



Universidade do Algarve

Bombas iónicas como alvos terapêuticos

Joel Ludovico Fernandes Gomes

Dissertação

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Faro, 2013



Universidade do Algarve

Bombas iónicas como alvos terapêuticos

Joel Ludovico Fernandes Gomes

Dissertação

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação:

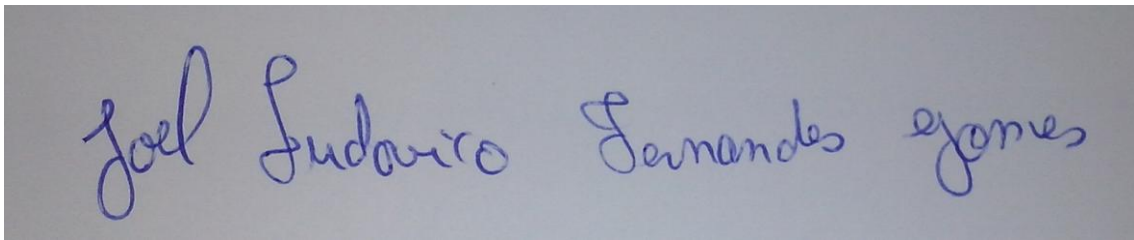
Professor Doutor Manuel Aureliano Alves

Faro, 2013

Bombas iónicas como alvos terapêuticos

Declaração de autoria de trabalho

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



Joel Ludovico Fernandes Gomes

Faro, 16 de Dezembro de 2013

© Joel Ludovico Fernandes Gomes

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.

Agradecimentos:

Ao professor doutor Manuel Aureliano Alves por toda a disponibilidade, empenho e paciência que teve para comigo na realização desta dissertação.

A todos os meus amigos que sempre tiveram presentes no decorrer de todo o curso de mestrado integrado de Ciências Farmacêuticas.

Aos meus pais, irmão e toda a minha família, por todo o apoio incondicional de me deram, mesmo nos momentos mais difíceis no decorrer deste curso

Resumo

O transporte de íons através da membrana plasmática da célula, é um dos processos fulcrais para toda a sua atividade metabólica. Nomeadamente, o controlo da osmolariedade da célula, transmissão de impulso nervoso, controlo de pH, contração muscular entre muitos outros. A célula possui vários sistemas responsáveis por este transporte de íons através na membrana, transportadores, canais iónicos, e bombas iónicas. Estes últimos, também conhecidas como P-ATPases, devido às suas particularidades de funcionamento e localização de fácil acesso, têm sido desde longa data alvos terapêuticos para fármacos, que visam o tratamento de patologias tão conhecidas e incidentes na população tais como úlcera gástrica, falência cardíaca entre outros.

Esta dissertação tem o objetivo de analisar o mecanismo de alguns fármacos que atuam em três P-ATPases específicas Na^+/K^+ , Ca^{2+} e H^+/K^+ ATPases. Realça-se a importância destes fármacos no tratamento de algumas patologias, bem como, de problemas associados ao seu uso. Adicionalmente perspetiva-se o desenvolvimento científico esperado, que vise a melhor compreensão destas bombas iónicas, bem como a elaboração de novos fármacos que atuem nas mesmas.

Palavras chave: Bombas iónicas, P-ATPases, transporte iónico, fármacos.

Abstract

The ion transport through the cell plasmatic membrane it's one of the main processes of all the cells' metabolic activity, namely cell's osmolarity control, nerve impulse transmission , pH, muscle contraction among many others. The cell has several systems responsible for ion' transport across the membrane, such as, exchangers, ion channels and ion pumps. Concerning the latter, those are well-known as drugs targets, for treating some pathologi such as gastric ulcer and heart failure, among others.

This thesis aims to analyze the mechanisms of some drugs acting on three specific P-ATPases, Na^+/K^+ , Ca^{2+} and H^+/K^+ ATPases. It is emphasized the importance of those pumps in the treatment of some diseases, as well as problems associated with its use of the drugs. Additionally it is taking into consideration, the awaited scientific development on this matter, which will bring a better understanding of these ion pumps and also the development of new drugs that could act on the mentioned.

Keywords: Ion pumps, P-ATPases, ion transport, drugs.

Índice

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Índice de figuras.....	8
Índice de tabelas.....	10
Lista de Abreviaturas.....	11
Metodologia.....	12
1. Transporte através da membrana lipídica.....	13
1.1 Canais iónicos.....	14
1.2. Bombas iónicas.....	16
1.2.1. Estrutura geral das P-ATPases.....	17
1.2.2. Mecanismo de transporte das P-ATPases.....	18
2. Bombas iónicas enquanto alvos terapêuticos.....	20
2.1. Diferenças estruturais das P-ATPases.....	21
3. Mecanismos de ação de diferentes inibidores nas P-ATPases.....	24
3.1. Na ⁺ K ⁺ -ATPase.....	24
3.2. H ⁺ K ⁺ -ATPase.....	28
3.3. Ca ²⁺ -ATPase.....	33
4. Conclusões e perspetivas futuras.....	38
5. Bibliografia.....	40

Índice de Figuras

Figura 1 - Diferentes agentes de transporte de iões através da membrana lipídica, canais iónicos (A), transportadores (B) e bombas iónicas (C).....	13
Figura 2 – Estrutura da zona de filtro seletivo do canal de potássio com a indicação dos oxigénios que facilitam a passagem do potássio até o interior da célula, através das setas indicativas	15
Figura 3- Estrutura geral das P-ATPases e seus domínios, e indicação dos resíduos mais conservados entre as diferentes P-type ATPases, através de pontos vermelhos.....	17
Figura 4 – Esquema demonstrativo de todo o mecanismo E1\E2 da Na ⁺ \K ⁺ -ATPase, com indicação dos vários estados intermédios e o movimento dos iões durante o processo.....	19
Figura 5 – Estrutura de SERCA, Na ⁺ \K ⁺ e H ⁺ \K ⁺ - ATPases, com a indicação do domínio β, presente nas bombas Na ⁺ \K ⁺ e H ⁺ \K ⁺ - ATPases.....	23
Figura 6 – Estrutura química da Ouabaína e Digoxina, e indicação dos seus grupos funcionais.....	25
Figura 7 - Local de ligação da ouabaína à bomba Na ⁺ \K ⁺ -ATPase, com indicação das hélices transmembranares, bem como os resíduos envolvidos na ligação.....	26
Figura 8 - Esquema de mecanismo de inibição Na ⁺ \K ⁺ -ATPase, com a indicação do local de ligação do ião (A), e o local de obstrução por ligação dos esteroides cardiotónicos (B).....	27
Figura 9 - Estrutura de omeprazol e de dois dos seus derivados, pantoprazol e lansoprazol , com a indicação dos grupos funcionais do omeprazol.....	29
Figura 10 - Esquema das reações químicas para a ativação acídica do Omeprazol.....	30
Figura 11 - Local de ligação do omeprazol a H ⁺ \K ⁺ -ATPase, com indicação das hélices transmembranares envolvidas bem como da cisteína responsável pela ligação do omeprazol a H ⁺ \K ⁺ -ATPase.....	31

Figura 12 - Esquema de mecanismo de inibição H^+K^+ -ATPase, com a indicação do local de ligação do íon (A), e o local de obstrução por ligação dos inibidores da H^+K^+ -ATPase (B).....	32
Figura 13 – Estruturas químicas de Tapsigargina e Ácido ciclopiazonico.....	34
Figura 14 – Demonstração dos diferentes locais de ligação da tapsigargina, e do ácido ciclopiazonico a SERCA, com indicação da principais hélices transmembranares envolvidas, bem como a indicação do Glu309 com extrema importância no processo.....	35
Figura 15 - Esquema do mecanismo de inibição da SERCA, com a indicação do local de ligação do Ácido ciclopiazonico (A), local de ligação da Tapsigargina (B), e também do local de ligação do íon (C).....	36

Índice de Tabelas

Tabela I – Indicação das diferentes famílias das P-Type ATPases, com a indicação dos respectivos íons que transportam.....	16
Tabela II – Indicação de inibidores para as diferentes bombas iônicas SERCA, Na ⁺ /K ⁺ e H ⁺ /K ⁺ - ATPases, respectivos IC ₅₀ e efeitos terapêuticos.....	21

Lista de Abreviaturas

ATP – Adenosina tri-fosfato

CPA – “cyclopiazonic acid”

CTS - “cardiotonic steroids”

PCABs – “potassium-Competitive Acid Blockers

PMCA – “plasma membrane Ca^{2+} ATPase”

PPIs – “proton Pump Inhibitors”

SERCA – “sarco(Endo)plasmatic Reticulum Ca^{2+} ATPase”

TG - taspigargina

TM – “transmembrane hélix”

METODOLOGIA

A pesquisa de todo o material bibliográfico utilizado para a realização desta dissertação foi realizada entre Março de 2013 e Outubro de 2013.

As principais fontes consultadas consistiram em livros, artigos, revistas e outras publicações da área constantes nas bases de dados online de pubmed, sciendirect e b-on.

1. Transporte através da membrana lipídica

A célula é a unidade estrutural de todo e qualquer ser vivo, sendo estas as responsáveis todas as atividades metabólicas. Para tal atividade a célula necessita de consumir uma grande variedade de constituintes químicos, e expelir de si outros indesejados. Assim sendo a célula necessita de um sistema de transporte através de uma barreira altamente hidrofóbica que é a sua membrana lipídica. Parte dos compostos químicos que a célula necessita são compostos iónicos, são exemplos N^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} entre muitos outros, estes compostos podem ter funções tão importantes como a manutenção da osmolariedade da célula, transmissão de impulso nervoso, controlo de pH, controlo de volume contração muscular. Para o transporte destes iões a célula possui sistemas de transportadores, como por exemplo canais iónicos, como o canal de potássio (Fig. 1A), transportadores de cloro (Fig.1B), e bombas iónicas, como a bomba de cálcio (Fig.1C), sendo que os canais iónicos e a bombas iónicas são os que se encontram mais profundamente estudados, e são estes que serão apresentados neste trabalho, em especial a bombas iónicas, (Gadsby, 2009).

