atividade insulino-mimética (Matsumoto, 1994), efeito hepatoprotector (Pawa e Ali, 2004) e anticoagulante (Rhule *et al.*, 1998).

O molibdênio possui também efeitos relevantes, que poderão ser aplicados na indústria farmacêutica, nomeadamente, o efeito insulino-mimético (Reul, *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2008), antiviral (Inouye *et al.*, 1993; Rhule *et al.*, 1998) e antitumoral (Rhule *et al.*, 1998; Waern e Harding, 2004; Waern *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2007).

Relativamente a compostos de tungstênio, os efeitos relatados são semelhantes aos descritos para outros oxometalatos de vanádio e molibdênio, nomeadamente os efeitos: antitumorais (Rhule *et al.*, 1998; Hasenknopf, 2005; Hou *et al.*, 2007), anti-inflamatórios (Hou *et al.*, 2007), insulino-miméticos (Nomiya *et al.*, 2001; Domingo, 2002; Uskoković-Marković, 2007; Miró-Queralt *et al.*, 2008; Topic *et al.*, 2010), hematoprotetores (Uskoković-

Marković *et al.*, 2007) e efeito antiviral (Rhule *et al.*, 1998). Além disso, é referido, tal como acontece com elementos análogos ao tungstênio, nomeadamente o vanádio e o molibdênio, ser essencial que sejam descritas as propriedades físico-químicas e toxicológicas destes compostos para um melhor entendimento da sua interação com enzimas, de modo a que estes compostos possam ser aplicados na indústria biomédica e farmacêutica (Jelikić-Stankov *et al.*, 2007).

Efeitos em doenças, como a doença de Wilson, foram reportados, uma vez que compostos contendo molibdênio e tungstênio são capazes de coordenar e reduzir o excesso de cobre em determinados tecidos (Haywood *et al.*, 1998).

### 1.8 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático

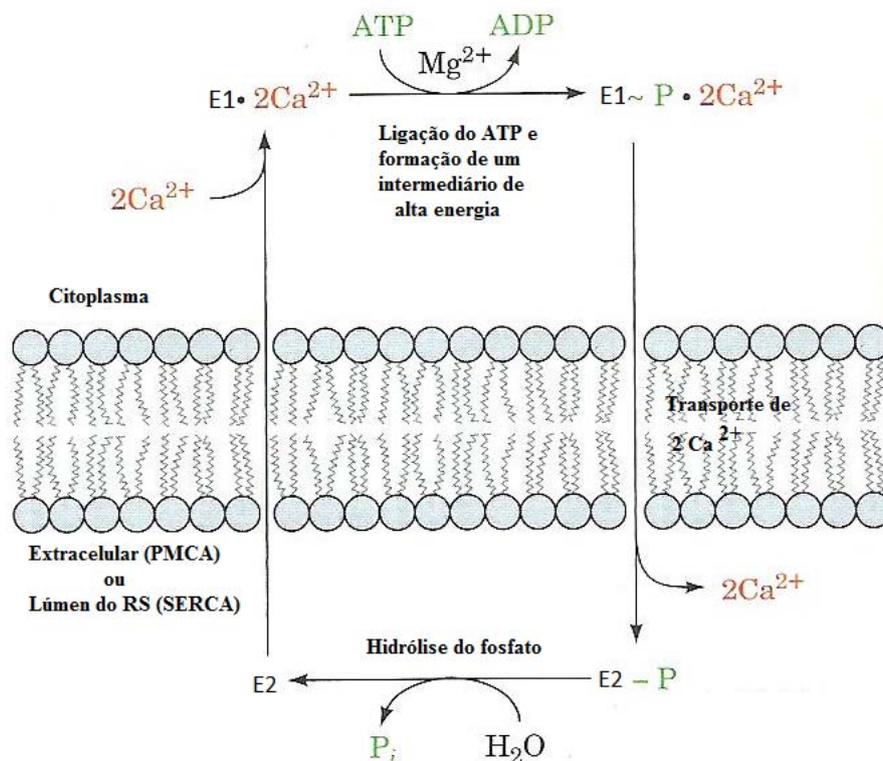
O cálcio é um elemento essencial para o correto funcionamento e homeostase de diversos processos intracelulares. Ele pode desempenhar um papel regulador nos mais diversos processos metabólicos como: a fosforilação oxidativa, a fotossíntese, a contração muscular, a plasticidade sináptica, a expressão genética, a atividade hormonal e apoptose. (Silva e Williams, 2001; Demaux e Distelhorst, 2003; Martonosi e Pikula, 2003; Rudiger *et al.*, 2007; Voet e Voet, 2011).

A homeostasia do cálcio é regulada por canais iónicos intracelulares que são ativados por proteínas ou outras moléculas tais como neurotransmissores (Putney, 2001), por trocadores, por bombas iónicas e por organelos subcelulares como o retículo sarcoplasmático e a mitocôndria. Muito embora o gradiente eletroquímico transmembranar seja favorável, à entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula, esta é condicionada uma vez que é mediada por canais e transportadores específicos existentes na membrana plasmática que promovem o transporte deste ião por difusão facilitada, de acordo com o gradiente eletroquímico ou através do transporte ativo, contra o gradiente eletroquímico à custa do gasto de ATP.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático é uma enzima (SERCA1a) pertencente à classe das ATPases do tipo P. Estas enzimas são responsáveis pelo transporte de uma variedade de catiões através de membranas celulares e dependem da autofosforilação usando o ATP como substrato (MacLennan e Green, 2000) (Fig. 1.11).

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, sendo uma ATPase que transloca cálcio através de membranas celulares, é fácil de preparar na sua orientação nativa, isto é, sob a forma de vesículas e manter assim a sua função biológica *in vitro* (Mintz e Guilain, 1997) o que possibilita a sua

utilização como modelo para análise da relação estrutura-função bem como a compreensão dos princípios de transporte do cátion.

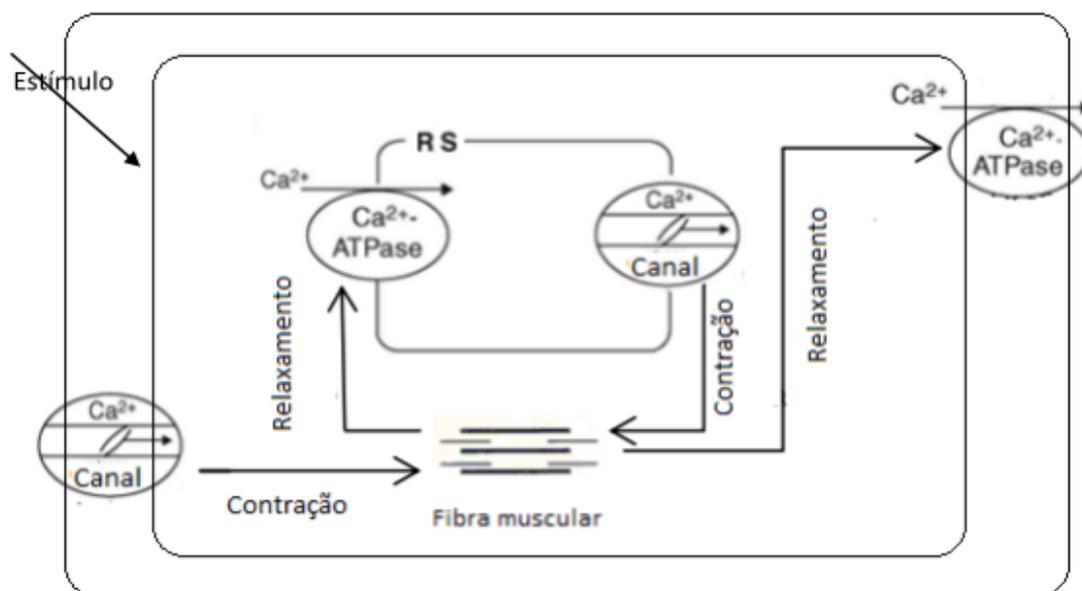


**Figura 1.11** – Mecanismo cinético do transporte ativo de cálcio por  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (adaptado de Voet e Voet, 2011).

De acordo com estudos de fluorescência e espectroscópicos, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pode formar dímeros na membrana do RS, no entanto, o monómero constitui a unidade funcional do sistema apesar da interação cooperativa entre os oligômeros poder influenciar a cinética de transporte do cálcio (Merino *et al.*, 1999; Mintz e Guilain, 1997). Além disso, tem a vantagem de se obter quantidades de proteína com um grau de pureza relativamente elevado, que permite a análise cinética detalhada da reação de transporte do cálcio (MacLennan e Toyofuku, 1992; Mintz e Guilain, 1997) bem como pode permitir o estudo do modo como pode ser afetada a sua função por efeito de inibidores. Devido ao largo espectro de atuação e regulação nos sistemas biológicos, torna-se cada vez mais importante estudar as interações de alguns metais, nomeadamente os oxometalatos, com as proteínas transportadoras destes íons, entre as quais a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. O estudo do modo de interação com as bombas iônicas que são alvos terapêuticos de ação de fármacos, o desenvolvimento de novos fármacos, tais como os oxometalatos que além de terem propriedades insulino-miméticas, anticancerígenas, entre outras, pouco se sabe sobre as suas funções nas células, são fundamentais para o potencial uso de metais na medicina.

### 1.8.1 Importância biológica da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

A homeostasia do cálcio nas células é mantida por proteínas transportadoras, tanto de proteínas que transportam o íon a favor do gradiente eletroquímico (transporte passivo) como contra o gradiente através da hidrólise de ATP (transporte ativo -  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases). A homeostasia celular tende a manter a concentração citoplasmática do cálcio nas células em repouso numa concentração aproximadamente 0,020-0,050  $\mu\text{M}$ , cerca de  $10^3$  a  $10^4$  vezes menor do que a concentração extracelular, na ordem de grandeza de mM, ou no lúmen do retículo sarco(end)plasmático (0,1-0,2 mM), sendo esta concentração vital para o adequado funcionamento das células (Martonosi e Pikula, 2003). A baixa concentração de cálcio nas células é mantida pela atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (RS), que transporta ativamente os íons cálcio do citosol para o seu reservatório intracelular, o retículo sarcoplasmático. Quando ocorre a ativação por estímulos elétricos ou químicos, o  $\text{Ca}^{2+}$  entra para o citoplasma, provocando um aumento da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, mitocondrial ou nuclear. Este aumento desencadeia um elevado número de respostas fisiológicas, tais como a atividade contráctil, produção energética e a ativação de processos nucleares. (Stern *et al.*, 1997; Bootman *et al.*, 2001; Carafoli *et al.*, 2001). A entrada de cálcio para o RS, induz o relaxamento muscular (Fig. 1.12) (Mundiña-Weilennann, *et al.*, 2001) entre outros processos.



**Figura 1.12** – Esquema do acoplamento excitação-contracção. Um estímulo permite a entrada de cálcio extracelular e libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático, o cálcio liga-se à fibra muscular e produz-se a contracção muscular. O relaxamento ocorre quando o cálcio é transportado para o lado extracelular ou para o lúmen do retículo sarcoplasmático pelas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (Adaptado de Mundiña-Weilennann, *et al.*, 2001).

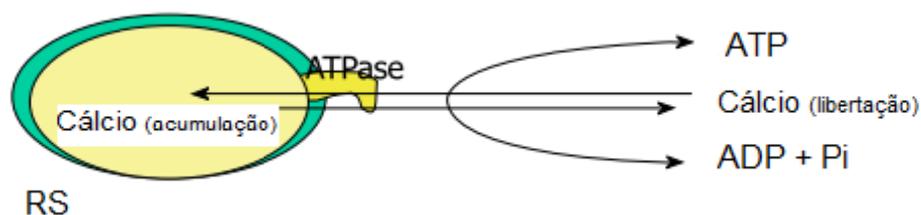
### 1.8.2 Estrutura da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo-esquelético (SERCA1), é uma das mais representativas enzimas pertencente à família das ATPases do tipo P, e tal como as  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases e  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPases pertence à subfamília  $\text{P}_2$ ATPases, em que as SERCA incluem-se no tipo da subfamília  $\text{P}_{2A}$ ATPases. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS é uma proteína transmembranar de massa molecular relativa de aproximadamente 110 kDa, (MacLennan *et al.*, 1985; Toyoshima *et al.*, 2000). Durante o processo de translocação de iões a proteína autofosforila-se no resíduo Asp351 (Møller *et al.*, 1996; MacLennan *et al.*, 1997; McIntosh, 1998). Dois iões  $\text{Ca}^{2+}$  são transportados por cada ATP hidrolisado enquanto dois ou três iões  $\text{H}^+$  são contra transportados para o citoplasma (Yu *et al.*, 1993).

Esta família pode ser dividida cinco em subfamílias principais ( $\text{P}_1$ ,  $\text{P}_2$ ,  $\text{P}_3$ ,  $\text{P}_4$  e  $\text{P}_5$ ) que englobam proteínas transportadoras de metais pesados, tais como o  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ;  $\text{H}^+$ -ATPases de plantas, de fungos e de bactérias e apresentam diferentes números de hélices transmembranares. (Fagan e Saier, 1994; Møller *et al.*, 1996). Por sua vez, as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases podem-se subdividir em grupos distintos, as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases do retículo sarco(endo)plasmático (SERCA), que promovem a acumulação do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático no lúmen do RS e as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases da membrana plasmática (PMCA) que mantêm a concentração citoplasmática de cálcio através do transporte do cálcio para o meio extracelular (Brandt e Vanaman, 1996).

O retículo sarcoplasmático (RS) do músculo-esquelético, onde se encontram as SERCA, é um sistema membranar intracelular, que se estende pelo sarcoplasma das células musculares, altamente especializado e desempenha um papel fulcral no ciclo de contração e relaxamento muscular (Aubier e Viires, 1998). Este é constituído por um conjunto de túbulos e cisternas e rodeiam as miofibrilas do músculo estriado compostas por miosina e actina. As membranas do RS podem ser isoladas sob forma de vesículas de retículo sarcoplasmático de músculo-esquelético (VRS), de forma estável e mantendo a sua orientação nativa. O sistema isolado possui uma elevada afinidade para o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase que catalisa tanto a hidrólise, quando ocorre a acumulação de cálcio pelas vesículas, como a síntese de ATP quando ocorre a libertação de cálcio pelas vesículas (Fig. 1.13).

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é uma das proteínas transmembranares e representa cerca de 60-80% do conteúdo proteico existente nas VRS (Inesi, 1972; Meissner *et al.*, 1973; de Meis e Vianna, 1979; de Meis e Inesi, 1982; Sande-Lemos e de Meis, 1988; Martonosi e Pikula, 2003).

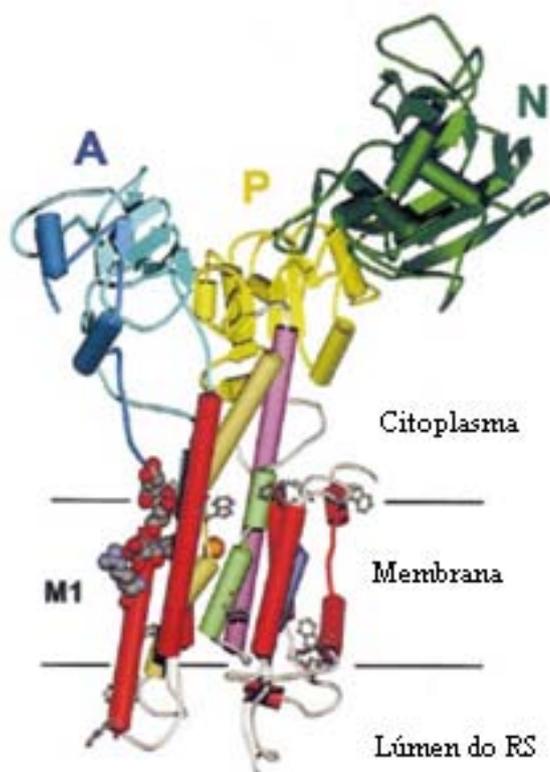


**Figura 1.13** – Translocação reversível de cálcio pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS, ocorrendo síntese ou hidrólise de ATP (Adaptado de Aureliano, 2011).

A sequência primária de aminoácidos da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS foi estabelecida em 1985, mediante a codificação do seu ADN, sendo esta constituída por 994 resíduos de aminoácidos, contendo provavelmente 2 a 3 ligações dissulfeto, cuja redução pode levar à inibição total da libertação do cálcio no lúmen do RS (Brandl *et al.*, 1987; MacLennan *et al.*, 1997). O estabelecimento da sua estrutura secundária esteve envolvido em alguma controvérsia (MacLennan *et al.*, 1985).

Porém, após os trabalhos de Toyoshima e seus colaboradores foi proposto o modelo geral aceite para a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, sendo descrito como um modelo constituído por dez hélices- $\alpha$  transmembranares de acordo com a estrutura obtida por cristalografia de raios-X obtida com uma resolução de 2,6 Å (Toyoshima *et al.*, 2000). Após análise por microscopia eletrónica, pode-se dividir a estrutura da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em três regiões (Fig. 1.14), uma região citoplasmática, um curto domínio “stalk” pé-helical, que consiste numa extensão da região transmembranar e que inclui as 10 hélices- $\alpha$ , constituída essencialmente por resíduos menos hidrofóbicos e por uma grande parte de resíduos carregados e uma região luminal (Toyoshima *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1998; Lee e East, 2001).

A região citoplasmática inclui a subunidade catalítica  $\alpha$  possui três domínios: o domínio N (domínio nucleotídico) que é o domínio de ligação do MgATP; o domínio P (domínio de fosforilação) que contém o resíduo Asp351 ao qual se liga covalentemente o grupo fosfato transferido pelo ATP e o domínio A ou  $\beta$  que tem estrutura de folha  $\beta$ , sendo por isso designado por domínio transdutor ou domínio de ativação de folha  $\beta$  e que está associado à transdução de energia. A região transmembranar onde se encontram as hélices- $\alpha$  é a região onde se assume que as hélices formam o canal para passagem do cálcio em que quatro das hélices estão diretamente envolvidas na ligação ao cálcio. (Lodish *et al.*, 2007; Toyoshima *et al.*, 2000).



**Figura 1.14** - Estrutura da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático. As hélices  $\alpha$  encontram-se representadas por cilindros, as folhas  $\beta$  por setas. Os domínios citoplasmáticos A, P, N encontram-se coloridos de azul, amarelo e verde, respectivamente. As quatro hélices  $\alpha$  envolvidas na ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  encontram-se destacadas da seguinte maneira: M4 amarelo, M5 lilás, M6 verde e M8 azul. Um dos dois íons de cálcio (esfera laranja) é visível nesta representação (Lee e East, 2001).

O domínio de ativação encontra-se ligado à região transmembranar com as hélices (M1-M3), através de 3 longos “loops” e estando isolado da restante estrutura. Estudos mutagênicos revelaram que o tamanho destes “loops” é essencial para a passagem dos íons de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este domínio atua como um ativador do mecanismo transmembranar que regula a ligação e transporte do  $\text{Ca}^{2+}$ . Possui também uma sequência essencial no processo de desfosforilação que se designa por sequência “motif 181TGES” (Toyoshima *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2005; Toyoshima, 2008). Alguns estudos demonstraram que este domínio é muito móvel durante o transporte ativo, podendo fechar e proteger da água o sítio de fosforilação onde se encontra o resíduo Asp351 nas conformações E2 e E2P. Este movimento é essencial para a alteração das posições dos domínios A, N e P e por isso se designa por atuador ao regular a ligação e translocação dos íons cálcio (Toyoshima *et al.*, 2000; Lee e East, 2001; Toyoshima e Inesi, 2004; Ma *et al.*, 2005; Toyoshima, 2008). O resíduo de glutamato 183 da

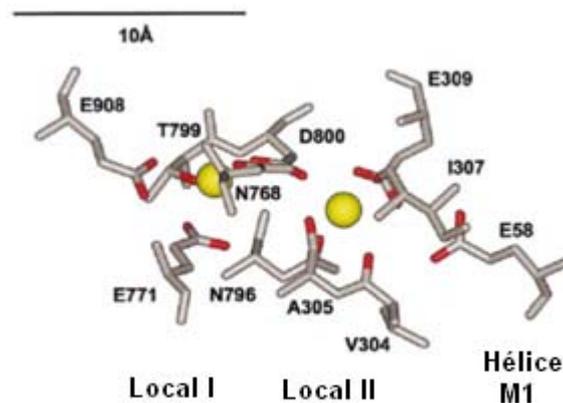
sequência TGES é essencial ao processo de desfosforilação E2P e alterações desta sequência podem afetar o ciclo catalítico (Clausen *et al.*, 2004; Anthonisen *et al.*, 2006). Estudos recentes indicam que a substituição da Ile188 por alanina aumenta a afinidade para o ATP o que afeta a desfosforilação da E2P (Clausen *et al.*, 2011).

O domínio de fosforilação é o domínio central e pode ser dividido em duas partes que diferem na sua constituição, havendo uma homologia estrutural com outras proteínas, as hidrolases (Toyoshima *et al.*, 2000; Stokes e Green, 2003). A região N-terminal e a C-terminal encontram-se ligadas formando um típico empacotamento de Rossmann. Em geral, este empacotamento é característico de proteínas que ligam nucleótidos caracterizando-se, neste caso, por ter sete folhas  $\beta$  paralelas associadas a oito hélices  $\alpha$ , à semelhança de outras proteínas com este tipo de empacotamento. É devido a este tipo de empacotamento que a estrutura adquire um formato que permite uma rotação do domínio A sobre a sua superfície (Ma *et al.*, 2005; Toyoshima, 2008).

O resíduo de Asp351, encontra-se na região C-terminal da folha  $\beta$  central, sendo esta região rodeada por resíduos carregados negativamente, a superfície fica acessível ao solvente e propicia à hidrólise do ATP (Toyoshima *et al.*, 2000). Existem três resíduos de aspartato fundamentais que se encontram próximo do sítio de fosforilação (Asp627, Asp703 e Asp707) em que o resíduo Asp703 é fundamental na coordenação do magnésio em que intervêm os carboxilos dos resíduos Asp351 e Asp703 bem como o carbonilo do resíduo de Thr353 e duas moléculas de água (Toyoshima e Inesi, 2004; Ma *et al.*, 2005; Toyoshima, 2008). Pensa-se que dos 24 resíduos de cisteína (Cys), nove podem estar envolvidos na ligação ao ATP e nas modificações conformacionais que são induzidas pela ligação do substrato. No entanto, não parece haver um ou outro aminoácido essencial cuja modificação afete enormemente as propriedades de ligação do ATP à proteína, contudo o resíduo do aminoácido Asp351 existente no local de fosforilação constitui um requisito para a funcionalidade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Mintz e Guillain, 1997).

Porém, o domínio nucleotídico, onde se estabelece a ligação fundamental com ATP, tem na sua constituição alguns resíduos essenciais para que esta ligação se estabeleça, nomeadamente os resíduos Phe487, Arg560, Lys515 e Lys492, em que no local de ligação para o ATP os resíduos apresentam carga positiva a pH fisiológico (Toyoshima e Inesi, 2004). Nas ATPases do tipo P, este domínio citoplasmático é o que apresenta uma maior variabilidade estrutural (Toyoshima *et al.*, 2000; Toyoshima e Mizutani, 2004; Toyoshima, 2008).

A região transmembranar, como já foi referido anteriormente, é constituída por 10 hélices- $\alpha$  (M1-M10). A hélice M5 possui um tamanho de 60 Å, percorrendo todo o espaço transmembranar desde a superfície luminal até ao final do domínio P, sendo muitas vezes metaforicamente chamada como a coluna da molécula. Os locais de ligação e transporte do  $\text{Ca}^{2+}$  encontram-se ligados na região transmembranar, são hidrofóbicos, no entanto podem conter grupos hidroxilo (Pick e Racker, 1979), os iões cálcio podem-se coordenar entre as hélices M4-M6 e M8 (Toyoshima, 2008 e Toyoshima, 2009). Os aminoácidos Glu309 e Asn796 estão envolvidos num dos locais de ligação enquanto os aminoácidos Glu771 e Thr799 estão envolvidos com o outro local de ligação. Por outro lado o aminoácido Asp800 encontra-se associado a ambos os locais de ligação. De tudo isto, sugere-se que os locais são distintos e encontram-se em localizações opostas: um local exposto ao citoplasma e outro local exposto ao lúmen do RS (Inesi, 1987; Mintz e Guillian, 1997; Stokes e Green, 2003). Os iões cálcio coordenam-se num arranjo assimétrico com sete ligandos contendo oxigénio (Fig. 1.15) (McPhalen *et al.*, 1991; Toyoshima, 2008).



**Figura 1.15** - Locais de alta afinidade para a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. O local I é constituído por ligandos correspondentes às hélices M5, M6 e M8, já os ligandos do local II são predominantemente da hélice M4. O Asp800 coordena a ligação de ambos os catiões de  $\text{Ca}^{2+}$  (representados por esferas de coloração amarela) (Lee e East, 2001).

### 1.8.3 Mecanismo e ciclo catalítico da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

No processo de contração muscular, os iões  $\text{Ca}^{2+}$  são libertados do retículo sarcoplasmático para as células musculares através dum canal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Quando se dá o relaxamento, ocorre o processo inverso, com o auxílio da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase os iões cálcio são bombeados do citoplasma das células para o lúmen do RS.

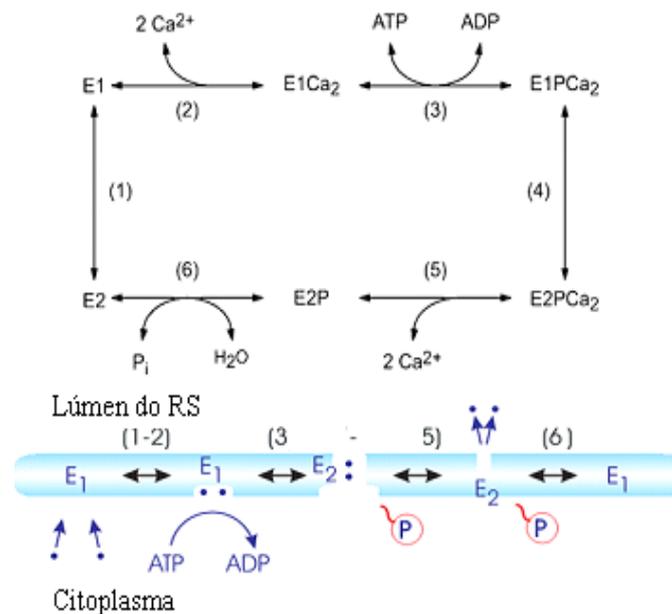
O sítio catalítico, que compreende o local de ligação do ATP e o de fosforilação, localizados na região citoplasmática da célula, bem como os sítios de ligação ao cálcio que se encontram

inseridos na membrana sarcoplasmática e que se encontram a uma distância de aproximadamente 40 Å. A existência de dois locais de ligação dos íons cálcio à proteína, um exposto ao citoplasma e outro ao lúmen do RS, implica que a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase tenha que transferir os íons cálcio entre estes dois locais de modo a transportar os íons de um lado para o outro da membrana do RS, o que sugere que haja necessidade de uma reorientação estrutural da enzima durante o seu ciclo catalítico (Mintz e Guillain, 1997).

De acordo com o modelo clássico das E1/E2 das P-ATPase (de Meis e Vianna, 1979; Møller *et al.*, 1996), a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase alterna entre dois estados conformacionais distintos E1 e E2, em que o transporte de cálcio pode ser explicado em termos de uma transição entre um estado de alta afinidade para os íons cálcio (E1) e um estado de baixa afinidade (E2) processo que permite o transporte de dois íons cálcio por cada molécula de ATP hidrolisada (Fig. 1.16) (Inesi, 1985; Jenks, 1989; Mintz e Guillain, 1997). O estado conformacional E1, caracterizado por ter os locais de ligação acessíveis ao cálcio citoplasmático com uma alta afinidade para os íons ( $K_d = 3 \times 10^{-7}$  M)  $\text{E1} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$ . Nesta conformação, a enzima é rapidamente fosforilada por ATP, mas não por fosfato inorgânico (Pi)  $\text{E1} \cdot \text{P} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$ . A energia livre proveniente do ATP é utilizada pelo fosfoenzima para proceder a uma modificação estrutural E1·P a E2·P. No estado E2, os locais de ligação passam a ter uma baixa afinidade para o  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d = 1 \times 10^{-3}$  M) e ficam expostos para o espaço extracelular ou para o lúmen do RS. Contudo ainda subsiste alguma controvérsia sobre a existência de locais de ligação de baixa afinidade expostos ao lúmen, uma vez que não foi verificado por cristalografia de raios-X em estruturas cristalizadas a evidência dos locais de baixa afinidade (Toyoshima, 2008). Esta conformação (E2) caracteriza-se também pelo facto do enzima apresentar reatividade com o fosfato inorgânico (Pi), mas não com o ATP (de Meis e Vianna, 1979; Inesi *et al.*, 1992; MacLennan e Toyofuku, 1992; Stokes e Wagenknecht, 2000; Toyoshima e Mizutani, 2004; Tadini-Buoninsegni *et al.*, 2006; Toyoshima, 2009).

Após a ligação do MgATP à conformação  $\text{E1} \cdot \text{P} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$ , ocorre a fosforilação alterando assim a sua conformação para  $\text{E2} \cdot \text{P} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$ . Nesta fase ocorre então a libertação dos íons para o lúmen do RS e a consequente hidrólise da enzima fosforilada, que ao adotar a conformação E2 pode retornar ao estado conformacional E1 e iniciar novo ciclo catalítico (Lee e East, 2001). No estado conformacional E1, em especial no estado conformacional  $\text{E1} \cdot \text{P} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$ , os três domínios citoplasmáticos (A, P e N) encontram-se separados formando uma estrutura aberta nesse local que permite a ligação do substrato (ATP), enquanto no estado conformacional E2, estes domínios têm uma aproximação considerável e encontram-se

fortemente associados formando uma estrutura compacta semelhante a uma cabeça (Fig. 1.17) (Martinosi e Pikula, 2003; Stokes e Wagenknecht, 2000; Toyoshima *et al.*, 2000). Esta estrutura compacta também é observada nos outros estados conformacionais (Ogawa *et al.*, 1998).



**Figura 1.16** - Ciclo catalítico da Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Inicialmente ocorre a interação de dois íons Ca<sup>2+</sup> e de uma molécula de ATP com a conformação E1 da Ca<sup>2+</sup>-ATPase no citoplasma (reações 1 e 2). Segue-se então a fosforilação da enzima pela molécula de ATP, sendo os íons ligados aos respectivos locais de ligação (reação 3), passando a enzima para a conformação E1PCa<sub>2</sub>. A reação 4, é caracterizada pela transformação da conformação E1PCa<sub>2</sub> na conformação E2PCa<sub>2</sub>, na qual há uma perda de afinidade pelo ADP sendo esta acompanhada pela perda de afinidade para os íons Ca<sup>2+</sup>. Estes são então libertados para espaço luminal (reação 5). Segue-se então a hidrólise do enzima libertando o P<sub>i</sub> (reação 6) para o citoplasma em que a enzima adota a conformação E2 e pode finalizar o ciclo originando a conformação E1. (Adaptado de Martinosi e Pikula, 2003; Daiho *et al.*, 2003).

Na região da membrana do RS, as hélices- $\alpha$  transmembranares M1-M6 movimentam-se consideravelmente durante o ciclo reacional contrariamente às hélices- $\alpha$  M7-M10, que atuam aparentemente como uma âncora transmembranar (Fig. 1.17) (Toyoshima, 2008).

Na figura 1.17, pode-se observar locais de ligação do cálcio que estão representados por I e II e localizam-se na zona transmembranar. Contudo, a ligação dos dois íons Ca<sup>2+</sup> é sequencial e cooperativa (Inesi *et al.*, 1980; Inesi, 1987). O primeiro íon de cálcio liga-se ao local I, que se encontra rodeado pelas hélices M5, M6 e M8 que permitem formar uma cadeia lateral de átomos de oxigénio e duas moléculas de água. O segundo íon de cálcio, vai ligar-se ao local II que se encontra próximo da hélice M4 e em conjunto com a hélice M6



### 1.8.3.1 A Ligação do $\text{Ca}^{2+}$ : $\text{E2} \rightarrow \text{E1} \rightarrow \text{E1} \cdot 2 \text{Ca}^{2+}$

A conformação E2, que permite a libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  para a região do lúmen com a subsequente hidrólise da ligação aspartilfosfato, apresenta os domínios citoplasmáticos compactos “headpiece”, estando tanto o domínio N como o A ligados por pontes de hidrogénio (Toyoshima e Nomura, 2002). A cavidade transmembranar de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  encontra-se rodeada de moléculas de água, encontrando-se todos os grupos carboxilo protonados de forma compensar e contrabalançar a carga criada pela libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  (Obara *et al.*, 2005). Esta estrutura (E2) pode persistir se o pH do meio for baixo, uma vez que a pH 7 a compensação oferecida pelo  $\text{H}^+$  é insuficiente. No entanto, os três domínios citoplasmáticos, uma vez que se encontram bastante próximos nesta conformação, podem sofrer uma dissociação com uma ligeira agitação térmica o que permite a libertação de prótons para o citoplasma (Tadini-Buoninsegni *et al.*, 2006). Esta libertação de prótons através da membrana, leva a que quando se atinge o pH 7, resulta num rearranjo da estrutura da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase para o estado E1 (Inesi *et al.*, 2008).

Quando a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase se encontra na conformação E1 (desfosforilada), os grupos carboxílicos na cavidade de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  não se encontram protonados, possuindo neste caso, os locais de ligação uma elevada afinidade para o  $\text{Ca}^{2+}$  na zona citoplasmática. Nesta altura, em condições fisiológicas, ou seja a pH próximo de 7, na presença de uma concentração na ordem dos mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , um ião de  $\text{Ca}^{2+}$  ocupa o local de ligação I de alta afinidade (Inesi *et al.*, 2002), provocando um rearranjo das hélices- $\alpha$  transmembranares formando neste caso a conformação  $\text{E1} \cdot \text{Ca}^{2+}$  (Champeil *et al.*, 1983).

Após ligação do primeiro ião  $\text{Ca}^{2+}$  à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, o local de ligação II passa a ter alta afinidade o que traduz uma ligação cooperativa do  $\text{Ca}^{2+}$  e ocorre uma movimentação bastante significativa das hélices M1-M6. A hélice M5 movimenta-se conjuntamente com o domínio citoplasmático P, sendo que o movimento da M5 promove também o movimento da hélice M4 o que a expõe para a região citoplasmática, deixando a localização II exposta para a ligação de outro ião  $\text{Ca}^{2+}$ . Neste momento a hélice transmembranar M1 encontra-se indiretamente estabilizada pela ligação dos iões cálcio (Toyoshima e Nomura, 2002; Toyoshima, 2008) perto do resíduo Glu309 na hélice M4 porque existe espaço suficiente enquanto a porta citoplasmática está acessível (Toyoshima, 2009).

### 1.8.3.2 Formação do estado de transição: $E1 \cdot 2Ca^{2+} \rightarrow E1 \cdot P$

Após a ligação dos íons cálcio, ocorre a ligação do ATP na superfície citosólica, numa reação rápida que envolve a complexação de um íon  $Mg^{2+}$  com o ATP. O ATP é hidrolisado a ADP e o grupo fosfato libertado (grupo  $\gamma$ -fosfato) é transferido para o grupo  $\beta$ -carboxilo do resíduo de aspartato (Asp351) localizado no domínio de fosforilação, formando-se deste modo uma ligação acil-fosfato de alta energia  $E1 \sim P$  (intermediário acil-fosfato altamente energético, instável e ADP sensível:  $Ca_2E1 \sim P$ ) (Andersen, 1989; Jencks, 1989; Lodish *et al.*, 2007; Voet e Voet, 2011).

Esta ligação do ATP é feita próxima dos domínios P e N, promovendo uma ligação entre ambos os domínios através da ligação do  $\gamma$ -fosfato do ATP e do  $Mg^{2+}$ . As diversas ligações de hidrogénio formadas à volta do ATP e do metal sugerem que este estado caracteriza-se por criar uma elevada tensão na molécula. Estas ligações fazem com que o “loop” que inclui o resíduo Asp703 seja posicionado em frente do Asp351. Este movimento ao ser amplificado promove a ligação entre o domínio A e a hélice transmembranar M3. Ao mesmo tempo, a hélice M1 vai movimentar-se de forma a dobrar-se para que o seu N-terminal anfipático fique sobre a superfície membranar. Este movimento permite ocupar o espaço da parte transmembranar próximo do resíduo Glu309 fechando a passagem transmembranar do local de ligação do  $Ca^{2+}$ . Nesta altura as hélices M1 e M2 formam uma estrutura em V (Fig. 1.17 e Fig. 1.18). A fosforilação do resíduo Asp351 fixa então o domínio N numa posição inclinada de modo a formar, em conjunto com o domínio A, uma estrutura a preparada para a transição entre  $E1 \cdot P \rightarrow E2 \cdot P$  (Lenoir *et al.*, 2004).

As duas partes da folha  $\beta$  que estão presentes no empacotamento de Rossmann do domínio P estão alinhadas na conformação  $E1 \cdot P$ , no entanto após a alteração para a conformação  $E2 \cdot P$ , formam-se pontes de hidrogénio entre elas através da ligação do  $Mg^{2+}$  e do ADP. Muitos metais podem ligar-se ao local de ligação do  $Mg^{2+}$  no domínio P, próximo do Asp703 (Toyoshima, 2008).

### 1.8.3.3 Libertação do $Ca^{2+}$ para o lúmen do RS: $E1 \cdot P \rightarrow E2 \cdot P$

A transferência do grupo fosfato para o Asp351 permite a dissociação do ADP que desencadeia a abertura da interface dos domínios N e P (Toyoshima e Mizutani, 2004). O domínio A procede a uma rotação que provoca sobreposição do seu “loop” no espaço situado entre os domínios N e P sobre o aspartilfosfato (Toyoshima *et al.*, 2007; Olesen *et al.*, 2007). Esta sobreposição é estabilizada não só por várias ligações de hidrogénio como também pelo

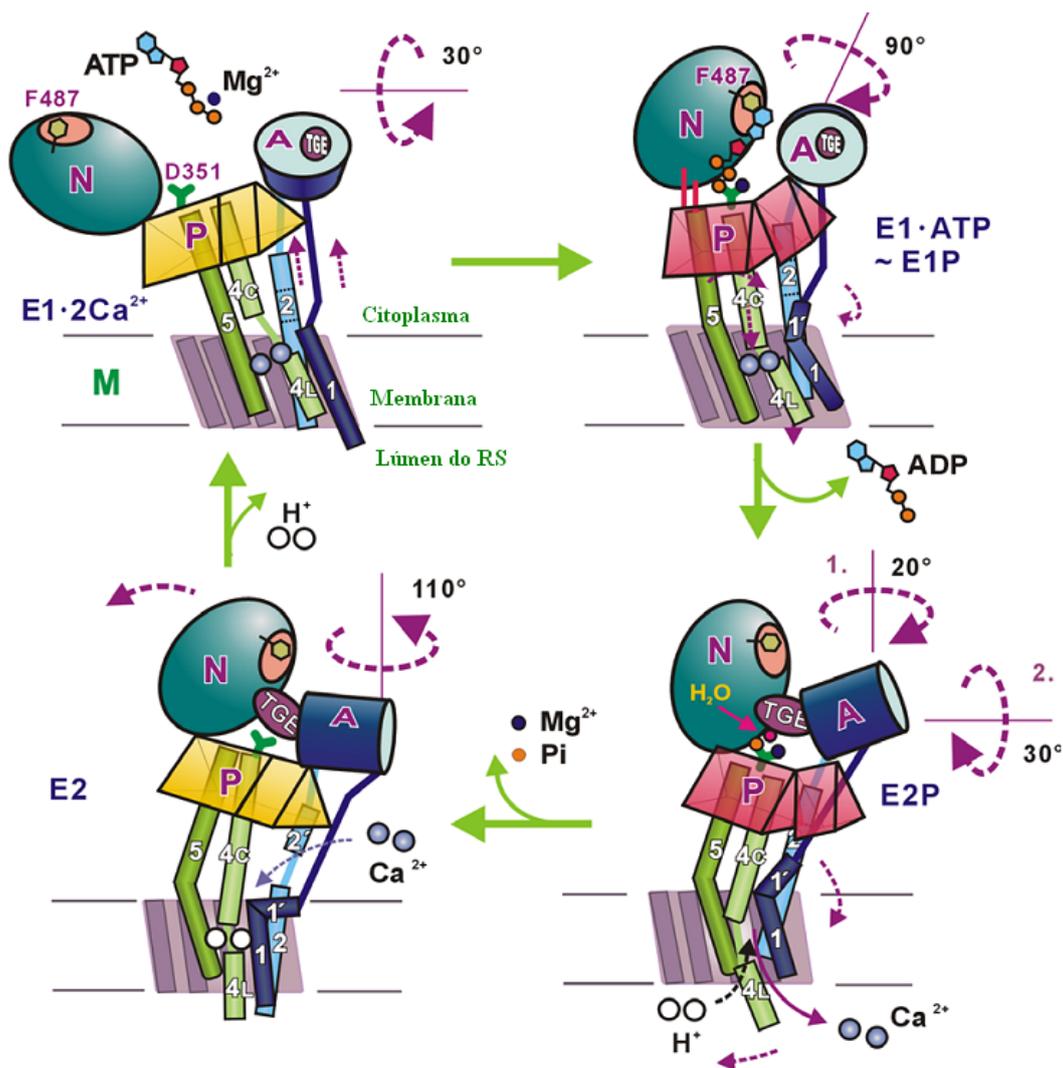
Mg<sup>2+</sup> (Toyoshima *et al.*, 2007; Toyoshima, 2008). O “loop” mantém a estrutura E2·P, ocupando o espaço onde se encontrava ligado o ADP, de modo a prevenir a possível ligação de outra molécula de ADP. O aspartilfosfato, através de uma ligação de van der Waals com o carbono  $\alpha$  do resíduo de Gly182, é protegido das moléculas de água, provavelmente a estabilização desta estrutura por pontes de hidrogénio e ligações de van der Waals é essencial para a libertação do Ca<sup>2+</sup> para o lúmen do RS. (Toyoshima e Mizutani, 2004).

A rotação do domínio de ativação provoca um rearranjo das hélices  $\alpha$  (Toyoshima e Nomura, 2002; Toyoshima e Mizutani, 2004). As hélices que se encontram numa posição inferior, M1-M2, rearranjam-se de modo a abrir um canal que permite a passagem e libertação dos iões Ca<sup>2+</sup> para o lúmen (Toyoshima *et al.*, 2007). Esta abertura permite também a entrada de protões e moléculas de água para a estabilização dos locais de ligação do Ca<sup>2+</sup> (Obara *et al.*, 2005). Deste modo a Ca<sup>2+</sup>-ATPase sofre uma modificação conformacional para E2·P em que os dois locais de ligação têm baixa afinidade para o cálcio e estão dispostos para o lúmen do RS, o que impulsiona o deslocamento dos iões para o lúmen do RS, enquanto os dois locais de ligação de elevada afinidade para o cálcio localizados na região citoplasmática são inativados. A Ca<sup>2+</sup>-ATPase livre do cálcio e ADP-insensível denotada pela conformação E2·P, indica uma ligação acil-fosfato forte. O rearranjo das hélices transmembranares está relacionado com uma inclinação do domínio P de modo a manter a junções das hélices M1 e M2 numa estrutura em forma de V, enquanto a porção hidrofóbica de M1 tendencialmente ficará na parte hidrofóbica da membrana, como resultado o domínio P sofre uma inclinação fazendo com que a hélice M4 que tem os iões cálcio ligados se aproxime do espaço luminal na estrutura E2 (Fig. 1.18). Verifica-se que o tamanho do “loop” que liga a região mais hidrofóbica da M1 ao domínio A tem uma elevada importância no processo de transformação do aspartilfosfato, assim se este for demasiado pequeno provoca uma restrição ao enzima e a passagem E1·P→E2·P fica bloqueada; caso seja demasiado grande, a transição E1·P→E2·P é demasiado rápida, impedindo assim a libertação dos iões para o lúmen, ficando a enzima na conformação E2P (Daiho *et al.*, 2003; Daiho *et al.*, 2007; Toyoshima, 2008).

#### 1.8.3.4 Hidrólise do aspartilfosfato: E2·P →E2

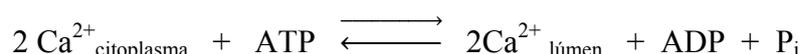
Na transição do E2·P →E2 e Pi, o domínio A sofre uma rotação, relacionada com a introdução de uma molécula de água no local de fosforilação, de modo a que a passagem que se formou para a passagem dos iões seja fechada (Toyoshima e Mizutani, 2004; Toyoshima, 2008). O “loop” modifica a sua conformação no qual o resíduo Glu183 da cadeia lateral fixa uma

molécula de água que catalisa a hidrólise do aspartilfosfato, provavelmente através da remoção do hidrogénio da molécula de água (Toyoshima e Mizutani, 2004). A libertação tanto do grupo fosfato como do  $Mg^{2+}$  provoca um relaxamento do domínio P o que provoca a libertação das hélices M1 e M2, fechando deste modo por completo a passagem para o lúmen, originando a conformação E2. O balanço espacial e de cargas no local de ligação do cálcio é, como já referido, compensado pela incorporação de moléculas de água e protonação dos resíduos (Obara *et al.*, 2005). Contudo, através de agitação térmica, os prótons são libertados para o citoplasma e dissipados pela membrana do RS, sendo o estado conformacional E2, a pH 7 um estado de transição o que permite que a proteína volte à conformação E1 após a libertação do  $P_i$ , sendo que os locais de baixa afinidade são inativados enquanto os locais de elevada afinidade para o cálcio são regenerados do lado citoplasmático (Toyoshima, 2008).



**Figura 1.18** - Desenho ilustrativo das modificações estruturais da  $Ca^{2+}$ -ATPase durante o ciclo catalítico (Toyoshima, 2008).

Uma característica importante do ciclo catalítico da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é sua reversibilidade, o que tem facilitado os estudos do ciclo de transporte. Assim os termos “ADP-sensível” e “ADP-insensível” refletem a capacidade para reverter a fosforilação e doar o grupo fosfato de volta ao ADP, formando-se novamente ATP; a forma “ADP-sensível” pode reverter essa fosforilação enquanto a forma “ADP-insensível” não pode reverter e formar de novo o ATP (Andersen, 1989). De qualquer modo a reação global de transporte de cálcio pode ser representada pela reação (Jencks, 1989):



Neste processo de acumulação de cálcio pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS verifica-se e ejeção de prótons (Madeira, 1980; Madeira, 1982) provavelmente devido à atividade intrínseca da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Madeira, 1980), sendo estabelecido que a ejeção de prótons é um processo normal da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, pois o processo é inibido pelo inibidor específico da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Aureliano e Madeira, 1994b).

Em termos práticos, a reversibilidade da acumulação de íons pode acontecer em duas situações distintas: o primeiro caso acontece quando VRS previamente saturadas do íon cálcio são colocadas num meio em que o íon cálcio está ausente, nestas condições as VRS podem sintetizar ATP a partir de ADP e  $\text{P}_i$  à custa de um efluxo de dois íons cálcio por cada molécula de ATP sintetizado (de Meis e Inesi, 1982). No segundo caso pode ocorrer reversibilidade na ausência de um gradiente de cálcio em que vesículas “leaky” sintetizam o ATP, descrevendo o ciclo catalítico, passo a passo no sentido inverso (Inesi, 1985; Mintz e Guillian, 1997).

#### 1.8.4 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase um alvo de ação de fármacos

As bombas iônicas desempenham um papel importante na manutenção fisiológica de íons. Alterações à homeostasia de íons implicam um funcionamento celular desregulado, o que pode conduzir ao aparecimento de patologias. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, sendo uma bomba iônica que têm um papel importante na homeostasia do cálcio, contribui para a manutenção das funções celulares. Alterações no funcionamento da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase podem provocar consequências nas funções celulares. O excesso ou a deficiência de  $\text{Ca}^{2+}$  podem levar: à rápida morte celular por necrose, ou à indução da morte celular programada (apoptose); à alteração do processo excitação-contração muscular, entre outros efeitos.

A atividade destas bombas iônicas pode ser modulada por diversas moléculas, entre as quais alguns fármacos e também oxometalatos com propriedades terapêuticas. Deste modo quer a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, quer outras bombas iônicas, são alvos da terapêutica conhecida por alguns fármacos. Neste sentido foi feita uma análise no capítulo 7 à ação de fármacos em bombas iônicas, comparando-se mecanismos e sítios de ligação de fármacos inibidores de bombas iônicas com oxometalatos e polioxometalatos.

## Capítulo 2

---

### Objetivos

---

## 2 Objetivos

Os sistemas envolvidos na regulação de iões na biologia celular, nomeadamente translocadores, bombas e organelos subcelulares constituem excelentes modelos para avaliar a toxicidade de compostos. No presente estudo, serão analisados os efeitos de compostos conhecidos como tendo propriedades insulino-miméticas nos sistemas envolvidos na homeostasia de cálcio. Este estudo contribui para o esclarecimento dos mecanismos celulares de toxicidade em alvos celulares de substâncias com aplicações na farmacologia.

A concretização do estudo pretendido tem como objetivo geral estudar a interação de sistemas translocadores de iões, nomeadamente a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS, com compostos potencialmente insulino-miméticos, como oxometalatos de vanádio, em especial o vanadato e decavanadato, mas também de molibdénio, tungsténio e nióbio, avaliando e comparando os seus efeitos na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS, isto é, na hidrólise de ATP associada à translocação de cálcio. Além dos efeitos que os oxometalatos induzem nas funções da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS pretende-se esclarecer o modo de atuação dos oxometalatos na função e estrutura da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS. Para tal, recorreu-se a técnicas bioquímicas e biofísicas, nomeadamente técnicas de isolamento e purificação, técnicas espectroscópicas e estudos cinéticos.

Numa primeira fase realizaram-se os seguintes estudos:

- Isolamento e purificação de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de vesículas de retículo sarcoplasmático (VRS) de músculo-esquelético de coelho; Quantificação e análise do grau de pureza da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS; Verificação da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS através de métodos enzimáticos para avaliar a capacidade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS para os estudos cinéticos.

Numa segunda fase, através de estudos *in vitro* dos efeitos tóxicos dos compostos insulino-miméticos em sistemas sub-celulares envolvidos na regulação de iões. Estes estudos compreendem estudos cinéticos, em que se pretende avaliar a variação de atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS em diferentes condições, na presença ou ausência de soluções dos oxometalatos de modo a verificar ou caracterizar, entre outros:

- O tipo e o grau de inibição ( $\text{IC}_{50}$ ) dos diferentes compostos potencialmente insulino-miméticos, quantificando desta forma a potencia tóxica relativa dos diferentes oxometalatos.
- O efeito do tempo de incubação na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase.

