

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA



**ESTUDO DA INTERACÇÃO DE COMPLEXOS DE VANÁDIO COM
A Ca²⁺-ATPASE DE RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO:
ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Ana Guerreiro Pereira

FARO

(2009)

Aos meus Pais
Ao Horácio
À Catarina
Ao Professor Aureliano
À Teresa

*Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante, no hay camino,
sino estelas en la mar.*

(António Machado, poeta sevilhano)

AGRADECIMENTOS

Não podia deixar passar em branco a oportunidade de agradecer, honesta e sinceramente, a todos os que me deram a mão, me guiaram, ajudaram e impulsionaram nesta longa e conturbada caminhada. Graças a todos vocês, sem exceções, cheguei ao cume do meu Everest pessoal!

Ao Professor Doutor Aureliano Alves, meu orientador científico, professor e Amigo, desde os longínquos tempos de Biologia Celular! Obrigada por todas as oportunidades que me deu, por nunca desistir de acreditar em mim, pelos sábios conhecimentos que me transmitiu e pela disponibilidade, simpatia, conselhos, amizade, paciência e motivação que, desde sempre, me demonstrou. Obrigada por me mostrar que o caminho se faz caminhando e por o encetar comigo! Esta tese é-lhe dedicada, pois sem o Professor, nunca existiria.

À Doutora Teresa Tiago, minha co-orientadora, professora e Amiga, pela forma incansável com que sempre me guiou, apoiou e ensinou, mostrando-me outros olhares sobre o mundo da ciência. Obrigada por teres estado presente em momentos cruciais da jornada, pelo teu humor, paciência, pragmatismo, sinceridade, enfim, por seres uma Amiga e uma Cientista excepcional! Esta tese também é tua e, como tal, é-te dedicada.

Ao Professor Doutor Fernando Henao, por me ter transmitido preciosos conhecimentos técnicos e científicos, pelo interesse, paciência, presença, amizade e jovialidade com que me brindou desde o primeiro dia em Badajoz. Obrigada por caminhares comigo e por me dares uma nova confiança, em mim e na ciência. Não posso deixar de agradecer, igualmente, ao Professor Doutor Carlos Guitérrez-Merino, que tão generosa e caloramente me acolheu no seu laboratório!

À Professora Doutora Debbie C. Crans, por ter aceite partilhar este desafio e colaborado tão calorosa e generosamente no projecto, partilhando compostos, conhecimentos e amizade. Obrigada por ter acreditado em mim e no meu trabalho, bem como pelos inesquecíveis momentos no simpósio de Vanádio! Gostaria, igualmente, de fazer uma referência a C. Orvig, cuja simpatia e interesse contribuíram para tornar Julho de 2008 num ponto de viragem pessoal.

À Professora Doutora Deborah Power, por toda a sua paciência e apoio durante o Curso de Especialização em Biotecnologia e, especialmente, na fase mais conturbada do projecto. Obrigada, também, à Dra Emília Costa, pela simpatia e conhecimentos transmitidos. A todo o corpo docente do Mestrado em Biotecnologia, o meu sincero agradecimento

Ao corpo docente da Licenciatura em Bioquímica da Universidade do Algarve, por todos os conhecimentos que me foram inculcados ao longo do curso e, em especial, ao Professor Doutor Jorge Martins pela amizade, simpatia e disponibilidade sempre demonstradas.

Aos meus colegas e Amigos de laboratório e não só! Sandra Soares, Pedro Palma, André, Miguel e Dalila, pelas longas discussões, almoços, lanches e, em especial, apoio e Amizade! Obrigada, igualmente, a *nuestros hermanos* em Badajoz, Alex, Miguel Ángel e Maria, pelo vosso apoio incondicional enquanto estive desse lado!

À Ana Rita, Rita Narciso, Pedro, Teddy, Ana Marta, Adriana, Nuno, Vítor Hugo e Armando, pela grande Amizade que sempre nos uniu, pelo apoio, carinho e compreensão ao longo destes anos, por estarem presentes nos bons e maus momentos, pelas brincadeiras, conselhos e ajuda neste e noutros momentos cruciais. Obrigada por acreditarem em mim!

Ao pessoal da *blogocoisa*, que tornou o que antes era virtual numa sincera e honesta amizade: Tete, Fausto, Rafeiro Perfumado, Gata Verde, Safira, Vicio, FATifer, Afrodite, Pax, Rei da Lã, Isa, Nawita, A., Fada, LBJ, Mel! Obrigado, pessoal, vocês são excepcionais!

Ao Horácio, meu companheiro, pelo Amor, amizade, apoio e paciência incondicionais, pelo carinho, por acreditar em mim, por me ter ensinado a confiar e a enfrentar desaires, e por ter tornado estes últimos dez anos nos mais felizes da minha vida. Esta tese não existiria sem ti, como tal, é-te dedicada.

À Catarina, minha irmã, que apesar de ser mais nova sempre me incitou à sensatez, sempre me apoiou, aconselhou e acreditou em mim em todos os anos das nossas vidas. Adoro-te, maninha!

Aos meus Pais, por serem os melhores do Mundo, por me amarem e acarinharem, pela Amizade, compreensão, paciência. Por me incentivarem a lutar, por não me deixarem desistir, por me ensinarem o “pensamento positivo”. Sem vocês, nunca, mas nunca em vez alguma chegaria onde cheguei. Adoro-vos!

Ao meu Tio Quim, por me ter aberto os olhos e por se preocupar. A toda a minha família do peito: Teté, Hélio, Pati, Jony, Jójó, Zézé, Paulo, Rute, Mígui, Miguelita, avó e avô! Obrigada por me apoiarem e acarinharem desde que nasci. Adoro-vos, *people!*

RESUMO

A bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático é uma das proteínas mais extensivamente estudadas, capaz de interagir com várias espécies e compostos de vanádio. Combinando-se estudos de fluorescência com ensaios cinéticos de transporte e ligação de ^{45}Ca à ATPase, avaliou-se o efeito de três complexos de vanádio na função bioenergética e estrutural de Ca^{2+} -ATPase.

Demonstrou-se que concentrações próximas dos valores de IC50 (para a hidrólise de ATP) de BMOV-V(IV) e de PDC-V(V) não inibem significativamente a acumulação de ^{45}Ca por sarcovesículas. Por outro lado, o complexo PDC-V(V) mostrou ser capaz de estimular a ligação de ^{45}Ca ao retículo sarcoplasmático, sugerindo que este complexo pode interagir com o domínio de ligação de cálcio à bomba. Vários estudos de fluorescência mostraram que BMOV-V(IV) e PDC-V(V) poderão ser capazes de induzir a conformação E2 (tal como soluções de “decanadato” e de “monovanadato”) e E1 de Ca^{2+} -ATPase (tal como soluções de “metavanadato”), respectivamente. Apesar de o composto HAIDA-V(IV) privilegiar a conformação E1 (devido à sua elevada afinidade para iões Ca^{2+}), inibiu significativamente o transporte e a ligação de ^{45}Ca , o que sugere que possa interagir com os locais de união de cálcio.

Os resultados obtidos são consistentes com a formação de um aducto entre o composto de vanádio e a proteína, o que sugere um efeito na homeostasia intracelular de cálcio, nos sistemas de contracção muscular e, inclusive, nas vias de acção de insulina. Cada um dos três complexos promoveu respostas distintas na Ca^{2+} -ATPase, sugerindo uma evidencia de actividades biológicas diversas em função da espécie química de V e do ambiente de coordenação.

Palavras-chave: Ca^{2+} -ATPase, retículo sarcoplasmático, músculo esquelético, vanádio, *diabetes mellitus*, complexos coordenados de oxovanádio.

ABSTRACT

The calcium pump of sarcoplasmic reticulum is one of the most well understood proteins and it is known to interact with vanadium species and compounds. A combination of intrinsic and extrinsic fluorescence studies, as well as kinetic measurements on the ^{45}Ca transport and binding to the ATPase, were performed to evaluate the effects of three vanadium complexes on the ATPase bioenergetic and structural function.

It was demonstrated that BMOV-V(IV) and PDC-V(V) concentrations around the IC50 values for inhibition of hydrolysis did not significantly inhibit ^{45}Ca uptake. On the other hand PDC-V(V) was able to stimulate SR ^{45}Ca binding, suggesting that these complexes may interact with the calcium binding domain of the pump. Fluorescence studies with FITC labelled SERCA have shown that BMOV and PDC shift the calcium pump to the E2 (like decavanadate and monovanadate solutions) and E1 (like metavanadate solutions) conformations, respectively. Although HAIDA-V(IV) favoured the E1 conformation (a high Ca^{2+} affinity state), it significantly inhibited ^{45}Ca binding, suggesting that HAIDA-V(IV) may interact with calcium binding sites of the pump.

All these observations are consistent with an adduct formation between protein and V compounds and with their union to the catalytic site of Ca^{2+} -ATPase. The three coordination compounds promote different responses in the calcium pump, suggesting an evidence of diverse biological activity in relation to specific chemical vanadium species and distinct coordination environments. The results also indicate that the three coordination compounds could promote a response in the calcium homeostasis and muscle contraction systems through the SERCA.

Key words: Ca^{2+} -ATPase, sarcoplasmic reticulum, skeletal muscle, vanadium, *diabetes mellitus*, insulin-mimetic coordination complexes of oxovanadium.

ABREVIATURAS

ADP – Adenosina 5`- difosfato

AMP – Adenosina 5`- monofosfato

AGE – produtos terminais de glicosilação (*advanced glycation end product*)

ATP – Adenosina 5`- trifosfato

ATPase – Adenosina 5`- trifosfatase

BEOV – bis (etilmaltolato) de oxovanádio (IV)

βME – Beta-mercaptoetanol

BMOV-V(IV) – bis(maltolato) de oxovanádio (IV)

BSA – Albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

Ca²⁺- ATPase – Actividade de ATPase dependente de cálcio

Da – Dalton

DPH – 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

EGTA – ácido etilenoglicoltetracético (*ethylene glycol tetraacetic acid*)

FITC – isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)

g – Aceleração gravítica

GL-RS – Complexo glicogenolítico associado a Retículo Sarcoplasmático

GSH – glutationa reduzida

HAIDA-V(IV) – bis- (iminodiacetato de N-hidroxilamida) de vanádio (IV)

HEPES – Ácido (N-2-hidroietil) piperazina- N`-2- etano sulfónico

HMW – Marcador de peso moléculas elevado (*high molecular weight*)

H₂O dd – água bi-destilada

Hz – Ciclos por segundo (Hertz)

LDH – desidrogenase do lactato (*lactate dehidrogenase*)

LMW – Marcador de baixo peso molecular (*low molecular weight*)

Lys – aminoácido lisina (e seu resíduo)

Mili Q – Água desionizada com condutividade 0,054 μS/cm

MOPS – ácido 3-N-morfolino propanossulfônico (*3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*)

NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleótido (oxidada)

NADH – nicotinamida adenina dinucleótido (reduzida)

P_i – Fosfato inorgânico ou ortofosfato (sem especificar o grau de protonação)

PDC-V(V) – piridina-2,6-dicarbo-xilato de dioxovanádio (V)

PK – cinase do piruvato (*pyruvate kinase*)

PLP – fosfato piridoxal

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PSA – Persulfato de amônio

PVC – Cloreto de polivinilo

Rpm – Rotações por minuto

RS – Retículo sarcoplasmático

SDS – Dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SDS-PAGE – electroforese em gel de poli-acrilamida, em condições desnaturantes

SERCA – Ca²⁺-ATPase de Retículo Sarco e Endoplasmático (*Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase*)

SERCA-FITC – Ca²⁺-ATPase de Retículo Sarco e Endoplasmático marcada com isotiocianato de fluoresceína

TCA – Ácido tricloroacético

TEMED – N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina

TES – Trietilssilano (*Triethylsilane*)

TMA-DPH – 1,4-trimetilaminofenil-6-fenil-1,3,5-hexatrieno

Tris – 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

Trp – aminoácido triptofano, ou seu resíduo.

UV/VIS – Ultravioleta/ visível

⁵¹V-NMR – Ressonância magnética nuclear do isótopo 51 de vanádio (*⁵¹V nuclear magnetic resonance*)

VRS – Vesículas de retículo sarcoplasmático

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. <i>Diabetes mellitus</i>: considerações relevantes	2
1.1. Classificação de <i>Diabetes Mellitus</i>	2
1.2. Descontrolo da Glicémia e Diabetes “tipo 2”	4
1.3. Anti-diabéticos orais no tratamento clínico actual de <i>Diabetes Mellitus</i> “Tipo 2”	5
2. Vanádio: considerações relevantes	6
2.1. Distribuição e Biodisponibilidade de Vanádio	7
2.2. Propriedades Físico-Químicas Gerais de Vanádio	8
2.3. Propriedades Químicas de Vanádio em Solução Aquosa	8
2.4. Vanádio em Sistemas Biológicos	12
2.5. Acção Bioquímica e Molecular de Vanádio	17
2.6. Aplicações Farmacológicas de Vanádio	20
3. A Ca^{2+} - ATPase de Retículo Sarcoplasmático	28
3.1. Papel Fisiológico de SERCA1a e de Retículo Sarcoplasmático	29
3.2. Aspectos Estruturais da Ca^{2+} - ATPase de Retículo Sarcoplasmático	31
3.3. Ciclo Catalítico e de Transporte da Ca^{2+} - ATPase de Retículo Sarcoplasmático	35
4. Interação de Compostos de Vanádio com a Ca^{2+} - ATPase	38
4.1. Interação de oligómeros de V(V) com a Ca^{2+} -ATPase de RS	38
4.2. Interação da Ca^{2+} - ATPase de RS com Complexos Orgânicos de Vanádio	41
5. Objectivos do estudo experimental	41
II. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	43

1. Isolamento e Caracterização de Vesículas e de Complexo Glicogenolítico associado a Retículo Sarcoplasmático do Músculo Esquelético de Coelho

- 1.1. Isolamento de Vesículas de Retículo Sarcoplasmático 43
- 1.2. Isolamento de Complexo Glicogenolítico associado a Retículo Sarcoplasmático 45
- 1.3. Conservação das Amostras de VRS e GL-RS 46
- 1.4. Caracterização das Preparações de VRS e GL-RS 46

2. Preparação de soluções de vanádio 51

- 2.1. Preparação de soluções de vanadato 51
- 2.2. Preparação de soluções de complexos orgânicos coordenados de vanádio 51

3. Análise da actividade de Ca²⁺-ATPase na Presença de Compostos de Vanádio 52

- 3.1. Determinação da actividade hidrolítica de Ca²⁺-ATPase 52
- 3.2. Análise da acumulação de Ca²⁺ por radiometria com ⁴⁵Ca 53
- 3.3. União de cálcio a VRS: análise radiométrica com ⁴⁵Ca e ³H-glicose 54

4. Determinação da Fluorescência de Ca²⁺-ATPase na Presença de Compostos de Vanádio

- 4.1. Análise da ligação de ATP à Ca²⁺-ATPase e da alteração E1/E2 56
- 4.2. Extinção da fluorescência em SERCA-FITC: acessibilidade de KI ao FITC 59
- 4.3. Determinação de anisotropia ou polarização da fluorescência 60

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO 64

1. Isolamento e Caracterização da Bomba de Cálcio em Preparações de Vesículas e de Complexo Glicogenolítico associado a Retículo Sarcoplasmático de Músculo Esquelético de Coelho

- 1.1. Isolamento de VRS e GL-RS de músculo esquelético 64
- 1.2. Análise quantitativa das preparações de VRS e GL-RS 67
- 1.3. Análise qualitativa e estado de pureza das preparações de VRS e GL-RS 68
- 1.4. Actividade hidrolítica da Ca²⁺-ATPase em preparações de VRS e GL-RS 72

2. Efeito de Vanádio nas Propriedades Funcionais de Ca²⁺ - ATPase de VRS 74

- 2.1. Efeito de complexos coordenados de vanádio na actividade hidrolítica de Ca^{2+} -ATPase 76
- 2.2. Efeito de vanádio na acumulação de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase de VRS: estudos cinéticos por radiometria com ^{45}Ca 79
- 2.3. Efeito de soluções de vanadato e de complexos de vanádio na afinidade de VRS para Ca^{2+} : análise radiométrica com ^{45}Ca e ^3H -glicose 95

3. Efeito de Vanádio nas Propriedades Estruturais de Ca^{2+} -ATPase de VRS: Estudos de Fluorescência

- 3.1. Análise do efeito de vanádio na alteração E1/E2 e na ligação de ATP à Ca^{2+} -ATPase 101
- 3.2. Efeito de soluções de oxovanadatos na extinção da fluorescência em VRS: acessibilidade de KI ao FITC 114

4. Efeito de Complexos de Vanádio na Fluidez da Membrana de VRS: Determinação da Anisotropia ou Polarização da Fluorescência

IV. CONCLUSÃO GERAL 119

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 121

I. INTRODUÇÃO

A *Diabetes mellitus* (*diabetes*, palavra de origem grega, significa “sifão”; *mellitus*, de origem latina, alude a “adocicado” – a expressão significará “sifão doce como mel” e é originária do tempo em que o diagnóstico médico incluía a prova da urina de um paciente) é uma desordem metabólica, de origem multifactorial (genética e ambiental), caracterizada por uma hiperglicemia sanguínea crónica. Afectando aproximadamente 246 milhões de indivíduos em todo o mundo, especialmente nos países desenvolvidos (estando o progresso da doença associado à ocidentalização do modo de vida das populações) e de um modo crescente (Grimaldi, 2003; Diabetes Atlas, 2007), a diabetes é já considerada uma epidemia global, à qual se somam várias complicações metabólicas adversas e um elevado esforço financeiro (Wild *et al.* 2004; Landersdorfer & Jusko, 2008). Estima-se que, em 2025, mais de 7,3% da população mundial estará afectada por esta pandemia silenciosa, que reclama mais vidas que o vírus da imunodeficiência humana (VHI) e que constitui uma das maiores causas de morte prematura (a cada dez segundos, morre uma pessoa devido a complicações relacionadas com diabetes), à escala mundial (Duarte *et al.*, 2002; Diabetes Atlas, 2007).

O campo de investigação no tratamento de *Diabetes mellitus* tem progredido exponencialmente nas últimas três décadas, tendo-se iniciado em 1922 com a descoberta da insulina, cujo suprimento exógeno se converteu rapidamente na terapêutica principal da maioria das manifestações de diabetes (Shechter *et al.*, 2003). Contudo, esta hormona requer a presença funcional do seu receptor e só pode ser administrada numa forma injectável (por via subcutânea, intramuscular ou endovenosa), não sendo activa mediante a administração oral; adicionalmente, têm-lhe sido atribuídos efeitos negativos cumulativos como, hipoglicémia, reacções alérgicas no local da injeção, hipo-potassiémia e resistência insulínica, para além das várias consequências associadas a um mau controlo da terapêutica (Gorol *et al.* 1995; Garcia-Vicente *et al.*, 2007). A introdução de agentes antidiabéticos sintéticos, eficazes por via oral, constituiu assim um marco do tratamento de *Diabetes mellitus*, mesmo apesar da sua acção estar dependente da presença de uma concentração mínima adicional de insulina endógena (Shechter, 1990; Garcia-Vicente *et al.*, 2007).

Apesar de os meios e terapêuticas farmacológicas actuais terem proporcionado um aumento da qualidade e esperança média de vida dos doentes diabéticos, a grande maioria continua a apresentar uma inevitável deterioração no controlo da glicémia, independentemente do tipo de terapêutica adoptada (UKPDS, 1995; Landersdorfer & Jusko, 2008). Legitima-se, assim, o despontar de novas abordagens ao tratamento ou correcção de *Diabetes mellitus*, por via farmacológica ou genética, bem como da necessidade de esclarecer os mecanismos moleculares e celulares que estão na base desta doença (Merck, 2007). Uma vez delineadas e reconhecidas as aplicações farmacológicas dos iões metálicos, não é de estranhar que uma dessas abordagens se baseie na capacidade que alguns metais de transição possuem em mimetizar as vias de acção da insulina, constituindo uma alternativa oral viável às injeções diárias da hormona: é o caso do vanádio, molibdénio, zinco, tungsténio, cobalto e crómio (Ding & Crans, 2006; Landersdorfer & Jusko, 2008).

De todos os agentes metálicos anti-diabéticos actualmente conhecidos, o vanádio foi o primeiro a ser utilizado no tratamento efectivo de pacientes diabéticos, já em 1899, vinte anos antes da descoberta da insulina (Sakurai *et al.*, 2006). Após a descoberta do poder inibitório de vanádio sobre as ATPases, começou-se a constatar que os seus sais (como ortovanadato de sódio, Na_3VO_4 ; metavanadato de sódio, NaVO_3 e sulfato de vanadilo VOSO_4) tinham a capacidade de exibir efeitos semelhantes aos da insulina, nomeadamente na acumulação e metabolismo da glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo, bem como, na inibição concomitante da lipólise no tecido adiposo. Começaram a surgir, então, em 1980, referências mais concretas ao uso potencial de compostos de vanádio no tratamento de diabetes tipo 1 e 2; cinco anos depois, demonstrava-se o seu efeito estimulante na insulina, verificando-se *in vivo* a diminuição dos níveis de glicose e de lípidos no plasma de ratos insulino-deficientes, sem que se registassem alterações na concentração de insulina (Tolman *et al.*, 1979; Rehder *et al.*, 2002; Thompson & Orvig, 2004). Demonstrada a capacidade insulino-mimética de vanádio, o passo seguinte centrou-se na síntese e caracterização de compostos de vanádio estáveis, neutros e de baixa toxicidade, um campo de investigação necessário e relevante, pois oferece uma alternativa farmacologicamente comprovada no tratamento de *Diabetes mellitus* (Aureliano *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009).

Já se sintetizaram, entretanto, diversos compostos coordenados de vanádio que têm demonstrado exercer um efeito superior ao da própria hormona, na estimulação de vários tecidos alvo pouco sensíveis, ou mesmo insulino-insensíveis (Shechter *et al.* 2003; Thompson & Orvig 2006); estes complexos metálicos orgânicos podem, adicionalmente, atravessar a barreira gastro-intestinal e há evidências de que também conseguem ultrapassar a barreira hemato-encefálica (Tsiani & Fantus, 1997; Thompson *et al.*, 1999). Por outro lado, as propriedades insulino-miméticas de vanádio poderão permitir a sua utilização como sonda nos mecanismos celulares e moleculares de acção da insulina nos organismos, mecanismos estes que ainda não estão totalmente compreendidos (Aureliano & Crans, 2009; Pereira *et al.*, 2009).

Apesar de existirem vários estudos e resultados efectivos e promissores, muitas questões permanecem em aberto, sendo necessário elucidar com exactidão os mecanismos moleculares que medeiam a acção de vanádio nos organismos vivos, de modo a evitar reacções secundárias adversas e a se poderem sintetizar compostos específicos para cada tipo de paciente (Landersdorfer & Jusko, 2008). Concomitantemente, existem dissemelhanças no modo como os diferentes compostos de vanádio afectam as vias que promovem os efeitos insulino-miméticos; logo, existem mecanismos de acção diferentes (embora correlacionados) para cada tipo de composto, reflexo do facto de o metal ter a capacidade de alterar as suas propriedades bioquímicas consoante o número de oxidação, a coordenação e o grau de oligomerização dos seus iões (Aureliano & Crans, 2009).

Os iões e os compostos de vanádio são conhecidos por inibir especificamente a Ca^{2+} -ATPase de Retículo Sarcoplasmático (RS), um sistema transmembranar envolvido na regulação da concentração de cálcio intracelular e no processo de contracção muscular (Pick, 1982; Aureliano & Madeira, 1994). Para além de esta Ca^{2+} -ATPase constituir um excelente modelo metabólico no estudo dos efeitos das várias espécies de vanádio na homeostasia celular do catião Ca^{2+} , há evidências de que estará envolvida nas próprias vias de acção da insulina, podendo mesmo ser um dos potenciais alvos biológicos de compostos de vanádio insulino-miméticos (Aureliano *et al.*, 2008).

1. *DIABETES MELLITUS*: CONSIDERAÇÕES RELEVANTES

A *Diabetes mellitus* (bem como outras formas menores de intolerância à glicose) é actualmente reconhecida como um conjunto heterogéneo de distúrbios metabólicos que têm origem em desequilíbrios na homeostasia glicose-insulina e que se caracterizam por níveis plasmáticos elevados de glucose (hiperglicémia). Mediante uma carência absoluta ou relativa de insulina e/ou uma resistência à sua acção, que por seu turno se traduz numa ineficiência das vias de acção desta hormona em vários órgãos-alvo, acumulam-se perturbações nos metabolismos de glucose, lípidos e proteínas que, somadas, originam uma intolerância à glicose e uma hiperglicémia crónicas e características (Atkison & Maclaren, 1990; Gorol *et al.*, 1995; Landersdorfer & Jusko, 2008).

Os sintomas de hiperglicémia incluem poliúria (micção excessiva), polidipsia (sede excessiva), perda de peso (por vezes acompanhada de polifagia – fome insaciável) e visão enevoada; a susceptibilidade a determinadas infecções e a redução do ritmo de crescimento podem resultar, ainda, da hiperglicémia crónica (Gorol *et al.*, 1995; Gavin *et al.* 2003). A longo prazo, desenvolvem-se afecções secundárias caracterizadas por danos, disfunções e falhas em vários órgãos, especialmente nos olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos; aparecem, pois, sob a forma de retinopatias (podendo conduzir à perda de visão), nefropatias (disfunção e falência renal), neuropatias periféricas, doenças vasculares cerebrais, doenças coronárias e cardíacas (microangiopatia e aterosclerose, por exemplo), doenças vasculares periféricas e ulceração (com conseqüente amputação) dos membros inferiores. Se não forem controladas, estas complicações, debilitantes e muito graves, conduzirão à morte (Sakuray, 2002; Gavin *et al.* 2003; Diabetes Atlas, 2007).

1.1. Classificação de *Diabetes Mellitus*

Considera-se geralmente aceite a existência de dois tipos principais de diabetes, consoante a etiologia e o quadro clínico apresentados: a *Diabetes mellitus* Insulino Dependente (DMID), ou de tipo I, e a *Diabetes mellitus* Não-Insulino Dependente (DMNID), ou de tipo II (Gorol *et al.* 1995; Harrison, 1998; Diabetes Atlas, 2007).

O primeiro tipo, DMID, corresponde à ausência total ou quase total de secreção de insulina endógena e, apesar de surgir tipicamente em indivíduos jovens (antes dos 40 anos), pode afectar pessoas de qualquer idade. Trata-se de uma forma grave de diabetes, que resulta da destruição progressiva das células beta dos ilhéus de Langerhans pancreáticos, perpetrada por linfócitos do próprio sistema imunitário (mecanismo auto-imune); embora os mecanismos concretos que desencadeiam este processo permaneçam por descrever, pensa-se que poderão resultar da presença de um agente, ainda desconhecido (um vírus, uma toxina, ou ambos), que despoletará as agressões auto-ímunes às células pancreáticas, num terreno geneticamente predisposto. Quando, após uma fase de latência, 90% dos ilhéus insulino-secretores estão destruídos, a doença propriamente dita exterioriza-se de forma brusca e agressiva (Voet & Voet, 1995; Duarte *et al.*, 2002; Grimaldi, 2003; Gavin *et al.*, 2003; Laaso, 2008). Os pacientes que sofrem de diabetes do tipo 1 são, assim, dependentes da administração diária

de insulina exógena; sem este controlo glicémico, os pacientes com DMID desenvolveriam uma cetoacidose mortal (Gorol *et al.* 1995; Duarte *et al.*, 2002; Grimaldi, 2003).

A DMNID, que é responsável por cerca de 80 a 90 % dos casos de diabetes, é um distúrbio hetero-géneo que se caracteriza por uma concentração de glicose sanguínea anormalmente elevada (hiperglicémia) e por uma resposta atípicamente lenta à ingestão do açúcar, que acaba por tornar os tecidos-alvo insensíveis à acção da insulina (mesmo que os níveis sanguíneos da hormona sejam normais), o que conduz a uma série de danos irreversíveis e, comunmente, à morte. Pode afectar tanto jovens como adultos e idosos, estando associada à interacção entre genes de susceptibilidade e factores de estilo de vida, nomeadamente, hipertensão e obesidade. A sua terapêutica não requer, geralmente, uma administração insulinémica exógena, conseguindo-se um bom controlo da glicemia através da administração de antidiabéticos orais e de uma dieta adequada (Fraústo *et al.*, 1997; Grimaldi, 2003; Laakso, 2008; Stumvoll *et al.*, 2008).

1.2. Descontrolo da Glicémia e Diabetes tipo 2

A glicose é a principal fonte de energia do organismo humano, pelo que a manutenção da sua concentração sanguínea dentro de determinados níveis, e o controlo do seu transporte para o interior das células, vão envolver mecanismos fisiológicos bastante complexos e ainda obscuros. A Insulina, por sua vez, é a hormona chave na regulação desses mecanismos, sendo produzida e segregada pelas células beta do pâncreas, localizadas nos chamados ilhéus de Langerhans. Em geral, a normoglicémia (valores normais de glicose no sangue) é mantida pela correlação equilibrada entre a secreção da insulina e a eficácia das suas acções; quando ocorrem disfunções neste equilíbrio, surge a patologia conhecida como *Diabetes mellitus* (Harrison, 1998; Stryer, 2002; Voet *et al.*, 2008; Quintas *et al.*, 2008; Laaso, 2008).

Apesar de a DMNID ser conhecida há vários séculos, a compreensão da sua etiologia e patogénese ainda é incompleta. Em jejum, a maior parte da glicose é produzida pelo fígado e cerca de metade é utilizada pelo metabolismo cerebral; a restante é capturada por vários tecidos e, maioritariamente, pelo tecido muscular esquelético. Após uma refeição, quando a glicose entra na circulação sanguínea, a insulina é secretada em grandes quantidades, inibindo a produção de glicose pelo fígado e aumentando a sua captação pelo músculo, regulando a glicémia. Contudo, se existir um qualquer defeito que promova a falta, insuficiência ou inibição da acção da insulina (como uma falha no receptor da insulina), os efeitos da hormona tornam-se insuficientes, tanto em termos da captação e metabolização de glicose no músculo esquelético (e outros tecidos-alvo), como da inibição da produção de glicose pelo fígado, instalando-se a resistência à insulina. O pâncreas acaba por já não conseguir produzir insulina suficiente para compensar a resistência à hormona e a sua falta de eficácia, dando-se o descontrolo da glicémia e instaurando-se o quadro de hiperglicémia (níveis excessivos de glicose no sangue) (Voet & Voet, 1995; Harrison, 1998; Duarte *et al.*, 2002; Stumvoll *et al.*, 2008; Laakso, 2008).

Incapaz de produzir energia suficiente a partir do catabolismo da glicose, o organismo tem de recorrer a fontes alternativas de energia, mobilizando as reservas de glicose (glicogenólise) e libertando ácidos gordos e proteínas; a degradação proteica permitirá obter aminoácidos, para conversão em glicose (gluco-neogénese) e a conversão dos ácidos gordos (por lipólise) em ácido acetoacético, acetona e ácido hidroxibutírico (formação de corpos cetónicos) funcionará como suprimento alternativo (em especial no cérebro e no músculo cardíaco). O excesso de corpos cetónicos resulta em cetoacidose, conduzindo à diminuição do pH sanguíneo, que pode ter consequências graves se for prolongada. A necessidade de eliminar o excesso de glicose no sangue e os efeitos da mobilização de gorduras e proteínas conduzem, por fim, às manifestações clínicas características de Diabetes (Peres, 1994; Gorol *et al.*, 1995; Duarte *et al.*, 2002; Harrison, 1998). Os indivíduos com DMNID apresentam, portanto, uma disfunção da secreção de insulina e uma resistência à acção da hormona nos tecidos-alvo que, na maior parte dos casos, não se resolve com a administração de insulina exógena (Harrison, 1998; Stumvoll *et al.*, 2008; Laakso, 2008).

1.3. Anti-diabéticos orais no tratamento clínico actual de *Diabetes Mellitus* Tipo 2

Na terapêutica de *Diabetes mellitus* tipo 2, para além de um controlo da alimentação e da prática orientada de exercício físico, utilizam-se hipoglicemiantes orais como as sulfonilureias e as biguanidas. As sulfonilureias foram, durante muitos anos, o pilar da terapêutica anti-diabética oral, por estimularem a produção de insulina pelas células beta do pâncreas; no entanto, estão associadas a perturbações cutâneas, fotossensibilidade e outras reacções alérgicas, perturbações gastro-intestinais, icterícia, teratogenicidade e, ainda, hipoglicémia (Gorol *et al.*, 1995; Thompson & Orvig, 1995; Duarte *et al.*, 2002; Pfeiffer, 2008).

Actualmente, são as biguanidas que têm um papel chave e básico no tratamento da DMNID, principalmente a metformina, devido à sua acção de sensibilização à insulina (Stumvoll *et al.*, 2008). Também são utilizados outros fármacos, como os inibidores da α -glicosidase, as tiazolidinedionas (sensibilizadores de insulina) e, mais recentemente, os potenciadores da acção das incretinas (Duarte *et al.*, 2002; Merck, 2007).

Contudo, para além dos efeitos colaterais, cada grupo dos fármacos referidos dirige-se apenas a um dos defeitos metabólicos que caracterizam a diabetes tipo 2, pelo que uma abordagem eficaz, que melhore o controlo da glicémia, tem de passar por uma terapêutica combinada; estes fármacos possuem ainda a desvantagem de necessitarem de resqúícios de insulina endógena para actuar. Muitas vezes, e após falência das estratégias orais, tornar-se necessária a administração de insulina exógena (Pfeiffer, 2008; Stumvoll, 2008).

2. VANÁDIO: CONSIDERAÇÕES RELEVANTES

Descoberto em 1802 por Andrés Manuel del Rio, o Vanádio foi inicialmente designado pancrómio (do grego *panchromium*, muitas cores), devido à extraordinária gama de cores dos seus sais e, mais tarde, eritrónio, em alusão à cor vermelha desses sais quando tratados com ácidos); no entanto, del Rio perdeu a confiança na sua descoberta,

pensando tratar-se, afinal, de apenas mais um composto de crómio. Trinta anos depois, o elemento foi redescoberto por Nils Gabriel Sefstrom, que o purificou na sua forma de óxido e o denominou de Vanádio, em honra da deusa nórdica da beleza e do amor, Vanadis, novamente em alusão à gama de cores dos derivados do elemento (Nriagu, 1998; Barceloux, 1999). Todavia, foi a descoberta de que o músculo estriado continha vanádio, na forma de vanadato, que despontou o interesse sobre a função biológica e bioquímica deste elemento de transição; adicionalmente, quando se estabeleceu a sua acção inibitória sobre a enzima Na^+ , K^+ -ATPase, reforçou-se um novo campo de investigação, centrado na bioquímica e na vasta gama de efeitos biológicos de vanádio (Josephson, L. & C. Cantley, Jr., 1977; Tsiani & Fantus, 1997). Revisões de como o vanádio pode actuar e funcionar na biosfera incluem investigações que vão desde a química de coordenação e redox deste elemento (Crans, 1994a; Crans *et al.*, 1998; Rehder, 1999), passando pelos aspectos funcionais e estruturais (Rehder e Jantzen, 1998; Crans, 2004) até aos efeitos bioquímicos e fisiológicos do vanádio ou compostos de vanádio (Chasteen, 1983; Rehder, 2003; Mukherjee, 2004).

A química excepcionalmente complexa que o vanádio apresenta tem originado sucessivas interpretações incorrectas desde o momento em que o metal foi descoberto. Deste modo, para uma análise correcta dos efeitos promovidos por vanádio em sistemas biológicos, o comportamento dos seus compostos deve ser sempre intercalado com a identificação prévia das espécies oligoméricas presentes no meio de reacção, com as suas complexas propriedades químicas e com o conhecimento das inúmeras acções que podem exercer nos organismos vivos, para além das interacções a que estão sujeitos (Tiago *et al.*, 2002; Rehder, 2003).

Torna-se necessária, assim, uma breve descrição dos aspectos mais importantes da bioquímica e toxicologia do elemento, que, em apenas algumas décadas, passou de ligeiramente tóxico e carcinogénico a anti-diabético, anti-cancerígeno e, eventualmente, essencial (Thompson & Orvig, 2006).

2.1. Distribuição e Biodisponibilidade de Vanádio

Membro do grupo VB da tabela periódica (número atómico 23), o Vanádio é um sólido metálico à temperatura ambiente que ocorre nas formas isotópicas naturais ^{50}V e ^{51}V (existem outros isótopos, menos estáveis) e que está amplamente distribuído por todos os ecossistemas, embora em quantidades muito pequenas. Na crosta terrestre, o vanádio é o décimo quinto elemento mais abundante, com uma concentração entre 100 a 200 ppm e uma abundância relativa de 0,014%. Está difusamente distribuído em rochas, solos, plantas, animais e, numa menor extensão, na água, onde os níveis raramente excedem 0,1 ppb. A sua abundância na biosfera é cerca de duas vezes a do cobre, dez vezes a do chumbo e a do molibdénio, constituindo o metal de transição mais abundante a seguir ao ferro, titânio, manganésio e zircónio (Greenwood & Earnshaw, 1997; Mamane & Pirrone, 1998). O vanádio também se encontra nos alimentos consumidos pelo homem e outros animais; os alimentos considerados “ricos” neste elemento incluem a salsa, cogumelos, pimenta preta e mariscos, seguidos das frutas, vegetais, cereais, gorduras e óleos, com menor quantidade (Chasteen, 1983).

Se bem que o vanádio metálico, em si, não ocorra na natureza, conhecem-se cerca de 70 minerais diferentes onde o metal está associado (em especial na forma de pentóxidos de vanádio ou vanadatos) a urânio, cobre, chumbo, zinco, fosfatos ou titânio ferroso, como no caso da cavancite, carnotite, vanadinite, patronite ou roscoelite. Muitos compostos de vanádio são, por outro lado, constituintes principais da matéria orgânica fóssil, principalmente óleos de crude, carvão e fósseis carbonáceos (Nriagu, 1998; Greenwood & Earnshaw, 1997). A erosão da crosta terrestre e a actividade vulcânica constituem as principais fontes de vanádio natural, enquanto que a combustão dos combustíveis fósseis ricos em vanádio e o uso de pesticidas são a principal fonte antropogénica do elemento. Isto não só leva à existência de vanádio no ar e solos (respectivamente) como também nos oceanos, onde é rapidamente solubilizado ou sedimentado. Uma vez incorporado em organismos marinhos ou alimentos provenientes do solo tratado quimicamente, torna-se disponível para transferência através da cadeia alimentar (Sitprija & Eiam-Ong, 1998; Eady, 1995).

A vasta utilização industrial dos compostos de vanádio (indústria química, agricultura, energia atómica, tecnologia espacial e alta tecnologia), as elevadas concentrações existentes nos óleos de crude e a sua combustão contribuíram para o aumento significativo deste elemento no meio ambiente e, conseqüentemente, para um renovado interesse pelo elemento e pelos problemas ambientais por ele induzidos (Sadiq *et al.*, 1992; Etchevery & Cortizo, 1998).

2.2. Propriedades Físico-Químicas Gerais de Vanádio

As propriedades gerais dos elementos químicos dependem, em última análise, da configuração electrónica do seu átomo. A variabilidade encontrada no comportamento químico do Vanádio, um membro da 1ª série de transição, poderá residir, então, na sua configuração ($[Ar] 3d^2 4s^2$), que lhe permite formar estados de oxidação – 2, –1, 0, +2, +3, +4 e +5, sendo +3 (forma vanádica), +4 (forma de vanadilo) e +5 (forma de vanadato) os estados geralmente encontrados em solução aquosa. Na presença de O_2 , ar ou agentes oxidantes, este elemento encontra-se sempre no estado de oxidação +5; o estado de oxidação +4 é, contudo, a forma mais estável e pode ocorrer combinada com agentes redutores matéria orgânica fóssil, principalmente óleos de crude, carvão e fósseis carbonáceos (Chang, 1994; Silva & Williams, 1997; Crans, *et al.*, 1998; Sitprija & Eiam-Ong, 1998).

Os compostos de vanádio podem formar dois grupos distintos: um, de oxianióes e oxicatiões (exemplo: VO_4^{2-} , VO^{2+} e VO_2^+) e outro, formado por compostos associados a centros iónicos contendo S (exemplo, VS_4^{3-} , VS^{2+} e $VSSH^+$); este último, terá sido maioritário nas condições redutoras da terra primitiva (Silva & Williams, 1997; Sitprija & Eiam-Ong, 1998). Frise-se o facto de que é preciso ter sempre em conta que as espécies de vanádio tendem a mudar com a variação das condições do meio, possuindo cada uma determinadas propriedades físico-químicas. E, com efeito, a química do vanádio é extremamente rica, devido à sua flexibilidade (que o leva a adoptar inúmeras coordenações geométricas), por um lado, e à sua química redox extensiva, em vários ambientes, seja no estado sólido, seja em solução aquosa (Crans, *et al.*, 1998).

2.3. Propriedades Químicas de Vanádio em Solução Aquosa

A química de Vanádio em solução aquosa é extremamente complexa, devido à facilidade que este elemento tem em assumir diferentes números e geometrias de coordenação, que podem alterar-se mediante uma simples variação do pH, da concentração ou da quantidade de agentes oxidantes, redutores, e quelantes presentes (Crans *et al.*, 2004). A figura I.1 ilustra algumas das geometrias adoptadas por compostos de vanádio; a coordenação tetraédrica, bipiramidal trigonal e octaédrica são as geometrias mais frequentemente encontradas em solução aquosa (Stankiewicz *et al.*, 1995).

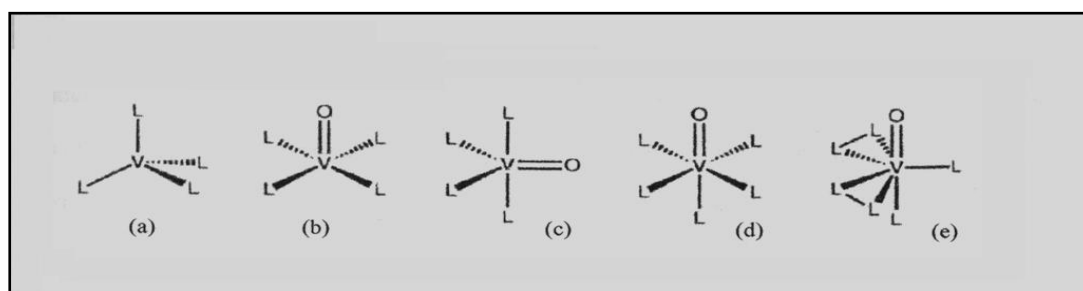


Figura I.1 - Geometrias idealizadas de compostos de vanádio com diferentes números de coordenação, onde L- Ligando e V – vanádio. a) tetraédrica, b) pirâmide quadrangular, c) bipirâmide trigonal, d) octaédrica e e) bipirâmide pentagonal (Crans, 1994).

Em solução aquosa, os estados de oxidação mais comuns e estáveis vão de +5 a +2 e, desses, apenas o V(III), V(IV) e V(V) são biologicamente importantes; o V(II) é demasiado redutor para existir em qualquer organismo vivo conhecido. Em condições fisiológicas, o vanádio encontra-se maioritariamente nos estados de oxidação V(IV) e V(V); o ião vanádico, V(VIII), parece ocorrer apenas nos vanadócitos de tunicados (Baes & Mesmer, 1976; Chasteen, 1983; Crans *et al.*, 1998). Tanto o vanadilo (vanádio (IV)) como o vanadato (vanádio (V)) apresentam vários equilíbrios de protonação em solução aquosa, para além de poderem sofrer reacções de hidratação, redox e oligomerização complexas, dependendo dos compostos presentes em solução, o que resulta, assim, na formação e interconversão de uma multitude de complexos (Crans, 2004).

2.3.1. Vanádio tetravalente (IV): o ião vanadilo

A química do vanádio (IV) em solução aquosa está centrada no catião oxovanádio, ou vanadilo (VO_2^+), que forma complexos penta e hexa-coordenados e apresenta uma cor azulada. Este catião permanece estável apenas em meios ácidos, pelo que, em soluções com valores de pH superiores a 3 é rapidamente oxidado. Adicionalmente, o ião vanadilo forma-se facilmente a partir de vanádio (V) na presença de qualquer agente redutor em solução aquosa, como o ácido ascórbico, a glutathiona reduzida (GSH), a cisteína ou o NADH,

compostos intracelulares muito comuns; por este motivo é, muito provavelmente, o principal estado de oxidação do vanádio existente nos fluidos intracelulares dos sistemas biológicos (Crans, 1998; Rehder, 2003).

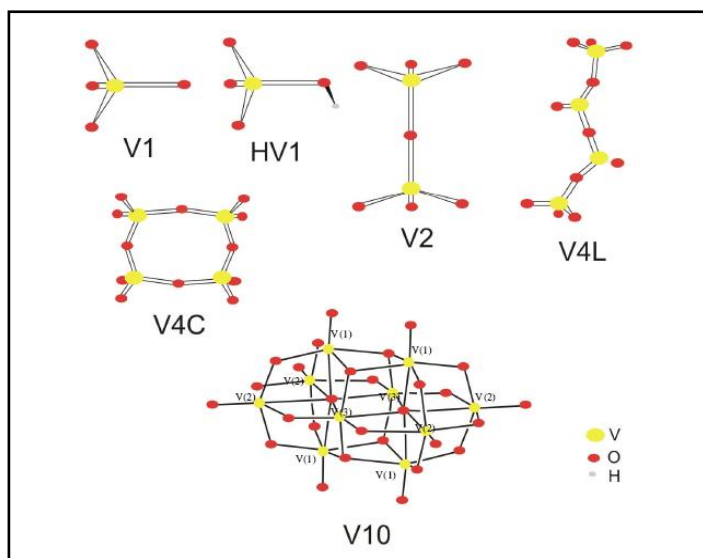
Capaz de formar complexos estáveis com moléculas como o ATP, PPI, catecolaminas e aminoácidos livres, e, possuindo ainda uma elevada afinidade para certas proteínas (como a hemoglobina e transferrina), o vanádio tetravalente (IV) está, assim, protegido da oxidação a vanádio pentavalente (V), facto adicional que lhe permite existir dentro da gama de pHs intracelulares. Contudo, a sua presença sob a forma de um catião livre torna-se deste modo improvável nos fluidos intracelulares, excepto, possivelmente, no ambiente ácido dos lisossomas celulares (Chasteen, 1983; Silva & Williams, 1997).