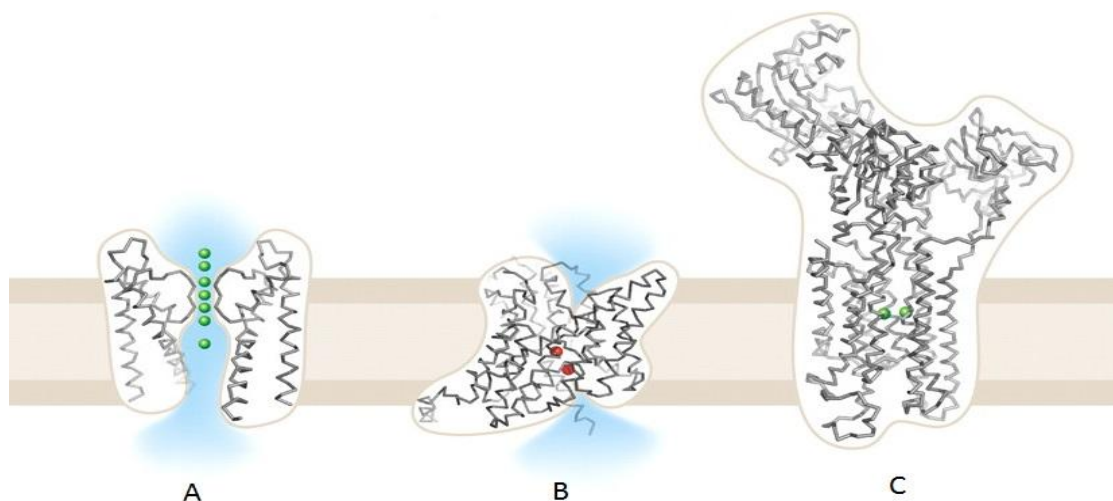


Figura 1 - Agentes de transporte de íons através da membrana citoplasmática (Gouaux and Mackinnon, 2005)

1.1 Canais iónicos

Canais iónicos consistem numa forma de transporte através da membrana plasmática, denominado por transporte passivo, isto porque não há qualquer gasto de energia, o transporte é regido então apenas segundo os gradientes elétricos e de concentração de iões da célula, sendo capazes de transportar uma grande variedade de diferentes iões, como por exemplo Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , H^+ , Cu^{2+} , entre outros, a uma velocidade elevadíssima, 10 a 100 milhões de iões por segundo, fazendo assim com que estes sejam os transportadores de iões mais rápidos, estando presentes em células tão diferentes, como neurónios, células musculares entre outras (Gouaux and Mackinnon, 2005).

A alta rapidez e seletividade dos canais iónicos pode ser facilmente explicada pela própria estrutura e mecanismo destes. Tomando como exemplo o canal iónico de potássio, que foi alvo de estudo de Roderick MacKinnon, tendo recebido o prémio Nobel da química em 2003 (MacKinnon, 2003).

Este canal é constituído por um poro largo aquoso, que por si só atravessa grande parte da membrana lipídica onde os iões K^+ solvatados se difundem rapidamente, seguido de uma pequena região filtro (Gouaux et al., 2013).

Esta região do canal vai servir como um filtro altamente seletivo capaz de selecionar o ião K^+ em detrimento de qualquer outro ião. Note-se que a seletividade destes canais chega mesmo a ser capaz de selecionar o K^+ que tem um raio iónico de 1,33 Å, de outros iões como o Na^+ que tem um raio bastante semelhante 0,95 Å. Tal seletividade consegue-se porque nesta estrutura então presentes quatro lugares de ligação ao ião K^+ , onde este ião interage com oito átomos de oxigénio parcialmente carregados (Fig. 2). Estes átomos de oxigénios vão servir como moléculas de água, que compensam a alta hidrofobicidade da membrana lipídica ajudando assim os iões K^+ a deslocarem-se até ao interior da célula. Os iões Na^+ não conseguem atravessar a membrana por este canal de K^+ , uma vez que estes ao encontrarem a zona de seletividade do canal, não conseguem ligar-se aos diferentes lugares de ligação, isto porque o seu raio iónico por ser menor que o raio de K^+ , mesmo que pouco, é o suficiente para que o Na^+ não consiga interagir com todos os átomos de oxigénio, e formar o complexo Na-O, e prosseguir através do canal, tal como o ião K^+ (MacKinnon, 2003; Gouaux and Mackinnon, 2005).

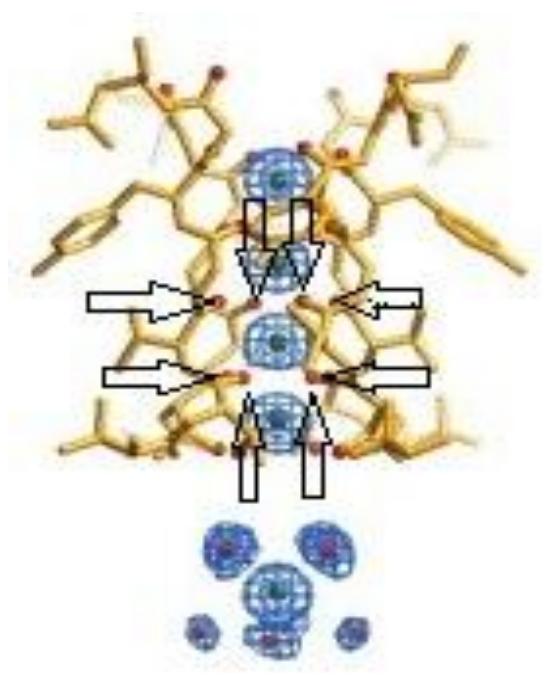


Figura 2 - Esquema da estrutura da zona seletiva do canal de potássio (MacKinnon, 2003).

Os canais iônicos podem ser alvos de fármacos para várias patologias bem presentes na população, como hipertensão, em que fármacos como o verapamil, ou a amlodipina que atuam como bloqueadores dos canais de cálcio tanto do músculo cardíaco como na parede vascular dos vasos sanguíneos, diminuindo a sua contractilidade, melhorando a circulação sanguínea, e diminuindo a pressão arterial, ou como anestésico local como a lidocaína, que atua nos canais de sódio das células nervosas bloqueando o impulso nervoso, diminuindo a sensação de dor (Bagal et al, 2013).

1.2. Bombas iónicas

As bombas iónicas consistem em proteínas transmembranares que ao invés dos canais iónicos transportam iões contra o gradiente de concentração das células, conhecido com transporte ativo uma vez que á o consumo de ATP. São apenas capazes de transportar 100 iões por segundo, ou seja a sua função apesar de ser tal como os canais iónicos o transporte de iões através da membrana, as bombas funcionam como um agente mais rigoroso e mais preciso no controlo da osmolariedade da célula (Gadsby, 2004).

De entre as bombas iónicas destaca-se uma super-família de bombas iónicas as P-type ATPases, assim conhecidas por sofrerem a fosforilação por ATP, encontram-se em virtualmente todas as células eucariotas, mas também em bactérias, e são capazes de transportar uma enorme variedade de iões, como se pode verificar na tabela I (Apell, 2004).

Esta superfamília pode-se dividir em cinco subfamílias (I-V) P-ATPases e estas subfamílias ainda poderão ter outras subclassificações A, B, C e D dependendo das suas características de transporte, ião e membrana onde se encontram (Bublitz et al, 2010).

Tabela I - Famílias das P-ATPases (Bublitz et al, 2010).

Tipo	Subtipo	Iões transportados
I	I-A	K^+
	I-B	Cu^{2+} ; Zn^{2+} ; Cd^{2+} ; Pb^{2+} Co^{2+} .
II	II-A	Ca^{2+}
	II-B	Ca^{2+}
	II-C	Na^+ ; K^+ , H^+ , K^+
	II-D	Na^+ e Ca^{2+}
III		H^+ , Mg^{2+}
IV		(Fosfolípidos)
V		Não totalmente conhecido

1.2.1 Estrutura geral das P-ATPases

Em comparação com os canais iônicos, são estruturalmente mais complexas, com um mecanismo mais extenso onde há a passagem de íons distintos em simultâneo mas em sentidos opostos. De forma a perceber todo o mecanismo das bombas iônicas P-ATPases, e de como os fármacos atuam nestas é importante a percepção da estrutura destas e de como os seus domínios se organizam. A estrutura geral das bombas (Fig 3), contem um domínio catalítico principal, subunidade α que consiste em dez hélices transmembranares (TM (*transmembrane hélix*)), domínio transmembranar, e três domínios citoplasmáticos chamado domínio N onde existe um grupo lisina, importante na ligação ao nucleosídeo do ATP, domínio P onde se encontra o aspartato fosforilado, resíduo essencial para a fosforilação do ATP e o domínio A (zona atuadora) ou seja o que transforma a hidrolisação de ATP em atividade (Bublitz et al, 2010).

De forma a exemplificar a estrutura geral, das P-ATPases, encontra-se a figura 3, com base na estrutura da Ca^{2+} presente no retículo endoplasmático, que demonstra a localização dos diferentes domínios, mas também com indicação dos resíduos altamente conservados entre as diferentes P-ATPases, pontos vermelhos (Bublitz et al, 2010).

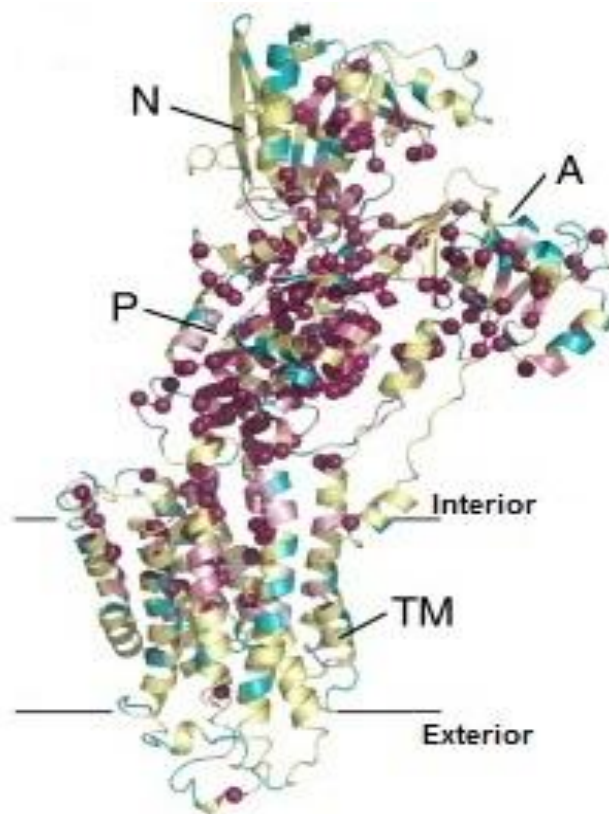


Figura 3 - Estrutura geral das P-ATPases e seus domínios, e os resíduos mais conservados entre as diferentes P-type ATPases (Bublitz et al, 2010).

A ligação do domínio citoplasmático ao domínio transmembranar é feita por cinco “*linkers*” que formam a estrutura crucial para fazer a ligação entre a libertação da energia no lado do citoplasma e a conversão de tal energia em uma translocação física de iões através da membrana, (Bublitz et al, 2010).