• Se o grau de inibição ( $IC_{50}$ ) induzido pelos oxometalatos será alterado por efeito da adição de um agente redutor como o DTT, ou de agentes antioxidantes, de modo a esclarecer se a atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS poderá estar relacionada com o seu estado de oxidação.

Foram ainda efetuados estudos da interação dos oxometalatos com a  $Ca^{2+}$ -ATPase por espectrofotometria de absorção atômica, espectroscopia de  $^{51}V$ -RMN, EPR e espectroscopia de Raman de modo a complementar e ou confirmar indicações reveladas pelos estudos de cinéticos, bem como elucidar aspetos da interação dos oxometalatos na estrutura e função da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS.

De entre estes estudos salienta-se a novidade na utilização da Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) no estudo da interação dos oxometalatos com a  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, onde se pretende avaliar e quantificar a interação dos oxometalatos, em especial a espécie decavanadato, com a  $Ca^{2+}$ -ATPase, nomeadamente para a determinação da constante de dissociação e da estequiometria de ligação metal:proteína.

Através de estudos da interação de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS com oxometalatos de vanádio por espectroscopia de  $^{51}V$ -RMN e EPR, caracterizou-se a composição das soluções de vanadato e decavanadato, e analisou-se a interação da espécie decavanadato com a  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS de modo a correlacionar os estudos cinéticos com os resultados obtidos na interação dos oxometalatos com  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS por EAA e por RMN.

Por espectroscopia Raman, analisaram-se diferenças nos espectros da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS em suas diferentes conformações e verificou-se em estudos complementares a interação destes oxometalatos com propriedades insulino-miméticas com a  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, de modo a verificar alterações estruturais induzidas pelos oxometalatos, bem como as conformações induzidas pelos diferentes oxometalatos.

Finalmente, fez-se um estudo comparativo do modo de ação de 44 fármacos e oxometalatos com três tipos de bombas iónicas, perspetivando aplicações terapêuticas de futuros fármacos.

## Capítulo 3

---

### Materiais e métodos

---

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Reagentes

Todos os reagentes para preparação de soluções e soluções tampão utilizados foram de grau analítico químico e adquiridos a empresas especializadas. Metavanadato de amônio, tungstato de sódio e molibdato de sódio foram comprados a Riedel-de-Haën. Decaniobato de tetrametilamônio hexahidratado  $[N(CH_3)_4]_6[Nb_{10}O_{28}] \cdot 6H_2O$  foi produzido de acordo com o descrito (Ohlin *et al.*, 2008; Ohlin *et al.*, 2009a) e gentilmente enviado pelo Professor Doutor William Casey da Universidade da Califórnia. ATP, isento de vanádio, foi adquirido à empresa Sigma. Todos os outros reagentes foram de grau analítico bioquímico e fornecidos pelas empresas Merck, Roche, Sigma ou BDH (British Drug Houses).

#### 3.2 Preparação de soluções de oxometalatos

##### 3.2.1 Soluções de vanadato

As soluções “stock” de vanadato foram preparadas a partir de metavanadato de amônio ( $NH_4VO_3$ ) que foi dissolvido em  $H_2O$  com resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , numa concentração de  $50 \text{ mM}$ , mediante agitação magnética e aquecimento e ajustou-se o pH a  $7,0$ . A solução assim preparada é incolor.

A solução de decavanadato, com  $50 \text{ mM}$  de vanádio total foi preparada com parte da solução de metavanadato previamente preparada, ajustando-se o pH a  $4,0$ , de acordo com os métodos descritos na literatura (Soares *et al.*, 2008b; Aureliano e Crans, 2009). A coloração amarela obtida após a acidificação revela a presença de decavanadato (Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009). Sabe-se que a cinética de decomposição do  $V_{10}$  determinada por absorvência ao comprimento de onda de  $400 \text{ nm}$  no meio reacional (Aureliano e Crans, 2009) apresenta um decaimento de absorvência de primeira ordem com um tempo de semivida estimado de cerca de  $12 \text{ horas}$ , quando efetuado com  $0,1 \text{ mM}$  de concentração da espécie decamérica no ensaio (correspondente a  $1 \text{ mM}$  de vanádio total) o que está de acordo com estudos anteriores (Soares *et al.*, 2007b). Por isso, nos trabalhos efetuados as concentrações de  $V_{10}$  usadas e tempos de incubação e análise permitem dizer que teremos quase exclusivamente a espécie decamérica nas soluções de  $V_{10}$ . Relativamente a soluções de vanadato estudos por espectroscopia de RMN (Aureliano e Madeira, 1994a; Soares *et al.*,

2007b) mostraram que soluções acima de 1 mM contêm as espécies monoméricas, diméricas ou tetraméricas de vanádio.

### 3.2.2 Soluções de molibdato

As soluções “stock” de molibdato foram preparadas a partir de molibdato de sódio que foi dissolvido em H<sub>2</sub>O com resistividade de 18,2 MΩ·cm a 25 °C, numa concentração de 50 mM. Após a dissolução, o pH foi ajustado a 7,0.

### 3.2.3 Soluções de tungstato

As soluções “stock” de tungstato foram preparadas a partir de tungstato de sódio que foi dissolvido em H<sub>2</sub>O com resistividade de 18,2 MΩ·cm a 25 °C, numa concentração de 50 mM. Após a dissolução, o pH foi ajustado a 7,0.

### 3.2.4 Soluções de decaniobato

As soluções de decaniobato foram preparadas em água com resistividade de 18,2 MΩ·cm a 25°C, numa concentração 10 mM ajustando-se o pH a 6,0. As soluções de decaniobato são estáveis nestas condições (Ohlin *et al.*, 2008; Ohlin *et al.*, 2009a).

Todas as soluções foram armazenadas a 7 °C e mantidas em gelo sempre que utilizadas. Nas concentrações usadas nos ensaios a adição das soluções dos metais não alteram o pH do meio reacional.

## 3.3 Isolamento de vesículas de retículo sarcoplasmático (VRS) de músculo-esquelético de coelho

O isolamento das vesículas de retículo sarcoplasmático foi realizado pelo método descrito por Carvalho e Leo (Carvalho e Leo, 1967), modificado por da Costa e Madeira (Gomes da Costa e Madeira, 1986), tendo-se adicionado um passo adicional, com o objetivo de remover a glicogénio fosforilase e enzimas associadas como sugerido por Cuenda (Cuenda *et al.*, 1994).

A fração microsomal do músculo-esquelético de coelho contendo vesículas de retículo sarcoplasmático pode ser obtida por aplicação da técnica de centrifugação diferencial (Aureliano, 1995) ao homogeneizado de músculo-esquelético de coelho que é constituído por células fragmentadas. A centrifugação diferencial é uma técnica separativa que permite isolar os diferentes componentes celulares com base na velocidade de sedimentação de partículas

com diferentes tamanhos e densidades, mediante o uso de várias forças centrífugas crescentes (Wilson e Walker, 2005).

O método utilizado envolve um passo de eliminação de proteínas contrácteis (presentes em solução), por solubilização em soluções de força iónica elevada uma vez que após a centrifugação da solução, os fragmentos que devem sedimentar são os fragmentos de RS longitudinal.

Todo o material, bem como as e soluções utilizadas foram previamente refrigerados e o isolamento decorreu a 4 °C como a seguir se descreve:

1. Sacrificou-se um coelho, doméstico, jovem por deslocamento cervical (pancada rápida atrás do pescoço), cortando-se em seguida a artéria jugular, de modo a permitir o sangramento.
2. Esfolou-se o animal, expondo-se os músculos dorsais e das pernas, passou-se por água com resistividade de 18,2 MΩ•cm a 25 °C, e colocou-se num tabuleiro com gelo.
3. Removeram-se os tecidos conjuntivos e a gordura que envolvia o tecido muscular, retirando-se em seguida os músculos dorsais e os músculos brancos das coxas, que se lavaram com H<sub>2</sub>O com resistividade de 18,2 MΩ•cm a 25 °C. Cortaram-se os músculos retirados para um copo e pesaram-se.
4. Trituraram-se os músculos com um moedor de carnes, adicionando-se tampão de isolamento na proporção 1:1 (v/v), contendo KCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,0, β-mercaptoetanol 2,5 mM e PMSF 5 μM, os dois últimos reagentes apenas foram adicionados à solução de isolamento no início do procedimento.
5. A suspensão assim obtida foi colocada num homogeneizador de lâminas (*Waring blender*), adicionando-se tampão de isolamento até uma proporção de 2,5:1 (v/v) relativamente ao volume da suspensão inicial de músculo.
6. Homogeneizou-se durante 5 segundos a uma velocidade relativamente baixa (velocidade 1 ~18500 rpm) e, em seguida, durante 15 segundos a velocidade mais elevada (velocidade 2 ~ 22500 rpm).
7. Após 30 segundos de repouso, a suspensão foi novamente homogeneizada à velocidade 1 durante 20 segundos, sendo posteriormente homogeneizada à velocidade 2 durante o mesmo tempo. Obteve-se assim o homogeneizado, constituído por fragmentos da sarcolema e conteúdos celulares (fragmentos de

- células musculares, mitocôndrias, núcleos, miofibrilas e vesículas de RS longitudinal (Gomes da Costa e Madeira, 1986).
8. O homogeneizado foi centrifugado a 8000 g, num rotor JA 14, durante 20 minutos e a 4° C, numa centrífuga Beckman J2 MC. Desprezou-se o sedimento (constituído por fragmentos de célula, sarcolema, núcleos, mitocôndrias, miofibrilas).
  9. Filtrou-se o sobrenadante através de 4 camadas de gaze lavada com meio de isolamento e refrigerada (removendo-se restos de gordura, tecido conjuntivo, e componentes sub-celulares mais pesados como mitocôndrias, peroxissomas, lisossomas e núcleos ou outros que tenham ficado). Centrifugou-se este filtrado como anteriormente (passo 8).
  10. O sobrenadante foi novamente filtrado através de 4 camadas de gaze refrigerada e lavada com solução tampão de isolamento. Retirou-se uma amostra do sobrenadante resultante, também denominado sobrenadante pós-mitocondrial, por em princípio se terem desprezado as mitocôndrias e por ser composto maioritariamente por VRS.
  11. Centrifugou-se o filtrado pós-mitocondrial durante 60 minutos a 40000 x g e a 4°C num rotor JA 20. Desprezou-se o sobrenadante e retirou-se uma amostra deste: amostra 3. Neste passo dever-se-ão ter separado sarcolemas, túbulos-T e outras membranas leves, das VRS.
  12. Ressuspendeu-se o sedimento no menor volume de uma solução de lavagem contendo KCl 0,6 M e Tris-HCl 10 mM pH 7.0. Este procedimento foi sempre feito com o auxílio de um *potter* tipo *Elvehjem*, num equivalente a 3 ou 4 passagens a 200 rpm.
  13. A suspensão foi diluída com a solução de lavagem numa proporção 6:1. Com esta etapa de solubilização procedeu-se a um aumento da força iónica do meio envolvente das proteínas contrácteis residuais, e outras proteínas facilmente solubilizadas, hidratando-as.
  14. Centrifugou-se a suspensão durante 35 minutos, a 78000 x g e 4°C num rotor Ti. Desprezou-se o sobrenadante, recolhendo-se previamente uma amostra: amostra 4.
  15. Recolheu-se por fim o sedimento final, cuidadosamente, de modo a evitar um pequeno ponto central (presumivelmente uma fração mitocondrial) e ressuspendeu-se no menor volume possível da solução de isolamento, com a ajuda de um pequeno *potter* (previamente refrigerado e lavado com a mesma solução).

16. Procedeu-se então à divisão da suspensão em alíquotas, às quais se adicionou igual volume (1:1) de sacarose 2 M. A adição de sacarose, em concentrações elevadas permite a preservação da funcionalidade das amostras microsossomais. Uma vez que as membranas não são permeáveis à sacarose, a remoção da água da estrutura membranar (por osmose) evita a danificação da estrutura das VRS inerente ao processo de congelação (Gomes da Costa e Madeira, 1986).
17. Procedeu-se à homogeneização pelo *vortex* seguindo-se à imediata imersão das alíquotas em azoto líquido. Este passo é essencial para o armazenamento uma vez que o congelamento rápido das frações membranares previne a formação de cristais de gelo que deteriorariam as membranas de RS.
18. As preparações foram armazenadas a -80 °C.

### 3.4 Caracterização da Ca<sup>2+</sup>-ATPase de RS

#### 3.4.1 Quantificação do teor em proteína nas VRS expresso em quantidade de Ca<sup>2+</sup>-ATPase pelo método de Bradford

A quantificação do teor em proteína nas VRS foi feita pelo método de Bradford que consiste na adição de uma solução de reagente de Bradford às amostras de proteína a quantificar, formando-se um complexo corado que é medido quantitativamente por espectrofotometria visível a 595 nm (Bradford, 1976). Esta técnica tem como base o facto de utilizar o corante “Coomassie brilliant blue” G-250 (Compton e Jones, 1985), um corante aniónico que interage com as proteínas desenvolvendo uma coloração azul, que pode ser detetada por espectrofotometria (Mikkelsen e Cortón, 2004). Este corante absorve entre 470 e 650 nm, mas apresenta uma absorvência máxima a 595 nm quando se liga a proteínas.

O método apresenta um limite de deteção abaixo de 20 µg/mL de proteína. Uma das suas limitações é o facto de apenas se ligar aos aminoácidos denominados de básicos (pH fisiológico).

Para a quantificação das VRS do músculo-esquelético de coelho fez-se primeiro uma reta de calibração com 2,4,6,8 e 10 µg de proteína obtida através da preparação de amostras de albumina de soro bovino (BSA) com concentração conhecida (Tabela 3.1). Para tal utilizou-se uma concentração de BSA de 0,5 mg/mL. Após a adição do BSA ao tampão de isolamento (KCl 0,1 M, Tris maleato 10 mM, pH 7,0) e água com resistividade de

18,2M $\Omega$ •cm a 25 °C, agitaram-se as amostras no *vortex*. Adicionou-se reagente de Bradford (na proporção 1:1), homogeneizou-se novamente e deixou-se em repouso 5 minutos.

Num espectrofotômetro SHIMADZU UV-2410 PC, leram-se os valores de absorvência das amostras a 595 nm e elaborando-se posteriormente um gráfico de absorvência a 595 nm *versus* quantidade de proteína.

**Tabela 3.1** – Condições para determinação da curva de calibração para determinar o teor em proteína pelo método de Bradford.

BSA ( $\mu$ g)	BSA ( $\mu$ L)	Meio ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	Volume final ( $\mu$ L)
0	0	5	595	600
2	4	5	591	600
4	8	5	587	600
6	12	5	583	600
8	16	5	579	600
10	20	5	575	600

Para a determinação da concentração da proteína adicionou-se 50  $\mu$ L de amostra (VRS sem sacarose), 443.75  $\mu$ L de tampão de isolamento (KCl 0,1 M, Tris maleato 10 mM, pH 7,0) e 6,25  $\mu$ L de SDS 10% ([SDS]<sub>final</sub> 0,125%, percentagem de SDS tolerada neste método, isto é, não causa interferência com o reagente de Bradford), homogeneizando-se. As amostras assim tratadas ficaram diluídas 10 vezes e analisadas em triplicado segundo a Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** – Condições de análise para determinação do teor em proteína nas amostras de Ca<sup>2+</sup>-ATPase.

Replicados	Amostra ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	Volume final ( $\mu$ L)
A <sub>1</sub>	5	595	600
A <sub>2</sub>	5	595	600
A <sub>3</sub>	5	595	600

Posteriormente, adicionou-se o reagente de Bradford (na proporção 1:1, e que no nosso caso foram 600  $\mu$ L). Verificou-se a absorvência e interpolou-se através do reta de calibração a quantidade de proteína, tendo em conta as diluições efetuadas anteriormente a concentração de proteína foi determinada pela Equação 3.1.

---

$$[\text{Amostra}] (\text{mg/mL}) = \frac{\mu\text{g}}{\text{amostra}(\mu\text{L})} \times 10 (\text{diluição}) \quad (\text{Equação 3.1})$$

### 3.4.2 Eletroforese em condições desnaturantes SDS-PAGE

O estado de pureza das preparações de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoladas foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), método que separa e identifica as proteínas de acordo com a sua massa molecular (Hames, 1998; Weber e Osborn, 1969).

A eletroforese descreve a migração de partículas carregadas quando sujeitas a um campo elétrico. A SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) é uma técnica bastante utilizada para monitorizar o processo de purificação de uma proteína, uma vez que se baseia na separação das proteínas de acordo com o seu tamanho, e pode ser também utilizada para determinar a massa molecular de proteínas.

O SDS é um detergente aniónico capaz de ligar fortemente às proteínas e é utilizado no tratamento das amostras. Numa primeira fase as proteínas sofrem uma desnaturação térmica, em tampão de amostra contendo  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor das ligações dissulfito) e SDS. O primeiro composto é utilizado para quebrar as ligações dissulfito (S-S) envolvidas na estrutura terciária da proteína enquanto o SDS auxilia a desnaturação ligando-se fortemente à proteína anulando todas as cargas positivas existentes. Cada molécula de SDS liga dois resíduos de aminoácido, o que confere uma carga total negativa à proteína desnaturada proporcional à sua massa e qualquer tentativa de “*fold*ing” proteico irá resultar numa repulsão eletrónica por parte das moléculas de SDS (Wilson e Walker, 2005).

Assim, quando uma mistura de proteínas, todas carregadas negativamente devido ao SDS, mas com massas diferentes, é submetida a um campo elétrico, as proteínas migram a diferentes velocidades em direção ao ânodo do aparelho eletroforético (Hames, 1998) dependendo da respetiva massa molecular. A mobilidade eletroforética das proteínas será tanto maior quanto menor a sua massa molecular (Wilson e Walker, 2005; Voet e Voet, 2011), tal como seguidamente se explica.

A velocidade de migração das proteínas ( $v$ ) é diretamente proporcional à diferença de potencial aplicada a uma carga ( $Eq$ ) e inversamente proporcional à resistência provocada pela fricção das proteínas ao longo do gel. A fricção exercida pelas moléculas é medida através do tamanho da proteína, da forma da proteína, pelo tamanho da rede criada pelo gel de

poliacrilamida e pela viscosidade do tampão,  $v = Eq/f$ , em que  $f$  é o coeficiente de fricção. O coeficiente de fricção depende da viscosidade do meio,  $\eta$ , e do raio da molécula,  $r$  ( $f = 6\pi\eta r$ ). Normalmente a mobilidade eletroforética ( $\mu$ ) é a razão entre a velocidade e a diferença de potencial ( $E$ ),  $\mu = v/E$ , substituindo o  $v$ , temos  $\mu = q/f$ , em que  $q$  é a carga da molécula (constante). Consequentemente a migração das moléculas depende exclusivamente da relação carga/massa e da resistência que estas oferecem à rede criada pelo gel (Mikkelsen e Cortón, 2004; Wilson e Walker, 2005; Voet e Voet, 2011). Como a carga da molécula é a mesma a velocidade de migração só depende do coeficiente de fricção ( $f$ ) que é proporcional à massa da proteína.

As eletroforeses foram efetuadas num sistema SDS *mini-protean* descontínuo constituído por dois géis de diferentes concentrações: o gel de separação de 7,5 % de acrilamida e o gel de concentração de 4% de acrilamida de acordo com a tabela 3.3.

O gel de concentração permite concentrar a amostra numa banda densa de acordo com as massas moleculares antes de os componentes serem resolvidos (Robyt e White, 1996) enquanto o gel de separação a 7,5 % de acrilamida é o ideal para o fracionamento de uma mistura de proteínas (Hames, 1998) na ordem das massas moleculares que se encontram nas VRS.

**Tabela 3.3** - Reagentes e volumes utilizados na preparação dos géis de separação e concentração.

Reagentes	Gel de separação 7,5 %	Gel de concentração 4 %
	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)
Acrilamida 30 %	1250	400
Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8.8	1250	-
Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 6.8	-	750
SDS 10%	50	30
H <sub>2</sub> O	2420	1800
PSA 10%	25	15
TEMED	3.33	5
Volume final	5000	3000

Preparou-se o gel de separação com uma percentagem de poliacrilamida de 7,5%, adicionando-se, pela seguinte ordem e com os volumes indicados na tabela 3.3, uma solução

de acrilamida 30 % (m/v), tampão de separação (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 4x concentrado), SDS 10 % e água com resistividade de 18,2 MΩ•cm a 25 °C. Por fim para promover a polimerização adicionou-se PSA 10 % e TEMED como catalizador. Agitou-se e colocou-se a polimerizar no sistema de vidros da eletroforese previamente montados. Colocou-se água de modo a impedir a desidratação do gel e impedindo o contacto do mesmo com o oxigénio. Após a polimerização, cerca de 30 minutos, retirou-se a H<sub>2</sub>O e preparou-se o gel de concentração, 4% acrilamida. Para tal adicionou-se pela seguinte ordem e com os volumes indicados na tabela 3.3, uma solução acrilamida 30 %, tampão de concentração (0,5 M Tris, pH 6,8; 4 vezes concentrado), SDS 10 %, água com resistividade de 18,2 MΩ•cm a 25 °C e por fim PSA 10 % e TEMED. Após agitação suave colocou-se sobre o gel de separação deixando-se polimerizar durante cerca de 30 minutos. Após a polimerização transferiu-se o gel para a tina de eletroforese, na qual foi adicionado o tampão de eletroforese do ânodo (Tris 25 mM, glicina 192 mM; SDS 0,1% (m/v) e acetato de sódio 0,1 M, pH 8,3) e o tampão de eletroforese do cátodo (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (m/v), pH 8,3). As amostras foram preparadas para um volume final de 100 µL dos quais apenas 25 µL correspondem ao tampão de amostra (Tris-HCl 320 mM, pH 6,8; β-mercaptoetanol 0,4 M, SDS 8%, glicerol 15% (v/v) (confere densidade à amostra) e azul de bromofenol 0,024 % (marcador da frente de migração). Colocaram-se as amostras em água a ferver durante 5 minutos e adicionou-se aos poços 20 µL de cada amostra retirada do isolamento da proteína. Reservou-se um poço de cada gel para adicionar 5 µL de solução de marcadores proteicos de baixa massa molecular (LMW) e outra para o marcador de alta massa molecular (HMW) (Tabela 3.4). Aplicou-se um campo elétrico de 100 V ao gel durante aproximadamente 1 hora.

No final da migração, retirou-se o gel e colocou-se numa tina com solução corante contendo (“Coomassie Brilliant Blue” 0,2% com metanol 45% (v/v) e ácido acético glacial 10%) aproximadamente 1 hora. Após coloração deixou-se o gel em solução descorante (metanol 10% (v/v) e de ácido acético glacial 10% (v/v) até ser possível clarificar as bandas presentes, para tal substitui-se a solução descorante várias vezes.

A massa molecular das proteínas foi determinada interpolando-se as suas mobilidades eletroforeticas relativas e efetuando-se a curva padrão log (massa molecular) versus R<sub>f</sub>, relação linear de acordo com a equação 3.2.

$$R_f (\text{mobilidade relativa}) = \frac{\text{migração da proteína (mm)}}{\text{migração do marcador (mm)}} \quad (\text{Equação 3.2})$$

Através desta e por interpolação da mobilidade das bandas presentes nas amostras é possível concluir o grau de pureza das proteínas (Mikkelsen e Cortón, 2004; Wilson e Walker, 2005; Voet e Voet, 2011).

Posteriormente, procedeu-se à análise densitométrica dos géis usando o programa Quantity One Version 4.2.1 para a determinação da quantidade relativa da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas VRS que foram isoladas.

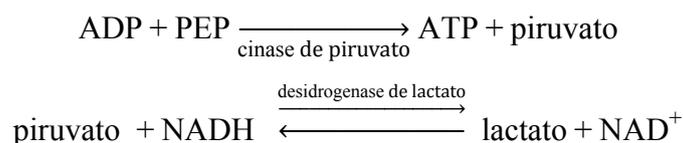
**Tabela 3.4** – Marcadores moleculares utilizados na SDS-PAGE.

Marcadores moleculares (Sigma)			
HMW	kDa	LMW	kDa
Miosina	205	Albumina	66
$\beta$ -galactosidade	116	Ovalbumina	45
Fosforilase b	97	Gliceraldeído-3-P-desidrogenase	36
Fritose-6-P-cinase	84	Anidrase carbónica	29
Albumina	66	Tripsinogénio	24
Desidrogenase Glutâmica	55	Inibidor da tripsina	20
Ovalbumina	45	$\alpha$ -lactalbumina	14,2
Gliceraldeído-3-P-desidrogenase	36	Aprotinina	6,5

### 3.4.3 Estudo da atividade da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS

Os métodos analíticos para ensaios enzimáticos podem ser classificados como contínuos e descontínuos. Neste trabalho foram utilizados métodos contínuos que medem a alteração de algumas propriedades, nomeadamente a absorvência, no ensaio enzimático ao longo do tempo.

Muitos substratos absorvem na zona do visível ou do ultravioleta e uma variação na absorvência no decorrer do ensaio é utilizado como base para o cálculo da atividade enzimática. No entanto, existem muitos que não exibem estas propriedades e podem ser acoplados a outras reações enzimáticas através de intermediários comuns. Inúmeros ensaios acoplados utilizam como base a formação ou no consumo de NADH de acordo com as seguintes reações:



Uma vez que o NADH absorve a 340 nm, este é utilizado num elevado número de ensaios enzimáticos (Fersht, 1999; Wilson e Walker, 2005)

A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi estudada, na presença de vários oxometalatos ou ausência (controlo), pelo método acoplado (Meissner, *et al.*, 1973; Cuenda *et al.*, 1990; De Foresta *et al.*, 1994; Aureliano *et al.*, 2008) na presença de NADH e ATP para regenerar o sistema. Os ensaios foram realizados com as VRS isoladas previamente diluídas a 1mg/mL com uma concentração de sacarose 0,25 M.

A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS foi medida espectralmente a 25° C e 340nm, utilizando as enzimas associadas cinase de piruvato/desidrogenase de lactato nos ensaios, nas seguintes condições: KCl 0,1 M, HEPES 25 mM (pH 7.0) e  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{M}$ , fosfoenolpiruvato 0,42 mM, desidrogenase de lactato 18 UI, cinase de piruvato 7,5 UI e ATP 2,5 mM. Nesta situação procedeu-se ao auto zero. Posteriormente adicionou-se NADH 0,25mM, deixando-se estabilizar o valor de absorvência, antes de se iniciar a reação. O ensaio inicia-se após a adição de 10  $\mu\text{g/mL}$  de VRS e terminando 15 minutos depois com a adição de um ionóforo A23187 (calcimicina) 4% (m/m) relativamente à massa de proteína. Nas condições descritas foram efetuados sempre ensaios de controlo, ou seja na ausência de metais ou na presença de oxometalatos tais como vanadato, decavanadato, decaniobato, tungatato e molibdato. Também se procedeu a ensaios de medição da atividade na ausência ou presença de antioxidantes tais como: glutathione (1 mM), quercetina (10  $\mu\text{M}$ ) e canferol (10 $\mu\text{M}$ ) ou na ausência e presença de agentes redutores como o DTT. As soluções dos metais ou antioxidantes ou redutores foram adicionadas sempre antes da adição da proteína. Nas concentrações utilizadas verificou-se que, por adição de 40  $\mu\text{M}$  de ADP, as soluções dos metais e antioxidantes não afetam o sistema enzimático acoplado usado para medição da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase presente nas vesículas de retículo sarcoplasmático. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e o cálculo da atividade enzimática foi efetuado de acordo com a equação 3.3.

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta\text{DO}/\text{minuto} \times V_{\text{ensaio}}}{\epsilon_{\text{NADH}} \times V_{\text{proteína}}} \quad (\text{Equação 3.3})$$

Em que :  $V_{\text{ensaio}}$ - volume total no ensaio (1000  $\mu\text{L}$ );  $V_{\text{proteína}}$ - volume de solução de proteína (1mg/mL), usou-se um volume de 10  $\mu\text{L}$  em todos os ensaios;  $\Delta\text{DO}$  – variação da absorvência;  $\epsilon_{\text{NADH}}$  – coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm, cujo valor é de  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , o que significa que a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato/mL corresponde a uma variação em absorvência de 6,22 DO. A atividade ATPásica calculada foi em nmol NADH/min/ $\mu\text{g}$  ou em nmol NADH/min e expressa em nmol ATP/min/ $\mu\text{g}$  ou em nmol ATP/min visto ser o ATP o substrato da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

### 3.5 Estudo da variação de atividade da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase com a incubação em diferentes soluções de oxometalatos

A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi estudada na presença ou ausência (controlo) de vários oxometalatos. Numa primeira fase foram determinados os  $\text{IC}_{50}$  para os vários metais. O meio reacional foi constituído por KCl 0,1 M, HEPES 25 mM (pH 7,0) e  $\text{MgCl}_2$  5 mM. Adicionou-se  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{M}$ , fosfoenolpiruvato 0,42 mM, desidrogenase de lactato 18 UI e cinase de piruvato 7,5 UI. Nesta situação procedeu-se ao Auto zero. Posteriormente adicionou-se NADH 0,25 mM, deixando-se estabilizar a solução. O ensaio era iniciado após a adição de ATP 2,5 mM, sendo posteriormente adicionadas as VRS. O ensaio terminou com a adição de um ionóforo de cálcio A23187 a 4 % (m/m).

Posteriormente, o valor de  $\text{IC}_{50}$  determinado foi utilizado para realizar os ensaios de incubação. Estes ensaios foram efetuados incubando as VRS durante 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Foram efetuados todos os cálculos necessários através de regressão linear, calculou-se a atividade enzimática e determinou-se o valor da percentagem de inibição para cada solução de cada um dos oxometalatos para cada condição experimental. Os cálculos efetuados tiveram como base as equações 3.3 e 3.4.

$$\text{Atividade (\%)} = \frac{\text{Atividade enzimática}_{\text{oxometalato}}}{\text{Atividade enzimática}_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.4})$$

### 3.6 Determinação de resíduos de cisteína reduzidos

A titulação dos resíduos de cisteína acessíveis reduzidos presentes na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS foi realizada na ausência de agentes desnaturantes e usando o reagente DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)) de acordo com o indicado em trabalhos anteriores (Fohr *et al.*, 1989; Soares *et al.*, 2007c; Soares *et al.*, 2008b; Ramos *et al.*, 2009), usando o coeficiente de extinção molar de  $14150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a 412 nm para o produto da reação TNB (2-nitro-5-tiobenzoato). Os ensaios foram efetuados num meio contendo HEPES 25 mM (pH 7,0) KCl 100 mM e  $\text{MgCl}_2$  5 mM e tampão fosfato de sódio 55 mM (pH 7,2). Foram feitos ensaios controle com 0,2 mL de VRS (1 mg/mL) na ausência de metais ou antioxidantes e seguiu-se a reação durante 5 minutos. Foram ainda realizados ensaios com vanadato, decavanadato, decabionato, tungstato ou com molibdato adicionado ao meio. Neste caso, incubou-se durante 5 minutos antes da adição de 0,2 mL de VRS (1 mg/mL). Foram ainda efetuados, nas mesmas condições ensaios na ausência ou na presença de antioxidantes tais como: quercetina (100  $\mu\text{M}$ ) e canferol (100  $\mu\text{M}$ ).

### 3.7 Estudos por espectroscopia de absorção atômica da interação de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase com oxometalatos de vanádio

A determinação da concentração de vanádio, em ensaios na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de VRS, foi realizada por espectroscopia de absorção atômica (EAA). A espectroscopia de absorção atômica (EAA) é uma técnica bastante seletiva bem como bastante sensível (Rubinson e Rubinson, 1998) e conseqüentemente é utilizada para a análise de metais vestigiais num elevado número de amostras, incluindo amostras biológicas (Broekaert, 2002). Em geral as concentrações atômicas não são medidas diretamente em solução, isto é, os átomos tem de ser volatilizados, num processo chamado de atomização em que através duma chama ou eletrotermicamente as amostras do elemento a analisar são submetidas a temperaturas elevadas de modo a dissociarem as suas ligações químicas e obter os elementos químicos no estado de vapor atômico. Neste estado atomizado, o elemento é capaz de emitir ou absorver radiação monocromática no respetivo comprimento de onda, o que se traduz num pico de absorção cuja altura ou área pode ser usada para quantificação pela lei de Lambert-Beer (Rouessac e Rouessac, 2001 Wilson e Walker, 2005). A atomização de elementos pode ser realizada num atomizador de chama ou eletrotérmico, dependendo da amostra e/ou metal em questão (Skoog *et al.*, 1998).

Na EEA eletrotérmica o espectrofotómetro possui uma câmara de grafite que pode ser aquecida eletrotermicamente até 2800 ° C. A câmara de grafite funciona como uma cavidade ótica onde a amostra é injetada e em seguida submetida à atomização. O poder de deteção é superior pelo facto da amostra ser completamente atomizada e mantida sob a forma de vapor e dos átomos livres ficarem retidos no reservatório atómico por um longo período de tempo (Broekaert, 2002) e apresenta várias 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 deteção cerca de 1000 vezes superior ao do método por chama, permitindo a deteção concentrações na ordem de µg/L (ppb). Outra vantagem da EEA eletrotérmica é o uso de pequenos volumes de amostra (na ordem dos microlitros), em solução ou matriz biológica (Gonçalves, 1996).

### **3.7.1 Determinação de limites de deteção e quantificação**

Os limites de deteção e quantificação do equipamento para as condições de análise utilizadas na determinação de vanádio foram determinadas conforme recomendado pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), tendo-se seguido as recomendações da norma ISO 8466-1, os referidos limites foram calculados a partir da estatística de mínimos quadráticos da reta de calibração, admitindo-se que o desvio-padrão da estimativa representa o desvio-padrão do branco (ISO 8466-1). Os limites de deteção e quantificação obtidos para o vanádio nas condições experimentais utilizadas foram de  $5 \pm 1$  e  $14 \pm 3$  ppb, respetivamente.

### **3.7.2 Preparação das amostras para quantificação do conteúdo em vanádio**

A determinação da concentração de vanádio total existente nos sobrenadantes das amostras centrifugadas a 40000 g durante 60 minutos, à temperatura de 4 °C, foi efetuada por EEA eletrotérmica num espectrofotómetro de absorção atómica Avanta GBC PAL300-Auto sample, 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 3.5 e Tabela 3.6).

**Tabela 3.5** – Caracterização das condições operatórias, parâmetros da câmara de grafite e parâmetros de amostragem utilizados na EAA eletrotérmica.

Condições operatórias de EAA eletrotérmica		Parâmetros da Câmara de Grafite		Parâmetros de Amostragem	
Modo de instrumento	Absorvência	Etapa 1	Injeção	Padrão 1 (50 ppb)	5 µL Solução (i) 15 µL água com resistividade de 18,2 MΩ•cm a 25°C
Modo de calibração	Concentração	Etapa 2	85 °C, 2,0 s.		
Modo de medida	Altura pico	Etapa 3	97 °C, 1,0 s.	Padrão 2 (100 ppb)	7.5 µL Solução (i) 12,5 µL água com resistividade de 18,2 MΩ•cm a 25°C
Corrente	18 mA	Etapa 4	120 °C, 10,0 s.		
Largura da fenda	0,2 nm	Etapa 5	1200 °C, 10,0 s.	Padrão 3 (150 ppb)	10 µL Solução (i) 10 µL água com resistividade de 18,2 MΩ•cm a 25°C
Comprimento de onda	318,2 nm	Etapa 6	1200 °C, 1,0 s.		
Introdução da amostra	<i>Automix</i>	Etapa 7	2700 °C, 0,8 s.	Padrão 4 (200 ppb)	20 µL Solução (i)
Constante do tempo	0	Etapa 8	2800 °C, 0,1 s.		
Replicados	3				Amostra 20 µL

(i) Os padrões 1,2 e 3 foram preparados automaticamente por diluição do padrão 4 com água com resistividade de 18,2 MΩ•cm a 25°C.

De acordo com o método descrito anteriormente (Gonçalves, 1996), o equipamento foi calibrado com uma série de soluções padrão contendo 50, 100, 150 e 200 ppb de vanádio, obtidas por diluições sucessivas de uma solução de vanádio concentrada ( $1002 \pm 2$  mg/L, Merck), de modo a obter retas de calibração que permitiram determinar, por interpolação, a concentração de vanádio (ppb) presente em cada uma das amostras. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, sendo injetado na câmara de grafite um volume 20 µL de amostra que foi submetido a uma vaporização lenta até 700 K ( $\sim 427$  °C), para dispersão de produtos de decomposição voláteis, após o qual 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 3.6).

**Tabela 3.6** – Parâmetros de programação da câmara de grafite utilizados para a determinação da concentração de vanádio por EAA eletrotérmica, no espectrofotômetro de absorção atômica GBC Avanta.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Fluxo de gás (L/min)	Padrão de gás	Comando de leitura
1	85	5	3	Normal	Não
2	95	40	3	Normal	Não
3	120	5	3	Normal	Não
4	1400	5	3	Normal	Não
5	1400	1	3	Normal	Não
6	1400	2	0	Normal	Não
7	2700	1	0	Normal	Sim
8	2700	2	0	Normal	Sim
9	2700	2	3	Normal	Não

### 3.7.3 Validação do método

De acordo com os métodos de referência descritos pelo United Nations Environment Programme (UNEP) em 1990, a exatidão do método foi avaliada através da análise de material de referência certificado (MRC) para análise de elementos, usando-se o TORT-2, proveniente de hepatopâncreas de lagosta do National Research Council of Canada (NRCC), cujo valor certificado de vanádio é de  $1,64 \pm 0,19$  mg/kg.

O MRC TORT-2 foi pesado e sujeito ao mesmo tratamento das amostras de modo a calcular-se o fator de rendimento do MRC (Z) de acordo com o teste “Z-scores” (Castro, 1997).

$$Z = \frac{|X_{\text{lab}} - X_v|}{S}$$

$X_{\text{lab}}$ , 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 a incerteza de  $X_v$ ).

O resultado obtido foi avaliado segundo os parâmetros:

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

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

$$|Z| > 3 : \text{Satisfatório}$$

Estabelecidos para a classificação do fator de rendimento do MRC, tendo-se obtido o valor  $Z = 1,68$  e considerando-se o fator de rendimento satisfatório para o método utilizado (Tabela 3.7)

**Tabela 3.7** – Valor do fator de rendimento do MRC utilizado segundo o teste “Z-scores” e valor certificado do MRC para o vanádio.

MCR TORT-2	Concentração de Vanádio (mg/kg)	Teste "Z-scores"
Valor certificado	1,64±0,19	$0 < Z \leq 2$
Valor obtido	1,32±0,23	$Z = 1,68$

### 3.7.4 Análise da interação das diferentes conformações da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS com oxometalatos por EAA

A espectroscopia de absorção atômica não tem sido usada para estudos de interação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS com oxometalatos. No presente estudo abrimos a porta ao uso de uma técnica bastante sensível que permite estudar interações entre proteínas e metais e aplicámo-lo ao estudo da interação de oxometalatos de vanádio  $V_1$  e  $V_{10}$  com a bomba de cálcio.

Para tal foram efetuados ensaios em várias condições variando a relação proteína metal nas diferentes conformações da bomba de cálcio. Todos os ensaios foram realizados fazendo variar a relação entre a quantidade de  $V_1$  e  $V_{10}$  e proteína em  $\mu\text{M}$  (numa proporção 10:1, 2:1, 1:1 1:2). Os ensaios foram feitos no meio reacional contendo KCl 0,1 M, HEPES/KOH 25mM pH 7,0 e  $\text{MgCl}_2$  5 mM:

- Com  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{M}$  e sem ATP
- Com  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{M}$  e ATP 0,25 mM
- Com EGTA 0,5 mM
- Com EGTA 0,5 mM e fosfato de sódio 5 mM

### 3.7.5 Determinação da estequiometria da ligação do decavanadato à $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS

#### A) Método Job padrão

Incubou-se concentrações crescentes de decavanadato entre 0 e 1  $\mu\text{M}$  e SR-  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase entre 0 e 1  $\mu\text{M}$ , com o somatório de ambas constante em cada ensaio mas quocientes

diferentes, na presença de meio reacional contendo KCl 0,1 M, HEPES/KOH 25 mM pH 7,0 e MgCl<sub>2</sub> 5 mM e CaCl<sub>2</sub> 50 μM.

B) Método do reagente limitante – Método de Job Modificado

Incubou-se concentrações crescentes de decavanadato entre 0 e 2 μM em presença de concentração constante de SR- Ca<sup>2+</sup>- ATPase 1 μM, na presença de meio reacional contendo KCl 0,1 M, HEPES/KOH 25 mM pH 7,0 e MgCl<sub>2</sub> 5 mM e CaCl<sub>2</sub> 50 μM.

### 3.7.6 Determinação da constante de dissociação K<sub>d</sub> entre decavanadato e Ca<sup>2+</sup>- ATPase de RS pelo método de Scatchard

Os ensaios foram realizados fazendo variar a relação entre a quantidade de V<sub>10</sub> e proteína em μM (numa proporção 1:4, 1:2, 1:1 2:1,10:1 e 20:1) na presença de meio reacional contendo KCl 0,1 M, HEPES/KOH 25 mM pH 7,0 e MgCl<sub>2</sub> 5 mM e CaCl<sub>2</sub> 50 μM.

### 3.7.7 Efeito de decaniobato e heparina na interação entre V<sub>10</sub> e Ca<sup>2+</sup>- ATPase de RS

Incubou-se V<sub>10</sub> e SR- Ca<sup>2+</sup>- ATPase 1:1 na presença de meio reacional contendo KCl 0,1 M, HEPES/KOH 25 mM pH 7,0 e MgCl<sub>2</sub> 5 mM e CaCl<sub>2</sub> 50 μM. Após 5 minutos adicionou-se Heparina (30 μg e 60 μg) e decabionato (10 μM, 100 μM e 200 μM):

A) Sem ATP

B) Com ATP 2,5 mM

Todos os ensaios foram sujeitos a uma centrifugação a 40 000 g no rotor JÁ 18.1 durante 60 minutos e a 4 °C. Foi recolhido o sobrenadante para proceder à quantificação do vanádio não ligado à proteína por EAA eletrotérmica. Desprezou-se o sedimento que seria constituído essencialmente pelo sistema metal-proteína.

Em cada ensaio foram realizados controlos constituídos por todos os componentes reacionais excluindo a proteína e foram feitos no mínimo três determinações para cada condição experimental.

A análise do metal não ligado por EAA foi efetuada num espectrofotómetro *Varian Spectra A20*, em que as amostras foram colocadas na câmara de grafite, numa ordem crescente, prevista, de concentração. Este procedimento permite minimizar ou evitar erros por contaminação.

### 3.7.8 Análise de resultados

As concentrações de vanádio livre nos sobrenadantes das amostras analisadas foram calculadas em ppb a partir das curvas de calibração obtidas. As concentrações de vanádio ligado foram obtidas em ppb por diferença entre os sobrenadantes das amostras controlo, em que não se usou  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS e as amostras em que se usou o oxometalato e a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS. Os valores de concentração obtidos em ppb foram convertidos em concentração  $\mu\text{M}$  para os diferentes oxometalatos de vanádio,  $V_1$  e  $V_{10}$  tendo em consideração as massas molares expressas em vanádio.

### 3.8 Espetroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A Ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica que faz a monitorização da absorção de energia associada a transições de núcleos entre níveis de energia magnética nuclear adjacentes, sendo esta energia medida em função do campo magnético externo aplicado, obtendo-se como resultado um espectro de absorção em função da força do campo (Cantor e Schimmel, 1980).

As moléculas sujeitas a um campo magnético forte absorvem energia por determinados tipos de núcleos na região das radiofrequências do espectro eletromagnético (Holme, 1998, Robyt e White, 1996). O espectro de RMN apresenta bandas de ressonância de forma lorentziana que apresentam os seguintes parâmetros espectrais:

- 1) desvio químico ( $\delta$ ) - posição de cada banda relativamente ao desvio químico da referência ( $\delta_0$ ), expresso em ppm (partes por milhão).
- 2) amplitude (altura do sinal em unidades arbitrárias).
- 3) intensidade (área da banda).
- 4) largura a meia altura ( $\Delta_{1/2}$ ) - medida da largura do sinal a metade da amplitude máxima, expressa em hertz (Hz).
- 5) constante de acoplamento de *spin* (J) - separação, em Hz, entre os sinais de um multipletto.
- 6) tempos de relaxação de *spin* nuclear longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ) (James, 1975).

As aplicações biológicas do RMN abrangem a obtenção de informações sobre a estrutura de macromoléculas, concentração, interação entre moléculas, ou ainda reações enzimáticas (Holme, 1998). A análise 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.

O isótopo 51 de vanádio ( $^{51}\text{V}$ ) tem propriedades magnéticas que se adequam ao estudo deste elemento por espectroscopia de RMN, ele tem uma abundância natural de cerca de 99,76 %, um *spin* nuclear de 7/2 e apresenta uma sensibilidade de 39% relativamente à do próton ( $^1\text{H}$ ) (Chasteen, 1983). No entanto  $^{51}\text{V}$  possui um momento quadrangular muito pequeno, não sendo os sinais detetados excessivamente largos ( $\Delta_{1/2}$  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). Tais características levam a que o núcleo de  $^{51}\text{V}$  um dos melhor sucedidos em estudos de RMN, particularmente em estudos que envolvem as espécies diamagnéticas de Vanádio(V), uma vez que, para as espécies paramagnéticas o vanádio(IV), o alargamento dos sinais são muito grandes o que impossibilita a sua observação (Chasteen, 1983; Rehder, 1982).

Os valores dos desvios químicos, que variam entre -480 e -600 ppm relativamente à referência  $\text{VOCl}_3$  ou as larguras a meia altura dos sinais de  $^{51}\text{V}$ -RMN dependem da geometria de coordenação (tetraédrica, octaédrica, bipiramidal trigonal) e aumentam com a formação de complexos (Rehder, 1982). Em núcleos com momentos quadrapolares, os valores de  $\Delta_{1/2}$  dependem da simetria de coordenação, o que leva a aumentos de valores de  $\Delta_{1/2}$  quando se formam complexos com simetrias distorcidas como é o complexo  $\text{VO}_2(\text{EDTA})^{3-}$  (Tabela 3.8).

**Tabela 3.8** - Valores de largura a meia altura ( $\Delta_{1/2}$ ) obtidos em vários tipos de coordenação de átomos de vanádio. (Adaptado de Rehder, 1982).

Simetria do vanádio	Complexo ou espécie	( $\Delta_{1/2}$ ) Hz
Tetraédrico	$\text{VOCl}_3$ ; $\text{VO}_4^{3-}$	< 10-60
Quase tetraédrico	$\text{H}_2\text{VO}_4^-$	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) <sup>1</sup>
(com átomos de vanádio vizinhos)	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	150 (10B) <sup>1</sup>
	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	350 (10C) <sup>1</sup>
Rômbico	$\text{VO}_2(\text{EDTA})^{3-}$	800

<sup>1</sup>10A, 10B e 10C: correspondem às três bandas da espécie decamérica de vanadato ( $\text{V}_{10}$ ) que se observam no espectro de  $^{51}\text{V}$ -RMN

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 elétrico devido a um átomo dador da proteína na esfera de coordenação do vanádio (Crans *et al.*, 1990; Wittenkeller *et al.*, 1991). Assim se uma dada espécie de  $^{51}\text{V}$  estiver na presença de uma enzima, tal como a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, pode sofrer um alargamento do respetivo sinal, o que é um indicativo de uma interação entre metal e proteína (Aureliano e Madeira, 1998; Crans, 1994). Como cada espécie de vanadato origina ressonâncias bem resolvidas no espectro de  $^{51}\text{V}$ -RMN, cuja localização é sensível ao estado de protonação da solução (Tabela 3.9) (Crans *et al.*, 1998) e dado que as diversas espécies têm tempos de relaxação semelhantes (Heath e Howarth, 1981), a integração dos sinais correspondentes permite determinar a fração molar de cada espécie que pode ser usada para calcular as concentrações de cada oligómero (Crans, 1994).

**Tabela 3.9** - Fórmulas, valores de pKa, desvios químicos, cor e estrutura das principais espécies de oxovanadatos em solução aquosa. (Adaptado de Crans *et al.*, 1990).

Fórmula	pKa	Desvio químico (ppm)	Cor e estrutura
$\text{VO}_4^{3-}$	-	-541,2	incolor; linear
$\text{HVO}_4^{2-}$	~12	-538,8	incolor; linear
$\text{H}_2\text{VO}_4^-$	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>

### 3.8.1 Caracterização das soluções de vanadato e estudos de interação de $V_{10}$ com a $Ca^{2+}$ -ATPase de RS por $^{51}V$ -RMN

Analisou-se previamente as soluções de metavanadato e decavanadato por espectroscopia de RMN do isótopo 51 de vanádio ( $^{51}V$ ),  $^{51}V$ -RMN, para caracterizar os oligómeros presentes nas soluções que foram usadas nos diversos estudos.

Os estudos de RMN foram efetuados no departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Os espectros de  $^{51}V$ -RMN foram adquiridos num espectrofotómetro *Brüker AM-400 MHz* equipado com uma sonda multinuclear inversa de 5 mm. Todas as amostras foram analisadas em presença de 10%  $D_2O$  e colocadas em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro sendo irradiadas a uma frequência de 105,2 MHz e os espectros adquiridos à temperatura ambiente da sonda (22 °C) e nas seguintes condições espectrais de aquisição: largura espectral (45 455 Hz), tempo de aquisição (0,086 s), tempo de excitação e de espera (0 s), número de transientes (30 000), tempo de relaxação (0,01 s), largura do pulso (11  $\mu$ s), sequência de pulsos (90°). (Aureliano e Madeira, 1994a)

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).

Os espectros de decavanadato (5mM de vanádio total) foram obtidos num meio contendo HEPES 25 mM (pH 7,0), KCl 100 mM,  $MgCl_2$  5 mM e  $CaCl_2$  50  $\mu$ M na ausência ou na presença de vesículas de retículo sarcoplasmático (5 mg/mL de proteína total) e ATP 2,5 mM. Espectros semelhantes foram obtidos adicionando 0,5 e 1 mM de decaniobato ( $Nb_{10}$ ) na ausência ou na presença de ATP 2,5 mM.

Os valores das larguras a meia altura dos sinais de ressonância foram corrigidos relativamente ao valor atribuído para o alargamento das bandas (20 Hz) o que se traduz em que aos valores de largura a meia altura está associada uma variação de  $\pm 10$  Hz.