2.3.2. Vanádio pentavalente (V): o ião vanadato

O vanádio pentavalente, V(V), é a forma redox mais estável do metal, e num largo intervalo de pH. Se, por um lado, a pH ácido existe o catião cis-VO^{2+} , que se complexa com agentes quelantes (como o EDTA), por outro, para valores iguais ou superiores aos do pH fisiológico surgem os vanadatos, formas aniónicas que tendem a originar complexos polinucleares (Chasteen, 1983; Crans, 1994). Em acréscimo, tendem a sobrevir em simultâneo vários equilíbrios de protonação e de oligomerização, bem como várias reacções redox entre os aniões (Crans *et al.*, 2004; Ramasarma, 2007). Neste sentido, as soluções aquosas de V(V) são extremamente complexas e implicam a coexistência de uma série de oxovanadatos, cuja identidade e abundância depende da concentração total do elemento, do pH, da força iónica, temperatura e presença de outras substâncias no meio (Pettersson *et al.*, 1985; Rehder, 1991; Aureliano & Madeira, 1998; Crans *et al.*, 2004).

Em condições neutras e na gama de concentrações mais frequentemente empregues em estudos bioquímicos (μM a mM), as espécies de polioxovanadatos predominantes numa solução aquosa são o monómero (V_1), o dímero (V_2), o tetrâmero cíclico (V_4), o pentâmero cíclico (V_5). Estes polioxovanadatos, em solução, atingem o equilíbrio muito rapidamente, dado que a troca entre átomos de vanádio e de oxigénio se dá em milisegundos (Crans *et al.*, 1990; Tiago *et al.*, 2004). A figura I.2 expõe as estruturas propostas para estes oligómeros de vanadato.

Figura I.2 – Estruturas de algumas espécies de vanadato: V1 (VO_4^{3-}), HV1 (HVO_4^{2-}), V2 ($\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$), V4L ($\text{V}_4\text{O}_{13}^{6-}$), V4C ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$), V10 ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$). Os átomos são representados por círculos amarelos (vanádio), círculos vermelhos (oxigénio) e cinzentos (hidrogénio). As estruturas V1, HV1, V2, V4L e V4C foram adaptadas de Aureliano *et al.* (1993) e a V10 de Howarth, & Jarold (1978).



O vanadato monomérico existe, dependendo do pH, em três formas principais (VO_4^{3-} , HVO_4^{2-} e $\text{H}_2\text{VO}_4^{2-}$), formadas a partir da protonação do chamado ortovanadato VO_4^{3-} ; na maioria das condições ambientais, e em pHs fisiológicos, o monómero existe essencialmente como $\text{H}_2\text{VO}_4^{2-}$ (Baes & Mesmer, 1976; Petterson *et al.*, 1985; Crans *et al.*, 1990). Este monómero, pode oligomerizar-se e originar o dímero $\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$ (as unidades V_2O_7 costumam ser conhecidas por “pirovanadatos”), vulgarmente tido como um análogo de pirofosfato (PPi), apesar da falta de evidências mais concretas da sua estrutura em solução aquosa. Uma vez formado o dímero, é induzida a derivação do vanadato tetramérico ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$), a espécie maioritária em soluções relativamente concentradas, e, finalmente, da espécie pentamérica cíclica ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$) (Baes & Mesmer, 1976; Crans, 1994). Em solução aquosa, a espécie tetramérica tem a formula molecular $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ e a sua estrutura raios-X descreve-a como cíclica, calculando-se que seja do tipo adamantano; as estruturas de raios-X para as espécies $\text{HV}_4\text{O}_{12}^{3-}$ também apontam para geometrias cíclicas (Tracey *et al.*, 1988). O oxovanadato pentamérico ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{3-}$), é outra espécie que se pressupõe deter uma disposição cíclica; contudo, a sua estrutura ainda não foi resolvida (Crans, 1994a).

Apesar de as espécies V_1 , V_2 , V_4 e V_5 constituírem os principais vanadatos presentes em solução aquosa, podem-se gerar outros oligómeros, dos quais se destaca, em termos de significado biológico e bioquímico, o decavanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) (Aureliano & Gândara, 2005; Tiago *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2006; Tiago *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2007; Tiago *et al.*, 2008; Aureliano & Crans, 2009). A espécie decamérica, que se arranja num acervo (o chamado *cluster*) de dez átomos de vanádio com coordenação octaédrica distorcida, é a predominante em soluções ácidas e moderadamente ácidas (pH 2-6), bem como nas condições em que a concentração de vanadato é superior a 100 μM (Stankiewicz *et al.*, 1994; Ramasarma, 2007).

Os aniões de decavanadato são significativamente mais estáveis que os oligómeros mais pequenos, que são lábeis em solução aquosa, especialmente na gama de pH fisiológico; o decâmico, bem como os seus derivados, pode apresentar tempos de meia-vida mais elevados (até cerca de 2 dias) pois, contrariamente aos pequenos oligómeros, a sua velocidade de hidrólise é lenta (Pope, 1983; Khan *et al.*, 1992; Avecilla, 2007). No estado sólido, esta espécie oligomérica adquire a mesma configuração e, em determinadas condições, organiza-se em estruturas supramoleculares (conhecendo-se quatro arranjos supramoleculares diferentes), mantidas por forças Van der Waals, interações electrostáticas e ligações de hidrogénio que se estabelecem entre cada unidade decamérica (Avecilla, 2007).

Grande parte da importância biológica que se atribui ao vanádio tem sido associada ao ortovanadato (VO_4^{3-}), que se sabe ser um análogo estrutural e electrónico do ortofosfato (PO_4^{3-}); as três espécies protonadas do monómero de V(V) aparentam, inclusivamente, ser análogas dos derivados de fosfato correspondentes (Crans *et al.*, 1990; Plass, 1999). Crê-se que o ortovanadato poderá coordenar-se tetraedricamente de um modo semelhante ao estado fundamental do fosfato ou, ainda, apresentar uma geometria bipiramidal trigonal penta-coordenada, tal como acontece com o estado de transição de PO_4^{3-} . Presume-se que seja esta a razão pela qual os vanadatos são capazes de mimetizar as acções dos fosfatos nas reacções bioquímicas (Greenwood & Earnshaw, 1997; Barceloux, 1999; Plass, 1999). Se a isto se juntar o facto de o ácido vanádico (H_3VO_4 , $\text{pK}_a = 3,5; 7,8; 12,5$) ser mais fraco do

que o ácido fosfórico (H_3PO_4 , $\text{pK}_a = 1,7; 6,5; 12,1$), justifica-se, parcialmente, a existência de uma ligação preferencial do vanadato às enzimas, em detrimento do fosfato (Chasteen, 1983).

No entanto, até muito recentemente, desconsiderava-se a especiação de vanádio em solução, facto que levou a que muitos dos efeitos biológicos atribuídos ao monómero de vanadato resultassem, na realidade, da interacção deste com outros polioxovanadatos e/ou da presença da espécie decamérica, que pode até ser a mais estável em ambiente biológico (Aureliano & Gândara, 2005; Avecilla, 2007; Aureliano & Crans, 2009).

2.4. Vanádio em Sistemas Biológicos

2.4.1. Bioacumulação e compostos biogénicos contendo vanádio

Apesar de o vanádio ser vestigial na maioria dos seres vivos, conhecem-se organismos, como os tunicados e alguns cogumelos, que acumulam compostos de vanádio em quantidades consideráveis; para estes seres, o elemento é um nutriente essencial. As primeiras descrições de funções biológicas atribuídas ao vanádio foram reveladas na análise de tunicados (como os da espécie *Ascídea nigra*), ao se verificar que estes organismos são capazes de acumular grandes quantidades de vanádio, e em concentrações que chegam a atingir 1 M (a maior concentração conhecida de vanádio num sistema vivo). Os tunicados da classe ascídea possuem metalo-proteínas, conhecidas como vanabinas, que se ligam especificamente ao vanádio, capturando-o nas formas HVO_4^{2-} ou H_2VO_4 (os ortovanadatos presentes na água do mar), reduzindo-o a V(III) com o auxílio do agente redutor NADPH e transportando-o para o interior das células sanguíneas, sob a forma de V^{3+} e VO^{2+} .

Alguns cogumelos venenosos do género *Amanita* (*A. muscaria*, *A. regalis* e *A. velatipes*), apresentam a particularidade de concentrar vanádio no estado de oxidação (IV), sob a forma de amavadina (Figura I.3), um complexo octa-coordenado que se une a dois ligandos tetradentados derivados de ácido N-hidroximino-2,2-dipropiónico, $\text{H}_3(\text{HIDPA})$. Apesar de exibir características únicas, a função concreta deste composto natural de vanádio, todavia, permanece por esclarecer, pensando-se que poderá constituir um sistema de protecção contra a danificação de tecidos (mimetizando a peroxidase por forma a potenciar a regeneração desses tecidos), por um lado, e um elemento tóxico, por outro, para a protecção do próprio cogumelo contra predadores naturais (Chasteen, 1983; Bayer, 1995; Berry *et al.*, 1999; Li & Oberlies, 2005). A amavadina é um dos complexos de vanádio mais estudados, presentemente, tendo-se sintetizado, inclusive, uma sua forma análoga, bis (N-hidroxilamidoiminoacetato) de vanádio(IV), ou HAIDA-V(IV) (Figura I.3). Este análogo de amavadina possui um ligando $\text{H}_3(\text{HIDPA})$ com uma elevada afinidade para vanádio tetravalente, facto pelo qual é um composto hidrolítica e oxidativamente estável a pH neutro (Aureliano & Crans, 2009).

Um outro organismo com a capacidade de acumular vanádio, é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada no fabrico de cerveja, que armazena V(IV) em concentrações milimolares e em compartimentos específicos (Bode, 1990). Até em plantas superiores se observou que o vanádio é absorvido do solo após uma redução de V(V) a

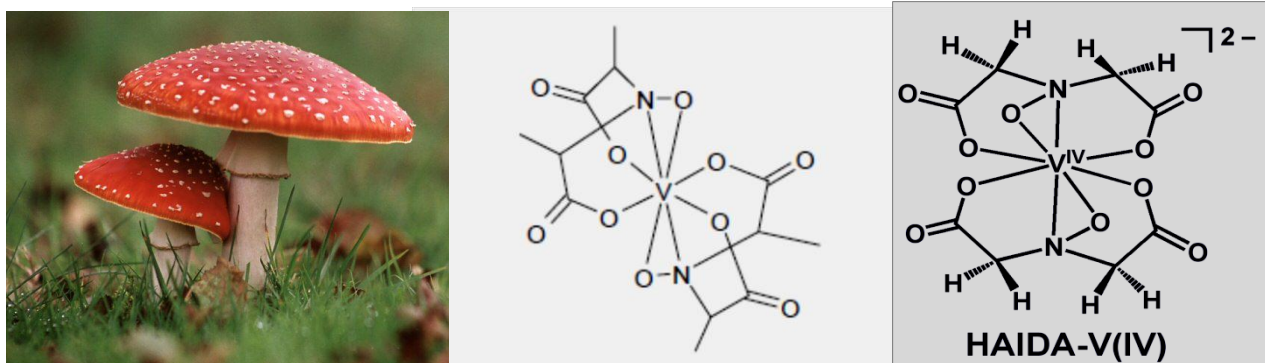


Figura I.3 – Compostos biogénicos contendo vanádio: cogumelo da espécie *Amanita muscaria* (à esquerda) e estrutura de Amavadina (ao centro) (figura de *Amanita* retirada da internet; Li & Oberlies, 2005; Aureliano *et al.*, 2008).

V(IV), por complexação com um componente existente na parede celular, acumulando-se essencialmente nas raízes (Pope *et al.*, 1983). Já nos animais em geral, o vanádio está maioritariamente presente nos tecidos hepático e esquelético (Etcheverry & Cortizo, 1998). Recentemente, identificou-se um outro bioacumulador de vanádio, na minhoca *Pseudopotamilla ocellata* e em outros anelídeos tubiformes (Ishii & Nakai, 1995). Nos peixes, por seu turno, o vanádio é incorporado a partir da água ou dos alimentos; pensa-se que o fígado e os rins sejam os principais acumuladores de vanádio na espécie *Anguilla anguilla*, (enguia comum) ao passo que no caso de *Carassius auratus* (peixinho dourado), o núcleo e as mitocôndrias apresentam maior taxa de acumulação (Eady, 1995). As espécies *Sparus aurata* (dourada) e *Halobatrachus didactylus* (charroco) são susceptíveis à acumulação de vanádio nas mitocôndrias do músculo cardíaco, embora se tenha igualmente demonstrado que o metal se acumula no plasma do primeiro espécime e se tenha detectado a sua presença no fígado e rins do segundo, após uma exposição aguda (Borges *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2006).

Para além de bioacumuladores naturais, conhecem-se organismos onde o vanádio existe como cofactor de haloperoxidases e nitrogenases. As haloperoxidases representam uma larga gama de enzimas que catalizam a oxidação de haletos (X⁻) na presença de peróxido de hidrogénio; algumas destas enzimas contêm um grupo prostético, ao passo que outras possuem um complexo de V(V) ligado a N e O (Vilter, 1995). As algas vermelhas e castanhas possuem haloperoxidases associadas biologicamente a vanádio, actualmente conhecidas como haloperoxidases dependentes de vanádio (HVPO), como é o caso da cloroperoxidase de *Carrularia inaequalis* (Cl-VPO). Nas H-VPO, o vanádio presente no local activo da enzima é pentavalente e está directa e axialmente ligado a um resíduo de histidina, encontrando-se “embebido” na proteína e coordenado numa extensa rede de pontes de hidrogénio (Silva & Williams, 1997; Crans *et al.*, 1998). As nitrogenases, por seu turno, são metaloenzimas importantes do ponto de vista ecológico, uma vez que catalisam a conversão de N₂ a NH₃ e são, deste modo, responsáveis pelo ciclo biológico do azoto, processo que está dependente da fixação do N₂. Actualmente, conhecem-se mecanismos baseados numa nitrogenase contendo ferro e numa outra, portadora de agrupamentos polinucleares e centrais de Fe-S com um átomo de vanádio coordenado, exactamente como acontece nas azoto-bactérias (Robson *et al.*, 1986).

2.4.2. Absorção, excreção e acumulação de vanádio em humanos e animais superiores

Os mecanismos de absorção, excreção e acumulação de vanádio nos sistemas vivos ainda não estão totalmente compreendidos, apesar de se conhecerem as suas vias principais nos mamíferos superiores. A absorção dos compostos de vanádio depende tanto da sua solubilidade como da via de entrada; em condições normais, a absorção de sais do metal pode tomar lugar por inalação, pelo tracto gastrointestinal e ainda pela pele. Nos pulmões, a absorção é facilitada, mas no tracto gastrointestinal, em contraste, os sais de vanádio são fracamente absorvidos; de notar que o V(V) é cerca de 3 vezes mais facilmente absorvido do que o V(IV). A pele é uma via de entrada menor, especialmente devido à fraca solubilidade do vanádio metálico (Erdmann *et al.*, 1984; Mukherjee, *et al.*, 2004). Uma vez no estômago, a maior parte do vanádio ingerido adopta a forma catiónica de vanadilo, que permanece no ambiente alcalino do duodeno; o vanadilo pode depois ser oxidado novamente a vanadato para ser absorvido por um sistema de transporte aniónico desconhecido (Mukherjee, *et al.*, 2004). Assim que o vanádio atinge a corrente sanguínea, é novamente reduzido a vanadilo ao se ligar às proteínas transferrina e albumina, sendo rapidamente transportado (em uma hora ou meia hora) na direcção de vários tecidos. O vanádio é então armazenado, especificamente e de modo diferencial, em determinados órgãos (Etcheverry & Cortizo, 1998; Barceloux, 1999).

O tipo de administração ou exposição ao vanádio parece influenciar a distribuição tecidular de vanádio, verificando-se uma relação directa entre a zona do organismo onde foi efectuada a administração e o aumento da concentração de vanádio ao fim de um curto espaço de tempo. Em ratos, por exemplo, após vários dias de exposição o vanádio é acumulado preferencialmente no tecido ósseo, seguido do fígado e rim (Rochin *et al.*, 1980); as maiores concentrações de vanádio encontram-se nos ossos, rins, fígado e, ainda, pulmão; o cérebro parece reter a menor quantidade; os ossos e os dentes têm, por seu turno, a capacidade de reter grandes quantidades de vanádio, chegando a constituir reservatórios. Em condições fisiológicas normais, a quantidade total de vanádio no organismo humano pode atingir cerca de 100 μM , com muitos tecidos contendo menos de 10 nanograma de vanádio por grama de tecido, uma vez que pouco do metal é retido pelo organismo (Etcheverry & Cortizo, 1998; Mukherjee, *et al.*, 2004).

Muito do vanádio ingerido que não é absorvido é excretado pelas fezes; a urina e a bÍlis constituem a principal via de eliminação do vanádio que foi absorvido no estômago (e que, em caso último, poderá ser excretado pelas fezes). A excreção do vanádio é extremamente rápida, pois o rim é capaz de excretar 40 a 60% do metal 1 a 3 dias após a absorção; na urina, o vanádio tem um tempo de meia vida de 20 a 40 horas. Se o composto, pelo contrário, tiver sido inalado, a excreção torna-se bifásica, com uma etapa inicial de eliminação rápida (10-20 horas) seguida de uma fase longa e terminal (40-50 dias) (Barceloux, 1999; Mukherjee, *et al.*, 2004).

2.4.3. Efeitos fisiológicos e toxicológicos de vanádio

Cada composto de vanádio tem um número de coordenação, estabilidade e labilidade específicas, podendo assim responder e actuar de diversas formas a nível fisiológico. Os diversos efeitos fisiológicos induzidos por

vanádio nos animais estão bem documentados em diversos estudos e artigos de revisão; entre esses efeitos, contam-se: a mineralização dos dentes e ossos (possuindo um papel no metabolismo do cálcio, portanto); mimetização e potenciação de factores de crescimento (função na reprodução e desenvolvimento); promoção da biossíntese de lípidos (colesterol e triglicéridos), com posterior inibição da sua acumulação nos vasos sanguíneos e no Sistema Nervoso Central (SNC); estimulação do consumo de glicose pelo músculo e síntese de glicogénio pelo fígado (capacidade para mimetizar e potenciar os efeitos celulares da insulina); indução da produção de hemácias; interferência na força de contracção do músculo cardíaco-vascular; implicação na transdução de sinais celulares, (regulando a actividade de segundos mensageiros); inibição e activação de inúmeras enzimas (Chasteen, 1983; Zaporowska & Scibior, 1998; Etcheverry & Cortizo, 1998; Aureliano & Madeira, 1994; Sitprija & Eiam-Ong, 1998; Barceloux, 1999; Mukherjee, *et al.*, 2004; Etcheverry & Barrio, 2007; Molinuevo e Cortizo, 2007; Tiago *et al.*, 2007; Aureliano, 2007; Aureliano *et al.*, 2008; Aureliano & Crans, 2009; etc.), entre muitos outros. Este metal de transição pode, ainda, modular vários genes, activando-os; entre eles estão o gene da MIP-2 (*macrophage inflammatory protein*), o do factor alfa de necrose tumoral (TNF- α), da interleucina 8 e do factor p53 da apoptose (Mukherjee, *et al.*, 2004).

A privação nutricional de vanádio tem sido relacionada com várias deficiências, em galinhas e ratos, descrevendo-se perturbações no crescimento (retardamento), malformações ósseas, casos de infertilidade e distúrbios no metabolismo lipídico (aumento dos níveis de colesterol no plasma), entre outros. Deste modo, este elemento vestigial pode ser considerado essencial em alguns animais, devido às suas diversas acções fisiológicas e bioquímicas (Sitprija & Eiam-Ong, 1998; Mukherjee, *et al.*, 2004). O seu papel como oligoelemento essencial em seres humanos, contudo, não está ainda demonstrado, não se conhecendo indícios de deficiências nutricionais causadas por vanádio, nem a existência de proteínas ou enzimas que contenham vanádio, em humanos e em mamíferos superiores (Erdmann *et al.*, 1984; Sitprija & Eiam-Ong, 1998).

Embora em concentrações vestigiais (1 a 10 nM) o vanádio exerça diversos efeitos benéficos nos organismos, para concentrações superiores torna-se tóxico (Nechay, 1984). Os efeitos tóxicos do vanádio parecem resultar, provavelmente, da sua capacidade de produzir espécies reactivas de oxigénio, sabendo-se que este elemento é capaz de inibir, a fosforilação oxidativa, mediante a modulação das actividades das enzimas mitocondriais. No geral, pode-se dizer que a toxicidade dos compostos de vanádio em mamíferos é baixa, variando com a natureza do composto e aumentando proporcionalmente à sua valência; os compostos pentavalentes são os mais tóxicos. Verifica-se, por outro lado, que a toxicidade é elevada quando o composto de vanádio é injectado, moderada quando é inalado e baixa quando ingerido (Barceloux, 1999).

A sintomatologia de toxicidade associada ao vanádio, em vários mamíferos (inclusive, o Homem), inclui a coloração esverdeada da língua, paladar metálico, diarreia, câibras, fadiga, irritação da pele e mucosas, anemia, palpitações cardíacas, bronquite, pneumonia e distúrbios no SNC, entre outros (Thompson, *et al.*, 1998). A maioria dos efeitos clínicos promovidos por compostos de vanádio resulta de uma acção local nos olhos e no tracto respiratório superior; a irritação das vias aéreas conduz a rinites, hemorragias nasais, conjutivites, tosse e dores no peito. Após exposições severas e prolongadas, pode-se desenvolver bronquite, pneumonia e, pensa-se, asma. Podem surgir outros sintomas não-específicos, como dores de cabeça, palpitações, fraqueza, vertigens e

depressões, embora a toxicidade neurológica não esteja ainda consistentemente demonstrada (Thompson, *et al.*, 1998).

Estudos toxicológicos de vanádio no sistema cardiovascular indicaram que este possui efeitos inotrópicos tanto positivos como negativos (dependendo da concentração e do composto), induz vasoconstrição em vários órgãos e a diminuição da força de contracção ventricular, bem como várias modificações cardiovasculares fisiológicas; em peixes, verificou-se também um efeito vasoconstritor nas brânquias (Bell *et al.*, 1979; Carmignani *et al.*, 1991). Sendo um dos órgãos alvo de acumulação de vanádio, o rim apresenta toxicidade ao vanádio dependendo do modo como este é administrado: a via parenteral conduz aos valores mais tóxicos; o impacto do vanádio no funcionamento dos rins também depende da espécie: enquanto que nos ratos se verifica uma diurese acentuada, no cão ou no gato a filtração glomerular decresce (Thompson, *et al.*, 1998).

A acção tóxica dos compostos de vanádio na função reprodutora inclui toxicidade nas gónadas, com perturbações na espermatogénese, mobilidade dos espermatozóides e conseqüente decréscimo na fertilidade, em ratos; nos humanos, não se conhecem anomalias reprodutivas promovidas por este elemento. Os animais em gestação são mais susceptíveis à toxicidade potencial de vanádio, uma vez que este pode atravessar a placenta e acumular-se no feto, levando à diminuição do seu tamanho e ao aumento da incidência de abortos e reabsorções; verifica-se ainda o desenvolvimento de uma teratogenicidade que se traduz pelo aparecimento de fendas palatinas (Thompson *et al.*, 1998; Barceloux, 1999). O efeito mutagénico e teratogénico potencial dos compostos de vanádio tem sido extensivamente estudado, sabendo-se hoje que este elemento não é clastogénico e é apenas ligeiramente mutagénico. A sua carcinogenicidade não foi ainda demonstrada no homem e outros mamíferos, embora este elemento de transição interfira com a mitose e a distribuição dos cromossomas (Léonard & Gerber, 1994); pelo contrário, os compostos de vanádio exibem actividade anti-tumoral (Mukherjee, *et al.*, 2004).

A acção fisiológica do vanadato não se restringe à espécie monomérica de vanadato, como se pensou durante muito tempo. Com efeito, pode dever-se também a espécies condensadas presentes na gama de pH fisiológico para concentrações de vanadato mais elevadas (μM – mM). Existem mesmo evidências de que espécies oligoméricas diferentes possam ter alvos e tipos de modulação enzimática diferentes. Nesse sentido, esclarecer os vários mecanismos pelos quais as diferentes espécies oligoméricas de vanadato podem actuar torna-se importante não só para a elucidação de alguns aspectos moleculares dos processos enzimáticos, como também para o aumento do conhecimento da bioquímica celular deste elemento e dos seus potenciais efeitos biológicos (Amado *et al.*, 1993; Crans, 1994; Stankiewicz *et al.*, 1995).

2.5. Acção Bioquímica e Molecular de Vanádio

Nos fluidos corporais e extracelulares, os compostos de vanádio existem predominantemente como vanadatos, que entrarão nas células através de canais iónicos inespecíficos. Intracelularmente, irão ser reduzidos (ganhando um electrão) mediante a acção da glutathiona celular (GSH) e de outros compostos com grupos $-\text{OH}$,

como pentoses, hexoses ou etanolaminas e, ainda, catecolaminas, ascorbatos e equivalentes redutores (NADH, NADPH) (Nriagu, 1998).

2.5.1. Metabolismo celular de vanádio

Intracelularmente, o metal tende a estar presente na forma de vanadilo (VO^{3+}), ligado à glutathiona, à transferrina (uma proteína transportadora de ferro), a catecolaminas, e a outros pequenos péptidos; extracelularmente, no plasma, existe como monovanadato (H_2VO_4^-) e está ligado, normalmente, à transferrina do soro e à hemoglobina. Apesar de uma pequena parte de V(IV) ser reoxidado a V(V), a complexação da espécie reduzida impede uma acumulação de vanadatos, impedindo acções inibitórias, que poderiam causar severos danos celulares) (Chasteen, 1983; Zaporowska & Scibior, 1998). A bio-redução de vanádio (V) a vanádio (IV) parece constituir um mecanismo natural de destoxificação celular, na medida em que o vanadilo é menos tóxico para a célula (Baran, 1998).

Como se pode deprender, o vanádio é susceptível de provocar inúmeras mudanças bioquímicas nas células, afectando os processos de fosforilação e desfosforilação de proteínas, participando na formação de radicais livres e regulando muitas actividades enzimáticas (através da inibição ou activação de enzimas) (Crans, 1994a). Sendo um forte inibidor da maioria das ATPases e fosfatases, e um regulador de inúmeras actividades enzimáticas, o metal de transição tem o alcance para participar num número praticamente ilimitado de eventos celulares, nos quais se inclui o transporte e metabolismo da glicose, o transporte de iões e aminoácidos, a síntese de glicogénio, a transcrição genética, a síntese de proteínas, a síntese de DNA, a expressão de oncogenes, a diferenciação celular e muitos outros, eventos que a hormona insulina também medeia (Sitprija & Eiam-Ong, 1998; Zaporowska & Scibior, 1998). A figura I.4 sintetiza o metabolismo celular de vanádio.

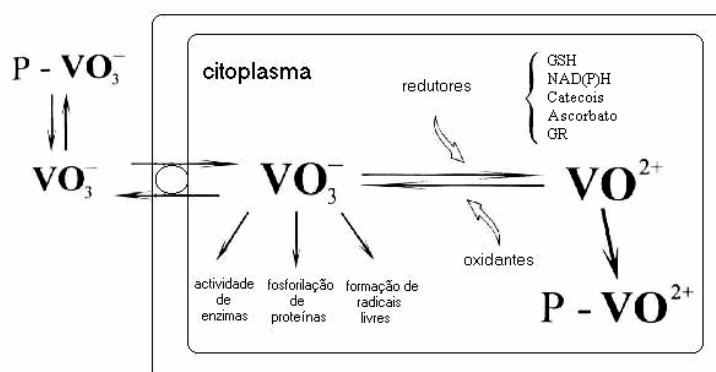


Figura I.4 – Transporte de vanádio para a célula e seus efeitos nos processos intracelulares. Legenda: P, proteína; GSH, glutathiona reduzida; GR, glutathiona redutase (adaptado de Zaporowska & Scibior, 1998).

O vanádio tem também capacidade para oxidar o NADPH e outros agentes redutores intracelulares, gerando radicais livres de oxigénio; a peroxidação lipídica aumenta, mas a actividade de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase e a catalase diminui. Daí que a toxicidade do metal pareça derivar, pelo menos em parte, destas propriedades pro-oxidantes (como já se referiu anteriormente), quando associadas a uma absorção de quantidade elevadas de compostos de vanádio no organismo (Byczkowski & Kulkarni, 1998).

2.5.2. Modulação geral de actividades enzimáticas por vanádio

A inibição da ribonuclease pelo vanádio foi a primeira referência da acção deste metal na actividade de uma enzima (Lindquist *et al.*, 1973). Posteriormente, verificou-se que as fosfatases ácida e alcalina, que se supõem passarem por um intermediário fosforilado, são fortemente inibidas por vanádio; esta descoberta sugeriu o uso deste metal como sonda cinética de mecanismos enzimáticos envolvendo a hidrólise de ligações fosfo-éster (Van Etten *et al.*, 1974). Todavia, estes estudos receberam pouca importância, até Cantley e os seus colaboradores identificarem, em 1977, uma “impureza” no ATP comercial da Sigma (preparado a partir de músculo esquelético de cavalo): tratava-se de vanádio (V), que concomitantemente se descobriu ser também um inibidor da Na^+, K^+ -ATPase (Josephson & Cantley, 1977). Desde então, o metal tem sido extensivamente estudado e utilizado como ferramenta, não só na análise do mecanismo da Na^+, K^+ -ATPase, como também de diversas outras enzimas, entre as quais a Ca^{2+} -ATPase e a ATPase da miosina do músculo esquelético (Aureliano & Madeira, 1994; Aureliano & Madeira, 1998; Aureliano, 2000; Tiago *et al.*, 2002; Tiago *et al.*, 2004; Aureliano & Gândara, 2005; Tiago *et al.*, 2007; Aureliano *et al.*, 2008; Aureliano & Crans, 2009).

Enzimas como as ATPases (de canais iónicos, fosfoenzimas transportadoras, da dineína, da miosina) e as fosfatases (fosfatase da tirosina, fosfatase ácida e alcalina), bem como a cinase de fosfofrutose, ciclase de adenilato, esterase de colina e catalase, entre outras, são fortemente inibidas por vanadatos (Etcheverry & Cortizo, 1998). Estão bem documentados os casos em que as transferases e hidrolases de fosfato aceitam ortovanadato como análogo do ortofosfato, formando o complexo enzima-vanadato que inibe as ATPases do tipo P (Hasselbach & Medda, 1983; Aureliano & Madeira, 1998). De entre as enzimas que são estimuladas pelo elemento, contam-se a maioria das cinases (por exemplo, a cinase da tirosina) (Nechay, 1984); a desidrogenase da glucose-6-fosfato, por exemplo, que leva à redução da concentração de glucose, fá-lo muito mais eficientemente se estiver na presença de vanadato, através da formação de ésteres de vanadato análogos aos ésteres de fosfato envolvidos naquela reacção catalítica (Crans *et al.*, 2004). Outros exemplos de activação são o da mutase de fosfoglicerato e o da fosfatase de fosfoglicerato, estimuladas na presença da espécie dimérica de vanadato (Crans *et al.*, 1998).

A modulação da actividade enzimática por vanádio está relacionada com o número de coordenação do metal, pondo-se a hipótese de este actuar como um forte estado de transição ou de mimetizar cofactores e/ou substratos; pode ainda estar envolvido em ligações de hidrogénio, interacções electroestáticas e interacções estéricas (Rehder & Jantzen, 1998; Crans *et al.*, 2004). A interacção directa de V(V) com as enzimas tem sido associada à analogia estrutural do ião VO_4^{3-} com o fosfato; assim, virtualmente todas as enzimas envolvidas em reacções de hidrólise de PO_4^{3-} (como é o caso da ATPase da miosina) ou transferência de grupos PO_3^- (como acontece no ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase), poderão aceitar este vanadato como análogo de ortofosfato, através da esterificação do metal com grupos hidroxilo ou fosfato (Goodno, 1982; Pick, 1982; Chasteen, 1983). Se o intermediário destas reacções se encontrar penta-coordenado numa estrutura bipiramidal-trigonal, então, dado que o ião monovanadato, livre ou complexado, pode formar facilmente este tipo de estrutura, obtém-se um análogo do estado de transição do substrato (Crans *et al.*, 1998; Rehder & Jantzen, 1998; Crans *et al.*, 2004).

Para além de afectar processos de fosforilação, a facilidade com que o metal alterna entre os estados de oxidação +4, +5 (e +3), leva à implementação de um possível papel na interacção redox com enzimas contendo resíduos de cisteína, por exemplo, ou com qualquer outro composto orgânico que tenha actividade redox (Rehder, 1999). Um outro tipo de interacção com enzimas envolve a mimetização de interacções proteína-proteína (como acontece com as polimerases e transcriptases). Assim, as diferentes espécies de vanádio que se formam em solução podem apresentar diferentes alvos e tipos de modulação enzimática, devido às diferentes estruturas que são formadas (Crans *et al.*, 1998).

Apesar de a maioria dos efeitos do vanádio nas enzimas tender a ser atribuída à espécie monomérica de V(V) (VO_4^{3-}), mimetizadora de fosfato, pode dizer-se que esta tem a capacidade de exibir actividade biológica através das espécies oligoméricas que dela derivam. Mesmo para concentrações de vanadato muito baixas, existem vestígios de espécies oligoméricas que podem influenciar a actividade enzimática; assim, muitos dos efeitos que se têm atribuído ao monovanadato foram deduzidos, na realidade, sem se ter em conta as outras espécies eventualmente presentes (Aureliano & Madeira, 1994; Pereira, 2003; Tiago *et al.*, 2004).

Com efeito, também existe analogia estrutural entre o divanadato e o pirofosfato, sugerindo que o primeiro interage com locais de ligação de NAD^+ , NADP^+ , FAD^+ e Co-A (Stankiewicz *et al.*, 1995). Já o vanadato tetramérico, por sua vez, não parece exibir tal analogia com substratos ou co-factores, pelo que, durante muito tempo, pensou-se que seria uma forma inactiva de vanadato; em 1990, contudo, demonstrou-se que a enzima desidrogenase de 6-fosfogluconato é inibida competitivamente no que respeita ao substrato e não competitivamente em relação ao co-factor. Actualmente, conhecem-se outras enzimas inibidas por tetra-vanadato, incluindo desidrogenases, isomerasas, aldolases e a fosfolipase específica do fosfatidil-inositol. Na generalidade dos casos, a afinidade da espécie tetramérica para as enzimas é efectivamente modesta, exceptuando no caso da superóxido dismutase (Wittenkeller *et al.*, 1991).

A espécie decamérica ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) é um dos mais fortes inibidores enzimáticos conhecidos. Já em 1973 se referia que este oligómero inibia a adenilatocinase de músculo esquelético de coelho; mais recentemente, o decavanadato revelou-se um forte inibidor não-competitivo da hexocinase e da fosfofrutocinase e, outros estudos referem ainda a cinase dependente de AMPc, que é inibida de uma forma não competitiva em relação ao ATP e de um modo competitivo relativamente ao substrato. A espécie decamérica de vanadato é, inclusive, a que inibe mais fortemente tanto a ATPase da miosina como a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático. Em todos os exemplos conhecidos, o decavanadato parece actuar ligando-se a sítios específicos de ligação de polifosfatos, em enzimas ou receptores, quer no domínio do substrato, quer num local alostérico (Stankiewicz *et al.*, 1994; Aureliano & Madeira, 1998; Pereira, 2003; Tiago *et al.*, 2007; Aureliano & Crans, 2009).

2.6. Efeitos Farmacológicos de Vanádio: Acção Insulino-Mimética e Anti-diabética

No início do século XX, quando o vanádio ainda não suscitava interesse biológico, já era utilizado por médicos franceses no tratamento de patologias diversas como, diabetes, anemia e reumatismo crónico, entre

outras. Contudo, quando a inibição das hidrolases de fosfato pelo metal ficou conhecida, a sua utilização farmacológica começou a ser questionada e as suas aplicações têm-se revelado tão surpreendentes quanto diversas (Shetcher *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2004). Assim, e actualmente, os estudos toxicológicos e fisiológicos de vanádio estão centrados essencialmente nos efeitos fármaco-cinéticos, tóxicos e fisiológicos de compostos com propriedades insulino-miméticas (Heinemann *et al.*, 2003) e como supressor de tumores (como no caso do cancro de cólon) (Kanna *et al.*, 2003), para além do desenvolvimento de substâncias com actividade espermicida (da Cruz *et al.*, 2003). Na literatura, podemos encontrar diversos artigos de revisão sobre as várias aplicações medicinais do vanádio, das quais se destaca o seu efeito o seu efeito anti-carcinogénico e anti-diabético (Evangelou, 2002; Rehder, 2003; Shechter *et al.*, 2003; Crans *et al.*, 2004;).

Com efeito, o vanádio tem-se revelado promissor no tratamento de tumores uma vez que, para além de possuir, por si só, uma actividade anti-tumoral, verificou-se, *in vivo*, que reverte a resistência às drogas anti-carcinogénicas; de notar que a resistência das células malignas às drogas anticarcinogénicas constitui um dos maiores obstáculos da quimioterapia actual. Mais recentemente, a aplicação de polioxometalatos como agentes anti-virais, incluindo a acção anti-VHI, tem sido discutida, baseada na interacção eficaz de decavanadatos com enzimas metabolizadores de fosfato (Pope, 1994; Rehder, 2003; Evangelou, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004).

O uso potencial de compostos de vanádio como substitutos orais da insulina no tratamento de pacientes diabéticos do tipo I e, particularmente, diabéticos do tipo II está hoje bem estabelecido. Estes compostos são comunmente designados de mimetizadores da insulina, na medida em que, tal como a hormona, estimulam a entrada de glicose para as células (com consequente diminuição dos níveis de glicose no sangue), inibem os processos de glicogenólise (degradação de glicogénio em glicose) e de gliconeogénese (formação de glicose), e estimulam a lipogénese (síntese de gorduras) (Etcheverry & Cortizo, 1998; Rehder, 2003; Shetcher *et al.*, 2003; Crans *et al.*, 2004). Os efeitos destes compostos parecem compreender, portanto, a inibição de vários sistemas enzimáticos chave no fígado, músculo e tecidos adiposos, que actuam colectivamente na utilização ou armazenamento celular da glicose, bem como no bloqueio das acções hormonais que se opõem à acção da insulina (Shechter, 1990; Elberg *et al.*, 1998; Sakurai & Tsuji, 1998).

Contudo, mesmo apesar de todos os estudos e efeitos biomédicos notáveis descritos para o vanádio, as companhias farmacêuticas continuam a não demonstrar interesse na utilização do elemento na terapêutica de *Diabetes mellitus*, nomeadamente, do tipo II. Se, por um lado, as terapêuticas orais combinadas são economicamente mais atractivas e seguras para estas grandes empresas (que, a comercializarem estes compostos teriam de lidar com a competição com outros fármacos orais que, embora menos eficazes, já estão instalados no mercado) (Rehder, 2003) por outro, existem ainda obstáculos bioquímicos e fisiológicos que impedem o seu uso clínico seguro. Com efeito, para além dos mecanismos da sua acção anti-diabética permanecerem obscuros, dado o comportamento químico complexo do metal tanto *in vitro* como *in vivo*, trata-se de um elemento com toxicidade associada (em especial para a forma vanadato, relativamente à forma vanadilo), que se acumula e que é retido no tecido ósseo durante mais do que um mês. Para além disso, a sua fraca absorção a nível gastro-intestinal compromete a entrada e eficácia do metal nos tecidos-alvo (Verma *et al.*, 1998; Srivastava *et al.*, 2005; Aureliano *et al.* 2008).

Tentando superar os imporéns do uso terapêutico de vanádio na diabetes, vários grupos de investigação têm-se concentrado e articulado entre si na produção, desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos compostos de vanádio, que potenciem a eficácia insulinomimética do metal, aumentem a sua absorção pelo organismo e que diminuam a toxicidade associada. A busca por novos compostos, juntamente com a capacidade que este elemento tem em se complexar facilmente com inúmeros agentes quelantes presentes nos fluidos orgânicos, levaram ao desenvolvimento de inúmeros complexos orgânicos de vanadato e vanadilo; efectivamente, estes iões metálicos, por possuírem um grupo orgânico associado, passam a exibir níveis exíguos (se não inexistentes) de toxicidade, adquirem uma maior capacidade para atravessar biomembranas, vêem a sua absorção gastro-intestinal melhorada e, ainda, usufruem de uma maior mobilidade intracelular (Verma *et al.*, 1998; Melchior *et al.*, 2001; Sakurai, 2002; Buglyo *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2005; Crans *et al.*, 2006; Thompson & Orvig, 2006; Aureliano *et al.*, 2007; Aureliano *et al.*, 2008; Aureliano & Crans, 2009; Pereira *et al.*, 2009).

2.6.1. Efeitos Insulino–Miméticos Observados *In Vivo*

Os ratos tornados diabéticos pela estreptozotocina (ratos STZ), que destrói as células Beta dos ilhéus de Langerhans, demonstraram ser o modelo animal mais apropriado para estudos *in vivo*, por manifestarem tanto os sintomas da DMID como da DMNID; estes animais exibem uma baixa produção de insulina e altos níveis de glicose sanguínea circulante (Shechter 1990; Sakurai & Tsuji, 1998). A administração de vanádio por via oral diminui os níveis de glicose sanguínea e reduz bastantes sintomas da doença, como a hiperfagia (ingestão excessiva de alimentos), a polidipsia (sede excessiva) e a poliúria (micção excessiva); ratos STZ tratados com orto e metavanadato de sódio, por exemplo, exibem uma hiperglicémia normalizada e uma melhoria da função cardíaca, independentemente dos níveis de insulina no plasma e registam ainda melhorias no transporte de hexoses, no músculo e no fígado. Estas e outras observações apontam não só para a capacidade anti-hiperglicémica do vanádio, com também para a aptidão em fomentar a intervenção da insulina nos animais testados (Chasteen, 1983; Verma *et al.*, 1998; Thompson & Orvig, 2006).

Subsequentemente a esta demonstração da acção de vanadato em ratos STZ, verificou-se contudo que elevadas concentrações deste ião provocavam efeitos adversos, como diarreia e morte por desidratação. Deste modo, o ião vanadilo parecia constituir a forma mais apropriada de administração *in vivo* de vanádio, já que a sua LD₅₀ é quase dez vezes maior do que a do vanadato. Em 1990, efectivamente, verificou-se que ratos STZ tratados com sulfato de vanadilo normalizavam os níveis de glicose, lípidos, creatinina e de hormonas da tiróide; adicionalmente, anomalias cardíacas e no *output* de gliceróis nos adipócitos de outros animais diabéticos eram corrigidas mediante medicação com sulfato de vanadilo. Em conjunto, estes resultados confirmam que o vanádio na forma de vanadilo é eficaz na atenuação da diabetes quer por substituir a insulina, quer por fomentar as acções desta hormona na homeostasia da glicose (Fraústo *et al.*, 1997; Sakurai & Tsuji, 1998).

O potencial terapêutico dos sais de vanadilo foi ainda testado em ratos denominados BB, modelos de insulino-deficiência espontânea e total, nos quais se observou a diminuição da dose de insulina necessária à manutenção de

uma glicémia normal. Outros aspectos benéficos de vanádio na DMID e na DMNID, demonstrados em vários modelos de animais diabéticos incluíram a normalização da produção e utilização de glicose, atenuação de hiperinsulinémia, aumento de tolerância à glicose e prevenção da exaustão das reservas pancreáticas de insulina (Verma *et al.*, 1998).

Estudos clínicos consideráveis têm suportado, ainda, a ideia de uma associação entre a hipertensão, a resistência à insulina e a hiperinsulinémia; assim, se estes dois últimos defeitos são responsáveis pelo desenvolvimento de hipertensão, os tratamentos que visarem a sua diminuição também irão levar à diminuição da pressão arterial. Análises experimentais subsequentes em modelos de hipertensão tanto genética como adquirida revelaram que o Vanádio, administrado oralmente, reduz significativamente a pressão sanguínea e a concentração de insulina no plasma, para além de conseguir manter esse efeito de modo prolongado, já foram realizados, inclusive, vários estudos em seres humanos, que implicavam o uso de sais de vanádio em doses baixas, de modo a evitar toxicidade (Goldwasser, 2000; Shechter *et al.*, 2003).

É actualmente assente, portanto, a capacidade de o Vanádio activar, *in vivo*, o transporte e o metabolismo de glicose em miócitos, adipócitos e hepatócitos, para além de inibir a lipólise (efeito insulino-mimético mecanisticamente distinto do efeito hormonal de facilitação do transporte de glicose) (Elberg *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2009). Para além disso, verifica-se uma regularização da expressão genética de enzimas cruciais ao metabolismo da glicose, como a glucocinase, a fosfofrutocinase-6, a acetil-coenzima A, sintetases de ácidos gordos, fosfoenol carboxicinase e cinase do piruvato (Bhanot *et al.*, 1995).