Estes “*linkers*” mostram ter uma extrema importância, uma vez que em estudos mostram que mutações nestes *linkers*, que promovam um encurtamento ou alongamento, poderão ter efeitos desastrosos, como a restrição de movimentos do domínio A durante os processos de fosforilação/desfosforilação, ou a não abertura do canal para a saída do ião (Holdensen and Andersen, 2009).

1.2.2 Mecanismo de transporte das P-ATPases

Como anteriormente dito, as bombas iónicas são capazes de transportar vários iões através da membrana celular. A forma como faz esse processo pode ser considerada como um mecanismo “ping-pong”, seja os iões são transportados sucessivamente em direções opostas através da membrana. Todo este processo de transporte de iões, é sempre acompanhado por alterações conformacionais da bomba, descritos por um mecanismo conhecido por mecanismo E1/E2. Este mecanismo baseia-se em duas conformações estruturais da bomba essenciais, a conformação E1, e conformação E2 sendo estas intermutáveis, tomando como exemplo a bomba Na^+, K^+ ATPase (Fig.4), em que o seu mecanismo foi descrito por Jens C. Skou, prémio Nobel de 1997 (Skou and Esmann, 1992).

O primeiro passo acontece quando três iões Na^+ ligam-se a bomba na conformação E1, conformação pela qual têm alta afinidade, e seguidamente a enzima hidrolisa o ATP, fosforilação, formando uma conformação intermediária $(3\text{Na})\text{E1-P}$. A partir desta conformação, há libertação dos três iões Na^+ para o meio extracelular, e a passagem da enzima para a conformação E2-P, nesta conformação a enzima apresenta uma alta afinidade para K^+ , admitindo a ligação de dois iões de K^+ , formando $(2\text{K})\text{E2-P}$. Após esta ligação a enzima sofre uma desfosforilação $(2\text{K})\text{E2}$, e conseqüente transporte dos dois iões K^+ para o interior da célula. A libertação dos iões de K^+ para o espaço intracelular é favorecida pela ligação de ATP e conseqüente transição para a conformação E1, e início de um novo ciclo (Skou and Esmann, 1992; Horisberger, 2004).

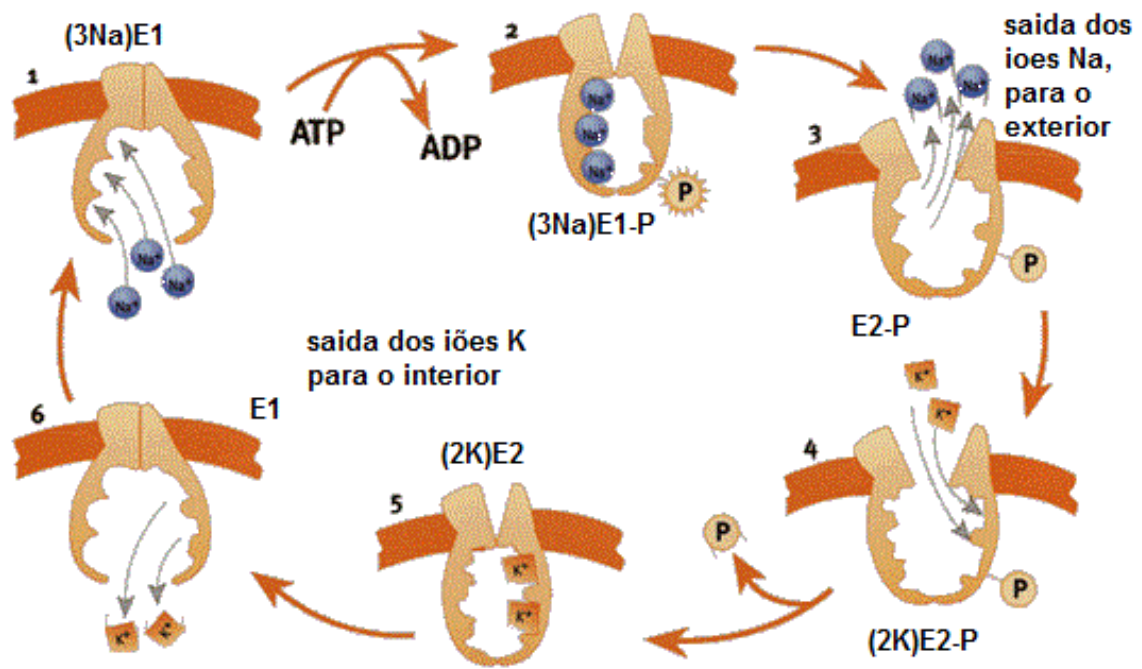


Figura 4 - Mecanismo E1/E2 Na,K-ATPase (Skou and Esmann, 1992).

Estudos recentes mostram que o Mg^{2+} tem também influência neste ciclo, nomeadamente na transição de E1 para E2, funcionando como catalisador desta transição, uma vez que no estado E1 há uma baixa afinidade para o ião com afinidade para E1, então o magnésio impossibilita a que a fosforilação aconteça sem que esteja presente tal ião (Toyoshima and Cornelius, 2013).

2. Bombas iônicas enquanto alvos terapêuticos

A história diz-nos que o uso de “drogas” para o tratamento de doenças, é desde do início dos tempos um processo de tentativa erro. Incontável número de plantas, minerais e produtos de origem animal, foram utilizados para a cura, diagnóstico e prevenção de inúmeras doenças. Parte desses tratamentos, com o desenvolvimento científico, tornaram-se fármacos, alguns desses com a atuação nas bombas iônicas, em específico as bombas Na^+/K^+ , Ca^{2+} , H^+/K^+ -ATPases, responsáveis pelo transporte dos íons Ca^{2+} , Na^+ , K^+ e H^+ , estes íons são de extrema importância, uma vez que têm funções de transporte secundários e processos de sinalização da célula, contração muscular, entre muitos outros. Dada a importância destas bombas, desde de algumas décadas para cá têm sido alvos de grande estudo, para a descoberta e criação de novas moléculas como inibidores para estas enzimas (Tabela II). E desde então têm sido conseguidas várias moléculas, com enorme impacto benéfico na saúde pública nas populações (Yatime et al, 2009).

É exemplo os esteroides cardiotônicos (*cardiotonic steroids* (CTS)) como a ouabaína ou a digoxina, conhecidos inibidores da bomba iônica Na^+/K^+ ATPase, usada como fármaco para patologias de falência cardíaca, extraída da planta do género *Digitalis* (Hauptman and Kelly, 1999; Cheng and Rybak, 2010), ou do omeprazol e seus derivados, que atuam na H^+/K^+ ATPase para o tratamento de úlcera péptica, onde estudos mostram claramente efeitos protetores da mucosa gástrica de ratinho, mesmo quando estes se encontram sujeitos a agentes ulcerosos como anti-inflamatórios não esteroides (Izzettin et al, 2012), ou até mesmo como anti tumoral, caso da taspigargina e seus derivados, que atua na Ca^{2+} ATPase do retículo endoplasmático (*sarco(Endo)plasmatic Reticulum Ca^{2+} ATPase* (SERCA)), capazes de induzir a morte celular, a células cancerígenas prostáticas (Dubois et al, 2013).

Tabela II- Inibidores das ATP-ases, respectivos IC₅₀ e indicações terapêuticas.

Alvo (ATPase)	Fármaco	IC ₅₀ [μM]	Aplicações terapêuticas	Referências
Na ⁺ \K ⁺ ATPase	Ouabaina	>10	Protetor cardiotónico	(Ihenetu et al, 2007)
	Digoxina	0,910	Protetor cardiotónico	
	Clorpromazina	62,5	Anti psicótico	(Bhattacharyya and Sem, 1999)
	Cloroquina		Anti malárico	
	Gramicidina	8,1	Antibiótico	
SERCA	Tapsigargina	0,001	Pró-farmaco anti tumoral	(Geng and Lotz, 1995)
	Acido ciclopiazonico	0,2	Isquemia do miocárdio	(Yard et al, 1994)
	Ciclosporina a	62	Imunossupressor	(Bilmen et al, 2002)
	Celecoxib	35	Anti-inflamatório	(Grosch et al, 2006)
H ⁺ \K ⁺ ATPase	Omeprazol	3,9	Anti-ulceroso	(Keeling et al, 1985)
	Pantoprazol	6,8		(Beil et al, 1992)
	Soraprazan	0,1		(Simon et al, 2007)

2.1. Diferenças estruturais das P-ATPases em estudo

Como foi descrito a estrutura geral das P-ATPases são amplamente semelhantes no entanto uma vez que esta família, transporta diferentes iões, podem ter localizações diferentes como é o caso de SERCA, localizada exclusivamente na membrana do reticulo endoplasmático, leva a que haja algumas diferenças.

Começando pelo facto de que destas bombas iónicas transportarem iões diferentes, uma vez que os iões transportados são diferentes, diferente carga, H⁺, Ca²⁺, raios iónicos diferentes (Na⁺= 0,95Å; Ca²⁺=0,66Å) assim os locais de ligação a estes iões, domínio transmembranar, estão naturalmente organizados de diferente modo. Ou seja apesar das

grandes similaridades entre SERCA, Na⁺/K⁺ e H⁺/K⁺ATPases nos seus locais de ligação, existem pequenas diferenças, sobretudo na orientação dos seus resíduos acídicos, responsáveis pela ligação aos respetivos iões, logo por consequência diferente preferência para os iões (Bublitz et al, 2010).

É também de notar que a subfamília PIIc, (Na⁺/K⁺ATPase e H⁺/K⁺ ATPase), ainda possuem uma subunidade adicional essencial para o seu funcionamento a subunidade β (Bublitz et al, 2010), (Fig. 4) estudos recentes mostram que esta subunidade tem importantes funções na bomba servindo como um centro alostérico, capaz de regular a atividade desta bomba (Horisberger, 2004).