A integração dos sinais de  $^{51}V$ -RMN permite determinar a fração molar de cada oligómero de vanadato presente nas soluções (Crans, 1994). Deste modo foram determinadas as áreas dos sinais de RMN correspondentes às várias espécies oligoméricas de vanadato foram obtidas por integração dos sinais e as concentrações relativas das espécies oligoméricas de vanadato [ $V_x$ ] foram calculadas a partir das frações do total das áreas dos sinais observados nos espectros obtidos (Aureliano, 1995), de acordo com a equação 3.5.

$$[V_x] = \frac{A_x}{A_t} \cdot \frac{[V_t]}{n} \quad (\text{Equação 3.5})$$

Onde:

$[V_x]$  - representa a concentração do oligómero de vanadato x;  $A_t$  - corresponde à soma total das áreas medidas das diferentes espécies;  $A_x$  - corresponde à área medida para o sinal referente à ressonância da espécie oligomérica de vanadato x;  $[V_t]$  - representa a concentração total de vanádio em solução; n - o número de agregação (número de átomos de vanádio da espécie de vanadato).

### 3.9 Ressonância paramagnética eletrônica

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica que tem princípios físicos semelhantes aos da espectroscopia de RMN e baseia-se no facto de um eletrão desemparelhado possuir também um momento magnético de *spin* quando sujeito à ação de um campo magnético externo. Devido ao momento magnético de *spin* associado a um eletrão desemparelhado ser  $10^3$  vezes superior ao do núcleo, os ensaios em RPE usam frequências na gama dos GHz (zona das micro-ondas) enquanto os ensaios de RMN usam frequências na gama dos MHz (zona das radio-ondas do espectro eletromagnético (Cantor e Schimmel, 1980).

As características dos sinais de um espectro de RPE de uma dada molécula com eletrão emparelhado podem ser afetadas por dois fatores: o fator *g* e a interação nuclear hiperfina. Para um eletrão livre no vácuo, o fator *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 para a identificação do respetivo grupo químico paramagnético. A interação nuclear hiperfina de um eletrão desemparelhado com um núcleo possuindo um número quântico de *spin* *I* origina  $2I + 1$  linhas no espectro de RPE (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 fator *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).

Para a caracterização e deteção de vanadilo ( $VO^{2+}$ ), e seus complexos, nomeadamente com proteínas, a espectroscopia de RPE é, regra geral, o método usado

preferencialmente. O vanadilo é caracterizado por ter quatro ligandos equatoriais e um axial correspondente ao grupo oxo na posição trans, assumindo assim uma posição octaédrica. Devido ao ter um *spin* nuclear ( $I = 7/2$ ) e à anisotropia da molécula, o elétron desemparelhado de  $\text{VO}^{2+}$  origina um espectro de RPE composto por duas séries de oito transições que são correspondentes à fração de moléculas com a ligação  $\text{V}=\text{O}$  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  $A$ , respetivamente. A magnitude destes valores depende da força de acoplamento hiperfino entre o elétron desemparelhado e o núcleo de  $^{51}\text{V}$  (Chasteen, 1983).

### 3.9.1 Análise da formação de vanadilo por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrónica

A redução das espécies de vanadato nomeadamente de decavanadato em interação com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de VRS foram analisadas por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrónica (RPE) num espectrofotómetro computadorizado *Brüker EMX-6/1 com uma cavidade retangular Brucker ER4116DM* a uma frequência de micro-ondas de 9654 GHz (banda X) equipado com um criostato *Oxford* (ESR900), num meio contendo tampão contendo HEPES 25 mM (pH 7,0), KCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM e  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{M}$ . Os espectros de vanádio reduzido, foram adquiridos usando uma potência de micro-ondas de 635  $\mu\text{W}$ , uma amplitude de modulação de 10 G, frequência de modulação de 100 kHz, constante de tempo de 168.840 ms e tempo de varrimento de 335,544 s. Registaram-se os espectros à temperatura de 77 K em amostras de 0,2 mL com os seguintes parâmetros espectrais: ganho do recetor,  $1,0 \times 10^5$ ; uma média de 4 varrimentos e um varrimento do campo magnético entre os 2400 e 4400G (Soares *et al.*, 2007c). A redução do decavanadato e consequente formação do vanadilo (IV) foi avaliada usando as amostras preparadas para os ensaios de RMN.

### 3.10 Espectroscopia de Raman

Os estudos de espectroscopia Raman foram efetuados na Unidade de Investigação e Desenvolvimento Química-Física Molecular da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. As amostras foram preparadas em meio contendo KCl 0,1 M, HEPES/KOH 25 mM pH 7,0 e  $\text{MgCl}_2$  5 mM e VRS (5mg/mL) e adicionando:

- a)  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{M}$

- b)  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{M}$  e ATP 2,5 mM
- c) EGTA 0,5 mM
- d) EGTA 0,5 mM e fosfato de sódio 5 mM

Deste modo obtiveram-se os espectros da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, nas conformações E1, E1P, E2, E2P. De forma a analisar as espectros da interação metal-proteína, também se prepararam amostras em que se adicionaram, ao meio contendo as VRS, os diferentes oxometalatos nas seguintes concentrações:

- e) Decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) 5mM vanádio total (0,5 mM  $\text{V}_{10}$ )
- f) Vanadato ( $\text{V}_1$ ) 1mM
- g) Decaniobato ( $\text{Nb}_{10}$ ) 1mM
- h) Tungstato ( $\text{W}_1$ ) 1mM
- i) Molibdato ( $\text{Mo}_1$ ) 1mM

Os espectros de Raman, foram obtidos à temperatura ambiente com um monocromador triplo “Jobin-Yvon T64000 Raman system” (distância focal 0,640 m, abertura f/7,5) equipado com grelhas holográficas de 1800 ranhuras por milímetro. O pré-monocromador foi utilizado no modo subtrativo. O sistema de deteção Charge Coupled Device (CCD) chip 1024×256 pixel (1”) foi refrigerado com azoto líquido. Foi utilizada a radiação de excitação de 514,5 nm proveniente de uma fonte de Laser de  $\text{Ar}^+$  (Coherent, modelo Innova 300-05) proporcionando cerca de 50 mW na posição da amostra. Usou-se a geometria de 90 ° entre a radiação incidente e o sistema coletor. A fenda de entrada foi ajustada para 200 nm, e a fenda entre o pré-monocromador e o espectrógrafo foi ajustada a 400 nm. As amostras foram seladas em capilares de vidro tubos de vidro Kimax com um diâmetro interior de 0,8 mm. Nas condições acima mencionadas foi estimado um erro de menos de  $1\text{cm}^{-1}$  para os números de onda.

### 3.11 Análise estatística

Todos os resultados de todos os parâmetros estudados estão expressos como média± desvio padrão, obtidos, no mínimo, em três ensaios independentes com três ou mais replicados de cada condição experimental de três preparações de VRS.

A análise estatística comparativa dos dados, relativamente a todos os parâmetros abordados, foi efetuada usando o teste t-student emparelhado (representado pela letra t), um teste paramétrico utilizado quando os parâmetros de normalidade da distribuição das amostras e de homogeneidade de variâncias entre os grupos de dados. Este teste é aplicado a um

reduzido número de amostras ( $n < 30$ ) e compara os grupos através da média dos seus valores nomeadamente quando se pretende estudar uma variável antes e após um tratamento e para isso fazem-se determinações em sujeitos/produtos antes e depois de aplicar um certo tratamento ou ocorrer um dado processo, estudando-se neste caso as diferenças entre os resultados. As hipóteses, nula e alternativa do teste são, respetivamente:

$H_0$ : 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 excedam o valor tabelado para a distribuição  $t$  para um nível de significância de  $p = 0,05$ .

Consideram-se os resultados significativamente diferentes do controlo quando  $p < 0,05$ .

## Capítulo 4

---

### Resultados

---

#### **4.1 Isolamento e caracterização da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de vesículas de retículo sarcoplasmático (VRS) de músculo-esquelético de coelho**

Neste trabalho, foram utilizadas vesículas de retículo sarcoplasmático, isoladas a partir do músculo-esquelético de coelho, como fonte de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase a qual provou ser um modelo excelente para estudar os efeitos de vanádio na homeostasia do cálcio. Após o isolamento das VRS, foi necessário proceder à caracterização das mesmas no que diz respeito ao seu conteúdo proteico, ao grau de pureza da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase presente nas vesículas bem como a ensaios de funcionalidade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de modo a considerar as VRS aptas para os estudos pretendidos. Deste modo, de acordo com o procedimento experimental, neste capítulo são apresentados os resultados referentes à determinação do teor em proteína total presente nas VRS isoladas, seguindo-se uma análise relativa quanto ao grau de pureza e constituição das VRS, nomeadamente quanto à concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase por análise dos géis que foram obtidos por SDS-PAGE.

##### **4.1.1 Quantificação do teor em proteína presente nas vesículas do retículo sarcoplasmático de músculo-esquelético de coelho**

No decorrer do trabalho experimental foram utilizados três lotes de VRS provenientes de isolamentos efetuados segundo o método descrito na secção 3.3 do capítulo 3.

Em geral as VRS obtidas são constituídas por vesículas seladas com cerca de 100 nm, nas quais 80 % da proteína total é  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase orientada na sua forma nativa e fisiologicamente ativa (Martinosi e Pikula, 2003).

Após os isolamentos para obtenção da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase procedeu-se à quantificação do teor em proteína total das VRS pelo método de Bradford tendo-se obtido valores de proteína total entre 11,6 e 17,2 mg/mL.

##### **4.1.2 Análise do grau de pureza da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de VRS de coelho por Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

No que diz respeito à determinação do grau de pureza das amostras e à constituição das VRS de coelho ela foi realizada através da análise das VRS isoladas por SDS-PAGE, após tratamento das amostras de VRS bem como de amostras recolhidas ao longo do processo de isolamento.

As medições para os cálculos de  $R_f$  das bandas foram efetuadas após a descoloração dos géis. Pela análise dos géis de SDS-PAGE observou-se, em todas as amostras de VRS, a existência de uma banda significativa de massa molecular aparente correspondente a cerca de 105 a 115 kDa, sendo que os valores das massas molares das bandas foram determinadas por comparação da mobilidade dos marcadores em função do logaritmo da sua massa molecular e de acordo com a literatura (Meissner *et al.*, 1973; Inesi e Kirtley, 1992) pode-se inferir que esta banda corresponda ao monómero de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Belcastro *et al.*, 1993; Cuenda *et al.*, 1994; Cuenda *et al.*, 1995). Observou-se nas amostras de VRS isoladas a presença de outras bandas, o que permite afirmar que as VRS isoladas contêm além de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase outros constituintes proteicos.

Verificou-se a existência de uma banda em todos os poços com massa molecular obtida cerca de 205 kD, em comparação com o marcador, podemos dizer que corresponde à miosina (205 kDa). Nas amostras de VRS é visível uma banda, a cerca de 98 kDa, imediatamente por baixo da banda referente à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, esta pode ser correspondente à glicogénio fosforilase b (dímero), uma proteína que tem sido descrita na literatura como estando associada à membrana do RS (Cuenda *et al.*, 1991; Cuenda *et al.*, 1994; Cuenda *et al.*, 1995). Observaram-se ainda outras duas bandas a cerca de 60 e 48 kDa e que correspondem, de acordo o descrito na literatura a calsequestrina e glicoproteína M53/55 (Belcastro *et al.*, 1993).

A análise das densidades das bandas correspondentes às frações proteicas presentes nas amostras de VRS isoladas foram determinadas a partir do programa *Quantity One Version 4.2.1*, tendo-se obtido para a banda correspondente à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase valores da ordem de  $65 \pm 10\%$  do conteúdo proteico total das VRS isoladas. Relativamente às outras bandas que aparecem nas amostras de VRS e que correspondem às proteínas de massa molecular aparente de 205 kDa, 98 kDa, 68 kDa e 48 kDa obtiveram-se os seguintes valores de conteúdo proteico, respetivamente,  $15 \pm 5\%$ ,  $4 \pm 2\%$ ,  $6 \pm 3\%$  e  $10 \pm 6\%$ .

#### 4.1.3 Estudos de avaliação da atividade da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

No sentido de avaliarmos como é que a funcionalidade da bomba de cálcio se comporta quando sujeita à ação dos oxometalatos procedeu-se inicialmente à verificação da atividade da bomba de cálcio pelo método descrito na secção 3.4.3, tendo-se verificado que a atividade da bomba de cálcio quando está desacoplada ( $3,58 \pm 0,16 \text{ nmolATP} \cdot \text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ proteína}$ ) ou seja quando na presença do ionóforo é cerca de seis a sete vezes superior à atividade basal

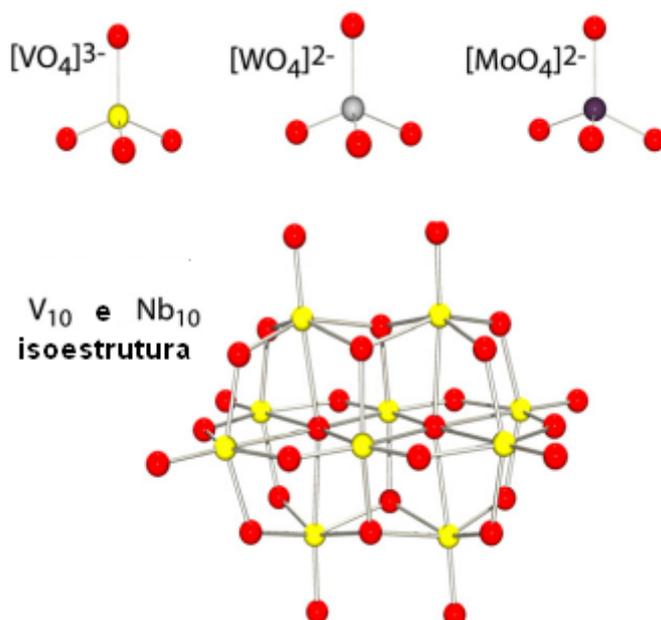
( $0,58 \pm 0,02$  nmolATP.min<sup>-1</sup>μg<sup>-1</sup>proteína) da mesma. Este aumento é semelhante ao observado em resultados anteriores em que se verificou uma atividade basal de  $60 \pm 10$  nmol H<sup>+</sup>/mg.min. e  $367 \pm 16$  nmol H<sup>+</sup>/mg.min. quando se mediu a atividade desacoplada na presença de 20 μM de lasalocida (Aureliano e Madeira, 1994a) e ligeiramente superior ao aumento 3-4 vezes da atividade medida em presença do ionóforo calcimicina (A23187) referida por Cuenda (Cuenda *et al.*, 1990). Deste modo as preparações de VRS que foram utilizadas nos estudos tinham a Ca<sup>2+</sup>-ATPase em condições de ser utilizadas nos estudos de atividade. Tal facto reflete que o isolamento decorreu de modo satisfatório, uma vez que no processo de isolamento alguns fatores, como a temperatura, alterações de pH ou oxidação da proteína que poderiam ter como consequência a desnaturação da proteína ao longo do processo de isolamento, além disso presença de proteínas contaminantes também poderiam contribuir para que a atividade do Ca<sup>2+</sup>-ATPase ficasse seriamente comprometida uma vez que sabe-se que a atividade enzimática da Ca<sup>2+</sup>-ATPase depende da estrutura química e da fluidez da membrana, qualquer alteração pode provocar a oligomerização da enzima o que será refletido numa redução do nível de ligação máximo do MgATP (Dalton *et al.*, 1998). Por outro lado, a glicogénio fosforilase b pode-se ligar reversivelmente às membranas do RS o que pode provocar uma perda significativa da atividade catalítica (Cuenda *et al.*, 1991; Cuenda *et al.*, 1995).

#### **4.2 Interações dos oxometalatos de vanádio (V), nióbio (Nb), molibdénio (Mo) e tungsténio (W) com a Ca<sup>2+</sup>-ATPase de RS.**

Embora a literatura sobre os efeitos biológicos de mono e polioxometalatos tenha vindo a aumentar rapidamente ao longo da maior parte última década, os mecanismos bioquímicos subjacentes os efeitos desses oxometalatos são ainda mal conhecidos. Contudo esta é, claramente, uma área em rápido desenvolvimento, devido a um interesse crescente no uso de complexos de metais biodisponíveis em bioquímica, biologia, biotecnologia, farmacologia e medicina.

Nos estudos que se apresentam, investigou-se os efeitos da interação da Ca<sup>2+</sup>-ATPase de retículo sarcoplasmático com cinco espécies iónicas de metais de transição conhecidas por terem efeitos biológicos. Assim, foram estudados efeitos de dois polioxometalatos semelhantes, decavanadato (V<sub>10</sub>) e decaniobato (Nb<sub>10</sub>), e três oxometalatos, vanadato (V<sub>1</sub>), tungstato (W<sub>1</sub>) e molibdato (Mo<sub>1</sub>) (Fig. 4.1) na função e na estrutura da Ca<sup>2+</sup>-ATPase de RS, a fim de revelar novas perspetivas sobre a interação metal-proteína e os efeitos na homeostase

do cálcio. Combinaram-se, estudos de cinética enzimática com estudos envolvendo espectroscopia de absorção atômica, espectroscopia de RMN, espectroscopia de RPE e espectroscopia de Raman, para análise do efeitos dos metais na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.



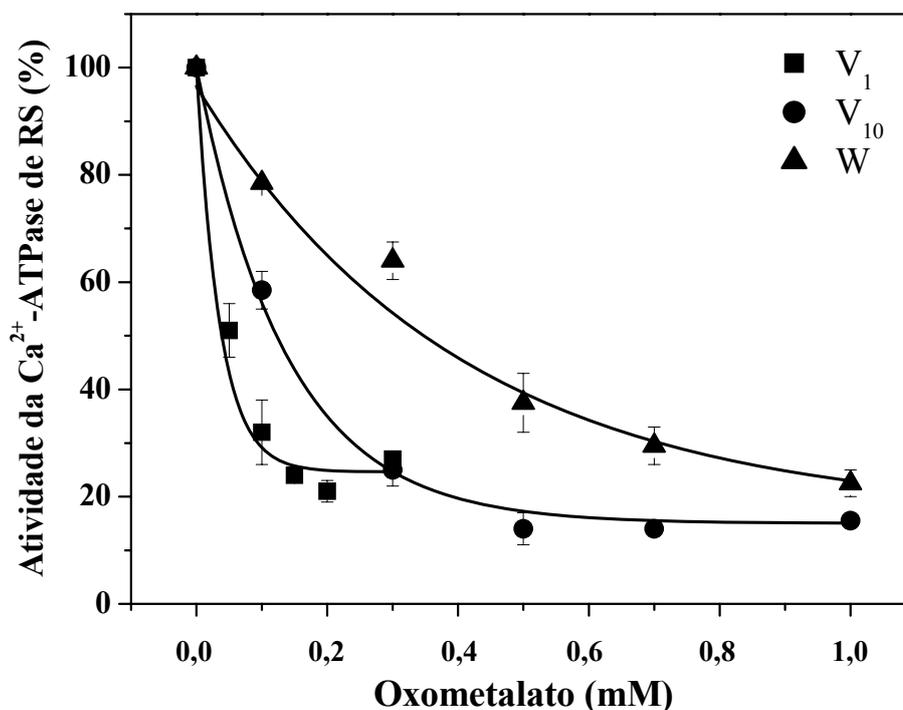
**Figura 4.1** - Estruturas de decavanadato, decaniobato e das espécies monoméricas de vanadato, tungstato e molibdato.

#### 4.2.1 Inibição da atividade da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase por oxometalatos de V, W e Mo e polioxometalatos de V e Nb

A avaliação da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em presença de oxometalatos permitiram verificar a magnitude dos efeitos inibitórios da atividade enzimática que ocorre quando sujeita a concentrações crescentes dos oxometalatos. Deste modo, avaliou-se relativamente ao controlo, ensaio sem a presença de oxometalatos, em que se considera a atividade em termos de 100 % de atividade, relativamente à atividade em presença de concentrações crescentes de oxometalatos de V, W e Mo e polioxometalatos de V e Nb. Pelas curvas de inibição podemos inferir os valores de  $\text{IC}_{50}$  de modo a comparar a magnitude dos efeitos dos diferentes oxometalatos.

A inibição da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, sobre a hidrólise do ATP, pelos oxometalatos é maior para ambas as espécies de vanádio relativamente ao tungstato e molibdato (Fig. 4.2 e Fig. 4.3). As concentrações de vanádio elementar necessárias para uma inibição de 50 % da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da espécie monomérica de vanádio ( $\text{V}_1$ ) e decamérica de vanádio foram determinadas com os valores de 0,05 mM (50  $\mu\text{M}$ ) e 0,150 mM (150  $\mu\text{M}$ ),

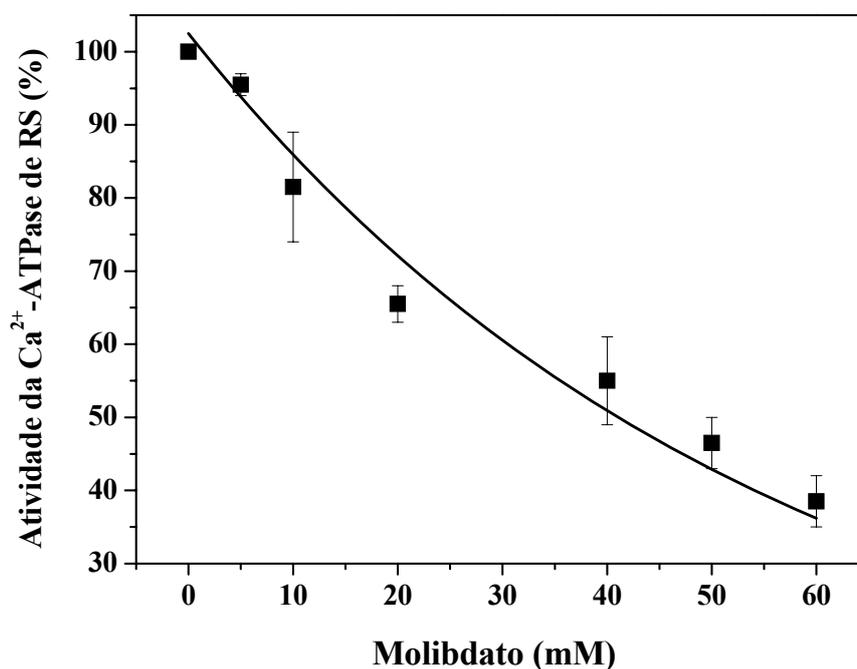
respetivamente. Contudo, deve-se salientar que, uma vez que a espécie  $V_{10}$  tem 10 átomos de vanádio e as concentrações das soluções são expressas em termos do seu conteúdo em vanádio total, as concentrações da espécie  $V_{10}$  usadas no ensaio são um décimo do conteúdo em vanádio monomérico ( $V_1$ ). Isto significa que o valor de 150  $\mu\text{M}$  obtidos em concentração elementar de vanádio (Fig. 4.2) corresponde a 15  $\mu\text{M}$  em  $V_{10}$  molecular.



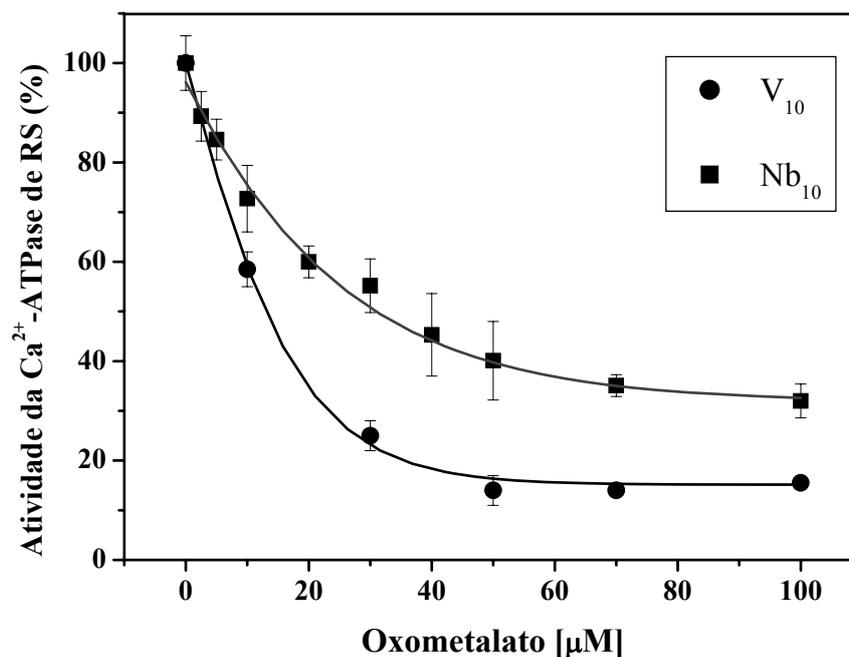
**Figura 4.2** - Efeitos do vanadato ( $V_1$ ) (■), decavanadato ( $V_{10}$ ) (●) e tungstato (W) (▲) na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (RS). Os ensaios foram realizados com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de vesículas de retículo sarcoplasmático contendo  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase incubadas num meio contendo 25 mM HEPES (pH 7,0), 100 mM KCl, 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 0,42 mM fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH e concentrações crescentes dos diferentes oxometalatos indicadas no eixo das abcissas. Após incubação adicionou-se desidrogenase de lactato 18 UI, cinase de piruvato 7,5 UI e ATP 2,5 mM. Após a adição do ATP iniciou-se a medição da reação e após 2 minutos adicionou-se 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de A23187 monitorizando-se a reação por mais 5 minutos. As curvas foram obtidas pelas médias correspondentes a seis experiências independentes relativas a seis concentrações diferentes de cada oxometalato. A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental.

Deste modo, o anião decavanadato ( $V_{10}$ ) revelou ser um inibidor da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mais potente do que o vanadato ( $V_1$ ), em concordância com o indicado em estudos prévios (Aureliano e Madeira, 1994a; Aureliano e Madeira, 1994b; Aureliano e Crans, 2009; Aureliano, 2009). Relativamente aos outros oxometalatos, verificou-se que o tungstato (Fig.

4.2) apresentou um  $IC_{50}$  de 0,4 mM (400  $\mu$ M) o que se traduz num valor oito vezes superior ao vanadato ( $V_1$ ). Relativamente ao molibdato, o valor obtido para o  $IC_{50}$  de 45 mM indica que este oxometalato é um inibidor muito pouco potente da atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase (Fig. 4.3). Em oposição ao molibdato foi verificado, num composto iso-estrutural de  $V_{10}$ , o decaniobato ( $Nb_{10}$ ) um valor de  $IC_{50}$  de 35  $\mu$ M que indica ser um potente inibidor da  $Ca^{2+}$ -ATPase. Relativamente ao  $V_{10}$ , o valor de  $IC_{50}$  do  $Nb_{10}$  é ligeiramente superior ao observado para o  $V_{10}$  (Fig. 4.4). No entanto, são valores que apesar de  $V_{10}$  ser o inibidor mais potente podemos considerar que o  $Nb_{10}$  tem uma potência de inibição similar ao  $V_{10}$ , embora as razões para esta diferença sejam analisadas numa das secções deste capítulo. Em resumo, os polioxometalatos estudados, decavanadato e decaniobato apresentam valores de  $IC_{50}$  inferiores aos oxometalatos monoméricos, apresentando uma potência inibitória da atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase superior aos oxometalatos monoméricos, nomeadamente tungstato e molibdato.



**Figura 4.3** - Efeito de molibdato na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (RS). A atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase foi calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental.

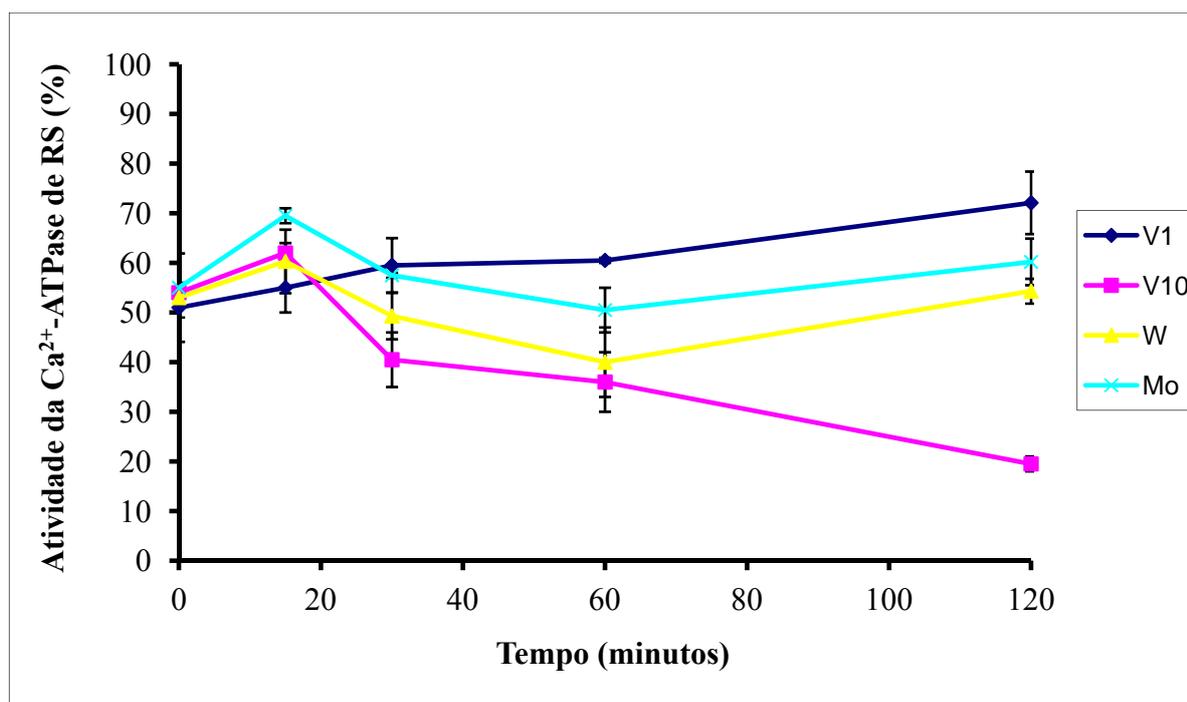


**Figura 4.4** - Efeitos de decavanadato ( $V_{10}$ ) (●) e decaniobato ( $Nb_{10}$ ) (■), na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (RS). A atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase foi calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental.

#### 4.2.2 Inibição da $Ca^{2+}$ -ATPase em função do tempo de incubação com os oxometalatos

Após a determinação do grau de inibição da hidrólise do ATP pela  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS pelos diferentes oxometalatos, analisou-se o efeito da incubação das soluções dos oxometalatos durante 15, 30, 60 e 120 minutos. Para cada composto, usou-se nos ensaios as concentrações dos  $IC_{50}$  previamente determinados. Após a incubação com a  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, mediu-se a atividade mantendo idênticas todas as condições experimentais usadas nos ensaios de atividade.

Verificou-se que o oxometalato que possui uma percentagem de inibição superior com a incubação é o decavanadato (Fig. 4.5). Sendo que apenas o  $V_{10}$  (150  $\mu$ M em concentração elemental que corresponde a 15  $\mu$ M em concentração molecular) tem um efeito de intensificar a inibição ao longo do tempo, a partir dos 15 minutos e atingindo um valor significativo com um máximo 50 % de diminuição da atividade relativamente à velocidade inicial após 120 minutos.

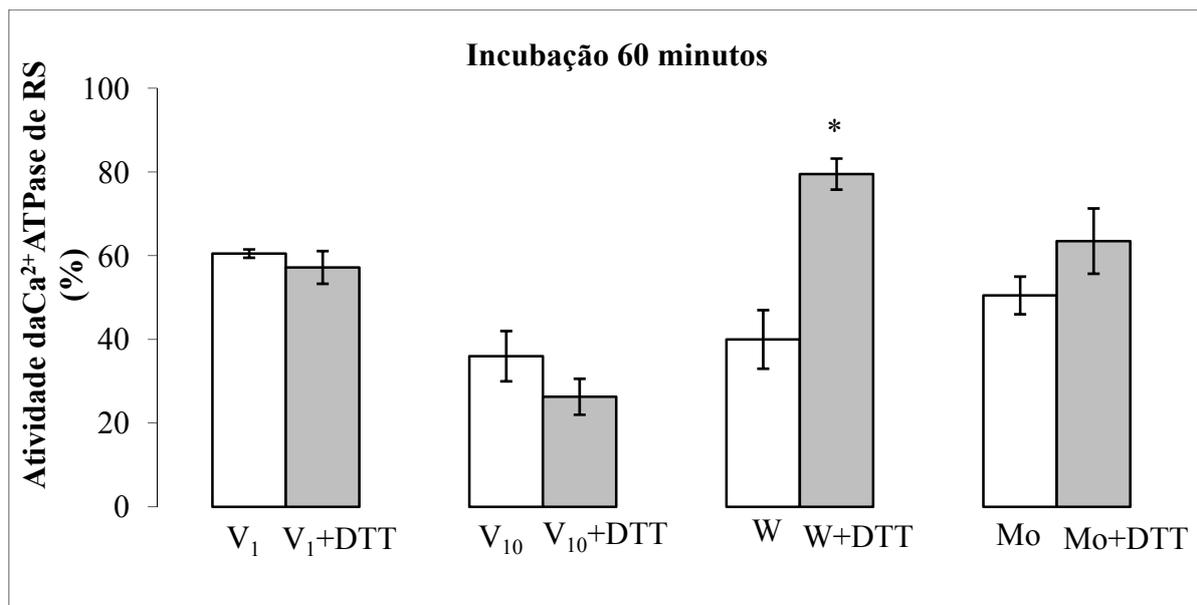


**Figura 4.5** - Atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em função do tempo de incubação com  $\text{V}_1$ ,  $\text{V}_{10}$ , W e Mo. A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi determinada e calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. As concentrações dos oxometalatos usadas nos ensaios foram as concentrações dos  $\text{IC}_{50}$  respectivos. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental.

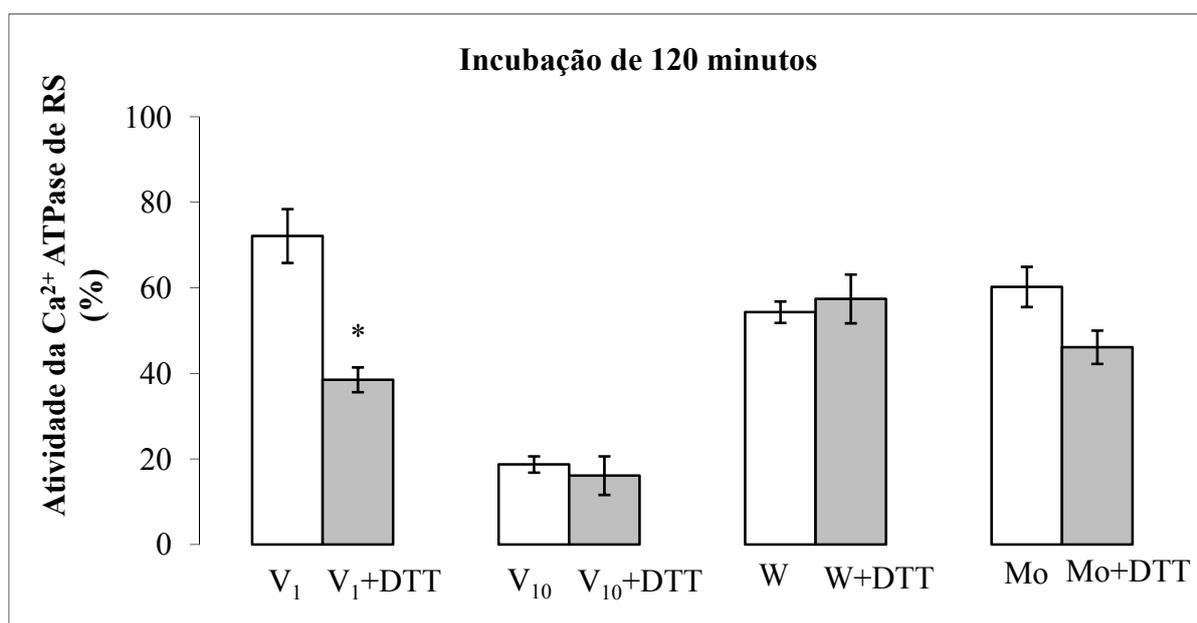
Por outro lado, observou-se que a incubação da bomba de cálcio com todos os oxometalatos provoca um estímulo na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase após 15 minutos (Fig. 4.5). Ao longo de duas horas, não se observou inibição por parte de  $\text{V}_1$ , sendo que os resultados obtidos denotam um aumento na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase com o aumento do tempo de incubação, para todos os oxometalatos, exceto para  $\text{V}_{10}$ .

Assim, tanto o molibdato como o tungstato e o vanadato revelam que após 120 minutos de incubação não aumentam a inibição verificada no tempo zero. Adicionalmente, foram realizados ensaios incubando os oxometalatos com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 60 e 120 minutos, na presença de um agente redutor de pontes dissulfeto (-S-S-), o ditioneitol (DTT, 1mM), referido também como sendo antioxidante (Fig. 4.6 e Fig. 4.7).

Verificou-se que o que o DTT não previne, nem reverte os efeitos inibitórios induzidos pelas espécies  $\text{V}_1$  e  $\text{V}_{10}$ , quer após 60 ou 120 minutos de incubação com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Esta observação sugere que o efeito inibitório não será devido a processos de oxidação-redução que possam ocorrer em resíduos de aminoácidos específicos da proteína ou que tal processo não pode ser revertido pelo DTT.



**Figura 4.6** - Efeitos comparativos dos oxometalatos na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, após 60 minutos de incubação sem e com DTT (1mM). A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi determinada e calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. As concentrações dos oxometalatos usadas nos ensaios foram as concentrações dos  $\text{IC}_{50}$  respetivos. Nos ensaios com DTT adicionou-se 1 mM antes de se proceder à incubação. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental. \*Significativamente diferente do controlo ( $p < 0,05$ ).



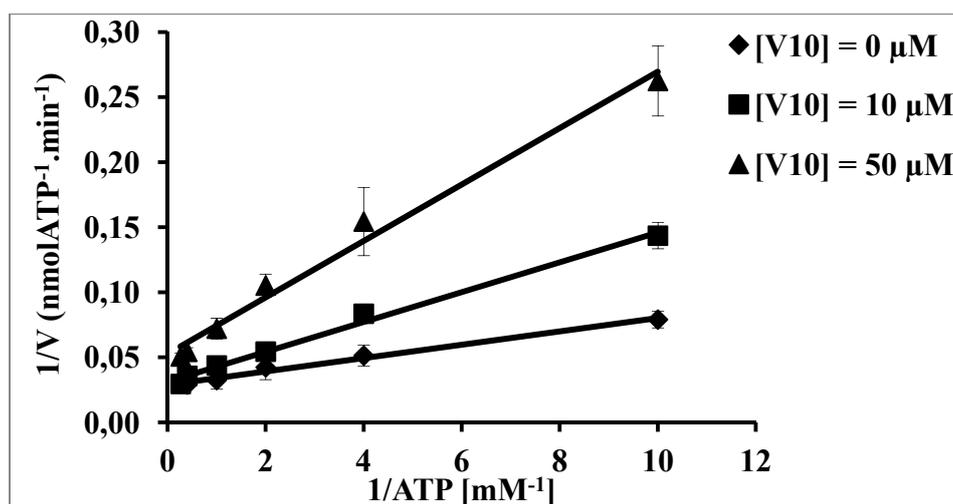
**Figura 4.7** Efeitos comparativos dos oxometalatos na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, após 120 minutos de incubação sem e com DTT (1mM). A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi determinada e calculada utilizando as equações 3.3 e 3.4. As concentrações dos oxometalatos usadas nos ensaios foram as concentrações dos  $\text{IC}_{50}$  respetivos. Nos ensaios com DTT adicionou-se 1 mM antes de se proceder à incubação. Os resultados experimentais representam a média  $\pm$  desvio padrão de um mínimo de três experiências com três diferentes preparações de VRS para cada condição experimental. \*Significativamente diferente do controlo ( $p < 0,05$ ).

Relativamente aos oxometalatos de tungsténio e molibdénio, verificou-se, a 60 minutos, uma reversão significativa da atividade para o tungsténio enquanto aos 120 minutos essa reversão já não é observada. Para o molibdato, verificou-se uma ligeira reversão a 60 minutos enquanto aos 120 minutos observou-se um aumento da inibição induzida pelo DTT. Aparentemente, a presença de um antioxidante como o DTT, não reverte a inibição promovida pelos oxometalatos, sugerindo que durante o processo não esteja envolvida a oxidação-redução. No entanto, o DTT pode reduzir o vanadato a vanadilo e contribuir para a inibição observada ao fim de 120 minutos, para o  $V_1$ .

#### 4.2.3 Tipo de inibição da $Ca^{2+}$ -ATPase por decavanadato, decaniobato e tungstato

Para elucidar o modo de interação dos oxometalatos com a  $Ca^{2+}$ -ATPase procedeu-se à análise do tipo de inibição de três oxometalatos na atividade da enzima, para tal determinou-se a atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase nas mesmas condições experimentais descritas na secção 3.4.3, na ausência de oxometalatos e utilizando duas concentrações de cada um ( $V_{10}$ ,  $Nb_{10}$  e  $W$ ), em presença de concentrações crescentes do substrato ATP.

Verificou-se que a inibição da atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase pelo decavanadato é competitiva para as concentrações mais baixas (10  $\mu\text{M}$ ), em que se observam valores de  $V_{\text{máx}}$  semelhantes e um valor de  $K_M$  superior ao do controlo. No entanto para concentrações mais elevadas de decavanadato (50  $\mu\text{M}$ ), em que se verifica uma diminuição de  $V_{\text{máx}}$  e aumento de  $K_M$  relativamente ao controlo, a inibição é não competitiva (Fig. 4.8) (Tabela 4.1).

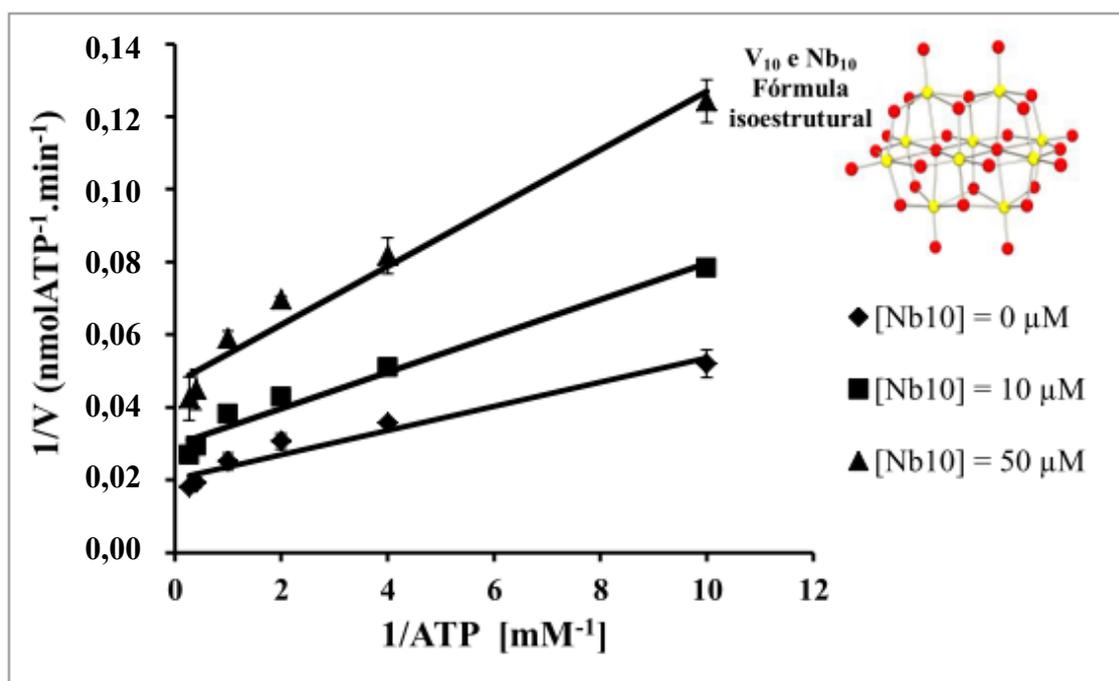


**Figura 4.8** - Representação de Lineweaver-Burk da inibição da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS pelo decavanadato ( $V_{10}$ ). A atividade da  $Ca^{2+}$ -ATP foi determinada e calculada de acordo com a equação 3.3. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental.

**Tabela 4.1** - Valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  na ausência ou na presença de 10 e 50  $\mu\text{M}$  de  $V_{10}$ .

$[V_{10}]$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_M$ [mM]	$V_{m\acute{a}x}$ (nmolATP.min <sup>-1</sup> )
0	0,176±0,007	34,6±4,2
10	0,507±0,012	32,5±4,8
50	0,330±0,009	19,1±3,7

Relativamente ao decaniobato, verificou-se que o  $Nb_{10}$  é um inibidor não competitivo da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase relativamente ao ATP (Fig. 4.9). O valor de  $K_M$  obtido é aproximadamente o mesmo do controlo (0,163 mM) para as curvas de inibição com 10 e 50  $\mu\text{M}$   $Nb_{10}$  com valores de  $K_M$  de 0,168 e 0,171 mM respetivamente, enquanto os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  diminuem relativamente ao controlo (49,0 nmolATP.min<sup>-1</sup>). Para as curvas de inibição com 10 e 50  $\mu\text{M}$  de  $Nb_{10}$  os valores obtidos de  $V_{m\acute{a}x}$ , são respetivamente 33,7 e 21,4 nmolATP.min<sup>-1</sup> (Fig. 4.9) (Tabela 4.2).



**Figura 4.9** - Representação de Lineweaver-Burk da inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS pelo decaniobato ( $Nb_{10}$ ). A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP foi determinada e calculada de acordo com a equação 3.3. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultaram da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental.

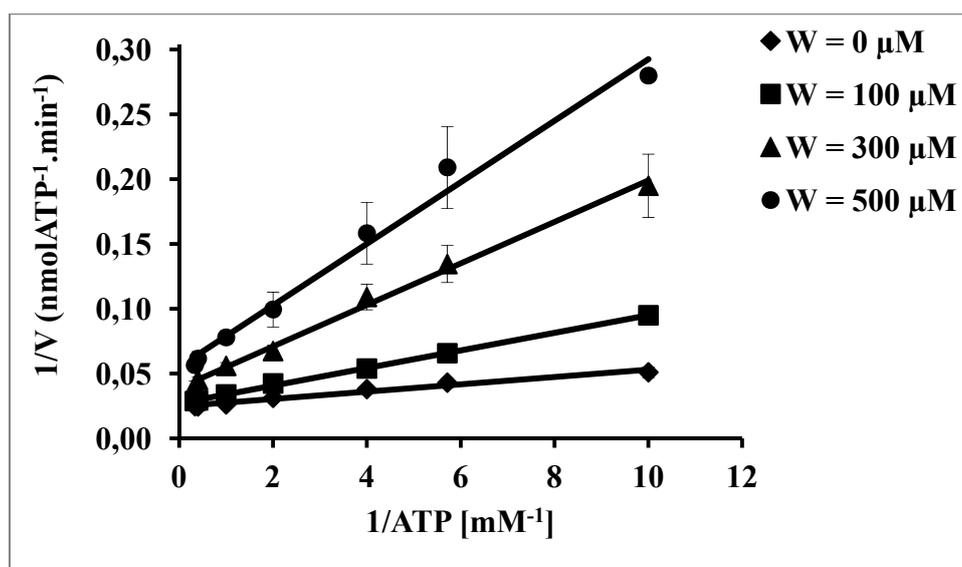
Enquanto que o decaniobato é estável em solução, o decavanadato não o é. Assim, a presença da espécie de vanadato monomérica pode ser responsável pelos processos de inibição competitiva que se observa para concentrações mais baixas de decavanadato (10  $\mu\text{M}$ ). Dado

que ambos os decametallatos são iso-estruturais e iso-eletrônicos ( $\text{Nb}_{10}$ ) e ( $\text{V}_{10}$ ), sugere-se que o decavanadato, tal como o decaniobato, interatue com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e inibe de modo não competitivo a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS relativamente ao seu substrato natural, o ATP.

**Tabela 4.2** - Valores de  $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$  na ausência ou na presença de 10 e 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Nb}_{10}$ .

$[\text{Nb}_{10}]$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_M$ [mM]	$V_{\text{máx}}$ ( $\text{nmolATP}\cdot\text{min}^{-1}$ )
0	$0,163\pm 0,006$	$49,0\pm 5,1$
10	$0,168\pm 0,008$	$33,7\pm 3,9$
50	$0,171\pm 0,011$	$21,4\pm 3,1$

A formação de monómeros de vanádio (V) nas condições experimentais de análise, será a espécie responsável pela interação competitiva, esta situação é similar ao que é observado pela ação do tungstato (Fig. 4.10) (Tabela 4.3).



**Figura 4.10** - Representação de Lineweaver-Burk da inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS pelo tungstato. A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP foi determinada e calculada de acordo com a equação 3.3. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental.

Neste caso, também se verifica uma inibição competitiva a 100  $\mu\text{M}$  de tungstato, enquanto para as outras concentrações de tungstato a inibição é não competitiva. Sabe-se que a forma predominante é o tungstato monomérico quando as concentrações são inferiores a 50  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 4.3** - Valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  na aus\encn\u00eancia ou na presen\u00e7a de 100, 300 e 500  $\mu\text{M}$  de tungstato.