Existem várias hipóteses para o mecanismo de acção do vanádio *in vivo*, apesar de este ainda não estar totalmente. A ideia mais frequentemente admitida é a das propriedades inibitórias do vanadato sobre as fosfatases de tirosina específicas intracelulares, pois tudo parece indicar que a acção da insulina está associada à activação de uma tirosina cinase. Também tem sido referenciada a possibilidade de o vanadato activar a autofosforilação do receptor da insulina, devido às semelhanças entre o vanadato e o fosfato. Outras hipóteses têm sido propostas, tais como, o aumento de cálcio intracelular (mensageiro secundário), a inibição da Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, a alteração do pH intracelular ou intravesicular e a modificação dos transportadores da glicose (Caldeira *et al.*, 1997; Verma *et al.*, 1998; Mukherjee *et al.*, 2004; Aureliano *et al.*, 2008). Trabalhos recentes indicam que a base molecular da acção insulinomimética do vanádio não envolve a actividade do receptor da insulina, mas sim a sua acção em eventos pós-receptor na cascata de sinalização da hormona (Etcheverry & Cortizo, 1998; Mukherjee *et al.*, 2004).

2.6.2. Efeitos Insulino-Miméticos Observados *In Vitro*

Virtualmente todos os efeitos biológicos da insulina na regulação da homeostasia da glicose são estimulados por vários compostos de vanádio, em células do tecido adiposo (adipócitos) ou hepático (hepatócitos) isoladas; estes modelos de estudo *in vitro* são utilizados há algum tempo, por serem menos complexos em termos de interpretação e por constituírem bons precursores de análises mais aprofundadas (Tolman *et al.*, 1979). Sabe-se

que os sais de Vanádio a) activam o transporte de hexoses como a glicose, nos adipócitos e células musculares, b) estimulam a glicogénese e inibem a glicogenólise no fígado, c) impulsionam a oxidação da glicose e a lipogénese em adipócitos e d) promovem a glicólise no fígado, devido à acção inibidora de vanadatos sobre a bifosfatase de 2, 6-frutose, entre muitas outras acções. Em suma, os compostos de vanádio inibem diversos sistemas metabólicos de enzimas hepáticas, musculares e adipócitas que actuam, colectivamente, na regulação da homeostasia da glicose. Para além disso, também bloqueiam a acção das hormonas que antagonizam a insulina (Dubyak, 1980; Rider *et al.*; 1990; Brichard *et al.*, 1995; Holman & Kasuga, 1997; Pereira *et al.*, 2009).

Algumas das acções específicas da insulina, que vários compostos de vanádio demonstraram mimetizar *in vitro*, e que serão as principais vias moleculares que explicam o comportamento insulino-mimético do metal de transição, incluem o estímulo da autofosforilação e regulação e o aumento da actividade da cinase de tirosina dos receptores de insulina; o aumento da ligação e insulina aos receptores; aumento da actividade da cinase de tirosina dos receptores de insulina; inibição da actividade da fosfatase de fosfotirosina e aumento da actividade Ser/Thr da cinase de tirosina.

2.6.3. Mecanismo Molecular de Insulino-Mimetismo de Vanádio

Para compreender os mecanismos que envolvem a acção antidiabética de Vanádio, é necessário compreender os principais eventos implicados nas vias de sinalização da insulina. Estas vias podem ser divididas em três níveis fundamentais (Rehder, 2003); o primeiro nível compreende a ligação da insulina ao seu receptor transmembranar, uma cinase de tirosina; quando a insulina se liga no lado extracelular deste receptor, a tirosina interior é fosforilada. No segundo nível, inclui-se a activiação de uma complexa cascata de eventos de transdução de sinal, estimulando-se a entrada de glicose na célula, por meio de um transportador. Finalmente, há que considerar a modulação de várias moléculas efectoras, como o transportador da glicose, enzimas chave do metabolismo do glicogénio e lípidos e factores de transcrição. A fosforilação do receptor da insulina é contrariada por uma fosfatase de tirosina (PTN) que cataliza a ruptura hidrolítica da ligação fosfoéster e que está totalmente activa na ausência de insulina ou no caso de tolerância à hormona (Rehder, 2003). A cascata de eventos que se segue à fosforilação da tirosina do receptor da insulina envolve a activação da proteína IRS-1 (substrato 1 do receptor da insulina) que, por seu turno, induz diversas vias de transdução de sinal, como a via da cinase Ras-MAP (proteína activada mitogenicamente por radicais livres), a da cinase de PI3 (fosfatidil inositol 3) e a da SHPTP2 (fosfatase da fosfotirosina) (Rehder, 2003; Shechter *et al.*, 2003).

Apesar de se ter demonstrado *in vitro* que o vanádio afecta a maioria das vias de transdução da insulina, os mecanismos *in vivo* exactos ainda estão por elucidar completamente; existem várias hipóteses para o mecanismo de acção do vanádio no que diz respeito ao metabolismo da glicose, que a seguir se apresentam.

a) Inibição de Fosfatases da Tirosina

A inibição das fosfatases de tirosina e a estimulação indirecta resultante da fosforilação da tirosina tem sido apontada como o modo principal de promoção de insulino-mimetismo na presença de compostos de vanádio. No caso de compostos de vanadato, apesar de se esperar que o receptor da insulina esteja envolvido, há provas experimentais de que os efeitos insulino-miméticos de vanádio (V) são independentes desse receptor, como por exemplo o facto de a inibição desse receptor não suprimir uma série de efeitos no metabolismo da glicose (Thompson & Orvig, 1995; Thompson & Orvig, 2006).

Tem-se avançado que o Vanádio (IV) pode mostrar algumas propriedades insulino-miméticas mediante a activação de uma cinase de tirosina citosólica que, por seu turno, actuará nas vias de sinalização da insulina. Também há autores que argumentam a existência de um aumento da actividade dos receptores da insulina em condições de sub-saturação insulinémica e na presença de vanadatos, que assim conduziriam a um acréscimo aparente na sensibilidade à insulina e à prolongação dos seus efeitos; assim, o vanadato conseguiria que baixas concentrações de insulina endógena e exógena se tornassem muito mais eficazes (Elberg *et al.*, 1998). Já no caso de compostos de peroxovanadato têm-se registado evidências de que estes actuam preferencialmente através do receptor da insulina. Isto pode estar relacionado com a capacidade e a especificidade destes compostos como inibidores de fosfatases de tirosina, bem como com uma maior ou menor facilidade de entrada nos tecidos vivos (Tolman *et al.*, 1979).

A hipótese de que a actividade anómala das fosfatases da tirosina é responsável por algumas formas de insulino-resistência características da DMNID e o facto de os compostos de vanádio modularem a actividade destas proteínas, tem sido um dos aspectos principais a ter em conta no desenvolvimento de fármacos de vanádio para o tratamento de certos tipos desta diabetes (Tolman *et al.*, 1979; Ahmad *et al.*, 1995).

b) Estímulo do Transporte de Glicose

À parte da activação de cinases de tirosina, os compostos de vanádio podem estimular sinais transdutores que por seu turno actuam ao nível do transporte de glicose para a célula (figura I.5).

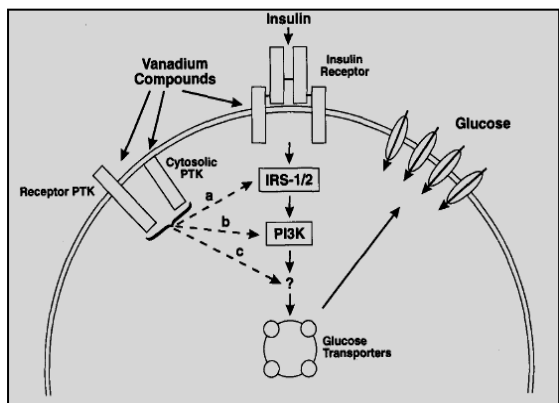


Figura I.5 – Estímulo do transporte de glicose por compostos de vanádio. A sinalização da insulina (*insulin*) para que o transporte de glicose (*glucose*) seja facilitado é mediada pela fosforilação do IRS-1 ou 2, com consequente activação da cinase de PI3 (PI3K). *Vanadium compounds* refere-se a compostos de vanádio, *insulin receptor* ao receptor de insulina e *cytosolic PTK* à cinase de tirosina (adaptado de Tolman *et al.*, 1979).

Pensa-se que o fazem por vias alternativas que requerem a fosforilação de tirosinas e activação subsequente dos receptores PTK (cinases de fosfotirosina); estas vias permanecem ainda por esclarecer, e não envolvem necessariamente o IRS ou o receptor da insulina nem obrigatoriamente a cinase de PI3 (Sakurai & Tsuji, 1998). Apesar de a activação da cinase de PI3 ser essencial ao transporte de glicose estimulado pela insulina, os compostos de vanádio conseguem estimular esse transporte mesmo havendo supressão da PI3K, o que indica que existem outras vias de activação do transportador de glicose independentes da acção da insulina. Provavelmente estas consistem em transdução mediante cinases de tirosina, onde o vanádio actua (do modo descrito no ponto anterior) (Elberg *et al.*, 1998).

Por outro lado, verificou-se que a destruição do citoesqueleto de actina bloqueia o estímulo induzido tanto por compostos de vanádio como por insulina; isto parece evidenciar a existência de um mecanismo de dois passos para o transporte de glicose, um dependente e outro independente da acção directa da insulina, passos estes que convergem entre si (Tolman *et al.*, 1979).

2.6.4. Compostos de Vanádio (V)

De entre os complexos orgânicos de vanádio pentavalentes, tem-se dado especial atenção a piridina-2,6-dicarboxilato de dioxovanádio (V), PDC-V(V) (Figura I.6), o primeiro composto de vanádio que demonstrou ser capaz de uma acção anti-hiperglicemiante e de reversão da resistência à insulina (típicas da diabetes II), com o metal na forma pentavalente (Crans, 2000; Buglyo *et al.*, 2005). Este complexo insulino-mimético, conhecido por inibir a actividade hidrolítica Ca^{2+} -ATPase do RS de músculo esquelético, é facilmente hidrolisado e oxidado mesmo em pHs neutros, interconvertendo-se em outras espécies de vanadato.

Recentemente, foi possível indagar que os níveis de inibição observados para este complexo são muito maiores que aqueles já descritos para várias soluções aquosas de vanadato, o que evidenciou o facto de que a inibição da bomba de cálcio não se poderá dever apenas à simples formação de oxovanadatos, a partir do complexo (Aureliano & Madeira, 1998; Pereira, 2003; Crans *et al.*, 2004; Aureliano 2007; Aureliano *et al.*, 2008).

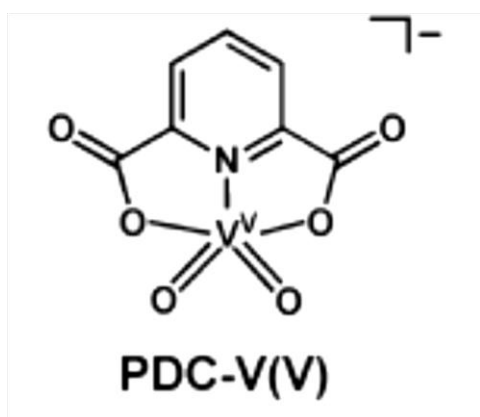


Figura I.6 – Estrutura molecular do complexo orgânico coordenado piridina-2,6-dicarboxilato de di-oxovanádio (*in* Aureliano *et. al.*, 2008).

2.6.5. Compostos de Vanádio (IV)

A penetração celular do vanadato está associada à sua redução a vanádio (IV) pela glutatona. Deste modo, se o efeito do metal envolver uma interação com o receptor da insulina a nível intracelular, pode-se pôr a hipótese de que a forma farmacologicamente activa de vanádio seja a forma vanadato. E, de facto, como já foi descrito, o vanadilo exerce uma acção normalizante dos níveis plasmáticos de glicose, lípidos, creatinina e hormonas tiroideias; além disso, as alterações cardíacas e da produção de glicerol pelos adipócitos de animais diabéticos são corrigidas após tratamento com vanadilo (Chasteen, 1983).

Um dos compostos mais estudados é o sulfato de vanadilo, que se revelou ser normoglicemiante em cerca de 13 semanas, em animais diabéticos do tipo I, apesar de os níveis plasmáticos de insulina permanecerem diminuídos. Como o tamanho e o conteúdo dos ilhéus de Langerhans pancreáticos permanecem semelhantes aos dos ilhéus de animais normais, pode-se supor que a normalização da glicémia diminui o estímulo enviado às células beta, protegendo-as da destruição pelos efeitos da diabetes. De notar, contudo, que a eficácia do sulfato de vanadilo como antidiabético não está relacionada com esta protecção, mas com a acção directa do vanádio sobre a hiperglicémia que, por sua vez, leva à melhoria da função pancreática (Fraústo *et al.*, 1997; Shechter *et al.*, 2003). Na tabela I.I estão listados os critérios que mostram que o sulfato de vanadilo permite um controlo do estado diabético, substituindo a insulina na sua correcção.

Tabela I.I – Critérios de validação da eficácia de sulfato de vanadilo como agente antidiabético (adaptado de Shechter *et al.*, 2003).

Critérios	Efeitos Associados
Clínicos	Redução do consumo hídrico Prevenção de cataratas diabéticas
Bioquímicos	Redução da hiperglicémia e hiperlipidémia
Farmacológicos	Prevenção da insuficiência contráctil cardíaca
Celulares	Diminuição da lipólise em adipócitos

Embora a toxicidade de vanadilo seja reduzida, a sua absorção celular tem de ser optimizada; a acção do ião, todavia, pode ser modulada com a adição de ligandos orgânicos que facilitam a sua orientação celular e a especificidade bioquímica; assim, se forem utilizados complexos orgânicos de V (IV), neutros, a solubilidade em meio não-aquoso (como as membranas celulares) é aumentada e as doses terapêuticas podem ser diminuídas, reduzindo-se os riscos aliados à toxicidade de vanádio (Thompson & Orvig, 1995; Krejsa *et al.*, 1997). Destes, o bis (maltolato) de oxovanádio (IV), $(VO(\text{malto})_2$ ou BMOV) (Figura I.7) foi já utilizado em estudos clínicos em humanos, demonstrando ser mais eficaz na redução dos níveis de glucose em sangue de ratos hiperglicémicos do que a forma livre de vanadilo (Goldwaser *et al.*, 2000).

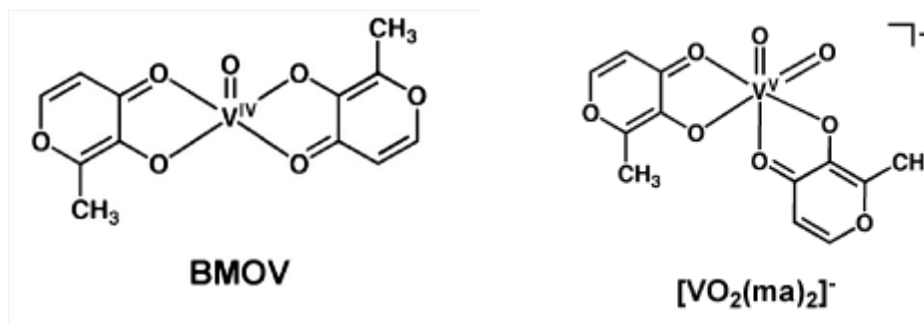


Figura 1.7 – Estrutura molecular do complexo orgânico coordenado bis (maltolato) de oxovanádio (IV), à esquerda, e do seu ião oxidado, à direita (in Aureliano *et. al.*, 2008).

Este complexo organometálico de oxovanádio (IV) associado a dois grupos de maltol (uma hidroxipirona), tem sido uma das maiores apostas em termos de terapêutica antidiabética; para além disso, também é conhecido por inibir a bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático do músculo esquelético (Aureliano, 2007; Aureliano *et al.*, 2008). Embora seja termodinamicamente estável, sem carga eléctrica e com bio-compatibilidade relativamente ao balanço hidrofílico/lipofílico (sendo por isso facilmente absorvido pelas células), o BMOV é facilmente hidrolizado e oxidado em pH neutro, originando espécies diferentes das administradas (Aureliano, 2007; Aureliano *et al.*, 2008). Apesar disso, essa administração normaliza os valores dos lípidos e da glicose num intervalo de tempo inferior ao de vários outros compostos e está associado à diminuição da concentração de glicose, colesterol e triglicéridos no plasma e à melhoria da função cardíaca efeito nos níveis plasmáticos de insulina; note-se que a eficácia do BMOV é cerca de 50% mais elevada que a do sulfato de vanadilo (Willsky *et al.*, 2001). O ligando maltol tem sido objecto de muitas variações e vários complexos de vanadilo, com maltol associado, têm sido sintetizados e caracterizados, tendo provado possuir uma eficácia similar às do BMOV. Uma variação do BMOV, o BEOV (bis (etilmaltolato) de oxovanádio (IV)), foi recentemente objecto de estudo mediante ensaios clínicos em indivíduos humanos (Rehder *et al.*, 2002).

3. A Ca²⁺ - ATPASE DE RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO

A Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático do músculo esquelético (variante SERCA1a), uma proteína transmembranar de 110 kDa, é comunmente classificada como uma trifosfatase de adenosina dependente de cálcio e pertencente à classe P das ATPases; há que notar que, apesar das convenções, está demonstrado que esta se comporta, na realidade, como uma hidrolase de fosfato. Recorrendo à energia libertada na hidrólise de um grupo fosforilo ligado a um resíduo aminoácido aspártico, esta Ca²⁺-ATPase é a principal responsável pelo transporte de cálcio (um segundo mensageiro da sinalização celular) desde o sarcoplasma até ao lúmen do seu do retículo sarcoplasmático (Lodish *et al.*, 2000; Mahaney *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2007; Aureliano, 2007).

Devido à homologia e conservação dos sítios de fosforilação e de ligação do ATP, a bomba de cálcio é uma P-ATPase que se constituiu como um modelo quase ideal no estudo do acoplamento entre uma reacção química (como a transferência de grupos fosforilo do ATP para uma enzima) e o movimento, acoplamento es-se que envolve a produção de trabalho físico e/ou osmótico. Por outro lado, trata-se de uma proteína fácil de obter incorporada em vesículas de RS fragmentado, onde mantém a sua orientação nativa e, por conseguinte, a função fisiológica, mesmo em condições *in vitro*; pode, ainda, ser facilmente armazenada por meio de congelamento com azoto líquido, em sacarose (cerca de 0,3 M) e a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Aureliano, 1995; Mintz e Guillain, 1996).

Não é de estranhar, assim, que esta seja a P-ATPase mais extensivamente estudada, desde a sua descoberta no início da década de 60 do século XX (por Hasselbach & Makinose, em 1961, e confirmada por Ebashi & Lipmann, em 1962): todo o progresso no conhecimento do mecanismo de um modelo como o da Ca^{2+} -ATPase, para além de ser um desafio só por si, vai permitir a transposição da informação para outros sistemas em que exista transdução de energia e sinalização celular. Estudos cristalográficos, espectroscópicos, cinéticos, moleculares e genéticos têm vindo a permitir um progresso muito significativo na análise estrutural e funcional das Ca^{2+} -ATPases, possibilitando delinear um modelo cinético geral para o transporte de Ca^{2+} , e elucidando o mecanismo molecular e transdutor do transporte de Ca^{2+} . Visto numa perspectiva mais alargada, o conhecimento estrutural e molecular dos sistemas de transporte e de transdução (e envolvidos na homeostasia iónica de segundos mensageiros) permitiu já antever algumas das bases estruturais de doenças hereditárias que afectam a translocação de iões e metabolitos ou as diversas vias de sinalização celular (como é o caso da *diabetes mellitus*, na qual se pensa existir o envolvimento de uma Ca^{2+} -ATPase afectada), providenciando medidas eficazes para o seu diagnóstico e terapia (Thompson & Orvig, 1995; Shechter *et al.*, 2003; Aureliano, 2007).

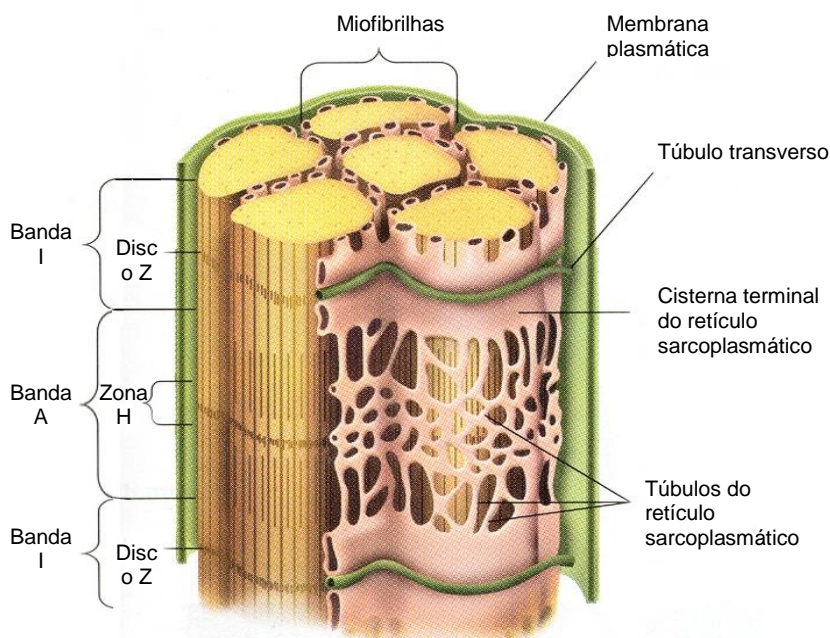
3.1. Papel fisiológico da SERCA1a e do Retículo Sarcoplasmático

Considerado um segundo mensageiro universal, o ião cálcio é o responsável pela sinalização e regulação de diversas vias celulares, entre elas os processos de fertilização, desenvolvimento, diferenciação e morte celular, bem como, os sistemas de contracção muscular, libertação de neurotransmissores, degradação de glicogénio no músculo e activação do metabolismo oxidativo (Bootman *et al.*, 2001; Voet *et al.*, 2008). A homeostasia celular tende a manter a concentração intracelular do ião Ca^{2+} , nas células em repouso, em níveis abaixo dos $0,1\text{ }\mu\text{M}$; tal é conseguido através de um bombeamento constante do catião para o meio extracelular, mediante a actividade de Ca^{2+} -ATPases de membrana plasmática (PMCA), por um lado, e a actuação de Ca^{2+} -ATPases que acumulam activamente o ião no lúmen dos Retículos Endo e Sarcoplasmáticos (SERCAs) intracelulares, por outro (Martonosi, 1995; Lodish *et al.*, 2000; Stryer *et al.*, 2002). Quando uma célula é estimulada, a concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma aumenta brusca e transitoriamente, podendo alcançar níveis micromolares (Spenelakis, 1998; Bootman *et al.*, 2001). A bomba de cálcio está, pois, no centro da manutenção da homeostasia celular de cálcio, seja no processo de contracção muscular, seja noutra sistema biorgânico funcional (Martonosi, 1996; Lodish *et al.*,

2002; Stryer *et al.*, 2002; Aureliano, 2007; Voet *et al.*, 2008).

No músculo esquelético estriado, o Retículo Sarcoplasmático (RS) é uma rede colectiva de canais fechados, tubulares e membranares que se estendem pelo sarcoplasma (citoplasma da célula muscular) e rodeiam intracelularmente cada sarcómero (unidade funcional da fibra muscular); estes canais envolvem, portanto, cada miofibrilha composta por filamentos de actina e miosina, no interior de cada fibra muscular. As cisternas do RS organizam-se numa rede de túbulos longitudinais (cujo conteúdo proteico é, maioritariamente, a Ca^{2+} -ATPase) na zona central do sarcómero mas, junto às linhas Z, adoptam uma estrutura contínua conhecida como cisterna terminal (onde se encontram os receptores da rianodina); quase sobre a linha Z é possível distinguir invaginações transversais da sarcolema (membrana plasmática da célula muscular) conhecidas por Túbulos Transversais, Túbulos-T ou Sistemas-T, que formam junções com as cisternas terminais (Figura I.8). Duas cisternas terminais opostas e o sistema-T interposto constituem, no seu conjunto, a chamada Tríade (Aureliano, 1995; Voet & Voet, 1995; Spelakakis, 1998; Lodish *et al.*, 2000; Azevedo, 2005).

Figura I.8 – Diagrama de miofibrilhas, onde se pode discernir a estrutura do retículo sarcoplasmático e o sistema de túbulos transversais e longitudinais, no músculo esquelético estriado (*in* Sousa, 2004, adaptado de Lodish *et al.*, 2000).



Este organelo altamente especializado funciona, pois, como um reservatório intracelular de Ca^{2+} , chegando a conter 1,5 mM deste íon, e está encarregue de controlar a sua concentração citoplasmática. O retículo sarcoplasmático vê-se, assim, directamente implicado na regulação do processo de contracção e relaxamento muscular (Lees *et al.*, 2001).

Quando um impulso nervoso alcança uma junção neuro-muscular, promove a despolarização superficial da sarcolema, que se propaga (do mesmo modo que um impulso nervoso) para o interior do sarcoplasma através dos túbulos-T. O sinal eléctrico é então transmitido às cisternas terminais do RS, dando-se a abertura dos canais iónicos de Ca^{2+} associados a receptores de rianodina (sensíveis à voltagem). À medida que o Ca^{2+} acumulado no lúmen do RS flui rapidamente para o citosol, a concentração de Ca^{2+} livre intracelular aumenta do nível de repouso (0,1 μM) para um nível activo (10^{-5} M), numa questão de milissegundos. Posteriormente, quando o potencial de

acção se dissipa, os canais de cálcio fecham-se e a membrana do RS retoma a sua impermeabilidade ao cálcio (Mintz & Guillain, 1997; Eckert et al., 1997; Zucchi & Ronca-Testoni, 1997; Stokes & Wagenknecht, 2000).

É o aumento brusco e transitório da concentração sarcoplasmática de Ca^{2+} que induz a contracção muscular, mediante a ligação do catião à troponina-C do Sistema Troponina-Tropomiosina, o que, por seu turno, activa uma série de alterações conformacionais que permitem a ligação das cabeças de miosina aos filamentos de actina: o músculo contrai. Subsequentemente, o Ca^{2+} dissocia-se da troponina-C e é rapidamente removido do sarcoplasma pela Ca^{2+} -ATPase da membrana do RS (SERCA1a); esta ATPase reacumula-o, bombeando-o activamente para o lúmen do organelo e usando o complexo MgATP como substrato fisiológico: o músculo relaxa. Uma vez no RS, o Ca^{2+} é ligado por duas enzimas solúveis: a calsequestrina e a chamada “proteína de alta afinidade para o cálcio”; estas servem como reservatórios para o Ca^{2+} intracelular, reduzindo-se desta forma a concentração livre do ião no

RS e diminuindo-se a energia necessária para bombear os catiões. A actividade da Ca^{2+} -ATPase muscular é, assim, regulada pela concentração de Ca^{2+} livre no sarcoplasma: se esta se tornar muito elevada, a velocidade do bombeamento aumenta até que concentração citosólica de Ca^{2+} seja inferior a $0,1 \mu\text{M}$. A Ca^{2+} -ATPase está, pois, próxima do equilíbrio no músculo em repouso e é maximamente activada durante a contracção (Martonosi, 1995; Stokes & Wagenknecht, 2000; Lodish *et al.*, 2000; Stokes & Green, 2003; Tupling, 2004).

Embora a remoção do Ca^{2+} seja também da responsabilidade da Ca^{2+} -ATPase da sarcolema (uma PMCA), que o exporta para o meio extracelular, a Ca^{2+} -ATPase do RS é o regulador fisiológico primário do processo de contracção muscular. A afinidade elevada da sua superfície citosólica para os iões Ca^{2+} ($K_D = 10^{-7} \text{ M}$) e a sua abundância na extensa membrana do retículo sarcoplasmático (representa 80 % do conteúdo proteico desta) permitem um transporte muito eficiente do catião, pelo que a reacumulação de Ca^{2+} após o estímulo muscular é bastante rápida e eficaz (Voet & Voet, 1995; Lodish *et al.*, 2000).

3.2. Aspectos Estruturais da Ca^{2+} -ATPase de Retículo Sarcoplasmático

Apesar de se ter evidenciado o facto de a Ca^{2+} -ATPase do RS formar oligómeros, nomeadamente dímeros e tetrâmeros, na membrana nativa do RS (o que resultará numa interacção cooperativa que influencia a cinética de transporte do cálcio), considera-se que o monómero ATPásico constitui a unidade funcional do sistema e retém toda a sua funcionalidade (Andersen, 1989; Merino & Merino, 1999). É ao monómero, pois, que o presente trabalho se refere.

A estrutura primária da bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático do músculo esquelético, estabelecida a partir da sequenciação do DNA codificante (MacLennan *et al.*, 1985), para além de revelar as numerosas analogias existentes com as outras P-ATPases, firmou a sub-unidade catalítica da enzima (α) como um único polipeptídeo (que se pensa conter 2 a 3 ligações dissulfídicas, cuja redução conduz, virtualmente, à inibição total da dissociação luminal de Ca^{2+}) com cerca de 994 aminoácidos e 110 kDa. Adicionalmente, e em função da hidrofobicidade desses resíduos, previu-se a existência de dez hélices transmembranares e localizaram-se os terminais N e C da

cadeia polipeptídica na porção citosólica, para além de se assinalar uma distribuição muito assimétrica pela bicamada lipídica (Toyoshima *et al.*, 1993; MacLennan, 1997; Mintz & Guillain, 1997). Apesar de existirem vários modelos propostos para a estrutura secundária e terciária da proteína, o mais recente, e globalmente aceite, baseia-se na representação 3D do envelope da bomba de cálcio (Figura I.9), obtida por difracção de raios-X a 14 Å de microcristais tubulares tridimensionais e sua análise mediante microscopia crioelectrónica (MacLennan, 1997; Stokes *et al.*, 1998), e no modelo de 10 hélices proposto por Toyoshima e seus colaboradores (Figura I.10), em 2000 (e revisto em 2008), mediante uma resolução tridimensional ímpar de 2,6 Å, que desfez praticamente todas as dúvidas referentes à estrutura tridimensional da proteína.

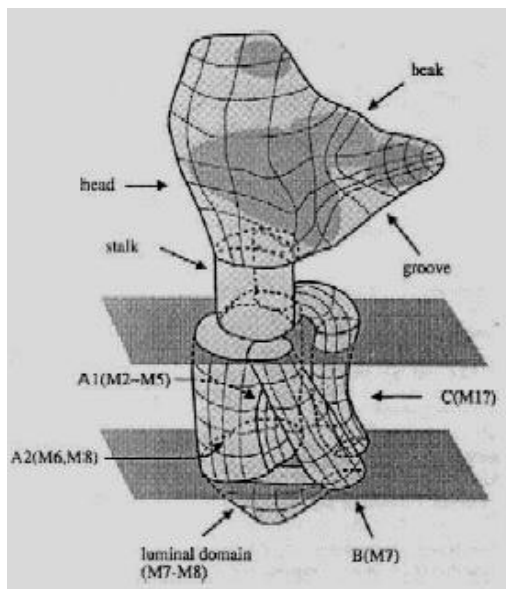


Figura I.9 - Topologia geral da Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA 1a), na ausência de Ca^{2+} e ATP, proposta por Stokes e Green e interpretada em termos do modelo de 10 hélices de Toyoshima *et al.* (in Mintz & Guillain, 1997).

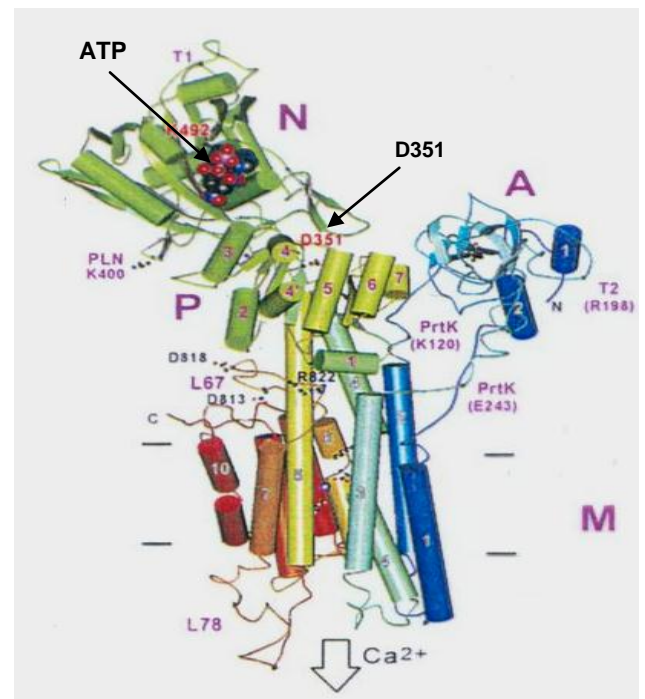


Figura I.10 - Arquitetura da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático, proposta por Toyoshima *et al.* em 2000. Os três domínios citoplasmáticos estão representados por A, N e P e as hélices transmembranares por M1-M10. As hélices α estão representadas por cilindros e as folhas β por setas. O resíduo que sofre fosforilação, o aspartato 351, está representado como D351 (adaptado de Toyoshima *et al.*, 2000).

Assim, e de acordo com o modelo estrutural que é actual e globalmente aceite (prevalecendo a denominação “modelo de dez hélices”) esta proteína transportadora possui uma sub-unidade catalítica (α) com três domínios citoplasmáticos por seu turno associados a uma série de dez hélices- α transmembranares, mediante um “pé” penta-helical, transmembranar e estreito. Com uma altura total de 120 Å, o monómero de Ca^{2+} -ATPase contém 70 % da sua massa na região extramembranar citoplasmática, 25 % na porção intramembranar e 5 % no lúmen do RS (Toyoshima *et al.*, 1993; MacLennan *et al.*, 1997; Stokes *et al.*, 1998).

A zona citoplásmica é complexa, hidrofílica, rica em estruturas secundárias do tipo folhas β pregueadas e estende-se a cerca de 65 Å acima da superfície da bicamada fosfolipídica, terminando numa estrutura que muitos autores denominam “cabeça da proteína” (65 x 40 x 50 Å), devido ao seu formato de pêssego ou, ainda segundo outros, de bico de pássaro. É nesta porção que se distinguem claramente três domínios chave: o domínio globular de ligação do substrato fisiológico MgATP (domínio N ou nucleotídico), o domínio globular de fosforilação (domínio P) e o domínio, globular e de folha- β , que está associado à transdução de energia e é hoje conhecido como domínio A (*actuator*), β ou transdutor (Toyoshima *et al.*, 1993; Mintz e Guillain, 1997; MacLennan *et al.*, 1997; Stokes *et al.*, 1998; Toyoshima *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2007; Toyoshima, 2008).

O domínio nucleotídico, N, com cerca de 27 kDa, forma o grosso da zona central da cabeça citoplasmática e parece ser constituído por uma mistura de hélices α e folhas β que se alternam regularmente. Composto pelos resíduos que se encontram entre as regiões constituintes do domínio P, que contém, localizado numa ranhura da cabeça, o resíduo Phe 487, ao qual se liga o ATP (sítio de ligação do ATP) e seus análogos (Yokenura *et al.*; 1997; Toyoshima *et al.*, 2000; Toyoshima *et al.*, 2008).

O domínio de fosforilação, P, é constituído por duas regiões amplamente separadas na estrutura primária, que se enrolam em oito hélices α curtas associadas, algo desordenadamente, a sete folhas β paralelas. É nesta porção que se encontra o resíduo aspártico, Asp 351, ao qual se liga covalentemente o grupo fosforilo transferido do ATP; o domínio P também contém um resíduo aspártico, Asp 703, que se pensa coordenar a acção do co-factor magnésio. Está ligado ao domínio transmembranar por extensões citoplasmáticas das hélices M4 e M5 (Spenelakis, 1998; Toyoshima *et al.*, 2000; Stokes e Green, 2003; Toyoshima *et al.*, 2008). O domínio impulsor da transdução energética (logo, regulador da ligação e libertação de cálcio), A (*actuator*), é o menor dos três domínios citoplasmáticos (tem um peso molecular de 16 kDa) e consiste num conjunto de 7 a 8 folhas β ligado a uma zona da cabeça entre os domínios de fosforilação e nucleotídico e, através das hélices S2 e S3, às hélices transmembranares M2 e M3. É este domínio que encerra o “bolso” hidrofóbico formado por N e P, impedindo a entrada da molécula de água que, posteriormente, induzirá a libertação do chamado fosfato inorgânico (por hidrólise da ligação fosfato-Asp 351), quando se der a extrusão de dois iões Ca^{2+} para o lúmen do RS (Inesi *et al.*, 1992; Stokes & Wagenknecht, 2000; Toyoshima *et al.*, 2000; Stokes & Green, 2003; Toyoshima *et al.*, 2008). A cabeça citoplasmática da enzima está conectada à porção transmembranar por meio de um “pé” ou “colo” estreito (16 Å de altura, 28 Å de diâmetro), formado por uma estrutura pentahelical- α anfipática (hélices S1 a S5), que se justapõe às primeiras 5 hélices transmembranares (M1 a M5); é nesta zona que se localizam os péptidos C e N-terminais, formados por 7 e 60 aminoácidos, respectivamente. Pensa-se que este *stalk* poderá estar implicado na transmissão das alterações conformacionais sofridas pela região citoplasmática, após a fosforilação da proteína, à zona transmembranar: quatro hélices transmembranares pertencentes ao “colo” da proteína poderão ser as promotoras e transmissoras (após a fosforilação) das modificações e alterações conformacionais nos locais de união do Ca^{2+} . Esta última consideração responderia à questão de como dois locais (o de fosforilação e os de ligação de Ca^{2+}) que distam largamente entre si (cerca de 40 a 50 Å) conseguem comunicar (Inesi *et al.*,

1992; Aravind *et al.*, 1998; MacLennan & Green, 2000; Toyoshima *et al.*, 2000; Stokes & Green, 2003; Toyoshima *et al.*, 2008).

A região transmembranar da Ca^{2+} -ATPase, que liga a porção citoplasmática à zona lumenal do RS, é formada por dez segmentos hidrofóbicos α -helicais (M1 a M10, cada um com cerca de 20 aminoácidos) ligados entre si por um total de 9 *loops* (ou *hairpins*) extramembranares, 5 lumenais (pequenos) e 4 citoplasmáticos. Os dois locais de ligação e translocação do Ca^{2+} , denominados I e II, estão inseridos lado a lado numa cavidade polar formada pelas hélices M4, M5 e M6 e resultam da justaposição ou sobreposição precisa dos resíduos aminoácidos específicos e volumosos situados nessas hélices e envolvidos na ligação do catião; o acesso a este canal e o transporte dos catiões para o espaço lumenal são, por conseguinte, controlados pelas interações entre esses resíduos (Inesi *et al.*, 1992; Mintz & Guillain, 1997; Toyoshima *et al.*, 2000). O chamado sítio I, de ligação do primeiro ião de cálcio, está rodeado pelas hélices M5, M6 e M8 e é constituído por átomos de oxigénio das cadeias laterais dos resíduos Asn 768, Glu 771 (na hélice M5), Thr 799, Asp 800 (na hélice M6) e Glu 908 (na hélice M8). O sítio II é formado pelos átomos de oxigénio dos grupos carbonilos das cadeias principais dos resíduos Val 304, Ala 305 e Ile 307 na hélice M6 e, ainda, pelos átomos de oxigénio das cadeias laterais de Asn 796, Asp 800 (na hélice M6) e Glu 309 (na hélice M4). A ligação dos dois iões de cálcio é sequencial e cooperativa: a união do primeiro altera o posicionamento do resíduo de Asp 800, o que origina alterações conformacionais que, por seu turno, dotam o sítio II de uma maior afinidade para o cálcio (Inesi *et al.*, 1992; Mintz & Guillain, 1997; MacLennan, 1997; Stokes & Green, 2003; Toyoshima, 2008).

3.2.1. Os Estados Conformacionais E_1 e E_2 da Ca^{2+} - ATPase de RS

Como já foi mencionado, admite-se a existência de pelo menos dois locais de ligação dos iões Ca^{2+} à bomba do RS, um exposto ao citoplasma (sítio I) e o outro ao lúmen do RS (sítio II), entre os quais o ião terá de ser transferido, atravessando a membrana do retículo e percorrendo uma distância de 40 a 50 Å. Para que tal seja possível, e de acordo com o modelo E_1 - E_2 das P-ATPases, a Ca^{2+} -ATPase alterna entre dois estados conformacionais principais, E_1 e E_2 , que possuem um papel central na transdução energética que conduz ao transporte dos iões Ca^{2+} . A natureza dessa alteração conformacional é, portanto, um aspecto importante no que respeita ao funcionamento da bomba, envolvendo um processo complexo que altera dramaticamente a afinidade dos locais de cálcio para com o ião e que reorienta a acessibilidade destes a partir de um ou outro lado da membrana (Martonosi, 1995; Toyoshima *et al.*, 2000; Stokes & Green, 2003).

No estado E_1 , a enzima caracteriza-se por uma elevada afinidade e acessibilidade para o Ca^{2+} citoplasmático (constante de dissociação, $K_D = 10^{-7}$ M), mas não ao lumenal; nesta conformação, pode ser fosforilada por ATP, mas não por fosfato inorgânico (P_i). À conformação E_2 , por seu turno, reputam-se sítios de baixa afinidade para os catiões ($K_D = 10^{-3}$ M), acessíveis a partir do lúmen e o facto de ser reactiva com P_i , mas não com ATP; neste estado, os locais de alta afinidade não estão organizados e o acesso ao sarcoplasma está vedado (Mintz & Guillain, 1997; Hua *et al.*, 1999; Lodish *et al.*, 2000; Stokes & Wagenknecht, 2000).

A maior diferença entre as duas conformações reside no domínio citoplasmático; se em E_1 há a formação de uma *groove* entre o domínio de fosforilação (assinalado como P) e o nucleotídico (assinalado como N), aproximando este último da membrana, já em E_2 a porção citoplasmática forma uma estrutura muito mais compactada e semelhante a uma “cabeça” (empacotamento de N, P e A). Há claramente uma abertura do sítio activo quando se passa de E_2 para E_1 , sugerindo que estes movimentos estão relacionados com a ligação do ATP e a transferência do grupo γ -fosforilo para os grupos carboxílicos do resíduo Asp351. Como seria de esperar, há um rearranjo das hélices transmembranares, disponibilizando, ora a ligação do Ca^{2+} na superfície citosólica (conformação E_1), ora a sua dissociação na superfície luminal (conformação E_2) (Toyoshima *et al.*, 2000; Stokes & Wagenknecht, 2000; Shin *et al.*, 2001; Toyoshima *et al.*, 2008). A figura I.11 ilustra as estruturas E_1 e E_2 propostas por Toyoshima *et al.* (2000).

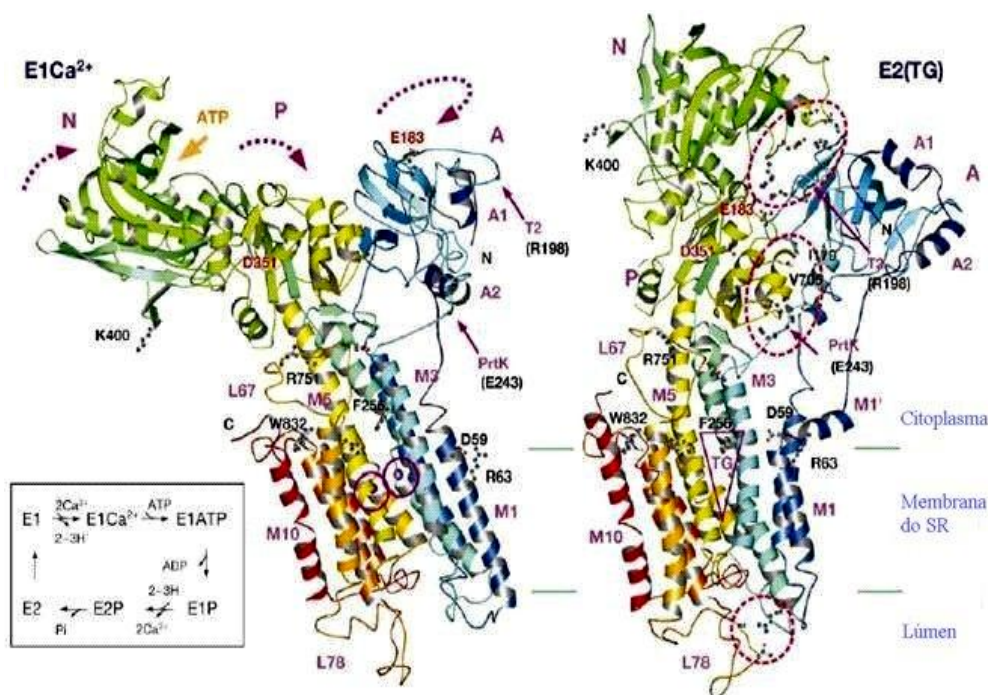


Figura I.11 – Modelos da arquitectura conformacional da Ca^{2+} -ATPase: estrutura da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático na conformação E_1Ca^{2+} (esquerda) e na conformação E_2 na presença de tapsigargina, $E_2(TG)$ (direita). As duas esferas presentes na conformação E_1Ca^{2+} representam os iões cálcio e as setas a tracejado a direcção do movimento dos domínios citoplasmáticos durante a modificação de E_1 para E_2 (adaptado de Toyoshima *et al.*, 2000).