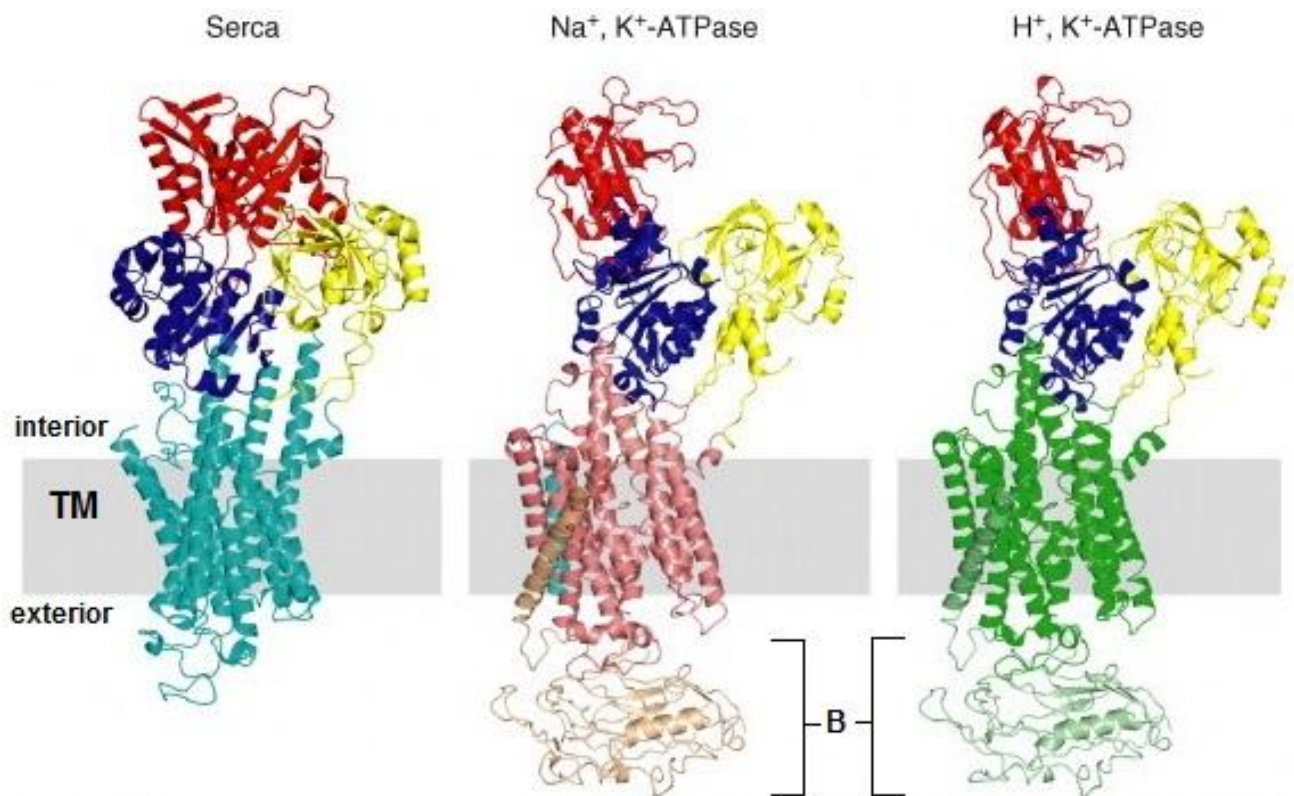


Figura 5 - Estruturas das SERCA, Na⁺/K⁺ e H⁺/K⁺ATPases (Bublitz, Poulsen et al. 2010)

É também de notar que em relação à Ca²⁺ATPase, pode-se considerar duas entidades distintas a Ca²⁺ATPase presente na membrana plasmática (*plasma membrane Ca²⁺ATPase* (PMCA)), e a Ca²⁺ATPase presente no reticulo endoplasmático (SERCA). Embora se possa considerar a mesma bomba iônica uma vez que ambas transportam

cálcio, no entanto possuem algumas diferenças. Em primeiro lugar a sua localização como já foi referenciado, embora ambas tenham a mesma função que é o transporte de cálcio, a PMCA exporta o cálcio do meio citoplasmático para o exterior da célula, e SERCA transporta do meio citoplasmático para o interior do retículo endoplasmático. Outra diferença significativa é que a PMCA por cada molécula de ATP apenas transporta um íon de Ca^{2+} , enquanto a SERCA transporta dois íons de Ca^{2+} , o que estruturalmente representa também uma diferença pois a PMCA apenas possui um local de ligação para o cálcio enquanto SERCA possui dois locais de ligação. (Di Leva et al, 2008).

A PMCA ainda apresenta uma característica interessante que é a capacidade de auto regulação, que consiste num alongamento do domínio C terminal, para assim poder ligar-se à calmodulina, que em certas condições é capaz de interagir com a maquinaria intrínseca da bomba baixando a sua atividade (Di Leva et al, 2008; Yatime et al, 2009).

3. Mecanismo de ação de diferentes inibidores nas P-ATPases

3.1 Na⁺/K⁺

A primeira bomba é a Na⁺/K⁺ ATPase, uma enzima amplamente presente em quase todas as células animais, e é a responsável por manter o potencial eletroquímico das células, bombeando através da membrana citoplasmática os íons de Na⁺ e K⁺, transportando três íons Na⁺ do interior da célula, para o meio extracelular, ao mesmo tempo que importa dois íons K⁺ do exterior para o interior da célula, (Horisberger, 2004).

A Na⁺/K⁺ ATPase é alvo para os conhecidos esteroides cardiotônicos (CTS), fármacos esses utilizados na taquiarritmia supraventricular associada à insuficiência cardíaca, melhorando a capacidade dinâmica do coração (ação cardiotônica) para o tratamento de insuficiência cardíaca (Schoner and Scheiner-Bobis, 2007), sabendo que estudos indicam que na Europa, ocorrem cerca de 4,1 milhões de mortes anuais, por problemas cardiovasculares, e destes cerca de 14% estão relacionados com a insuficiência cardíaca, é de todo importante a extensiva compreensão dos mecanismos destes fármacos, (Nichols et al, 2013). Isto também porque estudos recentes demonstram que estes CTS, podem ter funções de sinalização na célula tais como a proliferação celular, apoptose, motilidade e a ativação de processos genéticos (Yatime et al, 2011).

Mas esta bomba também pode ser alvo de fármacos para outras patologias como a malária, cloroquina, psicose, clorpromazina (Bhattacharyya and Sem, 1999), e a gramicidina A, uma molécula antibacteriana, neste caso este inibidor consegue ter uma dupla inibição, pois é capaz de não só ligar-se a bomba não só no estado livre como no seu estado complexada com substrato (Takada et al, 2008).

De entre todos os fármacos que atuam nesta bomba, como já foi dito destacam-se claramente os CTS, nomeadamente a ouabaína e a digoxina, estes estruturalmente consistem num núcleo esteroide com uma lactona de cinco membros ou seis membros, e um açúcar (Fig.6).

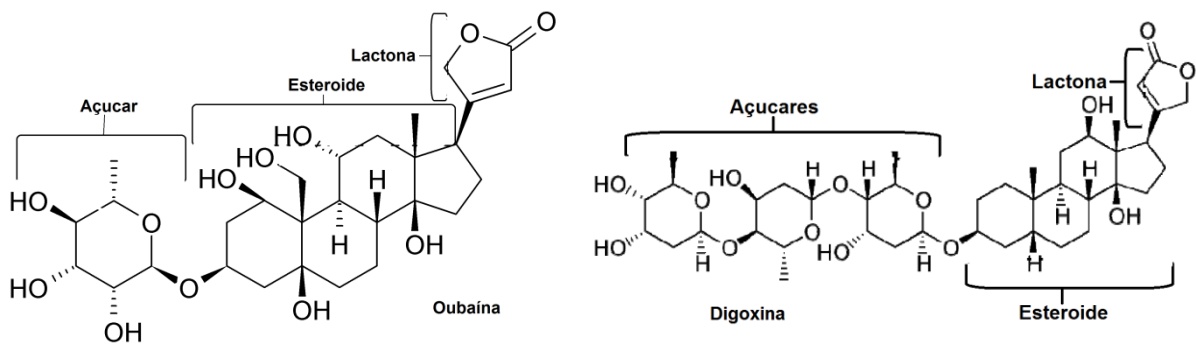


Figura 6 - Estrutura da Ouabaína e Digoxina, e seus grupos funcionais

A ouabaina é extraída da planta *digitalis purpúrea*, (Hauptman and Kelly 1999) no entanto esta também pode ser sintetizada na glândula supra-renal e no hipotálamo (Dvela et al. 2007), sendo que esta pode ser encontrada em circulação em pacientes com insuficiência cardíaca e hipertensão em concentrações significativas (Schoner and Scheiner-Bobis, 2007), ou a digoxina conhecido cardiotónico, utilizado desde o início do século XX, para o tratamento de insuficiência cardíaca (Kirch, 2001).

Estes CTS são fortes inibidores da bomba Na^+/K^+ -ATPase, ligam-se do lado extracelular da bomba no domínio TM, tendo estes alta afinidade para a conformação E2 da bomba. Nesta conformação, o canal do lado exterior encontra-se aberto, com o local de ligação ao ião, disponível para a ligação com o K^+ , formando assim na zona transmembranar uma cavidade grande suficiente para alojar os esteroides cardiotónicos (Yatime et al, 2009).

Como se pode verificar pela imagem (Fig. 7), que consiste numa visão da bomba de um ângulo superior da bomba Na^+/K^+ ATPase, os CTSs entram na cavidade numa conformação em que tanto o núcleo esteroide bem como a lactona encontram-se perto das hélices transmembranares TM1-TM2 e TM3-TM4, que mostram-se ser de extrema importância para a ligação inicial dos CTS a bomba, por pontes de hidrogénio (Yatime et al, 2009).

Sabe-se que neste local de ligação existem vários resíduos importantes para esta ligação dos esteroides cardiotónicos, destacam-se o resíduo Gln 111 e o Asn122 nas hélices transmembranares TM1 e TM2 respetivamente, pois se substituídos por Arg e Asp resulta numa total insensibilidade tanto para a oubaína mas também seus análogos CTSs (Price and Lingrel, 1988).

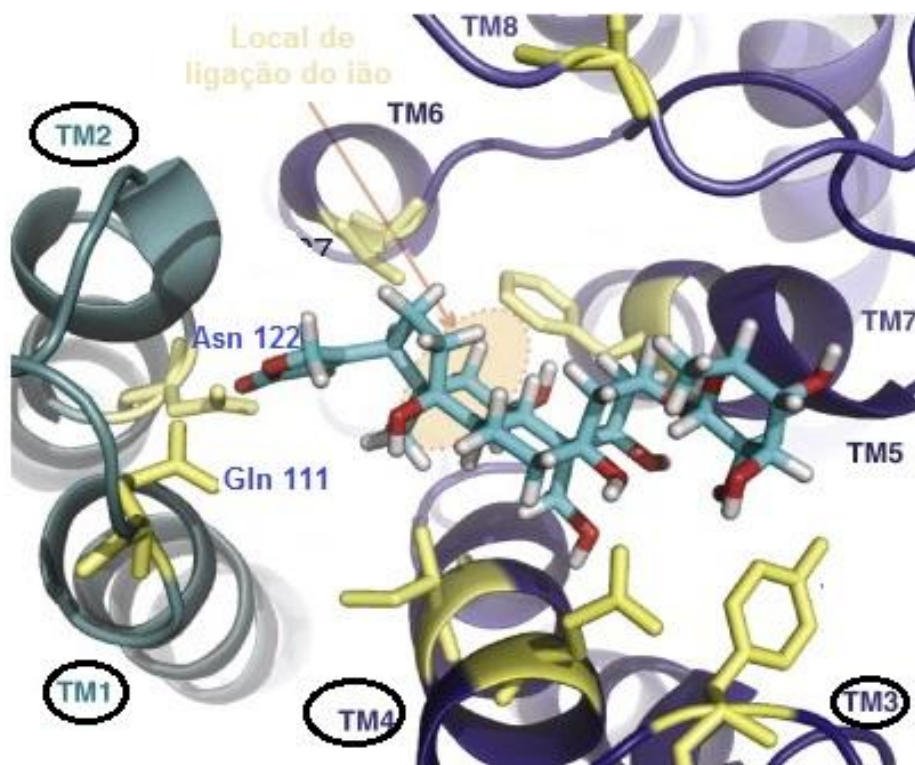


Figura 7 - Local de ligação dos CTSs à bomba Na/K-ATPase (Yatime et al, 2009).