[W] ( $\mu\text{M}$ )	$K_M$ [mM]	$V_{m\acute{a}x}$ (nmolATP.min <sup>-1</sup> )
0	0,114 $\pm$ 0,008	40,3 $\pm$ 4,3
100	0,251 $\pm$ 0,011	36,9 $\pm$ 4,8
300	0,412 $\pm$ 0,014	25,8 $\pm$ 3,7
500	0,429 $\pm$ 0,009	17,7 $\pm$ 2,8

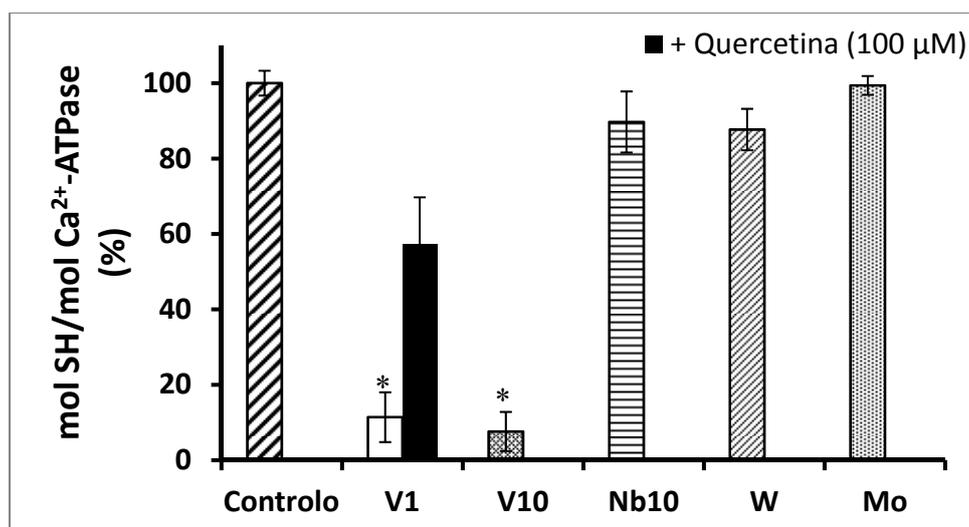
Contudo, podem formar-se polioxotungstatos para concentra\u00e7\u00f5es superiores, que se pensam ocorrerem para concentra\u00e7\u00f5es de 300 e 500  $\mu\text{M}$ . O tungstato, tal como se verificou tem uma menor capacidade de inibi\u00e7\u00e3o do que decavanadato e do que o vanadato para a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS ( $\text{IC}_{50} = 400 \mu\text{M}$  para  $W$ ,  $\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{M}$  para  $V_1$  e  $\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$  para  $V_{10}$ ), embora tenha maior poder inibit\u00f3rio do que o descrito para a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase de ( $\text{IC}_{50} = 1,5 \text{ mM}$  para  $W_1$ ) (Colovi\u00e7 *et al.*, 2011).

Para esta enzima, verificou-se que polioxotungstatos ( $W_{12}$ ) apresentam uma maior capacidade de inibi\u00e7\u00e3o, com  $\text{IC}_{50}$  inferior a 15  $\mu\text{M}$  (Colovi\u00e7 *et al.*, 2011), o valor encontrado para o  $V_{10}$ . Assim, para concentra\u00e7\u00f5es de 300 e 500  $\mu\text{M}$  podem ocorrer em solu\u00e7\u00e3o di e tetratungstatos tal como acontece com os vanadatos. Provavelmente estas esp\u00e9cies interatuam com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de modo diferente da esp\u00e9cie monom\u00e9rica, tal como acontece com a intera\u00e7\u00e3o de  $V_2$  e  $V_4$  com as enzimas comparativamente a  $V_1$ .

#### 4.2.4 Estudos de oxida\u00e7\u00e3o de ciste\u00ednas e efeitos de agentes antioxidantes na revers\u00e3o da oxida\u00e7\u00e3o e na inibi\u00e7\u00e3o da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase induzida pelos oxometalatos

##### 4.2.4.1 Oxida\u00e7\u00e3o de ciste\u00ednas por oxometalatos e revers\u00e3o por antioxidantes

A inibi\u00e7\u00e3o da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mediada por decavanadato pode envolver a oxida\u00e7\u00e3o das unidades de ciste\u00edna na prote\u00edna, localizadas junto do local ativo da enzima, e conseq\u00fcentemente afetar a atividade da enzima (Viner *et al.*, 1999). Nesse sentido, verificou-se que os oxometalatos vanadato e decavanadato induzem a oxida\u00e7\u00e3o das ciste\u00ednas acess\u00edveis da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS, enquanto que n\u00e3o se observou qualquer oxida\u00e7\u00e3o de ciste\u00ednas na presen\u00e7a de oxometalatos de Nb, W e Mo (Fig. 4.11).

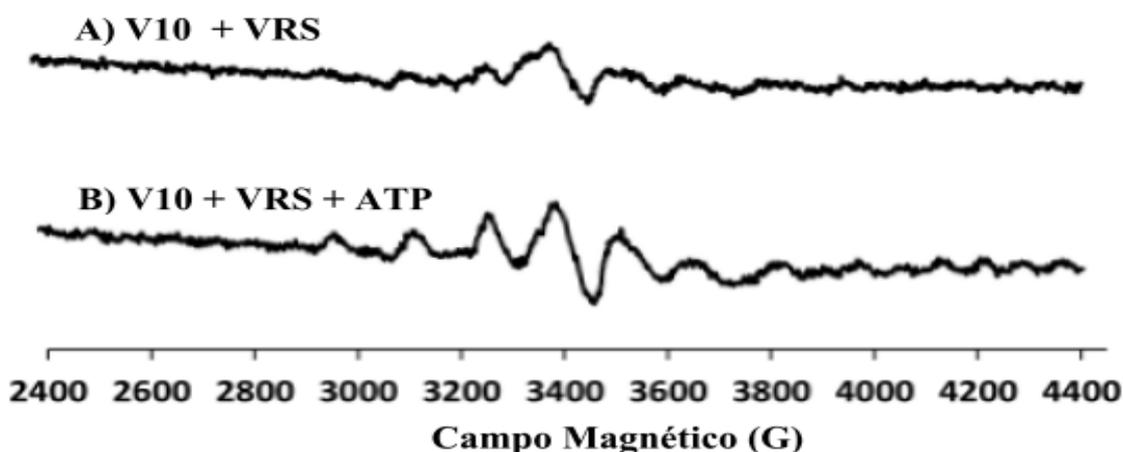


**Figura 4.11** – Determinação do conteúdo em cisteínas reduzidas na Ca<sup>2+</sup>-ATPase de RS após incubação com oxometalatos. Os grupos tiol acessíveis foram medidos, na ausência de agentes desnaturantes, como indicado na secção 3.6. Os dados são representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Os resultados apresentados são a média de ensaios em triplicado. A titulação do conteúdo em cisteína foi realizada em HEPES (pH 7,0), 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 55 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,2), após 5 minutos de incubação de 0,2mL Ca<sup>2+</sup>-ATPase de RS (1 mg/mL) com vanadato (1mM), decavanadato (0,3 mM), decaniobato (0,035 mM), tungstato (8 mM) ou molibdato (45 mM), na ausência ou na presença dos seguintes antioxidantes: glutathiona reduzida (GSH) (1 mM), a quercetina (100µM) ou canferol (100 µM). O aumento da absorvência, a 412 nm, foi continuamente registado durante 5 min; até um valor de equilíbrio foi atingido. \*Significativamente diferente do controlo (p<0,05).

Verificou-se ainda que a adição de antioxidantes, como a quercetina (100 µM), reverte parcialmente a oxidação das cisteínas induzida pelo vanadato (V<sub>1</sub>) em presença de quercetina (Fig. 4.11). Com outros antioxidantes, tais como GSH (1 mM), não foi possível avaliar o efeito, devido a interferências, no método, uma vez que o GSH reage com o DTNB e liberta TNB pelo que se observa um aumento contínuo de absorvência para o comprimento de onda da medição. Também por interferência com o método de medição do conteúdo em cisteínas, a reversão pelos antioxidantes da oxidação das cisteínas induzida pelo decavanadato não pôde ser determinada. Aparentemente, o decavanadato que absorve a 412 nm, também reage com os antioxidantes, quercetina e canferol, ou forma complexos com estes e nas condições de medição os valores de absorvência são superiores a duas unidades o que impossibilita uma medição em condições de linearidade. No entanto, é provável que se pudesse observar reversão da oxidação das cisteínas pelo V<sub>10</sub> como observado pelo V<sub>1</sub>. Em resumo, a interação de vanadatos com a Ca<sup>2+</sup>-ATPase induz a oxidação de cisteínas sugerindo um processo que envolve a redução de vanadato.

#### 4.2.4.2 Análise da redução de decavanadato por espectroscopia de RPE

Os resultados da determinação do teor em cisteínas reduzidas revelaram que os oxometalatos de vanádio oxidam as cisteínas da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Este processo levaria à redução de vanadato(V) a vanadilo(IV), que é uma espécie em que se deteta sinal em RPE. De facto, após incubação de decavanadato com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, detetou-se o sinal característico do vanadilo(IV), somente quando se incubou decavanadato com  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. (Fig. 4.12).

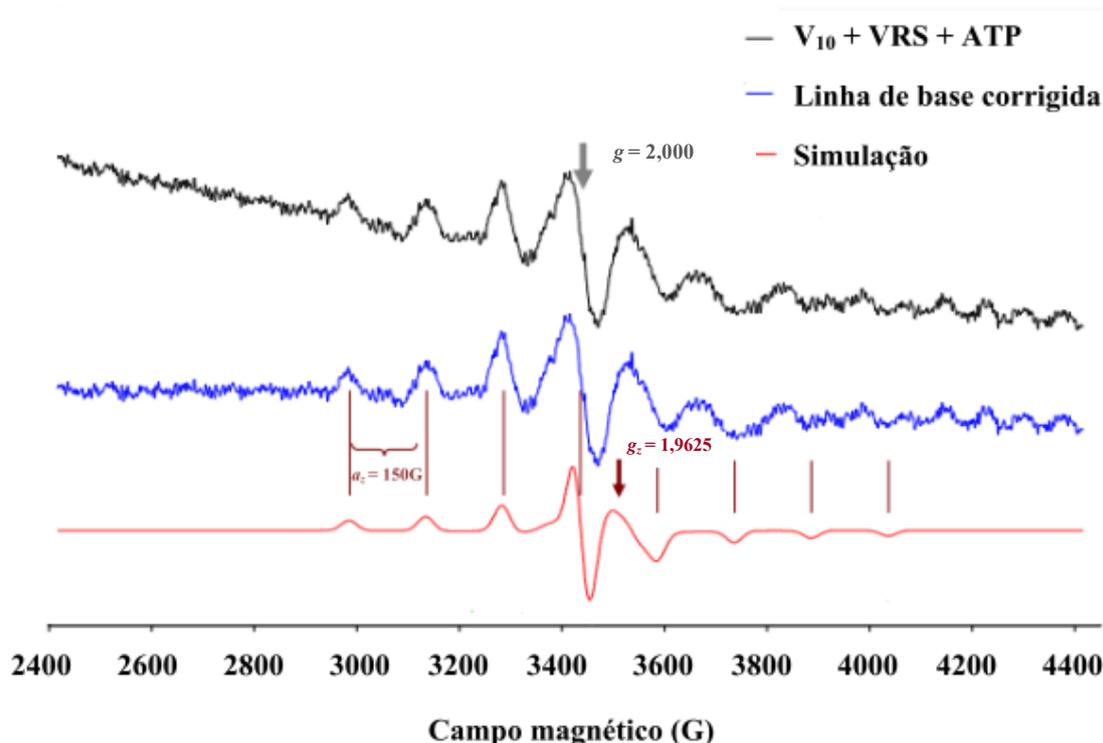


**Figura 4.12** - Espectros de RPE da banda X, obtidos a 9624 GHz e a uma temperatura de 77K, de soluções contendo 5 mM decavanadato (vanádio total) em 25 mM HEPES (pH 7,0), 100mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, na ausência (A) e na presença 2,5 mM ATP (B). Os espectros foram adquiridos como descrito na secção 3.9.1. Após a adição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase são observados os sinais típicos do vanádio(IV).

Este resultado sugere, que aquando da oxidação da cisteína na proteína em presença de decavanadato forma-se a espécie vanadilo resultante da redução de vanadato pela cisteína. Este processo pode explicar a diferença da potência de inibição entre decaniobato e decavanadato apesar de serem isoestruturais o  $\text{Nb}_{10}$  não sofre facilmente reação de oxidação-redução. De facto, enquanto que o potencial normal de redução do  $\text{VO}_2^+$  para o  $\text{VO}^{2+}$  é 1,0 V sob condições ácidas, o nióbio(V) não é conhecido como ser facilmente reduzido (Ohlin *et al.*, 2008; Ohlin *et al.*, 2009a). Esta diferença na atividade redox significa que enquanto o vanadato pode reduzir cisteína ( $E_0 \sim -0,15$  V), valores relativos ao potencial do eletrodo padrão de hidrogénio a pH 7,0, o niobato não reduz pois é uma espécie muito estável.

A partir do espectro, obtido da amostra contendo  $\text{V}_{10}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e ATP (Fig. 4.13, linha preta), foi possível determinar os parâmetros dos sinais de RPE do átomo de V(IV), tendo-se feito a correção da linha de base (Fig. 4.13, linha azul). Neste espectro, os valores de  $g_z$  (paralelo) e  $a_z$  (paralelo) podem ser determinados facilmente, obtendo-se por simulação

(Fig. 4.13, linha vermelha) os valores  $g_z = 1,9625$  e  $a_z = 150\text{G}$ . A posição de  $g_z$  e dos 8 desdobramentos desta linha estão indicados a castanho (Fig. 4.13). Porém, os valores de  $g_{x,y}$  (perpendicular) e  $a_{x,y}$  não puderam ser identificados.



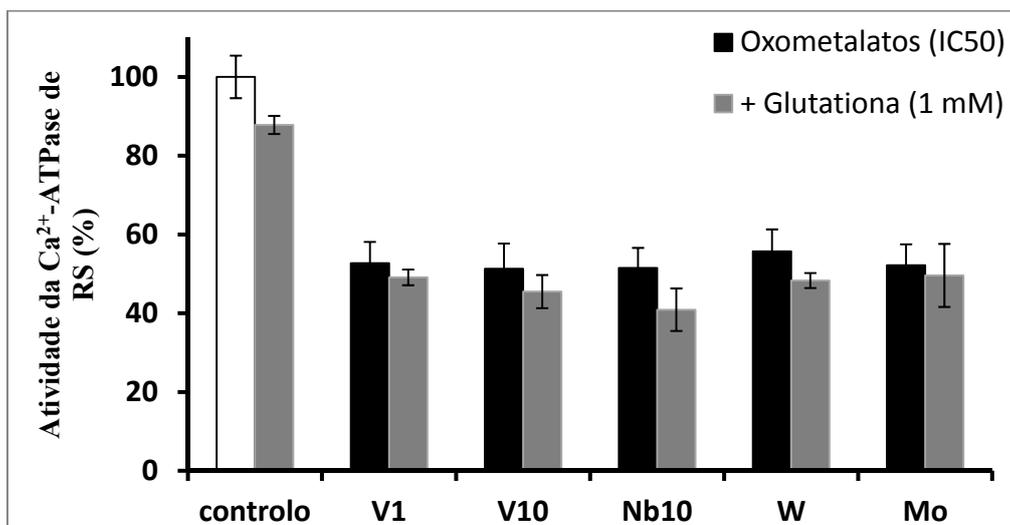
**Figura 4.13** – Espectro de RPE experimental da amostra contendo  $V_{10}$ ,  $Ca^{2+}$ -ATPase e ATP (linha preta), espectro experimental corrigido (linha azul) e simulação possível do espectro experimental (linha vermelha).

#### 4.2.4.3 Efeito de agentes antioxidantes na reversão da inibição da $Ca^{2+}$ -ATPase induzida pelos oxometalatos

Verificou-se anteriormente que os oxometalatos da vanádio  $V_1$  e  $V_{10}$  têm um efeito na diminuição do teor em cisteínas reduzidas na  $Ca^{2+}$ -ATPase, o que pode ter influência na sua atividade. No sentido de observar se esse efeito pode ser revertido por antioxidantes, estudou-se a ação de três antioxidantes no sentido de verificar se poderiam reverter a inibição induzida pelos oxometalatos na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase. Assim realizaram-se estudos com um conhecido antioxidante intracelular a glutathiona reduzida (GSH) que se sabe poder reduzir o vanádio(V) a vanádio(IV) e com dois antioxidantes naturais, a quercetina e o canferol.

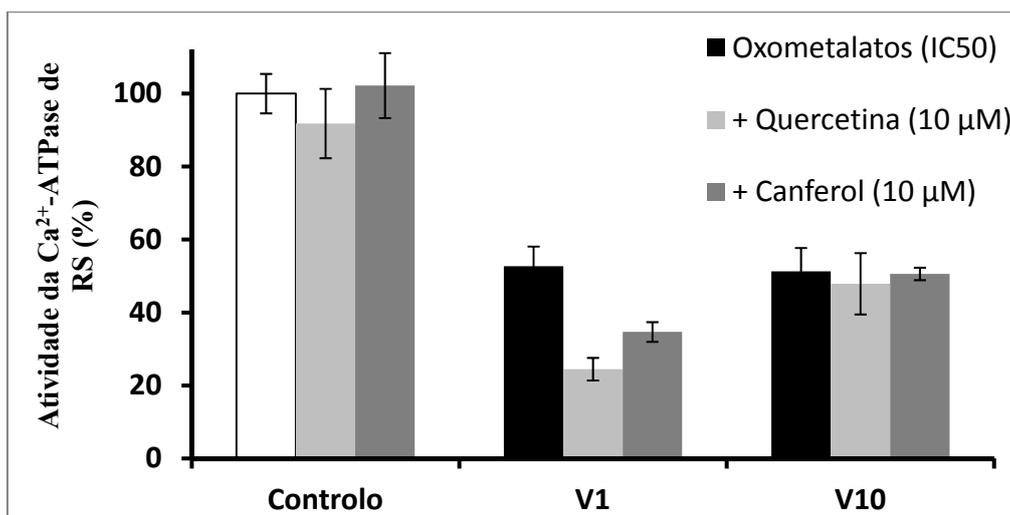
Relativamente à glutathiona (GSH), ela foi adicionada ao meio mesmo antes da adição dos oxometalatos. Muito embora se tenha observado que as soluções das espécies de vanádio ( $V_1$  e  $V_{10}$ ) induzem a oxidação de cisteínas, a GSH não revelou ser capaz de poder prevenir ou reverter a inibição da atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase uma vez que não se encontraram diferenças

significativas nos entre os valores de atividade aos valores de  $IC_{50}$  dos oxometalatos com ou sem GSH (Fig. 4.14), para os oxometalatos estudados.



**Figura 4.14** - Efeito da glutaciona reduzida (GSH) na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, em presença de concentrações de  $IC_{50}$  dos oxometalatos. A atividade foi medida como indicado na secção 3.4.3 e calculada de acordo com as equações 3.3 e 3.4. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão, de ensaios em triplicado.

Os ensaios de atividade utilizando outros antioxidantes como a quercetina e o canferol, antioxidantes presentes no vinho e nas maçãs, respetivamente, não se mostraram eficazes na reversão da atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase, o que pode sugerir que os efeitos inibitórios não são uma consequência da oxidação da cisteína, ou que a oxidação da cisteína específica não contribui de forma significativa para a modulação da atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase (Fig. 4.15).



**Figura 4.15** - Efeito dos antioxidantes quercetina e canferol na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, em presença de concentrações de  $IC_{50}$  dos oxometalatos de vanádio  $V_1$  e  $V_{10}$ . A atividade foi medida como indicado na secção 3.4.3 e calculada de acordo com as equações 3.3 e 3.4. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão, de ensaios em triplicado.

#### 4.2.5 Estudos da interação de vanadato e decavanadato com a $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS por espectroscopia de absorção atômica

Entre os oxometalatos estudados, os oxometalatos de vanádio apresentaram a capacidade de induzir oxidação de cisteínas, o que os diferencia dos outros oxometalatos, além do decavanadato ser o inibidor mais potente da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Neste trabalho, analisou-se a primeira, a interação do vanadato ( $\text{V}_1$ ) e decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS, por espectroscopia de absorção atômica.

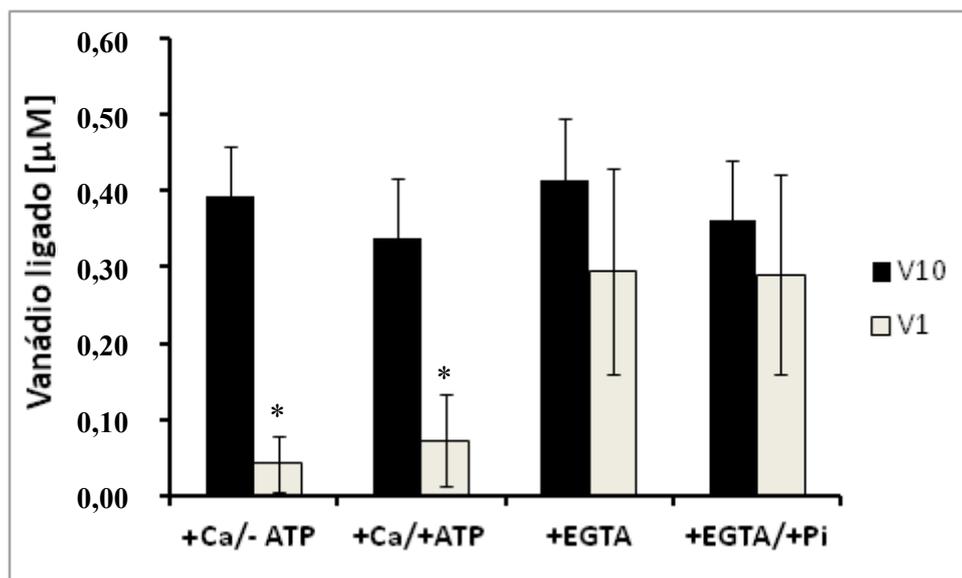
##### 4.2.5.1 Interação de vanadato e decavanadato com a $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS nas suas diferentes conformações por EAA

Os primeiros ensaios realizados para avaliar a interação passaram por incubar soluções contendo a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em meios que induziam as conformações E1, E1P, E2 e E2P com as espécies de vanádio  $\text{V}_1$  e  $\text{V}_{10}$ .

Quando se incubaram resultados quantidades equimolares ( $1 \mu\text{M}$ ) de proteína com  $\text{V}_1$  e  $\text{V}_{10}$ , na proporção 1:1 metal:proteína, verificou-se que no meio quando a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase se encontra induzida na conformação E1, cerca de 39 % do total de vanádio encontrou-se na forma ligada quando se utilizou soluções contendo  $\text{V}_{10}$ . Quando a incubação foi realizada com  $\text{V}_1$ , apenas cerca de 4% do vanádio total encontrou-se de forma ligada (Fig. 4.16).

A pequena quantidade de  $\text{V}_1$  que se liga à conformação E1 ou E1P está de acordo com o já referenciado anteriormente, uma vez que o vanadato liga-se preferencialmente à conformação E2 relativamente à conformação E1 (Dupont e Bennet, 1982; Aureliano e Madeira, 1994a). Esta afirmação pode ser confirmada (Fig 4.16), quando se incubou  $\text{V}_1$  com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, num meio contendo um agente quelante tal como o ácido etilenoglicoltetracético (EGTA), situação em que a conformação E2 é induzida. Neste caso, a quantidade de  $\text{V}_1$  ligada aumenta cerca de 6-7 vezes relativamente ao que se observa quando a proteína foi induzida para a sua conformação E1. Quando a proteína foi induzida numa conformação E2 a quantidade de  $\text{V}_1$  ligado acerca-se a valores da ordem dos 30 % relativamente à quantidade total de  $\text{V}_1$  presente no ensaio (Fig. 4.16).

Este aumento de ligação do  $\text{V}_1$  não é revertido pela presença de fosfato, uma vez que quando se induziu a conformação E2P a quantidade de  $\text{V}_1$  ligado determinado nas condições experimentais que induzem a conformação E2P é semelhante ao determinado quando se induziu a conformação E2.



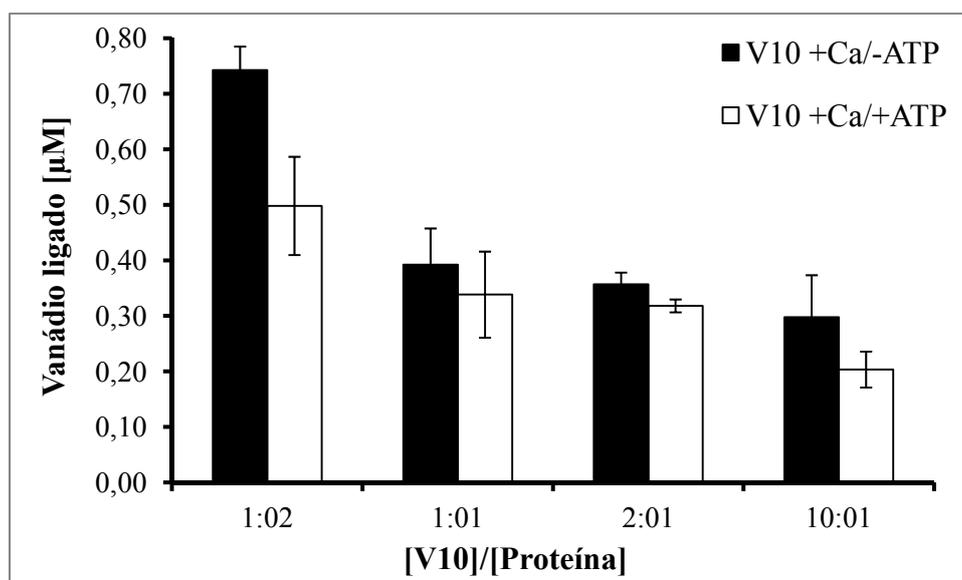
**Figura 4.16** - Análise das espécies de vanádio  $V_1$  e  $V_{10}$  ligadas nas diferentes conformações da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS por espectroscopia de absorção atômica (EAA). Amostras contendo Vanadato ( $V_1$ ) ou decavanadato ( $V_{10}$ ) com a concentração de  $1 \mu M$  para ambas as espécies de vanádio e igual concentração de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS ( $1 \mu M$ ), num meio contendo: KCl  $0,1 M$ , HEPES  $25 mM$  pH  $7,0$  e  $MgCl_2$   $5 mM$  e a)  $CaCl_2$   $50 \mu M$  (+Ca/-ATP); b)  $CaCl_2$   $50 \mu M$  e ATP  $2,5 mM$  (+Ca/+ATP); c) EGTA  $0,5 mM$  (+EGTA); d) EGTA  $50 mM$  e fosfato  $5 mM$  (+EGTA/+Pi), foram centrifugadas de acordo com o descrito na secção 3.7.7 e os sobrenadantes foram analisados no seu conteúdo em vanádio. Amostras controle de  $V_1$  e  $V_{10}$  com a mesma concentração,  $1 \mu M$ , na ausência de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS foram tratadas nas mesmas condições e nos diferentes meios. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental. \*Significativamente diferente do controle ( $p < 0,05$ ).

Ao contrário da interação do vanadato com a  $Ca^{2+}$ -ATPase, a interação de  $V_{10}$  aparentemente não é afetada pelas diferentes conformações da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, uma vez que não se observam diferenças significativas entre as quantidades de  $V_{10}$  ligado em qualquer das conformações (Fig. 4.16). Estes resultados estão de acordo com os observados em estudos de interação por espectroscopia de RMN (Aureliano e Madeira, 1994a).

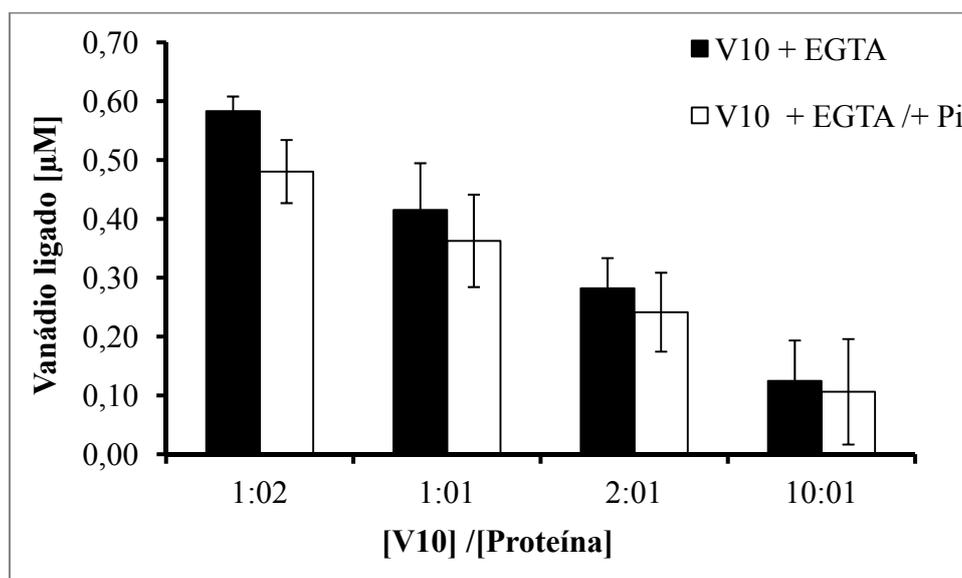
Na presença de cálcio ( $50 \mu M$ ) e ATP ( $2,5 mM$ ), ou seja quando a conformação E1P foi induzida observou-se uma pequena diminuição da quantidade de  $V_{10}$  ligado, de 39 para 33%, enquanto a quantidade de  $V_1$  ligado apresentou um ligeiro aumento de 4 para 7%. Este efeito oposto ao do ATP na interação de ambas as espécies  $V_{10}$  e  $V_1$  já havia sido descrito na interação com a  $Ca^{2+}$ -ATPase (Aureliano e Madeira, 1994b) ou na interação com actina ou

miosina (Tiago *et al.*, 2004a; Ramos *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2012). Muito embora se tenha observado esta tendência, as diferenças não são significativas para a ligação de cada oxometalato nas conformações E1 e E1P. As diferenças são consideradas significativas ( $p < 0,05$ ) se considerarmos a interação de  $V_{10}$  e  $V_1$  quer seja na ligação à conformação E1 ou E1P. Assim,  $V_{10}$  liga-se a qualquer conformação da enzima enquanto  $V_1$  apenas liga nas conformações E2 e E2P.

Verificou-se ainda que não existem diferenças significativas para a ligação do  $V_{10}$  à  $Ca^{2+}$ -ATPase nas conformações E1 e E1P em várias proporções metal:proteína (Fig. 4.17), o mesmo acontecendo para as conformações E2 e E2P, relativamente ao  $V_{10}$ . Contudo, parece haver uma tendência para uma ligeira menor ligação para as conformações fosforiladas, E1P e E2P (Fig. 4.18).



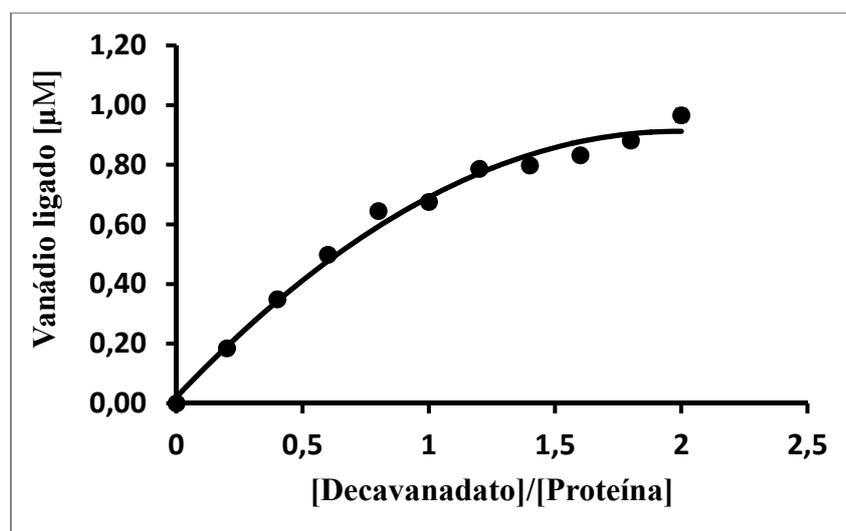
**Figura 4.17** - Análise da ligação  $V_{10}$ - $Ca^{2+}$ -ATPase de RS nas conformações E1 e E1P, após incubação com proporções metal proteína (1:2; 1:1; 2:1;10:1) em  $\mu$ M, por EAA num meio contendo: KCl 0,1 M, HEPES 25 mM pH 7,0 e  $MgCl_2$  5 mM e a)  $CaCl_2$  50  $\mu$ M (+Ca/-ATP); b)  $CaCl_2$  50  $\mu$ M e ATP 2,5 mM (+Ca/+ATP). As amostras foram centrifugadas de acordo com o descrito na secção 3.7.7 e os sobrenadantes foram analisados no seu conteúdo em vanádio. Amostras controlo de  $V_{10}$  com a mesma concentração, 1  $\mu$ M, na ausência de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS foram tratadas nas mesmas condições e nos diferentes meios. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental.



**Figura 4.18** - Análise da ligação  $V_{10}$ - $Ca^{2+}$ -ATPase de RS nas conformações E2 e E2P, após incubação com proporções metal:proteína (1:2; 1:1; 2:1;10:1) em  $\mu\text{M}$ , por EAA num meio contendo: a) KCl 0,1 M, HEPES 25 mM pH 7,0,  $MgCl_2$  5 mM e EGTA 0,5 mM (+EGTA); b) EGTA 50 mM e fósforo 5 mM (+EGTA/+Pi). As amostras foram centrifugadas de acordo com o descrito na secção 3.7.7 e os sobrenadantes foram analisados no seu conteúdo em vanádio. Amostras controlo de  $V_{10}$  com a mesma concentração, 1  $\mu\text{M}$ , na ausência de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS foram tratadas nas mesmas condições e nos diferentes meios. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental.

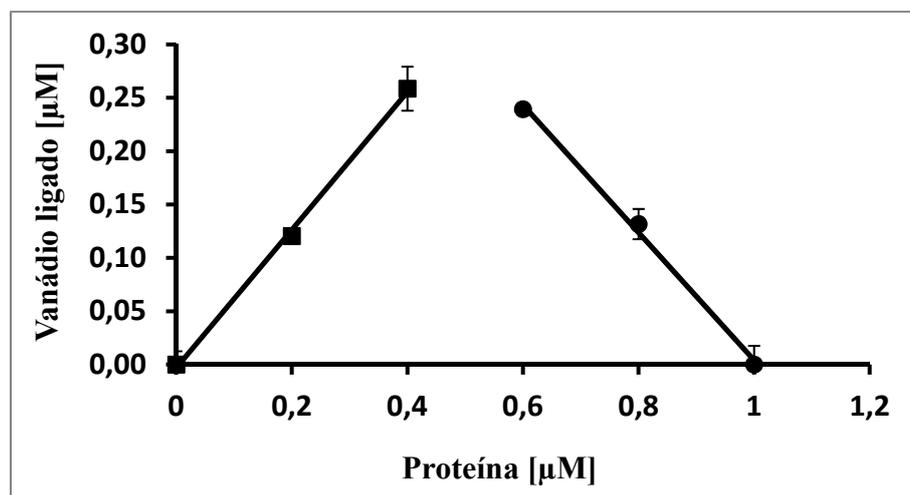
#### 4.2.5.2 Determinação da estequiometria de ligação $V_{10}$ - $Ca^{2+}$ -ATPase de RS e da constante de dissociação ( $K_d$ ) por EAA

Nas condições experimentais correspondentes à conformação E1, determinou-se a estequiometria de ligação  $V_{10}$ - $Ca^{2+}$ -ATPase. Usando o método de Job modificado, verificou-se que a quantidade de  $V_{10}$  ligado aumenta linearmente com a razão  $V_{10}$ /proteína até aproximadamente à razão 1:1, obtendo-se a saturação, a valores de vanádio ligado equimoleculares com a quantidade de proteína, o que indica uma estequiometria 1:1 (Fig. 4.19).



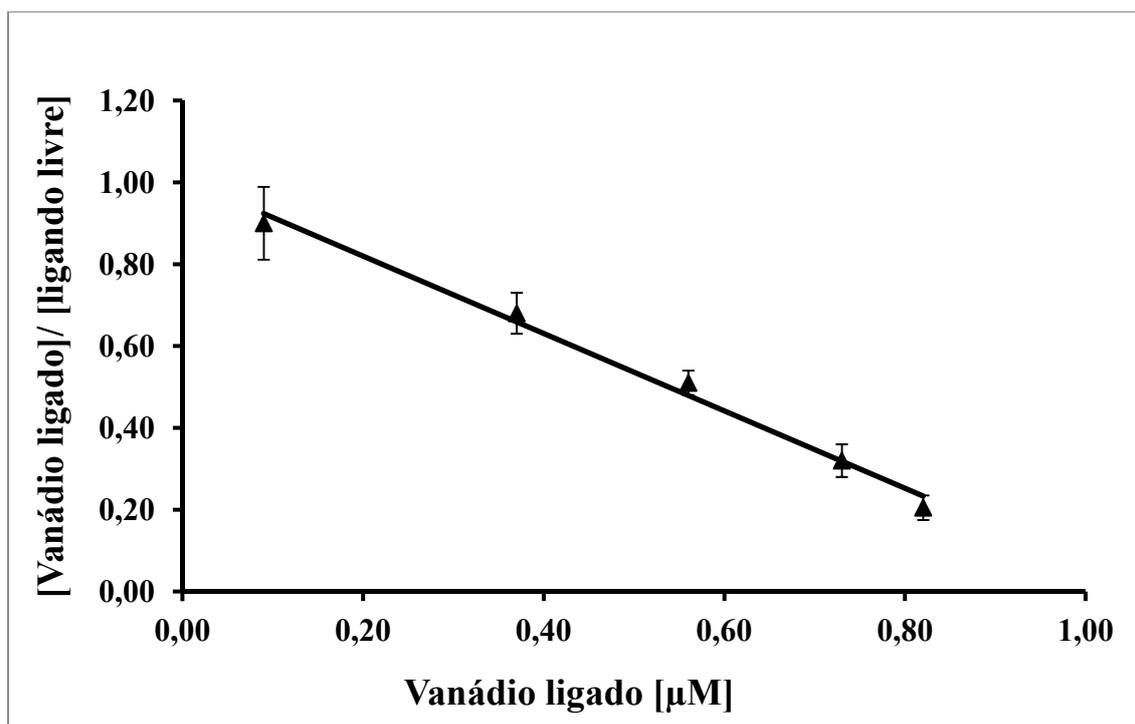
**Figura 4.19** - Determinação da estequiometria de ligação  $V_{10}:Ca^{2+}$ -ATPase de RS pelo método de Job modificado. Foram incubadas amostras  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS contendo  $1 \mu M$  com concentrações de  $V_{10}$  entre 0 e  $2 \mu M$ , num meio contendo KCl  $0,1 M$ , HEPES  $25 mM$  pH  $7,0$ ,  $MgCl_2$   $5 mM$  e  $CaCl_2$   $50 \mu M$ . Após centrifugação de acordo com o descrito na secção 3.7.7, os sobrenadantes foram analisados no seu conteúdo em vanádio por EAA. Amostras controle de  $V_{10}$  com as mesmas concentrações, na ausência de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, foram tratadas nas mesmas condições. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental.

A estequiometria 1:1, entre metal:proteína determinada por EAA foi confirmada por aplicação do método de Job tradicional em se usam razões diferentes de metal:proteína. (Fig. 4.20).



**Figura 4.20** - Determinação da estequiometria de ligação  $V_{10}:Ca^{2+}$ -ATPase de RS pelo método de Job. Foram incubadas amostras  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS contendo entre 0 e  $1 \mu M$  com concentrações de  $V_{10}$  entre 0 e  $1 \mu M$  e nas seguintes proporções  $V_{10}$ :proteína ( $\mu M$ ) (1:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:1) num meio contendo KCl  $0,1 M$ , HEPES  $25 mM$  pH  $7,0$ ,  $MgCl_2$   $5 mM$  e  $CaCl_2$   $50 \mu M$ . Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental.

A constante de dissociação ( $K_d$ ) de  $V_{10}$  para a  $Ca^{2+}$ -ATPase é um parâmetro muito poucas vezes referido na literatura, existem estudos efetuados usando isotiocianato de fluoresceína em que por espectrofotometria de fluorescência (FITC) foi determinado para o vanadato um  $K_d$  na ordem dos  $\mu M^{-1}$  (Highsmith *et al.*, 1985). Neste trabalho também foi determinada a constante de dissociação entre o  $V_{10}$  e  $Ca^{2+}$ -ATPase utilizando a EAA. Os resultados foram analisados pelo método de Scatchard, usando as seguintes proporções entre metal e proteína: 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 10:1 e 20:1. (Fig. 4.21)



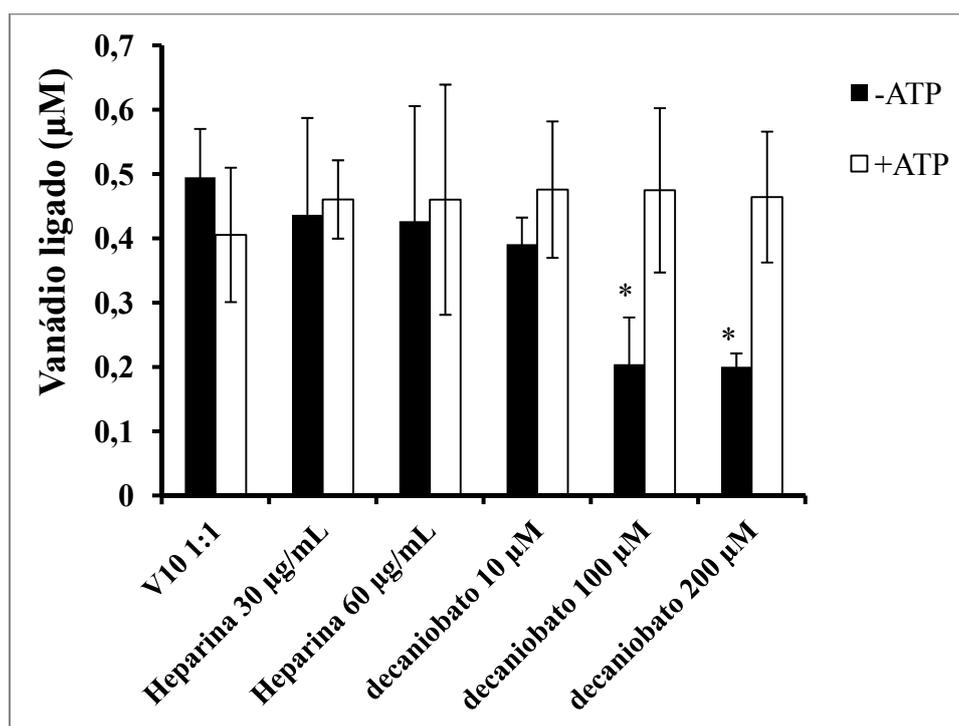
**Figura 4.21** - Análise da interação entre  $V_{10}$  e  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS pelo método de Scatchard. Os ensaios foram realizados com as seguintes razões entre metal e proteína ( $\mu M$ ): 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 10:1 e 20:1 num meio contendo KCl 0,1 M, HEPES 25 mM pH 7,0,  $MgCl_2$  5 mM e  $CaCl_2$  50  $\mu M$ . Após centrifugação de acordo com o descrito na secção 3.7.7, os sobrenadantes foram analisados no seu conteúdo em vanádio por EAA. Amostras controle de  $V_{10}$  com as mesmas concentrações, na ausência de  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, foram tratadas nas mesmas condições. Os resultados obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão e resultam da análise em triplicado de um mínimo de três preparações diferentes de VRS para cada condição experimental.

O valor obtido para a constante de dissociação ( $K_d$ )  $1,07 \mu M^{-1}$  para a interação entre  $V_{10}$  e  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS é muito semelhante aos valores descritos para o cálcio, magnésio e ATP, respetivamente 1, 0,9 e  $1 \mu M^{-1}$  (Gonzalez *et al.*, 2006). A partir desta análise, obteve-se o valor máximo de concentração de  $V_{10}$  ligado de  $1,11 \mu M$  que vem confirmar novamente a estequiometria de ligação 1:1 entre  $V_{10}$  e a  $Ca^{2+}$ -ATPase, sugerindo que existe uma molécula de  $V_{10}$  por cada  $Ca^{2+}$ -ATPase (Fig. 4.21).

#### 4.2.5.3 Análise por EAA do efeito de heparina e de decaniobato na interação $V_{10}$ - $Ca^{2+}$ -ATPase

Estudos adicionais por EAA, foram efetuados para tentar esclarecer o local de interação do  $V_{10}$  com a  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS. Deste modo analisou-se, na ausência e na presença de ATP, a interação entre  $V_{10}$  e  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS na proporção 1:1 entre metal e proteína. Nestas condições também se efetuaram ensaios na presença de heparina com as concentrações de 30 e 60  $\mu$ g e na presença de concentrações de 10, 100 e 200  $\mu$ M de decaniobato.

Verificou-se que a heparina não afeta a interação do  $V_{10}$  com a  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS nas concentrações utilizadas em ensaios realizados na ausência ou na presença de ATP. Por outro lado  $Nb_{10}$  reverte de modo significativo ( $p < 0,05$ ) a ligação do  $V_{10}$  (1 $\mu$ M) à  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS com uma percentagem de cerca de 50 % de reversão, para 100  $\mu$ M de  $Nb_{10}$ . Na presença de ATP, este efeito não é observado ou seja o ATP impede a reversão da ligação que ocorre pela presença de  $Nb_{10}$  em ensaios na ausência de ATP (Fig. 4.22).



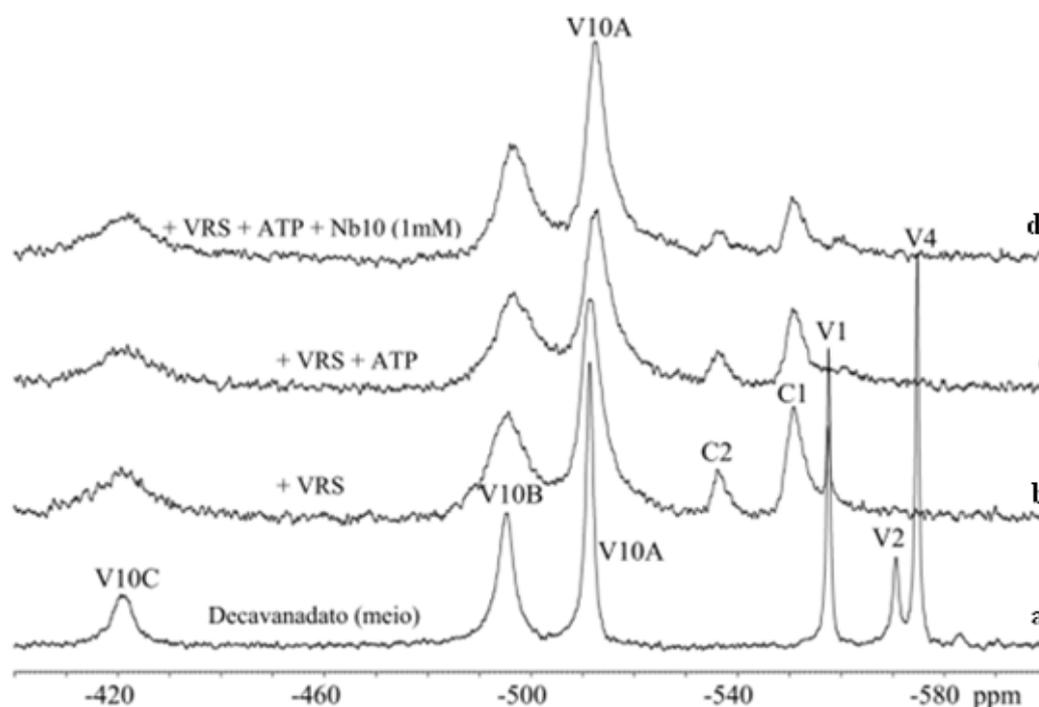
**Figura 4.22** - Análise de vanádio por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) de amostras contendo  $V_{10}$  (1 $\mu$ M) após adição de uma concentração igual de  $Ca^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (1  $\mu$ M), na presença de heparina ou decaniobato. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante analisado por EAA como o descrito na secção 3.7.2. Os resultados são representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Os resultados apresentados são a média de ensaios em triplicado. \*Significativamente diferente do controlo ( $p < 0,05$ ).

Utilizando Nb<sub>10</sub> em concentração 200 μM os resultados são equivalentes aos resultados com 100 μM em Nb<sub>10</sub>, ou seja a reversão da ligação entre V<sub>10</sub> e Ca<sup>2+</sup>-ATPase atinge um máximo de cerca de 50 % na ausência de ATP.

#### 4.2.6 Estudos da interação decavanadato com a Ca<sup>2+</sup>-ATPase de RS por espectroscopia de RMN

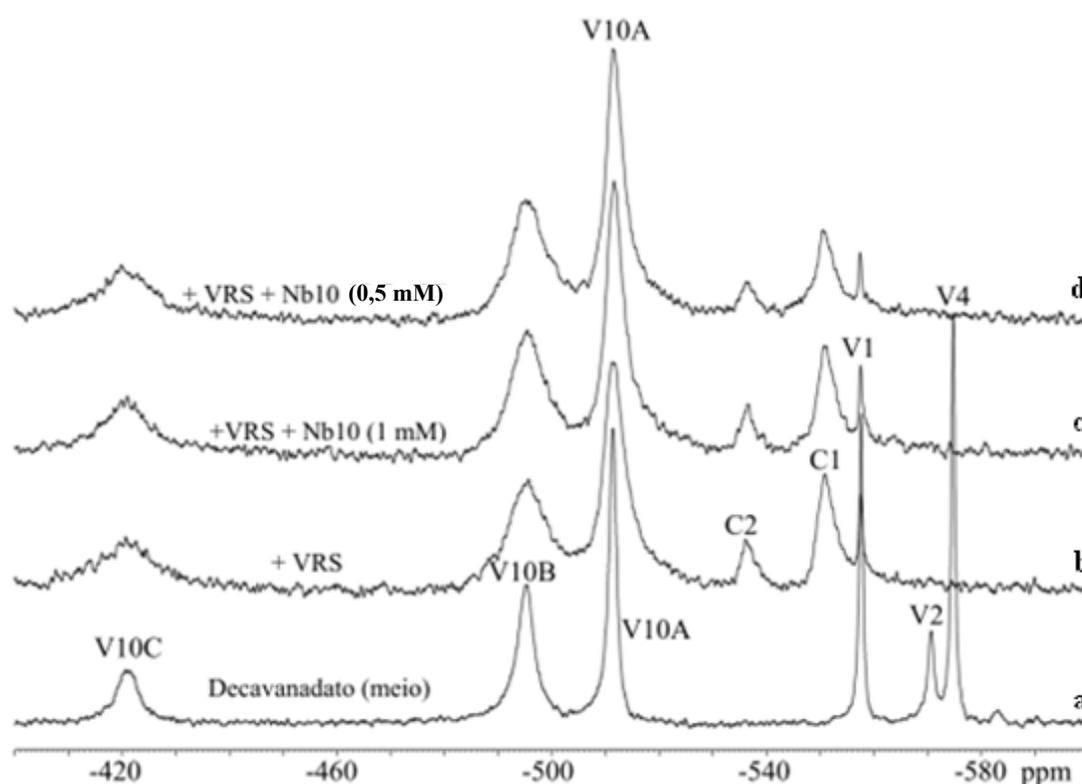
Para as soluções “stock” preparadas segundo o descrito na secção 3.2.1, nomeadamente a solução de vanadato 50 mM a pH 7,0 e decavanadato 50 mM a pH 4,0, os espectros de RMN revelaram apenas os picos característicos das espécies V<sub>1</sub> e V<sub>10</sub>, tal como se verificou em estudos anteriores (Aureliano e Madeira, 1994a).