3.3. Mecanismo Catalítico e de Transporte da Ca^{2+} -ATPase de Retículo Sarcoplasmático

O acoplamento da hidrólise de um grupo fosforilo ao transporte vectorial dos iões Ca^{2+} envolve a interacção controlada entre os eventos que ocorrem no sítio catalítico e os locais de transporte do cálcio, através de vários passos e reacções que dão segundo uma ordem bem definida. Em 1973, MaKinose propôs o modelo correntemente aceite e entretanto largamente substanciado para o mecanismo de acção de Ca^{2+} -ATPase de RS, no qual a enzima sofre uma transição entre o estado de alta afinidade para o Ca^{2+} (E_1) e o estado de baixa

afinidade (E_2) (Spelakakis, 1998; Toyoshima, 2008). Este modelo, aplicável a todas as P-ATPases e geralmente denominado por “ E_1 - E_2 ” está representado em termos cinéticos na Figura I.12, que ilustra o transporte de dois iões Ca^{2+} por molécula de ATP e por monómero de ATPase (Voet & Voet, 1995; Lodish *et al.*, 2000).

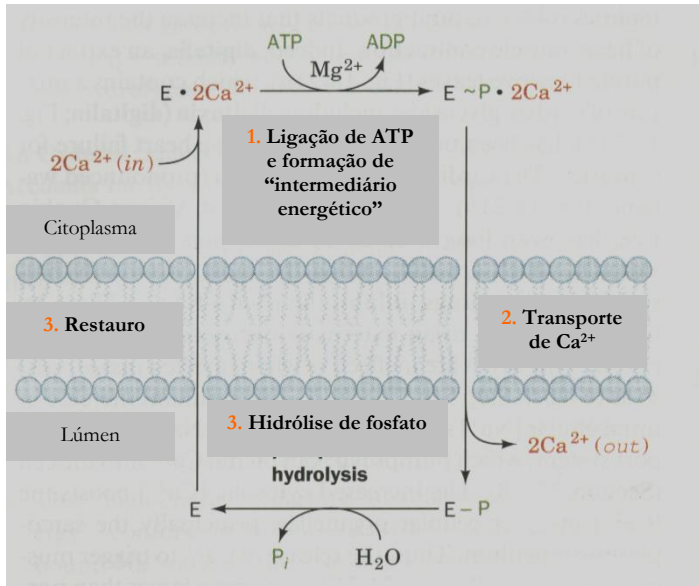


Figura I.12 – Mecanismo Cinético do Ciclo Catalítico e de Transporte da Ca^{2+} -ATPase do Retículo Sarcoplasmático, representando de uma forma simples e operacional o número mínimo de eventos necessário para o transporte de iões Ca^{2+} (contra o seu gradiente de concentração), por molécula de ATPe por monómero de ATPase. *In* refere-se ao citoplasma e *out* ao lúmen do RS (Voet & Voet, 1995).

De acordo com o modelo E_1 - E_2 presentemente descrito para a Ca^{2+} -ATPase do RS, os passos elementares envolvidos são os que em seguida se descrevem (Jencks, 1989; Martonosi, 1995; Voet & Voet, 1995; Eckert *et al.*, 1997; Mintz & Guillain, 1997; MacLennan, 1997; Lodish *et al.*, 2000; Stokes & Green, 2003; Toyoshima, 2008):

1. Quando a enzima está desfosforilada, e na sua conformação E_1 , está apta a capturar Ca^{2+} no sarcoplasma (onde a concentração do ião é baixa), uma vez que os seus sítios de transporte têm uma afinidade elevada para com o catião e estão direccionados para o sarcoplasma. Assim, a ATPase liga sequencial e cooperativamente dois iões Ca^{2+} citoplasmáticos e é activada. Esta ligação vai, agora, endireitar a hélice M5, o que leva à movimentação dos domínios citoplasmáticos, que por sua vez vão permitir a fosforilação subsequente da enzima.

2. A ocupação de ambos os sítios de ligação de Ca^{2+} é imprescindível para a ligação do substracto MgATP à forma activada Ca_2E_1 e, numa reacção rápida orientada pelo ião Mg^{2+} , o substracto transfere o seu grupo γ -fosforilo para o grupo β -carboxílico do resíduo Asp 351. Forma-se então o intermediário fosfoenzimático $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$ (\sim denota a ligação acil-fosfato que se forma).

3. Os iões Ca^{2+} ligados aos locais de alta afinidade estão oclusos na cavidade polar e sem acesso directo ao lúmen e ao sarcoplasma, devido à justaposição induzida dos aminoácidos específicos situados em ambos os terminais (sarcoplasmático e lumenal) das hélices M4, M5 e M6. A oclusão dos catiões ocorre de um modo sincronizado com a reacção de fosforilação: a fosforilação da enzima pelo ATP induz os movimentos de longo

alcance nos domínios catalítico e transmembranar que vão fechar os acessos citoplasmáticos (mediante a sobreposição dos resíduos dos terminais citoplasmáticos das hélices) e promover a oclusão dos iões Ca^{2+} .

4. O intermediário $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$ que contém os iões Ca^{2+} oclusos diz-se ADP-sensível e é instável, pelo que vai sofrer perturbações estruturais que rearranjam as hélices M4, M5 e M6. Admite-se que é deste modo que se desfaz a justaposição dos resíduos terminais lumenais das hélices transmembranares, o que vai vedar os acessos ao sarcoplasma e permitir a abertura das vias de saída (para o interior do RS). A oclusão termina e os iões Ca^{2+} , menos firmemente ligados à enzima, são agora capazes de trocar a sua posição, com a enzima orientada em direcção ao lúmen. Assim, estas alterações conformacionais, que levam a enzima a adoptar a forma E_2 ($\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{-P}$), proporcionam a diminuição drástica da afinidade para com o cálcio e propõem o direccionamento e a translocação dos catiões para o lúmen do RS, onde estes são fisicamente libertados (num processo relativamente lento). Forma-se assim a fosfoenzima livre de cálcio, ADP-insensível e denotada por $\text{E}_2\text{-P}$ (- indica a ligação acil-fosfato que, aqui, é mais forte). É neste passo que a energia química contida inicialmente no ATP é transduzida para o transporte.

5. Quando os catiões se dissociam do confórmero de baixa afinidade ($\text{E}_2\text{-P}$), activam a sua desfosforilação: o grupo aspartil-fosforil do intermediário $\text{E}_2\text{-P}$ sofre hidrólise, libertando P_i . Sem o grupo fosforilo, o confórmero E_2 da enzima é instável, pelo que esta reverte à sua forma de alta afinidade para o cálcio, Ca_2E_1 através da movimentação dos domínios citoplasmáticos que reorientam os locais de transporte na direcção do citoplasma, regeneram os locais de alta afinidade para o Ca^{2+} e ligam outros dois Ca^{2+} , prontos para serem transportados num novo ciclo.

De notar que os termos “ADP-sensível” e “ADP-insensível” reflectem a capacidade para reverter a fosforilação e doar o grupo fosforilo de volta ao ADP (reformando-se ATP); a forma ADP-sensível pode fazê-lo, ao contrário da ADP-insensível. A reacção global, totalmente reversível, pode ser representada pela equação, de acordo com Jencks (1989): $2 \text{Ca}^{2+}_{\text{cit}} + \text{ATP} \rightleftharpoons 2 \text{Ca}^{2+}_{\text{lum}} + \text{ADP} + \text{P}_i$. Por cada molécula de ATP hidrolisada, a Ca^{2+} -ATPase transporta dois iões cálcio e 2-3 H^+ no sentido oposto ao dos iões cálcio, no entanto, não há formação de gradiente de H^+ uma vez que a membrana do RS é permeável a protões (Toyoshima, 2008).

4. INTERACÇÃO DE COMPOSTOS DE VANÁDIO COM A Ca^{2+} - ATPASE

4.1. Interacção de oligómeros de V(V) com a Ca^{2+} -ATPase de RS

O V(V) é actualmente conhecido pelos firmes efeitos inibitórios que produz nas hidrolases de fosfato do tipo E_1E_2 e, nomeadamente, na Ca^{2+} -ATPase das membranas plasmáticas e do RE, bem como na $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ ATPase do

RS, que interage dinamicamente com as várias espécies oligoméricas de vanadato, e, revelando diferentes sensibilidades (Varga *et al.*, 1985; Aureliano & Madeira, 1994; Aureliano & Madeira, 1998; Pereira, 2003; Aureliano, 2007). A ordem de interacção relativa dos diversos oligoaniões com a Ca^{2+} -ATPase do RS foi descrita como sendo de $V_4 > V_{10} > V_1 = V_2 = 1$ na ausência de ATP e de $V_4 = V_{10} = V_1 > V_2 = 1$, na presença de ATP, demonstrando como a inibição por diferentes espécies de V(V) está igualmente dependente do tipo de conformero enzimático existente (dado que a conformação desta enzima também procede da presença ou ausência de ATP, para além de Ca^{2+}), para além da própria identidade do oligoanião (Aureliano & Madeira, 1994; Aureliano & Madeira, 1998; Aureliano, 2007). Adicionalmente, essa inibição está dependente das condições de temperatura e pH do meio ambiente, bem como da existência, ou não, de uma incubação prévia entre os oligómeros e a enzima (Pereira, 2003).

Sabe-se que a bomba de cálcio, tal como as restantes ATPases do tipo P, aceita ortovanadato (espécie monomérica) como análogo de ortofosfato, formando um complexo enzima-vanadato (“vanadização”) no qual o vanadato adopta a estrutura bipiramidal trigonal idêntica à do ortofosfato. Tendo em conta que o vanadato reduz a afinidade da ATPase para cálcio, tem-se suposto que a enzima “vanadizada” adopta preferencialmente a sua conformação E₂, formando o complexo E₂-V; o mecanismo catalítico ficaria bloqueado a partir daqui, estando impedido o passo de hidrólise do grupo fosforilo (Figura I.13). Também se supõe poder existir uma interacção com o local de fosforilação, sem que haja o impedimento da ligação de ATP (formação de E₂-P-V) e consequente hidrólise do grupo fosfato; a enzima, contudo, permaneceria “vanadizada” (Pick, 1981; Hasselbach & Medda, 1983; Aureliano & Madeira, 1994; Aureliano & Madeira, 1998; Pereira, 2003; Aureliano, 2007).

Contudo, não se podem excluir outras vias de interacção que inibam a acção enzimática da bomba de cálcio, especialmente tendo em conta que já se verificou o facto de os oligómeros V₂, V₄ e V₁₀ exibirem maior afinidade para a enzima, em detrimento da espécie monomérica. São estas espécies estáveis de V(V), portanto, as principais responsáveis pela alteração dos processos que a Ca^{2+} -ATPase cataliza, se estiverem presentes no meio reaccional em determinadas concentrações e dependendo das condições de pH e temperatura (Varga *et al.*, 1985; Aureliano & Madeira, 1994; Aureliano & Madeira, 1998; Pereira, 2003).

A espécie decamérica, já conhecida como o inibidor mais preponderante de entre os restantes oligómeros de V(V), não se comporta como um análogo do fosfato, embora se ligue à ATPase no próprio sítio de ligação de ATP e, especialmente, na conformação E₂ desta enzima, adoptando uma geometria octaédrica (formação de E₂-V) (Figura I.12). O denominado decavanadato também se poderá fixar num local responsável pelo bloqueio alostérico do movimento de Ca^{2+} , próximo do sítio activo; foi sugerido, inclusive, que a ligação da espécie decamérica poderia estender-se até ao “domínio A” da bomba de cálcio, onde oxidaria o resíduo serina 186 (Csermely *et al.*, 1995; Varga *et al.*; 1985; Hua, 2000). Adicionalmente, tanto a espécie decamérica como a monomérica poderão ligar-se ao resíduo aspártico aceitador do grupo fosforilo, no sítio de fosforilação da enzima, bloqueando o local activo e impedindo a formação do intermediário fosforilado. A espécie decamérica também é conhecida por desacoplar e alterar o *turnover* da bomba de cálcio (Aureliano & Madeira, 1994; Aureliano & Madeira, 1998; Aureliano, 2007).

A espécie tetramérica possui, por seu turno, a capacidade de formar estruturas cíclicas, podendo ligar-se perto do sítio de fosforilação, com preferência pelo conformero E2 da enzima e, possivelmente, a resíduos aminoácidos carregados positivamente, como a lisina e a arginina (Varga *et al.*, 1985; Aureliano & Madeira, 1994; Aureliano & Madeira, 1998). Pode também ser responsável por muitos dos efeitos que tendem a ser atribuídos à espécie monomérica (Aureliano & Madeira, 1994; Tiago *et al.*, 2007; Aureliano, 2007)

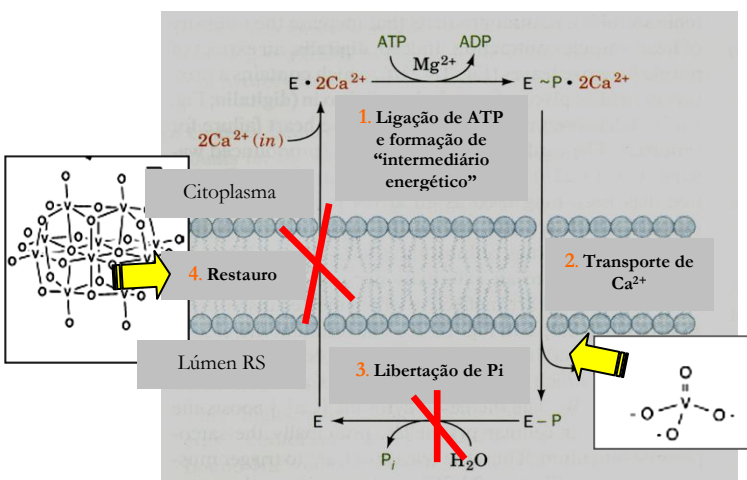


Figura I.12 – Efeito de V(V) monomérico (V1) e decamérico (V10) no ciclo catalítico e de transporte de cálcio pela Ca²⁺-ATPase de RS. Ambos se ligam preferencialmente à enzima na sua conformação E2, “vanadizando-a” e bloqueando o seu ciclo, impedindo a libertação hidrolítica fosfato inorgânico e a captura de Ca²⁺, respectivamente (adaptado de Voet & Voet, 1995 e de Aureliano, 2007). *In* refere-se ao Ca²⁺ acumulado no lúmen do RS e *out*, ao citosol.

Deste modo, a inibição pelo vanadato depende primariamente do estado conformacional da enzima e das espécies de vanadato presentes no meio reaccional. Apesar de se asseverar que a interacção com os vanadatos é favorecida quando a bomba está na conformação E₂, dando-se então o bloqueio putativo da ATPase, também existem evidências, retiradas de estudos com ⁵¹V-NMR, de uma interacção de vários oligómeros com a forma E₁ (Aureliano & Madeira, 1998; Pereira, 2003; Aureliano, 2007). Os locais de ligação ao substracto (MgATP) e de fosforilação, na região catalítica da enzima, e os locais de ligação ao cálcio, na região transmembranar, parecem ser os que estão acessíveis à interacção e consequente inibição da actividade hidrolítica e de transporte de cálcio pela enzima. Os grupos tiol também são conhecidos como alvos potenciais de iões metálicos, pelo que também podem ser afectados por compostos de vanádio e, assim, alterar a funcionalidade enzimática (Varga *et al.*, 1985; Aureliano, 2007).

Como resultado da inibição da actividade hidrolítica da Ca²⁺ATPase do RS, há uma interferência na acumulação e transporte de Ca²⁺ celular: ao impedir a reacumulação eficaz do ião Ca²⁺, o V(V) induz a sua acumulação no citosol, comprometendo a homeostasia intracelular de cálcio (Aureliano, 1995; Pereira, 2003). Efectivamente, a acumulação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático é afectada pelas várias espécies oligoméricas de vanadato, nomeadamente, as espécies monomérica e decamérica. Quando o efluxo de cálcio promovido pelo retículo sarcoplasmático não está associado à actividade da ATPase (efluxo passivo), a ATPase comporta-se como um canal de cálcio e tanto a espécie monomérica como a espécie decamérica de vanadato tendem a inibir a entrada de cálcio no citosol, chegando mesmo a comportar-se como ligandos naturais da enzima. Contudo, quando esse efluxo está acoplado às reacções intrínsecas da ATPase, nomeadamente, à síntese de ATP (efluxo activo), apenas o decavanadato demonstra exercer efeitos notórios, inibindo quase totalmente a saída activa de

cálcio a partir do lúmen do RS. Para além disso, apenas a espécie decamérica é capaz de inibir a acumulação de cálcio no RS na ausência de agentes quelantes de Ca^{2+} , a actividade ATPásica na ausência de um gradiente de cálcio e a ejeção de prótons associada à bomba de cálcio (Aureliano, 1995; Aureliano, 2000; Aureliano, 2007). O vanadato pode ainda interagir com a $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{ATPase}$ induzindo a sua cristalização em dímeros (ou outros oligómeros) de ATPase, para além de mediar a sua foto-clivagem específica (Dux & Martonosi, 1983; Maurer & Flesher, 1984; Vegh *et al.*, 1990; Molnar, *et al.*, 1991).

Todos estes efeitos, tão diversos entre si e que comprovadamente interferem com a homeostasia de cálcio no músculo esquelético, sugerem um papel putativo dos oligómeros de vanadato nas vias de sinalização do catião, através da sua ligação à $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ do RS. Poder-se-à, inclusive, especular se esta enzima transdutora de energia não poderá constituir, ela mesma, um alvo fisiológico do metal (Pereira, 2003; Aureliano, 2007).

4.2. Interação da Ca^{2+} - ATPase de RS com Complexos Orgânicos de Vanádio

Para além de o vanádio ser utilizado como uma sonda no estudo e caracterização da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, e deste modo, na elucidação dos mecanismos de contração muscular e homeostasia do cálcio nas células, pode mesmo envolver esta enzima transportadora nos mecanismos insulino-miméticos que promove e actuar como um ligando natural desta. Um novo campo de investigação tem vindo a desenvolver-se, então, baseado nas interações de compostos e complexos de vanádio com um dos modelos metabólicos mais bem caracterizados e utilizados, a $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, não só com vista ao desenvolvimento de terapêuticas eficazes no combate à diabetes, como também na elucidação do envolvimento da ATPase nas vias de acção da insulina e no ambiente diabético (Pereira, 2003; Sousa, 2004; Aureliano *et al.*, 2005; Aureliano, 2007; Aureliano *et al.*, 2008; Aureliano & Crans, 2009). E, com efeito, vários estudos (Bidasee *et al.* 2005; Wold *et al.*, 2005) têm mostrado uma actividade reduzida da bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático, em algumas condições diabéticas, podendo resultar em distúrbios cardíacos (relaxamento cardíaco desacoplado) (Aureliano Aureliano *et al.*, 2005; Aureliano *et al.*, 2008); sabe-se, adicionalmente, que a insulino-resistência nos músculos cardíaco e esquelético é uma característica de diabetes tipo II e que estes tecidos (cujo funcionamento é regulado pelo segundo mensageiro Ca^{2+} , note-se) estão envolvidos, portanto, nas vias de sinalização da insulina (Harrison, 1998; Duarte *et al.*, 2002; Stumvoll *et al.*, 2008).

5. OBJECTIVOS DO ESTUDO EXPERIMENTAL

Recentemente, demonstrou-se o facto de três complexos orgânicos coordenados, piridina-2,6-dicarboxilato de dioxovanádio (V) (ou PDC-V(V)), o bis(maltolato) de oxovanádio (IV) (ou BMOV-V(IV)) e o bis(iminodiacetato de N-hidroxiámina) de vanádio (IV) (ou HAIDA-V (IV)), três classes estruturalmente muito distintas de compostos de vanádio, inibirem comprovadamente a actividade hidrolítica da $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ de Re-

tículo Sarcoplasmático de músculo esquelético de coelho. Com estes estudos, estabeleceu-se uma ordem relativa de inibição PDC-V(V) > BMOV-V(IV) > vanadato monomérico > vanadato decamérico > HAIDA-V (IV) e os valores de IC50 25, 40, 50, 100 e 325 μ M, respectivamente (Aureliano *et al.*, 2008).

Enquanto que os primeiros dois complexos orgânicos (um, de vanádio teravalente e o outro, de vanádio pentavalente), como já se referiu, são conhecidos por induzirem efeitos insulino-miméticos *in vitro* e são instáveis, o terceiro é um conhecido análogo de amavadina, um composto natural de vanádio, conhecido pela sua estabilidade hidrolítica e oxidativa a pH neutro. Efectivamente, este último composto de oxovanádio possui um ligando “H3(hidpa)” que liga à forma tetravalente de vanádio de tal forma, que é o único ligando do género sideróforo que se conhece capaz de ligar vanádio com uma afinidade muito mais elevada do que qualquer outro ião metálico (Garner *et al.*, 2000).

Deste modo, partindo dos valores de IC50 anteriormente descritos e combinando vários estudos de espectroscopia de fluorescência com ensaios cinéticos de transporte e ligação de ^{45}Ca à ATPase, pretendeu-se avaliar e comparar o efeito dos três complexos coordenados de vanádio distintos (PDC – V(V), BMOV-(IV) e HAIDA-V(IV)) na função bioenergética e estrutural da bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético. Adicionalmente, pretendeu-se inferir se esta Ca^{2+} -ATPase pode ser considerada um potencial alvo celular de complexos coordenados de oxovanádio, nomeadamente, complexos insulino-miméticos.

II. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS E DE COMPLEXO GLICOGENOLÍTICO ASSOCIADO A RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO

Através de centrifugação diferencial, uma técnica que separa os componentes celulares mediante a aplicação, a homogenatos de tecidos fragmentados, de forças centrífugas crescentes e sucessivas é possível obter fragmentos de retículo sarcoplasmático (RS) do músculo esquelético, sob a forma de vesículas. Devido às suas diferentes formas e densidades, os organelos celulares detêm diferentes velocidades de sedimentação, permitindo a sua separação (Aureliano, 1995; Wilson & Walker, 1999; Nelson & Cox, 2000).

1.1. Isolamento de Vesículas de Retículo Sarcoplasmático

Para se isolarem as vesículas de retículo sarcoplasmático (VRS) necessárias aos estudos experimentais, seguiu-se o método de fraccionamento celular simples descrito por Carvalho & Leo (1967) e modificado por Da Costa & Madeira (1986), que descrevem um passo de *salting in* para eliminação das proteínas contrácteis presentes na fracção microsomal sedimentada. Solubilizando-se estas proteínas em soluções de força iónica elevada e após a centrifugação dessa solução, deverão sedimentar apenas vesículas de retículo sarcoplasmático longitudinal; nestas, cerca de 80% do conteúdo proteico deverá ser constituído pela Ca^{2+} -ATPase na sua forma nativa, com capacidade funcional para acumular cálcio *in vitro*, na presença de ATP e magnésio (Santos & Carvalho, 1978; Aureliano, 1995; Mintz & Guillain, 1997; Pereira, 2003; Sousa, 2004).

As VRS assim isoladas, contudo, contêm glicogénio, glicogénio fosforilase e outras enzimas do metabolismo do glicogénio. Para as eliminar, adaptou-se uma etapa adicional desenvolvida por Cuenda *et al.* (1994), que consistiu na solubilização desse material proteico numa solução contendo sacarose e sua remoção posterior por centrifugação em rotação máxima. Todo o material e soluções utilizados foram previamente refrigerados e o isolamento decorreu a 4 °C, no gelo, como a seguir se descreve.

Após deslocamento cervical, com uma pancada rápida atrás do pescoço, sacrificou-se um coelho-europeu (*Oryctolagus cuniculus*) doméstico (jovem e com cerca de 2 kg) por corte da artéria jugular, de modo a permitir sangramento. Esfolou-se o espécime, que foi em seguida lavado com água bi-distilada e colocado numa tina contendo gelo; os músculos dorsais e dos membros foram expostos e removeu-se o tecido conjuntivo e a gordura envolventes. Os músculos dorsais e os músculos brancos das coxas foram então removidos, lavados com água bi-distilada, cortados em pedaços, pesados e rapidamente transferidos para um triturador de carne, recolhendo-se a carne triturada num copo de plástico previamente arrefecido. À carne triturada adicionou-se tampão de isolamento e homogeneização (KCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM pH 7, β ME 2,5 mM PMSF 5 μ M; os dois últimos reagentes foram adicionados à solução apenas no início do isolamento), na proporção de 1:1 (mL/g); mediu-se o volume da solução a adicionar numa proveta refrigerada.

A suspensão obtida foi colocada num homogeneizador de lâminas (*Waring blender*), adicionando-se o tampão de isolamento anterior até se obter uma proporção de 2,5:1 (v/v), de suspensão por volume da inicial. Homogeneizou-se 5 s a velocidade baixa (18500 rpm) e, novamente, 15 s a velocidade elevada (22500 rpm); após um período de repouso de 30 s, esta operação foi repetida, em ciclos de 20s. O homogenato assim obtido (constituído por fragmentos da sarcolema e conteúdos celulares em suspensão, como fragmentos de células musculares, mitocôndrias, núcleos, miofibrilhas e VRS longitudinais, segundo da Costa & Madeira 1986) foi distribuído por tubos de centrifuga (250 mL) previamente refrigerados e centrifugado a 8000 x g (7300 rpm em rotor JA14, para a centrifuga *Beckman J2 MC*) durante 20 minutos, a 4 °C.

Filtrou-se o sobrenadante anteriormente obtido (desprezando-se o *pellet*) através de 4 camadas de gaze previamente embebida em tampão de isolamento e refrigerada, com funil (removendo-se restos de gordura, tecido conjuntivo e componentes celulares mais pesados, como mitocôndrias, peroxissomas, lisossomas e núcleos), para um copo ou *erlenmeyer* lavado (com solução de isolamento), colocado em gelo. Este filtrado foi centrifugado como descrito anteriormente (7300 rpm em rotor JA14, para a centrifuga *Beckman J2 MC*, durante 20 minutos, a 4 °C).

Repetiu-se a filtração com 4 camadas de gaze, do sobrenadante resultante (o sedimento foi desprezado), denominado sobrenadante pós-mitocondrial (por, em princípio, estar livre de mitocôndrias e ser constituído maioritariamente por VRS com glicogénio e enzimas do seu metabolismo associadas, de acordo com Santos & Carvalho, 1978) e distribuiu-se este segundo filtrado por tubos de 50 mL, centrifugando-se a 40000 x g (18000 rpm em rotor JA20 para centrifuga *Beckman J2 MC*) a 4 °C, durante 1 hora. Neste passo, dever-se-ão ter desprezado sarcolemas, túbulos-T e outras membranas leves (Belcastro *et al.*, 1993).

O *pellet* recolhido anteriormente (desprezando-se o sobrenadante) foi então ressuspensão no menor volume possível de solução tampão de lavagem (KCl 0,6 M; Tris-HCl 10 mM pH 7), com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Em seguida, transferiu-se esta ressuspensão para um *potter Elvehjem* (previamente refrigerado e lavado com solução de lavagem) e realizaram-se 3 a 4 passagens a 200 rpm (mantendo o *potter* no gelo). Esta nova suspensão foi diluída com solução tampão de diluição e remoção (KCl 0,1 M; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; Sacarose 0,25 M), numa proporção de 6:1 (v/v) e seguidamente centrifugada (em tubos de 10 mL) a 78000 x g durante 35 minutos e a 4 °C. O *pellet* final foi recolhido cuidadosamente, evitando-se um pequeno ponto central de coloração castanha (presumivelmente a fracção mitocondrial), e ressuspensão em solução tampão de isolamento, no menor volume possível (50 µL), com o auxílio de *potter Elvehjem* (previamente refrigerado e lavado com solução de isolamento). Obtiveram-se, no total, cerca 3,9 mL de suspensão, imediatamente colocada em gelo. O rendimento do isolamento deverá ser calculado através da equação II.1.

$$(II.1) \quad \eta = \frac{\text{massa de proteína isolada}}{\text{massa proteica inicial}} \times 100 \% \quad (\text{Aureliano, 1995; Pereira, 2003})$$

Na equação II.1, a massa de bomba de cálcio isolada refere-se à massa posteriormente quantificada de proteína isolada (considerando-se que esta corresponde, por aproximação, à Ca²⁺-ATPase) e a massa inicial, à massa de músculo esquelético inicialmente pesado.

1.2. Isolamento de Complexo Glicogenolítico associado a Retículo Sarcoplasmático

As preparações de VRS usualmente efectuadas em vários laboratórios e de acordo com diversos protocolos, incluindo o do isolamento segundo Carvalho & Leo (1967), modificado por Da Costa & Madeira (1986), têm demonstrado estar associadas a quantidades elevadas de partículas de glicogénio, fosforilase do glicogénio b (forma desfosforilada da enzima) e de outras enzimas-chave directamente envolvidas no metabolismo do músculo esquelético (Entman *et al.*, 1989; Cuenda *et al.*, 1994; Garduño *et al.*, 2001). Tornou-se necessário, portanto, confirmar essa presença contaminante nas fracções micros-somais resultantes da maioria dos isolamentos padrão e comparar-se com as preparações de VRS obtidas como descrito no ponto anterior, de acordo com um novo desenho do protocolo prático. Assim, de modo a se garantir a pureza das amostras de VRS necessárias ao trabalho experimental, isolaram-se fracções de retículo sarcoplasmático mediante um procedimento *standard*, com vista à obtenção de amostras deste Complexo Glicogenolítico associado aos fragmentos de Retículo Sarcoplasmático (GL-RS).

Aproveitando-se o facto de a homogeneização e filtração serem necessárias por igual, recolheu-se uma parte do último filtrado pós-mitocondrial obtido no isolamento de VRS (alínea 1.1 do procedimento experimental) e centrifugou-se a 100 000 x g, durante 35 minutos e a 4 °C.

O sobrenadante assim obtido foi desprezado, como anteriormente, e o sedimento ressuspenso num volume mínimo de “solução tampão B” (solução de ressuspensão, constituída por KCl 0,1 M; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; glicerol 20% v/v), em gelo e com o auxílio de *potter Elvehjem* (previamente refrigerado e lavado com a solução de isolamento anteriormente utilizada).

Obteve-se um total de 4,75 mL de suspensão, imediatamente colocada em gelo. O rendimento do isolamento foi calculado como descrito em 1.1.

1.3. Conservação das Amostras de VRS e GL-RS

Como não ocorreu uma utilização imediata de ambas as preparações, VRS e GL-RS, conservaram-se e armazenaram-se as amostras para futuras utilizações, dividindo-se as suspensões obtidas em pequenas alíquotas de 50 µL, às quais se adicionou igual volume de sacarose 2 M, homogeneizando-se de imediato com vórtex e congelando-se rapidamente por imersão em azoto líquido e armazenando-se, consecutivamente, a -80 °C. O congelamento rápido de fracções membranares num meio com concentrações elevadas de sacarose promove a remoção osmótica da água presente na estrutura membranares, precavendo-se assim a formação de cristais de gelo, que perfurariam as membranas micros-somais, inutilizando as amostras. As preparações assim armazenadas retêm boas actividades de “hidrólise” de ATP e de acumulação de cálcio, bem como uma boa razão Ca^{2+}/ATP , indicadores da funcionalidade e eficiência bioenergética das preparações (da Costa & Madeira, 1986, Aureliano, 1995).

1.4. Caracterização das Preparações de VRS e GL-RS

1.4.1. Análise Quantitativa das amostras de VRS e GL-RS

A concentração de proteínas nas fracções de VRS e GL-SR foi determinada mediante o método de Bradford (1976), modificado, que é uma técnica colorimétrica para a determinação de proteínas totais que se baseia na ligação específica, numa solução ácida, do corante *Coomassie Brilliant Blue* (Figura VIII.1 do Anexo VIII) às cadeias laterais básicas ou aromáticas das proteínas, dos resíduos aminoácidos Arginina e Histidina (hidrofilicos) e Fenilalanina, Triptofano e Tirosina (hidrofóbicos), respectivamente; de notar que o método responde primariamente aos resíduos de Arginina. O corante, na sua forma livre, é catiónico e tem um máximo de absorção a 470 nm (radiação vermelha, do espectro electromagnético visível); ligado a uma proteína, contudo, reverte para uma forma aniónica que absorve maximamente a 595 nm (radiação azul, do espectro electromagnético visível) (Bradford, 1976; Compton, 1985). Dentro de uma gama particular de concentrações, a relação entre o valor dessa absorvância e a quantidade de proteína presente é linear e previsível. Consequentemente, pode-se traçar uma curva de regressão linear (ou curva de calibração) a partir de várias soluções padrão (com concentrações conhecidas de uma proteína padrão) e calcular a concentração de proteína total numa solução, por interpolação da recta assim obtida. As rectas assim obtidas reflectem a Lei de Beer-Lambert (equação II.2, onde A representa a absorvância, ϵ a absorvidade molar ou coeficiente de extinção molar, λ o comprimento de onda utilizado na medição de A , C a concentração da espécie e t a largura da *cuvette*), que denota a relação linear existente entre a Absorvância e a Concentração (Holme e Peck, 1993; Wilson & Walker, 1999).

$$(II.2) \quad A = \epsilon\lambda Ct \quad (\text{Plummer, 1987})$$

Assim, para medir a quantidade de complexo proteína-*comassie brilliant blue* nas preparações, adicionou-se o chamado reagente de bradford (constituído pelo corante azul) a soluções de VRS e GL-RS diluídas em solução de isolamento e solução B, respectivamente, numa proporção de 1:1 (v/v) (600 μ L). Após agitação em *vortex*, aguardou-se 1 minuto (de forma a que se formasse o complexo corado; este, é estável durante cerca de uma hora) e leu-se a sua absorvância a 595 nm num espectrofotómetro ultravioleta -visível (UV/Vis). Nas condições experimentais utilizadas, utilizaram-se soluções padrão de albumina de soro bovino (0, 2, 4, 6, 8 e 10 μ g de BSA), para cálculo da curva de calibração ($Abs_{(BSA)}$ a 595 nm *vs* [BSA]); esta proteína padrão tem um intervalo de linearidade de, tipicamente, 200 a 900 μ g/ml.

1.4.2. Análise Qualitativa das amostras de VRS e GL-RS

O estado de pureza das preparações de VRS e GL-RS foi analisada por electroforese em gel de poli-acrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), um método que separa as proteínas de acordo com a sua massa

molecular. Na presença de SDS, (*Sodium Dodecyl Sulfate* ou Dodecil sulfato de sódio, de fórmula molecular $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{OSO}_3^-$), um detergente aniónico que se liga às cadeias polipeptídicas de um modo proporcional ao número de aminoácidos (1 mol de SDS por cada dois resíduos aminoácidos, ou, uma molécula de SDS por ligação peptídica), as proteínas são desnaturadas e convertidas numa estrutura linear com uma densidade de carga negativa (q) uniforme, a pH 7, independente do seu peso molecular. Quando sujeitas a um campo eléctrico, (E), estas partículas carregadas negativamente vão-se mover através das malhas do gel de poliacrilamida (num processo de filtração em gel) na direcção do ânodo de um aparelho electroforético a uma velocidade (v) que, por seu turno, depende do coeficiente de fricção (f) à filtração em gel; a equação II.3 reflecte estas relações (Weber & Osborn, 1969; Laemmli, 1970; Plummer, 1987; Rickwood & Hames, 1994; Wilson & Walker, 1999; Voet *et al.* 2008).

$$(II.3) \quad E \cdot q = v \cdot f$$

Como E e q são constantes, a mobilidade da proteína (U), que se define como a velocidade por unidade de campo percorrido, é inversamente proporcional ao coeficiente de fricção e depende essencialmente, portanto, do tamanho da molécula. Deste modo, sob a acção de um campo eléctrico, quanto maior for o peso molecular da proteína, maior será a porção polipeptídica a deslocar-se, logo, maior o coeficiente de fricção a que esta está sujeita; por conseguinte, quanto maior for o peso molecular de uma proteína, menor será a sua mobilidade electroforética (Aureliano, 1995; Voet *et al.*, 2008).

Assim sendo, a aplicação de um campo eléctrico a uma mistura de proteínas carregadas negativamente resultará em diferentes velocidades de migração em direcção ao ânodo do aparelho, conseguindo-se a sua separação diferencial em função do seu peso molecular (Rickwood & Hames, 1994). As distâncias de migração relativas (R_f) de proteínas, em SDS-PAGE, variam linearmente na razão inversa do logaritmo da sua massa molecular; logo, pode-se determinar a massa molecular (M_M) de determinada proteína medindo-se a sua migração/mobilidade relativa (R_f) (equação II.4) e por interpolação de uma curva de calibração construída mediante as migrações e logaritmos de massas moleculares conhecidas de proteínas padrão (equação II.5) (Weber & Osborn, 1969; Plummer, 1987; Wilson e Walker, 1999).

$$(II.4) \quad R_f(\text{proteína}) = \frac{\text{migração da proteína}}{\text{frente de migração}}$$

$$(II.5) \quad R_f = f(\log M_M \text{ proteína})$$

A electroforese foi realizada segundo o método de Laemmli (1970) e em concordância com o protocolo descrito por Marques & Ramos (2002), num sistema SDS-PAGE *mini-protean* descontínuo, constituído por dois géis de diferentes concentrações: o gel de concentração com 4 % de acrilamida e o de resolução com 10 % de acrilamida (de modo a se permitir a separação entre a Ca^{2+} -ATPase e a fosforilase do glicogénio). A utilização de um gel de concentração permite a concentração da amostra numa banda densa, antes da separação dos seus componentes (Robyt & White, 1987).

Preparou-se o gel de resolução de poli(acrilamida) a 10 % (a partir de uma solução de acrilamida 30 % e bis-acrilamida 0,8 %) em solução tampão de resolução (375 mM Tris-HCl pH 8,8) contendo 0,1 % de SDS. O início da polimerização e catálise foram promovidas pela adição de 0,05 % (m/v) de persulfato de amónio (PSA) e 0,033% (v/v) de tetrametiletenodiamina (TEMED), deixando-se o gel polimerizar no sistema de vidros do aparelho electroforético durante cerca de 30 a 40 minutos. O gel de concentração de poli(acrilamida) a 4 %, por sua vez, foi preparado em solução tampão de concentração (125 mM Tris-HCl pH 6,8) contendo 0,1 % de SDS, iniciando-se a polimerização com a adição de 0,05 % (m/v) de PSA e induzindo-se a catálise com 0,055% (v/v) de TEMED, deixando-se polimerizar sobre o gel de resolução.

As preparações de VRS e GL-SR (que continham sacarose, note-se) foram submetidas a desnaturação com uma solução contendo Tris-HCl 0,32 M, pH 6.8 (solução tampão 4 vezes concentrada), β -mer-captoetanol 0.4 M, SDS 8% (m/v), glicerol 15% (v/v) e azul de bromofenol 5%. O β -mercaptoetanol é um agente redutor de ligações dissulfídicas intra e inter-moleculares, permitindo que os fragmentos polipeptídicos sejam expostos, em toda a sua extensão, ao desnaturante SDS; o glicerol confere densidade às amostras e o azul de bromo-fenol marca a frente de migração (alguns grupos preferem utilizar os corantes *comassie brilliant blue* ou m-Cresol roxo). A suspensão assim obtida foi homogeneizada em *vortex* e colocada, durante 5 minutos, em banho de imersão a 100 °C (por forma a se acelerar a quebra de ligações dissulfídicas); seguidamente, aplicaram-se 3, 8 e 13 μg de proteína total das amostras tratadas de VRS e 13, 8 e 3 μg de GL-RS.

A corrente eléctrica foi ajustada a 100 V e deixou-se a separação electroforética decorrer durante cerca de 4 h, após o que se colocou o gel numa solução corante contendo ácido acético glacial 10%, metanol 45% e o corante *comassie brilliant blue* 0,1%, durante cerca de 1 hora, e posteriormente descorado *overnight* numa solução contendo ácido acético glacial 10% e metanol 10%.

Em todos os casos, a massa molecular das proteínas foi determinada interpolando-se as suas mobilidades electroforéticas e realizando-se a curva de calibração $\log(M_M)$ vs R_f . Os marcadores proteicos utilizados, denominados HMW e LMW. Adicionalmente, avaliou-se a densidade das bandas electroforéticas resultantes, recorrendo-se ao software *Quantity One* (dos Laboratórios Bio-Rad); por conseguinte, a quantidade relativa de Ca^{2+} -ATPase e Fosforilase do Glicogénio nas VRS e no GL-RS isolados pôde ser estimada. Segundo MacLennan e Yip (1972), a banda correspondente à Ca^{2+} -ATPase do RS apresenta uma mobilidade proporcional a uma proteína de 100 kDa; a fosforilase do glicogénio corresponde à proteína padrão indicada como fosforilase b.

1.4.3. Determinação da actividade hidrolítica de Ca^{2+} -ATPase nas amostras de VRS e GL-RS

A actividade hidrolítica de Ca^{2+} -ATPase, nas preparações de VRS e de GL-RS isoladas e descrita pela equação II.6, foi medida por espectrofotometria, acoplado-se a hidrólise da molécula de ATP às reacções catalizadas pelas enzimas cinase do piruvato (PK) e desidrogenase do lactato (LDH), de acordo com o protocolo descrito por Cuenda *et al.* (1994).



No método enzimático acoplado piruvato cinase/lactato desidrogenase, recorre-se aos intermediários formados numa sequência específica de reacções (Figura II.1), nas quais a conversão de fosfoenolpiruvato (PEP) em piruvato, pela PK, é acoplada à conversão de piruvato em lactato, pela LDH, numa reacção que requer a oxidação de NADH em NAD^+ (forma reduzida e oxidada do dinucleótido nicotinamida de adenina, respectivamente). Ambas as formas absorvem a 260 nm, ao passo que apenas a forma reduzida, NADH, absorve maximamente a 340 nm; o coeficiente de extinção molar do NADH para este comprimento de onda (ϵ_{340}) é $6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($6,2 \times 10^3 \text{ } \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Cuenda *et al.*, 1994; Bagshaw, 1982; Tiago, 2005).

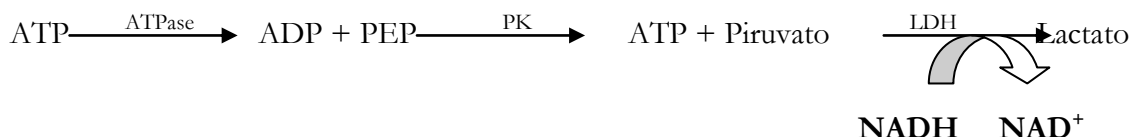


Figura II.1. – Esquema reaccional do sistema enzimático acoplado cinase do piruvato (PK)/desidrogenase do Lactato (LDH). O ATP “hidrolisado” pela Ca^{2+} -ATPase é regenerado pela PK na presença de fosfoenol-piruvato (PEP), produzindo-se adicionalmente, para além do ATP, piruvato. O piruvato, por seu turno, é convertido a lactato pela LDH, na presença de NADH (que se converte em NAD^+) (adaptado de Tiago, 2005; Vinagre, 2007).

Assim, seguindo-se a conversão de NADH em NAD^+ , através da variação da absorção de luz a 340 nm, monitoriza-se a reacção de produção de ADP (“hidrólise” de ATP) pela Ca^{2+} -ATPase, ao longo do tempo. Segundo a sequência de reacções efectuadas (Figura II.1), que é estequiométrica, a quantidade de NADH oxidada por minuto corresponde à quantidade de ADP libertado por minuto, o que, por sua vez, reflecte directamente a velocidade de “hidrólise” de ATP (quantidade de ATP “hidrolizado” por minuto). O decréscimo na absorvância é assim convertido em actividade ATPásica e a conversão de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de substrato / mL .

A actividade hidrolítica da bomba de cálcio foi medida a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em *cuvettes* de quartzo, utilizando-se uma mistura de reacção constituída por TES-TRIS 100 mM pH 7, KCl 100 mM e MgCl_2 3 mM (solução reaccional), à qual se adicionaram CaCl_2 50 μM , PEP 0,42 mM, PK 18 IU e LDH 18 IU; o chamado auto-zero (a 340 nm) foi executado nesta altura (excluindo-se a contribuição dos componentes da mistura para a absorvância) e só depois

se adicionaram NADH 0,375 mM e 5 µg/mL de VRS ou GL-RS. As reacções foram, em seguida, iniciadas com adição de ATP 0,25 mM, de modo a se obter um declive mensurável, a partir do qual se obteve a actividade basal da Ca^{2+} -ATPase (ou actividade acoplada total) das duas preparações. Ao se adicionar, seguidamente, 5 mM do agente quelante EGTA, sequestrou-se praticamente todo o cálcio presente no meio reaccional e bloqueou-se a actividade enzimática dependente de Ca^{2+} , sem afectar as restantes actividades. Estimou-se, deste modo, a actividade basal independente de cálcio (ou actividade acoplada independente de cálcio); subtraindo este valor ao anterior, estimou-se a actividade basal dependente de cálcio (ou actividade acoplada dependente de cálcio). Pode-se inferir, daqui, se as vesículas se encontram seladas e, ainda, o grau de pureza das mesmas.

Com vista a se determinar a actividade máxima da bomba de cálcio nas preparações de VRS ou GL-RS, adicionou-se 4% (p/p, em relação à proteína) do ionóforo calcimicina (ou A_{23187}) à mistura reaccional descrita previamente e após adição das preparações de RS ou GL-RS. Na presença deste ionóforo (selectivo para os iões divalentes de cálcio), a membrana sarcoplasmática torna-se permeável aos iões Ca^{2+} , de modo que o efluxo destes através dos canais iónicos assim formados acaba por aumentar; o gradiente de cálcio torna-se inexistente. Por conseguinte, a actividade hidrolítica da bomba foi analisada em condições nas quais a acumulação de Ca^{2+} não limita a reacção (pois a sua concentração intra e extracelular atinge um equilíbrio, dizendo-se que a hidrólise de ATP se desacopla do transporte vectorial de Ca^{2+}) e em que o sistema passa a funcionar à sua velocidade máxima (Aureliano & Madeira, 1994).