Após a ligação, CTS a estas hélices transmembranares, estudos sugerem que ocorre um rearranjo estrutural da bomba levando a ligação de outras hélices transmembranares como TM5, TM6, TM7, e também TM8, à molécula CTS levando assim a formação de um complexo que resulta numa total obstrução do canal, impedindo assim o acesso do íon K⁺, ao seu local de ligação, (Fig.8).

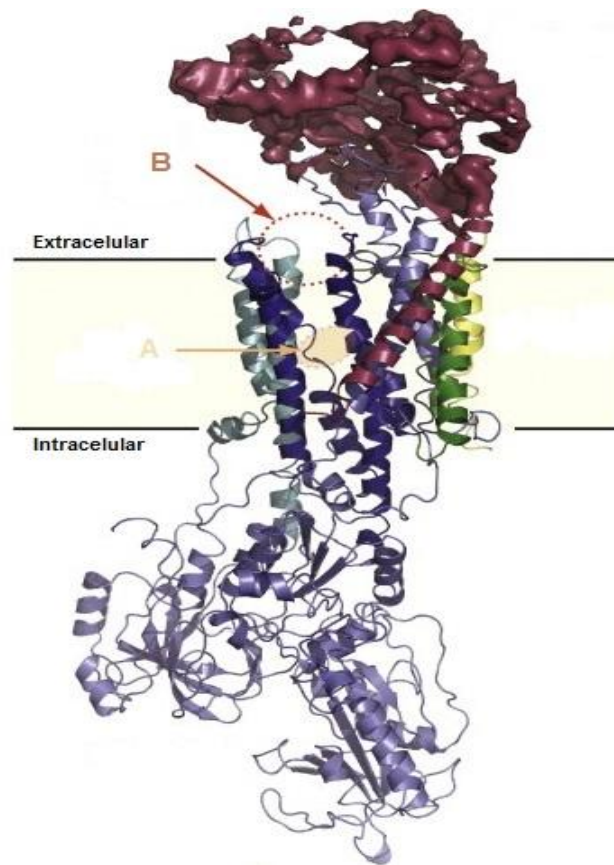


Figura 8 - Esquema de mecanismo de inibição Na^+/K^+ ATPase, A-local de ligação do íon, B-local de obstrução por ligação dos CTS (Yatime, Buch-Pedersen et al. 2009)

Assim com a inibição desta bomba iônica, verifica-se um grande aumento da concentração intracelular de Na^+ , e conseqüentemente deste aumento, vai levar ao aumento da atividade do transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, exportando da célula Na^+ em excesso e introduzindo Ca^{2+} extracelular na célula. Este aumento de Ca^{2+} , irá resultar na contração muscular. Daí as propriedades cardiotônicas dos esteroides cardiotônicos (Yatime et al, 2009).

No entanto apesar destes CTS serem usados há imenso tempo, estes contêm alguns problemas toxicológicos que limitam muito a sua utilização. Tomando em atenção ao facto de CTS como a digoxina, têm uma janela terapêutica estreita, assim sendo é recorrente a toma de doses excessivas, que pode levar, a uma constante polarização das célula, podendo resultar em episódios de taquicardia, ou até mesmo uma trombocitopenia, estes efeitos poderão ser mais perigosos e mais frequentes em doentes que possam ter alguma patologia, como alguma disfunção renal, que diminua as

concentrações de K^+ , e de Mg^{2+} ou que estejam a ser medicados com fármacos que conduzam ao abaixamento da concentração destes iões como por exemplo diuréticos. A hipomagnesémia, e a hipopotassémia, são fatores de risco uma vez que perduram o efeito da digoxina nas células pois, apenas altas concentrações de K^+ e Mg^{2+} , são capazes de desviar o equilíbrio, para assim a libertação da digoxina das bombas Na^+K^+ -ATPase, diminuindo os efeitos tóxicos (Dawson and Buckley, 2012).

3.2. H^+/K^+ ATPase

A segunda bomba é a bomba gástrica de H^+,K^+ ATPase, que transporta um ião H^+ do interior da célula, para o meio extracelular, em troca de um ião K^+ , conhecido alvo terapêutico para o tratamento de úlcera péptica, e de refluxo esofágico, são patologias extremamente dolorosas diminuindo a qualidade de vida dos doentes, e que atinge uma larga franja da população, sendo mesmo que estudos demonstram que incidência de casos de úlcera péptica que levam à hospitalização é de cerca de 6,5 doentes e 1,1 óbitos para cada 100 000 habitantes (Thorsen et al, 2013).

Estas patologias gástricas, consistem numa acidificação excessiva no estomago, causada na grande maioria dos casos pela bactéria *Helicobacter pylori*. Uma vez que em todo o processo de acidificação do estomago, culmina na segregação de prótons para o lúmen do estomago, por parte da bomba iónica H^+/K^+ ATPase, o desenvolvimento de moléculas capazes de inibir esta bomba é portanto crucial (Schubert and Peura, 2008). A primeira molécula a ser usada foi omeprazol, que consiste estruturalmente num grupo benzimidazol, ligado a um grupo enxofre responsável pelas ligações à proteína, e um grupo pirimidina, e posteriormente os seus derivados (pantoprazol, lanzoprazol entre outros) conhecidos por *Proton Pump Inhibitors* (PPIs), (Fig.9).

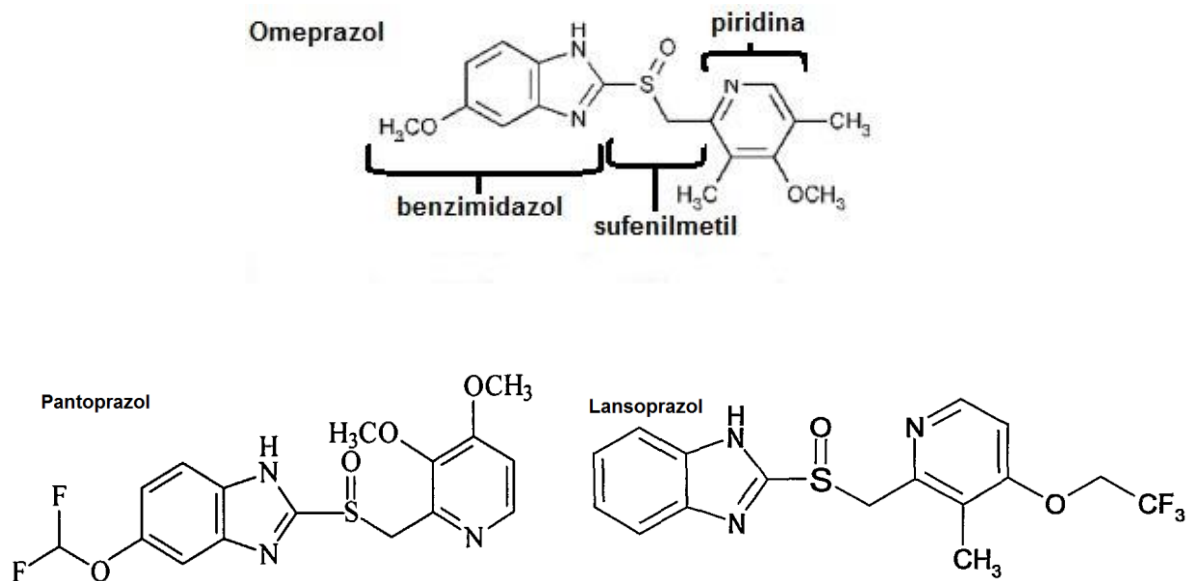


Figura 9 - Estrutura de omeprazol e seus grupos funcionais, e estrutura de dois dos seus derivados, pantoprazol e lansoprazol.

São um grupo de inibidores, que atuam no lado externo da $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ na conformação E2, mas necessitam de ser ativados pela acidificação do meio para assim ativar os seus grupos enxofre, (Fig.10), referente à ativação acídica do omeprazol. Esta ativação consiste em sucessivas protonações resultando em duas moléculas, o ácido sulfenico, e a sulfenamida, que facilmente podem reagir com os grupos tiol das cisteínas na bomba, formando ligações dissulfito covalentes irreversíveis (Shin and Sachs, 2006).

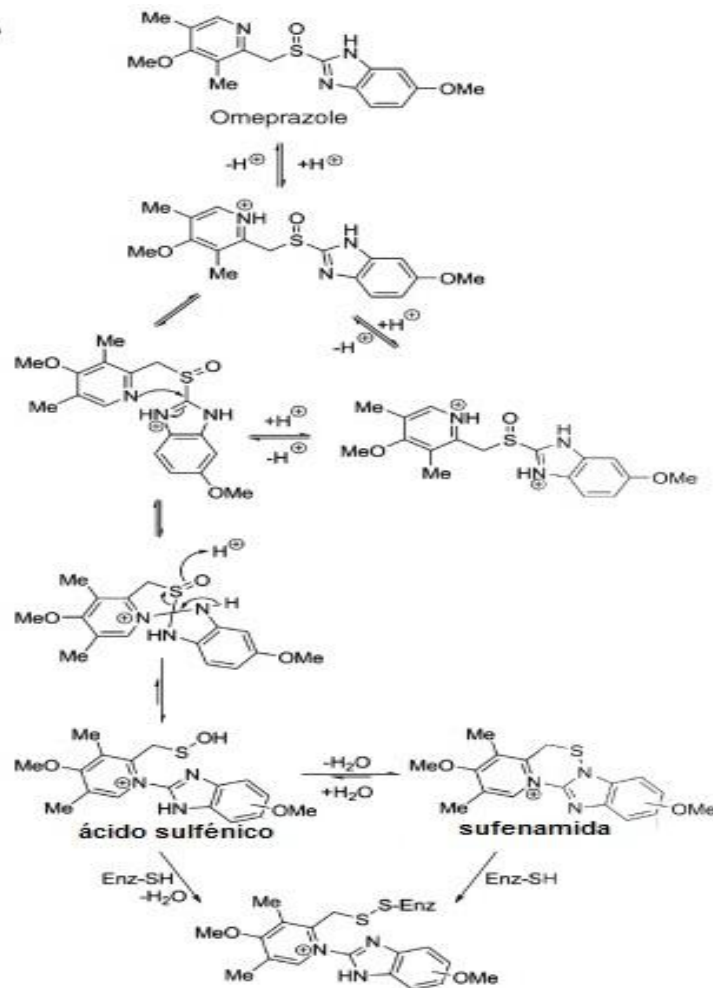


Figura 10 - Esquema de reações químicas para a ativação ácida do Omeprazol (Yatime et al, 2009).