Assim, no presente estudo foram obtidos espectros de RMN de decavanadato nas condições descritas na secção 3.8.1 de modo a verificar a interação da Ca<sup>2+</sup>-ATPase com o decavanadato e a influência do decaniobato nessa interação. Para a solução de V<sub>10</sub> nas condições do ensaio (5 mM de vanádio total), o espectro <sup>51</sup>V-RMN revelou os picos da espécie V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, e V<sub>4</sub> e V<sub>10</sub> (Fig. 4.23a).



**Figura 4.23** - Espectros de RMN do isótopo 51 de vanádio (105,2 MHz), à temperatura ambiente, de decavanadato (5 mM vanadato total) em 25 mM HEPES (pH 7,0), 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 μM CaCl<sub>2</sub> (a) e após adição sucessiva de Ca<sup>2+</sup>-ATPase de RS (b), 2,5 mM de ATP (c) e decaniobato (1mM) (d).

Nos espectros de  $^{51}\text{V}$ -RMN (Fig. 4.23a e Fig. 4.24a) o decavanadato apresenta três picos, nomeados por  $V_{10A}$ ,  $V_{10B}$  e  $V_{10C}$ , numa proporção 2 : 2 : 1, tal como verificado em trabalhos anteriores (Aureliano e Madeira, 1994a; Tiago *et al.*, 2004b; Ramos *et al.*, 2010; Crans *et al.*, 2011). Um alargamento do sinal de RMN observado para o  $V_{10}$  indica que o decavanadato ( $V_{10}$ ) interage com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS (Fig. 4.23b), sendo a interação mais forte na presença de ATP, o ligando natural da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS, uma vez que se observa um alargamento de 3 para 4 (Fig. 4.23c, Tabela 4.4). A adição de  $\text{Nb}_{10}$  reverte a interação de  $V_{10}$  com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase uma vez que o alargamento diminui de 4 para 3 (Fig. 4.23d), na presença de ATP, e de 3 para 2,5 na ausência de ATP (Fig. 4.24b e Fig. 4.24c, Tabela 4.4). Os sinais de RMN  $C_1$  e  $C_2$  observados nos espectros de RMN (Fig. 4.23 e 4.24) correspondem a sinais de complexos entre vanadatos e sacarose (Aureliano e Madeira, 1994a), uma vez que as preparações de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase contêm sacarose.



**Figura 4.24** - Espectros de RMN do isótopo 51 de vanádio (105,2 MHz), à temperatura ambiente, de decavanadato (5 mM vanadato total) em 25 mM HEPES (pH 7,0), 100 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  (a) e após adição sucessiva de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS (b), decaniobato (1 mM) (c) e decaniobato (0,5 mM) (d).

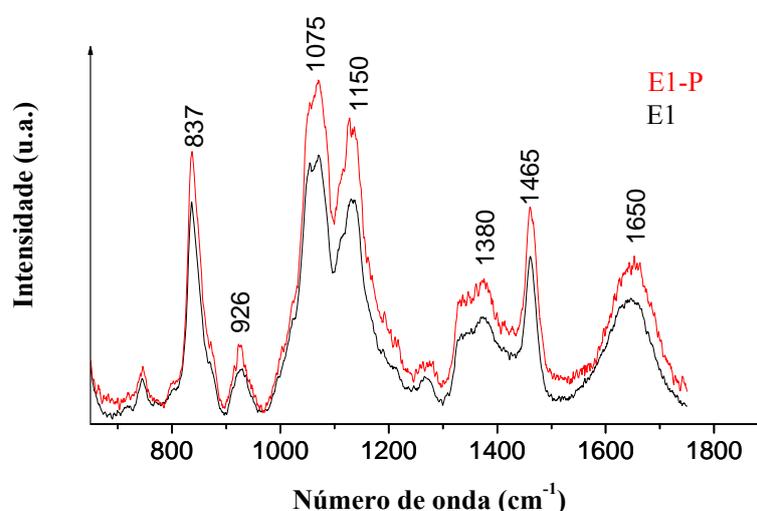
**Tabela 4.4** - Parâmetros espectrais de RMN, à temperatura ambiente, nomeadamente desvio químico ( $\delta$ ), largura a meia altura ( $\Delta v_{1/2}$ ) e fator de alargamento da largura a meia altura ( $f$ ) que é definido como o coeficiente entre o valor da  $\Delta v_{1/2}$  na ausência e na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS (5 mg/mL) das espécies de vanadato monomérico ( $V_1$ ), dimérico ( $V_2$ ), tetramérico ( $V_4$ ) e decamérico ( $V_{10}$ ) presentes em solução de decavanato 5 mM de vanádio total, correspondente a 0,5 mM de  $V_{10}$  em diferentes condições experimentais.

Decavanadato (5 mM)								
	$V_{10C}$	$V_{10B}$	$V_{10A}$	$V_1$	$V_2$	$V_4$	$C_2$	$C_1$
<b>Meio</b>								
$\delta/\text{ppm}$	-421,0	-495,0	-512,0	-558,0	-571,0	-575,0	-537,0	-551,0
$\Delta v_{1/2}/\text{Hz}$	1394,0	996,0	398,0	199,0	398,0	199,0		
Area	2,5	6,4	10,4	4,3	1,0	5,6		
<b>[+ <math>\text{Ca}^{2+}</math>-ATPase de RS (5 mg/mL)]</b>								
$\delta/\text{ppm}$	-421,0	-495,0	-512,0	-558,0	-571,0	-575,0	-537,0	-551,0
$\Delta v_{1/2}/\text{Hz}$	2788,0	2390,0	1195,0	199,0			996,0	1095,0
$f$	(2,0)	(2,4)	(3,0)	(1,0)				
Area	3,6	5,4	8,5	1,2			1,0	2,8
<b>[+ <math>\text{Ca}^{2+}</math>-ATPase de RS (5 mg/mL) + ATP (2,5 mM)]</b>								
$\delta/\text{ppm}$	-421,0	-495,0	-512,0	-558,0	-571,0	-575,0	-537,0	-551,0
$\Delta v_{1/2}/\text{Hz}$	3386,0	2589,0	1593,0				1195,0	1195,0
$f$	(2,4)	(2,6)	(4,0)					
Area	2,9	5,4	6,9				0,9	2,0
<b>[+ <math>\text{Ca}^{2+}</math>-ATPase de RS (5 mg/mL) + <math>\text{Nb}_{10}</math> (1 mM)]</b>								
$\delta/\text{ppm}$	-421,0	-495,0	-512,0	-558,0	-571,0	-575,0	-537,0	-551,0
$\Delta v_{1/2}/\text{Hz}$	2190,0	1991,0	996,0	199,0			996,0	1095,0
$f$	(1,6)	(2,0)	(2,5)	(1,0)				
Area	2,6	5,8	9,6	0,9			0,8	2,0
<b>[+ <math>\text{Ca}^{2+}</math>-ATPase de RS (5 mg/mL) + <math>\text{Nb}_{10}</math> (0,5 mM)]</b>								
$\delta/\text{ppm}$	-421,0	-495,0	-512,0	-558,0	-571,0	-575,0	-537,0	-551,0
$\Delta v_{1/2}/\text{Hz}$	2788,0	2190,0	996,0	199,0			1195,0	1195,0
$f$	(2,0)	(2,2)	(2,5)	(1,0)				
Area	3,3	5,8	9,5	0,6			0,8	2,0
<b>[+ <math>\text{Ca}^{2+}</math>-ATPase de RS (5 mg/mL) + ATP (2,5 mM) + <math>\text{Nb}_{10}</math> (1 mM)]</b>								
$\delta/\text{ppm}$	-421,0	-495,0	-512,0	-558,0	-571,0	-575,0	-537,0	-551,0
$\Delta v_{1/2}/\text{Hz}$	2788,0	1991,0	1195,0				1195,0	1195,0
$f$	(2,0)	(2,0)	(3,0)					
Area	2,9	4,7	8,4				0,5	1,4

### 4.2.7 Estudos estruturais por Espetroscopia de Raman

A fim de esclarecer as alterações estruturais induzidas pelos oxometalatos na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, foi utilizada a espectroscopia de Raman para analisar as diferentes conformações da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em solução e comparar o efeito que a presença dos oxometalatos induzem na proteína, e se favorecem uma determinada conformação.

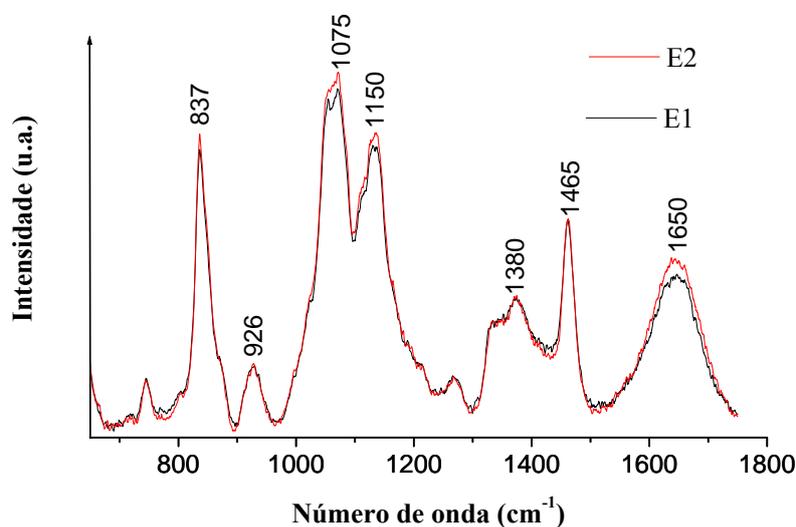
Foram obtidos os espectros de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase na conformação E1 e na conformação E1P, na presença de ATP (Fig. 4.25).



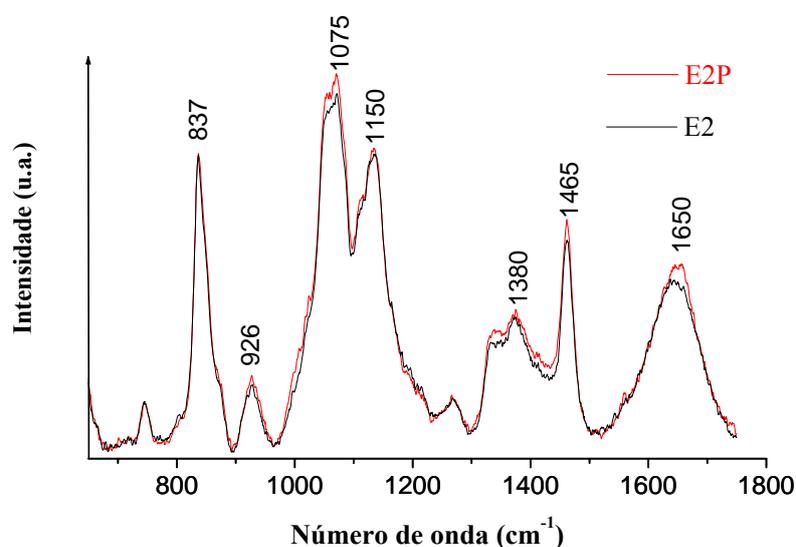
**Figura 4.25** - Espectros de Raman da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E1 e E1P.

Os espectros da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, apresentam perfis semelhantes em ambas as conformações E1 e E1P, verificando-se uma maior intensidade dos picos a 837, 926, 1075, 1150, 1380 e 1465 e 1650  $\text{cm}^{-1}$  para a conformação E1P. O pico mais intenso a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde à vibração de alongamento do grupo carbonilo (C=O) presente nas ligações peptídicas do chamado grupo amida I. O pico a 1150  $\text{cm}^{-1}$ , provavelmente pode ser atribuído às vibrações de alongamento dos grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) das moléculas lipídicas (Thomas, 2002; Nielsen *et al.*, 2007) uma vez que a amostra contém não só a proteína membranar, mas também a bicamada lipídica natural do retículo sarcoplasmático. Um ligeiro aumento no pico a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída à amida I (vibração de alongamento grupo carbonilo do péptido), é observado para a conformação E1P (Fig. 4.25), o que sugere mudanças na estrutura secundária da proteína. Não se observaram alterações significativas quando foram obtidos

espectros da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase num meio contendo EGTA, que complexa todo o cálcio livre e favorece a conformação E2, comparativamente com a conformação E1 (Fig. 4.26) ou quando se obteve o espectro na presença de EGTA e fosfato inorgânico, ou seja nas condições em que a conformação E2P é favorecida (Fig. 4.27).



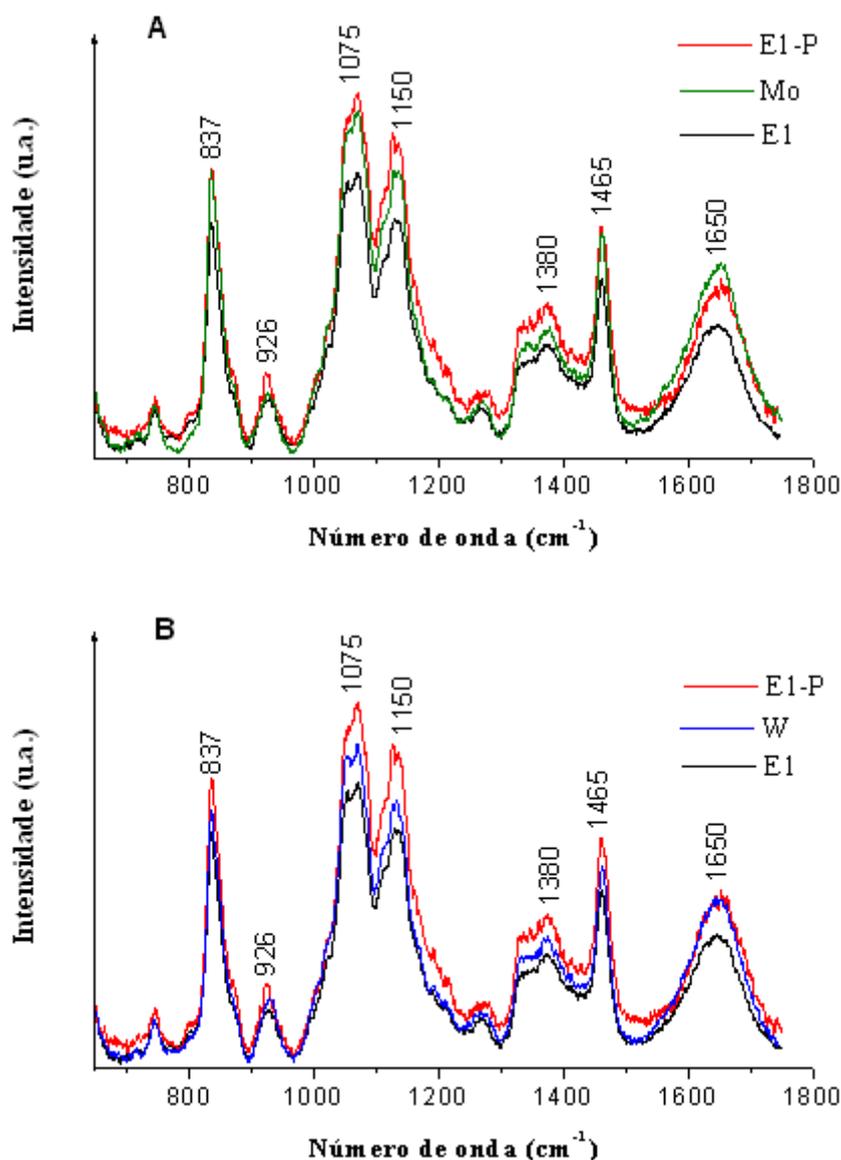
**Figura 4.26** - Espectros de Raman da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E1 e E2.



**Figura 4.27** - Espectros de Raman da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase na conformação E2 e após fosforilação na conformação E2P.

Relativamente aos espectros da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase obtidos após incubação com os diferentes oxometalatos verificou-se que o molibdato e o tungstato (Fig. 4.28A e Fig. 4.28B), induzem diferentes mudanças nas intensidades dos picos, mas não de modo tão intenso quanto o observado na mudança da conformação E1 para E1P, sugerindo que estes oxometalatos

possam promover mudanças conformacionais diferentes na proteína mas com tendência a uma modificação semelhante ao induzido pela fosforilação pelo ATP.

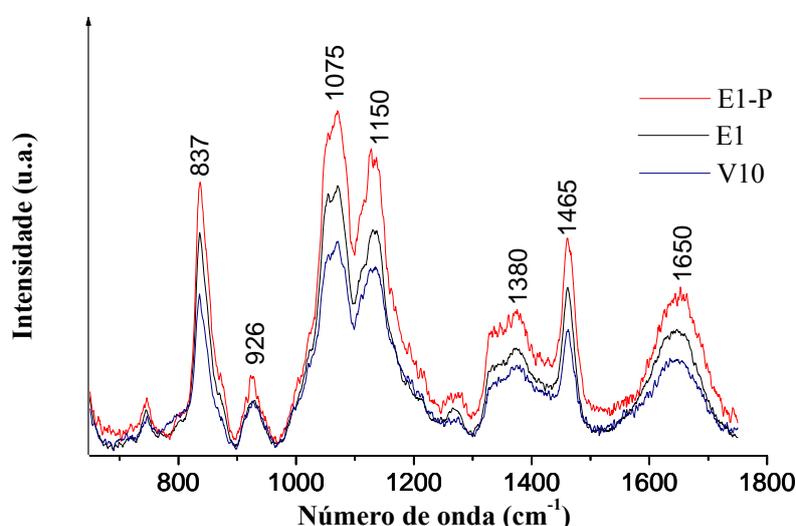


**Figura 4.28** - Espectros de Raman de Ca<sup>2+</sup>-ATPase nas conformações E1, E1P e na presença de molibdato (acima, A) ou tungstato (abaixo, B).

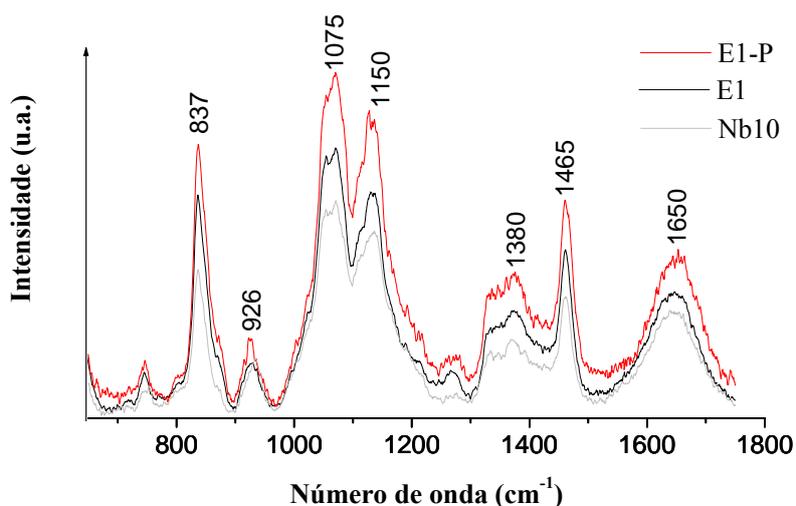
Em comparação com os espectros de E1P, após a adição de Mo, os picos a 837, 1075 e 1650 cm<sup>-1</sup> não se alteraram, enquanto o pico a 1650 cm<sup>-1</sup> é mais intenso e os picos a 926, 1150 e 1380 cm<sup>-1</sup> são menos intensos (Fig. 4.28A). Portanto, Mo diminuiu a intensidade do pico a 1150 cm<sup>-1</sup>, e aumentou intensidade do pico a 1650 cm<sup>-1</sup>, pertencentes, respetivamente às vibrações de alongamento do metileno (CH<sub>2</sub>) em moléculas lipídicas e amida I devido à presença da ligação carbonilo (C=O) (Thomas, 2002; Nielsen *et al.*, 2007).

Para o W, verificou-se uma diminuição de intensidade nas bandas, em comparação com E1P, relativamente aos seis primeiros picos observados no espectro, ao passo que o pico a  $1650\text{ cm}^{-1}$  mostrou a mesma intensidade (Fig. 4.28B). Embora tanto para Mo e W, se tenha observado sinais de aumento de estrutura organizada em  $\alpha$ -hélices, a interação com Mo parece induzir alterações diferentes e mais pronunciadas na conformação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do que a interação com W, nomeadamente entre a conformação E1 e E1P.

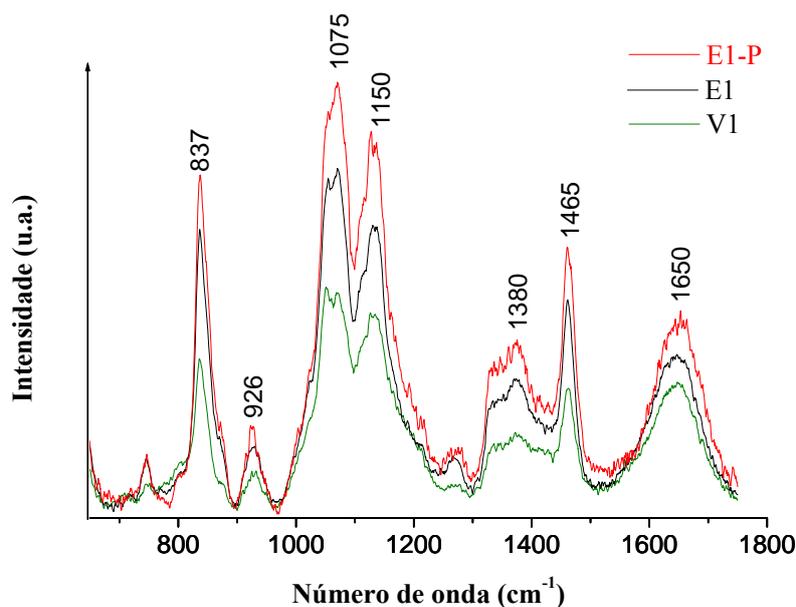
Ao contrário dos oxometalatos anteriores, as intensidades dos sinais de diminuíram, em todos os picos em comparação com os espectros da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase na conformação E1 ou E1P, após a incubação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase com decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) (Fig. 4.29), decaniobato ( $\text{Nb}_{10}$ ) (Fig. 4.30), ou vanadato ( $\text{V}_1$ ) (Fig. 4.31).



**Figura 4.29** - Espectros de Raman de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E1, E1P e na presença de decavanadato.

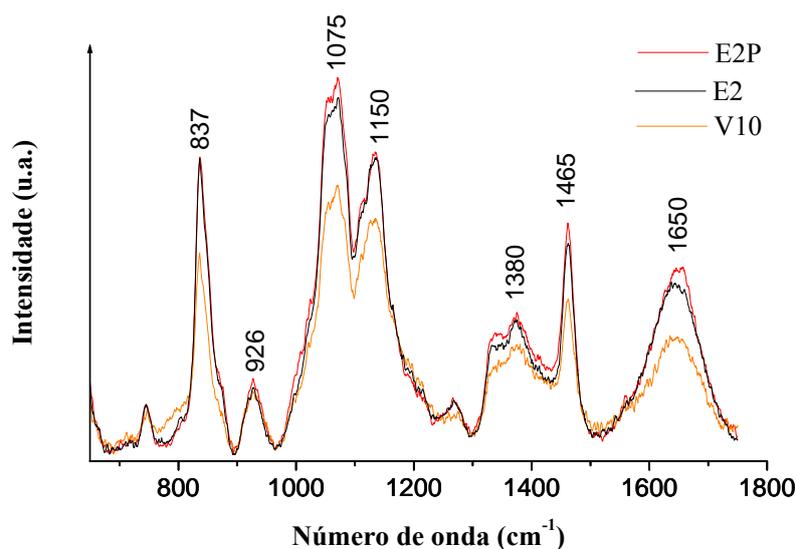


**Figura 4.30** - Espectros de Raman de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E1, E1P e na presença de decaniobato.

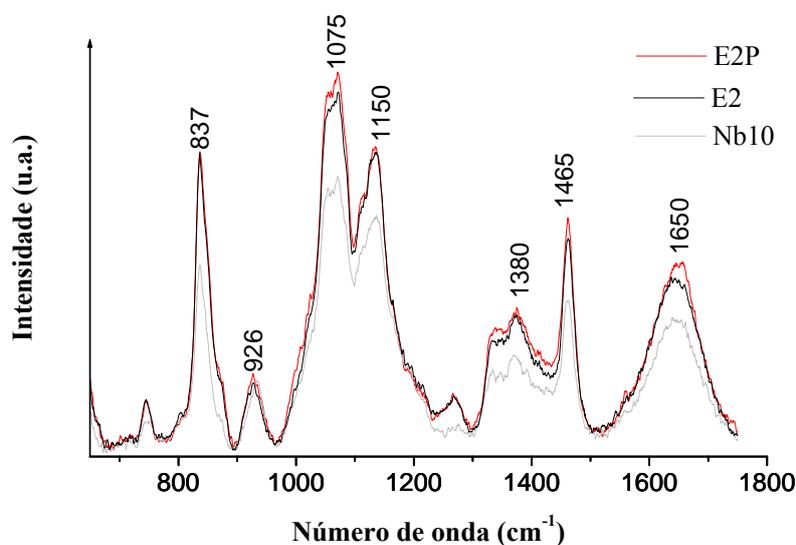


**Figura 4.31** - Espectros de Raman de Ca<sup>2+</sup>-ATPase nas conformações E1, E1P e na presença de vanadato.

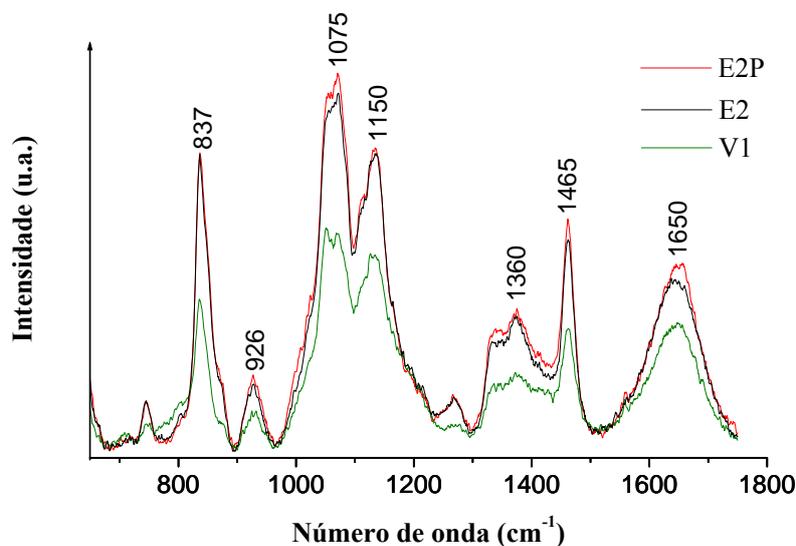
Além disso, a diminuição das intensidades dos picos observada nos espectros de Raman quando a proteína interage com V<sub>10</sub>, Nb<sub>10</sub> ou V<sub>1</sub> observada relativamente à conformação E1, foi também detetada no espectro de Raman, quando a enzima está na conformação E2, isto é, ausência de cálcio livre, devido à presença de EGTA. Sugere-se que estes oxometalatos possam interatuar com a proteína quer na conformação E1 ou E2 (Fig. 4.32, Fig. 4.33 e Fig. 4.34).



**Figura 4.32** - Espectros de Raman de Ca<sup>2+</sup>-ATPase nas conformações E2, E2P e na presença de decavanadato.



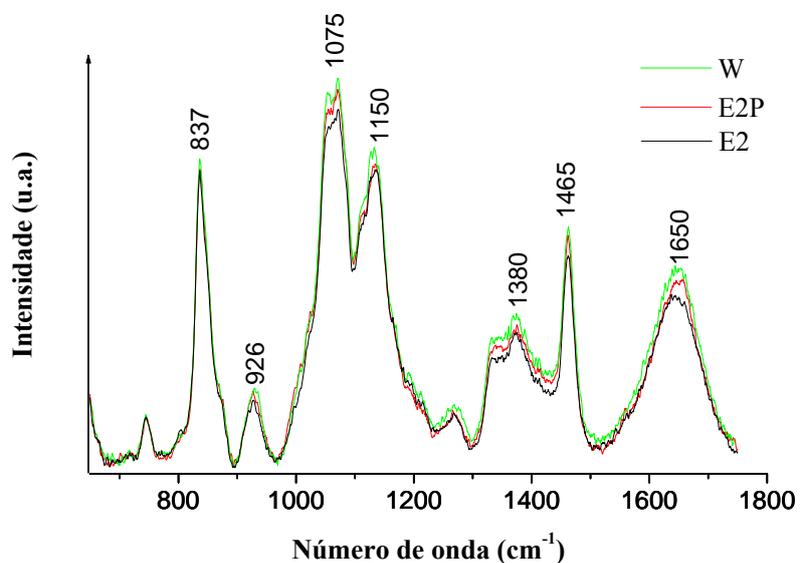
**Figura 4.33** - Espectros de Raman de Ca<sup>2+</sup>-ATPase nas conformações E2, E2P e na presença de decaniobato.



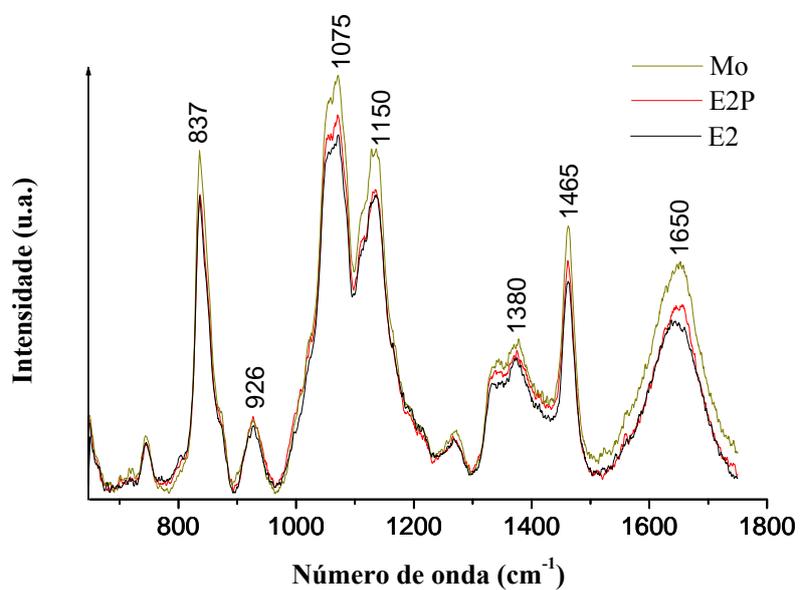
**Figura 4.34** - Espectros de Raman de Ca<sup>2+</sup>-ATPase nas conformações E2, E2P e na presença de vanadato.

Em sentido contrário, aos efeitos induzidos pelos oxometalatos de vanádio e nióbio, não se observaram alterações significativas, detetadas no espectro de Raman, relativamente à conformação E2 da proteína, após adição de fosfato inorgânico (conformação E2), no caso do tungstato (Fig. 4.35), enquanto incrementos de intensidade em todos os picos, com exceção do

pico a  $926\text{ cm}^{-1}$ , foram observados pela interação do molibdato relativamente a ambas conformações, E2 e E2P (Fig. 4.36).



**Figura 4.35** - Espectros de Raman de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E2, E2P e na presença de tungstato.



**Figura 4.36** - Espectros de Raman de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nas conformações E2, E2P e na presença de molibdato.

## Capítulo 5

---

### Discussão

---

### 5.1 Inibição da atividade da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase por oxometalatos de vanádio, nióbio, tungstênio e molibdênio.

A primeira enzima a ser descrita como sendo inibida pelo decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) foi a adenilato cinase (DeMaster e Mitchell, 1973). Desde então, têm sido descritas muitas enzimas e/ou proteínas, que interagem com o  $\text{V}_{10}$ , o qual se reconhece poder ter diferentes efeitos biológicos, tais como, por exemplo, a miosina (Tiago *et al.*, 2004a; Tiago *et al.*, 2007), a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Csermely *et al.*, 1985a; Aureliano e Madeira, 1994a; Aureliano e Madeira, 1994b; Hua *et al.*, 2000; Aureliano *et al.*, 2005; Aureliano *et al.*, 2008) e actina (Ramos *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2009, Ramos *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2012), entre outros (Messmore e Raines, 2000; Aureliano e Gândara, 2005; Aureliano e Crans, 2009; Aureliano, 2009). Mesmo assim, na maioria dos estudos sobre as interações/efeitos de vanadato com proteínas, os autores assumiram o vanadato monomérico como a espécie ativa, não sendo geralmente considerada a contribuição de outros polioxovanadatos. Em muitos destes estudos não é fornecida qualquer informação sobre a composição das soluções de vanadato e outros em que se afirma claramente que a acidificação do meio foi realizada, formando-se a espécie  $\text{V}_{10}$  que ao estar presente no meio pode contribuir para os efeitos biológicos observados (Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009). De facto, é bem conhecido que a espécie  $\text{V}_{10}$  induz vários efeitos em sistemas biológicos, não só *in vitro* mas também *in vivo* (Aureliano e Madeira, 1994a; Aureliano e Gândara, 2005; Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009). Estudos com  $\text{V}_{10}$  demonstraram que este ião tem um efeito diferente de vanadatos simples (Willsky *et al.*, 1984; Aureliano e Madeira, 1994a; Crans, 1994; Messmore e Raines, 2000; Aureliano e Gândara, 2005; Ramos *et al.*, 2006; Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009).

No entanto, espécies de oxovanadatos, como  $\text{V}_{10}$ , estão ainda em processo de contínua pesquisa relativamente aos seus efeitos em sistemas biológicos, como descrito em revisões recentes (Aureliano e Gândara, 2005; Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009; Ramos *et al.*, 2012). Alguns autores têm-se focado na interação de oxovanadatos, especificamente o  $\text{V}_{10}$ , com sistemas biológicos, sendo a literatura sobre a química dos polioxovanadatos em solução muito extensa (Pope, 1983; Muller *et al.*, 1998).

Assim, além de vanádio (V), tungstênio (W) e molibdênio (Mo) têm também sido utilizados num grande número de substâncias farmacológicas (Stankov *et al.*, 2007), incluindo aqueles com aplicações antidiabéticas (Stankov *et al.*, 2007; Nomiya, 2001) em adipócitos de ratos (Matsumoto, 1994; Ahmad, *et al.*, 2006; Zorzano *et al.*, 2009), em que o  $\text{V}_{10}$  tem sido sugerido como sendo um agente insulino-mimético mais potente do que alguns complexos de

vanádio, embora o mecanismo de ação não seja bem conhecido (Pereira *et al.*, 2009). Talvez o efeito mais notável do  $V_{10}$  descrito até agora refira-se à indução da despolarização da membrana mitocondrial e à inibição de consumo de oxigênio em concentrações nanomolares, o que leva à necrose celular (Soares *et al.*, 2007c ; Soares *et al.*, 2008b).

A  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS tem provado ser um excelente modelo para o estudo dos efeitos do oxovanadato e complexos de vanádio em E1/E2-ATPases ou ATPases do tipo P, tal como outras E1/E2 enzimas, nomeadamente a  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase. Eles também estão envolvidos na homeostasia do  $Ca^{2+}$  e portanto, podem regular a sinalização de vários processos em células musculares e não musculares, e as ATPases do tipo P são conhecidas como alvos potenciais fármacos na medicina (Schjøtt, *et al.*, 2009). O transporte de cálcio pela  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS pode ser afetado pela toxicidade que os metais podem exercer na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase, tendo sido demonstrado que o transporte de  $Ca^{2+}$  pode ser inibido por oxovanadatos, tais como o  $V_{10}$ , enquanto não foram detetados efeitos com o vanadato em concentração até 2 mM (Aureliano e Madeira, 1994a; Aureliano e Madeira, 1994b). Além disso, a atividade de ATPase desta enzima é muito sensível à presença de complexos de vanádio, tais como vários complexos de vanádio-citrato e o complexo de bis(maltolato)oxovanádio(IV) (BMOV), entre outros (Aureliano *et al.*, 2005; Aureliano *et al.*, 2008). Nesses estudos, verificou-se que os diferentes complexos de coordenação de vanádio induzem diferentes graus de inibição de  $Ca^{2+}$ -ATPase, em que os complexos de vanádio podem inibir a bomba de cálcio com mais ou menos potência do que vanadato ( $V_1$ ), sugerindo que o seu modo de ação é diferente do que o vanádio não complexado.

Além disso, de entre todos os complexos de vanádio ou oxovanadatos não complexados, o  $V_{10}$  parece ser o oxomatalato mais potente no que diz respeito à inibição da  $Ca^{2+}$ -ATPase (Aureliano e Madeira, 1994a; Aureliano *et al.*, 2005; Aureliano *et al.*, 2008), observação confirmada neste estudo que indica o decavanadato como o oxometalato de maior potência inibitória da  $Ca^{2+}$ -ATPase ( $IC_{50} = 15 \mu M$ ). Sendo conhecido que a homeostasia do cálcio tem um papel importante nos processos envolvidos na morte celular, tais como necrose e apoptose. Além de se ter verificado que a diminuição da atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS em condições específicas associadas com diabetes, pode resultar num comprometimento do relaxamento cardíaco (Bidasee *et al.*, 2004) ou que a administração *in vivo* de espécies decavanadato, também têm demonstrado que a atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS diminui (Soares *et al.*, 2007a), isto sugere que estas enzimas podem ser um alvo importante para o desenvolvimento de drogas específicas uma vez que as bombas iónicas são conhecidas como

alvos potenciais de drogas na medicina (Schiøtt, *et al.*, 2009). Uma vez que as cinases de tirosina e fosfatases estão envolvidos nos processos bioquímicos de diversas doenças, os oxometalatos e polioxometalatos podem ser potencialmente úteis no tratamento, embora os mecanismos exatos de ação ainda são incertos ou não completamente esclarecidos.

Assim é particularmente importante, neste contexto, compreender os efeitos e o modo de interação dos metais em modelos biológicos que imitam, tão perto quanto possível, as condições fisiológicas. Em estudos anteriores foi previamente verificado que complexos de vanádio inibem a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase numa extensão diferente dos oxovanadatos simples (Hua *et al.*, 2000; Aureliano *et al.*, 2005; Aureliano *et al.*, 2008).

No presente estudo, tendo em conta os estudos de inibição efetuados, todos os oxometalatos estudados exibem um efeito inibitório da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS. As curvas dose resposta mostraram que a sensibilidade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS é diferente para cada um dos oxometalatos. As espécies decaméricas de V e Nb, decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) e decaniobato ( $\text{Nb}_{10}$ ) são as que apresentam um efeito inibitório mais acentuado pois são as que apresentam valores de  $\text{IC}_{50}$  mais baixos, o que está de acordo com resultados que se conhecem para o decavanadato como alvo de algumas proteínas ou enzimas nucleotido dependentes (Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009). Por outro lado, os dados relativamente aos efeitos do tungstato ou molibdato sobre a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS são escassos ou inexistentes no caso do decaniobato.

O que é obvio é o facto de o molibdato ser o inibidor menos efetivo da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS relativamente aos outros oxometalatos monoméricos (tungstato e vanadato) por isso o que apresenta menor risco de toxicidade celular.

De acordo com a ordem relativa para a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS pelos oxometalatos que foi obtida:  $\text{V}_{10} > \text{Nb}_{10} > \text{V}_1 > \text{W}_1 > \text{Mo}_1$ , pode-se afirmar que os polioxometalatos são inibidores muito mais potentes de ATPases do tipo P, como a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS, com uma magnitude de potência inibitória entre 3 e 3000 vezes superior aos oxometalatos monoméricos estudados, e que apenas o  $\text{V}_{10}$  têm um efeito inibitório que aumenta em função do tempo de incubação.

As informações sobre o tipo de inibição enzimática que os oxometalatos induzem na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase são escassas ou inexistentes. Em alguns estudos, o decavanadato foi descrito como inibidor não competitivo (Aureliano e Madeira, 1994a; Aureliano, 2007). Outros estudos, no entanto, verificaram que a interação do decavanadato com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é competitiva (Csermely *et al.*, 1985a; Csermely *et al.*, 1985b), e propuseram dois sítios de

ligação para o  $V_{10}$  na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPas, um deles o sítio de ligação do vanadato, outro o sítio de ligação nucleotídico (Csermely *et al.*, 1985a; Csermely *et al.*, 1985b; Varga *et al.*, 1985). Isto levou à sugestão de que o sítio de ligação  $V_{10}$  é o mesmo que o local de ligação do ATP ou, pelo menos, na proximidade deste, uma vez que foi observado que um marcador fluorescente, o isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se liga especificamente a Lys-515 no interior do local de ligação de ATP também previne a ligação do decavanadato à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Varga *et al.*, 1985). No entanto, nesses estudos não são apresentados os valores cinéticos de  $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$  para determinar o tipo de inibição pelo  $V_{10}$ . No presente estudo, os resultados mostraram que ambos os polioxometalatos  $V_{10}$  e  $\text{Nb}_{10}$  têm um comportamento semelhante na inibição da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Anteriormente a este estudo, não existiam estudos sobre inibição de ATPases por  $\text{Nb}_{10}$ . Os estudos sobre os efeitos biológicos do nióbio, nos últimos dez anos são escassos e incluem entre outros, atividade insulino-mimética, atividade antitumoral e interação com proteínas (Hall *et al.*, 2000; Maniatakou *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010). Estudos de ósseo-integração e efeitos de ação a longo termo a nível renal ou sistêmico foram descritos à mais de vinte anos como atividades biológicas do niobato (Wong e Downs, 1966; Schroeder *et al.*, 1970; Johansson e Albrektsson, 1991).

Apesar da sua bioquímica ser diferente,  $\text{Nb}_{10}$  e  $V_{10}$  apresentam efeitos similares no que diz respeito à inibição da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, sendo esta inibição não competitiva relativamente ao substrato. Assim, o tipo de inibição mista obtido por  $V_{10}$  poderá ser explicado pela decomposição de  $V_{10}$  em  $V_1$ .  $V_1$  pode competir para o local de ligação do ATP, uma vez que os aniões vanadato são estruturalmente semelhantes ao anião fosfato e podem-se ligar ao ADP formando o complexo  $\text{ADP}\cdot V_i$  que é um análogo do ATP (Crans *et al.*, 2004). Deste modo, a estabilidade de  $\text{Nb}_{10}$ , permite deduzir o tipo de inibição de  $V_{10}$ .

As diferentes sensibilidades da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase para os diferentes oxometalatos e polioxometalatos apontam para a necessidade de compreender o seu modo de atuação. Aparentemente, as proteínas de membrana como a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, revelam-se alvos de primeira linha para os efeitos da exposição a metais. De facto, o potencial impacto dos metais em bombas iónicas como a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, pode afetar a modulação da homeostasia do cálcio e com isso afetar a regulação e bioenergética celular. Indiretamente, estes metais afetam também outros processos tais como a apoptose, a necrose, alterações da dinâmica do citoesqueleto, alterações no stresse oxidativo e alterações da atividade mitocondrial (Soares *et al.*, 2008b; Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009; Schiøtt *et al.*, 2009). Em resumo, estes estudos sugerem que as interações dos oxometalatos de vanádio, nióbio, tungsténio e

molibdénio com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase são diferentes, uma vez que não se comportam sempre como análogos de fosfato. Assim, verifica-se serem necessários estudos adicionais para clarificar a interação e os efeitos de polioxometalatos e oxometalatos com a estrutura e funcionamento da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

Considerando o papel das ATPases do tipo P, não podemos excluir a hipótese de que a inibição de enzimas específicas por decavanadato ou decaniobato possam contribuir para as observadas atividades anticancerígenas, antivirais e antidiabéticas, entre outras, que os polioxometalatos de metais de transição exibem, em especial os polioxometalatos de vanádio. A capacidade destes oxometalatos atuarem tanto como análogos de fosfato, como análogos do estado transição de enzimas catalisadas por processos de transferência de grupos fosfato e como potencialmente moduladores ou inibidores de enzimas nucleótido dependentes, sugere que diferentes oxometalatos podem revelar diferentes processos mecanísticos nestas classes de enzimas.

No entanto, os mecanismos de ação de tais complexos em células e animais não são tão simples e muitas experiências serão necessárias para deduzir para uma aplicação medicinal. Portanto, embora seja sugerido que a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase por vanadatos possa explicar muitos dos efeitos induzidos por vanádio, os mecanismos de ação como antidiabético ou anticancerígeno destes compostos não são simples e muitas experiências devem ser realizadas para se chegar a essa conclusão. Nesse sentido, embora muitos trabalhos apontem os efeitos medicinais destes metais e sua utilização como potenciais fármacos para o tratamento e prevenção de várias disfunções, devem ser tomados alguns cuidados para não especular sobre as extraordinárias ações terapêuticas de tais complexos.

## **5.2 Oxidação de cisteínas e análise da redução de decavanadato por espectroscopia de RPE. Efeitos de agentes antioxidantes na reversão da oxidação e na inibição da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase induzida por oxometalatos**

O facto de a inibição pelo decavanadato ser não competitiva, pode apontar para um modo específico de interação com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase que é claramente diferente da descrita para o vanadato  $\text{V}_1$ . Por outro lado, os estudos de inibição mostraram que o decavanato, o inibidor mais potente, com o valor de  $\text{IC}_{50}$  para a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ( $\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$ ) que é mais de duas vezes menor do que o valor de  $\text{IC}_{50}$  para o decaniobato ( $\text{IC}_{50} = 35 \mu\text{M}$ ). Isto mostra que o decavanadato pode ter uma característica diferente sobre a interação de proteínas. Além disso, alguns estudos, apontam para a oxidação das cisteínas como uma parte fundamental do

mecanismo de inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pelo decavanadato (Viner *et al.*, 1996; Viner *et al.*, 1999). Também se verificou que o vanadato pode ser reduzido por grupos tiol em condições fisiológicas (Crans *et al.*, 2010), observando-se essa redução particularmente devido a uma interação específica com proteínas, tais como a actina (Ramos *et al.*, 2009 ; Ramos *et al.*, 2010) e também com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Viner *et al.*, 1999). Tem sido sugerido que apenas um ou dois resíduos de cisteína (Cys) da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS são verdadeiramente importantes para a função da enzima (Viner *et al.*, 1999). Uma modificação da Cys349, localizada perto do local de fosforilação leva a uma modulação da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pelo peroxinitrito (Viner *et al.*, 1996). Neste caso, a oxidação pode ser revertida com GSH, mas para concentrações elevadas de agentes de oxidação o conteúdo em grupos SH diminui e o efeito não é revertido, isto é, a oxidação é irreversível (Viner *et al.*, 1996). Na verdade, têm sido observados efeitos inibitórios na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase promovidos por espécies reativas de oxigênio e de azoto (Viner *et al.*, 1996; Viner *et al.*, 1999), bem como pelo 3-bromopiruvato, conhecido por ser uma substância antitumoral (Jardim-Messeder *et al.*, 2012), em todos estes efeitos parece estar envolvido o processo de oxidação de cisteínas da proteína.

Os resultados deste trabalho indicam que os oxometalatos de vanádio ( $V_1$  e  $V_{10}$ ), em oposição aos oxometalatos de nióbio, tungstênio e molibdênio, oxidam as cisteínas da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, tendo-se comprovado a redução do vanádio(V) a vanadilo por RPE. Não foi possível fazer, através dos espectros de RPE obtidos, uma análise de que tipo de átomos, possam estar a coordenar o vanádio devido a dados incompletos. Assim, para sugerir quais os átomos envolvidos na coordenação, era necessário recorrer a espectros de complexos com coordenação conhecida, de modo a relacionar a coordenação com os valores dos parâmetros de RPE. Alguns dados, de parâmetros de RPE de complexos de vanadilo com apoferritina, malonato, cianeto entre outros (Chasteen e Thail, 1982) existentes na literatura apresentam valores diferentes dos obtidos para a interação com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Os valores descritos, obtidos por RPE, para o complexo vanádio(IV)/F-actin:  $a_z$  (paralelo) = 195,6G;  $a_{x,y}$  (perpendicular) = 65 G;  $g_z$  (paralelo) = 1,9399;  $g_{x,y}$  (perpendicular) = 1,998 (Ramos *et al.*, 2009) também são diferentes, o que sugere que os diferentes complexos com o ião vanadilo originam valores específicos dos sinais de RPE. Contudo, o valor de  $g_z = 1,9625$  obtido está de acordo com o referenciado para o valor de  $g_z$  para o vanadilo em espectros de RPE, que em geral são inferiores ao valor teórico para o eletrão livre, observando-se em geral para o vanadilo um valor de cerca de 1,95 para o  $g_z$  (Smith *et al.*, 2002).

Relativamente ao efeito da presença de antioxidantes, a presença de GSH, quercetina ou canferol, não revertem a inibição induzida pelos oxometalatos, apesar de se ter verificado uma reversão da oxidação da cisteína pelo vanadato em presença de quercetina. Portanto, os resultados sugerem que o vanadato induz oxidação da cisteína, mas que esta oxidação não modula a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

Provavelmente, os resíduos de cisteína que estão localizados próximo ao local de ligação de nucleótidos, tais como Cys675 ou Cys674, não são particularmente importantes na modulação da atividade da enzima. Por outro lado têm sido descrito que a ligação do decavanadato à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pode envolver todos os três domínios citoplasmáticos, mas mais perto do local de fosforilação da proteína (Hua *et al.*, 2000; Toyoshima *et al.*, 2000). A ligação do decavanadato prevê que a molécula de  $V_{10}$  encaixa na proteína como uma bola, o que impede a mudança para a conformação que permite a libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  (Toyoshima *et al.*, 2000). Este local de ligação poderia explicar o efeito inibitório que o decavanadato apresenta na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Num outro estudo, observaram-se resultados similares aos obtidos neste trabalho, assim verificou-se que a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS de musculo-esquelético de coelho foi oxidada por  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ , sistema que gera radicais hidróxilo por reação de tipo Fenton, e a sua atividade inibida em 50 %. O uso de dois antioxidantes, trolox e stobadina, previnem a oxidação dos grupos tiol (SH) e a peroxidação lipídica mas não previnem a diminuição da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Voss *et al.*, 2008). Contudo, a reversão da atividade por antioxidantes foi observada num estudo recente, em que o *t*-BHP (*tert*-butil-hidroperóxido), molécula que gera a produção de ROS, diminui significativamente a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membranas de hepatócitos de rato, sendo essa atividade revertida em 40 % por GSH e 20 % pelo antioxidante sintético BHT (butil-hidroxitolueno), tendo sido sugerido que a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase envolve a oxidação de grupos tiol (Singh *et al.*, 2012).