Após a adição de calcimicina às amostras de RS e GL-SR, que permitiu determinar a actividade desacoplada total da Ca^{2+} -ATPase, adicionou-se EGTA como anteriormente, por forma a se determinar a actividade desacoplada independente de cálcio e depreender a actividade desacoplada dependente de cálcio, em ambas as preparações. Dado que as enzimas PK e LDH se encontram em excesso no meio de reacção, a velocidade de conversão do NADH, monitorizada a 340 nm e 25 °C, estará limitada pela produção de ADP e Pi pela bomba. O ATP, como é regenerado, mantém a sua concentração inicial.

2. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DE VANÁDIO

2.1. Preparação de soluções de vanadato

As soluções *stock* de vanadato foram preparadas segundo protocolos descritos por Csermely *et al.* (1985) e Aureliano & Madeira (1994), numa concentração de 40 e 10 mM, por dissolução de metavanadato de amónio (NH_4VO_3) em água mili-Q, mediante agitação magnética e um ligeiro aquecimento. Seguidamente, recolheu-se cerca de metade desta solução amarela, denominada “solução de metavanadato” (pH = 7), e adicionou-se HCl 5 M de modo a se ajustar o potencial hidrogeniónico, baixando-o até 4,0; a mistura homogénea resultante é uma “solução de decavanadato”, cuja cor alaranjada é um indicador da presença de espécies decaméricas estáveis (Aureliano & Madeira, 1998). Ambas as soluções foram armazenadas a 4 °C e mantidas em gelo sempre que

utilizadas. A solução de “decavanadato” foi sempre submetida a um acerto de pH a 7,0, adicionando-se NaOH 5 M, imediatamente antes dos estudos *a priori*.

2.2. Preparação de soluções de complexos orgânicos coordenados de vanádio

Em todos os estudos descritos, utilizaram-se complexos orgânicos coordenados de vanádio sintetizados no Departamento de Química da Colorado State University, pela equipa de investigação liderada por Debbie C. Crans, de acordo com os procedimentos descritos por Crans *et al.* (2000) e Buglyo *et al.* (2005) (PDC-V(V)), Caravan *et al.* (1995) (BMOV-V(IV)) e Smith *et al.* (1997) (HAIDA-V(IV)). Prepararam-se, assim, soluções *stock* de PDC-V(V) 10 mM, BMOV-V(IV) 10 mM e HAIDA-V(IV) 40 mM (todas com pH aproximadamente 6,5), por dissolução em água bi-destilada e solução tampão MOPS 50 mM (pH 6,83), com agitação enérgica, e imediatamente antes de cada utilização, do modo referido por Aureliano *et al.* (2008).

3. ANÁLISE DA ACTIVIDADE DE Ca^{2+} -ATPASE NA PRESENÇA DE COMPOSTOS DE VANÁDIO

3.1. Determinação da actividade hidrolítica de Ca^{2+} -ATPase

A actividade hidrolítica da bomba de cálcio foi medida na presença do complexo orgânico insulino-mimético PDC-V(V) e do análogo de Amavadina HAIDA-V(IV), recorrendo-se ao sistema enzimático acoplado PK/LDH já descrito (alínea 1.4.3. do Procedimento Experimental). Através da adição de ADP à mistura reaccional inferiu-se a interferência que os complexos de vanádio poderiam exercer no sistema e mediante análise de espectros de absorção dos três complexos em estudo na presença de vários componentes do sistema acoplado (por espectroscopia de Ultravioleta/Visível) confirmou-se a eficácia do método. Pretendendo-se determinar a actividade máxima (desacoplada) de VRS na presença de 25 e 100 μM de PDC-V(V) e de 325 e 1000 μM de HAIDA-V(IV), adicionaram-se 7 μg de vesículas a uma mistura de reacção contendo HEPES-KOH 31,25 mM (pH 7), KCl 125 mM, MgCl_2 6,25 mM, CaCl_2 62,5 μM , PEP 0,42 mM, NADH 0,25 mM, 104,3 μL de H_2O , 25 μg de PK, 25 μg de LDH e 4 % (p/p) do ionóforo selectivo de cálcio (calcimicina). Seguidamente, incubaram-se os complexos em estudo com as VRS, durante cinco minutos, após os quais se iniciaram as reacções do sistema acoplado mediante a junção de ATP 2,5 mM (num volume final de 700 μL); o decréscimo de absorvância a 340 nm foi seguido durante 20 minutos, em todos os ensaios (incluindo o ensaio-controlo, sem vanádio somado).

Calculou-se a actividade hidrolítica, de cada situação, como descrito na alínea 1.4.3. do Procedimento Experimental e determinou-se o valor da percentagem de inibição (% de controlo) para cada concentração e

complexo coordenado de vanádio, através da equação II.7 (onde I, $a_{(\text{inibidor})}$ e $a_{(\text{controlo})}$ correspondem, respectivamente, à percentagem de inibição, à actividade na presença de complexo e à actividade na ausência de complexo):

$$(II.7) \quad I (\% \text{ de controlo}) = 100 \cdot [1 - a_{(\text{inibidor})} / a_{(\text{controlo})}] \quad (\text{Aureliano, 1995})$$

Estes estudos foram levados a cabo no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade da Extremadura (Badajoz).

3.2. Análise da acumulação de Ca^{2+} por radiometria com ^{45}Ca

Para determinar a velocidade de transporte de cálcio por VRS, recorreu-se a uma técnica cinética descontínua de radiometria, utilizando-se o isótopo radioactivo ^{45}Ca , e de acordo com o protocolo de filtração descrito por Cuenda *et al.* (1993). Através deste método, as vesículas microssomais são levadas a acumular ^{45}Ca pela actividade da bomba de cálcio; após a filtração de amostras extraídas do meio reaccional em períodos específicos, e a retenção do radioisótopo em filtros apropriados, é possível quantificar o cálcio acumulado pela enzima. Para isso, procede-se à medição do decaimento radioactivo do ^{45}Ca contido nos filtros, utilizando-se um contador de cintilações, que avalia o número de partículas radioactivas emitidas pelo núcleo instável do isótopo. De modo a que as cintilações contadas correspondam à quantidade de Ca^{2+} acumulado, é necessário ter em conta não só a radioactividade basal como também a actividade específica (cintilação contada por nmol de cálcio) do radioisótopo (Tada *et al.* 1978; Galina & de Meis, 1991; Aurelino, 1995; Cuenda *et al.*, 1993).

Os estudos cinéticos por Radiometria de ^{45}Ca , que a seguir se descrevem, foram elaborados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade da Extremadura (Badajoz).

Incubaram-se 0,01 mg de VRS com PDC-V(V), BMOV-(IV), HAIDA-V(IV), solução de decavanadato e solução de metavanadato nas concentrações de, respectivamente, 25 μM , 40 μM , 325 μM , 50 μM e 100 μM (IC_{50} determinados como descrito por Aureliano *et al.*, 2008), durante 5 minutos, num meio reaccional contendo MOPS-KOH 50 mM, pH 7, sacarose 200 mM, KCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, oxalato de potássio 5 mM e ^{45}Ca 45 μM (que, somada à concentração no lúmen de RS, rondará a concentração total de 50 μM). O transporte foi iniciado pela adição de ATP 2,5 mM (perfazendo-se um volume total de 1 ml) às amostras que, ao fim de 10 e 30 segundos, foram depuradas em filtros *Millipore* (com poros de 0,45 μm de tama-nho) embebidos numa solução de LaCl 3 mM, KCl 0,1 M, MgCl_2 5 mM e Tricina/Tris 50 mM (pH 7) e colocados previamente num sistema de filtração a vácuo *Millipore*. Seguidamente, lavaram-se os filtros com quantidades abundantes da mesma solução, por forma a se eliminar o ^{45}Ca que não foi transportado.

Os filtros com ^{45}Ca retido foram depois colocados em frascos próprios (*vials*), adicionando-se 2 mL de etilenoglicol (que desfaz a membrana do RS), por forma a desintegrá-los e transformá-los numa mistura homogénea, após o que se juntou uma solução de cintilação constituída por tolueno, agitando-se. Por fim, determinou-se a radioactividade de cada filtro, medida em cada *vial* num contador de cintilações *Beckman LS 3801*. A radioactividade padrão (dependente da actividade específica do radioisótopo) foi determinada mediante contagem de cintilações de três amostras de 60 μL de ^{45}Ca (que correspondem a 3 nmoles de ^{45}Ca) incorporado no meio reaccional, que se colocaram numa tira de papel e, em seguida, no *vial* respectivo. A radioactividade basal (“tempo zero”) foi estimada a partir de uma amostra de meio reaccional com ^{45}Ca , VRS e vanádio; os controlos (ausência de vanádio), para cada tempo de transporte, consistiram em meio reaccional com ^{45}Ca , VRS e ATP adicionados. Estas duas amostras foram filtradas, lavadas e levadas ao contador como anteriormente.

De modo a avaliar o efeito de oxalato no ensaio descrito acima, repetiu-se o mesmo procedimento experimental num meio reaccional sem oxalato e sem sacarose adicionados (uma vez que se verificou que esta não promovia alterações no sistema experimental), na presença de PDC-V(IV) 100 μM , BMOV-V(V) 100 μM e HAIDA-V(IV) 500 μM e considerando os tempos de transporte 5, 10, 30 e 60 segundos.

3.3. União de cálcio a VRS: análise radiométrica com ^{45}Ca e ^3H -glicose

Por forma a se estimar a quantidade de Ca^{2+} ligada a vesículas de RS não-fosforiladas (excluindo-se a adição de ATP), recorreu-se a uma técnica radiométrica de ^{45}Ca e ^3H -glicose descrita por Henao *et al.* (1991). Deste modo, incubaram-se 0,3 mg/mL de VRS, durante 5 minutos, com cada solução ou complexo de vanádio nas concentrações estipuladas que, em seguida, foram adicionadas a 2,2 mL de tampão de fixação de ^{45}Ca constituído por MOPS-Tris 50 mM (pH 7), KCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, ^{45}Ca 100 μM e ^3H -glicose 100 μM . Filtraram-se, de imediato, 2 mL desta suspensão (0,3 mg de VRS), para cada situação, através de filtros *Millipore* (com poros de 0,45 μm de tamanho) embebidos numa solução de LaCl 3 mM, KCl 0,1 M, MgCl_2 5 mM e Tricina/Tris 50 mM (pH 7) e colocados previamente num sistema de filtração a vácuo *Millipore*. De notar que não foram efectuadas as lavagens anteriormente descritas (ponto 4.2.1 do Procedimento Experimental).

Para contagem de cintilações padrão, utilizaram-se três amostras de meio reaccional com 60 μL de ^{45}Ca (que correspondem a 3 nmoles de ^{45}Ca) e no caso dos controlos (ausência de vanádio), amostras contendo ^{45}Ca , ^3H -glicose e VRS (em meio reaccional).

Posteriormente, colocaram-se os filtros (com o ^{45}Ca livre, retido nas suas malhas) em *vials* e adicionaram-se 2 mL de líquido de cintilação contendo tolueno (não se adicionou etilenoglicol, para não se desfazer a membrana das vesículas, nem libertar o Ca^{2+} que a elas se ligou). A radioactividade de ^{45}Ca e de ^3H -glicose de cada amostra foi então medida num contador de cintilações *Beckman LS 3801*. Subtraindo-se a radioactividade emitida por ^{45}Ca da radioactividade irradiada por ^3H -glicose (expressando-se o seu valor em nmol de ^{45}Ca /mg de SERCA), estimou-se a quantidade de Ca^{2+} ligada às VRS (expressa em nmoles de ^{45}Ca ligado/mg proteína).

4. DETERMINAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DE Ca^{2+} -ATPASE NA PRESENÇA DE COMPOSTOS DE VANÁDIO

Assentando no fenómeno natural que envolve a emissão de radiação electromagnética por um cromóforo, alguns nano-segundos (10^{-9} s) após a absorção desta, a fluorescência é uma técnica de espectroscopia de emissão muito utilizada na análise de interacções do tipo ligando-proteína, devido à sua elevada sensibilidade e facilidade de utilização. Não é, contudo, uma característica de todas as moléculas biológicas e, apesar de muitas proteínas possuírem esta propriedade dita intrínseca, torna-se necessária, por vezes, a incorporação (geralmente de forma covalente) de uma sonda fluorescente (Shenaan, 2000; Loura & Almeida, 2004).

A absorção da radiação electromagnética provoca a transição de um electrão para uma orbital molecular de maior energia, num processo que ocorre muito rapidamente (10^{-15} segundos). Dado que, neste estado excitado, os núcleos da molécula excitada, a densidade da nuvem electrónica e os grupos circundantes carregados deixam de estar nas suas posições de equilíbrio, tendem a sofrer uma transição não radiativa (em aproximadamente 10^{-12} segundos) para um estado excitado de menor energia. A energia deste estado excitado pode ser dissipada, então, mediante a emissão de um fóton, dando lugar a um fenómeno denominado luminescência (emissão de luz por uma substância); esta é geralmente discriminada em duas categorias, dependendo da natureza do estado excitado: a emissão de luz a partir de um “estado excitado singuleto” é denominada por fluorescência, ao passo que quando provém de um “estado excitado tripleto” (originado quando o *spin* de um electrão roda) produz fosforescência. No chamado “estado excitado singuleto”, o electrão na orbital desse estado mantém o seu *spin* emparelhado com um electrão na orbital do estado fundamental; como estes electrões têm valores de *spin* opostos, o retorno do electrão excitado ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente, com emissão de um fóton (Lakowicz, 1999; Shenaan, 2000; Loura & Almeida, 2004).

O tempo de vida de fluorescência e o rendimento quântico (Q), constituem as características mais importantes de um fluoróforo. O rendimento quântico é definido como o número de fótons emitidos em relação ao número de fótons absorvidos; fluoróforos com maior rendimento quântico (próximo da unidade) são os que apresentam emissões mais intensas. O tempo de vida do estado excitado, por seu turno, determina o tempo disponível para o fluoróforo interagir ou se difundir no seu ambiente e, deste modo, também estabelece a informação que é possível extrair desta emissão (Shenaan, 2000; Loura & Almeida, 2004).

Devido à escala temporal da fluorescência, a maioria das medições dizem-se ser de estado estacionário, pois quando a amostra é exposta à luz (com um feixe de luz contínuo, monitorizando-se a intensidade ou o espectro de emissão), o estado estacionário é atingido quase instantaneamente e o espectro de fluorescência pode fornecer informação sobre o ambiente que rodeia o fluoróforo. Tal é possível uma vez que este espectro de emissão varia largamente de molécula para molécula, estando igualmente dependente da estrutura química do fluoróforo e do ambiente que o rodeia. Desta forma, o espectro de emissão (e excitação) de fluoróforos intrínsecos, extrínsecos e prostéticos fornece dados sobre a conformação de uma proteína, a interacção desta com um ligando e a acessibilidade do fluoróforo a supressores de fluorescência (*quenchers*) (Lakowicz, 1999).

Até 1976 o pouco que se sabia acerca da estrutura de Ca^{2+} -ATPase era retirado de experiências com técnicas ópticas (como a técnica de dispersão de luz –*light scattering*– ou a dispersão óptica rotacional – ORD no original), ressonância electrónica paramagnética (EPR no original) e difracção de raios-X (Dupont *et al.*, 1988). Contudo, quando de Meis *et al.* propuseram, em 1976, um esquema cinético mais realista para a sequência de reacções da Ca^{2+} -ATPase levou à aplicação de técnicas de estado-estacionário, de entre as quais a fluorescência. Esta demonstrou ser, não só, um método de elevada sensibilidade e resolução temporal, como também, a mais eficiente e produtiva até então, começando-se com a evidência de que o espectro de emissão de fluorescência intrínseca da bomba é alterado na presença alternada de ATP ou cálcio. Dado que os dois estados conformacionais, E1 e E2, são adquiridos consoante a proteína interage, ou não (respectivamente), com os seus ligandos naturais, e tendo em conta que ambos os estados apresentam diferentes fluorescências, é possível diferenciá-los por espectroscopia de emissão. Adicionalmente, a própria enzima demonstrou ser um modelo promissor na aplicação desta ferramenta a outras proteínas (de Meis, 1981; Champeil *et al.*, 1986; Dupont *et al.*, 1988).

Os estudos de fluorescência descritos no presente trabalho consistem em medições de estado-estacionário que recorrem à análise da fluorescência intrínseca ou à fluorescência de sondas incorporadas (extrínseca) e foram realizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade da Extremadura.

4.1. Análise da ligação de ATP à Ca^{2+} -ATPase e da alteração E1/E2

4.1.1. Por Fluorescência Intrínseca

A fluorescência de aminoácidos específicos, e em particular a do triptofano, tem demonstrado fornecer dados valiosos sobre o ambiente local destes nas proteínas e contribuiu para a resolução da estrutura da Ca^{2+} -ATPase, durante o ciclo reacional. Com efeito, muita da informação sobre as alterações conformacionais que a proteína sofre aquando da ligação dos seus substratos (MgATP e Ca^{2+}), assim como a transformação do seu conformero E1 no conformero E2, adveio da aplicação de técnicas de espectroscopia de emissão. Estas são, actualmente, amplamente utilizadas no estudo da interacção deste modelo transmembranar com variados ligandos de interesse, como o vanádio (Champeil *et al.*, 1986).

Quando a bomba de cálcio de RS é iluminada com radiação de comprimento de onda a 290 nm, emite uma fluorescência cujo espectro de emissão apresenta um máximo centrado a 330 nm. Esta fluorescência deve-se principalmente aos 13 resíduos de triptofano da molécula (denominando-se fluorescência intrínseca, fluorescência da proteína ou fluorescência de triptofanos), que constituem grupos repórter bastante sensíveis na indicação de alterações conformacionais, mesmo as mais súbteis (os resíduos aromáticos de tirosina também contribuem, embora em menor extensão); a fluorescência intrínseca da proteína é considerada, pois, um bom indicador das transições entre os vários intermediários do ciclo catalítico. Em adição, reconhece-se actualmente a existência de diferentes classes de resíduos de triptofano que estão intimamente relacionados com várias alterações

conformacionais características, entre elas as que procedem a ligação de cálcio à bomba e a alteração E1/E2 (de Foresta *et al.*, 1990; Garcia-Martín *et al.*, 1990; Henao *et al.*, 2005).

A união de ATP ao local catalítico da Ca^{2+} -ATPase, bem como a alteração conformacional E1/E2, foram avaliados mediante o registo da emissão de fluorescência de triptofanos, a 330 nm ($\lambda_{\text{Exc}} = 290$ nm), após a adição de Mg^{2+} 2 mM e, em seguida, de ATP 100 μM . Todos estes registos foram efectuados num espectrofluorímetro *Perkin-Elmer*. Os “saltos” na fluorescência ($\Delta F/F_0$) foram estimados em todas as experiências e convertidos em percentagens (calculando-se $\Delta F/F_0 \cdot 100\%$) (Tiago *et al.*, 2002).

4.1.2. Por Fluorescência Extrínseca

Os fluoróforos extrínsecos, que são usualmente sondas externas ligadas covalentemente à proteína em análise, apresentam algumas vantagens em relação aos fluoróforos intrínsecos (nomeadamente, os resíduos de triptofano das proteínas), embora o seu uso também possa levantar alguns contratempos. A maior vantagem das sondas fluorescentes reside no facto de poderem ser escolhidas de forma a possuírem comprimentos de onda de emissão e excitação específicos, tempos de vida mais longos e/ou maior resposta a alterações de polaridade. Conjuntamente, estas sondas deverão ser sensíveis aos efeitos que se pretende monitorizar e que não poderão perturbar a estrutura e funções da proteína na qual foram incorporadas. Quando todas estas condições são conciliadas, os sinais obtidos por fluorescência extrínseca podem revelar-se mais esclarecedores do que aqueles que se obtém pela fluorescência intrínseca da proteína; note-se que o triptofano, por existir em abundância em muitas proteínas, torna a interpretação dos resultados relativamente complexa. Adicionalmente, quando são incorporadas num único local concreto da proteína, estas moléculas extrínsecas vão fornecer informações mais fidedignas acerca do mesmo (Lakowicz, 1999; Shenaar, 2000).

A monitorização da fluorescência extrínseca de proteínas tem sido obtida com uma grande variedade de sondas fluorescentes que reagem principalmente com grupos sulfidrilo ou amina (Lakowicz, 1999). A bomba de cálcio do RS, por exemplo, é específica e estequiometricamente marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), um fluorocromo que deriva do xanteno fluoresceína e que é amplamente utilizado como marcador dos grupos amina laterais de resíduos de lisina. No caso da bomba, este composto é selectivamente incorporado no resíduo lisina 515 (Lys515), que se localiza no sítio nucleotídico (próximo do local de ligação de ATP, mas excluído do domínio de fosforilação); a reacção tem sido descrita como sendo competitiva em relação ao ATP, cuja ligação se vê inibida mediante impedimento estérico originado pela presença (na estrutura tridimensional da proteína) do derivado da fluoresceína (Pick, 1981; Mitchison *et al.*, 1982; Henao *et al.*, 1991; McIntosh *et al.*, 2008).

A marcação da proteína transmembranar com FITC foi realizada em meio alcalino, de modo a garantir que o grupo amina lateral do resíduo de Lys515 se mantenha protonado, para que possa reagir com a sonda; este meio não poderá ser demasiado alcalino, caso contrário poderá desnaturar-se a proteína ou inutilizar as VRS. A

incorporação de FITC foi levada a cabo mediante o protocolo descrito por Pick (1981), Mitchinson *et al.* (1982) e Champeil *et al.* (1988).

O FITC foi dissolvido em dimetilformamida, imediatamente antes da sua utilização e numa concentração de 2 mM, evitando-se a sua oxidação. Seguidamente, incubaram-se amostras de VRS 1 mg/mL em Tricina-Tris 10 mM, pH 8, sacarose 0,3 M, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0,01 mM com diferentes concentrações de FITC (sempre inferiores a 20 µM), mantendo-se a suspensão em zona escura durante trinta minutos. De notar que o volume de FITC que se utiliza na marcação não deverá exceder 1 a 2 % do volume final do meio de incubação, caso contrário, poder-se-á comprometer a estabilidade das vesículas e da proteína.

Depois de se abrandar a reacção de incorporação, colocando-se as amostras em gelo após o período de incubação, realizou-se uma centrifugação (3000 rpm em rotor 65 Ty de centrífuga Beckman), desprezando-se o sobrenadante resultante. O precipitado, constituído por VRS com SERCA-FITC, foi lavado em solução de ressuspensão de VRS (TES-KOH 0,1 M pH 7,4; Sacarose 0,25 mM; KCl 0,1 M), ressuspendido e homogeneizado em solução tampão de marcação. Centrifugou-se novamente, nas mesmas condições, lavou-se, ressuspendeu-se e homogeneizou-se em tampão de ressuspensão de VRS. Esta dupla centrifugação pretendeu levar à eliminação de excesso de FITC (FITC livre), evitando-se uniões inespecíficas. As alíquotas de SERCA-FITC podem ser conservadas a -80 °C.

O grau de marcação foi determinado através da quantificação da enzima com FITC ligado, por espectrofotometria de Ultravioleta-Visível a 280 e a 495 nm, respectivamente os máximos de absorvância de uma proteína e de FITC (Henao & Gutierrez-Merino, 1989). Deste modo, adicionou-se uma solução de SDS 1 % (que solubiliza as membranas de RS e evita que estas provoquem a dispersão de luz com a sua presença) e NaOH 0,1 M (deve-se manter o pH em níveis alcalinos, pois a absorvância do FITC é máxima nestas condições) a uma alíquota de SERCA-FITC, na *cuvette* de medição, determinando-se o espectro de absorção (comprimentos de onda de 260 a 600 nm) da amostra de SERCA-FITC; mediante o valor da absorvância nos máximos de 280 e 495 nm (e sabendo que 6,8 cm no espectro correspondem a 0,4 DO), calculou-se a concentração de bomba-FITC, recorrendo-se à lei de Beer-Lambert (Equação II.2) e utilizando-se o coeficiente de extinção molar da proteína (1,1 M⁻¹cm⁻¹) e do FITC (80000 M⁻¹cm⁻¹). Finalmente, estimou-se a razão FITC/SERCA.

Marcando a Ca²⁺-ATPase do RS com FITC, que tem sido utilizado como sonda específica do local catalítico, é possível detectar as alterações conformacionais E1/E2, através da sua excitação ao comprimento de onda de 495 nm e medição da sua fluorescência no máximo de emissão centrado a 525 nm (Henao *et al.*, 1991; Henao *et al.*, 2005). Assim, juntaram-se soluções de metavanadato 100 e 200 µM, decavanadato 50 e 100 µM, PDC 25 µM, BMOV 40 µM ou HAIDA 325 µM a 2,5 mL de uma solução contendo VRS 0,1 mg/mL. À adição de vanádio seguiu-se, em todos os ensaios, o acréscimo de EGTA 2 mM e, finalmente, de Ca²⁺ 3 mM. Os “saltos” de fluorescência foram calculados como anteriormente.

4.2. Extinção da fluorescência em SERCA-FITC: acessibilidade de KI ao FITC

A extinção da fluorescência, ou *quenching*, é um processo fotofísico no qual ocorre a supressão ou diminuição na intensidade da fluorescência de um determinado fluoróforo. O *quenching* pode dar-se devido a vários fenómenos, entre eles a transferência de electrões, prótons ou energia, formação de excímeros, rearranjos moleculares e o chamado *quenching* colisional (ou dinâmico). Este último sucede quando um fluoróforo no estado excitado é desactivado após colidir com uma outra molécula; esta é geralmente de diferente natureza, actua como supressora ou extintora da fluorescência do fluoróforo e é usualmente denominada *quencher*. Após a colisão, o fluoróforo regressa ao estado fundamental (sem emissão de um fóton e sem alterações químicas permanentes em ambas as moléculas) (Lakowicz, 1999; Valeur, 2002).

Ao oferecer uma via alternativa de despopulação do estado excitado, os *quenchers* reduzem a fluorescência de um dado fluoróforo, desde que se consigam mover para a proximidade do centro fluorescente. Assim, a acessibilidade destes supressores ao meio fluorescente é um parâmetro que dita a eficácia do *quenching* colisional. Este fenómeno é caracterizado pela equação clássica de Stern-Volmer (Equação II.8), que estima o decréscimo na intensidade da fluorescência:

$$(II.8) \quad F_0/F = 1 + K_{sv} [Q]$$

Na equação de Stern-Volmer, F_0 e F correspondem à intensidade da fluorescência antes e depois da adição do agente extintor (Q), respectivamente; K_{sv} representa a constante de *quenching* efectiva (ou constante de Stern - Volmer) e corresponde à concentração de agente supressor na qual a fluorescência é 50 % da inicial. De acordo com esta equação, um gráfico de $1/F$ versus $[Q]$ (concentração de *quencher* em função do inverso da intensidade final da fluorescência) deverá ser linear, interceptando o eixo das ordenadas em 1 e com um declive que é o valor de K_{sv} ; uma constante de Stern-Volmer elevada indica uma grande acessibilidade do *quencher* ao centro fluorescente (Lakowicz, 1999; Loura & Almeida, 2004; Henao *et al.*, 2005).

A constante de Stern-Volmer é bastante utilizada como indicador do modo de exposição de grupos fluorescentes ao meio envolvente, em macromoléculas como as proteínas. Tendo em conta que a exposição ou geometria desses grupos pode ser modificada pelas alterações conformacionais de uma proteína, uma análise de Stern-Volmer, antes e depois da ocorrência do *quenching*, pode ser um óptimo indicador das características dessas alterações, assim como da interacção de um ligando com a proteína de interesse (Lakowicz, 1999).

Para titulação, com KI, da fluorescência de Ca^{2+} -ATPase marcada com o fluoróforo FITC ($\lambda_{\text{Excitação}} = 495$ nm; $\lambda_{\text{Emissão}} = 520$ nm), adicionou-se, numa *cuvette* de medida, 0,2 mg/mL da proteína marcada a 2,5 mL de meio de medida (com composição idêntica à descrita na alínea 5.1.1.a), seguida do acréscimo de solução de metavanadato 100 μ M ou de decavanadato 50 μ M. Após 5 minutos de incubação, registou-se o *quenching* da

fluorescência através da adição de várias alíquotas de uma solução de KI 5 M previamente preparada em água bi-distilada; foram efectuados 4 pulsos de 12,5 μL (correspondentes às concentrações de KI 25, 50, 75 e 100 mM), 6 de 25 μL (concentrações de KI de 150, 200, 250, 300, 350 e 400 mM) e 3 de 50 μL (KI 500, 600 e 700 mM). O controlo foi obtido por determinação do valor da fluorescência da SERCA-FITC diluída em meio de medida, sem suplementação com soluções de vanadato e titulando-se como anteriormente.

Seguidamente, determinou-se a constante de Stern-Volmer para todas as situações em estudo, mediante análise da representação gráfica da equação clássica de Stern-Volmer (Equação II.8).

4.3. Determinação de anisotropia ou polarização da fluorescência

O fenómeno de anisotropia de fluorescência baseia-se no princípio da excitação foto-selectiva de fluoróforos por luz polarizada; a absorção e a emissão de luz na molécula em análise ocorrem preferencialmente quando a radiação tem polarização segundo um determinado eixo molecular. Esta excitação selectiva resulta numa população parcialmente orientada de fluoróforos excitados e, conseqüentemente, numa emissão de fluorescência parcialmente polarizada. O ângulo relativo destes momentos vai determinar a anisotropia (r) ou a polarização (P) da fluorescência, que se definem através das equações II.10 e II.11. Nestas equações, $I_{||}$ e I_{\perp} representam as intensidades da emissão de luz polarização paralela e perpendicular, respectivamente, à da radiação de excitação (luz polarizada vertical) (Lakowicz, 1999; Loura & Almeida, 2004).

$$(II.10) \quad r = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + 2I_{\perp})$$

$$(II.11) \quad P = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + I_{\perp})$$

A anisotropia e a polarização exprimem o mesmo fenómeno e podem ser inter-convertidas mediante as equações II.12 e II.13 (Lakowicz, 1999):

$$(II.12) \quad r = 2P / (3 - P)$$

$$(II.13) \quad P = 3r / (2 + r)$$

Para moléculas esféricas (e considerando-se que outros processos, para além da difusão rotacional, não contribuem para uma perda de r), a anisotropia pode ser dada pela equação de Perrin (Equação II.14), na qual r_0 é o valor de anisotropia que se esperaria na ausência de difusão rotacional (para muitos fluoróforos, o valor teórico

máximo de r_0 é 0,4), τ corresponde ao tempo de vida do fluoróforo e θ é o seu tempo de correlação rotacional (Loura & Almeida, 2004).

$$(II.14) \quad r = r_0 / (1 + \tau/\theta)$$

A anisotropia mede, portanto, a quantidade de rotação molecular durante o tempo de vida excitado da molécula e é sensível, pois, à rigidez do ambiente molecular, às barreiras que neste são encontradas (e, assim, à fluidez de uma bicamada lipídica) e à forma e tamanho do fluoróforo (factores que afectam θ). Se, durante o tempo de vida do estado excitado, o fluoróforo mudar a sua orientação, a anisotropia irá diminuir, efeito que tem sido aplicado na medição das chamadas rotações *brownianas* (rotações moleculares aleatórias, irregulares e contínuas, ocasionadas por colisões entre as moléculas; representam a energia térmica do sistema), de fluoróforos ligados a proteínas. Isto, porque, um fluoróforo numa solução aquosa não-viscosa apresenta tipicamente uma anisotropia próxima de zero (pois não existem restrições ao seu movimento e a rotação do fluoróforo é mais rápida que a emissão de fluorescência); todavia, se for transferido para uma macromolécula os efeitos de difusão rotacional diminuem (uma vez que aumentam as barreiras e a difusão depende da orientação da molécula) e, conseqüentemente, a anisotropia aumenta (Lakowicz, 1999; Loura & Almeida, 2004).

Assim, compreende-se que proteínas com menor massa molecular tenham tempos de correlação rotacional menores e que, por isso, se espera que originem anisotropias menores. A anisotropia de proteínas maiores também pode ser baixa, se forem covalentemente modificadas com fluoróforos que possuam um tempo de vida longo. Os tempos de correlação rotacional da maioria das proteínas são comparáveis aos tempos de vida de fluoróforos típicos; como resultado, as medições da anisotropia de fluorescência em proteínas são sensíveis a qualquer factor que afecte a velocidade de difusão rotacional como pode acontecer no caso de uma proteína embebida numa membrana (Lakowicz, 1999).

Esta técnica, que permite obter informação acerca da fluidez de biomembranas, implica a introdução de uma molécula hidrofóbica fluorescente na bicamada, que actuará como sonda. Após se fazer incidir luz de excitação polarizada sobre essa sonda, esta irá emitir radiação cuja polarização será afectada pela fluidez do meio. Deste modo, se o valor da polarização de emissão for igual ao da de excitação, pode-se deduzir que a sonda tem a liberdade de movimento restringida; se, pelo contrário, existir uma despolarização (diminuição da anisotropia) da radiação fluorescente emitida, tal significará que a sonda alterou a sua orientação no período de tempo decorrido entre a excitação e a emissão. O grau de despolarização do sinal emitido reflecte, portanto, a microviscosidade da membrana (Loura & Almeida, 2004; Vinagre, 2007).

A fluidez da membrana de retículo sarcoplasmático foi analisada, neste sentido, por espectroscopia de polarização de fluorescência (ou, anisotropia de fluorescência), recorrendo-se à sonda 1,4-trimetilaminofenil-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH); este derivado catiónico da sonda fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) é rapidamente incorporado (em 15 minutos) na região polar das biomembranas, verticalmente, onde permanece localizado durante 30 minutos, de modo restricto (Vinagre, 2007). Antes de se iniciar a monitorização da fluidez

da bicamada, e assim verificar se as soluções e compostos de vanádio em estudo provocam alguma alteração na membrana sarcoplasmática que possa afectar as propriedades estruturais e/ou funcionais da SERCA, calculou-se a quantidade de sonda a adicionar; esta terá de estar numa proporção de 1 mole de sonda por cada 500 moles de lipidos. Sabendo-se que a relação lipido-proteína, no RS, é de 90:1, determinou-se serem necessárias 0, 242 µg de TMA-DPH.

A quantidade previamente estimada de sonda foi incubada, durante 15 minutos, a 37 °C e mediante agitação constante (suave), após se adicionarem 0,4 mg de VRS a uma *cuvette* contendo 2 mL de tampão de medição (MOPS-Tris 200 mM pH = 7,4, EGTA 2 mM e MgCl₂ 5 mM). Depois da incorporação de TMA-DPH na membrana de VRS, somou-se a cada amostra a concentração prescrita de cada complexo orgânico de vanádio em estudo, nomeadamente, HAIDA 1 e 2 mM ou PDC 200 500 e 1000 µM ou BMOV 200, 500 e 1000 µM. Incluiu-se a preparação de um controlo, que foi feita de igual forma e na ausência de vanádio.

Seguidamente, mediu-se a polarização da fluorescência no comprimento de onda de excitação 360 nm e no de emissão 442 nm. Estas mensurações foram realizadas num espectrofluorímetro que, através de um polarizador, consegue orientar a direcção da luz que atravessa a amostra; determinou-se a polarização máxima com o plano de polarização da radiação paralelo ao do polarizador e, a polarização mínima, com esse plano perpendicular. O valor da polarização da fluorescência foi calculado através da equação II.15, onde P representa a polarização da fluorescência, G é o factor de anisotropia que depende o espectro-fluorímetro e do polarizador, I_{||} simboliza a intensidade de fluorescência com os polarizadores paralelos (0°/0°, respectivamente, excitação e emissão) e I_⊥, a intensidade quando estes são perpendiculares (0°/90°).

$$(II.15) \quad P = (I_{||} - GI_{\perp}) / (I_{||} + GI_{\perp}) \quad (\text{Vinagre, 2005})$$

Determinou-se o factor de anisotropia dependente do fluorímetro e do polarizador, G, através da expressão II.16:

$$(II.16) \quad G = I_{(90^{\circ}/0^{\circ})} / I_{(0^{\circ}/90^{\circ})} \quad (\text{Vinagre, 2005})$$

Mediante o valor de P, obteve-se o valor da anisotropia (r) recorrendo-se à equação II.12, embora também pudesse ser determinada pela equação II.18.

$$(II.18) \quad r = (I_{||} - GI_{\perp}) / (I_{||} + 2GI_{\perp}) \quad (\text{Vinagre, 2005})$$

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA BOMBA DE CÁLCIO EM PREPARAÇÕES DE VESÍCULAS E DE COMPLEXO GLICOGENOLÍTICO ASSOCIADO A RETÍCULO SARCOPLAS-MÁTICO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO

Através dos protocolos de isolamentos usualmente efectuados pelos diversos grupos que investigam a Ca^{2+} -ATPase, desde a sua descoberta por Hasselbach & Makinose (1961), consegue-se obter um sistema experimental que tem dado valiosos contributos na elucidação do mecanismo molecular, funcional e estrutural, das bombas iónicas (Ebashi & Lipmann, 1962; Da Costa e Madeira, 1986). Concomitante-mente, esse conhecimento possibilitou a clarificação de várias vias de transdução de sinais e energia, que possuem na sua base a translocação de diversos iões e metabolitos, entre eles o conhecido segundo mensageiro Ca^{2+} ; é o caso de funções celulares chave como a proliferação, secreção e metabolismo e de fenómenos tão complexos quanto a contracção muscular, fertilização, batimento cardíaco e transmissão sináptica (MacLennan, 2000; Groof *et al.*, 2002). Identificaram-se, também, diversos distúrbios associados ao aumento demasidado prolongado dos níveis intracelulares de cálcio (dissipada mediante o funcionamento das bombas de cálcio de retículo sarcoplasmático e de membrana plasmática) em parte devido ao facto de este ião, em concentrações da ordem micromolar, conduzir à precipitação de ácidos orgânicos e fosfatos, activação da apoptose e, mesmo, a disfunções como a hipertermia maligna, doença de Brody e cardiomiopatias; o envolvimento da SERCA nas vias da insulina e, conseqüentemente, no desenvolvimento e/ou agravamento de *diabetes mellitus* (nomeadamente, do tipo 2) começa igualmente a ser considerado (Karpati *et al.*, 1986; MacLennan & Philips, 1992; Green & Reed, 1998; MacLennan, 2000; Aureliano *et al.* 2008).

1.1. Isolamento de VRS e GL-RS de músculo esquelético

Com o presente isolamento e fraccionamento do RS longitudinal, pretendeu-se obter Ca^{2+} -ATPase embebida no seu meio lipídico nativo, no qual a proteína se encontra uniformemente distribuída e mantém a sua actividade fisiológica. A fracção juncional de cisternas e de túbulos-T terminais foi desprezada neste processo, uma vez que a primeira é essencialmente livre da enzima e, a segunda, possui uma isoforma da Ca^{2+} -ATPase que exhibe propriedades distintas das manifestadas pela bomba da zona longitudinal. Para além disso, a zona terminal de cisternas é um subdomínio do RS especializado no efluxo de cálcio e rico em canais de cálcio do receptor de rianodina, contrariamente à parte longitudinal, que constitui o local específico onde o cálcio é acumulado (Hidalgo, 1983; Rossi *et al.*, 1990; Mintz & Guillain, 1997; Sorrentino, 2006).

Com tal em mente, adoptaram-se processos de isolamento (Carvalho & Leo, 1967; Da Costa & Madeira, 1986) compreenderam, fundamentalmente, três etapas: homogeneização, centrifugação diferencial e solubilização. No passo de homogeneização, obteve-se uma suspensão homogénea derivada da destruição das células

musculares e constituída por fragmentos de sarcolema e de outras membranas, das células musculares e do citoesqueleto, proteínas contrácteis (actina, miosina e complexo actomiosina) proteínas sarcoplasmáticas (e outros componentes solúveis), organelos subcelulares (intactos ou não) como núcleos, mitocôndrias, ribossomas, vesículas de RS “pesado” (túbulos-T) e, as vesículas de RS longitudinal (“leve”). Seguidamente, por centrifugação diferencial, removeram-se os núcleos, miofibrilhas, citoesqueleto, fragmentos da célula, mito-côndrias e outros materiais insolúveis que possam estar presentes, bem como partículas lipídicas ou de tecido conjuntivo eventualmente ainda na suspensão; tal foi conseguido mediante centrifugação e filtração alternadas. A força centrífuga usada permitiu que os elementos mais pesados sedimentassem, separando-os de elementos mais leves como as VRS; o sobrenadante obtido pode ser denominado pós-mitocondrial e é constituído maioritariamente por vesículas de RS impuras. Por centrifugação de longa duração e a força centrífuga relativamente mais elevada, excluíram-se fragmentos de sarcolema, túbulos-T e membranas leves, sedimentando as VRS longitudinais (MacLennan, 1970; Heuson-Stiennon *et al.*, 1972; Santos & Carvalho, 1978).

Na terceira etapa dos procedimentos seguidos, pretendeu-se a remoção das proteínas contrácteis e de outras proteínas sarcoplasmáticas contaminantes, através da sua solubilização numa solução de força iónica relativamente elevada. Dado que a solubilidade de uma proteína a determinada força iónica resulta de interacções polares com o solvente aquoso, de interacções iónicas com os sais presentes e de forças electroestáticas repulsivas (entre moléculas igualmente carregadas), a adição de sal pode estabilizar todas essas forças (pois fornece contra-íões que estabilizam as cargas iónicas proteicas), conduzindo à dissolução de proteínas num processo denominado *salting-in*; a concentração desse sal (neste caso, KCl 0,6 M) deverá ser suficientemente baixa para que as proteínas não se agreguem (o que levaria à sua precipitação), e mantenham a sua esfera de hidratação, e suficientemente alta para as estabilizar. Deste modo, na última centrifugação, as VRS deverão ter sedimentado e as proteínas contaminantes mantidas em solução no último sobrenadante desprezado (MacLennan, 1970; Santos & Carvalho, 1978; Scopes, 1982; da Costa & Madeira, 1986; Deutcher, 1990; Aureliano, 1995; Voet *et al.*, 2008).

Todavia, a preparações elaboradas como a descrita, tem sido associada a presença de quantidades elevadas de glicogénio (a molécula que armazena glicose), fosforilase do glicogénio e outras enzimas essenciais ao metabolismo glicogenolítico (entre elas, cinase da creatina, miocinase, cinase da fosforilase, glicosidase, desaminase do AMP, fosfoglutamase) e, também, ao metabolismo glicolítico (cinase do piruvato, enolase, mutase e cinase do fosfoglicerato, 3-fosfato-desidrogenase do gliceraldeído e aldolase, por exemplo). Com efeito, sabe-se actualmente que, na célula, estas enzimas estão física e parcialmente ligadas a densos grânulos de glicogénio que, por seu turno, se associam ao retículo sarcoplasmático (Wanson & Drochmans, 1972; Pickart & Jencks, 1982; Ross & McIntosh, 1987; Cuenda *et al.*, 1994; Xu & Becker, 1998; Lee & Jay, 2004; Hargreaves, 2004). Deste modo, por forma a se eliminarem estas macromoléculas contaminantes das preparações de vesículas de RS, introduziu-se uma adaptação no protocolo experimental de preparação de VRS até agora utilizado no laboratório do grupo: uma quarta etapa, que consistiu na diluição e solubilização final (em KCl 0,1 M; Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e sacarose 0,25 M) da suspensão, segundo a sugestão de Cuenda *et al.* (1994). Desenhando um novo procedimento para este isolamento, procurou-se a remoção de, pelo menos, 95% das partículas e enzimas associadas ao RS, para garantir que na

última centrifugação efectuada sedimentassem essencialmente fragmentos de retículo sarcoplasmático longitudinal (VRS).

Um dos problemas com que geralmente se depara no isolamento e purificação de uma enzima, reside na perda da sua funcionalidade e, por conseguinte, da sua actividade; tal pode ser atribuído a três factores principais, entre eles, a fragmentação da fracção microssomal final ou desnaturação da enzima. Assim, para se minimizarem danos nas vesículas, e prevenir a desnaturação da proteína nelas embebida, é necessário eliminar a ocorrência de extremos de pH e temperatura. O uso de uma solução com efeito tampão dentro do intervalo de pH celular (6 a 8) e a redução mínima da temperatura em 20 °C (realizando-se todo o isolamento a 0 °C – 4 °C, no gelo) permitiram estabilizar a enzima e diminuir (num factor de 3 a 5) a sua reactividade (Scopes, 1982; Deutcher, 1990). Adicionalmente, teve-se em conta a referência de Santos & Carvalho (1978), onde se descreveu que a manutenção de um valor de pH de aproximadamente 7, durante todo o processo de isolamento e relativamente a outros valores de pH, permite a obtenção de uma maior quantidade de Ca²⁺-ATPase, assim como actividades hidrolíticas e de transporte de Ca²⁺ máximas, em preparações de RS.

Por outro lado, a modificação de resíduos aminoácidos com elevada reactividade, como os de cisteína, cujo grupo sulfidrilo é susceptível de sofrer oxidação fora do ambiente intracelular redutor, podem promover a inactivação do local catalítico da enzima. De modo a evitar-se essa oxidação, utilizou-se o agente redutor β-mercaptoetanol, numa concentração suficientemente elevada para que não ocorresse a formação de pontes dissulfídicas (oxidação) entre resíduos de cisteína, que putativamente modificassem e desactivassem o centro activo. A degradação proteolítica da enzima, por seu turno, foi evitada adicionando-se um inibidor específico de proteases, o PMSF. Contudo, dado que existe uma grande diversidade de proteases, torna-se difícil escolher o inibidor mais adequado, sendo necessário testar periodicamente a actividade da enzima (Scopes, 1982; Deutcher, 1990).