Devido a esta pré-ativação dos PPIs, torna o tempo de resposta algo longo, desde da toma destes fármacos até ao alívio sintomático. Deste modo, houve um investimento na procura de moléculas que não seja necessário esta ativação prévia, (Yatime et al, 2009). E neste seguimento surgiu então uma nova classe de fármacos que funcionam como antagonistas do K^+ na $H^+/K^+ATPase$, conhecidos como *Potassium-Competitive Acid Blockers* (PCABs). Deste grupo de fármacos destaca-se o soraprazan que é um potente antagonista de K^+ , que não necessita de ativação prévia como os PPIs, e que se liga não-covalentemente a $H^+/K^+ATPase$, factores que o tornam mais rápido e também bastante eficaz, no entanto uma vez que são ligações não covalentes, é necessário uma dose mais alta que os PIPs para produzir os efeitos desejados (Simon et al, 2007; Schubert and Peura, 2008).

No que se refere ao mecanismo de ação do omeprazol, verifica-se como já foi descrito, que este consegue entrar no espaço extracelular perto da entrada da bomba, espaço esse criado pela conformação E2. Nesta posição, o grupo enxofre do omeprazol liga-se covalentemente, a uma cisteína, de extrema importância para a formação deste complexo, a cisteína 813, na hélice transmembranar TM6, (Fig. 11), outras cisteínas como as cisteínas 321, 822 e 892 noutras hélices transmembranares, também se mostram muito importante para a formação da ligação, no entanto é a cisteína 813 que se apresenta como principal agente para a formar a ligação (Munson et al, 2005).

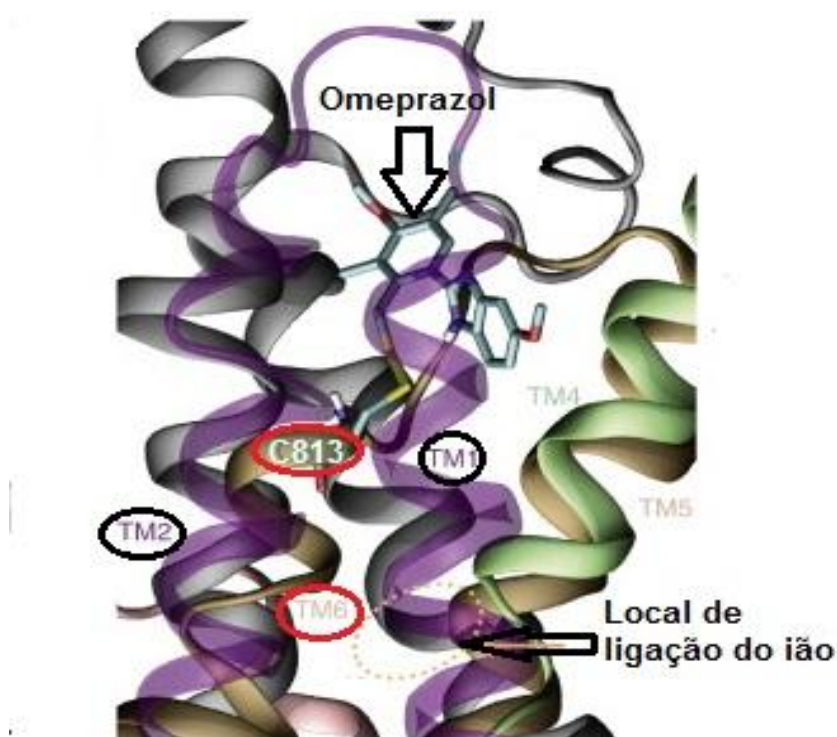


Figura 3 - Local de ligação do omeprazol a H^+/K^+ -ATPase (Yatime et al, 2009).

Com esta ligação do omeprazol à proteína, verifica-se que o grupo benzimidazol do omeprazol fica a bloquear a hélices transmembranares TM1 e TM2, impedindo assim a passagem do íon K^+ até ao seu local de ligação a bomba. Existe outro modelo de inibição do omeprazol, que consiste na entrada do omeprazol, no mesmo espaço mas neste caso com uma orientação espacial diferente, de forma que ao ligar-se com a cisteína 813 o omeprazol sofre uma rotação deixando o anel de benzimidazol a bloquear a helice TM4, ao invés das helice TM1 e TM2, como o primeiro modelo apresenta.

Apesar desta diferença, o mecanismo em si é o mesmo levando ao mesmo resultado isto é, o bloqueio da proteína, levando à obstrução do local de ligação do ião (Fig 12).

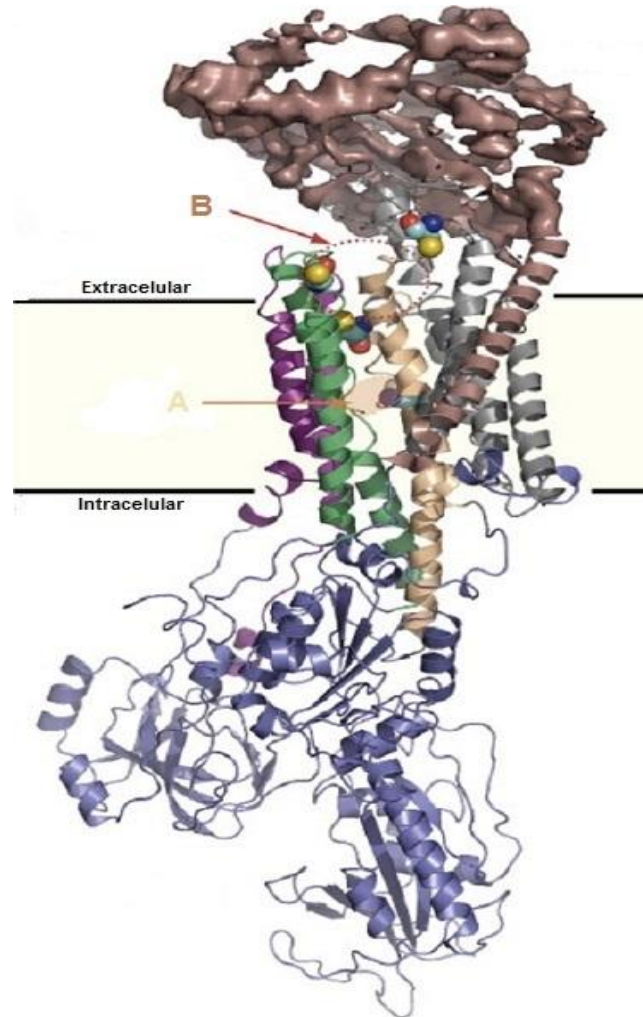


Figura 124 - Esquema do mecanismo de inibição da H⁺/K⁺ ATPase A- local de ligação do ião, B- local de ligação dos PPIs (Yatime et al, 2009)

No que se refere aos derivados de omeprazol, tais como o pantoprazol, ou lansoprazol, o mecanismo de ação destes é de grosso modo o mesmo no entanto poderá haver o envolvimento de outras cisteínas de outras hélices transmembranares (Schubert and Peura, 2008; Yatime et al, 2009).

Contudo utilização de PPIs para o tratamento de úlceras gástricas e de refluxo esofágico deve também ser cuidadosamente usada (Schubert and Peura, 2008). Um dos problemas da utilização de PPIs, já anteriormente descrito, é o facto da necessidade da ativação

química, que leva a um tardamento do efeito, mas também algumas questões de segurança. Uma vez que o uso de PIPs leva a uma diminuição da secreção ácida do estômago, por inibição da H^+K^+ -ATPase, pode levar a uma resposta do organismo de produção excessiva de gastrina, que consiste numa hormona que estimula a secreção ácida do estômago, levando a uma hipergastrinémia. Esta hipergastrinémia, pode originar fatores de crescimento celular que pode levar ao aparecimento de tumores não só no estomago, mas também no pâncreas, ou cólon, embora seja pouco comum (Yang et al, 2007).

Também poderão ocorrer problemas de má absorção, uma vez que o ácido secretado pelo estômago tem como função ajudar na digestão assim sendo, um défice de acidez de estomago pode levar a problemas de má absorção de vitamina B12, ferro, cálcio e magnésio (Schubert and Peura, 2008).

De facto, verificou-se num estudo que retrata um caso clínico, de uma hipomagnesémia causada pela utilização de esomeprazol, um derivado de omeprazol, que causava um impedimento da absorção de magnésio, levando a sintomas de letargia, e câibras musculares severas (Kuipers et al, 2009).

3.3. Ca^{2+} ATPase

A terceira bomba é a Ca^{2+} ATPase, como já foi referenciado, tanto pode ser a PMCA, ou a SERCA. Claramente SERCA, devido a sua especificidade no reticulo, e o seu fácil isolamento está mais profundamente estudada. No entanto, sabe-se que desordens na PMCA geram na maior parte dos casos problemas do foro neurológico, uma vez que estas desordens têm maior impacto nas células nervosas, onde o controlo das concentrações de cálcio tem de ser necessariamente mais precisas. É exemplo a doença neurodegenerativa de Huntington, onde se sabe que uma mutação que diminua a expressão de PMCA nos neurónios pode ser uma das origens para a alta concentração de Ca^{2+} nos neurónios, característico desta patologia (Kuhn et al, 2007).

De entre os inibidores da SERCA a taspigargina (TG) que é o seu inibidor mais potente. A TG originalmente extraída da planta *Thapsia garganica*, planta já usada medicina arábica há mais de 2000 anos, (Sagara and Inesi, 1991). Este fármaco é também conhecido como um forte anti tumoral para o cancro da próstata, (Dubois et al, 2013). Verifica-se que este tipo de cancro teve uma incidência de cerca de 149,8 por cada 100

000 habitantes, num estudo entre os anos de 2001 e 2007, realizado nos U.S.A. (Li et al, 2012).