Salienta-se ainda que os estudos efetuados no presente trabalho, em que se utilizaram soluções de decavanadato teve-se em conta que a espécie  $V_{10}$  tem um tempo de semivida entre 5 e 12 horas, a 25 °C, e cerca de 3 horas a 37 °C dependendo do meio (composição da solução) e temperatura em que se efetuam os ensaios (Aureliano *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2007a; Soares *et al.*, 2007b; Soares *et al.*, 2007d; Soares *et al.*, 2008a).

A maior parte dos estudos com espécies de vanádio ou com complexos orgânicos de vanádio não têm em conta a estabilidade das soluções de vanádio. Neste estudo, a maioria dos ensaios não foram além dos 10 a 30 minutos e à temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C, pelo que o tempo de duração dos ensaios é muito menor que o tempo

de semivida determinado para o  $V_{10}$  de modo a assegurar que os efeitos biológicos são devidos maioritariamente à presença do  $V_{10}$  nas soluções deste oxometalato (Aureliano e Madeira, 1994a; Aureliano *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2007b; Soares *et al.*, 2007d; Soares *et al.*, 2008; Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2010). Se não se tivesse em conta a estabilidade das espécies ou complexos de vanádio apenas se poderia especular sobre a origem dos efeitos observados. De facto tem sido mostrado por RMN que estes compostos de vanádio, podem em solução originar a complexos de vanádio com diferentes estados de oxidação (Aureliano *et al.*, 2008). Portanto, além dos fatores conhecidos da complexidade química que o vanádio apresenta, nomeadamente os múltiplos estados de oxidação, a semelhança existente entre o vanadato e o fosfato, a ocorrência de vários oligómeros de vanádio em solução e a possibilidade de formação de complexos de vanádio com várias moléculas que apresentam atividade biológica com interesse, pode-se adicionar ainda, a importância de determinar a estabilidade das espécies de vanádio ou complexos de vanádio em solução, antes de, como referido na secção anterior (secção 5.2), se especular sobre os efeitos.

### 5.3 Interação de oxometalatos com a $Ca^{2+}$ -ATPase por espectroscopia de absorção atômica (EAA), espectroscopia de $^{51}V$ -RMN e espectroscopia Raman

Os estudos por EAA foram efetuados em meios com as condições necessárias para induzir as diferentes conformações da  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS (Aureliano e Madeira, 1994a). Por isso, através da EAA foi possível avaliar a interação de  $V_1$  e  $V_{10}$  com a  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, nas suas diferentes conformações, correspondentes aos diferentes passos do mecanismo da translocação de cálcio, utilizando concentrações na ordem de  $\mu M$  que são cerca de 1000 vezes mais baixas do que as usadas na espectroscopia de  $^{51}V$ -RMN.

Verificou-se que o decavanadato apresenta uma maior interação com a  $Ca^{2+}$ -ATPase de SR em todas as conformações o que pode sugerir uma concordância com os resultados obtidos nos ensaios da atividade com o tempo de incubação, uma vez que o  $V_{10}$  é a espécie que apresenta uma diminuição crescente da sua atividade em função do tempo de incubação. Pode-se observar que há uma interação de ambos os oxometalatos com a  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS, sendo que o decavanadato possui uma interação superior em todas as conformações em especial nas conformações E1 e E1P, esta superior capacidade de ligação superior está de acordo com o que tem sido evidenciado por outras técnicas de estudo da interação metal-

proteína nomeadamente por  $^{51}\text{V}$ -RMN ou fluorescência (Csermely *et al.*, 1985a; Csermely *et al.*, 1985b; Aureliano, 2000; Aureliano e Gândara, 2005; Aureliano e Crans, 2009).

Está descrito que  $V_{10}$  se liga à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase no sítio nucleótido da sua estrutura (Hua *et al.*, 2000). Alguns ensaios *in vitro* mostraram que a espécie  $V_{10}$  liga-se à miosina ATPase (Tiago *et al.*, 2004a; Tiago *et al.*, 2007), e também induz a translocação de cálcio pelo RS mimetizando o segundo mensageiro inositoltrifosfato ( $\text{IP}_3$ ) (Fohr *et al.*, 1991), além de outros efeitos e interações (Aureliano e Gândara, 2005; Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009). Estes exemplos são demonstrativos de uma grande variedade de interações entre o  $V_{10}$  e diferentes proteínas, nomeadamente em enzimas que tenham sítios de ligação com o inositol 3-fosfato, sítios de ligação de nucleótidos ou sítios de ligação polifosfato próximo do domínio de ligação ao substrato ou em sítios alostéricos. Contudo, não se encontram habitualmente descritos estudos de estequiometria de ligação entre  $V_{10}$  e proteínas, particularmente utilizando a EAA. Obteve-se uma estequiometria de ligação  $V_{10}:\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1:1 (Fig. 4.19 e 4.20), embora em estudos anteriores tivesse sido sugerida uma relação metal:proteína de 1:1 e 2:1, respetivamente para o  $V_1$  e  $V_{10}$ . Nesses estudos, sugere-se a existência na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de mais de um sítio de ligação para o polioxovanadato contendo 10 átomos de vanádio (Varga *et al.*, 1985; Csermely *et al.*, 1985b; Hua *et al.*, 2000). Assim, o  $V_{10}$  poderia ligar-se ao sítio de ligação do vanadato na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, mas para concentrações elevadas poderá ligar-se também ao sítio de ligação nucleótido como foi previamente determinado por fluorescência e espectroscopia de RPE (Inesi *et al.*, 1984; Coan *et al.*, 1986). A estequiometria 1:1 obtida neste trabalho revela apenas um local de ligação entre  $V_{10}$  e proteína, sugerindo apenas um local de ligação como descrito por Toyoshima (Toyoshima *et al.*, 2000).

Também se analisou a interação de  $V_{10}$  com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase na estequiometria 1:1 em presença de heparina, normalmente descrita como um análogo do ATP, e referida em alguns estudos como inibidor da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática (Felix *et al.*, 2007), e na presença de decaniobato ( $\text{Nb}_{10}$ ), um polioxometalato contendo 10 átomos de nióbio, com uma estrutura idêntica ao  $V_{10}$ , sendo isoeletrónicos ambos o polioxometalatos mas em que o decaniobato tem uma elevada estabilidade em solução (Ohlin *et al.*, 2009b; Villa *et al.*, 2009). Relativamente à heparina, esta não revelou afetar a interação do  $V_{10}$  com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, provavelmente a heparina não se ligará no mesmo local do decavanadato. Por outro lado o decaniobato reverte a associação  $V_{10}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, sugerindo que o decavanadato e o decaniobato competem para o mesmo sítio de ligação à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase na ausência de ATP, enquanto na presença de ATP esta ligação é prevenida. O facto de também ambos serem

inibidores não competitivos pode indicar que terão o mesmo local de ligação uma vez que são moléculas isoestruturais. Assim, pode-se afirmar que o ATP não reverte a interação entre  $V_{10}$  e a  $Ca^{2+}$ -ATPase mas previne a competição observada entre  $V_{10}$  e  $Nb_{10}$  para a ligação metal:proteína. Talvez a similaridade existente nas cargas elétricas entre ATP (3-),  $V_{10}$  (6-) e  $Nb_{10}$  (6-) seja um indicador do facto de estas três moléculas poderem ligar-se ao sítio ativo da  $Ca^{2+}$ -ATPase, ou próximo do sítio ativo, ou numa porção do sítio ativo ou a diferentes conformações da  $Ca^{2+}$ -ATPase que se estabelecem no decurso do processo de translocação do cálcio acoplado à hidrólise do ATP. A ocorrência de domínios de ligação a aniões que podem ligar a decavanadato com elevada afinidade já foram descritos para ABC ATPases (Messmore e Raines, 2000). Também é conhecido que o decavanadato apresenta interação com a miosina em domínios de ligação ao fosfato que ocorrem na vizinhança dos denominados sítio de ligação “back-door” (Tiago *et al.*, 2004a; Tiago *et al.*, 2007). Com actina foi sugerido que o  $V_{10}$  tem uma interação eletrostática com ligação ao sítio de ligação ao ATP (Ramos *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011).

Relativamente à espectroscopia de RMN, esta tem sido uma das técnicas de referência no estudo da interação de oxometalatos de vanádio com a  $Ca^{2+}$ -ATPase. Os primeiros trabalhos em que se utilizou a  $^{51}V$ -NMR para explorar a interação entre oxovanadatos e proteínas, nomeadamente a  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS (Csermely *et al.*, 1985a), datam de meados dos anos 80, mas, desde então, o método tem sido aplicado a uma variedade de biomoléculas, incluindo proteínas musculares como a miosina e actina, entre outros (Inesi *et al.*, 1984; Aureliano e Madeira, 1994a; Tiago *et al.*, 2004b; Aureliano, 2009; Aureliano e Crans, 2009; Ramos *et al.*, 2010; Aureliano, 2011; Crans *et al.*, 2011). Em geral, estes estudos mostraram que na interação de proteínas com determinadas espécies de vanadato(V) eram induzidas mudanças na intensidade e na forma dos correspondentes sinais de vanadato de RMN. Em alguns estudos, estas alterações não foram observadas e a interação foi revertida pela presença dos ligandos naturais das proteínas (Aureliano e Madeira, 1994a; Tiago *et al.*, 2004b; Ramos *et al.*, 2010), proporcionando uma visão sobre os modos preferidos de interação do vanádio com esses substratos.

Os estudos de absorção atómica que mostraram que o decaniobato, oxometalato isoestrutural e isoeletrónico do  $V_{10}$ , previne a interação do decavanadato com a  $Ca^{2+}$ -ATPase (Fig. 4.22). O facto de a inibição pelo decavanadato ser não competitiva, como sugerido (Fig. 4.8), e que a interação com a  $Ca^{2+}$ -ATPase ocorre independentemente da conformação em que esta se encontra (Fig. 4.18), pode apontar para um modo específico de interação com a  $Ca^{2+}$ -

ATPase que é claramente diferente da descrita para vanadato. Esta observação, de acordo com estudos anteriores executados em condições funcionais muito perto às fisiológicas, significa que o decavanadato é a única espécie de vanádio capaz de prevenir a translocação de cálcio acoplada à hidrólise de ATP, ao passo que nenhum efeito foi encontrado para soluções de vanadato até concentrações de 2 mM (Aureliano e Madeira, 1994a). Deste modo, o recurso à espectroscopia de RMN para verificar os resultados obtidos por EAA é fundamental no sentido de considerar o Nb<sub>10</sub> uma ferramenta útil no esclarecimento da ação do decavanadato na Ca<sup>2+</sup>-ATPase. A análise dos espectros obtidos revelaram alargamentos de sinal semelhantes aos que têm sido descritos em diversos casos de interação de espécies oligoméricas de oxovanadatos com proteínas (Aureliano e Madeira, 1994a; Tiago *et al.*, 2004b; Ramos *et al.*, 2006; Aureliano e Crans, 2009; Ramos *et al.*, 2010) ou com a estrutura lipídica (Crans *et al.*, 2011). Contudo, em presença de Nb<sub>10</sub>, verifica-se uma diminuição do alargamento do sinal V<sub>10A</sub>, devido à interação V<sub>10</sub>-Ca<sup>2+</sup>-ATPase, quer na presença de ATP (Fig. 4.23d) ou na ausência de ATP (Fig. 4.24c e Fig. 4.24d). Estas observações confirmam que o Nb<sub>10</sub> reverte a interação de V<sub>10</sub>-Ca<sup>2+</sup>-ATPase, indicando que as espécies V<sub>10</sub> e Nb<sub>10</sub> competem para o mesmo local de ligação, um local que deverá ser diferente do local de ligação de ATP. Estes resultados complementam e comprovam a utilidade da EAA no estudo da interação de oxovanadatos com a Ca<sup>2+</sup>-ATPase e permitem deduzir os efeitos do decavanadato na Ca<sup>2+</sup>-ATPase comparando-os com o seu análogo isoestrutural, o decaniobato.

Neste trabalho, considerou-se a utilização da espectroscopia de Raman para analisar a Ca<sup>2+</sup>-ATPase nas conformações E1, E1P, E2 e E2P, e avaliar o efeito dos oxometalatos na interação com a proteína, de modo a verificar que alterações conformacionais são induzidas. Dado que, a espectroscopia de Raman, entre outros processos e aplicações, é uma técnica sensível a pequenas alterações estruturais de proteína, e tem sido uma ferramenta muito versátil para investigar modificações estruturais de proteínas resultantes de uma interação das proteínas com metais (Carey, 1982; Tuma, 2005). Tal como na espectroscopia de infravermelho, na espectroscopia de Raman, os espectros de Raman apresentam várias bandas que correspondem a modos de vibração específicos devidos a diferentes formas estruturais comuns observadas em proteínas ou a modos vibracionais específicos de ligações ou grupos funcionais existentes nas proteínas (Carey, 1982; Tu, 1982; Arp *et al.*, 2001; Thomas, 2002; Xie *et al.*, 2004; Tuma, 2005; Nielsen *et al.*, 2007). Entre estes, incluem-se uma banda a cerca de 855 cm<sup>-1</sup>, que pertence a resíduos de tirosina, e uma banda próximo de 930 cm<sup>-1</sup>, indicativa de presença de α-hélices (Tu, 1982; Arp *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004; Tuma, 2005) (Fig.

4.25). A espectroscopia de Raman foi utilizada para seguir a fosforilação de resíduos de tirosina de péptidos em que duas bandas entre 820 e 855  $\text{cm}^{-1}$  (Siamwiza *et al.*, 1975; Arp *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004) são observadas na ausência de fosforilação. Assim, num espectro de Raman de proteínas podem ser identificadas várias bandas que são sensíveis às alterações de conformação das proteínas. Estas bandas podem ser utilizadas para a avaliação de mudanças conformacionais de proteínas induzidas por fatores externos ou internos. Por exemplo, como resultado da fosforilação da tirosina em péptidos, são observadas duas bandas a cerca 825 e 853  $\text{cm}^{-1}$  (Siamwiza *et al.*, 1975; Arp *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004). A razão entre as intensidades destas bandas dá-nos indicações sobre a força da ligação de hidrogénio dos resíduos de tirosina (Siamwiza *et al.*, 1975; Arp *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004).

No presente estudo, esta ressonância de Fermi não foi observada e por isso o duplete de bandas não é visível, mas em vez disso observa-se uma banda a cerca 837  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 4.25). Tal observação pode ser interpretada de duas maneiras: i) as tirosinas não estão envolvidos em ligações de hidrogénio (Xie *et al.*, 2004), ou ii) os resíduos de tirosina quando fosforilados, leva ao colapso do duplete e uma única banda é observada (Siamwiza *et al.*, 1975; Arp *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004). Enquanto a primeira hipótese deve ser descartada, porque as tirosinas teriam estar voltadas para o interior da proteína em vez de interagirem com a água, o segundo é improvável porque é conhecido que a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é fosforilada no ácido aspártico (de Meis e Vianna, 1979; Inesi *et al.*, 1984).

Os espectros obtidos para a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, na conformação E1 e E2 (Fig. 4.26), não revelaram diferenças significativas, de acordo com observações efetuadas em estudos semelhantes em que se utilizou outra bomba iónica, isto é,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Raussens *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2007). Os espectros obtidos em presença dos oxometalatos revelam diferenças que são mais evidentes quando comparadas com o espectro da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase na conformação E1. Essas diferenças são mais pronunciadas em alterações de intensidade observadas no pico a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , que está relacionado com a vibração correspondente ao grupo carbonilo da amida I, e indica alterações na estrutura secundária e em alterações na intensidade do pico a 1150  $\text{cm}^{-1}$  que podem ser devidas provavelmente às alterações induzidas pelos metais nos grupos metileno das moléculas de lípidos (Nielsen *et al.*, 2007) o que pode sugerir um efeito sobre a estrutura da membrana lipídica.

Nota-se que a presença do ligando natural da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, o ATP, induz alterações conformacionais mais pronunciadas que as interações com os oxometalatos relativamente à conformação E1 (Fig. 4.25). Este facto, poderá estar relacionado em que após a ligação de

cálcio dentro do domínio transmembranar, a ligação do ATP próxima dos domínios N e P, induzem diferenças no arranjo dos domínios citoplasmáticos, tais como o domínio de ligação de ATP e o domínio de fosforilação, que se traduz no movimento das hélices transmembranares de modo a fechar a passagem transmembranar do local de ligação do cálcio. Por isso, além das alterações conformacionais induzidas pelo cálcio, a fosforilação também pode induzir fortes transições conformacionais.

Relativamente ao efeito dos oxometalatos, é sugerido que decavanadato e decaniobato induzam alterações conformacionais semelhantes na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, que são diferentes das observadas nas conformações E1 ou E2, uma vez estes oxometalatos promovem alterações semelhantes nos espectros de Raman (Fig. 4.29 e Fig. 4.30). Relativamente a W e Mo, estes oxometalatos promovem alterações de conformação nitidamente diferentes das observadas na interação dos oxometalatos de vanádio e nióbio.

Tendo em conta as observações acima referidas, sugere-se que o tungstato induz o mesmo tipo de mudanças estruturais que são muito semelhantes aos observados na fosforilação por fosfato inorgânico, ou seja, semelhantes à conformação E2 ou E2P (Fig. 4.35) enquanto que molibdato induz mudanças estruturais semelhantes à conformação E1P (Fig. 4.28A). Por outro lado o decaniobato, vanadato e decavanadato causam alterações diferentes, correspondentes a um tipo de espectro que não corresponde aos espectros descritos para as conformações E1, E1P, E2 e E2P. No entanto, estes últimos oxometalatos interagem com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em ambas as conformações, E1 e E2, provocando alterações conformacionais observadas por espectroscopia de Raman. Ao contrário, tungstato e o molibdato aparentemente parecem induzir conformações muito semelhantes às conformações E2 ou E2P e E1P, respetivamente. Assim, a espectroscopia de Raman mostrou ser uma ferramenta de diagnóstico útil para fornecer informações adicionais sobre o efeito da oxometalatos na conformação  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e, como tal, complementar o uso já conhecido das técnicas de RMN e RPE na interação de metais com proteínas.

## **Capítulo 6**

---

### **Conclusões**

---

## 6 Conclusões

Os oxometalatos de vanádio, nióbio, tungstênio e molibdênio inibem a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático com os seguintes valores de  $\text{IC}_{50}$ : 15, 35, 50, 400  $\mu\text{M}$  e 45 mM, respetivamente, para decavanadato, decaniobato, vanadato, tungstato e molibdato. Por conseguinte,  $\text{V}_{10}$  é o inibidor mais potente desta enzima do tipo P, seguido de perto por  $\text{Nb}_{10}$ , sendo por isso os polioxometalatos mais efetivos do que os correspondentes oxometalatos monoméricos.

O estudo da interação de vanadatos com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase por espectrofotometria de absorção atômica, que podendo detetar concentrações muito baixas de metais, mostrou-se muito vantajosa. Mostrou-se que a estequiometria de ligação  $\text{V}_{10}$ :  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é de 1:1, e que o  $\text{V}_{10}$  liga-se numa extensão semelhante em todas as conformações da enzima, ou seja, E1, E1P, E2 e E2P que ocorrem durante o processo de translocação de cálcio por transporte ativo. Em contraste, foi demonstrado que a espécie monomérica de vanadato ( $\text{V}_1$ ) liga-se preferencialmente à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase apenas para as conformações E2 e E2P, enquanto para as conformações E1 e E1P a ligação não é favorecida. Um  $K_d$  de 1  $\mu\text{M}$ , foi determinado para a constante de dissociação  $\text{V}_{10}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Concluiu-se que o  $\text{V}_{10}$  mostra uma interação específica com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, em comparação com outros oxometalatos.

Assim, o  $\text{V}_{10}$  é um inibidor não competitivo e induz a oxidação de cisteínas na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, ao contrário de  $\text{Nb}_{10}$ , W e Mo. A inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase não é revertida por GSH ou quercetina, mas a oxidação das cisteínas é parcialmente prevenida por antioxidantes, tais como quercetina. Verificou pela primeira vez que o  $\text{Nb}_{10}$  inibe a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, e que o faz de um modo não competitivo em relação ao substrato nativo, o ATP. Estes dados levam-nos a concluir que o local de ligação à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do  $\text{V}_{10}$  e  $\text{Nb}_{10}$  será o mesmo. Por outro lado, o  $\text{Nb}_{10}$  como é estável nas condições experimentais, sendo uma espécie isoestrutural e isoeletrónica do  $\text{V}_{10}$  mostrou ser uma excelente ferramenta para clarificar o modo de interação e os efeitos de  $\text{V}_{10}$  na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

A interação de decavanadato com proteínas, nomeadamente com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, pode afetar os grupos tiol com a consequente redução de vanadato a vanadilo. Considera-se que as presentes observações possam contribuir para a compreensão das interações dos oxometalatos com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e o papel do  $\text{V}_{10}$  na biologia celular, em particular no mecanismo de interação do  $\text{V}_{10}$  com as bombas iónicas.

A espectroscopia Raman permite uma nova abordagem na interação dos oxometalatos com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, podendo observar-se que distintas alterações conformacionais na

proteína são induzidas pela presença de diferentes oxometalatos, semelhantes à E1P, E2 e E2P ou a nenhuma das conformações estabelecidas para o ciclo catalítico da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Especificamente que molibdato e tungstato induzem E1P ou E2 e E2P, respetivamente, enquanto decavanadato, decaniobato e vanadato monomérico induzem outras conformações.

Sugere-se que devido à redução do vanadato, bem como o modo não competitivo da inibição induzida pelo  $\text{V}_{10}$  na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, as espécies monoméricas de molibdato e tungstato se comportam de maneira diferente em relação à interação de  $\text{V}_{10}$  com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS. Conclui-se que os oxometalatos induzem diferentes efeitos sobre a estrutura e na função da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

## Capítulo 7

---

### **As bombas iónicas como alvos de ação de fármacos e oxometalatos**

---

## 7.1 Introdução

A descoberta acidental de que vanádio atuava como um inibidor de bombas iônicas, tais como  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ( $\text{IC}_{50} = 40 \text{ nM}$ ) (Cantley *et al.*, 1977), leva-nos, mais de 30 anos depois, para a discussão das aplicações de oxometalatos e polioxometalatos como potenciais fármacos no tratamento da várias doenças cujos alvos moleculares estão estabelecidos serem precisamente bombas iônicas:  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase,  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Yatime *et al.*, 2009). Estas enzimas são classificadas como ATPases do tipo P, em que o processo de transporte de íons está acoplado à hidrólise de ATP. O mecanismo é bem conhecido, e envolve pelo menos quatro etapas e duas conformações proteicas, E1 e E2 (de Meis e Vianna, 1979). Durante o processo de transporte de íons através da membrana, estas conformações das proteínas podem ser fosforiladas pelo ATP ou por fosfato inorgânico, respetivamente. As três principais características estruturais destas ATPases do tipo P incluem um domínio de ligação de nucleotídeo, localizado no lado citoplasmático, um sítio de ligação de fosforilação e um sítio de ligação dos catiões localizado na região transmembranar (de Meis e Vianna, 1979; Toyoshima *et al.*, 2000). Esses domínios podem ser alvos potenciais de inibidores utilizados como agentes terapêuticos, embora o conhecimento do mecanismo de ação, de muitos fármacos ainda se encontre por esclarecer.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (RS) tem a função de remover o cálcio intracelular levando ao processo de relaxamento muscular (de Meis e Vianna, 1979; Aureliano, 2011). O processo de transporte de cálcio e/ou hidrólise de ATP pode ser inibido por vanadato, particularmente em condições onde é favorecida a conformação de E2, formando-se um análogo da conformação E2P (Aureliano e Madeira, 1994a), por isso as ATPases do tipo P também são caracterizadas por serem inibidas pelo vanadato (Pedersen e Carafoli, 1987). Nos estudos apresentados no capítulo anterior, confirmou-se claramente que, em comparação com o vanadato, o decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) é um inibidor mais potente, sendo que a interação não é impedida quando a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase se encontra noutras conformações, E1, E1P, E2 ou E2P, contrariamente ao que acontece com o vanadato. Assim, a interação de  $\text{V}_{10}$  com a proteína não é prevenida pela presença de  $\text{Ca}^{2+}$  ou ATP, enquanto a inibição é não competitiva, relativamente ao ATP (Fraqueza *et al.*, 2012a).

Além disso, durante o mecanismo de inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pelo decavanadato, ocorre oxidação de cisteínas na proteína e simultaneamente o decavanadato é reduzido, embora as implicações desse processo ainda não se encontrem completamente esclarecidas (Fraqueza *et al.*, 2012b).

Existem por outro lado algumas drogas e/ou fármacos conhecidos como inibidores de bombas iônicas tais como: ouabaína, omeprazol, tapsigargina (TG), entre outros, mas apenas para alguns foram claramente estabelecidos mecanismos e sítios de ligação nas ATPases (Yatime *et al.*, 2009). A maioria destes inibidores das bombas iônicas ligam-se às proteínas perto ou dentro do domínio transmembranar bloqueando a entrada dos catiões, principalmente quando a proteína está na conformação E2 (Yatime *et al.*, 2009), enquanto os oxometalatos interatuam com a proteína no lado citoplasmático no domínio nucleotídeo ou num lobo esférico que envolve os três domínios citoplasmáticos (Toyoshima *et al.*, 2000). Entre as ATPases do tipo P, os principais inibidores da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase são os esteroides cardiotônicos (CTS), sendo para a  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase, os designados como inibidores da bomba de prótons (PPI) e, mais recentemente, os bloqueadores ácidos competitivos do potássio (PCAB). Para a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase temos a tapsigargina, o ácido ciclopiazônico (CPA) e vanadato como inibidores conhecidos, entre outros. Assim, verifica-se que as bombas iônicas são alvos moleculares potenciais para compostos utilizados como antiulcerosos, anticancerígenos e na isquemia cardíaca, entre outras doenças. Estes compostos que têm sido descritos como potentes inibidores de bombas iônicas, embora os mecanismos de ação não estejam completamente compreendidos, em alguns casos, enquanto para outros, ainda não estão completamente estabelecidos. Por outro lado, as potenciais aplicações de oxometalatos e polioxometalatos em farmacologia e medicina, bem como a compreensão dos seus efeitos nos vários processos bioquímicos são assuntos de interesse crescente na atualidade.

Assim, este capítulo apresenta como perspectiva analisar e comparar os vários mecanismos e sítios de ligação nas bombas iônicas, de fármacos inibidores das bombas iônicas e compará-los com diferentes oxometalatos e polioxometalatos. Por exemplo, a capacidade de inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase por estes oxometalatos não é muito diferente dos fármacos conhecidos. Destaca-se, neste capítulo, o decavanadato como sendo um forte inibidor da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ( $\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$ ), o qual apresenta interações específicas com a proteína. Estas perspectivas podem ser úteis para desenvolver estratégias de incluir este polioxometalato em futuros compostos com aplicações terapêuticas. De entre as interações específicas de  $\text{V}_{10}$  com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase destacam-se: inibidor não-competitivo, relativamente ao ATP; a sua ligação não é impedida por qualquer das conformações  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, liga-se num lobo esférico na região citoplasmática envolvendo vários domínios; induz oxidação de cisteínas e formação de vanadilo. A maioria dos fármacos ligam-se à proteína dentro domínio transmembranar, bloqueando a entrada de catiões, somente quando as ATPases estão nas

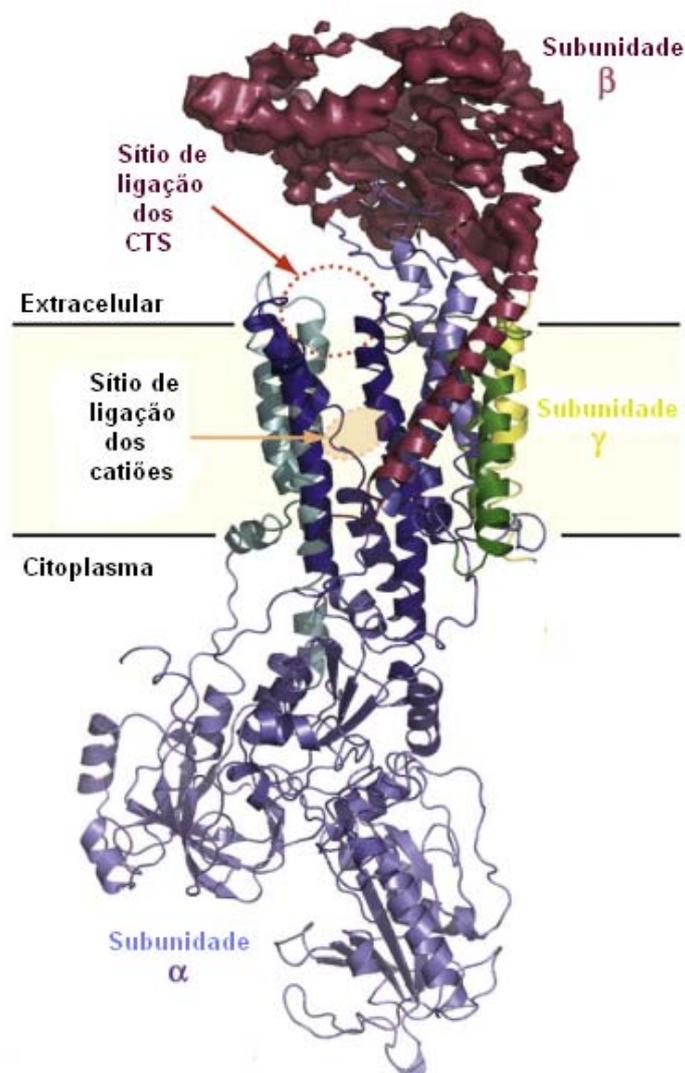
conformações mais favoráveis, E2 ou E2P. Apresentam-se, neste capítulo, estudos sobre interações de oxometalatos e polioxometalatos com bombas iônicas, e compara-se o seu modo de ação com outros inibidores de bombas iônicas, conhecidos para serem utilizados como drogas terapêuticas. Deste modo, analisaram-se 18 classes de compostos conhecidos como inibidores de bombas iônicas, num total de 44 compostos em que apenas para dez compostos são conhecidos os mecanismos de ação.

## 7.2 Inibidores de Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

Os inibidores da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase incluem compostos utilizados para o tratamento de doenças diversas, tais como: insuficiência cardíaca, antipsicóticos, antimalária, sendo também usados como anestésicos, promotores tumorais, antibióticos e agentes de insulino-miméticos (Tabela 7.1). Como foi descrito acima, o vanadato é um conhecido inibidor da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, ou seja, um inibidor de ATPases do tipo P, que bloqueia a bomba na sua conformação E2P. Também os esteroides cardiotônicos (CTS), tais como a ouabaína, são fortes inibidores da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase com valores de IC<sub>50</sub> abaixo de 1 μM (Tabela 7.1). Os CTS bloqueiam o mecanismo de translocação de catiões de forma semelhante ao vanadato, nomeadamente por ligação na conformação E2P, embora se possam ligar a vários estados conformacionais da bomba, que ocorrem durante o processo de transporte. Relativamente à ouabaína, esta inibe a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase através de ligação à Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pelo lado extracelular (Fig. 7.1). Esta inibição induz um aumento da concentração intracelular de Na<sup>+</sup> que conduz a um aumento da concentração de cálcio através do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (Paula *et al.*, 2005; Schoner e Scheiner-Bobis, 2007; Yatime *et al.*, 2009). Esta associação entre a bomba e o trocador leva a um aumento da concentração de cálcio intracelular e logo induz o processo de contração muscular e por isso este tipo de compostos caracterizam-se como medicamentos cardiotônicos.

Devido à relevância que as bombas iônicas têm na homeostasia do cálcio, a ouabaína também tem sido usada no tratamento de tumores mamários (Böttinger e Habermann, 1984; Dzimiri e Almotrefi, 1991; Juhaszova e Blaustein, 1997; Scheiner-Bobis e Schneider, 1997; Ihenetu *et al.*, 2007; de Pont *et al.*, 2009; Wansapura *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010).

Além dos CTS conhecem-se outros inibidores da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase usados como fármacos, nomeadamente a clorpromazina, um medicamento antipsicótico (Tabela 7.1), a cloroquina (IC<sub>50</sub> não encontrado) um conhecido agente anti malária, e o antibiótico gramicidina A (IC<sub>50</sub> = 8 μM).



**Figura 7.1** – A ligação dos inibidores esteroides cardiotônicos (CTS) na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase localiza-se na zona extracelular junto à entrada do canal de saída dos íons (Adaptado de Yatime *et al.*, 2009).

Uma vez que estes fármacos também afetam outras proteínas ou os efeitos sobre a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase são apenas observados para concentrações mais elevadas, a nosso conhecimento, não foram descritos mecanismos bioquímicos de ação envolvendo a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase para esses fármacos (Bhattacharyya e Sen, 1999). Entre os inibidores da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase referidos na tabela 7.1 (Böttinger e Habermann, 1984; Dzimiri e Almotrefi, 1991; Ishida *et al.*, 1993; Juhaszova e Blaustein, 1997; Scheiner-Bobis e Schneider, 1997; Bhattacharyya e Sen, 1999; Kutchai e Geddis, 2001; Ihenetu *et al.*, 2007; Coca *et al.*, 2008; Takada *et al.*, 2008; de Pont *et al.*, 2009; Wansapura *et al.*, 2009; Wu, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Čolović *et al.*, 2011), foi descrito o mecanismo de ação de alguns esteroides cardiotônicos, tais como a ouabaína. Neste caso, a ouabaína liga-se à  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase na

interface da membrana perto da entrada do sítio de ligação do catião (Fig. 7.1) quando a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase se encontra na conformação E2P, tal como referido. São fundamentais nesta interação, os resíduos de aminoácidos localizados entre as hélices transmembranares TM2 e TM1, entre outras como TM5 e TM6. Não é claro se os CTS com diferentes tamanhos ou em conformações diferentes da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase vão se ajustar a este local de ligação ou mesmo se eles bloqueiam a entrada de catiões com a mesma potência (Croyle *et al.*, 1997; Yatime *et al.*, 2009).

Além de vanadato, também o tungstato e polioxotungstatos são conhecidos por inibir a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Para esta enzima, polioxotungstatos ( $\text{W}_{12}$ ) apresentam uma maior capacidade de inibição com um  $\text{IC}_{50}$  cerca de 3  $\mu\text{M}$  (Čolović *et al.*, 2011) enquanto o tungstato apresenta uma menor capacidade de inibição ( $\text{IC}_{50} = 1,5 \text{ mM}$ ) para  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, mas muito mais significativa capacidade de inibição para a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de RS ( $\text{IC}_{50} = 400\mu\text{M}$ ). Para a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase verificou-se que o tungstato apresenta um tipo inibição competitivo relativamente ao ATP (Capítulo 4, secção 4.2.3). Portanto, os oxometalatos e polioxometalatos, são fortes inibidores de bombas iônicas tal como se verifica com certos fármacos, que têm como alvos as bombas iônicas.

### 7.3 Inibidores de $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase

Entre os inibidores da  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase incluem-se fármacos antiulcerosos, antivirais e antibióticos (Tabela 7.1). As doenças gástricas são muito dolorosas e podem levar à ulceração da mucosa gástrica por isso, normalmente, a inibição da  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase é uma estratégia para evitar a segregação ácida e assim prevenir o agravamento da ulceração que ocorre nestas patologias. Os primeiros inibidores da bomba de prótons (PPI), foram compostos derivados de benzimidazol, como o omeprazol, que apresenta valores de  $\text{IC}_{50}$  de cerca de 3-4  $\mu\text{M}$ , superiores ao  $\text{IC}_{50}$  dos bloqueadores ácidos competitivos com o potássio (PCAB) ( $\text{IC}_{50}=0,1 \mu\text{M}$ ) ou dos compostos com propriedades antibióticas como as prodigiosinas ( $\text{IC}_{50} = 0,03 \mu\text{M}$ ) (Keeling *et al.*, 1985; Asano *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 1990; Beil *et al.*, 1992; Kataoka *et al.*, 1995; Seto-Young *et al.*, 1997; Matsuya *et al.*, 2000; Farley *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2007). Relativamente aos inibidores da bomba de prótons (PPIs), estes ligam-se à bomba também na conformação E2P, em que no caso do omeprazol, o mecanismo de inibição descrito implica uma reação irreversível em que o omeprazol é convertido na sua forma ativa, o ácido sulfénico ou a sulfenamida que vai reagir com os resíduos de cisteína da proteína, levando à inibição da  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Shin e Sachs, 2006; Sachs *et al.*, 2007; Yatime *et al.*, 2009).

**Tabela 7.1** – Valores de IC<sub>50</sub>, K<sub>d</sub> e aplicações terapêuticas de compostos inibidores de ATPases do tipo P.

Classe de inibidor	Compostos	IC <sub>50</sub> [μM]	K <sub>d</sub> [nM]	Aplicações terapêuticas	Referências
<b>Inibidores de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase</b>					
<b>Esteroides cardiotônicos (CTS)</b>	Ouabaína	> 10		Tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e arritmia cardíaca	(Juhaszova e Blaustein, 1997)
		0.01-0.5			(Juhaszova e Blaustein, 1997)
		0.600			(Ihenetu <i>et al.</i> , 2007)
		2.2			(Böttinger e Habermann, 1984)
		0.08-0.32			(Böttinger e Habermann, 1984)
		1.8			(Dzimiri e Almotrefi, 1991)
		1-100			(Wansapura <i>et al.</i> , 2009)
		60	27.7		(De Pont <i>et al.</i> , 2009)
			28		(Scheiner-Bobis e Schneider, 1997)
			1		(Scheiner-Bobis e Schneider, 1997)
	dihidro-ouabaína	> 1000		(Zhang <i>et al.</i> , 2010)	
	Digoxina	0.910		(De Pont <i>et al.</i> , 2009)	
	Digoxigenina	20		(Ihenetu <i>et al.</i> , 2007)	
	Strofantidina	> 100		(De Pont <i>et al.</i> , 2009)	
	Ouabagenina	160		(De Pont <i>et al.</i> , 2009)	
		> 1000		(De Pont <i>et al.</i> , 2009)	
<b>Clorpromazina</b>	Clorpromazina (CPZ)		K <sub>d1</sub> = 32500	Fármaco antipsicótico fototóxico	(Bhattacharyya e Sen, 1999)
		62.5	K <sub>d2</sub> = 142500		(Kutchai e Geddis, 2001)

Classe de inibidor	Compostos	IC <sub>50</sub> [μM]	K <sub>d</sub> [nM]	Aplicações terapêuticas	Referências
<b>Inibidores de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase</b>					
<b>Cloroquina</b>	Cloroquina (CLQ)	n.d.*	K <sub>d1</sub> = 20000 K <sub>d2</sub> = 115000	Fármaco antimalária	(Bhattacharyya e Sen, 1999)
<b>Procaína e derivados</b>	Procaína	17700		Anestésicos locais	(Kutchai e Geddis, 2001)
	Cloroprocaína	13000			(Kutchai e Geddis, 2001)
	Bupivacaína	6700			(Kutchai e Geddis, 2001)
	Mepivacaína	> 10000			(Kutchai e Geddis, 2001)
	Lidocaína	30400			(Kutchai e Geddis, 2001)
<b>Palitoxina</b>	Palatoxina (PTX)	0.8		Promotor tumoral	(Bötttinger e Habermann, 1984)
		0.2-0.45			(Bötttinger e Habermann, 1984)
		0.0035			(Scheiner-Bobis e Schneider, 1997)
		0.4 -3.1	20000		(Ishida <i>et al.</i> , 1993; Coca <i>et al.</i> , 2008; Wu, 2009)
<b>Gramidicina A</b>	Gramidicina A	8.1		Antibiótico	(Takada <i>et al.</i> , 2008)
<b>Compostos de tungstênio</b>	Ácido tungstosilícico, (W <sub>12</sub> ) H <sub>4</sub> SiW <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (WSiA)	3.4-4.3		Propriedades insulino- miméticas	(Čolović <i>et al.</i> , 2011)
	Ácido tungstofosfórico, (W <sub>12</sub> ) H <sub>3</sub> PW <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (WPA)	2.9-3.1			(Čolović <i>et al.</i> , 2011)
	Tungstato de sódio (W <sub>1</sub> )	1300-1500			(Čolović <i>et al.</i> , 2011)

\* Não determinado

Classe de inibidor	Compostos	IC <sub>50</sub> [μM]	K <sub>d</sub> [nM]	Aplicações terapêuticas	Referências
<b>Inibidores de H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase</b>					
<b>Inibidores da bomba de prótons (PPIs)</b>	Omeprazol	30		Agentes antiúlcerosos (úlceras gástricas e duodenais)	(Matsuya <i>et al.</i> , 2000)
		50			(Seto-Young <i>et al.</i> , 1997)
		2.4			(Beil <i>et al.</i> , 1992)
		3.9			(Keeling <i>et al.</i> , 1985)
		36			(Keeling <i>et al.</i> , 1985)
	Pantoprazol	6.8			(Beil <i>et al.</i> , 1992)
<b>Bloqueadores ácidos competitivos com o potássio (PCABs)</b>	SCH 28080 (2-metil-8- (fenilmetoxi)imidazo-[1,2]- piridina-3-acetonitrilo)	14.3		Agentes antiúlcerosos (úlceras gástricas e duodenais)	(Farley <i>et al.</i> , 2001)
	Soraprazan	0.1	26.4		(Simon <i>et al.</i> , 2007)
<b>Diterpenoides</b>	Ácido scopadúlcico B (SA-B)	54		Agente antiviral	(Asano <i>et al.</i> , 1990)
	Diacetil scopadol (DAS)	20-30			(Hayashi <i>et al.</i> , 1990)
<b>Prodigiosinas</b>	Prodigiosina 25-C	17		Antibióticos	(Asano <i>et al.</i> , 1990)
	Prodigiosina	0.03			(Kataoka <i>et al.</i> , 1995)
	Metacicloprodigiosina	1.5			(Matsuya <i>et al.</i> , 2000)
		3.0			(Matsuya <i>et al.</i> , 2000)

Classe de inibidor	Compostos	IC <sub>50</sub> [μM]	K <sub>d</sub> [nM]	Aplicações terapêuticas	Referências
<b>Inibidores de Ca<sup>2+</sup>-ATPase</b>					
<b>Tapsigargina</b>	Tapsigargina (TG)	0.029		Profármaco para a terapia de tumores na próstata	(Johnson <i>et al.</i> , 2002) (Sagara e Inesi, 1991; Geng e Lotz, 1995) (Moreno <i>et al.</i> , 2008)
		0.001			
		0.01674			
<b>Ácido ciclopiazónico</b>	Ácido ciclopiazónico (CPA)		7	Ação cardioprotetora na isquemia do miocárdio	(Soler <i>et al.</i> , 1998) (Yard <i>et al.</i> , 1994) (Yard <i>et al.</i> , 1994) Geng e Lotz, 1995)
		0.2			
		1.0			
		3.0			
<b>Lactonas macrocíclicas</b>	Ciclosporina A	62		Agentes imunossupressores, agente antihelmintico (Ivermectin)	(Bilmen <i>et al.</i> , 2002) (Ahern <i>et al.</i> , 1999) (Bilmen <i>et al.</i> , 2002) (Bilmen <i>et al.</i> , 2002)
	Ivermectina	3.54			
		14.9			
	Rapamicina	77			
<b>Curcuminoides</b>	Curcumina	15.0	K <sub>d1</sub> = 550 K <sub>d2</sub> = 10000	Agentes antitumorais, antioxidantes, antiartríticos, antiamiloides e anti- inflamatórios	(Logan-Smith <i>et al.</i> , 2001) (Bilmen <i>et al.</i> , 2001)
		7.0 - 17.0			
<b>2,5-di-(<i>t</i>-butil)-dihidroxiquinona</b>	BHQ (2,5-di-( <i>t</i> -butil)- dihidroxiquinona)		200	Agente antioxidante	(Logan-Smith <i>et al.</i> , 2001)
<b>Celecoxib</b>	Celecoxib	35		Fármaco anti- inflamatório	(Grösch <i>et al.</i> , 2006) (Johnson <i>et al.</i> , 2002)
		35			

Classe de inibidor	Compostos	IC <sub>50</sub> [μM]	K <sub>d</sub> [nM]	Aplicações terapêuticas	Referências
<b>Inibidores de Ca<sup>2+</sup>-ATPase</b>					
	Vanadato monomérico (V <sub>1</sub> )	50			(Fraqueza <i>et al.</i> , 2012)
	Decavanadato (V <sub>10</sub> )	15	1000		(Fraqueza <i>et al.</i> , 2012)
	PDC-V(V)- piridina-2,6- dicarboxilatodioxovanádio(V)	25			(Aureliano <i>et al.</i> , 2008)
	BMOV bis(maltolato)oxovanádio(IV)	40			(Aureliano <i>et al.</i> , 2008)
<b>Compostos de vanádio</b>	Vanadato monomérico (V <sub>1</sub> )	80		Propriedades insulino- miméticas	(Aureliano <i>et al.</i> , 2008)
	HIDA-V(IV) - bis( <i>N</i> - hidroxiliminodiacetato) vanádio(IV)	325			(Aureliano <i>et al.</i> , 2008)
	Complexo vanádio(V):citrato (VC) (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> [V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ].6H <sub>2</sub> O	500			(Aureliano <i>et al.</i> , 2005)
	Complexo peroxovanádio(V):citrato (PVC)) (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> [V <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ].4H <sub>2</sub> O	500			(Aureliano <i>et al.</i> , 2005)
<b>Compostos de tungstênio</b>	Tungstato de sódio (W <sub>1</sub> )	400			(Fraqueza <i>et al.</i> , 2012)

Foi descrito que a interação dos PPI com a proteína resulta numa oxidação da cisteína 813, embora outros resíduos de cisteína em várias hélices transmembranares possam estar envolvidos, tais como os resíduos Cys321, Cys822 ou Cys892 (Lambrecht *et al.*, 1998). Outro fármaco usado no tratamento de úlceras peptídicas, o soraprazan pertence ao grupo dos bloqueadores ácidos competitivos com o potássio (PCAB) e é mais potente do que os PPI. O mecanismo de ação não é conhecido, tendo sido sugerido que competem com o potássio antagonizando o seu transporte (Simon *et al.*, 2007).

#### 7.4 Inibidores de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

Entre os inibidores da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, incluem-se compostos usados na terapia de tumores, agentes cardioprotetores, agentes imunossupressores, entre outras aplicações (Tabela 7.1). Destes inibidores destacam-se a tapsigargina (TG) e o ácido ciclopiazônico (CPA). A tapsigargina (TG), composto extraído de uma planta mediterrânica, a tápsia (*Thapsia garganica*), é o mais potente inibidor da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de entre todos os inibidores conhecidos desta enzima, com  $\text{IC}_{50}$  numa gama de concentrações na ordem dos nM (Sagara e Inesi, 1991; Geng e Lotz, 1995; Johnson *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2008) (Tabela 7.1). O uso de TG como antitumoral, tem sido descrito uma vez que a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase leva ao aumento da concentração de cálcio no citoplasma, o que conduz à ativação de fatores de apoptose que controlam a morte celular. Ambos os compostos TG e ácido ciclopiazônico (CPA, ( $\text{IC}_{50} = 1\mu\text{M}$ )) estabilizam a conformação E2 da enzima (Yatime *et al.*, 2009), impedindo a ligação do cálcio à enzima e a indução da conformação de E1. Tal como acontece com os inibidores do tipo P anteriores, estes compostos ligam-se na zona de membrana, mais especificamente na via de entrada do cálcio para os locais de ligação, portanto próximo da zona transmembranar. No entanto, eles ligam-se em diferentes sítios que podem ser ocupados simultaneamente pelos dois inibidores (Yatime *et al.*, 2009).

Assim por exemplo, o BHQ (2,5-di-(*t*-butil)-dihidroxiquinona) também se associa à proteína ao mesmo sítio de ligação de CPA. A TG e o CPA além de locais de ligação diferentes, também têm modos de ação diferentes para esta enzima. Assim, enquanto a TG bloqueia as hélices transmembranares TM3, TM5 e TM7, o CPA move as hélices TM1e TM2 na direção das hélices TM3 e TM4. Contudo, ambas as interações induzem o encerramento do canal de cálcio (Moncoq *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Yatime *et al.*, 2009). Embora a maioria dos inibidores da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, apresentados na Tabela 7.1, pareçam interagir favoravelmente com a conformação E2, algumas interações de compostos, tais como a

curcumina, parece ser favorecida pela conformação E1P da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Yatime *et al.*, 2009).

De entre as espécies de vanádio, o decavanadato, inibe a atividade hidrolítica da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (RS) com elevada potência ( $\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$ ). Um polioxometalato semelhante, o decaniobato, apresenta uma inibição ligeiramente menor mas superior a outros oxometalatos (Fraqueza *et al.*, 2012a). A atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase também é inibida por complexos de vanádio tais como complexos de vanádio-citrato e bis(maltolato) oxovanádio(IV) (BMOV) (Tabela 7.1) (Aureliano *et al.*, 2005; Aureliano *et al.*, 2008). Este e outros compostos de vanádio foram descritos para o tratamento da diabetes mellitus (Thompson e Orvig, 2004). O decavanadato (Pereira *et al.*, 2009) e compostos (Yraola *et al.*, 2007) contendo decavanadato foram descritos como capazes de normalizar os teores de glucose sanguínea (Yraola *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009) e os perfis de lipídicos no plasma (Pereira *et al.*, 2009).

No entanto, devido a capacidade de inibir fosfatases específicas, o decavanadato foi recentemente descrito para ser usado como agente terapêutico no tratamento de diversas doenças como a leishmaniose (Turner *et al.*, 2012). O  $\text{V}_{10}$  interfere também na homeostasia do cálcio, na contração muscular e na função mitocondrial (Gândara *et al.*, 2005; Aureliano, 2009). A mitocôndria tem sido descrita como um dos alvos subcelulares do decavanadato uma vez que diversos processos mitocondriais são afetados em concentrações na ordem de nM (Soares *et al.*, 2007c; Soares *et al.*, 2008b). O estudo sobre a interação de decaniobato e decavanadato com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (secção 4.2.3) mostrou que ambos inibem de modo não competitivo a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, mas apenas o  $\text{V}_{10}$  é capaz de induzir a oxidação de cisteínas. Neste sentido, não podemos deixar de considerar a contribuição do vanadilo para os efeitos observados e induzidos pelo decavanadato (Fraqueza *et al.*, 2012a; Fraqueza *et al.*, 2012b). Em condições perto das fisiológicas, com ou sem ionóforos de cálcio, tem sido referido que decavanadato inibe a translocação de cálcio enquanto para o vanadato não (Aureliano e Madeira, 1994a). Tem sido descrito que o sítio de ligação de  $\text{V}_{10}$  com a conformação E2 situa-se na interseção dos três domínios citoplasmáticos proteína que inclui o domínio nucleotídeo, o domínio de fosforilação e os domínios de “ $\beta$ -strand” (Toyoshima *et al.*, 2000). Assim, o local de ligação de decavanadato com a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é diferente do local descrito para os outros fármacos.