Mesmo apesar das desvantagens inerentes a um isolamento, as preparações de RS não deixam de ser sistemas muito estáveis que se mantêm por um período de tempo relativamente longo quando armazenadas a – 80 °C, depois de diluídas em sacarose e congeladas em azoto líquido. A sacarose é muito utilizada na conservação de fracções microssomais e membranares: a exposição a esta solução hipertónica resulta na saída de água para o exterior das vesículas, até que se atinja um equilíbrio isotónico. Conjuntamente com um congelamento rápido, consegue-se prevenir a formação de gelo dentro das vesículas de RS (e de GL-RS) bem como outros danos inerentes à congelação (da Costa e Madeira, 1986; Gennis, 1989; Cuenda *et al.*, 1995).

Adicionalmente, com o intuito de obter um termo de comparação para as preparações de VRS efectuadas, adaptou-se o protocolo de isolamento destas e, conjugando-o com os procedimentos seguidos por Cuenda *et al.* (1995), Nogueira *et al.* (1996) e Garduño *et al.* (2001), preparou-se o designado GL-RS de músculo esquelético. A análise qualitativa e quantitativa deste último foi então levada a cabo, pela primeira vez no grupo de investigação; estabeleceu-se, portanto, a percepção de que o complexo enzimático estruturado formado pela correlação estreita entre o retículo sarcoplasmático e partículas de glicogénio agregadas a fosforilase do glicogénio, outras enzimas e substratos envolvidos nas vias glicogenolíticas e glicolíticas, constitui uma unidade funcional que modula as

propriedades, bioenergéticas e estruturais, da Ca^{2+} -ATPase em estudo. E, com efeito, a presença deste sistema tem sido associada à regeneração do ATP necessário à acumulação de cálcio, a partir de glicogenólise e consequente glicólise, em detrimento do ATP formado pela cadeia de fosforilação oxidativa das mitocôndrias. Um aumento na concentração citosólica de AMP e ADP, após a contracção do músculo, activaria este caminho metabólico alternativo, garantindo uma baixa concentração de cálcio no sarcoplasma (e a manutenção da sua homeostasia, em última análise), e evitando gastos desnecessários de energia nas células musculares (Goldstein *et al.*, 1985; Cuenda *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1995).

1.2. Análise quantitativa das preparações de VRS e GL-SR

Através da quantificação pelo método de Bradford estimaram-se cerca de 23,13 mg/mL e 19,9 mg/mL de proteína total nas preparações de VRS e de GL-RS, respectivamente. Os primeiros valores estão dentro do intervalo de concentrações geralmente obtido em estudos anteriores (Aureliano, 1995; Moderno, 2003; Pereira, 2003; Sousa, 2004); os segundos, contudo, são ligeiramente mais baixos do que o que se esperaria obter numa amostra de GL-RS, constituída por um maior número de proteínas associadas. Tal pode ser explicado por a ressuspensão de VRS ter sido feita num volume menor de solução tampão e sacarose, resultando numa suspensão mais concentrada. De facto, obtiveram-se cerca de 3,9 mL de suspensão de VRS e 4,75 mL de GL-RS; na primeira, determinou-se uma quantidade de 90,2 mg e, na segunda, 94,5 mg de proteína total.

O rendimento do processo de isolamento foi calculado relativamente à quantidade de músculo inicial, eliminando-se grande parte dessa massa no decorrer dos procedimentos e diluindo-se diferentemente em solução tampão e sacarose. Somando as massas de proteína total determinadas para uma e outra preparação, tem-se um rendimento total de cerca de 0,114 %, algo inferior ao conseguido em isolamentos anteriores (0,2 a 0,38% segundo Pereira, 2003) mas geralmente concordante com Leonardo (2002) e Sousa (2004), que referem um rendimento total (em relação à proteína total) de 0,16 (em charroco e em coelho) e 0,12 % (em dourada). Moderno (2002) citou, contudo, rendimentos de vários isolamentos tanto inferiores (entre 0,02 e 0,09 %) como superiores (entre 0,13 e 0,16 %) aos obtidos no presente estudo. Pode-se inferir, portanto, que a perda de proteínas ao longo do processo corresponderá à exclusão de componentes proteicos indesejados e que, nas preparações finais, a proteína maioritária será a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, no caso das VRS, acompanhada de várias enzimas metabólicas, no caso de GL-RS.

Saliente-se que é comum considerar que o valor de proteína total obtido em isolamento de sarcovesículas se assume como correspondendo à quantidade de Ca^{2+} -ATPase presente, uma vez que esta constitui 80 % das proteínas do retículo sarcoplasmático; em adição, presume-se que estas vesículas são constituídas por 0,6 mg de lípidos por mg de proteína, o que representará 80 a 100 moles de fosfolípidos por mole de Ca^{2+} -ATPase (Hidalgo, 1987; Mintz & Guillain, 1996). Há que ter sempre presente, porém, que existe sempre uma fracção de proteínas minoritárias (especialmente no caso de amostras de GL-RS) que contribuem para o valor de proteína quantificado

e que este último também está dependente do tipo de animal sacrificado (tendo Sousa -2004- registado disparidades entre amostras provenientes de dourada e coelho), do estado de saúde, idade, hora do último suplemento alimentar, entre outras, para além dos factores inerentes a um procedimento experimental elaborado de forma relativamente distinta.

1.3. Análise qualitativa e estado de pureza das preparações de VRS e GL-RS

O estado de pureza e a constituição do material isolado foram analisados por SDS-PAGE de amostras de preparações de VRS e complexo GL-RS; os resultados obtidos estão ilustrados na figura III.1. De notar que se aplicaram massas distintas de proteína por forma a se distinguirem bandas que de outra forma poderiam não ser visíveis. Em todas as amostras de VRS aplicadas é bem visível a existência de uma banda larga correspondendo a uma massa molecular aparente de cerca de 97 a 110 kDa (valor obtido por comparação com o marcador molecular e calculados por interpolação de uma recta padrão, como referido no ponto 1.4.2. do capítulo II), característica do monómero de Ca^{2+} -ATPase (MacLennan & Ostwald, 1973; Campbell & MacLennan, 1981; MacLennan *et al.*, 1990; Cuenda *et al.*, 1994 e 1995; Belcastro *et al.*, 1993; Shutova *et al.*, 1999; Pereira, 2003; Sousa 2004). Esta bomba do tipo P constitui a maioria do conteúdo proteico das preparações de VRS (embora nas amostras analisadas não seja 80 % deste), o que é confirmado tanto pela intensidade das bandas correspondentes, relativamente às restantes, como pela análise densiométrica de uma das bandas ilustradas na imagem esquerda da figura III.1; esta última permitiu estimar a presença de cerca de 22,5 % de Ca^{2+} -ATPase em VRS, e 12% em GL-RS. De notar que, a percentagem de proteína determinada com o *software Quantity One* não depende da quantidade de proteína total aplicada no gel (Sousa, 2004), mas é ponderada com relação ao valor de densidade (int/mm^2) associado ao somatório das intensidades de todas as bandas visíveis, num determinado poço. De qualquer forma, a percentagem de Ca^{2+} -ATPase determinada é muito baixa, quando comparada com o seu valor teórico (80 %), indicando perdas elevadas desta proteína, ou da sua integridade, durante o processo de isolamento e purificação.

Nas preparações de GL-RS é possível distinguir uma banda associada a uma massa de 95 a 100 kDa, posicionada imediatamente a seguir à banda de Ca^{2+} -ATPase; nos poços correspondentes às preparações de VRS, e no gel de acrilamida 10 %, essa banda confunde-se com a da própria bomba iónica (formando uma banda única), em virtude de possuírem um padrão electroforético semelhante. Visualizando-se essas posições no que respeita às amostras de GL-RS da imagem à esquerda e, sobretudo, o poço 3 na imagem à direita da figura III.1 (gel de acrilamida a 12 %), é possível distinguir as duas bandas com clareza. A proteína em questão foi identificada como a forma desfosforilada (b) da fosforilase do glicogénio, uma enzima que catalisa a fosforilação do glicogénio e que possui um papel central na glicogenólise, como já foi referido, para além de constituir um modelo para o estudo do controlo alostérico em enzimas. Esta banda era esperada, portanto, na medida em que se sabe que a enzima está reversivelmente associada à membrana do RS (Cuenda *et al.*, 1994 & 1995; Xu *et al.*, 1995; Hargreaves, 2004).

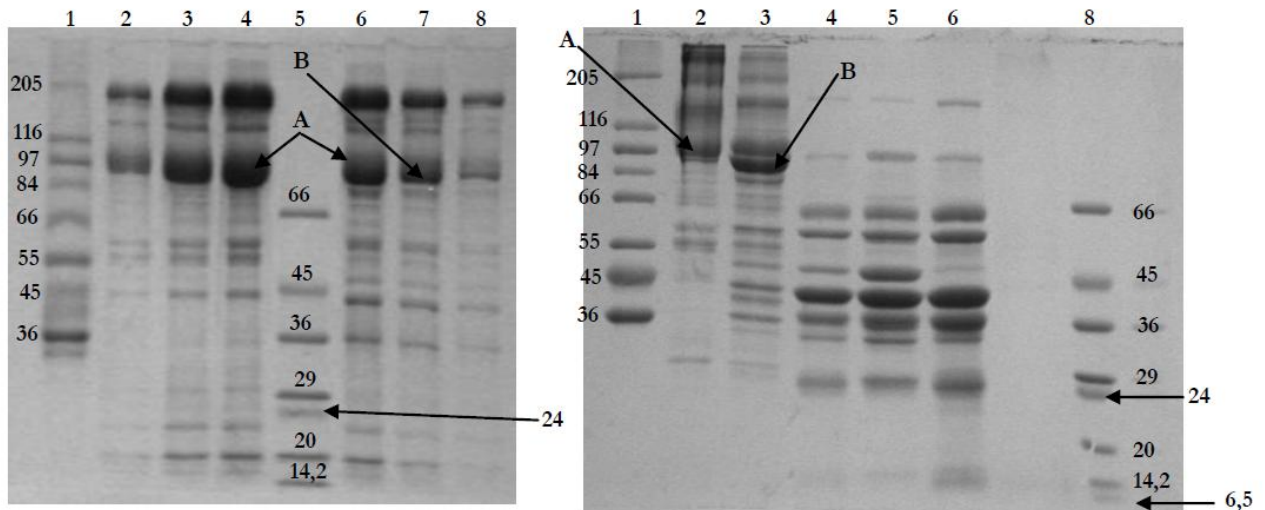


Figura III.1. – Electroforese SDS-PAGE *mini protean* de amostras de preparações de VRS e complexo GL-RS. À esquerda, uma separação por filtração em gel, em poliacrilamida a 10 %, dos componentes de ambas as preparações: os poços 1 e 5 contêm proteínas padrão de alta e baixa massa molecular, respectivamente (os valores das massas moleculares, em kDa, estão indicados na imagem ao lado da banda correspondente); nos poços 2, 3 e 4 aplicaram-se 3, 8 e 13 µg de proteína (respectivamente) de amostras de VRS; os poços 6, 7 e 8 correspondem a 13, 8 e 3 µg de proteína (respectivamente) de amostras de complexo GL-RS. À direita, imagem de gel distinto, em poliacrilamida a 12 %, com amostras provenientes de outras preparações de VRS e GL-RS (que não as caracterizadas), para termo de comparação: nos poços 1 e 8 foram aplicados os padrões proteicos de alta e baixa massa molecular; o poço 2 contém uma amostra de 15 µg de proteína de uma amostra distinta de VRS e o poço 3, uma amostra de 15 µg de proteína de uma amostra distinta de GL-RS; os poços 4, 5 e 6 contêm componentes eliminados ao longo da preparação de VRS. A e B referem-se à posição da banda de Ca²⁺-ATPase e de fosforilase b de glicogénio, respectivamente.

A análise da imagem à esquerda da figura II.1 não permite concluir se o procedimento adoptado eliminou a fosforilase “contaminante”, nas preparações de VRS; todavia, no isolamento em que se obtiveram as amostras aplicadas no gel representado na imagem à direita (e em que foi utilizado o mesmo protocolo) consegue-se discernir uma densidade inferior dessa proteína e relativamente à quantidade de Ca²⁺-ATPase, o que permite deduzir que o passo experimental introduzido remove grande parte das proteínas contaminantes. Isto é reforçado mediante a comparação entre os padrões electroforéticos obtidos com VRS e aqueles que resultam com GL-RS ou amostras retiradas ao longo do isolamento: há várias bandas, nos poços de amostras de VRS, que, ou são inexistentes, ou possuem uma densidade bastante reduzida, sugerindo a exclusão das proteínas correspondentes ao longo do procedimento.

As diversas preparações de sarcovesículas podem variar largamente no conteúdo em fosforilase b do glicogénio consoante vários factores. De entre os mais importantes, conta-se o período de jejum ou qualquer outro tratamento que provoque a degradação de glicogénio no músculo esquelético antes do sacrifício do coelho, como um choque adrenérgico ou exercício físico intenso (Cuenda *et al.*, 1994 & 1995); as diferentes diluições efectuadas nos vários e distintos protocolos de isolamento também contribuem para essa disparidade. Percebem-se, assim, as dissemelhanças verificadas no conteúdo proteico, de preparação para preparação. A diminuição da quantidade de fosforilase do glicogénio nas preparações de VRS pode ser conseguida no geral, contudo, se o modelo animal for submetido a um período de privação alimentar de, pelo menos, 48 horas; este jejum, ao diminuir as reservas de glicogénio levará ao decréscimo da percentagem de fosforilase associada, pois, para que o glicogénio seja degradado pela fosforilase b, esta tem de passar à sua forma fosforilada activa (fosforilase a) que,

por seu turno, possui uma afinidade diminuta para o RS. Uma outra forma de reduzir grande parte da quantidade desta enzima glicogenolítica, passa pela digestão do glicogénio endógeno com α -amylase (Entman *et al.*, 1980; Cuenda *et al.*, 1994 & 1995).

Mediante um método enzimático acoplado mutase de glicose-fosfato e desidrogenase de glicose-6-fosfato (PGM/G6PDH), foi possível conferir, complementarmente, a actividade de fosforilase b de glicogénio de músculo esquelético em preparações de VRS e em amostras de GL-RS (resultados adicionais não apresentados, referentes a preparações elaboradas pelo grupo de investigação da Universidad de Extremadura). Como seria de esperar, registou-se uma actividade maior da enzima quando esta se encontra associada ao RS ($1,8 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$), em acordo com a presença do complexo glicogenolítico associado a este sistema de membranas; nas VRS, esta actividade aparentou ser muito inferior ($0,48 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$), em concordância com o facto de nestas ter sido eliminada a maioria da fosforilase b.

De notar que é importante eliminar esta última proteína, uma vez que as VRS “contaminadas” com uma elevada percentagem de fosforilase b podem conduzir a valores inferiores do intermediário fosfoenzimático que se forma durante o ciclo catalítico da bomba de cálcio; com efeito, a presença de fosforilase b tende a estar associada a uma diminuição da quantidade de intermediário fosfoenzimático formado durante o ciclo catalítico da ATPase, conduzindo a resultados mascarados. Outras análises podem ser também afectadas, nomeadamente, a desnaturação térmica da bomba de cálcio por calorimetria diferencial de varrimento (DSC, no original) ou a digestão proteolítica das membranas de RS; a preparação de anticorpos mono e policlonais a partir de sarcolema, por exemplo, requer a eliminação máxima da enzima glicogenolítica, de modo a evitar a formação de anticorpos anti-fosforilase (Centeno *et al.*, 1992; Cuenda *et al.*, 1994).

É interessante constatar que as preparações de GL-RS tendem a conter uma maior quantidade de fosforilase b do glicogénio (24,9 %, segundo análise densiométrica de uma das bandas correspondentes), relativamente à Ca^{2+} -ATPase (12 %). Tal observação está de acordo com a existência comprovada de um complexo enzimático glicogenolítico articulado com a membrana do RS, cuja função será a de providenciar à bomba, via glicogenolítica e glicolítica, o ATP necessário à reacumulação de cálcio e concomitante relaxamento muscular (Goldstein *et al.*, 1985; Cuenda *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1995). Uma tarefa assim obrigaria a uma associação física e próxima entre as duas enzimas e a uma quantidade relativamente elevada de fosforilase. Por conseguinte, pode-se concluir que o processo de isolamento seguido permite obter sarcovesículas em união com GL-RS.

A Ca^{2+} -ATPase e a fosforilase b do glicogénio não são as únicas proteínas presentes em preparações de sarcovesículas e, em especial, de GL-RS, como se já se pôde avaliar pela existência de outras bandas, com maior ou menor densidade, tal como é comum obter neste tipo de amostras (Leonardo, 2001; Moderno, 2002; Pereira, 2003; Sousa, 2004). Em ambas as figuras está patente a existência de bandas a cerca de 205, 165, 61, 52 e 41 kDa (valores estimados por comparação com o padrão); de acordo com o que está extensamente descrito na literatura, estas poderão corresponder às proteínas miosina, sarcalumenina e “proteína Ca^{2+} -ligante rica em histidina”, calsequestrina e calreticulina, glicoproteína M55 e, possivelmente, cinase da creatina, respectivamente. Discerne-se, ainda, uma banda com massa molecular a cerca de 21 kDa, que pode corresponder à miocinase (Bagshaw, 1982;

Campbell & MacLennan, 1980; Rossi *et al.*, 1990; MacLennan *et al.*, 1990; Belcastro *et al.*, 1993; Cuenda *et al.*, 1994; Mintz & Guillain, 1997; Shutova *et al.*, 1999). Não é de estranhar a presença destas proteínas, uma vez que a maioria das preparações de VRS tende a estar associada a diversas proteínas e enzimas glicogenolíticas e glicolíticas (Cuenda *et al.*, 1994; Xu & Becker, 1998; Rossi *et al.*, 1990).

A calsequestrina (60-63 kDa) é uma proteína ácida que constitui o regulador mais importante do armazenamento de cálcio no lúmen do RS, possuindo elevada afinidade para este catião (cada monómero de calsequestrina pode ligar até 40 Ca^{2+}) e diminuindo, assim, a concentração efectiva deste ião no interior do retículo (permitindo que mais cálcio possa ser acumulado). A calreticulina, a sarcalumenina (ou glicoproteína M160) e a glicoproteína M55/53, por seu turno, também possuem características de ligação ao Ca^{2+} , semelhantes às da calsequestrina (o que as fez ficar conhecidas como proteínas do tipo calsequestrina, reconhecendo-se o seu papel importante em todos os eventos mediados por Ca^{2+}); a glicoproteína M55/53 parece estar envolvida na regulação do transporte de Ca^{2+} , crendo-se que pode colaborar na transferência de Ca^{2+} do RS longitudinal para as cisternas terminais (Campbell & MacLennan, 1982; MacLennan *et al.*, 1990; Belcastro *et al.*, 1993; Mintz & Guillain, 1997; Shutova *et al.*, 1999; Rossi & Dirksen, 2006).

A existência de bandas relativas a cerca de 160 a 165 kDa pode presumir a presença de enzima desramificadora do glicogénio, outra proteína já identificada em preparações de VRS. Outro componente muito comum nas membranas de RS e próxima da bomba de cálcio, é a cinase da creatina, que pode fosforilar o ADP em excesso no músculo (que inibe a acumulação de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase), formando ATP que será utilizado no transporte do catião; crê-se, ainda, que esta proteína pode formar uma “diazima” com a fosforilase do glicogénio construindo, juntamente com a Ca^{2+} -ATPase, um complexo ternário compartimentado e especializado (Korge *et al.*, 1993; Lees *et al.*, 2004).

Apesar da presença de proteínas contaminantes nas preparações isoladas, a Ca^{2+} -ATPase é a única destas proteínas com uma actividade hidrolítica mensurável (para além de ser a única que transporta cálcio através da membrana sarcoplasmática do retículo). Mesmo a proteína contráctil miosina, que aparece frequentemente nestas preparações como uma banda correspondente a uma massa molecular de 205 kDa (Margossian & Lowey, 1982; Pereira, 2003; Sousa, 2004) e, neste caso, na preparação de VRS ilustrada pela imagem à esquerda da figura II.1 (onde a contaminação -a cerca de 23,5 %- é perceptível, mostrando que esta proteína não foi eficientemente excluída), tende a não apresentar actividade ATPásica quando o meio de ensaio contém concentrações relativamente elevadas de ião Mg^{2+} (Cuenda *et al.*, 1994).

1.4. Actividade hidrolítica da Ca^{2+} -ATPase em preparações de VRS e GL-SR

Nas membranas de músculo esquelético de coelho é comum registarem-se, no mínimo, 3 actividades ATPásicas diferentes, provenientes de uma Na^+ , K^+ -ATPase dependente de magnésio, uma ATPase dependente de magnésio (Mg^{2+} -ATPase, que requer concentrações de Mg^{2+} e Ca^{2+} na ordem dos milimolar) e da Ca^{2+} -ATPase (referida como possuindo uma actividade Mg^{2+} -ATPásica dependente de Ca^{2+} na ordem dos micromolar, ou como

a Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase). Em preparações de VRS, a actividade hidrolítica desta última é a predominante; a de Na^+ , K^+ -ATPase é inexistente e a de Mg^{2+} -ATPase varia de preparação para preparação (mediante a adição de quantidades elevadas de Ca^{2+}). Pensa-se que esta Mg^{2+} -ATPase seja derivada de contaminações do sistema de túbulos T e cisternas terminais, apesar de existirem autores que a referem como uma expressão cinética diferente da Ca^{2+} -ATPase do RS longitudinal (de Meis & Hasselbach, 1971; Hidalgo *et al.*, 1986; Valente *et al.*, 1990).

A Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático é um sistema reversível de transdução e conjugação energética que, uma vez preparada na forma de sarcovesículas, permanece estável e mantém a sua orientação membranar nativa. Devido a este facto, a função fisiológica de acumulação de Ca^{2+} e a actividade hidrolítica acoplada encontram-se preservadas *in vitro* (MacLennan, 1970; Mintz & Guillain, 1997). Assumindo-se que existem 22,5 e 12 % desta proteína nas preparações de VRS e GL-RS, respectivamente (e a única com actividade ATPásica hidrolítica nestas e em GL-RS), determinaram-se as actividades acopladas ou basais (sem adição de ionóforo) e desacopladas ou máximas (na presença de ionóforo) totais, dependentes e independentes de cálcio, de acordo com o método enzimático acoplado descrito na secção 1.4.3. do Procedimento Experimental (capítulo II). Este sistema de análise cinética contínua foi levado a cabo à temperatura ambiente (25 °C) e a um valor de pH 7; os valores estimados encontram-se compilados na tabela III.1.

Tabela III.1 – Valores médios das actividades acoplada ou basal e desacoplada ou máxima ($\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) de Ca^{2+} -ATPase em preparações de VRS e de complexo GL-RS, determinadas por um sistema contínuo de reacções enzimáticas acopladas, a pH 7 e 25 °C, num meio de ensaio contendo TES-TRIS 100 mM pH 7, KCl 100 mM, MgCl_2 , 3 mM (solução reaccional), ao qual se adicionaram CaCl_2 50 μM , PEP 0,42 mM, PK 18 IU e LDH 18 IU, NADH 0,375 mM e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de VRS ou GL-RS com 22,5 e 12% de Ca^{2+} -ATPase, respectivamente. As reacções foram iniciadas com ATP 0,25 mM. A presença de EGTA 5 mM permite determinar a actividade independente de cálcio e a adição de calcimicina 4 % (p/p), a actividade máxima. Os valores foram determinados mediante dois ensaios (no mínimo) e em relação à % de Ca^{2+} -ATPase estimada anteriormente por densiometria óptica.

	em VRS	em GL-RS
	Actividade ($\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Actividade ($\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
Acoplada e dependente de Ca^{2+}	3,59 ± 0,18	3,25 ± 0,20
Acoplada e independente de Ca^{2+}	1,25 ± 0,19	1,03 ± 0,02
Acoplada Total	4,84 ± 0,37	4,3 ± 0,19
Desacoplada e dependente de Ca^{2+}	19,94 ± 1,23	17,6 ± 3,38
Desacoplada e independente de Ca^{2+}	1,24 ± 0,20	1,208*
Desacoplada Total	21,18 ± 1,43	18,78 ± 3,38

* valor escolhido, por comparação, como o mais fiável (dada a inadequação dos restantes obtidos).

A actividade hidrolítica basal e total da bomba de cálcio foi calculada através da monitorização das velocidades iniciais de reacção enzimática na presença de um gradiente de Ca^{2+} , formado a partir do transporte transmembranar do catião. Uma vez que a hidrólise da fosfoenzima está acoplada ao transporte de Ca^{2+} e que, por

isso, é limitada por este, o valor obtido corresponde à quantidade mínima total de ATP que é virtualmente hidrolisado (ou de ADP que é libertado) por minuto e por miligrama de enzima. Nas preparações efectuadas, a actividade basal total apontou para um valor de $4,84 \pm 0,37$ em VRS e $3,25 \pm 0,20$ $\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ em complexo GL-RS, valores que, juntamente com os da actividade acoplada dependente e independente de Ca^{2+} estão em concordância com os descritos na literatura, mediante o uso do mesmo método de monitorização, nomeadamente, Cuenda *et al.* (1991, 1992, 1994 & 1995) e Garduño *et al.* (2001). Verifica-se que estes valores são ligeiramente inferiores quando o RS está associado ao complexo glicogenolítico (tabela III.1); tal resultado era esperado, uma vez que a actividade da bomba de cálcio tende a diminuir quando as sarcovesículas onde está incorporada estão associadas glicogénio fosforilase na sua forma inactiva b (forma essa que é a encontrada em preparações experimentais de RS e GL-RS). Efectivamente, existem evidências de que esta forma desfosforilada desloca o equilíbrio conformacional da Ca^{2+} -ATPase para um formato do tipo E2, insensível ao cálcio, e só fosforilada por pirofosfato, o que diminui a quantidade de intermediário fosfoenzimático que pode ser formado a partir de ATP (Cuenda *et al.* 1991, 1992, 1994 & 1995).

Na presença do ionóforo calcimicina, a hidrólise da fosfoenzima passa a estar desacoplada do transporte de Ca^{2+} e, não estando estreitada pelo gradiente formado, funciona na sua capacidade máxima. Nos presentes ensaios enzimáticos, apontou-se uma actividade desacoplada total de $21,18 \pm 1,43$ em VRS e $18,78 \pm 3,38$ $\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ em GL-RS, valores estes que aparentam ser mais elevados do que aqueles encontrados por Aureliano (1995) ou Cuenda *et al.* (1995). No entanto, Aureliano (1995) utilizou um processo de medida diferente, baseado na monitorização do fosfato inorgânico libertado (Tausky & Shorr, 1953) ao fim de dez minutos de reacção; Cuenda *et al.* (1995), por sua vez, determinaram a actividade pelo método descrito no presente trabalho (secção 1.4.3. do Procedimento Experimental), mas considerando a quantidade de proteína total e não a quantidade de Ca^{2+} -ATPase presente, o que pode em parte explicar as dissemelhanças. Comparando as medidas registadas nas preparações de VRS e de GL-RS, atesta-se que não há diferenças significativas, considerando-se o erro associado; o facto de o ionóforo levar ao efluxo de cálcio a partir do lúmen pode fazer com que a bomba adquira preferencialmente a sua conformação E1 (sensível ao cálcio), apta a ser fosforilada por ATP e seguindo o seu ciclo catalítico a partir daí.

Tomando a actividade acoplada e desacoplada demonstrada pelas preparações de Ca^{2+} -ATPase em VRS e GL-RS é possível conferir que a última é cerca de 4,4 vezes maior do que a primeira. Em outras preparações (Rito, 2009), verificou-se que esse valor era cerca de sete vezes; Aureliano (1995) refere uma razão desacoplada/acoplada de 10 vezes. As VRS preparadas no presente trabalho experimental podem ter perdido, assim, a sua integridade estrutural ou o seu acoplamento hidrólise de ATP/acumulação de Ca^{2+} funcional.

2. EFEITO DE VANÁDIO NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE Ca^{2+} - ATPASE DE VRS

A Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático preparada mediante uma técnica de centrifugação diferen-

cial, tem subsistido, até hoje, como um notável modelo, no estudo *in vitro* de diversas interações metabólicas, bioenergéticas e homeostáticas, entre outras. Constituindo-se como um arquétipo da análise do efeito de oxovanádios na homeostasia celular de cálcio e, em particular, na regulação do processo de contracção muscular, esta enzima converteu-se num artifício relevante quando é necessário testar a acção de determinados princípios activos nos sistemas bioquímicos. Não é de admirar, assim, que seja um modelo recorrente na análise da interacção de sais ou compostos coordenados de vanádio com uma potencial acção insulino-mimética, mais não seja porque esta acção se faz mediante a normalização das desordens metabólicas associadas à deficiência em ou resistência à insulina (Sousa, 2004; Aureliano *et al.*, 2005; Thompson & Orvig, 2006; Aureliano & Crans, 2009).

Tendo ainda em conta que alguns oxovanadatos são conhecidos por desarticular o acoplamento bioenergético e o número de *turnover* da enzima, e compreendendo-se que várias das acções deste metal de transição mimetizam as da insulina (Aureliano & Madeira, 1998; Thompson *et al.*, 1999), depreende-se então que poderá existir um envolvimento *in vivo* do próprio modelo de estudo nas vias de acção da hormona citada. E, com efeito, relatou-se recentemente uma diminuição na actividade ATPásica da bomba de cálcio do músculo cardíaco, em condições associadas a diabetes, situação que se verificou resultar numa diminuição da velocidade de relaxamento cardíaco (Bidasee *et al.*, 2004). Note-se que uma das características de *diabetes mellitus* do tipo 2 reside numa afecção semelhante e concomitante no músculo esquelético (Buse *et al.*, 2002).

A maioria dos estudos efectuados tende a atribuir a diminuição da velocidade de relaxamento muscular a um decréscimo na expressão genética de SERCA, o que é corroborado por outros grupos, que verificaram que de um estado de sobre-expressão de Ca^{2+} -ATPase deriva uma perda de contractilidade (Netticadan *et al.*, 2001; Trost *et al.*, 2002; Vetter *et al.*, 2002). Contudo, há autores que sugerem que esta não é única razão que explica a desaceleração do relaxamento cardíaco, propondo que, adicionalmente às alterações na expressão genética, a proteína (que possui um tempo de meia vida de cerca de 15 dias) estará sujeita a modificações pós-traducionais nos seus domínios, originadas pela patogénese diabética; tais modificações induzirão a quebra verificada no transporte de cálcio pela bomba (Candido *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003).

Como já se referiu, foi recentemente demonstrado por Aureliano *et al.* (2007 & 2008), o facto de as três classes estruturalmente distintas de complexos de oxovanádio em estudo (piridina-2,6-dicarboxilato de dioxovanádio (V) ou PDC-V(V); bis(maltolato) de oxovanádio (IV) ou BMOV-V(IV) e bis(iminodiacetato de N-hydroxilamida) de vanádio (IV) ou HAIDA-V(IV)) inibirem a actividade hidrolítica da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de *Oryctolagus cuniculus*. Mediante tais estudos, estabeleceu-se uma ordem relativa de inibição igual a PDC-V(V) > BMOV-V(IV) > vanadato monomérico > vanadato decamérico > HAIDA-V(IV), bem como os valores de IC_{50} de 25, 40, 50, 100 e 325 μM , respectivamente, e em relação à actividade hidrolítica da enzima. A inibição assim observada não foi explicada mediante formação de oxovanadatos nos meios de ensaio enzimáticos; embora os compostos coordenados BMOV-V(IV) e PDC-V(V) sejam reactivos (redox e hidroliticamente) a um valor de pH neutro, constatou-se, por comparação com o efeito exercido pelo complexo estável HAIDA-V(IV), que tal inibição não poderia explicar-se apenas pela formação derivatizada de oxovanadatos (Aureliano *et al.*, 2007 & 2008).

Deste modo, tomando os valores de IC₅₀ assim determinados como ponto de referência, analisou-se o efeito dos três compostos coordenados de oxovanádio referidos, nas propriedades funcionais do sistema transmembranar de transporte de cálcio mediado pela bomba do RS. Conhecendo-se o perfil de inibição destes complexos na actividade hidrolítica da enzima, pretendeu-se inferir principalmente a sua linha de interacção, no que respeita à acumulação de Ca²⁺ pela ATPase, por forma a se estabelecer uma correlação bioenergética.

2.1. Efeito de complexos coordenados de vanádio na actividade hidrolítica de Ca²⁺-ATPase

Apesar de o efeito dos três compostos de oxovanádio em estudo, na actividade hidrolítica da Ca²⁺-ATPase, ter sido previamente determinado, procurou-se uma reprodução dessas observações (para os valores de IC₅₀ anteriores e superiores), por forma a se obter uma noção dos valores de correlação bioenergética com o tipo de preparação de sarcovesículas e condições aqui utilizadas; estas últimas estavam comprovadamente isentas de complexo glicogenolítico associado ao RS e foram isoladas e caracterizadas pela equipa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade da Extremadura (análises não reportadas). Os ensaios não foram contudo repetidos, uma vez que se pretendia a obtenção de uma comparação, e não, de um valor de referência propriamente dito. Por conseguinte, e mediante recurso ao método enzimático acoplado PK/LDH descrito na alínea 1.4.3. do Procedimento Experimental (capítulo II), determinaram-se as percentagens de inibição (relativamente a um controlo sem inibidor) da actividade hidrolítica desacoplada de Ca²⁺-ATPase embebida em VRS, na presença de duas concentrações distintas de PDC-V(V) e de HAIDA-V(IV). A figura III.2 ilustra os resultados que reflectem a inibição observada.

Verificou-se que as concentrações de IC₅₀ de PDC-V(V) e HAIDA-V(IV) (25 e 325 µM, respectivamente, e obtidas anteriormente por Aureliano *et al.* – 2008) promoveram uma inibição de 55 % (no caso de PDC) e 45,7 % (no caso do complexo análogo de amavadina), valores percentuais que estão de acordo com o facto de estas

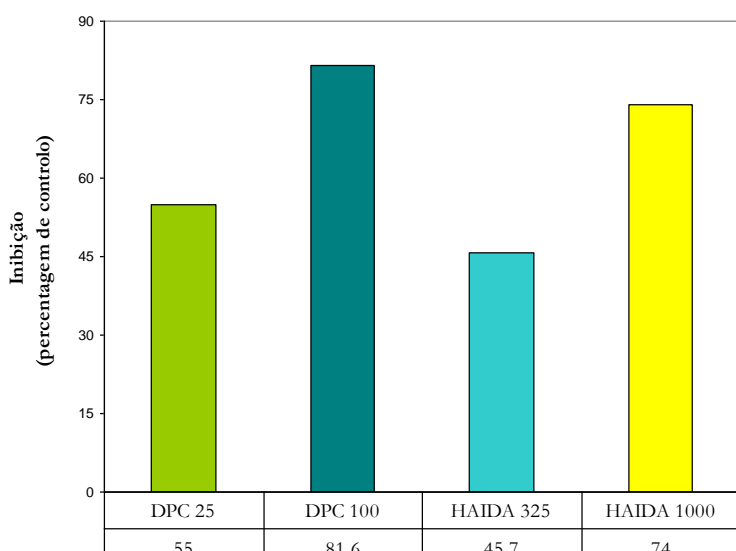


Figura III.2 – Efeito inibitório promovido por soluções de PDC-V(V) 25 e 100 µM (DPC 25 e 100, no gráfico, respectivamente) e de HAIDA-V(IV) 325 e 1000 µM, a pH 7 e 25 °C, na actividade de Ca²⁺-ATPase de VRS (% de controlo). Os ensaios cinéticos foram conduzidos num meio contendo HEPES-KOH 31,25 mM (pH 7), KCl 125 mM, MgCl₂ 6,25 mM, CaCl₂ 62,5 µM, PEP 0,42 mM, NADH 0,25 mM, 104,3 µL de H₂O, 25 µg de PK, 25 µg de LDH e 4 % (p/p) de calcimicina (conforme capítulo II).

constituírem as concentrações de complexos necessárias à produção de metade da inibição máxima que se poderá atribuir ao composto inibitório, no sistema biomolecular estudado. Os valores de IC_{50} são geralmente determinados como medida da eficácia de um composto em inibir um determinado processo biológico, ou componente de um processo, como o modelo aqui estudado é parte integrante do processo de contracção muscular e da regulação da homeostasia intracelular de cálcio. O parâmetro citado é muitas vezes utilizado em ensaios reaccionais de ligação competitiva e de antagonistas funcionais, especialmente se o composto for um candidato a fármaco, como é o caso de PDC-V(V) e BMOV-V(IV) (Hena *et al.*; 2005, Aureliano, 2008). Como esperado, é necessária uma maior quantidade de HAIDA-V(IV) para que se produza uma inibição considerável; esta tendência é mantida quando as concentrações são elevadas em cerca de 3,5 vezes a respectiva IC_{50} , como se pode observar na Figura III.2, duplicando 30% a inibição observada em ambos os casos. Pode-se inferir, portanto, que a inibição promovida por estes complexos é dependente da concentração destes em solução, tal como outros oxovanádios o são (Aureliano & Madeira, 1998; Tiago *et al.*, 2007; Aureliano & Crans, 2009).

Note-se que a inibição mais elevada foi observada, nos estudos anteriores já referidos e no presente trabalho, para compostos de oxovanádio susceptíveis de reagirem redox e/ou hidroliticamente; o análogo de amavadina, conhecido por ser estável nestas condições, revelou-se o inibidor menos eficaz. Estes perfis sugerem que a diminuição da hidrólise do resíduo aspartil-fosforil da bomba de cálcio se podem atribuir à decomposição em oxovanadatos simples, que formariam um complexo análogo ao estado de transição da fosfoenzima. No entanto, Aureliano *et al.* (2008) demonstraram que o composto de PDC-V(IV), e o de BMOV-V(IV) exercem efeitos superiores aos reportados para vanadato monomérico e decamérico; assim, torna-se mais provável a hipótese de serem os próprios complexos a actuar na Ca^{2+} -ATPase.

A par de PDC-V(V), o complexo insulino-mimético BMOV-V(IV) é um forte inibidor da actividade hidrolítica da bomba de cálcio de RS, mais ainda do que vanadato decamérico, o oxovanadato mais potente (Aureliano *et al.*, 2008; Aureliano *et al.*, 2009). Por serem extremamente eficazes como agentes insulino-miméticos, os ensaios com compostos PDC-V(V) e BMOV-V(IV) parecem sugerir a existência de uma ligação correlativa entre as propriedades mimetizadoras de insulina e a inibição hidrolítica observada; Sanchez-Ferrer *et al.* (1988) sugeriram a hipótese de esta inibição por oxovanádios estar ligada a uma mobilização do cálcio intracelular armazenado, por seu turno associada às vias de acção de insulina (Algenstaedt *et al.*, 1997; White, 1998).

É de considerar, adicionalmente, o facto de os resultados aqui descritos (bem como em Aureliano *et al.*, 2008) terem sido obtidos numa situação em que a bomba de RS se encontra energeticamente dissociada, isto é, onde a hidrólise do resíduo aspartil-fosforil não se encontra acoplada à translocação de Ca^{2+} (dissociação promovida pelo ionóforo calcimicina), nem limitada pelo gradiente de cálcio; produzem-se assim actividades máximas, logo, evidenciando-se interacções que podem não ser observáveis quando a bomba funciona dependentemente de Ca^{2+} . Nestas condições, o composto HAIDA-V(IV), tal como soluções de “monovanadato” (Aureliano & Madeira, 1998), não inibe tão eficazmente a hidrólise de ATP; no caso de soluções de “monovanadato”, considera-se que a inibição observada poderá provir da interacção com espécies tetraméricas (Aureliano & Madeira, 1998), que se sabem, no entanto, não estar presentes nas soluções do complexo estável HAIDA-V(IV).

Já as soluções de PDC-V(V) exibem um efeito maior do que as próprias soluções essencialmente possuidoras de espécies decaméricas; sabe-se que o vanádio, neste complexo, é reduzido ao estado de oxidação +4 (Aureliano *et al.*, 2008) em solução. É plausível a existência de um efeito sinérgico entre espécies de oxovanadato monoméricas e tetraméricas, a par do próprio complexo integral de vanadilo, que resultam no nível de inibição geralmente observado. Isto porque, nem um composto de vanádio estável, nem uma solução do mais potente oxovanadato (V_{10}) promoveram, só por si, as inibições mais significativas.

A inibição promovida pelo complexo coordenado BMOV-V(IV), contudo, revelou não ser possível a análise mediante o uso do método acoplado PK/LDH, pela mesma razão que este não é utilizado com soluções nominais de metavanadato: o complexo interfere com a obtenção de resultados, nas condições aqui utilizadas, uma vez que interage mensuravelmente com NADH, oxidando-o a NAD^+ . Tal foi evidenciado mediante testes à funcionalidade do sistema enzimático acoplado.

Confirma-se, ainda, que o composto de vanadato e o composto de vanadilo estudados diferem no seu grau de inibição da actividade hidrolítica da bomba de cálcio, corroborando o que tem sido descrito na literatura sobre os distintos efeitos bioquímicos, farmacológicos e toxicológicos exercidos por espécies distintas de vanádio, neste caso, espécies com números de oxidação, coordenação e ligandos orgânicos diferentes (Elberg *et al.*, 1998; Bhanot & McNeill, 1996; Nakai *et al.*, 1995; Llobet & Domingo, 1984; Aureliano, 2009). Mais uma vez se salienta a importância de uma especificação das soluções de vanádio ou compostos de vanádio, tendo em vista a análise correcta dos sistemas em estudo; apesar de esta importância já estar estabelecida e ser levada em conta, continuam a existir estudos em que é negligenciada.

Por outro lado, ressalva-se a concepção de uma química extraordinariamente complexa em torno do metal de transição descoberto por Manuel del Rio, bem como a conseqüente multitude de interacções com diversos ligandos e sistemas biológicos. Tais propriedades tornam os iões e compostos de oxovanádio em sondas deveras úteis, na elucidação de mecanismos como o de contracção muscular, regulação da homeostasia de um segundo mensageiro e, por acréscimo, nas vias de interacção de insulina; a elucidação de pormenores mais complexos relativos à estrutura molecular catalítica e vectorial da Ca^{2+} -ATPase, é outro dos campos no qual o uso de uma sonda espectroscópica representa uma ferramenta bioquímica bastante útil.

O facto de existir interacção com estas três classes tão distintas de oxovanádio, bem como as já muito bem documentadas inibições da actividade hidrolítica da Ca^{2+} -ATPase promovidas por soluções de vanadato (Aureliano & Madeira, 1998; Pereira, 2003; Sousa, 2006; Rito, 2009), coloca ainda este sistema sarcoplasmático de transporte na trajectória de um elemento multifacetado e biologicamente essencial; surge aqui uma das questões investigadas, assente no papel da bomba de cálcio enquanto alvo celular de oxovanádio.

2.2. Efeito de vanádio na acumulação de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase de VRS: estudos cinéticos por radiometria com ^{45}Ca

Possuindo um papel chave na regulação do nível iónico de cálcio nas células eucarióticas, as diferentes isoformas de Ca^{2+} -ATPase são hoje reconhecidas como elementos essenciais à função correcta da maquinaria

celular. A compreensão molecular do modo de acção destas bombas recebeu um ímpeto considerável quando a Toyoshima *et al.* resolveram, há quase dez anos, a estrutura tridimensional cristalina de SERCA de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético (SERCA1a). Estes avanços notáveis na estrutura e mecanismo molecular destas enzimas transportadoras têm sido acompanhados, por outro lado, pela emergência da questão das anomalias em bombas iónicas, parte da qual se tem centrado na disfunção da sinalização intracelular por Ca^{2+} .

As vias de acção da hormona insulina representam outro tópico crucial ao desenvolvimento de desordens metabólicas, especialmente de diabetes, bem como em processos celulares como os que medeiam o envelhecimento. A conexão estreita destas vias com o controlo dos níveis de cálcio no músculo estriado está igualmente estabelecida, mediante a interacção directa de domínios específicos de SERCA 1 (de músculo esquelético) e 2 (de músculo cardíaco) com proteínas *docking* (partículas de reconhecimento de sinais) receptoras de substractos de insulina (proteínas IRS). Tal interacção, que pode ser demonstrada *in vitro* e *in vivo* é, por seu turno, regulada por insulina e dependente da cascata de fosforilação de tirosina, estando alterada em condições diabéticas; torna-se importante, portanto, a compreensão de que existe de facto uma ligação entre a transdução de sinal de insulina e os efeitos desta hormona na sinalização por Ca^{2+} em tecidos insulinosensíveis como o músculo estriado esquelético e cardíaco (Algenstaedt *et al.*, 1997; White, 1998).

Tanto o músculo esquelético como o cardíaco apresentam várias alterações comprovadas nas situações diabéticas, reflectindo possíveis adulterações nas proteínas contrácteis e nos sistemas membranares que controlam a cinética intracelular de cálcio. Se, por um lado, existe uma depressão no transporte de Ca^{2+} pela bomba do sarcolema (PMCA) verifica-se, por outro, um decréscimo significativo do sequestro de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático, em músculo esquelético e cardíaco. Isto irá significar um decréscimo do efluxo de cálcio através da sarcolema e do influxo do ião para o interior do retículo; o resultado final é um aumento anómalo da concentração intracelular de cálcio e, conseqüentemente, a diminuição do nível de relaxamento muscular. E, de facto, as complicações diabéticas incluem cardiomiopatia e, mais raramente, dor crónica muscular; note-se, igualmente, que o músculo esquelético é um dos principais reservatórios de glicose do organismo e dos tecidos mais sensíveis à acção da insulina (Makino *et al.*, 1987; Swislocki *et al.*, 1997; Petersen & Shulman, 2002; Karlsson, 2005).