Mas também existem outros inibidores da SERCA, tais como o ácido ciclopiazonico (*cyclopiazonic acid* (CPA)), com efeitos cardioprotectores na isquemia de miocárdio. Outros incluem ainda a ciclosporina A, conhecido imunossupressor, ou o celecoxib um agente anti-inflamatório. Destes inibidores de SERCA destacam-se a TG e CPA (Fig. 13), que atuam na bomba com efeitos similares. Seria de esperar então que o local de ligação destes fármacos à bomba fosse o mesmo, no entanto tal não acontece (Fig 14). Verifica-se que estes fármacos possuem locais de ligação distintos e que até podem estar ambos ligados em simultâneo a bomba (Takahashi et al, 2007).

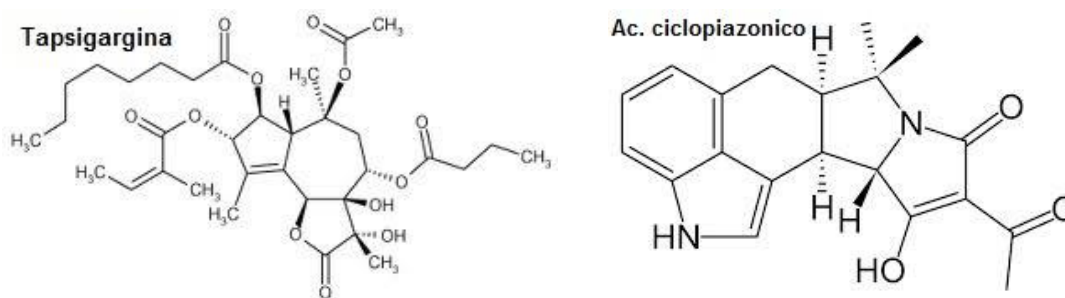


Figura 13- Estruturas de Tapsigargina e Ácido ciclopiazonico.

Foi descrito que estes fármacos, tal como os fármacos que atuam nas outras bombas anteriormente descritas, apresentam especial afinidade quando esta se encontra na conformação E2. No entanto, a TG liga-se na cavidade formada pelas hélices transmembranares TM3, TM4, TM5 e TM7, (Fig. 13), enquanto que o CPA se liga na cavidade formada pelas hélices transmembranares TM1, TM2, TM3 e TM4, (Fig.13), (Yatime et al, 2009).

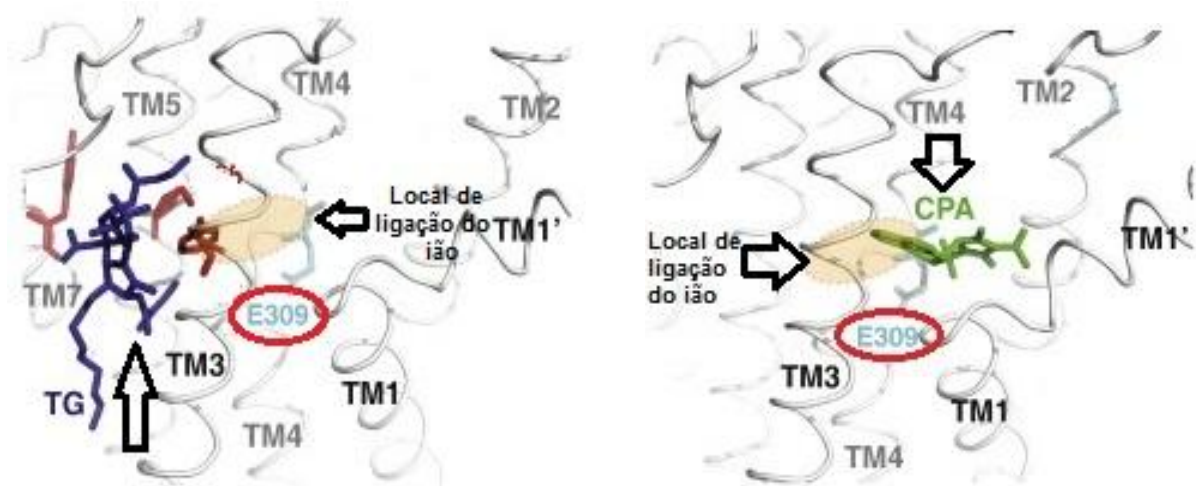


Figura 14 - Locais de ligação de TG e CPA na SERCA (Yatime et al, 2009).

Neste último caso, o CPA liga-se perto do canal, fazendo que com a sua ligação, TM1 e TM2 se desloque para perto de TM4, tampando assim o acesso do íon ao resíduo Glu309, considerado o responsável por iniciar o processo de abertura do canal. Uma vez que não há acesso a este Glu309, a bomba é bloqueada na conformação E2. Por outro lado o TG tem um local diferente de ligação, aliás fica mesmo fora do “caminho” normal do cálcio, não se verificando portanto um bloqueio do orifício de passagem de cálcio. Neste caso a inibição é feita por outro processo que consiste na imobilização das hélices membranares TM3, TM5 e TM7 numa posição que não é compatível para a ligação de cálcio a bomba, pois estas hélices sofrem uma translocação na passagem de E2 para E1 para acomodar os dois íons de Ca^{2+} , algo que se torna impossível na presença de TG. Assim TG e CPA embora tenham locais de ligação diferentes, ambos são capazes de bloquear a SERCA na conformação E2, impedindo a passagem de cálcio pela bomba (Fig. 14), (Yatime et al, 2009).

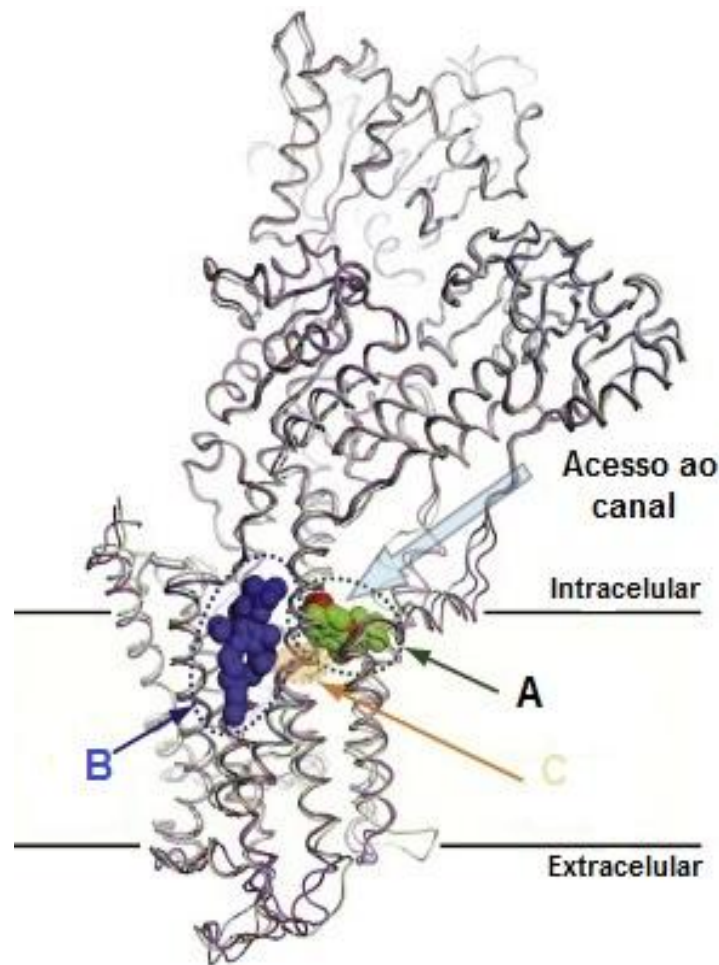


Figura 15 - Esquema do mecanismo de inibição da SERCA, A- local de ligação dos CPA, B- local de ligação da TG, C-local de ligação do ião(Yatime et al, 2009).

No entanto, este processo de inibição não explica por si só o alto poder de TG como um anti tumoral. Pensa-se que a inibição acima descrita, leva a um impedimento do armazenamento de cálcio no retículo, que irá resultar num aumento inicial de cálcio na célula. Verifica-se também um aumento de calmodulina que vai repor os níveis normais de cálcio, pela ativação da PMCA que promove a extrusão de cálcio da célula não levando à morte da célula. Contudo este processo resultará também na libertação de IP3. Este sim vai deslocar-se á membrana liga-se aos recetores de IP3 que são canais de cálcio criando assim um segundo influxo muito significativo de cálcio. Acoplado a este acontecimento há também uma cativação do complexo anexin-V, este é capaz de originar na membrana plasmática uns grandes homohexámeros, que por sua vez levam a formação de canais onde o cálcio se difunde livremente do exterior para o interior da

célula. Estes dois fenómenos levam a um aumento do cálcio no interior da célula (40 nM para 20 μ M), levando assim à morte na célula, (Denmeade and Isaacs, 2005).

Devido a este efeito, da taspigargina foi proposta como um agente anti tumoral. No entanto uma vez que esta molécula ter uma baixíssima seletividade, pois afeta todas as células que entra em contacto, tem uma citotoxicidade muito elevada. Contudo os seus derivados tais como o paclitaxel, docetaxel ou doxorubicina, apresentam menor citotoxicidade, e logo uma melhor aplicabilidade para o tratamento de tumores, (Denmeade and Isaacs, 2005). Tomando em atenção a facto das células cancerígenas, do cancro da próstata terem um crescimento lento, torna-as alvos mais difíceis. Por isso novos esforços devem ser feitos no sentido de criar novas moléculas com propriedades semelhantes a TG, mas mais específicas, ou moléculas que consigam fazer o transporte de TG até junto das células cancerígenas.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

As bombas iónicas, em especial a SERCA, Na^+/K^+ , H^+/K^+ -ATPase graças às suas particularidades estruturais e funcionais, e ao seu fácil acesso constituem, e continuarão a constituir alvos terapêuticos preciosos para determinadas patologias.

O mecanismo de atuação de fármacos nestas bombas é já conhecido, sabendo-se pormenores importantes como tais locais de ligação, tipo de interação fármaco-proteína, valores de IC_{50} , alterações conformacionais, entre outros. No entanto muito conhecimento sobre estas bombas ainda está por se adquirir, sobretudo no contexto estrutural, que certamente será muito útil para a formulação de novos fármacos mais efetivos e mais seguros e que tenham como alvos estas bombas iónicas. No entanto, podemos considerar que com o avanço rápido do desenvolvimento científico, será futuramente possível a elaboração de novas estruturas das diferentes P-ATPases com maior resolução, que irá seguramente ajudar a elaboração de novos fármacos.