Além do decavanadato, também os polioxotungstatos foram descritos por inibir não só as bombas iônicas de como,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase,  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mas também

ecto-ATPases (Čolović *et al.*, 2011). Na verdade, os polioxotungstatos são inibidores mais potentes (Čolović *et al.*, 2011), do que os complexos de coordenação de vanádio (Aureliano *et al.*, 2005; Aureliano *et al.*, 2008) (10 a 100 vezes), enquanto para o decavanadato os valores  $IC_{50}$  são mais baixos em uma a duas ordens de magnitude (Fraqueza *et al.*, 2012a; Fraqueza *et al.*, 2012b). Tendo em conta a especificidade dessas estruturas para as bombas iônicas, é sugerido que estes polioxometalatos possam ser utilizados como fármacos com atividade anticancerígena, antibiótica, atividade antiprotozoária, atividade antiviral, além de atividade antidiabética (Thompson e Orvig, 2004; Yraola *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009; Turner *et al.*, 2012).

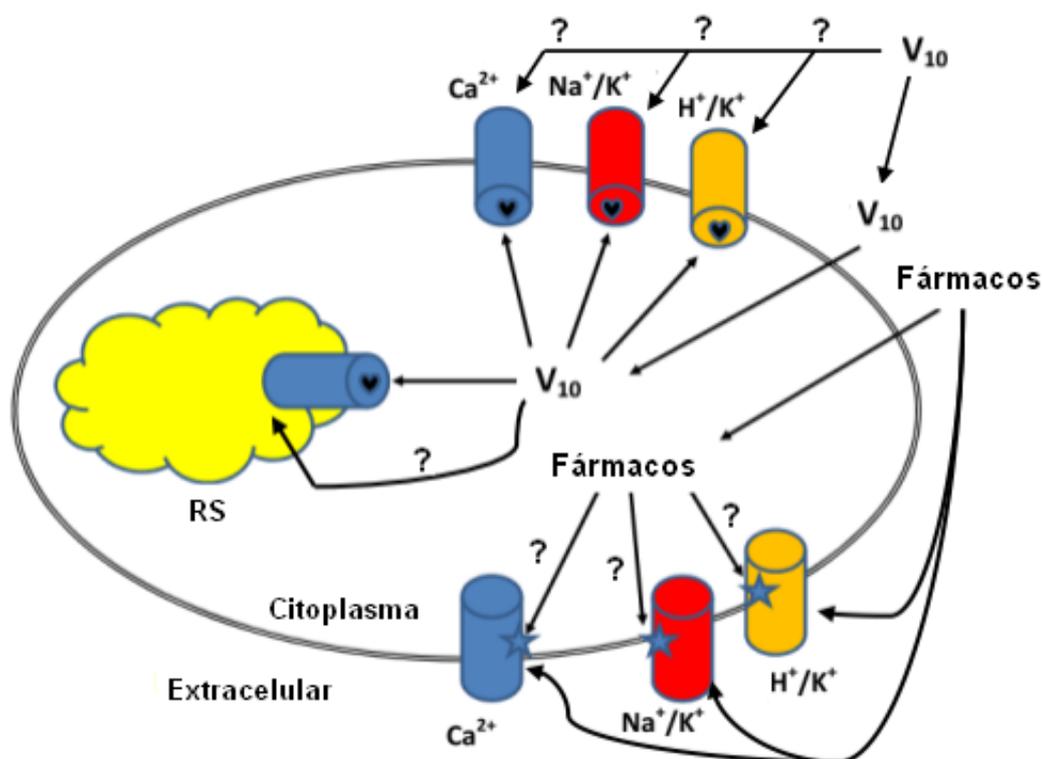
## 7.5 Conclusões

Entre 18 classes e cerca de quarenta compostos que atuam como inibidores de bombas iônicas, apenas para algumas classes os mecanismos bioquímicos são conhecidos. A maioria dos compostos como ouabaína, omeprazol, tapsigargina, CPA, e BHQ parecem interagir ou estabilizar as conformações E2 ou E2P, sendo que o sítio de ligação, encontra-se localizado na região transmembranar, na entrada do sítio de ligação dos cátions ou num local muito próximo. O processo de interação é normalmente reversível, mas o omeprazol tem modo de ação irreversível que envolve a reação com cisteínas que conduz a inibição da bomba. A tapsigargina (TG) é o inibidor mais potente  $Ca^{2+}$ -ATPase, e o mais potente inibidor de bombas iônicas referidos, com  $IC_{50}$  na ordem de concentração nM. Por outro lado, oxometalatos e polioxometalatos de vanádio e tungstênio apresentam-se com capacidade inibitória ( $IC_{50} = 2-15 \mu M$ ), embora com uma ordem de grandeza inferior à TG, têm uma capacidade inibitória semelhante a outros inibidores de bombas iônicas com atividades farmacológicas relevantes.

O decavanadato e outros oxometalatos apresentam um modo de ação que implica a interação com os domínios citoplasmáticos da proteína, nomeadamente o domínio nucleotídeo, o domínio de fosforilação ou num lobo esférico que envolve os vários domínios citoplasmáticos. Contudo o decavanadato, um inibidor bem conhecido da  $Ca^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático, apresenta uma inibição e interação com a  $Ca^{2+}$ -ATPase que são claramente diferentes de outros oxometalatos e polioxometalatos, nomeadamente, oxidação de cisteínas na proteína, a redução de vanadato e uma inibição não competitiva da  $Ca^{2+}$ -ATPase. Por outro lado, a inibição não é revertida por agentes antioxidantes, mas é prevenida a oxidação das cisteínas. Além disso, a interação de decavanadato com a proteína não é afetada

por qualquer uma das conformações que ocorre durante o processo de translocação de cálcio juntamente com a hidrólise do ATP. A análise comparativa dos processos inibição de bombas iônicas por vários tipos de inibidores aponta aparentemente para diferentes mecanismos de ação, embora muito existe ainda por esclarecer para as várias classes de inibidores.

Por outro lado, o comportamento de decavanadato face às bombas iônicas poderá ser útil para o desenvolvimento de novos compostos com atividade farmacológica em tenham estas bombas iônicas como alvos terapêuticos. Em resumo, as E1E2 ATPases, que transportam iões contra o gradiente, são alvos de fármacos e também de decavanadato ( $V_{10}$ ), em locais de ligação que são diferentes. A maioria dos fármacos ligam-se próximo da entrada dos locais de ligação dos catiões no lado extracelular da região transmembranar, enquanto o decavanadato liga-se a um lobo esférico formado pelos domínios da proteína no lado citoplasmático (Fig. 7.2).



**Figura 7.2** – Eventuais modos de ação de fármacos e compostos de vanádio ( $V_{10}$ ) com as bombas iônicas de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+/K^+$  e  $H^+/K^+$  ATPase. Estas bombas iônicas transportam catiões contra o gradiente e são alvos específicos de medicamentos ou fármacos e também de decavanadato ( $V_{10}$ ) em locais específicos de ligação. A maioria dos fármacos ligam-se do lado extracelular perto a entrada dos sítios de ligação dos catiões, na região transmembranar dentro da bicamada, enquanto o decavanadato liga-se a uma região de formada pelos três domínios da proteína no lado citoplasmático (adaptado de Aureliano e Fraqueza, 2012).

Tanto os fármacos como o decavanadato ou outros oxometalatos, podem atravessar a bicamada e interagir com as bombas iônicas, provavelmente através de sistemas de transporte através de membranas tais como canais, transportadores específicos e/ou bombas. Uma vez que a maioria dos fármacos tem caracter lipossolúvel o processo pode ocorrer por difusão. Atendendo a que para a maioria dos fármacos descritos, como por exemplo os CTS, a interação com as bombas é referida ocorrer pelo espaço extracelular estes não necessitam de atravessar a membrana para atuarem. Contudo, não está completamente esclarecido o modo como os fármacos inibem as bombas iônicas, deixando em aberto no futuro a novas experiências (Fig. 7.2). A definição precisa do modo de atuação poderá ser muito útil para o desenvolvimento de fármacos inibidores muito potentes e específicos para as bombas iônicas nos diferentes tecidos ou órgãos alvo, que possam eventualmente interatuar com a proteína em várias situações fisiológicas e em vários locais da proteína.

## **Capítulo 8**

---

### **Conclusões finais e perspectivas futuras**

---

## 8. Conclusões finais e perspectivas futuras

Os polioxometalatos de vanádio ou de nióbio, são inibidores mais efetivos que os oxometalatos monoméricos de vanádio, tungstênio e molibdênio, embora este último apresente uma capacidade muito inferior (3000 vezes inferior a  $V_{10}$ ). Dos oxometalatos estudados,  $V_{10}$  além de ser o inibidor mais potente, é um inibidor que induz a oxidação de cisteínas, sendo reduzido a vanadilo após interação com a  $Ca^{2+}$ -ATPase. Estudos mais aprofundados por RPE poderão esclarecer qual o tipo de átomos que coordenam o vanádio(IV). Dado que  $V_{10}$  e  $Nb_{10}$  são isoestruturais e isoeletrônicos, foi possível deduzir que  $V_{10}$  apresenta um tipo de inibição não competitiva.

Os oxometalatos de vanádio,  $V_1$  e  $V_{10}$ , ao contrário de  $Nb_{10}$ , tungstato e molibdato monomérico, oxidam as cisteínas acessíveis da  $Ca^{2+}$ -ATPase. O efeito de antioxidantes na reversão das cisteínas só foi possível ser verificado para  $V_1$  quando em presença de quercetina. Este método revelou algumas limitações, pelo que não foi possível estudar o efeito de outros antioxidantes, especialmente quando se utilizou  $V_{10}$ . Uma solução para esta limitação poderá passar por seguir a oxidação de cisteínas e a reversão por antioxidantes por espectroscopia de Raman, uma vez que é possível encontrar no espectro a banda correspondente ao grupo tiol (S-H) presente nas cisteínas.

A espectroscopia de Raman, como nova abordagem no estudo da interação de oxometalatos com a  $Ca^{2+}$ -ATPase, revelou-se promissora, podendo-se distinguir alterações conformacionais na proteína induzidas pelos diferentes oxometalatos.

Sendo a  $Ca^{2+}$ -ATPase de RS uma enzima transmembranar, não podemos excluir a possibilidade de que os efeitos dos oxometalatos e polioxometalatos na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase possam ser devidos, pelo menos em parte, à interação com a estrutura da membrana. Uma vez que os dados relativos à contribuição dessa interação são escassos ou inexistentes, é de considerar, efetuar estudos sobre o efeito dos oxometalatos na fluidez da membrana e sua implicação na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase.

Os polioxometalatos de vanádio e nióbio apresentam-se como fortes inibidores da  $Ca^{2+}$ -ATPase, com valores de  $IC_{50}$  de ordem de grandeza semelhante a muitos fármacos inibidores de  $Ca^{2+}$ -ATPase e de outras bombas iônicas, do tipo P-ATPases. Não poderemos excluir a hipótese de que a inibição deste tipo de enzimas pelas espécies decaméricas de vanádio e nióbio possam explicar a capacidade antitumoral, antiviral e antidiabética, entre outras,

observada para estes oxometalatos. Os oxometalatos atuam no lado citoplasmático das ATPases do tipo P, enquanto a maior parte dos fármacos para os quais se conhece o mecanismo de ação atuam do lado extracelular. Ainda serão necessários muitos estudos sobre oxometalatos, para utilização farmacêutica destes compostos quando comparados com as ações de outros fármacos. Relativamente aos fármacos, dado o caráter lipossolúvel da maioria dos fármacos, eles difundem facilmente pelas membranas e estarão presentes no citoplasma. Poderão os fármacos interagir com ATPases pelo lado citoplasmático, tal como acontece com os oxometalatos, uma vez que parecem todos estabilizar a proteína na conformação E2?

## Capítulo 9

---

### Referências bibliográficas

---

- Ahern, G.P.; Junankar, P.R.; Pace, S.M.; Curtis, S.; Mould, J.A.; Dulhunty, A.F. (1999). Effects of ivermectin and mivacurium on ryanodine receptors and the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in sarcoplasmic reticulum of rabbit and rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*. 514: 313-326.
- Ahmad, S.; Isab, A.A.; Ali, S.; Al-Arjaf, A.R. (2006). Perspectives in bioinorganic chemistry and some metal based therapeutic agents. *Polyhedron*. 25: 1633-1645.
- Akera, T.; Kyosuke, T.; Keisuke, T. (1983). Cardiac Actions of Vanadium. *Fed. Proc.* 42: 2984-2988.
- Alloway, B.; Ayres, D. (1993). *Chemical principles of environmental pollution*. Black Academic & Professional, Oxford, 395 p.
- Amano, R.; Enomoto, S.; Nobuta, M.; Sakamoto, M.; Tsujioka, R.; Ambe, F. (1996). Bone uptake of vanadium in mice: simultaneous tracing of V, Se, Sr, Y, Zr, Ru and Rh using a radioactive multitracer. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 10: 45-48.
- Andersen, J.P. (1989). Monomer-oligomer equilibrium of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and the role of subunit interaction in the  $\text{Ca}^{2+}$  pump mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*. 988: 47-72.
- Anthonisen, A.N.; Clausen, J.D.; Andersen, J.P. (2006). Mutational analysis of the conserved TGES loop of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *J Biol Chem*. 281: 31572-1582.
- Arrambide, G.; Barrio, D.A.; Etcheverry, S.B.; Gambino, D.; Baran, E.J. (2010). Spectroscopic behavior and biological activity of  $\text{K}_2[\text{VO}(\text{O}_2)\text{NTA}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . *Biol. Trace Elem. Res.* 136: 241-248.
- Arp, Z.; Autrey, D.; Laane, J.; Overman, S. A.; Thomas, G. J. Jr. (2001). Tyrosine Raman signatures of the filamentous virus Ff are diagnostic of non-hydrogen-bonded phenoxyls: demonstration by Raman and infrared spectroscopy of p-cresol vapor. *Biochemistry*. 40: 2522-2529.
- Asano, S.; Mizutani, M.; Hayashi, T.; Morita, N.; Takeguchi, N. (1990). Reversible inhibitions of gastric  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase by scopadulcic acid B and diacetyl scopadol. *The Journal of Biological Chemistry*. 265: 22167-22173.
- Ashiq, U.; Ara, R.; Mahroof-Tahir, M.; Maqsood, Z.T.; Khan, K.M.; Khan, S.N.; Siddiqui, H.; Choudhary, M.I. (2008). Synthesis, spectroscopy, and biological properties of vanadium(IV)-hydrazide complexes. *Chem. Biodivers.* 5: 82-92.
- Assimakopoulos, D.A.; Kolettas, E.; Zagorianakou, N.; Evangelou, A.; Skevas, A.; Agnantis, N. (2000). Prognostic significance of p53 in the cancer of the larynx. *Anticancer Res.* 20: 3555-3564.
- Aubier, M.; Viires, N. (1998). Calcium ATPase and respiratory muscle function. *Eur. Respir. J.* 11: 758-766.

- Aureliano, M. (1995). Transdução e conjugação energética na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático: interacção de vanadatos. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- Aureliano, M. (2000). Vanadate oligomer inhibition of passive and active  $\text{Ca}^{2+}$  translocation by the  $\text{Ca}^{2+}$  pump of sarcoplasmic reticulum. *J Inorg Biochem.* 80: 145-147.
- Aureliano, M. (2007). Decavanadate interactions with sarcoplasmic reticulum calcium pump. In: Aureliano M, editor. *Vanadium biochemistry*. Kerala, India: Research Signpost, 117-133.
- Aureliano, M. (2009). Decavanadate: a journey in a search of a role. *Dalton Trans.* 14: 9093–9100.
- Aureliano, M. (2011). Recent perspectives into biochemistry of decavanadate. *World J. Biol. Chem.* 2: 215-225.
- Aureliano, M.; Crans, D.C. (2009). Decavanadate ( $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$ ) and oxovanadates: oxometalates with many biological activities. *J. Inorg. Biochem.* 103: 536-546.
- Aureliano, M.; Fraqueza, G. (2012). Ionic pumps inhibitors: recent insights into oxometalates interactions with E1E2-ATPases. Submetido para publicação.
- Aureliano, M.; Gândara, R.M.C. (2005). Decavanadate effects in biological systems. *J. Inorg. Biochem.* 99: 979-985.
- Aureliano, M.; Henao, F.; Tiago, T.; Duarte, R.O.; Moura, J.J.G.; Baruah, B.; Crans, D.C. (2008). Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase is inhibited by organic vanadium coordination compounds: pyridine-2,6-dicarboxylatodioxovanadium(V), BMOV, and an amavadine analogue. *Inorg. Chem.* 47: 5677-5684.
- 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. (1994a). Interactions of vanadate oligomers with sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1221: 259-271.
- Aureliano, M.; Madeira, V.M.C. (1994b). Vanadate oligoanions interact with the proton ejection by the  $\text{Ca}^{2+}$  pump of sarcoplasmic reticulum *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 161–167.
- Aureliano, M.; Madeira, V.M.C. (1998). Energy transduction mechanisms as affected by vanadium (V) species:  $\text{Ca}^{2+}$ -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.; Tiago, T.; Gândara, R.M.; Sousa, A.; Moderno, A.; Kaliva, M.; Salifoglou, A.; Duarte, R.O.; Moura, J.J.G. (2005). Interactions of vanadium(V)-citrate complexes with the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J. Inorg. Biochem.* 99: 2355-2361.
- 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.
- Baran, E.J. (2000). Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. *J. Inorg. Biochem.* 80: 1-10.
- Barceloux, D.G. (1999). Vanadium. *Clin. Toxicol.* 37: 265-278.
- Basak, R.; Saha, B.K.; Chatterjee, M. (2000). Inhibition of diethylnitrosamine induced rat liver chromosomal aberrations and DNA-strand breaks by synergistic supplementation of vanadium and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Biochim. Biophys. Acta.* 1502: 273-282.
- Barrio, D.A.; Braziunas, M.D.; Etcheverry, S.B.; Cortizo, A.M. (1997). Maltol complexes of vanadium (IV) and (V) regulate in vitro alkaline phosphatase activity and osteoblast-like cell growth. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 11: 110-115.
- Barrio, D.A.; Cattaneo, E.R.; Apezteguia, M.C.; Etcheverry, S.B. (2006). Vanadyl(IV) complexes with saccharides. Bioactivity in osteoblast-like cells in culture. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84: 765-775.
- Barrio, D.A.; Etcheverry, S.B. (2010). Potential use of vanadium compounds in therapeutics. *Current Medicinal Chemistry.* 17: 3632-3642.
- Barrio, D.A.; Williams, P.A.; Cortizo, A.M.; Etcheverry, S.B. (2003). Synthesis of a new vanadyl(IV) complex with trehalose (TreVO): insulin-mimetic activities in osteoblast-like cells in culture. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8: 459-468.
- Beil, W.; Staar, U.; Sewing, K.F. (1992). Pantoprazole: a novel H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor with an improved pH stability. *Eur. J. Pharmacol.* 218: 265-271.
- Belcastro, A.N.; Gilchrist, J.S.; Scrubb, J. (1993). Function of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles with exercise. *J. Appl. Physiol.* 75: 2412-2418.
- Benítez, J.; Becco, L.; Correia, I.; Leal, S.M.; Guiset, H.; Pessoa, J.C.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Escobar, P.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D. (2011). Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: new achievements. *J. Inorg. Biochem.* 105: 303-312.
- 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.

- Bhanot, S.; Bryer-Ash, M.; Cheung, A.; McNeill, J.H. (1994a). Bis(maltolato) oxovanadium(IV) attenuates hyperinsulinemia and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Diabetes*. 43: 857-861.
- Bhanot, S.; McNeill, J.H. (1994b). Vanadyl sulfate lowers plasma insulin and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 24: 625-632.
- Bhanot, S.; McNeill, J.H.; Bryer-Ash, M. (1994c). Vanadyl sulfate prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension in rats. *Hypertension*. 23: 308-312.
- Bhanot, S.; Michoulas, A.; McNeill, J.H.(1995). Antihypertensive effects of vanadium compounds in hyperinsulinemic, hypertensive rats. *Mol. Cell. Biochem*. 153: 205-209.
- Bhattacharyya, D.; Sen, P.C.(1999). The effect of binding of chlorpromazine and chloroquine to ion transporting ATPases. *Mol. Cell. Biochem*. 198: 179–185.
- Bhattacharyya, S.; Tracey, A.S. (2001). Vanadium(V) complexes in enzyme systems: aqueous chemistry, inhibition and molecular modeling in inhibitor design. *J. Inorg. Biochem*. 85: 9-13.
- Bhuiyan M.S.; Shioda, N.; Fukunaga, F. (2008a). Targeting protein kinase B/Akt signaling with vanadium compounds for cardioprotection. *Expert Opin. Ther. Targets*. 12: 1217-1227.
- Bhuiyan, M.S.; Shioda, N.; Shibuya, M.; Iwabuchi, Y.; Fukunaga, K. (2009). Activation of endothelial nitric oxide synthase by a vanadium compound ameliorates pressure overload-induced cardiac injury in ovariectomized rats. *Hypertension*. 53: 57-63.
- Bhuiyan, M.S.; Takada, Y.; Shioda, N.; Moriguchi, S.; Kasahara, J.; Fukunaga, K. (2008b). Cardioprotective effect of vanadyl sulfate on ischemia/reperfusion-induced injury in rat heart in vivo is mediated by activation of protein kinase B and induction of FLICE-inhibitory protein. *Cardiovasc. Ther*. 26: 10-23.
- Bidasee, K.R.; Zhang, Y.; Shao, C.H.; Wang, M.; Patel, K.P.; Dincer U.D.; Besch, H.R. Jr. (2004). Diabetes increases formation of advanced glycation end products on sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Diabetes*. 53: 463–473.
- Bilmen, J.G.; Khan, S.Z.; Javed, M.H.; Michelangeli, F. (2001). Inhibition of the SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  pumps by curcumin. Curcumin putatively stabilizes the interaction between the nucleotide-binding and phosphorylation domains in the absence of ATP. *Eur. J. Biochem*. 268: 6318-6327.
- Bilmen, J.G.; Wootton, L.L.; Michelangeli, F. (2002). The inhibition of the sarcoplasmic /endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by macrocyclic lactones and cyclosporine A. *Biochem. J*. 366: 255-263.
- Bishayee, A.; Chatterjee, M. (1995a). Inhibition of altered liver cell foci and persistent nodule growth by vanadium during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Anticancer Res*. 15: 455-61.

- Bishayee, A.; Chatterjee, M. (1995b). Inhibitory effect of vanadium on rat liver carcinogenesis initiated with diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital. *Br. J. Cancer*. 71: 1214-1220.
- 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 metabolizing enzymes. *Breast Cancer Res. Treat.* 63: 133-145.
- Bode, H.P.; Friebel, C.; Fuhrmann, G.F. (1990). Vanadium uptake by yeast cells *Biochim. Biophys. Acta*. 1022: 163-170.
- Bootman, M.D.; Collins, T.J.; Peppiatt, C.M.; Prothero, L.S.; MacKenzie, L.; De Smet, P.; Travers, M.; Tovey, S.C.; Seo, J.T.; Berridge, M.J.; Ciccolini, F., Lipp, P. (2001). Calcium signalling-an overview. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 12: 3-10.
- 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.
- Böttinger, H.; Habermann, E. (1984). Palytoxin binds to and inhibits kidney and erythrocyte  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. *Arch. Pharmacol.* 325: 85- 87.
- Boulassel, B.; Sadeg, N.; Roussel, O.; Perrin, M.; Belhadj-Tahar, H. (2011). Fatal poisoning by vanadium. *Forensic Science International*. 206: e79-e81.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brandl, C.J.; deLeon, S.; Martin, D.R.; MacLennan, D.H. (1987). Adult forms of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 262: 3768-3774.
- Brandt, P.C.; Vanaman, T.C. (1996). The plasma membrane calcium pump: not just another pretty ion translocase. *Glycobiology*. 6: 665-668.
- Brichard, S.M.; Henquin, J.C. (1995). The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 265-270.
- Broekaert, J.A.C. (2002). Analytical atomic spectrometry with flames and plasmas. Weinheim: Wiley-VCH. xii, 364 p.
- 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.

- Cadene, A.; Grigorescu, F.; Serrano, J.J.; Cros, G. (1997). Characterization of vanadyl sulfate effect on vascular contraction: roles of calcium and tyrosine phosphorylation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281: 491-498.
- Caldeira, H.P.; Humanes, M.; Silva, J.A.; Fraústo da Silva, J.J.R. (1997). “Vanádio e diabetes – a mimetização da ação da insulina” *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química.* 64: 21-32.
- Canalis, E. (1985). Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. *Clin. Orthop.* 193: 246-263.
- Cantley, L.C.Jr.; Josephson, L.; Warner, R.; Yanagisawa, M.; Lechene, C.; Guidotti, G. (1977). Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* 252: 7421–7423.
- 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.
- 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.
- Carafoli, E.; Santella, L.; Branca, D.; Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36: 107-260.
- Carey, P. R. (1982). *Biochemical applications of Raman and resonance Raman spectroscopies.* Academic Press, New York, 242 p.
- 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.
- Carr, A.N.; Davis, M.G.; Eby-Wilkens, E.; Howard, B.W.; Towne, B.A.; Dufresne, T.E.; Peters, K.G. (2004). Tyrosine phosphatase inhibition augments collateral blood flow in a rat model of peripheral vascular disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287: H268-H276.
- Carvalho, A.P.; Leo, B. (1967). Effects of ATP on the interaction of  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ , and  $K^{+}$  with fragmented sarcoplasmic reticulum isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 150: 1327-1352.
- Castro, A. (1997). Validação de métodos em análise química. III Seminário de Validação e Qualidade no Laboratório Químico - UNICAM, Lisboa.
- Chakraborty, A.; Selvaraj, S. (2000). Differential modulation of xenobiotic metabolizing enzymes by vanadium during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats. *Neoplasma.* 47: 81-89.

- Chakraborty, T.; Swamy, A.H.; Chatterjee, A.; Rana, B.; Shyamsundar, A.; Chatterjee, M. (2007). Molecular basis of vanadium-mediated inhibition of hepatocellular pre neoplasia during experimental hepatocarcinogenesis in rats. *J. Cell Biochem.* 101: 244-258.
- Champeil, P.; Gingold, M.P.; Guillain, F.; Inesi, G. (1983). Effect of magnesium on the calcium-dependent transient kinetics of sarcoplasmic reticulum ATPase, studied by stopped flow fluorescence and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 258: 4453-4458.
- Chasteen, N.D. (1983). The biochemistry of vanadium. *Struct. Bonding.* 53: 105-138.
- Chasteen, N.D.; Thail, E.C. (1982). Iron Binding by Horse Spleen Apoferritin. Vanadyl(IV) EPR spin probe study. *J. Biol. Chem.* 257: 7672-7677.
- Chen, F.; Demers, L.M.; Vallyathan, V.; Ding, M.; Lu, Y.; Castranova, V.; Shi, X. (1999). Vanadate induction of NF-kappaB involves IkappaB kinase beta and SAPK/ERK kinase 1 in macrophages. *J Biol. Chem.* 274: 20307-20312.
- Chen, Y.W.; Yang, C.Y.; Huang, C.F.; Hung, D.Z.; Leung, Y, M.; Liu, S.H.(2009). Heavy metals, islet function and diabetes development. *Islets.* 1: 169-175.
- Clausen, J.D.; McIntosh, D.B.; Woolley, D.G.; Andersen, J.P. (2011) Modulatory ATP binding affinity in intermediate states of E2P dephosphorylation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 286: 11792-11802.
- Clausen, J.D.; Vilsen, B.; McIntosh, D.B.; Einholm, A.P.; Andersen, J.P. (2004). Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase assists in catalysis of E2/E2P partial reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 2776-2781.
- Coan, C.; Scales, D.J.; Murphy, A.J. (1986). Oligovanadate binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. Evidence for substrate analogue behavior. *J. Biol. Chem.* 261: 10394–10403.
- Coca, R.; Soler, F.; Fernández-Belda, F. (2008). Characterization of the palytoxin effect on Ca<sup>2+</sup>-ATPase from sarcoplasmic reticulum (SERCA). *Arch. Biochem. Biophys.* 2008, 478: 36–42.
- Colović, M.B.; Bajuk-Bogdanović, D. V.; Avramović, N. S.; Holclajtner-Antunović, I. D.; Bošnjaković-Pavlović, N. S.; Vasić, V.M.; Krstić, D. Z. (2011). Inhibition of rat synaptic membrane Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases by 12-tungstosilicic and 12-tungstophosphoric acid. *Bioorg. Med. Chem.* 19: 7063–7069.
- Compton, S.J.; Jones, C.G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 151: 369-374.
- Cortizo, A.M.; Bruzzone, L.; Molinuevo, S.; Etcheverry, S.B. (2000). A possible 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.; Caporossi, M.; Lettieri, G.; Etcheverry, S.B. (2000). Vanadate induced nitric oxide production: role in osteoblast growth and differentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 400: 279-285.
- Cortizo, A.M.; Etcheverry, S.B. (1995). Vanadium derivatives act as growth factor-mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 145: 97-102.
- Cortizo, A.M.; Molinuevo, M.S.; Barrio, D.A.; Bruzzone, L. (2006). Osteogenic activity of vanadyl(IV)-ascorbate complex: evaluation of its mechanism of action. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38: 1171-1180.
- Crans, D.C. (2000). Chemistry and insulin-like properties of vanadium(IV) and vanadium(V) compounds. *J. Inorg. Biochem.* 80: 123-131.
- Crans, D.C. (1994). Aqueous chemistry of labile oxovanadates of relevance to biological studies. *Comm. 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.; Schoeberl, S.; Gaidamauskas, E.; Baruah, B.; Roess, D. A. (2011). Antidiabetic vanadium compound and membrane interfaces: interface-facilitated metal complex hydrolysis. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16: 961-972.
- Crans, D.C.; Smee, J.J.; Gaidamauskas, E.; Yang, L. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem. Rev.* 104: 849-902.
- Crans, D.C.; Rithner, C.D.; Theisen, L.A. (1990). Application of time-resolved  $^{51}\text{V}$  2-D NMR for quantitation studies of kinetic exchange between vanadate oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 2901-2908.
- Crans, D.C.; Tracey, A.S. (1998). In: *Vanadium compounds: Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications*, Tracey, A.S.; Crans, D.C., Eds.; American Chemical Society Symposium Series 711: Washington DC, pp. 2-29.
- Crans, D.C.; Zhang, B.; Gaidamauskas, E.; Keramidas, A.D.; Willsky, G.R.; Roberts, C.R. (2010). Is vanadate reduced by thiols under biological conditions? Changing the redox potential of V(V)/V(IV) by complexation in aqueous solution. *Inorg. Chem.* 49: 4245-4256.
- Croyle, M.L.; Woo, A.L.; Lingrel, J.B. (1997). Extensive random mutagenesis analysis of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase alpha subunit identifies known and previously unidentified amino acid residues that alter ouabain sensitivity--implications for ouabain binding. *Eur. J. Biochem.* 248: 488-495.

- 
- Cruz, T.F.; Morgan, A.; Min, W. (1995). In vitro and in vivo antineoplastic effects of orthovanadate. *Mol. Cell. Biochem.* 153: 161-166.
- Csermely, P.; Martinosi, A.; Levy, G.C.; Ejckart, A.J. (1985a).  $^{51}\text{V}$ -NMR analysis of the binding of vanadium (V) oligoanions to sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 203: 807-815.
- Csermely, P.; Varga, S.; Martonosi, A. (1985b). Competition between decavanadate and fluorescein isothiocyanate on the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.* 150: 455-460.
- Cuenda, A.; Centeno, F.; Gutierrez-Merino, C. (1991). Modulation by phosphorylation of glycogen phosphorylase-sarcoplasmic reticulum interaction. *FEBS Lett.* 283: 273-276.
- Cuenda, A.; Henao, F.; Gutiérrez-Merino, C. (1990). Distances between functional sites of  $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ -ATPase from reticulum using  $\text{Co}^{2+}$  as a spectroscopic ruler. *Eur. J. Biochem.* 194: 663-670.
- Cuenda, A.; Henao, F.; Nogues, M.; Gutiérrez-Merino, C. (1994). Quantification and removal of glycogen phosphorylase and other enzymes associated with sarcoplasmic reticulum membrane preparations. *Biochim. Biophys. Acta.* 1194: 35-43.
- Cuenda, A.; Nogues, M.; Henao, F.; Gutiérrez-Merino, C. (1995). Interaction between glycogen phosphorylase and sarcoplasmic reticulum membranes and its functional implications. *J. Biol. Chem.* 270: 11998-12004.
- Cuesta, S.; Francés, D.; García, G.B. (2011). ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. *Neurotoxicol. Teratol.* 3: 1-6.
- Cusi, K.; Cukier, S.; DeFronzo, R.A.; Torres, M.; Puchulu, F.M.; Redondo, J.C. (2001). Vanadyl sulfate improves hepatic and muscle insulin sensitivity in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1410-1417.
- Dai, S.; Thompson, K.H.; Vera, E.; McNeill, J.H. (1994). Toxicity studies on one-year treatment of non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats with vanadyl sulphate. *Pharmacol. Toxicol.* 75: 265-73.
- Daiho, T.; Yamasaki, K.; Wang, G.; Danko, S.; Iizuka, H.; Suzuki, H. (2003). Deletions of any single residues in Glu40-Ser48 loop connecting a domain and the first transmembrane helix of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase result in almost complete inhibition of conformational transition and hydrolysis of phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* 278: 39197-39204.
- Daiho, T.; Yamasaki, K.; Danko, S.; Suzuki, H. (2007). Critical role of Glu40-Ser48 loop linking actuator domain and first transmembrane helix of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in  $\text{Ca}^{2+}$  deocclusion and release from ADP-insensitive phosphoenzyme. *J. Biol. Chem.* 282: 34429-34447.
-

- Dalton, K.A.; East, J.M.; Mall, S.; Oliver, S.; Starling, A.P.; Lee, A.G. (1998). Interaction of phosphatidic acid and phosphatidylserine with the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum and the mechanism of inhibition. *Biochem. J.* 329: 637-646.
- D'Cruz, O.J.; Dong, Y.; Uckun, F.M. (2003). Potent dual anti-HIV and spermicidal activities of novel oxovanadium(V) complexes with thiourea non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302: 253-64.
- D'Cruz, O.J.; Ghosh, P.; Uckun, F.M. (1998a). Spermicidal activity of chelated complexes of bis(cyclopentadienyl)vanadium(IV). *Mol. Hum. Reprod.* 4: 683-693.
- D'Cruz, O.J.; Ghosh, P.; Uckun, F.M. (1998b). Spermicidal activity of metallocene complexes containing vanadium(IV) in humans. *Biol. Reprod.* 58: 1515-1526.
- D'Cruz, O.J.; Uckun, F.M. (2001). Bis(4,7-dimethyl and 5-dinitro-1,10-phenanthroline) sulfato-oxovanadium(IV)-mediated in vivo male germ cell apoptosis. *J. Appl. Toxicol.* 21: 331-339.
- D'Cruz, O.J.; Uckun, F.M. (2002). Metvan: a novel oxovanadium(IV) complex with broad spectrum anticancer activity. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 11: 1829-1836.
- D'Cruz, O.J.; Uckun, F.M. (2005). Vaginal contraceptive activity of a chelated vanadocene. *Contraception.* 72: 146-156.
- D'Cruz, O.J.; Waurzyniak, B.; Uckun, F.M. (2004). Antiretroviral spermicide WHI-07 prevents vaginal and rectal transmission of feline immunodeficiency virus in domestic cats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1082-1088.
- De Foresta, B.; Henao, F.; Champeil, P. (1994). Cancellation of the cooperativity of  $\text{Ca}^{2+}$  binding to sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by the non-ionic detergent dodecylmaltoside. *Eur. J. Biochem.* 223: 359-369.
- 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.
- Demaurex, N.; Distelhorst, C. (2003). Cell biology. Apoptosis-the calcium connection. *Science.* 300: 65-67.
- de Meis, L.; Inesi, G. (1982). ATP synthesis by sarcoplasmic reticulum ATPase following  $\text{Ca}^{2+}$ , pH, temperature, and water activity jumps. *J. Biol. Chem.* 257: 1289-1294.
- de Meis, L.; Vianna, A.L. (1979). Energy interconversion by the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 275-292.
- Deng, Y.; Cui, H.; Peng, X.; Fang, J.; Wang, K.; Cui, W.; Liu, X. (2012). Dietary Vanadium Induces Oxidative Stress in the Intestine of Broilers. *Biol. Trace Elem. Res.* 145: 52-58.

- De Pont, J.J.H.H.M., Swarts, H.G.P., Karawajczyk, A., Schaftenaar, G., Willems, P.H.G.M., Koenderink, J. B. (2009). The non-gastric H,K-ATPase as a tool to study the ouabain-binding site in Na,K-ATPase. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 457: 623-634.
- Djordjevic, C. (1995). In: *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, Sigel, H.; Sigel, A. Eds.; Marcel Dekker, INC: New York, pp. 595-615.
- Domingo, J.L. (1999). Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity? *Mol. Cell. Biochem.* 203: 185-187.
- Domingo, J.L. (2002). Vanadium and tungsten derivatives as anti-diabetic agents: a review of their toxic effects. *Biol. Trace Elem. Res.* 88: 97–112.
- Domingo, J.L.; Bosque, M.A.; Luna, M.; Corbella, J. (1993). Prevention by Tiron (sodium 4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonate) of vanadate-induced developmental toxicity in mice. *Teratology.* 48: 133-138.
- Domingo, J.L.; Gomez, M.; Sanchez, D.J.; Llobet, J.M.; Keen, C.L. (1995). Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelatingagents on vanadium accumulation. *Mol. Cell. Biochem.* 153: 233-240.
- Dong, Y.; Narla, R.K.; Sudbeck, E., Uckun, F.M. (2000). Synthesis, X-ray structure, and anti-leukemic activity of oxovanadium(IV) complexes. *J. Inorg. Biochem.* 78: 321-330.
- Drakenberg, T. (1986). Nuclear magnetic resonance of less common quadrupolar nuclei. *Ann. Rep. NMR Spect.* 17: 231-283.
- Dupont, Y.; Bennett, N. (1982). Vanadate inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent conformational change of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *FEBS Lett.* 139: 237-240.
- Dux, L.; Martonosi, A. (1983). Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca-ATPase vesicles treated with vanadate. *J. Biol. Chem.* 258: 2599-2603.
- Dzimiri, N.; Almotrefi, A.A. (1991). Comparative effects of procainamide, tocainide and lorcaïnide on  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATPase in guinea pig heart preparations. *General Pharmacology.* 22: 403-406.
- 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.
- Ehrlich, V.A.; Nersesyan, A.K.; Atefie, K.; Hoelzl, C.; Ferk, F.; Bichler, J.; Valic, E.; Schaffer, A.; Schulte-Hermann, R.; Fenech, M.; Wagner, K.H.; Knasmüller, S. (2008). Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: results of a multiple end point study. *Environ. Health Perspect.* 116: 1689–1693.
- Erdmann, E.; Werdan, K.; Krawietz, W.; Schmitz, W.; Scholz, H. (1984) Vanadate and its significance in biochemistry and pharmacology. *Biochem. Pharmacol.* 33: 945-950.

- Etcheverry, S.B.; Barrio, D.A.; Williams, P.A.; Baran, E.J. (2001). On the interaction of the vanadyl (IV) cation with lactose: inhibition effects of vanadyl(IV)/monosaccharide and disaccharide complexes upon alkaline phosphatase activity. *Biol. Trace Elem. Res.* 84: 227-238.
- Etcheverry, S.B.; Cortizo, A.N. (1998a). 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.
- Etcheverry, S.B.; Cortizo, A.M. (1998b). Vanadium Bioactivity on Cells in Culture. In: *Vanadium Compounds. Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications*, Tracey, A. and Crans, D.C., Eds.; American Chemical Society Symposium Series 711: Washington, DC. pp. 270-276.
- Etcheverry, S.B.; Crans, D.C.; Keramidis, A.D.; Cortizo, A.M. (1997). Insulin-mimetic action of vanadium compounds on osteoblast-like cells in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 338: 7-14.
- Evangelou, A.M. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42: 249-265.
- Facchini, D.M.; Yuen, V.G.; Battell, M.L.; McNeill, J.H.; Grynblas, M.D. (2006). The effects of vanadium treatment on bone in diabetic and non-diabetic rats. *Bone.* 38: 368-377.
- Fagan, M.J.; Saier, M.H.Jr. (1994). P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* 38: 57-99.
- Faneca, H.; Figueiredo, V.A.; Tomaz, I.; Goncalves, G.; Avecilla, F.; Pedroso de Lima, M.C.; Geraldés, C.F.; Pessoa, J.C.; Castro, M.M. (2009). Vanadium compounds as therapeutic agents: some chemical and biochemical studies. *J. Inorg. Biochem.* 103: 601-608.
- Farley, R. A.; Schreiber, S.; Wang, S.G.; Scheiner-Bobis, G. (2001). A Hybrid between Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is sensitive to palytoxin, ouabain, and SCH 28080. *J. Biol. Chem.* 276: 2608-2615.
- Faure, R.; Vincent, M.; Dufour, M.; Shaver, A.; Posner, B.I. (1995). Arrest at the G2/M transition of the cell cycle by protein-tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and a glial cell line. *J. Cell. Biochem.* 59: 389-401.
- Felix, C.F.; Oliveira, V.H.; Moreira, O.C.; Mignaco, J.A.; Barrabin, H.; Scofano, H.M. (2007). Inhibition of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase by heparin is modulated by potassium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 586-596.
- Ferrer, E.G.; Williams, P.A.M.; Baran, E.J. (1993). The interaction of the VO<sup>2+</sup> cation with oxidized glutathione. *J. Inorg. Biochem.* 50: 253-262.

- Fersht, A. (1999). Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York: W.H. Freeman. xxi, 631 p.
- Fohr, K.J.; Scott, J.; Ahnert-Hilger, G.; Gratzl, M. (1989). Characterization of the inositol 1,4,5 trisphosphate-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 (IP<sub>3</sub>) from its receptor and inhibits IP<sub>3</sub> induced Ca<sup>2+</sup> release in permeabilized pancreatic acinar cells. *Cell Calcium* 12: 735-742.
- Francik, R.; Krośniak, M.; Barlik, M.; Kudła, A.; Gryboś, R.; Librowski, T. (2011). Impact of vanadium complexes treatment on the oxidative stress factors in wistar rats plasma. *Bioinorg. Chem. Applications*. Article ID 206316, 8 pages doi:10.1155/2011/206316.
- Frank, A.; Sell, D.R.; Danielsson, R.; Fogarty, J.F.; Monnier, V.M. (2000). A syndrome of molybdenosis, copper deficiency, and type 2 diabetes in the moose population of south-west Sweden. *Sci. Total Environ.* 249: 123-131.
- Fraqueza, G.; Ohlin, C.A.; Casey, W. H.; Aureliano, M. (2012a). Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interactions with decaniobate, decavanadate, vanadate, tungstate and molybdate. *J. Inorg. Biochem.* 107: 82-89.
- Fraqueza, G.; Batista de Carvalho, L.A.E.; Marques, M.P.; Maia, L.; Ohlin, C.A.; Casey, W.H.; Aureliano, M. (2012b). Decavanadate, decaniobate, tungstate and molybdate interactions with sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase: quercetin prevents cysteine oxidation by vanadate but does not reverse ATPase inhibition. *Dalton Trans.* 41:12749-12758.
- Fu, Y.; Wang, Q.; Yang, X.G.; Yang, X.D.; Wang, K. (2008). Vanadyl bisacetylacetonate induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13: 1001-1009.
- Fujio, Y.; Nguyen, T.; Wencker, D.; Kitsis, R.N.; Walsh, K. (2000). Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation.* 101: 660-667.
- Gândara, R.M.C.; Soares, S.S.; Martins, H.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. J. (2005). Vanadate oligomers: in vivo effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers. *Inorg. Biochem.* 99: 1238-1244.
- 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-Vicente, S.; Yraola, F.; Martí L.; González-Muñoz, E.; García-Barrado, M. J.; Cantó, C.; Abella, A.; Bour, S.; Artuch, R.; Sierra, C.; Brandi, N.; Carpené, C.; Moratinos, J.; Camps, M.; Palacín, M.; Testar, X.; Gumà, A.; Albericio, F.; Royo, M.; Mian, A.;

- Zorzano, A. (2007). Oral insulin-mimetic compounds that act independently of insulin. *Diabetes*. 56: 486-493.
- Geng, Y.; Lotz, M. (1995). Increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  selectively suppresses IL-1-induced NO production by reducing iNOS mRNA stability. *J. Cell Biol.* 129: 1651-1657.
- 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 ( $\text{O}_2^-$ ) during enzymatic catalysis by E.C. 1.2.3.2 xanthine oxidase. *Talanta* 32: 359-362.
- Ghosh, P.; D'Cruz, O.J.; Narla, R.K.; Uckun, F.M. (2000). Apoptosis-inducing vanadocene compounds against human testicular cancer. *Clin. Cancer Res.* 6: 1536-1545.
- Goc, A. (2006). Biological activity of vanadium compounds. *Cent. Eur. J. Biol.* 1: 314-332.
- Goldfine, A.B., Patti, M.E.; Zuberi, L.; Goldstein, B.J.; LeBlanc, R.; Landaker, E.J.; Jiang, Z.Y.; Willsky, G.R.; Kahn, C.R. (2000). Metabolic effects of vanadyl sulfate in humans with non insulin-dependent diabetes mellitus: in vivo and in vitro studies. *Metabolism*. 49: 400-410.
- Goldfine, A.B.; Simonson, D.C.; Folli, F.; Patti, M.E.; Kahn, C.R. (1995). Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3311-3320.
- Goldwasser, I.; Gefel, D.; Gershonov, E.; Fridkin, M.; Shechter, Y. (2000a). Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. *J. Inorg. Biochem.* 80: 21-25.
- Goldwasser, I.; Qian, S.; Gershonov, E.; Fridkin, M.; Shechter, Y. (2000b). Organic vanadium chelators potentiate vanadium-evoked glucose metabolism in vitro and in vivo: establishing criteria for optimal chelators. *Mol. Pharmacol.* 58: 738-746.
- Gomes da Costa, A.; Madeira, V.M. (1986). Magnesium and manganese ions modulate  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and its energetic coupling in sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 199-206.
- Gonçalves, M. (1996). Métodos instrumentais para a análise de soluções - Análise quantitativa. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa
- González, D.A.; Ostuni, M.A.; Lacapère, J.J.; Alonso, G.L. (2006). Stoichiometry of ATP and metal cofactor interaction with the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: A binding model accounting for radioisotopic and fluorescence results. *Biophys. Chem.* 124: 27-34.
- Greenwood, N.; Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the Elements* (2nd ed.), Oxford: Butterworth-Heinemann, 340 p. ISBN 0-7506-3365-4
- Gresser, M.J.; Tracey, A.S. (1990). In: *Vanadium in Biological Systems*. Chasteen N.D, Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, pp. 63-79.

- Grösch, S.; Maier, T.J.; Schiffmann, S.; Geisslinger, G. (2006). Cyclooxygenase-2 (COX-2) – independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute*. 98: 736-747.
- Hall, I.H.; Tolmie, C.E.; Barnes, B.J.; Curtis, M.A.; Russell, J.M.; Flinn, M.G.; Grimes, R.N. (2000). Cytotoxicity of tantalum(V) and niobium(V) small carborane complexes and mode of action in P388 lymphocytic leukemia cells. *Appl. Organomet. Chem.* 14: 108-118.
- Hamaguchi, T.; Sudo, T.; Osada, H. (1995). RK-682, a potent inhibitor of tyrosine phosphatase, arrested the mammalian cell cycle progression at G1 phase. *FEBS Lett.* 372: 54-58.
- 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.
- Hames, B.D. (1998). *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*, 3rd edition. Oxford University Press, New York, 376 p.
- Hanuske, U.; Hanuske, A.R.; Marshall, M.H.; Muggia, V.A.; Von Hoff, D.D. (1987). Biphasic effect of vanadium salts on in vitro tumor colony growth. *Int. J. Cell. Cloning*. 5: 170-178.
- Harland, B.; Harden-Williams, B. (1994). Is vanadium of human nutritional importance yet? *J. Am. Diet. Assoc.* 94: 891-894.
- Hasenknopf, B. (2005). Polyoxometalates: introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications. *Front. Biosci.* 10: 275-87.
- Hayashi, T.; Okamura, K.; Kakemi, M.; Asano, S.; Mizutani, M.; Takeguchi, N.; Kawasaki, M.; Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; Morita, N. (1990). Scopadulcic acid B, a new tetracyclic diterpenoid from *Scoparia dulcis* L. Its structure, H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase inhibitory activity and pharmacokinetic behaviour in rats. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 38: 2740-2745.
- Haywood, S.; Dincer, Z.; Holding, J.; Parry, N.M. (1998). Metal (molybdenum, copper) accumulation and retention in brain, pituitary and other organs of ammonium tetrathiomolybdate-treated sheep. *Br. J. Nutr.* 79: 329-331.
- 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.
- Heyliger, C.E.; Tahiliani, A.G.; McNeill, J.H. (1985). Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science*. 227: 1474-1477.
- Highsmith, S.; Barker, D.; Scales, D.J. (1985). High-affinity and low-affinity vanadate binding to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase labeled with fluorescein isothiocyanate. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*. 817: 123-133.