Monitorizando-se o decaimento radioactivo do isótopo ^{45}Ca (como compilado na secção 3.2 do Procedimento Experimental), foi possível determinar o nível de sequestro e acumulação de cálcio, em relação aos valores de IC_{50} (descritos anteriormente para a actividade hidrolítica da ATPase, por Aureliano *et al.* 2008) dos oxovanadatos e complexos de vanádio em estudo.

2.2.1. Efeito de complexos coordenados de vanádio na acumulação de cálcio por VRS

Os compostos de oxovanadato e vanadilo que possuem diversos efeitos mimetizadores das acções da insulina no metabolismo celular, têm demonstrado alterar os fluxos celulares de cálcio, através da inibição da actividade dos sistemas transportadores SERCA e PMCA. Foi analogamente descrita (Delfert & McDonald, 1985) a

redução do transporte de cálcio para a SERCA de retículo endoplasmático em adipócitos de rato, apontando-se valores de IC_{50} de cerca 30 a 33 μM ; no caso da PMCA desses adipócitos, contudo, constatou-se uma sensibilidade inferior para sais de vanadato e vanadilo na inibição do transporte de cálcio (IC_{50} de 144 e 92 μM , para vanadato e vanadilo). Estas observações destacam o facto de a sensibilidade das espécies e compostos de oxovanádio ser diferente entre as várias isoformas de Ca^{2+} -ATPase. No presente trabalho, analisaram-se preparações de VRS portadoras da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético, um dos tecidos que mais é afectado na patologia *Diabetes mellitus* Tipo 2. Em preparações de sarcovesículas nativas as averiguações relativas à acumulação de cálcio são um reflexo tanto da acumulação propriamente dita como do efluxo, passivo e activo, do catião. A presença do agente precipitante oxalato permite, contudo, a diminuição dos níveis de cálcio no interior das sarcovesículas, uma vez que o oxalato penetra no lúmen destas e remove praticamente todo o Ca^{2+} armazenado no meio intra-vesicular, garantindo a ausência do gradiente de cálcio e eliminando a inibição da enzima, por *feedback*, pelo Ca^{2+} lumenal; este artifício permite a observação, apenas, da acumulação de cálcio (de Meis, 2002). O anião oxalato impede, portanto, que a bomba seja inibida pelo próprio ião que transporta e que esta acumule virtualmente todo o cálcio presente no meio reaccional. Por outro lado, as actividades da Ca^{2+} -ATPase não atingem o equilíbrio, pelo que a velocidade de transporte de cálcio (e a “hidrólise de ATP”) se mantém próxima dos valores iniciais, durante todo o processo. Dito de outro modo, a acumulação de Ca^{2+} torna-se mais fácil de monitorizar (da Costa & Madeira, 1986).

A curva de progressão da acumulação de ^{45}Ca obtida para os três tempos de transporte considerados (0, 10 e 30 segundos) (Figura III.3), permitiu considerar a existência de uma relação linear entre o cálcio transportado e o tempo de acumulação, para a maioria das situações experimentais, exceptuando no caso de HAIDA-V(IV). Aos 30 segundos de sequestro, na presença de oxalato, as diferenças encontradas tornaram-se mais evidentes e, exceptuando no que respeita ao análogo de amavadina, continuaram a aumentar; esta última constatação permitiu inferir não só a diminuição da concentração de Ca^{2+} no interior das sarcovesículas (que, assim, não poderá limitar retroactivamente o transporte), como também a eliminação, pelo menos em grande parte, do efluxo do catião. Não só se obteve o artifício experimental pretendido (medição, apenas, da acumulação de ^{45}Ca) como também se pôde avaliar a integridade das VRS utilizadas, admitindo-se estarem seladas (em condições nativas, portanto).

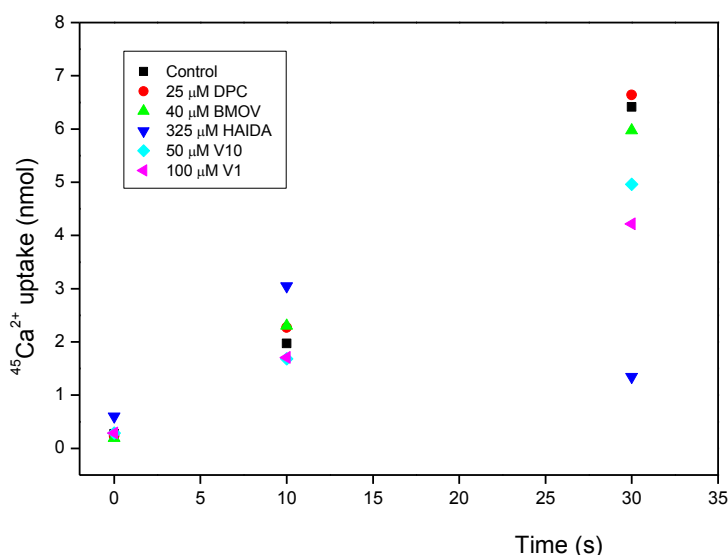


Figura III.3 – Curva de progressão obtida para a acumulação de ^{45}Ca na presença de PDC-V(V) 25 μM , BMOV-V(IV) 40 μM , HAIDA-V(IV) 325 μM , solução “decanadato” 50 μM (V10) e solução “metavanadato” 100 μM (V1), a pH 7, 25°C e utilizando-se oxalato; ao controlo (*Control*), corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção. ^{45}Ca uptake refere-se ao sequestro observado do isótopo radioactivo de cálcio e está representado em valores de nmol; a concentração de proteína utilizada foi 0,01 mg/mL. *Time* refere-se ao tempo de transporte desse isótopo e é dada em segundos. Os valores observados no tempo 30 s foram convertidos em actividades de $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ de VRS.

Na Figura III.4 A estão ilustrados os efeitos promovidos pelas soluções dos complexos coordenados de vanádio PDC-V(V), BMOV-V(IV) e HAIDA-V(IV), nas concentrações de IC₅₀ determinadas por Aureliano *et al.* (2008) bem como por soluções de “decavanadato” e “metavanadato”, na acumulação de cálcio (na presença de oxalato) pela SERCA de músculo esquelético. A tabela III.2, por seu turno, regista os valores observados para o sequestro de ⁴⁵Ca (μmol/min.mg proteína), nessas condições.

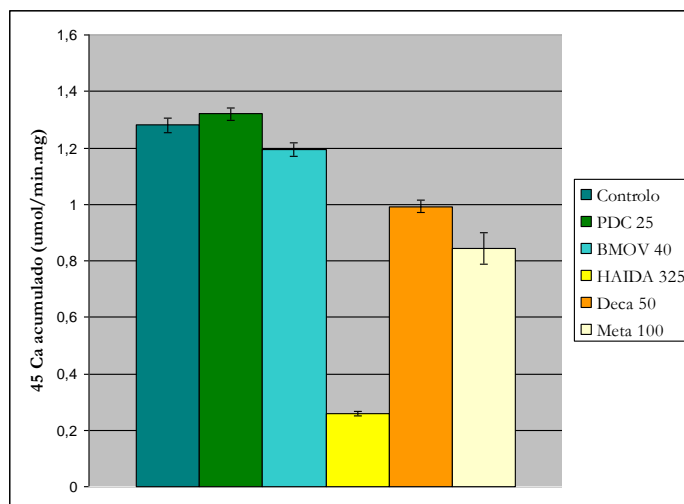


Figura III.4 – Efeito de soluções de oxovanadato e complexos de vanádio na acumulação de ⁴⁵Ca pela bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático, na ausência de um gradiente de cálcio. A) ⁴⁵Ca sequestrado (μmol/min.mg) na presença de PDC-V(V) 25 μM (PDC 25), BMOV-V(IV) 40 μM (BMOV 40), HAIDA-V(IV) 325 μM (HAIDA 325), solução “decavanadato” 50 μM (Deca 50) e solução “metavanadato” 100 μM (Meta 100), a pH 7, 25°C e findos 30 s de transporte; ao controlo, corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção.

Verifica-se que os únicos efeitos significativos na acumulação do catião divalente provieram da adição de soluções nominais de “metavanadato” 100 μM e “decavanadato” 50 μM e de 325 μM de HAIDA-V(IV), ao fim de trinta segundos de transporte (Figura III.3 A) Com base nestes valores, estabeleceu-se a ordem relativa de inibição da acumulação de ⁴⁵Ca: HAIDA-V(IV) >>> solução “metavanadato” > solução “decavanadato” >> BMOV-V(IV) ≥ PDC-V(V), nas concentrações de composto de vanádio ou oxovanádio totais que representam o IC₅₀ relativo à hidrólise do resíduo aspartil-fosforil do local catalítico da enzima. O composto BMOV-V(IV), bem como PDC-V(V) afiguraram não exercer efeitos significativos, uma vez que as diferenças encontradas se encontram dentro do erro experimental observado.

Existe, pois, uma disparidade entre os resultados obtidos aqui e anteriormente (Aureliano *et al.*, 2008) para o efeito na hidrólise de ATP, relativamente ao transporte de Ca²⁺: o perfil inibitório hidrolítico não é o mesmo que o de translocação de cálcio, e as concentrações que inibem em 50 % a actividade hidrolítica aparentam inibir em mais o sequestro de cálcio por HAIDA-V(IV) (79,9 %); as soluções de “metavanadato” e “decavanadato”, por seu turno, inibem-no em menor extensão (34,1 e 22,6 %, respectivamente). No que respeita às soluções de vanadato, poder-se-ia pensar à partida que o resultado é inesperado, uma vez que está estabelecido o facto de soluções de “decavanadato” constituírem inibidores mais eficazes da acumulação de Ca²⁺, em relação às de “metavanadato”

Tabela III.2 – Efeito de soluções de oxovanadato e complexos de vanádio na acumulação de ^{45}Ca pela bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático, na ausência de um gradiente de cálcio. A) Valores de ^{45}Ca sequestrado ($\mu\text{mol}/\text{min.mg}$) na presença de PDC-V(V) 25 μM , BMOV-V(IV) 40 μM , HAIDA-V(IV) 325 μM , solução “decavanadato” 50 μM e solução “metavanadato” 100 μM , a pH 7, 25°C e findos 30 s de transporte; ao controlo, corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção.

Situação	^{45}Ca acumulado ($\mu\text{mol}/\text{min.mg}$)
Controlo (ausência de V)	1,28 \pm 0,026
PDC-V(V) 25 μM	1,32 \pm 0,022
BMOV-V(IV) 40 μM	1,19 \pm 0,024
HAIDA-V(IV) 325 μM	0,26 \pm 0,008
Solução “decavanadato” 50 μM	0,99 \pm 0,022
Solução “metavanadato” 100 μM	0,844 \pm 0,056

(Aureliano & Madeira, 1994 & 1998; Sousa, 2006; Aureliano, 2007 & 2009). Contudo, é preciso não esquecer que a formação e estabilidade de espécies oligoméricas de oxovanadato está dependente da concentração total de vanádio em solução; assim, para uma concentração de 50 μM de vanádio total, correspondentes a 5 μM de V_{10} , poderá não existir a formação significativa de espécies decaméricas, que necessitam de unir dez átomos de vanádio, como descrito por outros autores (Chasteen, 1983; Crans 1998; Tiago *et al.* 2007). De resto, a inibição verificada mediante as soluções de oxovanádio está de acordo com o que já está descrito na literatura, onde se indica que, em condições nas quais o gradiente de cálcio é inexistente (utilizando-se oxalato ou fosfato), soluções contendo espécies V_1 e V_{10} inibirão o sequestro de Ca^{2+} pela ATPase (Aureliano *et al.*, 2007a & 2007b; Aureliano, 2000a & 2008; Aureliano & Crans, 2009).

Mesmo o facto de os perfis de inibição de hidrólise do aspartil-fosforil (da fosfoenzima) e de sequestro de Ca^{2+} serem díspares, não é surpreendente e está de acordo com o que é geralmente reportado para o efeito de oxovanádios na Ca^{2+} -ATPase de RS (Pick, 1982; Aureliano & Madeira, 1994; Sousa, 2006). Pode-se inferir, assim, que os complexos PDC-V(V) e BMOV(IV) não exerceram efeito significativo na eficiência energética da enzima, em relação ao estado controlo; a eficiência energética da enzima é dada mediante a determinação da razão Ca^{2+} translocado/ATP “hidrolizado” e, em condições nativas, o seu valor teórico é 2 (Aureliano, 1995).

As soluções de “meta” e “decavanadato” levaram a uma diminuição da eficiência energética, tendo-se reportado valores de 1,5 e 1,3 (Tabela III.3); a solução de “metavanadato” foi a que maior efeito produziu, se não se contar com o efeito de HAIDA-V(IV). Em última análise, PDC e BMOV aumentaram a eficiência energética numa situação em que esta foi diminuída pela inibição da hidrólise de ATP, o que já foi sugerido anteriormente por Aureliano (1995) e Pick (1982).

Todavia, sabe-se que soluções contendo espécies V_1 e V_4 aumentam a eficiência energética da enzima, promovendo o aumento do quociente $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ (Hasselbach & Makinose, 1962; Pick, 1982; Aureliano & Madeira, 1994); está igualmente descrita uma situação na qual o IC_{50} de soluções de “monovanadato” contendo estas espécies levam ao estímulo da acumulação de Ca^{2+} (Aureliano & Madeira, 1998), que não se observou no

Tabela III.3 – Efeito de soluções de oxovanadato e complexos de vanádio na eficiência energética (quociente $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$) da bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático, na ausência de um gradiente de cálcio, na presença de PDC-V(V) 25 μM BMOV-V(IV) 40 μM HAIDA-V(IV) 325 μM , solução “decavanadato” 50 μM e solução “metavanadato” 100 μM , a pH 7, 25°C e findos 30 s de transporte; ao controlo, corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção. Considerou-se $\text{ATP} = 50\%$ e as percentagens de acumulação de cálcio correspondentes, em cada situação (% de controlo); o valor da eficiência energética para condições sem oxovanádios é teórico e reportado por Hasselbach & Makinose (1962). A coluna $\Delta(\text{Ca}^{2+}/\text{ATP})$ representa o aumento ou diminuição da eficiência energética, na presença dos compostos descritos; considerou-se $\Delta(\text{Ca}^{2+}/\text{ATP})$ igual à $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ derivada da presença de cada composto, à qual se subtrai a eficiência energética derivada da sua ausência (condições nativas). O símbolo “+” corresponde a um aumento e “-”, a uma diminuição da eficiência energética.

Situação	Eficiência Energética ($\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$)	$\Delta(\text{Ca}^{2+}/\text{ATP})$
PDC-V(V) 25 μM	2,06	+ 0,06
BMOV-V(IV) 40 μM	1,86	- 0,15
HAIDA-V(IV) 325 μM	0,4	- 1,6
Solução “decavanadato” 50 μM	1,55	- 0,45
Solução “metavanadato” 100 μM	1,32	- 0,68
Condições nativas	2,0	0

presente trabalho. O resultado reportado no presente trabalho pode dever-se ao facto de nas pequenas concentrações utilizadas, existirem maioritariamente espécies V_1 ; na solução “decavanadato”, é provável que a quantidade de espécies decaméricas seja reduzida. A falta de espécies oligoméricas em quantidade relevante (nomeadamente, V_4 e V_{10}), nestas condições, pode ser a explicação para os valores aqui registados e, ao mesmo tempo, sugere que sejam estas as espécies responsáveis pela existência de efeitos mensuráveis na acumulação de cálcio. Não se excluiu, contudo, a hipótese de um comportamento anómalo ou de alterações nas soluções.

Por outro lado, dado que a presença de oxalato diminui consideravelmente a concentração de Ca^{2+} livre no meio, condição que favorece o conformero E2 da ATPase, é presumível admitir que os iões de vanadato poderão ver a sua ligação favorecida; a enzima ficaria bloqueada, assim, nesta conformação. Tal situação já foi observada por Pick (1982) e Dupont & Bennet (1982).

De notar, o facto de o complexo HAIDA-V(IV) ter originado uma curva de progressão de produtos defectiva (Figura VIV.1 do Anexo VIV), na qual inicialmente (ao fim de 10 segundos) parece existir uma activação do transporte, seguida de uma queda abrupta (aos 30 segundos) nos valores da acumulação de ^{45}Ca . Neste ponto do estudo experimental, considerou-se provável que algum elemento da mistura reaccional pudesse estar interferindo com os compostos de oxavanádio, nomeadamente com o análogo de amavadina, mascarando os seus possíveis efeitos, na acumulação de ^{45}Ca pela bomba de RS. As possíveis interações de sacarose e oxalato, presentes nas soluções reaccionais, foram então objecto de estudo adicional, com vista a se identificarem interferências com o método utilizado.

Verificou-se que o composto análogo de amavadina, como se suspeitava, é susceptível de formar complexos com oxalato, e em larga extensão. Tal ficou demonstrado mediante a obtenção de espectros de UV/Vis (em comprimentos de onda de 280 a 700 nm) tanto de oxalato como de HAIDA-V(IV), bem como de misturas de oxalato e HAIDA em vários tempos, onde é clara a interacção entre os dois compostos orgânicos, uma vez que a mistura de ambos resulta num perfil de absorção bastante distinto do espectro obtido para cada um dos

compostos separadamente. A partir de cerca de 400 nm há um aumento considerável do valor de absorvância, não atribuível apenas a um somatório das absorvâncias de uma e outra solução de oxovanádio (Figuras III.5 A e B). Observou-se, inclusive, a existência de uma cinética na interacção entre HAIDA-V(IV) e oxalato, representada por uma diminuição na absorvância registada a partir de cerca de 400 nm; o formato geral do espectro de HAIDA com oxalato, contudo, não é alterado com o tempo, sugerindo o aparecimento de um complexo HAIDA-oxalato (Figuras III.5 C).

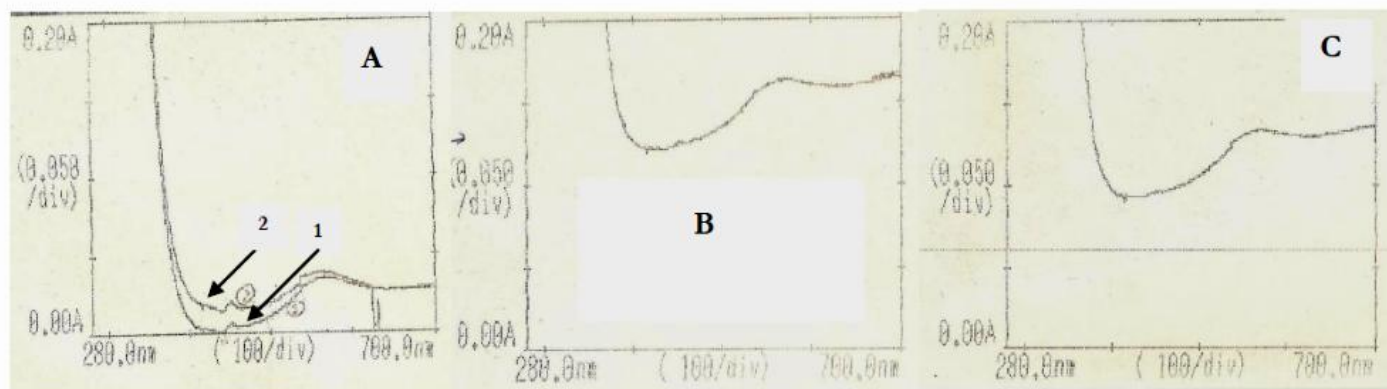


Figura III.5 – Espectros de absorção ultravioleta/visível de soluções de HAIDA-V(IV) 1 mM e oxalato 5 mM, a pH 7 e 25 °C (intervalo de comprimentos de onda: 280-700 nm). **A)** Espectro de absorção de uma solução de HAIDA-V(IV) 1 mM (**1**) e de uma solução de oxalato 5 mM (**2**). **B)** Espectro de absorção de uma mistura de soluções de HAIDA-V(IV) 1 mM e oxalato 5 mM, ao fim de 5 minutos de incubação do complexo com oxalato. **C)** Espectro de absorção de uma mistura de soluções de HAIDA-V(IV) 1 mM e oxalato 5 mM, ao fim de 10 minutos de incubação do complexo com oxalato.

Os complexos PDC-V(V) e BMOV-V(IV) não apresentaram interacção considerável com oxalato, pelo que os resultados obtidos com estes compostos, para a translocação de ^{45}Ca , são mais probatórios. O efeito de HAIDA-V(IV) não pode ser considerado nestas condições, facto pelo qual se levou a cabo um novo ensaio de sequestro de cálcio na ausência de oxalato. Quando um agente precipitante como este último não está presente, o transporte vectorial de cationes pela Ca^{2+} -ATPase está acoplado à hidrólise de ATP e é limitado pela existência de um gradiente de Ca^{2+} ; quando a concentração deste ião atinge níveis saturantes no lúmen de VRS, a enzima é confrontada com um efeito retroactivo, que a leva a atingir rapidamente o ponto de saturação. Concomitantemente, dá-se um efluxo de Ca^{2+} , estratégia mecanística para manter a concentração luminal de cálcio dentro de valores que permitam a ininterruptão do seu transporte. Este efluxo pode ser passivo ou activo. O primeiro caso ocorre quando não há associação à síntese de ATP, levando a bomba a funcionar como um canal de cálcio; no segundo caso, o efluxo está acoplado ao ciclo inverso da ATPase, onde o ATP produzido irá energizar a translocação de cálcio para o exterior das VRS (Aureliano *et al.*, 2007a & 2007b; Aureliano, 2000a & 2008; Aureliano & Crans, 2009).

A curva de progressão obtida para cinco tempos de transporte (0, 5, 10, 30 e 60 segundos), na ausência de oxalato (Figura III.6), revelou-se distinta da reportada na presença desse composto, como seria de esperar, já que existem limitações à actividade transportadora; por outro lado, estes valores reflectem também o efluxo de ^{45}Ca . Aos 30 segundos de sequestro, na ausência de oxalato, as diferenças encontradas são evidentes, como

anteriormente; contudo, é visível que a enzima entra em situação de saturação a partir dos 10 s de transporte, tanto na ausência como na presença de BMOV-V(IV) 100 μM . O análogo de amavadina 500 μM promoveu essa saturação praticamente depois do início do transporte; na presença de PDC-V(V), porém, não se observou a saturação dos níveis de Ca^{2+} no interior das sarcovesículas, nem ao

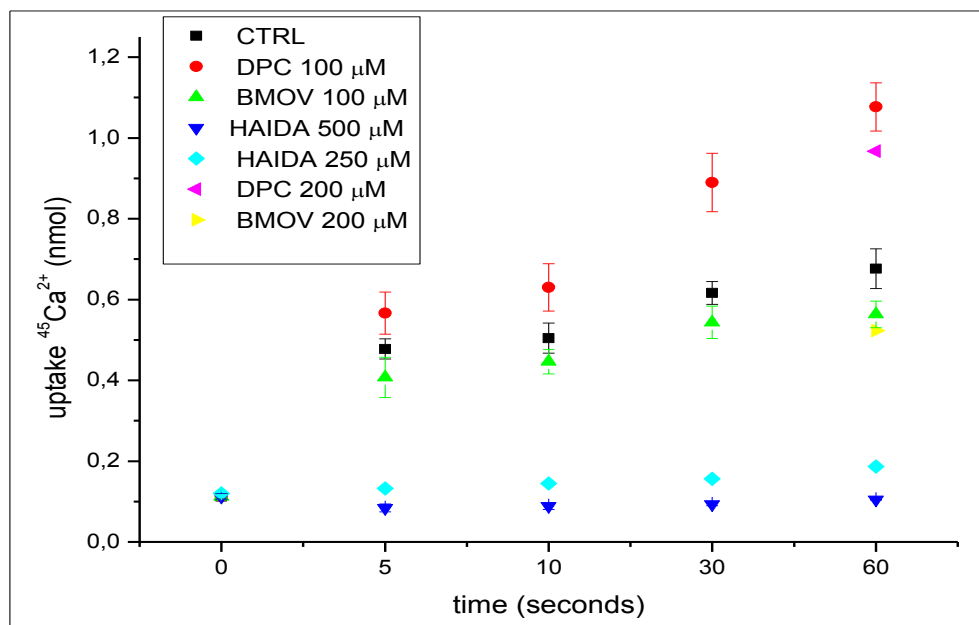


Figura III.6 – Curva de progressão obtida para a acumulação de ^{45}Ca na presença de PDC-V(V) 100 e 200 μM (DPC), BMOV-V(IV) 100 e 200 μM , HAIDA-V(IV) 200 μM e 500, a pH 7, 25°C e na ausência de oxalato; ao controlo (CTRL), corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção. ^{45}Ca uptake refere-se ao sequestro observado do isótopo radioactivo de cálcio e está representado em valores de nmol; a concentração de proteína utilizada foi 0,01 mg/mL. Time refere-se ao tempo de transporte desse isótopo e é dada em segundos (*seconds*). Os valores observados no tempo 30 s foram convertidos em actividades de $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ de VRS.

fim de 60 segundos de transporte. Este último apontamento sugere a hipótese de o complexo de vanadato poder estar a interferir com o gradiente de cálcio formado (quicá actuando como um agente sequestrante no interior das VRS?), ou a aumentar a eficiência energética do transporte; com efeito, verifica-se uma amplificação do sequestro de cálcio após os primeiros 5 segundos de reacção, que se torna significativa aos 30 segundos. A análise da figura VIV.6 permite ainda reportar a anulação da translocação de cálcio por concentrações de 250 e 500 μM de HAIDA-V(IV), o complexo mais estável; isto prova que um composto coordenado de vanadilo pode interferir com a bomba de cálcio do RS, sem estar associado à decomposição em espécies oligoméricas ou monoméricas de V. Não é demais lembrar que não existem dados na literatura, até à data, que refiram o efeito dos complexos em estudo na translocação de cálcio pela SERCA de músculo esquelético.

Nas figura III.7 estão ilustrados os efeitos promovidos pelas soluções dos complexos coordenados de vanádio PDC-V(V), BMOV-V(IV) e HAIDA-V(IV) na acumulação de cálcio. A tabela III.4, por seu turno, regista os valores observados para o sequestro de ^{45}Ca ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ proteína), nestas novas condições. Verifica-se que os efeitos mais significativos na acumulação do cálcio advieram da presença de HAIDA-V(IV) 500 μM e PDC-V(V) 100 μM , ao fim de trinta segundos de transporte (Figura III.7). Com base nos valores reportados, estabeleceu-se a

ordem relativa de inibição da acumulação de ^{45}Ca : HAIDA-V(IV) $\gg\gg$ BMOV-V(IV) = controlo; 100 μM de PDC-V(V), por sua vez, estimularam significativamente o transporte de Ca^{2+} . Estas observações e a inibição devida aos complexos de vanadilo já tinham sido observadas, aos 30 s, na ausência do gradiente de cálcio, confirmando e reforçando essas observações (não obstante as interferências promovidas pelo oxalato).

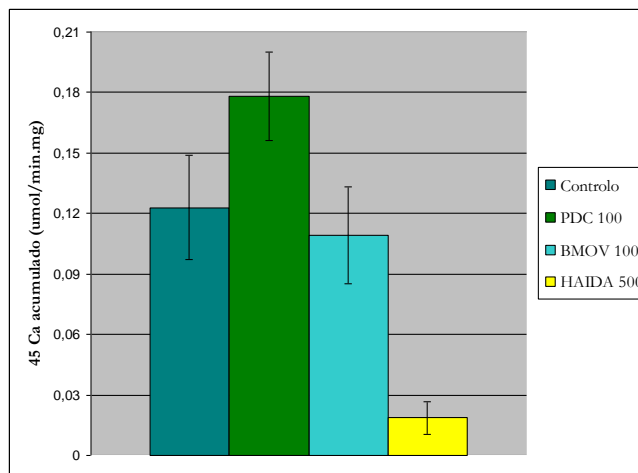


Figura III.7 – Efeito de complexos de vanádio na acumulação de ^{45}Ca pela bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático, na presença de um gradiente de cálcio. A) ^{45}Ca sequestrado ($\mu\text{mol}/\text{min.mg}$) na presença de PDC-V(V) 100 μM (PDC 100), BMOV-V(IV) 100 μM (BMOV 100), HAIDA-V(IV) 500 μM (HAIDA 500), a pH 7, 25°C e findos 30 s de transporte; ao controlo, corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção.

Tabela III.4 – Efeito de soluções de oxovanadato e complexos de vanádio na acumulação de ^{45}Ca pela bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático, na presença de um gradiente de cálcio. A) Valores de ^{45}Ca sequestrado ($\mu\text{mol}/\text{min.mg}$) na presença de PDC-V(V) 100 μM , BMOV-V(IV) 1000 μM , HAIDA-V(IV) 500 μM , a pH 7, 25°C e findos 30 s de transporte; ao controlo, corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção.

A	Situação	^{45}Ca acumulado ($\mu\text{mol}/\text{min.mg}$)
	Controlo (ausência de V)	0,123 ± 0,0057
	PDC-V(V) 100 μM	0,178 ± 0,014
	BMOV-V(IV) 100 μM	0,109 ± 0,008
	HAIDA-V(IV) 500 μM	0,017 ± 0,0067

É interessante notar, igualmente, que ambos os compostos coordenados de vanadilo, HAIDA e BMOV, levaram a uma inibição da actividade de transporte, o que está de acordo, mais uma vez, com as disparidades de comportamento entre vanadilo e vanadato.

É de relembrar as constatações de Hasselbach & Makinose (1962), Pick (1982) e Aureliano & Madeira (1994), de que soluções contendo os vanadatos V_1 e V_{10} aumentam a eficiência energética de SERCA e podem originar um estímulo no transporte de cálcio. Assim, é possível inferir que o oxovanadato coordenado PDC-V(V) (na concentração de 100 μM), que se sabe sofrer reacções redox e hidrólise a pH neutro (Aureliano, 2008), pode estar a actuar sinergicamente com o tetrâmero e o monómero de oxovanadato.

Também no caso de se observar o transporte de Ca^{2+} sem recorrer a oxalato se pensa poder estimar que a mesma concentração de vanádio exercerá efeitos distintos nas funções de transporte e de hidrólise levadas a cabo pela bomba de cálcio de RS; neste trabalho, contudo, não se determinaram os valores de inibição de hidrólise de ATP pelos compostos coordenados em estudo, nas concentrações escolhidas para o transporte de ^{45}Ca . Considerando-se as concentrações de IC_{50} para a hidrólise do aspartil-fosforil, estimou-se um quociente Ca^{2+} -ATP no intuito de uma aproximação ao efeito na eficiência energética da enzima; esses quocientes estão compilados na tabela III.5.

Tabela III.5 – Efeito de soluções de oxovanadato e complexos de vanádio na eficiência energética (quociente Ca^{2+} /ATP) da bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático, na presença de um gradiente de cálcio, para PDC-V(V) 100 μM BMOV-V(IV) 100 μM HAIDA-V(IV) 500 μM , a pH 7, 25°C e findos 30 s de transporte; ao controlo, corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção. Considerou-se ATP = 50 % e as percentagens de acumulação de cálcio correspondentes, em cada situação (% de controlo); o valor da eficiência energética para condições sem oxovanádios é teórico e reportado por Hasselbach & Makinose (1962). A coluna $\Delta(\text{Ca}^{2+}/\text{ATP})$ representa o aumento ou diminuição da eficiência energética, na presença dos compostos descritos; considerou-se $\Delta(\text{Ca}^{2+}/\text{ATP})$ igual à $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ derivada da presença de cada composto, à qual se subtrai a eficiência energética derivada da sua ausência (condições nativas). O símbolo “+” corresponde a um aumento e “-”, a uma diminuição da eficiência energética.

Situação	Eficiência Energética ($\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$)	$\Delta(\text{Ca}^{2+}/\text{ATP})$
PDC-V(V) 100 μM	2,9	+ 0,9
BMOV-V(IV) 100 μM	1,77	- 0,23
HAIDA-V(IV) 500 μM	0,3	- 1,7
Condições nativas	2,0	0

Tal aproximação deixa antever de imediato o facto de o composto HAIDA-V(IV) reduzir em larga extensão a eficiência energética da bomba. Mesmo existindo hidrólise de ATP (é o composto que menos inibe a actividade ATPásica), a acumulação de cálcio praticamente que cessa; evidencia-se aqui, portanto, que o análogo de amavadina, estável, interfere directamente com a translocação de cálcio, o que sugere uma clara interacção com os sítios de transporte de cálcio desta SERCA, por um lado, e o bloqueio da mesma na sua conformação E_2 (de baixa afinidade para Ca^{2+}), por outro. É possível, ainda, que se verifiquem as duas situações, o que poderia explicar a cessação quase total do transporte.

Já os 100 μM do composto BMOV-V(IV), reactivo, apesar de serem passíveis de inibir em grande extensão a hidrólise de ATP pela bomba, contractuam ao não reduzir significativamente a acumulação de Ca^{2+} e, por consequente, a eficiência energética, como já se descreveu atrás. O outro composto insulino -mimético, PDC-V(V), na concentração de 100 μM revelou um comportamento excepcional, ao aumentar em quase 1 unidade o valor do coeciente energético e em condições nas quais a função de hidrólise e de transporte se encontram acopladas. Esta última observação é de especial importância, uma vez que este composto é também aquele que mais inibe a enzima; ao levar ao aumento da eficiência energética, este complexo de oxovanadato consegue ainda elevar em quase 50 % o transporte de cálcio, significando isto que conseguirá reverter a acumulação citosólica

elevada e anómala de Ca^{2+} em células do músculo esquelético diabético. O complexo PDC-V(V) pode significar o restauro da homeostasia intracelular de cálcio, bem como a melhoria da sinalização celular associada a este catião e, por conseguinte, das vias metabólicas que dele dependem, como a via de acção de insulina. Dito de outra forma, este composto parece possuir uma acção terapêutica eficaz nas desordens associadas a diabetes ou a disfunções na sinalização celular por Ca^{2+} , mais ainda do que o candidato BMOV-V(IV). Estas observações são consistentes com Delfert & McDonald (1985), que sugeriram a possibilidade de o mecanismo de insulino-mimetismo de iões de vanádio passar por uma interacção com as SERCAs e PMCAs.

É interessante notar que, apesar de estar descrita a inibição promovida por iões de vanadato e vanadilo no transporte de Ca^{2+} pelas Ca^{2+} -ATPases de membrana plasmática e de retículo endoplasmático de adipócitos (Delfert & McDonald, 1985), o composto de vanadato PDC e o complexo de vanadilo BMOV, não apresentaram essa linha de tendência nos ensaios considerados no presente trabalho. Tal parece sugerir, em especial no caso de PDC-V(V), a manutenção da maior parte da integridade dos complexos, uma vez que, se existissem iões em solução, demonstrariam o perfil registado por Delfert & McDonald (1985). Contudo, os autores não referem a espécie de vanádio interactuante e sabe-se, adicionalmente, que soluções nominais de metavanadato de amónio, contendo espécies monoméricas, diméricas e tetraméricas, tendem a estimular o transporte de cálcio e não a inibi-lo. Mais uma vez é colocada em evidência a necessidade de identificar as espécies de vanádio que estão, de facto, presentes em solução, uma vez que está bem patente o quão distintas poderão ser as suas acções. Por outro lado, é possível que as dissemelhanças no tipo de modelo utilizado (adipócitos, no caso descrito na literatura, e sarcovesículas de RS no presente trabalho) evoquem mecanismos de actuação diferentes. De facto, não é de estranhar, que os resultados obtidos com sistemas enzimáticos isolados (*in vitro*) não correspondam aos observados em células vivas (*ex vivo*) (Crans *et al.*, 2004; Thompson & Orvig, 2006).

Assim, no presente trabalho, e tendo em conta que se prevê que apenas uma pequena fracção de PDC-V(V) retenha a sua identidade estrutural (Aureliano *et al.*, 2008), sugere-se uma combinação de efeitos produzidos pelo complexo em si e pelos iões de vanadato em solução (nomeadamente, espécies V1 e V4), em especial por estes últimos. Já o complexo BMOV-V(IV) aparenta manter a sua integridade estrutural quase por inteiro (Aureliano *et al.*, 2008), actuando apenas com uma pequena fracção de iões V(V) maltol; é notório o facto de a espécie actuante se centrar em torno do estado de oxidação +5. Dado, ainda, que o análogo de amavadina, HAIDA-V(IV), é um complexo estável (Aureliano *et al.*, 2008), sugere-se que será este que estará a interagir com a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático. Se a presença de iões de oxovanadato aparenta estimular em larga escala a translocação de cálcio, ao passo que a presença do complexo intacto a inibe, pode-se inferir que, quando o vanádio está inserido numa esfera de coordenação, apresenta uma tendência inibitória que não se verifica em situações nas quais a espécie maioritária é o ião de vanadato, livre ou associado em pequenos oligómeros (V1, V2 e V4). Tal tendência, contudo, não é igual quando se analisa o efeito destes complexos e iões na actividade hidrolítica do sistema (Aureliano *et al.*, 2008), verificando-se, pois, que nas condições presentemente estudadas os complexos estudados promovem um desacoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte vectorial de iões Ca^{2+} , especialmente no caso de HAIDA-V(IV).

Note-se ainda que a interacção de HAIDA-V(IV) com a bomba do RS foi demonstrada na presença de oxalato. A presença dos iões cálcio, para além de deslocar o equilíbrio da enzima no sentido da conformação E1, deveria levar à ocupação dos locais externos (de elevada afinidade) e internos (de baixa afinidade) e favorecer a desvanadização da ATPase (Pick, 1982; Dupont & Bennet, 1982; Coan *et al.*, 1986; Aureliano, 1995). Deste modo, e dadas as observações feitas até agora, o complexo HAIDA-(IV) aparenta ligar-se a estes locais de um modo competitivo e favorável à vanadização promovida por um composto coordenado. Começa a estabelecer-se igualmente a sugestão de que enquanto que os complexos integrais de vanadilo interagem com os locais de transporte de cálcio (uma vez que revelam inibir a translocação de cálcio em maior escala do que inibem a hidrólise de ATP), os iões de vanadato, ou os seus pequenos oligómeros, tendem a actuar ao nível dos domínios nucleotídico ou de fosforilação (dado que tendem a inibir a hidrólise do intermediário fosfoenzimático). Este último conjunto, ao demonstrar também uma estimulação no transporte, sugere o aumento da afinidade da enzima para o ião Ca^{2+} , com uma concomitante deslocação do equilíbrio enzimático para o conformero E1 (de elevada afinidade para o catião). A Ca^{2+} -ATPase possui também vários grupos tiol dos quais se destacam três resíduos de cisteína localizados na região dos domínios de fosforilação e nucleotídico, sabendo-se que estes domínios ligam vanadato (Hua *et al.*, 1999). De notar, por fim, que estas observações foram registadas para níveis de composto mais elevados do que aqueles que são geralmente administrado em estudos *in vivo* (Aureliano *et al.*, 2008).

2.2.3. Efeito do tempo de incubação com complexos coordenados de vanádio no transporte de Ca^{2+}

Por forma a se avaliar o efeito de vários tempos de pré-incubação (5, 15, 30, 45 e 60 minutos) com complexos coordenados de V no transporte de Ca^{2+} pela bomba de VRS, analisou-se radiometricamente a translocação de ^{45}Ca , durante 30 segundos (tempo no qual já se tinham verificado existir dissimilaridades mensuráveis na actuação dos diversos complexos e em relação a um controlo), na presença de oxalato e de soluções contendo PDC-V(IV) 100 μM e BMOV-V(V) 100 μM . A tabela III.6, compila os valores observados para o sequestro de ^{45}Ca ($\mu\text{mol}/\text{min.mg}$ VRS), na presença de PDC-V(V) 100 μM (PDC 100), BMOV-V(IV) 100 μM (BMOV 100), a pH 7, 25 °C e findos 30 s de transporte, e em função dos tempos de incubação considerados.

Tabela III.6 – Efeito do tempo de pré-incubação com complexos de vanádio na acumulação de ^{45}Ca pela bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático, na presença de um gradiente de cálcio. Valores de ^{45}Ca sequestrado ($\mu\text{mol}/\text{min.mg}$) na presença de PDC-V(V) 100 μM , BMOV-V(IV) 1000 μM , a pH 7, 25°C e findos 30 s de transporte; ao controlo, corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção.

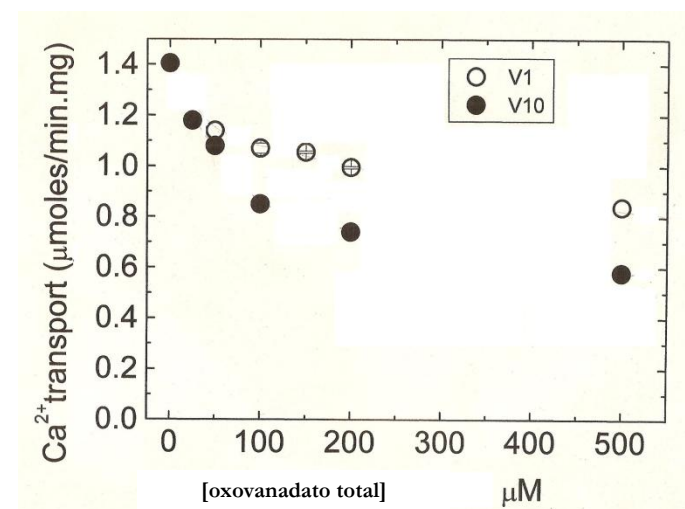
	^{45}Ca acumulado ($\mu\text{mol}/\text{min.mg}$)					
	0 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Controlo (ausência de V)	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02
PDC-V(V) 100 μM	0,98	0,91	0,84	0,86	1,07	1,22
BMOV-V(IV) 100 μM	0,98	0,88	0,95	0,89	0,95	0,88

Pela análise da tabela III.6 é possível notar o facto de o tempo de pré-incubação não aparentar afectar mensuravelmente o efeito promovido por PDC-V(V) e BMOV-V(IV) na acumulação, em 30 segundos, de ^{45}Ca . Para os 60 minutos dessa incubação, contudo, verifica-se um ligeiro aumento do transporte, promovido por PDV-V(V) e um ligeiro retardamento da translocação, na presença de BMOV-V(IV). Estes valores parecem encaixar-se no que já foi descrito, na medida em que o complexo de oxovanadato tendeu a exibir uma tendência para estimular o transporte de Ca^{2+} , ao passo que o complexo de oxovanadilo o inibia ligeiramente.

2.2.4. Titulação da acumulação de ^{45}Ca com soluções de vanadato

A acção de diferentes soluções com diferentes concentrações de “metavanadato” (50, 100, 150, 200, 500 μM) e “decavanadato” (25, 50, 100, 200, 500 μM) na translocação de ^{45}Ca , durante 30 segundos (e com uma pré-incubação de 5 minutos), por vesículas de RS, foi avaliada nas condições anteriormente descritas (alínea 3.2.1 do Procedimento Experimental). O transporte de Ca^{2+} ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$), dado em função da concentração total de vanadato (μM), está registado no gráfico ilustrado pela Figura III.8 e denota a titulação feita com as soluções nominais de meta e decavanadato.

Figura III.8 – Efeito de soluções de oxovanadato no transporte de Ca^{2+} pela bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático. O transporte de ^{45}Ca está denotado por “ Ca^{2+} transport” e é dado em valores de $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ proteína em VRS; estes valores estão representados em função da concentração total de vanadato e foram obtidos com a titulação do transporte de ^{45}Ca por soluções nominais de metavanadato (valores representados por círculos de fundo branco e denotados por “V1”) e decavanadato (valores representados por círculos de fundo preto e denotados por “V10”).



Ambas as soluções nominais de meta e decavanadato promoveram uma inibição da acumulação de cálcio pela bomba, de um modo dependente da concentração total de vanadato. Contudo, enquanto que o retardamento em 50 % do transporte de cálcio promovido por soluções de “metavanadato” se verificou para uma concentração de vanádio total de cerca de 25 μM (IC_{50} solução “metavanadato” é cerca de 25 μM , portanto), já as soluções de “decavanadato” apontaram essa inibição para cerca de 50 μM (IC_{50} solução “decavanadato” é cerca de 50 μM); de notar que, numa solução onde predominem as espécies decaméricas de vanadato, essa concentração deverá ser dividida por dez e considerada como sendo correspondente, no presente caso, a 5 μM de espécie decamérica. É

necessária, portanto, uma maior concentração de espécies “meta” monoméricas (25 μM) do que de espécies decaméricas de oxovanadato (5 μM) para que o transporte de cálcio seja inibido em cerca de 50 %.

Sabe-se que uma solução nominal de metavanadato 1 mM, contendo maioritariamente a espécie V_1 e quantidades análogas de V_2 e V_4 (numa concentração inferior), induz uma diminuição da actividade hidrolítica da Ca^{2+} -ATPase similar à solução nominal de decavanadato, que contém maioritariamente espécies decaméricas (V_{10}) (Aureliano & Madeira, 1994; Tiago, 2005). Apesar de a diferença entre a inibição promovida não ser muito díspare, há que ter em consideração que, na realidade, se tem apenas 100 μM de V_{10} numa solução de 1 mM em vanádio total. Estas evidências juntam-se a outras, na indicação do facto de o vanadato decamérico possuir um efeito inibitório superior ao observado para a espécie monomérica (V_1); estipularam-se, ainda, os valores de IC_{50} em 50 e 10 μM para as espécies monomérica e decamérica, respectivamente (Aureliano *et al.*, 2008). Os estudos do presente trabalho experimental tomaram estes valores como referência, considerando-se também que o perfil inibitório observado para a solução de “metavanadato” se deve à presença das espécies monomérica e tetramérica nesta solução (de notar que V_4 interactua com a enzima quer na conformação E_1 , quer na conformação E_2) (Aureliano, 1995; Aureliano, 2000; Pereira, 2003; Sousa, 2006).