Considera-se ainda que há a necessidade de estudo das P-ATPases enquanto um todo, e não individualmente de modo a tomar partido da sua alta semelhança, sendo que como foi demonstrado a sua organização dos seus domínios é muito semelhante, bem como o seu mecanismo de transporte de iões. Estas semelhanças refletem-se também no modo como os inibidores destas atuam. Isto é todos os inibidores apresentados têm alta afinidade para a conformação E2 da proteína, e a sua grande maioria leva a uma obstrução do canal, impossibilitando o acesso do ião ao seu local de ligação. Exceção para TG que tem um mecanismo um pouco diferente, pois atua fora do canal de acesso do ião, bloqueando o movimento de determinadas hélices transmembranares. Para além desta diferença, outras podem ser enumeradas, e carecem de algum estudo, como o tipo de interações entre o fármaco e a proteína, como foi demonstrado há fármacos que formam ligações com a proteína por pontes de hidrogénio caso da ouabaína, outros interagem por ligações covalentes como o caso do omeprazol, e outros ainda como o ácido ciclopiazónico, o tipo de interação ainda não está bem descrito.

Perspetivam-se no futuro novos estudos sobre novas estruturas das P-ATPases em diferentes conformações com maior resolução, a fim de perceber melhor de como a interação molecular dos fármacos nas bombas acontece (Toyoshima and Cornelius, 2013), bem como estudos que revelem novas funções das P-ATPases no metabolismo

da célula, tais como proliferação celular ou motilidade celular entre outros (Yatime, 2011). A conjugação de todo o conhecimento destas bombas iônicas nas diferentes áreas, tais como a química, bioquímica e medicina, juntamente com estas novas perspectivas, certamente resultará na formulação de novos fármacos e novas aplicações terapêuticas para as bombas iônicas.

5. Bibliografia

- Apell, H. J. (2004). "How do P-type ATPases transport ions?" *Bioelectrochemistry* 63(1-2): 149-156.
- Bagal, S. K., A. D. Brown, P. J. Cox, K. Omoto, R. M. Owen, D. C. Pryde, B. Sidders, S. E. Skerratt, E. B. Stevens, R. I. Storer and N. A. Swain (2013). "Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective." *J Med Chem* 56(3): 593-624.
- Beil, W., U. Staar and K. F. Sewing (1992). "Pantoprazole: a novel H⁺/K⁽⁺⁾-ATPase inhibitor with an improved pH stability." *Eur J Pharmacol* 218(2-3): 265-271.
- Bhattacharyya, D. and P. C. Sen (1999). "The effect of binding of chlorpromazine and chloroquine to ion transporting ATPases." *Mol Cell Biochem* 198(1-2): 179-185.
- Bilmen, J. G., L. L. Wootton and F. Michelangeli (2002). "The inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase by macrocyclic lactones and cyclosporin A." *Biochem J* 366(Pt 1): 255-263.
- Bublitz, M., H. Poulsen, J. P. Morth and P. Nissen (2010). "In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited." *Curr Opin Struct Biol* 20(4): 431-439.
- Cheng, J. W. and I. Rybak (2010). "Use of digoxin for heart failure and atrial fibrillation in elderly patients." *Am J Geriatr Pharmacother* 8(5): 419-427.
- Dawson, A. and N. Buckley (2012). "Digoxin." *Medicine* 40(3): 122-124.
- Denmeade, S. R. and J. T. Isaacs (2005). "The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer." *Cancer Biol Ther* 4(1): 14-22.
- Di Leva, F., T. Domi, L. Fedrizzi, D. Lim and E. Carafoli (2008). "The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation." *Arch Biochem Biophys* 476(1): 65-74.
- Dubois, C., F. Vanden Abeele, P. Sehgal, C. Olesen, S. Junker, S. B. Christensen, N. Prevarskaya and J. V. Moller (2013). "Differential effects of thapsigargin analogues on apoptosis of prostate cancer cells: Complex regulation by intracellular calcium." *FEBS J* 280(21): 5430-5440.
- Dvela, M., H. Rosen, T. Feldmann, M. Neshher and D. Lichtstein (2007). "Diverse biological responses to different cardiotonic steroids." *Pathophysiology* 14(3-4): 159-166.
- Gadsby, D. C. (2004). "Ion transport: spot the difference." *Nature* 427(6977): 795-797.
- Gadsby, D. C. (2009). "Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(5): 344-352.

- Geng, Y. and M. Lotz (1995). "Increased intracellular Ca²⁺ selectively suppresses IL-1-induced NO production by reducing iNOS mRNA stability." *J Cell Biol* 129(6): 1651-1657.
- Gouaux, E. and R. Mackinnon (2005). "Principles of selective ion transport in channels and pumps." *Science* 310(5753): 1461-1465.
- Grosch, S., T. J. Maier, S. Schiffmann and G. Geisslinger (2006). "Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors." *J Natl Cancer Inst* 98(11): 736-747.
- Hauptman, P. J. and R. A. Kelly (1999). "Digitalis." *Circulation* 99(9): 1265-1270.
- Holdensen, A. N. and J. P. Andersen (2009). "The length of the A-M3 linker is a crucial determinant of the rate of the Ca²⁺ transport cycle of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." *J Biol Chem* 284(18): 12258-12265.
- Horisberger, J. D. (2004). "Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump." *Physiology (Bethesda)* 19: 377-387.
- Ihenetu, K., H. M. Qazzaz, F. Crespo, R. Fernandez-Botran and R. Valdes, Jr. (2007). "Digoxin-like immunoreactive factors induce apoptosis in human acute T-cell lymphoblastic leukemia." *Clin Chem* 53(7): 1315-1322.
- Izzettin, F. V., M. Sancar, B. Okuyan, S. Apikoglu-Rabus and U. Cevikbas (2012). "Comparison of the protective effects of various antiulcer agents alone or in combination on indomethacin-induced gastric ulcers in rats." *Exp Toxicol Pathol* 64(4): 339-343.
- Keeling, D. J., C. Fallowfield, K. J. Milliner, S. K. Tingley, R. J. Ife and A. H. Underwood (1985). "Studies on the mechanism of action of omeprazole." *Biochem Pharmacol* 34(16): 2967-2973.
- Kirch, W. (2001). "Pressor and vascular effects of cardiac glycosides." *Eur J Clin Invest* 31 Suppl 2: 5-9.
- Kuhn, A., D. R. Goldstein, A. Hodges, A. D. Strand, T. Sengstag, C. Kooperberg, K. Becanovic, M. A. Pouladi, K. Sathasivam, J. H. Cha, A. J. Hannan, M. R. Hayden, B. R. Leavitt, S. B. Dunnett, R. J. Ferrante, R. Albin, P. Shelbourne, M. Delorenzi, S. J. Augood, R. L. Faull, J. M. Olson, G. P. Bates, L. Jones and R. Luthi-Carter (2007). "Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage." *Hum Mol Genet* 16(15): 1845-1861.
- Kuipers, M. T., H. D. Thang and A. B. Arntzenius (2009). "Hypomagnesaemia due to use of proton pump inhibitors--a review." *Neth J Med* 67(5): 169-172.
- Li, J., J. A. Djenaba, A. Soman, S. H. Rim and V. A. Master (2012). "Recent trends in prostate cancer incidence by age, cancer stage, and grade, the United States, 2001-2007." *Prostate Cancer* 2012: 691380.

- MacKinnon, R. (2003). "Potassium channels." *FEBS Letters* 555(1): 62-65.
- Munson, K., R. Garcia and G. Sachs (2005). "Inhibitor and ion binding sites on the gastric H,K-ATPase." *Biochemistry* 44(14): 5267-5284.
- Nichols, M., N. Townsend, P. Scarborough and M. Rayner (2013). "Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update." *Eur Heart J* 34(39): 3028-3034.
- Price, E. M. and J. B. Lingrel (1988). "Structure-function relationships in the Na,K-ATPase alpha subunit: site-directed mutagenesis of glutamine-111 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme." *Biochemistry* 27(22): 8400-8408.
- Sagara, Y. and G. Inesi (1991). "Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations." *J Biol Chem* 266(21): 13503-13506.
- Schoner, W. and G. Scheiner-Bobis (2007). "Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth." *Am J Physiol Cell Physiol* 293(2): C509-536.
- Schubert, M. L. and D. A. Peura (2008). "Control of gastric acid secretion in health and disease." *Gastroenterology* 134(7): 1842-1860.
- Shin, J. M. and G. Sachs (2006). "Gastric H,K-ATPase as a drug target." *Dig Dis Sci* 51(5): 823-833.
- Simon, W. A., M. Herrmann, T. Klein, J. M. Shin, R. Huber, J. Senn-Bilfinger and S. Postius (2007). "Soraprazan: setting new standards in inhibition of gastric acid secretion." *J Pharmacol Exp Ther* 321(3): 866-874.
- Skou, J. C. and M. Esmann (1992). "The Na,K-ATPase." *J Bioenerg Biomembr* 24(3): 249-261.
- Takada, Y., K. Matsuo and T. Kataoka (2008). "Gramicidin A directly inhibits mammalian Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase." *Mol Cell Biochem* 319(1-2): 99-103.
- Takahashi, M., Y. Kondou and C. Toyoshima (2007). "Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(14): 5800-5805.
- Thorsen, K., J. A. Soreide, J. T. Kvaloy, T. Glomsaker and K. Soreide (2013). "Epidemiology of perforated peptic ulcer: age- and gender-adjusted analysis of incidence and mortality." *World J Gastroenterol* 19(3): 347-354.
- Toyoshima, C. and F. Cornelius (2013). "New crystal structures of PII-type ATPases: excitement continues." *Curr Opin Struct Biol* 23(4): 507-514.
- Yang, Y. X., S. Hennessy, K. Probert, W. T. Hwang, A. Sedarat and J. D. Lewis (2007). "Chronic proton pump inhibitor therapy and the risk of colorectal cancer." *Gastroenterology* 133(3): 748-754.

Yard, N. J., M. Chiesi and H. A. Ball (1994). "Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase, on the frequency-dependence of the contraction-relaxation cycle of the guinea-pig isolated atrium." *Br J Pharmacol* 113(3): 1001-1007.

Yatime, L., M. J. Buch-Pedersen, M. Musgaard, J. P. Morth, A.-M. L. Winther, B. P. Pedersen, C. Olesen, J. P. Andersen, B. Vilsen and B. Schiøtt (2009). "P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787(4): 207-220.

Yatime, L., Laursen M., J. P. Morth, Esmann M., B. P. Pedersen, N. U. Fedosova (2009). " Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺, K⁺-ATPase" *Journal of Structural Biology* 174 296–306