- Hille, R. (2002). Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem. Sci.* 27: 360-367.
- Hogan, G. (1990). Peripheral erythrocyte levels, hemolysis and three vanadium compounds. *Experientia.* 46: 444-446.
- Holko, P.; Ligeza, J.; Kisielewska, J.; Kordowiak, A.M.; Klein, A. (2008). The effect of vanadyl sulphate (VOSO<sub>4</sub>) on autocrine growth of human epithelial cancer cell lines. *Pol. J. Pathol.* 59: 3-8.
- Holme, D.J.; Peck, H. (1998). *Analytical Biochemistry.* 3rd Edition. Longman Scientific & Technical, 488 p.
- Hou, G.; Dick, R.; Zeng, C.; Brewer, G.J. (2007). Antitumor and antiinflammatory effects of tetrathiotungstate in comparison with tetrathiomolybdate. *Transl. Res.* 149: 260-264.
- Howarth, O.W. (1990). Vanadium-51 NMR. *Progress NMR. Spectrosc.* 22: 453-485.
- Hua, S.; Inesi, G.; Toyoshima, C. (2000). Distinct topologies of mono and decavanadate binding and photo-oxidative cleavage in the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* 275: 30546-30550.
- Huang, C.; Ding, M.; Li, J.; Leonard, S.; Rojanasakul, Y.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; Jui, G.; Shi, X. (2000). Vanadium-induced nuclear factor of activated T cells activation through hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 276: 22397-22403.
- Ihenetu, K.; Qazzaz, H.M.; Crespo, F.; Fernandez-Botran, R.; Valdes, R.Jr. (2007). Digoxin-like immunoreactive factors induce apoptosis in human Acute T-cell lymphoblastic leukemia. *Clinical Chemistry.* 53: 1315-1322.
- Inesi, G. (1972). Active transport of calcium ion in sarcoplasmic membranes. *Annu.Rev. Biophys. Bioeng.* 1: 191-210.
- Inesi, G. (1985). Mechanism of calcium transport. *Ann.Rev.of Physiol.* 47: 573-601.
- Inesi, G. (1987). Sequential mechanism of calcium binding and translocation in sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 262: 16338-16342.
- Inesi, G.; Kirtley, M.R. (1992). Structural features of cation transport ATPases. *J Bioenerg Biomem.* 24: 271-283.
- Inesi, G.; Kurzmack, M.; Coan, C.; Lewis, D.E. (1980). Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicle. *J. Biol. Chem.* 255: 3025-3031.
- Inesi, G.; Lewis, D.; Murphy, A.J. (1984). Interdependence of H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and P<sub>i</sub> (or vanadate) sites in sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* 259: 996-1003.
- Inesi, G.; Lewis, D.; Nikic, D.; Hussain, A.; Kirtley, M.E. (1992). Long-range intramolecular linked functions in the calcium transport ATPase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 65: 185-215.

- Inesi, G.; Lewis, D.; Toyoshima, C.; Hirata, A.; de Meis, L. (2008). Conformational fluctuations of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the native membrane environment. Effects of pH, temperature, catalytic substrates, and thapsigargin. *J. Biol. Chem.* 283: 1189-1196.
- Inesi, G.; Zhang, Z.; Lewis, D. (2002). Cooperative setting for long-range linkage of Ca<sup>2+</sup> binding and ATP synthesis in the Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Biophys. J.* 83: 2327-2332.
- Inouye, Y.; Tokutake, Y.; Yoshida, T.; Seto, Y.; Hujita, H.; Dan, K.; Yamamoto, A.; Nishiya, S.; Yamase, T.; Nakamura, S. (1993). In vitro antiviral activity of polyoxomolybdates. Mechanism of inhibitory effect of PM-104 (NH<sub>4</sub>)<sub>12</sub>H<sub>2</sub>(Eu<sub>4</sub>(MoO<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>O)<sub>16</sub>(Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>)<sub>4</sub>).13H<sub>2</sub>O on human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res.* 20: 317-331.
- Ishida, Y.; Takagi, K.; Takahashi, M.; Satake, N.; Shibata, S. (1983). Palytoxin isolated from marine coelenterates. The inhibitory action on (Na,K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 258: 7900-7902.
- James, T.L. (1975). Nuclear magnetic resonance in biochemistry. Principles and applications. Academic Press, Inc., 413 p.
- Jardim-Messeder, D.; Camacho-Pereira, J.; Galina, A. (2012). 3-Bromopyruvate inhibits calcium uptake by sarcoplasmic reticulum vesicles but not SERCA ATP hydrolysis activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44: 801-807.
- Jelikić-Stankov, M.; Uskoković-Marković, S.; Holclajtner-Antunović, I.; Todorović, M.; Djurdjević, P. (2007). Compounds of Mo, V and W in biochemistry and their biomedical activity. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 21: 8-16.
- Jencks, W.P. (1989). How does a calcium pump pump calcium? *J. Biol. Chem.* 264: 18855-18858.
- Johansson, C.B.; Albrektsson, T. (1991). A removal torque and histomorphometric study of commercially pure niobium and titanium implants in rabbit bone. *Clin. Oral Implants Res.* 2: 24-29.
- Johnson, A.J.; Hsu, A.L.; Lin, H.P.; Song, X.; Chen, C.S. (2002). The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks. *Biochem. J.* 366: 831-837.
- Juhaszova, M.; Blaustein, M. P. (1997). Na<sup>+</sup> pump low and high ouabain affinity  $\alpha$  subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1800-1805.
- Kajimoto, Y.; Kaneto, H. (2004). Role of oxidative stress in pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1011: 168-76.
- Kaliva, M.; Giannadaki, T.; Salifoglou, A.; Raptopoulou, C.P.; Terzis, A.; Tangoulis, V. (2001). pH-dependent investigations of vanadium(V)-peroxo-malate complexes from

- aqueous solutions. In search of biologically relevant vanadium (V)-peroxo species. *Inorg. Chem.* 40: 3711-3718.
- Kassabova-Zhetcheva, V.D.; Pavlova, L.P. (2011). Synthesis and spectral characterization of a decavanadate/chitosan complex. *Turk. J. Chem.* 35: 215-223.
- Kataoka, T.; Muroi, M.; Ohkuma, S.; Waritani, T.; Magae, J.; Takatsuki, A.; Kondo, S.; Yamasaki, M.; Nagai, K. (1995). Prodigiosin 25-C uncouples vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase, inhibits vacuolar acidification and affects glycoprotein processing. *FEBS Letters.* 359: 53-59.
- Keeling, D.J.; Fallowfield, C.; Milliner, K.J.; Tingley, S.K.; Ife, R.J.; Underwood, A.H. (1985). Studies on the mechanism of action of omeprazole. *Biochemical Pharmacology.* 34: 2967-2973.
- Kiss, T.; Kiss, E.; Garribba, E.; Sakurai, H. (2000). Speciation of insulin-mimetic VO(IV)-containing drugs in blood serum. *J. Inorg. Biochem.* 80: 65-73.
- Klein, A.; Holko, P.; Ligeza, J.; Kordowiak, A.M. (2008). Sodium orthovanadate affects growth of some human epithelial cancer cells (A549, HTB44, DU145). *Folia Biol. Krakow.* 56: 115-121.
- Kletzin, A.; Adams, M.W. (1996). Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 5-63.
- Knudtson, B. (1979). Acute toxicity of vanadium to two species of freshwater fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 95-99.
- Korbecki, J.; Baranowska-Bosiacka, I.; Gutowska, I.; Chlubek, D. (2012). Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochim. Pol.* 59: 195-200.
- Kordowiak, A.M.; Klein, A.; Goc, A.; Dabroś, W. (2007). Comparison of the effect of VOSO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and NaVO<sub>3</sub> on proliferation, viability and morphology of H35-19 rat hepatoma cell line. *Pol. J. Pathol.* 58: 51-57.
- Koyuturk, M.; Tunali, S.; Bolkent, S.; Yanardag, R. (2005). Effects of vanadyl sulfate on liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 104: 233-247.
- Krieger, N.S.; Tashjian, A.H.Jr. (1983). Inhibition of stimulated bone resorption by vanadate. *Endocrinology.* 113: 324-328.
- Kustin, K.; McLeod, G. (1983). Vanadium and other metal ions in the physiological ecology of marine organisms. *Structure and Bonding* 53: 139-160.
- Kutchai, H.; Geddis, L.M. (2001). Inhibition of the Na,K-ATPase of canine renal medulla by several local anesthetics. *Pharmacological Research.* 43: 399-403.
- Lacka, B.; Grzeszczak, W. (1997). The role of free radicals in the pathogenesis of essential hypertension. *Polskie Arch. Med. Wew.* 98: 67-75.

- Lambrecht, N.; Corbett, Z.; Bayle, D.; Karlsh, S.J.; Sachs, G. (1998). Identification of the site of inhibition by omeprazole of a alpha-beta fusion protein of the H,K-ATPase using site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 273: 13719-13728.
- Lapenna, D.; Ciofani, G.; Bruno, C.; Pierdomenico, S.D.; Giuliani, L.; Giamberardino, M.A.; Cuccurullo, F. (2002). Vanadyl as a catalyst of human lipoprotein oxidation. *Biochem. Pharmacol.* 63: 375-380.
- Lau, K.H.; Tanimoto, H.; Baylink, D.J. (1998). Vanadate stimulates bone cell proliferation and bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinology.* 123: 2858-2867.
- Lee, A.G.; East, J.M. (2001). What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem. J.* 356: 665-683.
- Lenoir, G.; Picard, M.; Gauron, C.; Montigny, C.; Le Maréchal, P.; Falson, P.; Le Maire, M.; Møller J.V.; Champeil, P. (2004). Functional properties of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase after proteolytic cleavage at Leu119-Lys120, close to the A-domain. *J. Biol. Chem.* 279: 9156-9166.
- Léonard, A.; Gerber, G. (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat. Res.* 317: 81-88.
- Leonard, S.S.; Harris, G.K.; Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 1921-1942.
- Li, J.; Elberg, G.; Crans, D.C.; Shechter, Y. (1996). Evidence for the distinct vanadyl(+4)-dependent activating system for manifesting insulin-like effects. *Biochemistry.* 35: 8314-8318.
- Li, M.; Ding, W.; Baruah, B.; Crans, D.C.; Wang, R. (2008). Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B and alkaline phosphatase by bis(maltolato)oxovanadium(IV). *J. Inorg. Biochem.* 102: 1846-1853.
- Li, M.; Smee, J.J.; Ding, W.; Crans, D.C. (2009). Anti-diabetic effects of sodium 4-amino-2,6-dipicolinatodioxovanadium(V)dihydrate in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Inorg. Biochem.* 103: 585-589.
- Li, Y.T.; Zhu, C.Y.; Wu, Z.Y.; Jiang, M.; Yan, C.W. (2010). Synthesis, crystal structures and anticancer activities of two decavanadate compounds. *Transition Met. Chem.* 35: 597-603.
- Liochev, S.I.; Fridovich, I. (1991). The roles of  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}^\cdot$  and secondarily derived radicals in oxidation reactions catalyzed by vanadium salts. *Arch. Biochem. Biophys.* 29: 379-382.
- Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Matsudaira, P. (2007). *Molecular Cell Biology*. 6th edition, W.H. Freeman & Company, p. 973.

- Logan-Smith, M.J.; Lockyer, P.J.; East, J.M.; Lee, A.G. (2001). Curcumin, a molecule that inhibits the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum but increases the rate of accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* 276: 46905-46911.
- Ma, H.; Lewis, D.; Xu, C.; Inesi, G.; Toyoshima, C. (2005). Functional and structural roles of critical amino acids within the "N", "P", and "A" domains of the  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) headpiece. *Biochemistry.* 44: 8090-8100.
- MacLennan, D.H.; Brandl, C.J.; Korczak, B.; Green, N.M. (1985). Amino-acid sequence of a  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature.* 316: 696-700.
- MacLennan, D.H.; Green, N.M. (2000). Structural biology. Pumping ions. *Nature.* 405: 633-634.
- MacLennan, D.H.; Toyofuku, T. (1992). Structure-function relationships in the  $\text{Ca}^{2+}$  pump of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 559-562.
- MacLennan, D.H.; Rice, W.J.; Green, N.M. (1997). The mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by sarco(endo)-plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. *J. Biol. Chem.* 272: 28815-28818.
- Madeira, V.M.C. (1980). Proton movements across the membranes of sarcoplasmic reticulum during the uptake of calcium ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 200: 319-325.
- Madeira, V.M.C. (1982). Oxalate transfer across the membranes of sarcoplasmic reticulum during the uptake of  $\text{Ca}^{2+}$ . *Cell Calcium.* 3: 67-79.
- Mamane, Y.; Pirrone, N. (1998). Vanadium in atmosphere. In: Nriagu, J.O. (Eds.). *Vanadium in the environment, Part 1: Chemistry and Biochemistry.* John Wiley & Sons, Inc. New York, pp. 37-71.
- Maniatakou, A.; Karaliota, S.; Mavri, M.; Raptopoulou, C.; Terzis, A.; Karaliota, A. (2009). Synthesis, characterization and crystal structure of novel mononuclear peroxotungsten(VI) complexes. Insulinomimetic activity of W(VI) and Nb(V) peroxo complexes. *J. Inorg. Biochem.* 103: 859-868.
- Martonosi, A.N.; Pikula, S. (2003). The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim. Pol.* 50: 1-30.
- Marx J. (2002). Unraveling the causes of diabetes. *Science.* 296: 686-689.
- Matsui, T.; Li, L.; del Monte, F.; Fukui, Y.; Franke, T.F.; Hajjar, R.J.; Rosenzweig, A. (1999). Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation.* 100: 2373-2379.
- Matsumoto, J. (1994). Vanadate, molybdate and tungstate for orthomolecular medicine. *Medical Hypothesis.* 43: 177-182.

- Matsuya, H.; Okamoto, M.; Ochi, T.; Nishikawa, A.; Shimizu, S.; Kataoka, T.; Nagai, K.; Wasserman, H.H.; Ohkuma, S. (2000). Reversible and potent uncoupling of hog gastric (H<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase by prodigiosins. *Biochemical Pharmacology*. 60: 1855-1863.
- Maurer, A.; Fleischer, S. (1984). Decavanadate is responsible for vanadate-induced two-dimensional crystals in sarcoplasmic reticulum. *J. Bioenerg. Biomembr.* 16: 491-505.
- McIntosh, D. B. (1998). The ATP binding sites of P-type ion transport ATPases. *Adv. Mol. Cell. Biol.* 23A: 33-99.
- McNeill, J.H. (2000). Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity?: A reply. *Mol. Cell. Biochem.* 208: 167-168.
- McNeill, J.H.; Yuen, V.G.; Hoveyda, H.R.; Orvig, C. (1992). Bis(maltolato)oxovanadium(IV) is a potent insulin mimic. *J. Med. Chem.* 35: 1489-1491.
- McPhalen, C.A.; Strynadka, N.C.; James, M.N. (1991). Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective. *Adv. Protein Chem.* 42: 77-144.
- Medda, P.; Hasselbach, W. (1983). The vanadate complex of calcium transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum, its formation and dissociation. *Eur. J. Biochem.* 137: 7-14.
- Meissner, G.; Conner, G.E.; Fleischer, S. (1973). Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca<sup>2+</sup>-pump and Ca<sup>2+</sup> binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 298: 246-269.
- Mendel, R.R. (2001). Molybdenum: biological activity and metabolism. *Dalton Trans.* 3404-3409.
- Mendel, R.R.; Bittner, F. (2006). Cell biology of molybdenum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763: 621-35.
- Merino, J.; Gutiérrez-Merino, C.; Henao, F. (1999). Plausible stoichiometry of the interacting nucleotide-binding sites in the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from sarcoplasmic reticulum membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 368: 298-302.
- Messmore, J.M.; Raines, R.T. (2000). Decavanadate inhibits catalysis by ribonuclease A. *Arch. Biochem. Biophys.* 381: 25-30.
- Meyerovitch, J.; Farfel, Z.; Sack, J.; Shechter Y. (1987). Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. Characterization and mode of action. *J. Biol. Chem.* 262: 6658-6662.
- Mikkelsen, S.R.; Cortón, E. (2004). *Bioanalytical chemistry*. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons. xvii, 361 p.
- Mintz, E.; Guillain, F. (1997). Calcium transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1318: 52-70.

- 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.
- Miró-Queralt, M.; Guinovart, J.J.; Planas, J.M. (2008). Sodium tungstate decreases sucrase and Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporter in the jejunum of diabetic rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295: G479–G484.
- Molinuevo, M.S.; Cortizo, A.M.; Etcheverry, S.B. (2008). Vanadium (IV) complexes inhibit adhesion, migration and colony formation of UMR106 osteosarcoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 61: 767-773.
- Møller, J.V.; Juul, B.; le Maire, M. (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P- type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1286: 1-51.
- Moncoq, K.; Trieber, C.A.; Young, H.S. (2007). The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J. Biol. Chem.* 282: 9748-9757.
- Moreno, I.; Norambuena, L.; Maturana, D.; Toro, M.; Vergara, C.; Orellana, A.; Zurita-Silva, A.; Ordenes, V.R. (2008). AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca<sup>2+</sup>/heavy metal pump. *J. Biol. Chem.* 283: 9633-9641.
- Morita, A.; Yamamoto, S.; Wang, B.; Tanaka, K.; Suzuki, N.; Aoki, S.; Ito, A.; Nanao, T.; Ohya, S.; Yoshino, M.; Zhu, J.; Enomoto, A.; Matsumoto, Y.; Funatsu, O.; Hosoi, Y.; Ikekita, M. (2010). Sodium orthovanadate inhibits p53-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 70: 257–265.
- 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.
- Muller, A.; Peters, F.; Pope, M.T.; Gatteschi, D. (1998). Polyoxometalates: Very large clusters-nanoscale magnets. *Chem. Rev.* 98: 239-271.
- Mundiña-Weilennann, C.; Vittone, L.; Said, M.; Mattiazzi, A. (2001). Phospholomban: una pequeña proteína que regula la contractilidad miocárdica. *Rev. Fed. Arg. Cardiol.* 30: 651-658.
- Narla, R.K.; Chen, C.L.; Dong, Y.; Uckun, F.M. (2001a). In vivo antitumor activity of bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatooxovanadium (IV) (METVAN [VO(SO<sub>4</sub>)(Me<sub>2</sub>-Phen)<sub>2</sub>]). *Clin. Cancer Res.* 7: 2124-2133.
- Narla, R.K.; Dong, Y.; D’Cruz, O.J.; Navara, C.; Uckun, F.M. (2000). Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)sulfatooxovanadium(IV) as a novel apoptosis-inducing anticancer agent. *Clin. Cancer Res.* 6: 1546-1556.
- Narla, R.K.; Dong, Y.; Klis, D.; Uckun, F.M. (2001b). Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)sulfatooxovanadium(IV) as a novel antileukemic agent with matrix metalloproteinase inhibitory activity. *Clin. Cancer Res.* 7: 1094-1101.

- Narla, R.K.; Dong, Y.; Uckun, F.M. (2001c). Apoptosis inducing novel anti-leukemic agent, Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)sulfatooxovanadium(IV) [VO(SO<sub>4</sub>)(Me<sub>2</sub>-Phen)<sub>2</sub>] depolarizes mitochondrial membranes. *Leuk. Lymphoma* 41: 625-634.
- 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.E. ; Post, R.; Grantham, J.; Macara, I.; Kubena, L.; Philips, T.; Nielsen, F. (1986). Role of vanadium in biology. *Fed. Proc.* 45: 123-132.
- Nielsen, C.H.; Abdali, S.; Lundbaek, J.A.; Cornelius, F. (2007). Raman spectroscopy of conformational changes in membrane-bound sodium potassium ATPase. *Spectroscopy.* 22: 52-63.
- Nielsen, F.H. (1991). Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel and arsenic: Current knowledge and speculation. *FASEB J.* 5: 2661-2667.
- Nielsen, F.H. (1985). In: *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, Sigel, H. and Sigel, A. Ed., Marcel Dekker INC: New York, pp. 543-573.
- Niu, Y.; Liu, W.; Tian, C.; Xie, M.; Gao, L.; Chen, Z.; Chen, X.; Li, L. (2007). Effects of bis(alpha-furancarboxylato)oxovanadium(IV) on glucose metabolism in fatfed /streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 572: 213-219.
- Nomiya, K.; Torii, H.; Hasegawa, T.; Nemoto, Y.; Nomura, K.; Hashino, K.; Uchida, M.; Kato, Y.; Shimizu, K.; Oda, M. (2001). Insulin mimetic effect of a tungstate cluster. Effect of oral administration of homo-polyoxotungstates and vanadium-substituted polyoxotungstates on blood glucose level of STZ mice. *J. Inorg. Biochem.* 86: 657-667.
- Nose, Y.; Hayashi, M.; Uyama, T.; Moriyama, Y.; Michibata, H. (1997) Specific increase in the number of vanadium-containing blood cells by some ionophores and inhibitors of proton-ATPases in the ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. *Zoological Science.* 14: 205-210.
- Nriagu, J.O. (1998a). 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.
- Nriagu, J.O. (1998b). *Health Effects, Part 2, Vanadium in the Environment*. First Edition, New York: Wiley, 360 p.
- Obara, K.; Miyashita, N.; Xu, C.; Toyoshima, I.; Sugita, Y.; Inesi, G.; Toyoshima, C. (2005). Structural role of countertransport revealed in Ca<sup>2+</sup> pump crystal structure in the absence of Ca<sup>2+</sup>. *Proc .Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 14489-14496.
- 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.

- Ogawa, H.; Stokes, D.L.; Sasabe, H.; Toyoshima, C. (1998). Structure of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump of sarcoplasmic reticulum: a view along the lipid bilayer at 9-Å resolution. *Biophys. J.* 75: 41-52.
- Ohlin, C.A.; Villa, E.M.; Casey, W. H. (2009a). One-pot synthesis of the decaniobate salt  $[\text{N}(\text{CH}_3)_4]_6[\text{Nb}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6[\text{H}_2\text{O}]$  from hydrous niobium oxide. *Inorg. Chim. Acta.* 362: 1391-1392.
- Ohlin, C.A.; Villa, E.M.; Fettingner, J. C.; Casey, W. H. (2008). Distinctly different reactivities of two similar polyoxoniobates with hydrogen peroxide, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47: 8251-8254.
- Ohlin, C.A.; Villa, E.M.; Fettingner, J.C.; Casey, W.H. (2009b). A new titanoniobate ion - Completing the series  $[\text{Nb}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$ ,  $[\text{TiNb}_9\text{O}_{28}]^{7-}$  and  $[\text{Ti}_2\text{Nb}_8\text{O}_{28}]^{8-}$ . *Dalton Trans.* 15: 2677-2678.
- Olesen, C.; Picard, M.; Winther, A.M.; Gyurup, C.; Morth, J.P.; Orvig, C.; Møller, J.V.; Nissen, P.(2007). The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* 450: 1036-1042.
- Orvig, C.; Thompson, K.H.; Battell, M.; McNeill, JH. (1995). Vanadium Compounds as Insulin Mimics; *Met. Ions Biol. Syst.* 31: 575-594.
- Orvig, C.; Thompson, K.H.; Liboiron, B.D.; McNeill, J.H.; Yuen, V.G.(2003). Biocalization and in vivo coordination chemistry of vanadium pharmaceuticals. *J. Inorg. Biochem.* 96: 14.
- Packer, L. (1993). The role of antioxidative treatment in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 36: 1212-1213.
- Parrondo, R.; de las Pozas, A.; Reiner, T.; Rai, P.; Perez-Stable, C. (2010). NF-kappaB activation enhances cell death by antimitotic drugs in human prostate cancer cells. *Mol. Cancer.* 9: 82-95.
- Paula, S.; Tabet, M.R.; Ball, W.J. Jr. (2005). Interactions between cardiac glycosides and sodium/potassium-ATPase: three-dimensional structure-activity relationship models for ligand binding to the E2- $\text{P}_i$  form of the enzyme versus activity inhibition. *Biochemistry.* 44: 498-510.
- Pawa, S.; Ali, S. (2004). Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. *Biochim. Biophys. Acta.* 1688: 210-222.
- Pedersen, P.L., Carafoli, E. (1987). Ion Motive ATPases. I. ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12: 146-150.
- Pereira, M.J.; Carvalho, E.; Eriksson, J.W.; Crans, D.C.; Aureliano, M. (2009). Effects of decavanadate and insulin enhancing vanadium compounds on glucose uptake in isolated rat adipocytes. *J. Inorg. Biochem.* 103: 1687-1692.

- Pick, U. (1982). The interaction of vanadate ions with the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 257: 6111-6119.
- Pick, U.; Racker, E. (1979). Inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from sarcoplasmic reticulum by dicyclohexylcarbodiimide: evidence for location of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site in a hydrophobic region. *Biochemistry.* 18: 108-113.
- Pope, M.T. (1983). Heteropoly and isopoly oxometalates, Springer Verlag, New York, 190 p.
- Poucheret, P.; Verma, S.; Grynepas, M.D.; McNeill, J.H. (1998). Vanadium and diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* 188: 73-80.
- Putney, J.W.Jr. (2001). Cell biology. Channelling calcium. *Nature.* 410: 648-649.
- Ramanadham, S.; Heyliger, C.; Gresser, M.J.; Tracey, A.S.; McNeill, J.H. (1991). The distribution and half-life for retention of vanadium in the organs of normal and diabetic rats orally fed vanadium(IV) and vanadium(V). *Biol. Trace Elem. Res.* 30: 119-124.
- Ramanadham, S.; Mongold, J.J.; Brownsey, R.W.; Cros, G.H.; McNeill, J.H. (1989). Oral vanadyl sulfate in treatment of diabetes mellitus in rats. *Am. J. Physiol.* 257: H904-H911.
- Ramos, S.; Almeida, R.M.; Moura, J.J.G.; Aureliano, M. (2011). Implications of oxidovanadium(IV) binding to actin. *J. Inorg. Biochem.* 105: 777-783.
- Ramos, S.; Duarte, R.O.; Moura, J.J.G.; Aureliano, M. (2009). Decavanadate interactions with actin: cysteine oxidation and vanadyl formation. *Dalton Trans.* 38: 7985-7994.
- 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.
- Ramos, S.; Moura, J.J.G.; Aureliano, M. (2010). Actin as a potential target for decavanadate. *J. Inorg. Biochem.* 104: 1234-1239.
- Ramos, S.; Moura, J.J.G.; Aureliano, M. (2012). Recent advances into vanadyl, vanadate and decavanadate interactions with actin. *Metallomics.* 4: 16-22.
- Rangel, M.; Amorim, M.J.; Nunes, A.; Leite, A.; Pereira, E.; de Castro, B.; Sousa, C.; Yoshikawa, Y.; Sakurai, H. (2009). Novel 3-hydroxy-4-pyridinonato oxidovanadium(IV) complexes to investigate structure/activity relationships. *J. Inorg. Biochem.* 103: 496-502.
- Raussens, V.; Pézolet, M.; Ruyschaert, J.M.; Goormaghtigh, E. (1999). Structural difference in the  $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase between the E1 and E2 conformations. An attenuated total reflection infrared spectroscopy, UV circular dichroism and Raman spectroscopy study. *Eur. J. Biochem.* 262: 176-183.

- Ray, R.S.; Ghosh, B.; Rana, A.; Chatterjee, M. (2007). Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemo preventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int. J. Cancer*. 120: 13–23.
- Rehder, D. (1982). A survey of  $^{51}\text{V}$  NMR spectroscopy. *Bull. Magn. Reson.* 4: 33-83.
- Rehder, D. (2003). Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorg. Chem. Commun.* 6: 604-617.
- Reul, B.A.; Amin, S.S.; Buchet, J.P.; Ongemba, L.N.; Crans, D.C.; Brichard, S.M. (1999). Effects of vanadium complexes with organic ligands on glucose metabolism: a comparison study in diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 126: 467-477.
- Reul, B.A.; Becker, D.J.; Ongemba, L.N.; Bailey, C.J.; Henquin, J.C.; Brichard, S.M. (1997). Improvement of glucose homeostasis and hepatic insulin resistance in ob/ob mice given oral molybdate. *J. Endocrinol.* 155: 55-64.
- Rhule, J.T.; Hill, C.L.; Jud, D.A.; Schinazi, R.F. (1998). Polioxometalates in medicine. *Chem. Rev.* 98: 327-357.
- Rivadeneira, J.; Barrio, D.A.; Arrambide, G.; Gambino, D.; Bruzzone, L.; Etcheverry, S.B. (2009). Biological effects of a complex of vanadium(V) with salicylaldehyde semicarbazone in osteoblasts in culture: mechanism of action. *J. Inorg. Biochem.* 103: 633-642.
- Rivadeneira, J.; Barrio, D.A.; Etcheverry, S.B.; Baran, E.J. (2007). Spectroscopic characterization of a  $\text{VO}_2^+$  complex of oxodiacetic acid and its bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *Biol. Trace Elem. Res.* 118: 159-166.
- Robyt, J.F.; White, B.J. (1996). *Biochemical Techniques, Theory and Practice*, 2nd ed., Waveland Press, Inc., 528 p.
- 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.
- Rudiger, S.; Shuai, J.W.; Huisinga, W.; Nagaiah, C.; Warnecke, G.; Parker, I.; Falcke, M. (2007). Hybrid stochastic and deterministic simulations of calcium blips. *Biophys. J.* 93: 1847-1857.
- Sachs, G.; Shin, J. M.; Vagin, O.; Lambrecht, N.; Yakubov, I.; Munson, K. (2007). The gastric H,K ATPase as a drug target: past, present, and future. *J. Clin. Gastroenterol.* 41: S226-S242.
- Sagara, Y.; Inesi, G. (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J. Biol. Chem.* 266: 13503-13506.

- 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.
- Sakurai, H.; Yoshikawa, Y.; Yasui, H. (2008). Current state for the development of metallopharmaceutics and anti-diabetic metal complexes. Chem. Soc. Rev. 37: 2383-2392.
- Salice, V.C.; Cortizo, A.M.; Dumm, C.L.G.; Etcheverry, S.B. (1999). Tyrosine phosphorylation and morphological transformation induced by four vanadium compounds on MC3T3E1 cells. Mol. Cell. Biochem. 198: 119-128.
- Salifoglou, A.; Kaliva, M.; Giannadaki, T.; Raptopoulou, C. P.; Terzis, A. (2002). A new dinuclear vanadium(V)-citrate complex from aqueous solutions. Synthetic, structural, spectroscopic, and pH-dependent studies in relevanceto aqueous vanadium(V)-citrate speciation. Inorganic Chemistry. 41: 3850-3858.
- Samanta, S.; Chatterjee, M.; Ghosh, B.; Rajkumar, M.; Rana, A.; Chatterjee, M. (2008a). Vanadium and 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> combination in inhibitions of 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. Biochim. Biophys. Acta. 1780: 1106-1114.
- Samanta, S.; Swamy, V.; Suresh, D.; Rajkumar, M.; Rana, B.; Rana, A.; Chatterjee, M. (2008b). Protective effects of vanadium against DMH-induced genotoxicity and carcinogenesis in rat colon: removal of O(6)-methylguanine DNA adducts, p53 expression, inducible nitric oxide synthase downregulation and apoptotic induction. Mutat. Res. 650: 123-131.
- Sande-Lemos, M.P.; de Meis, L. (1988). Regulation of ATP synthesis catalyzed by the calcium pump of sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 263: 3795-3798.
- Scheiner-Bobis, C.; Schneider, H. (1997). Palytoxin-induced channel formation within the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase does not require a catalytically active enzyme. Eur. J. Biochem. 248: 717-723.
- Schiøtt, B.; Palmgren, M.G.; Møller, J.V.; Nissen, P.; Fedosova, N. (2009). Inhibitory effects of decavanadate on several enzymes and *Leishmania tarentolae* in vitro. Biochim. Biophys. Acta. 1787: 207-220.
- Schoner, W.; Scheiner-Bobis; G. (2007). Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. Am. J. Cardiovasc. Drugs. 7: 173-189.
- Schroeder, H.A.; Mitchener, M.; Nason, A.P. (1970). Zirconium, niobium, antimony, vanadium and lead in rats: life term studies. J. Nutr. 100: 59-68.
- Scior, T.; Guevara-García, J.A.; Melendez, F.J.; Abdallah, H.H.; Do, Q.T.; Bernard, P. (2010). Chimeric design, synthesis, and biological assays of a new nonpeptide insulin-

- mimetic vanadium compound to inhibit protein tyrosine phosphatase 1B. *Drug Des. Devel. Ther.* 4: 231-242.
- Scior, T.; Mack, H.G.; García, J.A.; Koch, W. (2009). Antidiabetic Bis-maltolato-oxo vanadium (IV): conversion of inactive trans to bioactive cis-BMOV for possible binding to target PTP-1B. *Drug Des. Devel. Ther.* 2: 221-231.
- 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.
- Seto-Young, D.; Monk, B.; Mason, A.B.; Perlin, D.S. (1997). Exploring an antifungal target in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of fungi. *Biochim. Biophys. Acta.* 1326: 249-256.
- Shah, D.I.; Singh, M. (2006). Inhibition of protein tyrosin phosphatase improves vascular endothelial dysfunction. *Vasc. Pharmacol.* 44: 177-182.
- Shechter, Y.; Goldwasser, I.; Mironchik, M.; Fridkin, M.; Gefel, D. (2003). Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes. *Coord. Chem. Rev.* 237: 3-11.
- 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.
- Shi, Y.; Harvey, I.; Campopiano, D.; Sadler, P.J. (2010). Niobium Uptake and Release by Bacterial Ferric Ion Binding Protein. *Bioinorg. Chem. Appl.* 1-11.
- Shin, J.M.; Sachs, G. (2006). Gastric H,K-ATPase as a drug target. *Dig. Dis. Sci.* 51: 823-833.
- Shukla, R.; Barve, V.; Padhye, S.; Bhonde, R. (2006). Reduction of oxidative stress induced vanadium toxicity by complexing with a flavonoid, quercetin: a pragmatic therapeutic approach for diabetes. *Biometals.* 19: 685-693.
- Siamwiza, M.N., Lord, R.C.; Chen, M.C.; Takamatsu, T.; Harada, I.; Matsuura, H.; Shimanouchi, T. (1975). Interpretation of the doublet at 850 and 830 cm<sup>-1</sup> in the Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds. *Biochemistry.* 14: 4870-4876.
- Silva, J.J.R.F.d.; Williams, R.J.P. (2001). *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life.* 2nd ed. Oxford University Press. xvii, 575 p.
- Simon, W.A.; Herrmann, M.; Klein, T.; Shin, J.M.; Huber, R.; Senn-Bilfinger, J.; Postius, S. (2007). Soraprazan: Setting new standards in inhibition of gastric acid secretion. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 321: 866-874.
- Simons, T.J. (1979). Vanadate - A new tool for biologists. *Nature.* 281: 337-338.

- Singh, S.; Agarwal, R.; Jamal, F.; Mehrotra, S.; Singh, R. (2012). Effects of tert-butyl hydroperoxide on Ca<sup>2+</sup> ATPase activity in isolated rat hepatocytes and its reversal by antioxidants. *J. Environ. Biol.* 33: 867-870.
- Sitprija, V.; Somchai, E. (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- 133.
- Skoog, D.; Holler, F.; Nieman, T. (1998). *Principles of instrumental analysis.* Saunders College Publishing, 960 p.
- Smee, J.J.; Epps, J.A.; Ooms, K.; Bolte, S.E.; Polenova, T.; Baruah, B.; Yang, L.; Ding, W.; Li, M.; Willsky, G.R.; la Cour, A.; Anderson, O.P.; Crans, D.C. (2009). Chloro substituted dipicolinate vanadium complexes: synthesis, solution, solid-state, and insulin-enhancing properties. *J. Inorg. Biochem.* 103: 575-584.
- Smith, T.S.; LoBrutto, R.; Pecoraro, V.L. (2002). Paramagnetic spectroscopy of vanadyl complexes and its applications to biological systems. *Coord. Chem. Rev.* 228: 1-18.
- 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.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007a). 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. pp. 149-179.
- 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. (2007d). Mitochondria as a target for decavanadate toxicity in *Sparus aurata* heart. *Aquat. Toxicol.* 83: 1-9.
- Soares, S.S.; Henao, F.; Aureliano, M.; Gutiérrez-Merino, C. (2008b). Vanadate induces necrotic death in neonatal rat cardiomyocytes through mitochondrial membrane depolarization. *Chem.Res. Toxicol.* 21: 607-618.
- 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.; Coucelo, J.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007b). Vanadium distribution, lipid peroxidation and oxidative stress markers upon decavanadate in vivo administration. *J. Inorg. Biochem.* 101: 80-88.
- Soares, S.S.; Martins, H.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2008a). Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: Metal accumulation and oxidative stress markers. *Comparative Biochemistry and Physiology . Part C* 147: 168-178.

- Soler, F.; Plenge-Tellechea, L. F.; Fortea, I.; Fernandez-Belda, F. (1998). Cyclopiazonic acid effect on  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent conformational states of the sarcoplasmic reticulum ATPase. Implications for the enzyme turnover. *Biochemistry*. 37: 4266-4274.
- Srivastava, A.K.; Mehdi, M.Z. (2005). Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabetic Medicine*. 22: 2-13.
- 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.
- Stankov, M.J.; Markovic, S.U.; Antunovic, I.H.; Todorovic, M.; Djurdevic, P. (2007). Compounds of Mo, V and W in biochemistry and their biomedical activity. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 21: 8-16.
- Stern, M.D.; Pizarro, G.; Rios, E. (1997). Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 110: 415-440.
- Stohs, S.J.; Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 321-336.
- Stokes, D.L.; Green, N.M. (2000). Modeling a dehalogenase fold into the 8-A density map for  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase defines a new domain structure. *Biophys. J.* 78: 1765-1776.
- Stokes, D.L.; Green, N.M. (2003). Structure and function of the calcium pump. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32: 445-468.
- Stokes, D.L.; Wagenknecht, T. (2000). Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: Structure and function of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and the ryanodine receptor. *Eur. J. Biochem.* 267: 5274-5279.
- Suzuki, K.; Inageda, K.; Nishitai, G.; Matsuoka, M. (2007). Phosphorylation of p53 at serine 15 in A549 pulmonary epithelial cells exposed to vanadate: involvement of ATM pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220: 83-91.
- Tadini-Buoninsegni, F.; Bartolommei, G.; Moncelli, M.R.; Guidelli, R.; Inesi, G. (2006). Pre-steady state electrogenic events of  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchange and transport by the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 281: 37720-37727.
- Takada, Y.; Hashimoto, M.; Kasahara, J.; Aihara, K.; Fukunaga, K. (2004). Cytoprotective effect of sodium orthovanadate on ischemia/reperfusion-induced injury in the rat heart involves Akt activation and inhibition of fodrin breakdown and apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311: 1249-1255.
- Takada, Y.; Matsuo, K.; Kataoka, T. (2008). Gramicidin A directly inhibits mammalian  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase. *Mol. Cell. Biochem.* 319: 99-103.

- Takahashi, M.; Kondou, Y.; Toyoshima, C. (2007). Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 5800-5805.
- Theberge, J.F.; Mehdi, M.Z.; Pandey, S.K.; Srivastava, A.K. (2003). Prolongation of insulin-induced activation of mitogen-activated protein kinases ERK 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase by vanadyl sulfate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* 420: 9-17.
- Thomas, G. J. (2002). New structural insights from Raman spectroscopy of proteins and their assemblies. *Biopolymers (Biospectroscopy)*. 67: 214-225.
- Thompson, H.J.; Chasteen, N.D.; Meeker, L.D. (1984). Dietary vanadyl(IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 5: 849-851.
- Thompson, K.H.; McNeill, J.H.; Orvig, C. (1999). Vanadium compounds as insulin mimics. *Chem. Rev.* 99: 2561-2572.
- Thompson, K.H.; Lichter, J.; LeBel, C.; Scaife, M.C.; McNeill, J.H.; Orvig, C. (2009). Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future. *J. Inorg. Biochem.* 103: 554-558.
- Thompson, K. H.; Orvig, C. (2004). Vanadium compounds in the treatment of diabetes. *Metal Ions Biol. Syst.* 41: 221-252.
- Thompson, K.H.; Orvig, C. (2006a). Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *Dalton Trans.* 761-764.
- Thompson, K.H.; Orvig, C. (2006b). Vanadium in Diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *J. Inorg. Biochem.* 100: 1925-1935.
- Tiago, D.M.; Laize, V.; Cancela, M.L.; Aureliano, M. (2008). Impairment of mineralization by metavanadate and decavanadate solutions in a fish bone-derived cell line. *Cell. Biol. Toxicol.* 24: 253-263.
- 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. *J. Inorg. Biochem.* 98: 1902-1910.
- Tiago, T.; Martel, P.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007). Binding modes of decavanadate to myosin and inhibition of the actomyosin ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Poteomics*. 1774: 474-480.
- Tolman, E.L.; Barris, E.; Burns, M.; Pansini, A.; Partridge, R. (1979). Effects of vanadium on glucose metabolism in vitro. *Life Sci.* 25: 1159-1164.

- Topic, A.; Milenkovic, M.; Uskokovic-Markovic, S.; Vucicevic, D. (2010). Insulin Mimetic Effect of Tungsten Compounds on Isolated Rat Adipocytes. *Biol. Trace Elem. Res.* 134: 296-306.
- Toyoshima, C. (2008). Structural aspects of ion pumping by  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 476: 3-11.
- Toyoshima, C. (2009). How  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochem. Biophys. Acta.* 1793: 941-946
- Toyoshima, C.; Inesi, G. (2004). Structural basis of ion pumping by  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 269-292.
- Toyoshima, C.; Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature.* 430: 529-535.
- Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H.; Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature.* 405: 647-655.
- Toyoshima, C.; Nomura, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature.* 418: 605-611.
- Toyoshima, C.; Norimatsu, Y.; Iwasawa, S.; Tsuda, T.; Ogawa, H. (2007). How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 19831-19836.
- Toyoshima, C.; Sasabe, H.; Stokes, D.L. (1993). Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature.* 362: 467-471.
- Tsaramyrsi, M.; Kavousanaki, D.; Raptopoulou, C. P.; Terzis, A.; Salifoglou, A. (2001). Systematic synthesis, structural characterization, and reactivity studies of vanadium(V)-citrate anions  $[\text{VO}_2(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)]_2^{2-}$ , isolated from aqueous solutions in the presence of different cations. *Inorg. Chim. Acta.* 320: 47-59.
- Tu, A. (1982). *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications.* By Anthony T. Tu. John Wiley and Sons, New York. Xvi, 448 pp.
- Tuma, R. (2005). Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies *J. Raman Spectrosc.* 36: 307-319.
- Turner, T.L.; Nguyen, V.H.; McLauchlan, C.C.; Dymon, Z.; Dorsey, B.M.; Hooker, J.D.; Jones, M.A. (2012). Inhibitory effects of decavanadate on several enzymes and *Leishmania tarentolae* in vitro. *J. Inorg. Biochem.* 108: 96-104.
- Uskoković-Marković, S.; Milenković, M.; Topić, A.; Kotur-Stevuljević, J.; Stefanović, A.; Antić-Stanković, J. (2007). Protective effects of tungstophosphoric acid and sodium tungstate on chemically induced liver necrosis in wistar rats. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10: 340-349.

- Uthus, E.O.; Nielsen, F.H. (1990). Effect of vanadium, iodine and their interaction on growth, blood variables, liver trace elements and thyroid status indices in rats. *Magnes. Trace Elem.* 9: 219-226.
- Vardatsikos, G.; Mehdi, M.Z.; Srivastava, A.K. (2009). Bis(maltolato)-oxovanadium(IV) induced phosphorylation of PKB, GSK-3 and FOXO1 contributes to its glucoregulatory response. *Int. J. Mol. Med.* 24: 303-309.
- Varga, S.; Csermely, P.; Martinosi, A. (1985). The binding of vanadium (V) oligoanions to sarcoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.* 148: 119-126.
- Verma, S.; Cam, M.C.; McNeill, J.H. (1998). Nutritional factors that can favorably influence the glucose/insulin system: vanadium. *J. Am. Coll. Nutr.* 17: 11-18.
- Viarengo, A. (1989). Biochemical effects of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.* 16: 153-158.
- Villa, E.M.; Ohlin, C.A.; Rustad, J.R.; Casey, W.H. (2009). Isotope-exchange dynamics in isostructural decametalates with profound differences in reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 16488-16492.
- Viner, R. I.; Huhmer, A. F.; Bigelow, D. J.; Schöneich, C. (1996). The oxidative inactivation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by peroxynitrite. *Free Radical Res.* 24: 243-259.
- Viner, R. I.; Williams, T. D.; Schöneich, C. (1999). Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry.* 38: 12408-12415.
- Voet, D.; Voet, J.G. (2011). *Biochemistry* 4rd ed. John Wiley & Sons, Inc. xv, 1515 p.
- Voss, P.; Engels, M.; Strosova, M.; Grune, T.; Horakova, L. (2008). Protective effect of antioxidants against sarcoplasmic reticulum (SR) oxidation by Fenton reaction, however without prevention of Ca-pump activity. *Toxicology in vitro.* 22: 1726-1733.
- Waern, J.B.; Dillon, C.T.; Harding, M.M. (2005). Organometallic anticancer agents: cellular uptake and cytotoxicity studies on thiol derivatives of the antitumor agent molybdocene dichloride. *J. Med. Chem.* 48: 2093-2099.
- Waern, J.B.; Harding, M.M. (2004). Coordination chemistry of the antitumor metallocene molybdocene dichloride with biological ligands. *Inorg. Chem.* 43: 206-213.
- Wansapura, A.N.; Lasko, V.; Xie, Z.; Fedorova, O.V.; Bagrov, A.Y.; Lingrel, J.B.; Lorenz, J.N. (2009). Marinobufagenin enhances cardiac contractility in mice with ouabain sensitive  $\alpha 1 \text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$ . *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296: 1833-1839.
- Weber, K.; Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.

- Wei, D.; Li, M.; Ding, W. (2007). Effect of vanadate on gene expression of the insulin signaling pathway in skeletal muscle of streptozotocin induced diabetic rats. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12: 1265-1273.
- Wilkins, P.; Wilkins, R. (1997). *Inorganic chemistry in biology*. Oxford University Press, Oxford, 235 p.
- Williams, P.A.; Etcheverry, S.B.; Barrio, D.A.; Baran, E.J.(2006). Synthesis, characterization, and biological activity of oxovanadium(IV) complexes with polyalcohols. *Carbohydr. Res.* 341. 717-724.
- Willsky, G.R.; Goldfine, A.B.; Kostyniak, P.J.; McNeill, J.H.; Yang, L.Q.; Khan, H.R.; Crans, D.C. (2001). Effect of vanadium(IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro studies with vanadylsulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV). *J. Inorg. Biochem.* 85: 33-42.
- Willsky, G.R.; White, D.A.; McCabe, B.C. (1984). Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high-molecular-weight vanadates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 259: 13273-13281.
- Wilson, K.; Walker, J.M. (2005). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 6th ed., Cambridge ; New York: Cambridge University Press. xvii, 783 p.
- 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  $^{51}\text{V}$  NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 7872-7881.
- Wong, L.C.K.; Downs, W.L. (1996). Zirconium, niobium, antimony, vanadium and lead in rats: life term studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 9: 561-570.
- Wu, H.C. (2009). Palytoxin: Membrane mechanisms of action. *Toxicon.* 54: 1183-1189.
- Xie, Y.; Zhang, D.; Jarori, G.K.; Davisson V.J.; Ben-Amotz, D. (2004). The Raman detection of peptide tyrosine phosphorylation. *Anal. Biochem.* 332: 116-121.
- Yanardag, R.; Bolkent, S.; Bulan, O.K.; Tunali, S. (2003). Effects of vanadyl sulfate on kidney in experimental diabetes. *Biol. Trace Elem. Res.* 95: 73-85.
- Yard, N.J.; Chiesi, M.; Ball, H.A. (1994). Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, on the frequency-dependence of the contraction-relaxation cycle of the guinea-pig isolated atrium. *Br. J. Pharmacol.* 113: 1001-1007.
- Yatime, L.; Buch-Pedersen, M.J.; Musgaard, M.; Morth, J.P.; Winther, A.L.; Pedersen, B.P.; Olesen, C.; Andersen, J.P.; Vilsen, B.; Schiøtt, B.; Palmgren, M.G.; Møller, J.V.; Nissen, P.; Fedosova, N. (2009). P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochimica Biophysica Acta.* 1787: 207-220.
- Yraola, F.; Garcia-Vicente, S.; Marti L.; Albericio, F.; Zorzano, A.; Royo, M. (2007). Understanding the mechanism of action of the novel SSAO substrate

- (C<sub>7</sub>NH<sub>10</sub>)<sub>6</sub>(V<sub>10</sub>O<sub>28</sub>).2H<sub>2</sub>O, a prodrug of peroxovanadate insulin mimetics. *Chem. Biol. Drug. Des.* 69: 423-428.
- Yu, X.; Carroll, S.; Rigaud, J. L.; Inesi, G. (1993). H<sup>+</sup> countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys. J.* 64: 1232-1242.
- Yuen, V.G.; Orvig, C.; McNeill, J.H. (1993a). Glucose-lowering effects of a new organic vanadium complex, bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 263-269.
- Yuen, V.G.; Orvig, C.; Thompson, K.H.; McNeill, J.H. (1993b). 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.; Slotwinska, M. (1993). Effects of chronic vanadium administration in drinking water to rats. *BioMetals.* 6: 3-10.
- Zeng, C.; Hou, G.; Dick, R.; Brewer, G.J. (2008). Tetrathiomolybdate is partially protective against hyperglycemia in rodent models of diabetes. *Exp Biol Med (Maywood).* 233: 1021-1025.
- Zhang, P.; Toyoshima, C.; Yonekura, K.; Green, N.M.; Stokes, D.L. (1998). Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8-Å resolution. *Nature.* 392: 835-839.
- Zhang, S.Q.; Chen, G.H.; Lu, W.L.; Zhang, Q. (2007). Effects on the bones of vanadyl acetylacetonate by oral administration: a comparison study in diabetic rats. *J. Bone Miner. Metab.* 25: 293-301.
- Zhang, Z.; Chen, F.; Huang, C.; Shi, X. (2002). Vanadate induces G2/M phase arrest in p53-deficient mouse embryo fibroblasts. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 21: 223-231.
- Zhang, Z.; Geo, N.; He, H.; Huang, C.; Jiang, B.; Jia, L.; Shi, X. (2004). The role of phosphatidylinositol-3 kinase in vanadate-promoted S phase entry. *Mol. Cell. Biochem.* 255: 239-245
- 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.
- Zhang, Z.; Li, Z.; Tian, J.; Jiang, W.; Wang, Y.; Zhang, X.; Li, Z.; You, Q.; Shapiro, J. I.; Si, S.; Xie, Z. (2010). Identification of hydroxyxanthenes as Na/K-ATPase ligands. *Mol. Pharmacol.* 77: 961-967.
- Zorzano, A.; Palacin, M.; Marti, L.; Garcia-Vicente, S. (2009). Arylalkylamine vanadium salts as new anti-diabetic compounds. *J. Inorg. Biochem.* 103: 559-566.