É possível inferir, ainda, que os valores de IC_{50} determinados para a acumulação de cálcio promovida pela bomba embebida em sarcovesículas não são os mesmos que foram descritos por Aureliano *et al.* (2008) para a hidrólise do intermediário fosfoenzimático da SERCA. Em ambos os casos das soluções “metavanadato” e “decavanadato”, a quantidade de vanádio total necessária à inibição de 50 % das actividades é menor no que respeita ao sequestro de cálcio; isto significa que estas soluções aparentam inibir mais fortemente o transporte de Ca^{2+} , e sempre com o decâmico a demonstrar ser o inibidor mais potente.

Os resultados presentemente descritos não se coadunam com alguns estudos realizados nas mesmas condições experimentais, embora com diferentes concentrações de cálcio, proteína e substrato (ATP), que indicam uma inibição de 50% para uma solução de “decavanadato” 2 mM, não ocorrendo inibição para a solução de “metavanadato” 5 mM (Aureliano & Madeira, 1994). Vários outros trabalhos (Pick, 1982; Aureliano, 1995) indicam, adicionalmente, que vanadato 2 mM não inibe a acumulação de Ca^{2+} pela ATPase de vesículas de RS, observando-se apenas um retardamento inicial do processo, devido a uma pré-incubação das vesículas com vanadato, na ausência de Ca^{2+} (Pick, 1982). Por outro lado, também não parece haver concordância entre as presentes observações e as efectuadas por Sousa (2006), que descreveu um efeito inibitório menos potente na acumulação de Ca^{2+} relativamente à hidrólise de ATP.

As disparidades encontradas entre este e os estudos referenciados podem dever-se às concentrações de vanádio total utilizadas. Sabendo-se que concentrações mais elevadas favorecem o aparecimento de espécies oligoméricas de vanadato, pode-se inferir que o efeito observado no presente trabalho (que recorreu a concentrações diminutas de vanádio) poderá estar maioritariamente relacionado com a presença de quantidades elevadas de espécie monomérica, em especial nas soluções “metavanadato”. A espécie tetramérica, com efeito, tem sido associada a menores inibições da acumulação de Ca^{2+} e num grau inferior à verificada na actividade hidrolítica (Aureliano, 1995; Sousa, 2004); esta referência, juntamente com as observações aqui registadas, parecem sugerir

um papel do tetrâmero em promover apenas um retardamento inicial do sequestro de cálcio pela SERCA, e um papel do monómero e do hexâmero em aumentar o nível dessa inibição. Assim, o tetrâmero poderá unir-se a um local da enzima que apenas influencia o transporte de Ca^{2+} , mas inibindo em maior escala a hidrólise da fosfoenzima. Já o decâmero e o monómero parecem estar a interagir directamente com a bomba e a impedir a translocação do catião divalente em causa.

O oxoanião monovanadato (VO_4^{3-}) demonstra não só semelhanças físicas e químicas com o de monofosfato (PO_4^{3-}) como, adicionalmente, pode ser facilmente derivatizado em solução aquosa com uma variedade de ligandos; tende, igualmente, a adoptar uma geometria pentacoordenada bipiramidal trigonal, em redor do átomo central de vanádio. Estas características permitem que o monómero de vanadato actue como um análogo da conformação do grupo fosfato, no estado de transição. Tal analogia estrutural com o fosfato, para além de dar ao metal de transição uma aplicabilidade como sonda cinética e espectroscópica no estudo de enzimas que catalizam a transferência de grupos fosforilo, confere-lhe grande parte da actividade biológica que actualmente se lhe atribui (Nechay 1984; Aureliano & Madeira, 1998; Tiago, 2005).

Tem sido referido que o monómero de vanadato ocupa o local de fosforilação, não impedindo contudo a ligação do ATP ao local activo da enzima (Pick, 1982); este dado poderá explicar o porquê de se verificar, aqui, uma inibição mais acentuada da acumulação de Ca^{2+} quando comparada com o verificado na hidrólise do intermediário fosfoenzimático. Se por um lado a hidrólise não é completamente impedida, por outro, a ligação do monómero no local de fosforilação poderá induzir alterações conformacionais que dificultarão a translocação vectorial de iões ou, até, impedir o passo de transdução de energia que se pensa estar associado às ligações conformacionais que o intermediário fosfoenzimático deverá experimentar ao passar de um estado dito “energético” para um nível de “menor energia” (devido à presença de V1 não existiria, assim, tal transição energética e, logo, não se libertaria a energia necessária ao transporte activo).

A espécie decamérica aparenta possuir não um, mas sim, dois locais de ligação à enzima, sendo um deles o domínio de fosforilação, no resíduo aspártico e de um modo não-competitivo, (Csermely *et al.* 1985; Coan *et al.*, 1986); o outro, será o domínio nucleotídico, no próprio local de ligação de ATP, competindo com este nucleótido pela ligação à enzima (Varga *et al.*, 1985). A capacidade de interagir deste modo com a SERCA levará não só à forte inibição da actividade hidrolítica como à redução do transporte iónico. Adicionalmente, existem evidências de uma interacção com o domínio transmembranar de ligação de cálcio (Aureliano, 1995; Pereira, 2003).

Ambas as soluções de oxovanadato parecem estar, igualmente, a promover a diminuição da razão $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$, de um modo geral, promovendo não só o desacoplamento entre estas funcionalidades, como também, a diminuição da eficiência energética (menor quantidade de cálcio é bombeado por molécula de ATP “hidrolisada”). Tal observação não está de acordo com o relatado por Sousa (2004), por exemplo, mas, como já se referiu, no presente trabalho recorreu-se a concentrações reduzidas de vanádio total, nas quais a espécie monomérica será o principal inibidor, especialmente na solução de “metavanadato”.

É plausível admitir que a inibição da actividade hidrolítica da bomba de Ca^{2+} de RS verificada pelo vanadato se pode dever a uma utilização do vanadato como análogo do fosfato (formando-se um complexo enzima-vanadato) ou então a um bloqueio da enzima num determinado estado conformacional. Os dados apresentados

até agora corroboram o facto de soluções e complexos de oxovanádio no geral interferirem com as propriedades funcionais da Ca^{2+} -ATPase de RS, nomeadamente e comprovadamente, com a hidrólise do intermediário fosfoenzimático e a translocação de catiões Ca^{2+} , desacoplando uma função da outra. Esta interacção funcional inibitória, num ponto de vista fisiológico, poderá levar a uma desregulação da homeostasia normal de cálcio; no entanto, tal avaliação só poderá ser completa na presença de componentes destoxicantes de vanádio, nomeadamente do sistema de glutathiona reduzida (GSH) (Baran, 1998).

Por fim, os resultados registados até aqui permitem colocar a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético na trajectória biológica cursada pelas várias espécies de oxovanadato capazes de uma interacção com a enzima. Começa-se a colocar, então, a hipótese de este sistema de transporte transmembranar estar não só envolvido nas vias de acção da hormona insulina (como já se descreveu anteriormente), como ainda, constituir um alvo fisiológico de diversos compostos de oxovanádio, insulino-miméticos ou não.

2.3. Efeito de soluções de vanadato e de complexos de vanádio na afinidade de VRS para Ca^{2+} : análise radiométrica com ^{45}Ca e ^3H -glicose

O efeito promovido por soluções de oxovanadato e de três complexos coordenados de oxovanádio distintos, na afinidade de SERCA não-fosforilada de músculo esquelético, para iões Ca^{2+} , foi avaliado mediante a técnica radiométrica desenvolvida por Henao *et al.* (1991), e descrita no ponto 3.3 da secção de Procedimento Experimental. Subtraindo-se a radioactividade irradiada por ^{45}Ca da radioactividade emitida por ^3H -glicose, determinou-se a quantidade de Ca^{2+} ligada às VRS (expressa em nmoles de ^{45}Ca ligado/mg proteína); estes valores foram, em seguida, correlacionados com as alterações funcionais observadas ao nível de “hidrólise” de ATP e de translocação de catiões Ca^{2+} em VRS tratadas com várias soluções nominais de metavanadato e decavanadato, de compostos orgânicos insulino-miméticos e de um análogo do produto natural amavadina. Os resultados assim obtidos encontram-se representados nas Figuras III.9 e III.10.

Da análise das Figuras 9 e 10 ressalta, de imediato, o facto de a presença de HAIDA-V(IV) inibir de modo significativo a união de ^{45}Ca a sarcovesículas, de um modo que aparenta ser dependente da concentração do dito complexo coordenado (aumentando a inibição da união com o aumento da quantidade de composto) nas condições analisadas. É, também, o complexo que originou o resultado mais coerente; com efeito, se repararmos na existência de uma tendência linear entre a inibição da união de ^{45}Ca aos locais de ligação de Ca^{2+} da bomba, pode-se inferir que as observações se complementam e coadunam. Estes resultados são consistentes, pois, com uma interferência directa do complexo coordenado HAIDA-V(IV) com os locais de ligação de cálcio à ATPase, em condições que promovem tanto o retardamento da hidrólise da fosfoenzima (comparando-se com o descrito por Aureliano *et al.*, 2008) como a inibição da translocação do catião. Sugere-se que este análogo de amavadina, hidrolítica e oxidativamente estável, tem a capacidade de se unir especificamente aos locais de ligação de cálcio no domínio transmembranar, impedindo a ligação do catião e interferindo estrutural e funcionalmente com a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético. De notar ainda que, na ausência de ATP, não existirá

o intermediário fosfoenzimático e que a bomba de cálcio irá adotar as formas E1, E2 ou E1-Ca²⁺; tendo em conta que o ensaio foi feito na presença de ⁴⁵Ca, é de supôr que seja E1 a conformação preferencial adoptada, revelando a capacidade de HAIDA-V(IV) se unir a esta forma de alta afinidade para Ca²⁺, competindo com este

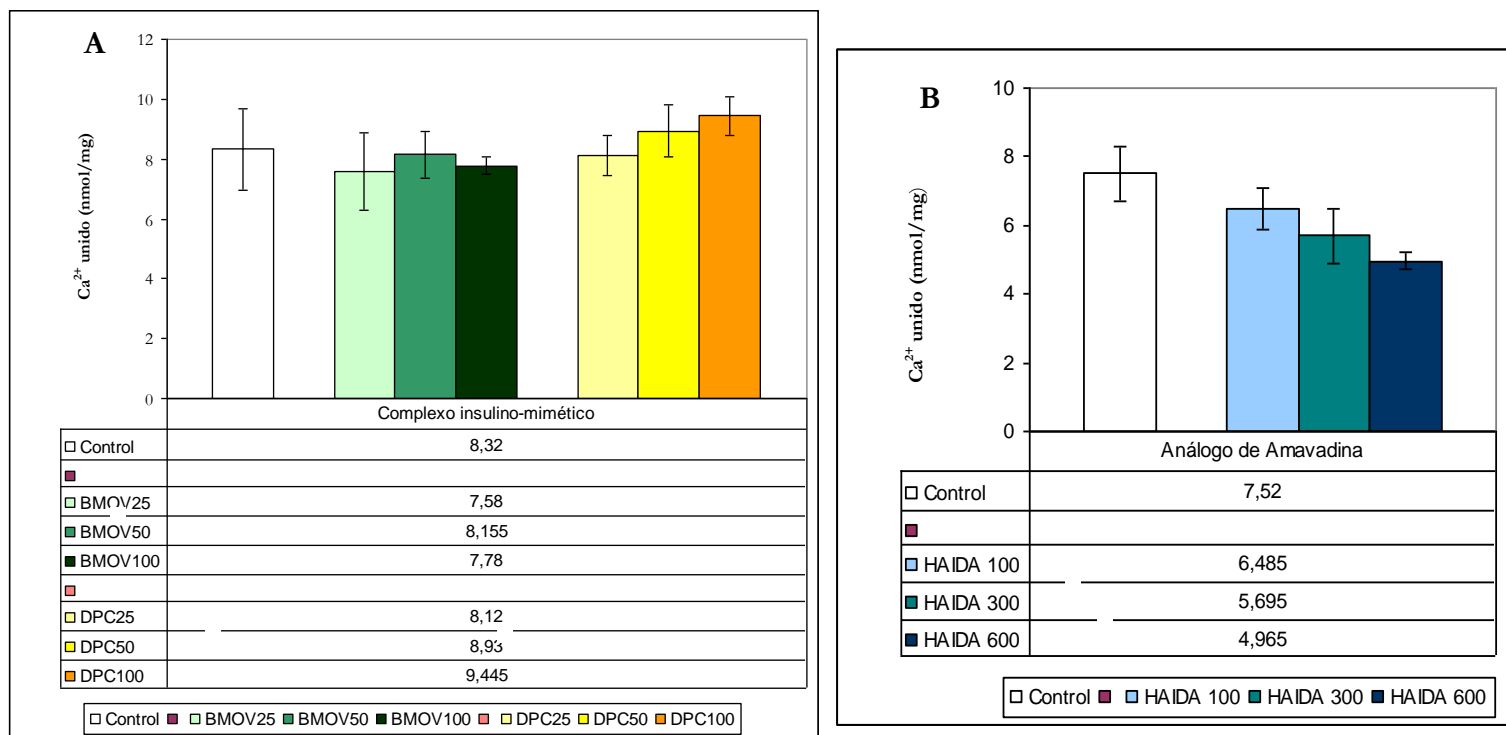


Figura III.9 – Quantidade de ⁴⁵Ca ligado a VRS (nmol ⁴⁵Ca unido/mg VRS) na A) ausência (controlo) e presença dos complexos insulino-miméticos PDC-V(V) 25, 50 e 100 μM (“DPC”, na figura), BMOV-V(IV) 25, 50 e 100 μM; B) ausência (controlo) e presença do análogo de amavadina HAIDA-V(IV) 100, 300 e 600 μM, a pH 7, 25 °C e pré-incubando as sarcovesículas com os compostos de oxovanádio durante 5 minutos.

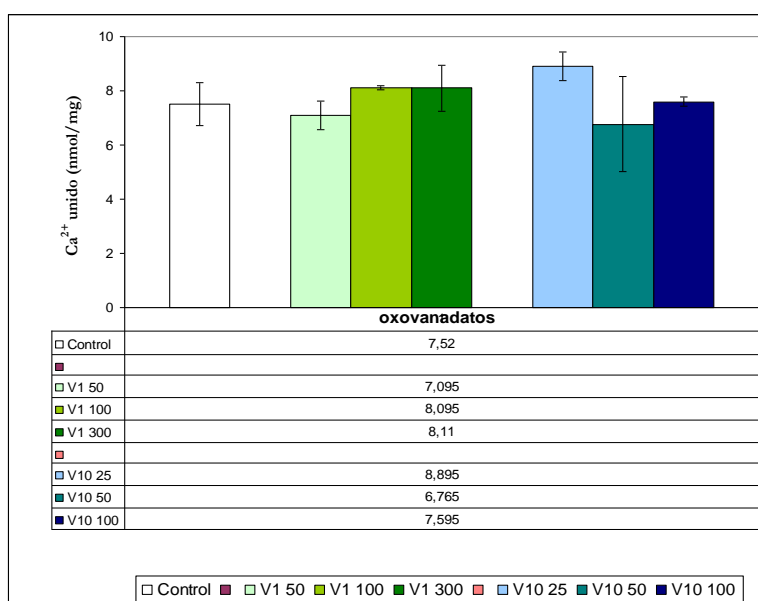


Figura III.10 – Quantidade de ⁴⁵Ca ligado a VRS (nmol ⁴⁵Ca unido/mg VRS) na ausência (controlo) e presença de soluções nominais de oxometavanadato (“V1” na figura) 50, 100 e 300 μM e soluções nominais de oxodecavanadato (“V10”, na figura) 25, 50 e 100 μM, a pH 7, 25 °C e pré-incubando as sarcovesículas com os compostos de oxovanádio durante 5 minutos.

pela ligação à ATPase e inibindo a união e translocação de Ca^{2+} pelo RS. Todavia, outra interpretação poderá residir na indução da conformação E2, de baixa afinidade para o Ca^{2+} , pelo composto HAIDA-V(IV).

Os efeitos descritos para a translocação e união de Ca^{2+} à bomba do RS, bem como na hidrólise de ATP, pelo complexo HAIDA-V(IV) poderão, ainda, estar associados à formação de dímeros desta ATPase, uma vez que a dimerização afecta os locais de ligação de Ca^{2+} localizados na zona transmembranar (Clarke *et al.*, 1989). A indução desta dimerização foi observada por Coan *et al.* (1986) mediante a ligação de espécies decaméricas de oxovanadato à enzima.

No que respeita ao complexo insulino-mimético de oxovanadilo BMOV-V(IV), é possível atribuir-se-lhe uma ligeira inibição da união de Ca^{2+} às sarcovesículas (Figura III.9), presumivelmente derivada da existência de uma pequena fracção de iões V(V)-maltol. No entanto, se se atender ao erro associado, considera-se que não ficou demonstrada a existência de um efeito significativo na união de ^{45}Ca a VRS. Estas considerações são apoiadas pelo que já se descreveu atrás relativamente ao efeito na translocação de Ca^{2+} , concordando com a circunstância de a presença de BMOV-V(IV), nas concentrações utilizadas, não reduz significativamente a acumulação de Ca^{2+} e a eficiência energética, apesar ser passível de inibir em grande extensão a hidrólise de ATP pela bomba (Aureliano *et al.*, 2008).

O composto BMOV-V(IV) poderá estar a actuar de uma forma na qual se comporta como um análogo quase funcional do nucleótido ATP, ao permitir que o ciclo desta proceda, mesmo apesar de não se dar a hidrólise da fosfoenzima. Existindo união e translocação de Ca^{2+} , é possível inferir que a função de transdução energética (essencial ao transporte do catião para o lúmen das sarcovesículas) não parece ter sido afectada pela presença do complexo, nas condições estudadas. Estas observações são consistentes com uma ocupação do local catalítico da enzima, aparentemente por iões maltolato de oxovanadato (uma vez que os oxovanadatos serão os maiores responsáveis pela inibição de fosfotransferases, e, em especial, de Ca^{2+} -ATPase), embora não se exclua a hipótese de haver complexação com o próprio complexo integral; os resultados obtidos com o análogo de amavadina demonstraram que é possível a interacção directa com um complexo não-dissociado. Por outro lado, apesar de não ser passível de reverter uma situação de desequilíbrio da homeostasia de cálcio no citoplasma de células musculares, a presença de BMOV-V(IV) não o agrava.

Por seu turno, o complexo de vanadilo PDC-V(IV) aparenta fomentar a ligação de ^{45}Ca a VRS, de um modo dependente da concentração de composto (aumentando esta estimulação com o aumento da concentração) e, significativamente, para concentrações de 100 μM (Figura III.9). Esta observação está de acordo com o verificado anteriormente, onde se delineou a existência de uma estimulação do transporte de ^{45}Ca , tanto na presença como na ausência de oxalato e em especial no último caso; ora, estando o equilíbrio conformacional maioritariamente deslocado no sentido de maior afinidade para Ca^{2+} (confórmero E1) quando a concentração de cálcio é elevada (ausência de oxalato), e no sentido do confórmero E2 quando um agente sequestrante do catião está presente, é lógico pressupor que a maior estimulação estará associada à condição que beneficia o estado E1 da ATPase. Tendo-se testado ambas as condições na presença de PDC-V(IV), facilmente se deduz que a incubação com uma solução deste complexo aparenta levar à estabilização da enzima na sua forma E1. Mais uma vez se evidencia que

o complexo PDC-V(V) pode significar o restauro da homeostasia intracelular de cálcio, e, por conseguinte, as via de acção de insulina; este composto parece possuir, mesmo, uma acção terapêutica eficaz nas desordens associadas a disfunções na sinalização celular pelo 2º mensageiro Ca^{2+} .

Aureliano *et al* (2008) realçaram o facto de a afinidade da Ca^{2+} -ATPase para os insulino-miméticos PDC-V(V) e BMOV-V(IV) ser similar à que já foi descrita em estudos prévios (Aureliano & Madeira, 1994 e 1998) na presença de espécies decaméricas de vanadato, que se sabe serem capazes de bloquear a bomba de cálcio. Contudo, tal aparenta ser válido quando se trata da actividade hidrolítica da enzima, pois tanto a união como a acumulação de ^{45}Ca são estimuladas (nomeadamente no caso de PDC-V(V)) e não bloqueadas (tanto no caso de PDC-V(V) como de BMOV-V(IV)), de um modo semelhante ao promovido por soluções nominais de metavanadato (Aureliano & Madeira, 1998). No entanto, conjugando essas investigações e registos anteriores com os dados apresentados na presente dissertação, pode-se dizer que se está perante fortes evidências de que a SERCA de músculo esquelético exhibe uma elevada afinidade para espécies presentes em soluções dos complexos anti-diabéticos em estudo. Estas afinidades têm demonstrado ser, inclusive, mais elevadas do que aquelas que se encontraram para soluções de compostos coordenados de oxovanádio-citrato (Sousa, 2004; Aureliano *et al.*, 2005).

A análise da Figura III.10 faculta a informação de que as soluções nominais de metavanadato testadas (50, 100 e 300 μM) promoveram, de um modo geral, um ligeiro estímulo na ligação de Ca^{2+} a VRS, para concentrações superiores a 100 μM de vanádio total. A concentração de 50 μM apontou para uma inibição pouco significativa da união e, se se atender ao erro associado, pode-se depreender que, na realidade, não a afectou. Nesta última solução, existirão maioritariamente espécies monoméricas de oxovanadato, ao passo que para concentrações mais elevadas começam a formar-se outras espécies, como a dimérica e em especial a tetramérica. Ora, de acordo com Aureliano & Madeira (1994 & 1998), e com o que já foi descrito atrás (Figura III.3) a espécie tetramérica de vanadato tende a estar associada a uma estimulação do transporte de cálcio para o lúmen de sarcovesículas; pode-se concluir, portanto, que será a espécie tetramérica a maior responsável por esse estímulo, uma vez que a sua presença contribui igualmente para o aumento da união de Ca^{2+} a VRS e da eficiência energética. Esta espécie aparenta interagir directamente, assim, com os locais de ligação de Ca^{2+} ou, pelo menos, com alguma secção que induza uma alteração tal nestes locais que o resultado será o acréscimo da afinidade da Ca^{2+} -ATPase para com o “seu” catião.

As soluções de “decavanadato”, por seu turno, apontaram para um acréscimo da afinidade de VRS para o catião de cálcio, quando a concentração de vanádio total rondava 25 μM . Para concentrações de vanádio superiores (100 μM), contudo, não se observou qualquer interferência na ligação de ^{45}Ca às amostras de RS. Para uma quantidade mais intermédia de vanádio total, não se logrou obter um resultado coerente, dado o elevado erro associado; por comparação com soluções de metavanadato de igual concentração (50 μM), todavia, e presumindo que a sua composição será praticamente idêntica neste patamar, será mais lógico supôr uma interacção nula com os sítios de ligação de Ca^{2+} . Tinha-se observado que a presença de espécies tetraméricas em soluções de “metavanadato” levava ao aumento da afinidade entre cálcio e a bomba; dado o resultado semelhante obtido com a solução de “decavanadato”, é de pressupôr que a rápida dissolução das espécies decaméricas, imediatamente

antes do ensaio, terá levado à sua desoligomerização e conseqüente formação de espécies V4, V2 e V1. A interação entre estas espécies resultaria no incremento observado.

Não é demais acrescentar, contudo, o facto de Aureliano & Madeira (1994 & 1998) terem referido que a interação da espécie monomérica de oxovanadato aparentar estar dependente da presença de Ca^{2+} e de ATP. Tendo em conta que os ensaios analisados nesta secção foram efectuados na ausência de ATP, pode-se atribuir os resultados descritos a essa mesma ausência, que afectaria a contribuição da espécie monomérica e levaria a um efeito derivado maioritariamente de outras espécies de oxovanádio. De um modo geral, e completando o que já tinha sido referido por Aureliano *et al.* (2008 e 2009), os efeitos promovidos na funcionalidade da bomba de cálcio de RS, pelos três complexos de oxovanádio em análise, PDC-V(V), BMOV-V(IV) e HAIDA-V(IV), não só demonstram ser dissemelhantes entre si, como também divergem significativamente daqueles que são observados na presença de diversas soluções de oxovanadatos. Tal observação é consistente com o pressuposto de ser o próprio complexo insulino-mimético a actuar na enzima, em conjunto com as espécies de oxovanadato que se possam formar (dependendo das condições do meio); no caso do composto análogo de amavadina, estas diferenças são ainda mais marcadas, e comparáveis às exercidas por espécies decaméricas em concentrações mais elevadas do que as que se utilizaram no presente trabalho (Aureliano, 1995; Sousa, 2004). Por outro lado, com base nos valores obtidos para o efeito de complexos e compostos de oxovanádio na afinidade de Ca^{2+} -ATPase para cálcio, estabeleceu-se a ordem relativa de inibição da união de ^{45}Ca : HAIDA-V(IV) \gg BMOV-V(IV) $>$ solução “decavanadato” $>$ solução “metavanadato” $>$ PDC-V(V). Como se pode verificar, é uma relação dispare da encontrada para a actividade hidrolítica da enzima e, em alguns pontos, da própria translocação de cálcio; em alguns dos casos, portanto, o efeito das várias espécies de oxovanádio sobre a união de Ca^{2+} a VRS não afecta do mesmo modo as várias funções da enzima.

A existência de interações directas com as VRS, aqui presenciada, é corroborada por estudos espectroscópicos de ^{51}V -NMR, nos quais se detectou um alargamento e diminuição da intensidade do sinal na presença de sarcovesículas (Aureliano *et al.*, 2008); dado que tal alargamento é observado quando se produz uma interação com proteínas, é válido concluir que existe de facto uma complexação dos complexos com a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (Wittenkeller *et al.*, 1991; Aureliano & Crans, 2009) que afecta a hidrólise do grupo aspartil-fosforil da bomba de cálcio, mediante complexação com o local activo ou o sitio catalítico da enzima, e a acumulação de Ca^{2+} no lúmen de RS., mediante interação com os locais de ligação de cálcio e com o domínio transmembranar da proteína.

3. EFEITO DE VANÁDIO NAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DE Ca^{2+} -ATPASE DE VRS: ESTUDOS DE FLUORESCÊNCIA

Está bem patente, até aqui, a existência de alterações funcionais na bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático, ao nível do transporte de cálcio e da hidrólise de um grupo fosforil-aspartil, pepretadas pelos

complexos coordenados insulino-miméticos PDC-V(V) e BMOV-V(IV), pelo análogo de amavadina, bem como, por soluções de oxovanádio. Outro dado que se tornou visível, é o facto de todos os resultados obtidos até agora serem consistentes com a formação de um aducto entre a Ca^{2+} -ATPase e os diferentes complexos e espécies de vanadato, com especial evidência para a complexação com o domínio transmem-branar da proteína e, especificamente, com os sítios de união de Ca^{2+} à enzima. Tais modificações funcionais reflectem, geralmente, interações estruturais concomitantes (Inesi *et al.*, 1992).

Dado que os espectros de emissão (e excitação) de fluoróforos intrínsecos, extrínsecos e prostéticos variam de molécula para molécula, estando dependentes da estrutura química desses fluoróforos e do ambiente que os rodeia, é válido considerar que podem fornecer dados sobre a conformação de uma proteína, a interacção desta com um ligando e a acessibilidade do fluoróforo a *quenchers* (Lakowicz, 1999). E, com efeito, as técnicas de fluorescência têm demonstrado ser, não só, métodos de elevada sensibilidade e resolução temporal, como também, muito eficientes e produtivas, tendo levado à evidência de que o espectro de emissão de fluorescência intrínseca da bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático é alterado na presença alternada de ATP ou cálcio. Sabendo-se que os dois principais estados conformacionais da Ca^{2+} -ATPase, E1 e E2, são adquiridos consoante a proteína interage ou não com os seus ligandos, e tendo em conta que ambos os estados apresentam diferentes fluorescências, é possível diferenciá-los por espectroscopia de emissão (de Meis, 1981; Champeil *et al.*, 1986; Dupont *et al.*, 1988).

3.1. Análise do efeito de vanádio na alteração E1/E2 e na ligação de ATP à Ca^{2+} -ATPase

As alterações funcionais observadas anteriormente, derivarão em parte de modificações estruturais que podem ser um reflexo da complexação simultânea de várias espécies de vanádio, em diferentes locais do sistema transmembranar. Assim, a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático irá adoptar várias conformações, de um modo que é modulado não só pelos seus ligandos naturais, como também, pela natureza específica de cada uma das espécies de oxovanádio susceptíveis de interagir com a proteína.

Por outro lado, a condição diabética tende a promover modificações pós-traducionais na SERCA de músculo estriado, especialmente através da ocorrência de produtos terminais de glicosilação (AGEs), como resultado do stresse oxidativo gerado pela condição de hiperglicémia diabética. A evidência da formação de AGEs susceptíveis de alterar uma proteína como a bomba de cálcio, que tem um tempo de meia vida de cerca de 14 dias, foi descortinada por Candido *et al.* (2003) e Ye *et al.* (2003); se os primeiros demonstraram que o tratamento com antagonistas de AGEs conduz à protecção contra alterações estruturais (nomeadamente as que levam a *cross-links* nos domínios proteicos) induzidas por diabetes, os segundos detectaram a reversão do desequilíbrio homeostático de cálcio induzido pela desordem metabólica. Deste modo, compreende-se que tais modificações possam comprometer os rearranjos conformacionais essenciais ao transporte vectorial dos cationes divalentes de cálcio e,

consequentemente, conduzir a uma situação de desaceleração na remoção do Ca^{2+} intracelular e no relaxamento muscular (Bidasee *et al.*, 2004).

Se os compostos anti-diabéticos forem susceptíveis de interferir na alteração conformacional necessária à translocação de cálcio, e em especial na conversão E1/E2, seria lógico supôr que poderiam contrariar, eventualmente, os efeitos induzidos pelas modificações estruturais de SERCA diabética; a homeostasia intracelular de cálcio seria, assim, restaurada. E, com efeito, de acordo com vários autores, a inibição por oxovanadato depende essencialmente do estado conformacional da Ca^{2+} -ATPase, para além da identidade e concentração das espécies de vanadato presentes no meio reaccional (Aureliano & Madeira, 1998); isto indica que deverá existir uma interferência a nível conformacional.

A modulação da actividade hidrolítica da bomba de Ca^{2+} de RS verificada pelo vanadato poder-se-á dever, em parte, à sua utilização como análogo de ortofosfato, formando um complexo enzima-vanadato; também é plausível a existência de um bloqueio da enzima num determinado estado conformacional (se o vanadato funcionar como um análogo do substrato) (Crans *et al.*, 2004). Resta saber se tais interacções serão capazes de restaurar a translocação de Ca^{2+} o que, até agora, parece ser viável no caso da espécie tetramérica de oxovanadato e do complexo coordenado PDC-V(V), que estimulam este transporte.

Tem sido proposto que, na ausência de ATP e Ca^{2+} , os iões de vanadato se ligam à bomba de cálcio na vizinhança do resíduo aspartil que recebe o grupo fosforilo transferido por ATP; o local activo da ATPase ficaria, assim, bloqueado e a formação do intermediário fosfoenzimático seria impedida, bloqueando a proteína no confórmero E2 (Aureliano, 1995). Na presença de ATP, contudo, existirá a conversão à forma E1 fosforilada (E1-P), que diminui a afinidade dos oxovanadatos para com a ATPase (Aureliano & Madeira, 1994). Este não é o único modelo de acção que a literatura refere, tendo-se registado uma ligação similar à de um análogo de ATP, no local nucleotídico da bomba (Crans *et al.*, 2002); no presente trabalho, por seu turno, detectou-se uma interacção tanto de oxovanadatos como de complexos de oxovanádio com a zona transmembranar da bomba.

Portanto, modulando a presença de ATP ou Ca^{2+} , bem como de agentes sequestrantes, foi possível levar a cabo medições de estado estacionário baseadas na análise da fluorescência intrínseca e da fluorescência de sondas incorporadas (extrínseca), em amostras de VRS submetidas ao efeito de soluções de oxo-vanadato e dos três complexos coordenados de oxovanádio em estudo. Com estas medidas, pretendeu-se inferir sobre o modo como PDC-V(V), BMOV-V(IV), HAIDA-V(IV), soluções de “metavanadato” e soluções de “decavanadato” poderão afectar a alteração conformacional E1/E2, imprescindível para a transdução energética e consequente translocação de cálcio para o lúmen de RS, e a união de ATP ao domínio catalítico da enzima.

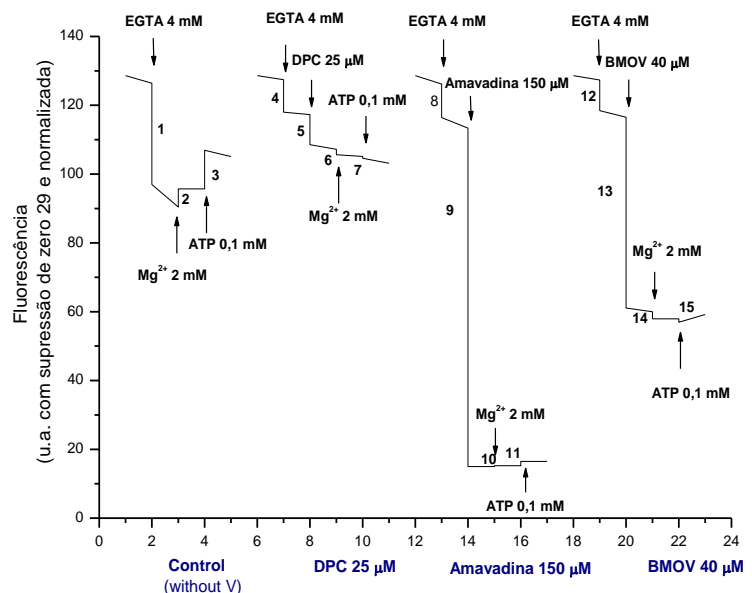
3.1.1. Por Fluorescência Intrínseca

Os 13 resíduos de triptofano (Trp) da bomba de cálcio constituem uma população de grupos repórter bastante sensível a alterações conformacionais, tendo permitido a visualização de transições entre os vários intermediários do ciclo catalítico, como as que precedem a ligação de ATP ao domínio nucleotídico, bem como, a

transição E1/E2 relacionada com a transdução energética (Garcia-Martín *et al.*, 1990). Esses fluoróforos, que se distribuem maioritariamente pela porção membranar da proteína, são de diferentes classes e podem ser considerados consoante a sua localização; têm-se, assim, os Trp próximos da interface proteína-lípido e os que estão profundamente embebidos no domínio transmembranar. De notar que está igualmente identificada uma terceira classe de Trps, localizados no domínio citoplasmático: é o caso do resíduo Trp 552 e, presumivelmente, do resíduo Trp 50 (de Foresta *et al.*, 1990).

Na ausência de cálcio, promovida pela adição de 2 mM do agente sequestrador EGTA, a enzima adquire o estado conformacional E2 (insensível a Ca^{2+}), o que se traduz por uma diminuição na intensidade da fluorescência emitida. Tal pode explicar-se mediante o facto de, nesta conformação, a população de Trp fluorófora estar menos acessível; com efeito, na forma E2 é adquirida uma reorientação transmembranar de hélices- α , específica para a libertação de iões Ca^{2+} no lado lumenal de retículo sarcoplasmático (Toyoshima, 2008), de um modo que “empacota” e embebe profundamente os resíduos de Trp fluorescentes, no interior da zona transmembranar membranar (Dupont *et al.*, 1988). Por outro lado, o substrato fisiológico MgATP, que é capaz de se unir a este confórmero, induz um aumento mensurável na fluorescência intrínseca, como previsto, uma vez que na presença de ATP a maioria das moléculas de bomba de cálcio retorna à sua forma E1, na qual o sitio catalítico está preparado para acomodar a molécula de nucleótido e, ainda, os catiões de cálcio; na conformação E1, a zona transmembranar, onde se encontra a população de Trp fluorófora, estará orientada de forma a existir acesso e alta afinidade para com os iões Ca^{2+} citoplasmáticos (Toyoshima, 2008). Na conformação E1 também está acessível o triptofano localizado na zona catalítica. De notar que este aumento é inferior ao que é geralmente induzido por uma adição de Ca^{2+} (Dupont *et al.*, 1982). Recorrendo a esta metodologia, foi possível inferir se as sarcovesículas tratadas com compostos e complexos de oxovanádio são susceptíveis de perder ou, pelo contrário, de incrementar, a capacidade de ligação de ATP ao sítio activo da Ca^{2+} -ATPase. Na Figura III.11 estão indicados os “saltos” de fluorescência intrínseca assim detectados, mediante tratamento com compostos coordenados de vanádio; a tabela III.6 mostra os valores quantificados desses saltos (percentagem).

Figura III.11 – Efeito de complexos coordenados de oxovanádio na ligação de ATP a VRS, posto em evidência por alterações nos “saltos” de fluorescência intrínseca ($\Delta F/F_0$) de Ca^{2+} -ATPase. A intensidade de fluorescência é dada em valores normalizados de u.a. e com supressão de zero igual a 29. “Control” refere-se a sarcovesículas na ausência de complexos coordenados, “DPC” à presença de PDC-V(V) 25 μ M, “Amavadina” à presença de HAIDA-V(IV) 150 μ M e “BMOV”, refere-se ao tratamento com BMOV-V(IV) 40 μ M. Em todos os casos, as sarcovesículas foram tratadas com EGTA 4 mM, Mg^{2+} 2 mM e ATP 0,1 mM e a fluorescência de Trp determinada a $\lambda_{exc} = 290$ nm e $\lambda_{emis} = 330$ nm.



É possível visualizarem-se os “saltos” na fluorescência intrínseca de SERCA típicos (comparados com Vinagre, 2007), obtidos com comprimentos de onda de excitação e de emissão de 290 e 330 nm, respectivamente, que podem ser interpretados como a seguir se descreve. Inicialmente na conformação E1, acessível ao cálcio, a proteína exibe valores de fluorescência relativamente elevados; a adição de EGTA, e conseqüente remoção do Ca^{2+} presente no meio, contudo, induz a diminuição desses valores, em virtude de os locais de ligação de Ca^{2+} , zona na qual se sabe estarem localizados muitos dos Trp fluoróforos (de Foresta, *al.*, 1990), passarem a estar inacessíveis (e a proteína adquire a sua forma E2). A adição de Mg^{2+} , por seu turno, leva a um ligeiro aumento da fluorescência de SERCA, o que está de acordo com o que é descrito por Champeil *et al.* (1986); esta alteração tem sido associada ao facto de os iões divalentes de Mg^{2+} competirem com Ca^{2+} pela união aos locais de ligação de cálcio (Dupont *et al.*, 1982). Por fim, a adição de ATP, e subsequente ligação de MgATP a E2, irá induzir novo aumento da fluorescência intrínseca da enzima. De notar que o valor do “salto” 1, na Figura III.12, não se coaduna com os de 4, 8 e 12, que traduzem situações iguais; tal desvio poderá ter tido origem em lapsos na medida da fluorescência relativa ao “salto” 1. Já 4, 8 e 12 são concordantes entre si.

É bem visível o facto de, para todos os complexos de oxovanádio testados, se dar uma redução do câmbio do sinal de fluorescência associado à adição de ATP a VRS. Neste sentido, será lógico pressupôr que o nucleótido, complexado com Mg^{2+} , não estará a conseguir unir-se à bomba tratada com PDC-V(V), BMOV-V(IV) e HAIDA-V(IV); de alguma forma, a interacção destes compostos com VRS está a afectar o domínio nucleotídico da Ca^{2+} -ATPase e é consistente com as descrições de inibição catalítica registadas

Tabela III.6 – Efeito de complexos coordenados de oxovanádio na ligação de ATP a VRS: valores quantificados (%) dos “saltos” de fluorescência intrínseca ($\Delta F/F_0$) de Ca^{2+} -ATPase. “Controlo” refere-se a sarcovesículas na ausência de complexos coordenados, “PDC” à presença de PDC-V(V) 25 μM , “HAIDA” à presença de HAIDA-V(IV) 150 μM e “BMOV”, refere-se ao tratamento com BMOV-V(IV) 40 μM . Em todos os casos, as sarcovesículas foram tratadas com EGTA 4 mM, Mg^{2+} 2 mM e ATP 0,1 mM e a fluorescência de Trp determinada a $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emis}} = 330 \text{ nm}$. Os valores positivos e negativos correspondem, respectivamente, a um aumento e a uma diminuição da fluorescência intrínseca de Ca^{2+} -ATPase.

Situação	$\Delta F/F_0$ (%)
1) Controlo: VRS + EGTA	- 23,3
2) Controlo: VRS + EGTA + Mg^{2+}	+ 6,74
3) Controlo: VRS + EGTA + Mg^{2+} + ATP	+ 11,7
4) VRS + EGTA	- 7,4
5) VRS + EGTA + PDC	- 7,5
6) VRS + EGTA + PDC + Mg^{2+}	- 1,5
7) VRS + EGTA + PDC + Mg^{2+} + ATP	- 0,5
8) VRS + EGTA	-7,7
9) VRS + EGTA + HAIDA	- 86,8
10) VRS + EGTA + HAIDA + Mg^{2+}	+ 1,6
11) VRS + EGTA + HAIDA + Mg^{2+} + ATP	+ 8,4
12) VRS + EGTA	- 7
13) VRS + EGTA + BMOV	- 47,6
14) VRS + EGTA + BMOV + Mg^{2+}	- 3,49
15) VRS + EGTA + BMOV + Mg^{2+} + ATP	+ 1,6

por Aureliano *et al.* (2008). E, mais ainda, dado que as concentrações de composto que se utilizaram nestes estudos de fluorescência correspondem aos IC50 referidos para a inibição da função ATPásica da enzima (Aureliano *et al.*, 2008); deste modo, é plausível admitir que a inibição que estes três compostos orgânicos de oxovanádio promovem, na hidrólise fosfoenzimática, se pode dever, pelo menos em parte, a uma competição do composto (ou das espécies em causa) pela ligação ao domínio N, o que, como já se referiu anteriormente, ocorre com espécies decaméricas (Csermely *et al.*, 1982). Apesar de estar a ser posta em evidência, nesta secção, a perda de capacidade de união de ATP à bomba de cálcio de RS, promovida pelos dois complexos insulino-miméticos, PDC e BMOV, e pelo análogo de amavadina, convém referir que os dados obtidos com medidas de fluorescência não permitem elações propriamente directas acerca da união precisa de ATP. Seriam necessárias medidas directas, e não em certa medida indirectas (como por exemplo, utilizando-se ATP marcado radioactivamente) para se poder inferir mais aproximadamente sobre a natureza estrutural deste impedimento.

Mais especificamente, não se pode concluir nada sobre a interacção com os resíduos de Lys515 (localizado mesmo no fundo do *pocket* de ligação de ATP) e de Lys492 (no *loop* curto que conecta folhas pregueadas beta do domínio N), que se sabe possuírem papéis cruciais na união do nucleótido à enzima (Clausen *et al.*, 2003). A elaboração de estudos coordenados de competição dos complexos orgânicos com FITC (que se une a Lys515), PLP (que se une a Lys 492) e MgATP, pelo sítio de ligação de ATP da porção catalítica da bomba de Ca^{2+} , permitiria determinar, contudo, se a perda da função hidrolítica da Ca^{2+} -ATPase se deve a uma interacção com estas Lys, impeditiva da ligação do nucleótido que os dados de fluorescência de Trp sugerem.

A adição de PDC-V(V) a VRS promoveu uma extinção no sinal de fluorescência (Figura III.11), indicando a tendência para uma passagem ao conformero E1 da ATPase (conformero que mais fluorescência intrínseca emite) e uma aparente afinidade do complexo coordenado testado para esta conformação. Tal está de acordo com as análises cinéticas efectuadas anteriormente por radiometria de ^{45}Ca .

Os resultados obtidos com os compostos BMOV e HAIDA, contudo, estão afectados pelo efeito de filtro interno, uma situação que ocorre quando um ligando absorve no comprimento de onda de excitação da molécula analisada. Neste caso, tanto as soluções de BMOV como de HAIDA aparentam estar a absorver, em larga escala, a 290 nm, o comprimento de onda de excitação utilizado (290 nm); sabe-se que soluções nominais de metavanadato e decavanadato absorvem a 280 nm, e evidenciam um efeito de filtro interno intenso, especialmente na presença de espécies decaméricas (Tiago, 2005). De notar que o efeito de filtro interno observado pelo composto HAIDA, que sabe ser estável, é mais intenso do que o experimentado por BMOV e que enquanto que em HAIDA esse efeito é comparável ao encontrado, nas mesmas condições, na presença de soluções “decavanadato”, em BMOV é comparável ao registado pela adição de soluções “metavanadato”. Tal parece sugerir um paralelo entre HAIDA e a espécie decamérica, que se estruturam num *cluster*, e BMOV e as espécies de grau de oligomerização inferior (V1, V2 e V4, nomeadamente), logo, de estruturas mais simplificadas; o ião vanadato-maltol resultante da oxidação e hidrólise do composto BMOV pode ser a espécie interactuante. Se se tiver em conta que a dissolução de BMOV é demorada e tem geralmente recurso a ligeiro aquecimento, pode-se inferir que, nestas condições, o composto BMOV pode ter-se oxidado e hidrolizado numa extensão maior do que a prevista.

Na Figura III.12 estão ilustrados os “saltos” de fluorescência intrínseca assim detectados, mediante tratamento com soluções de oxovanadatos; a tabela III.7 mostra os valores quantificados desses “saltos”.

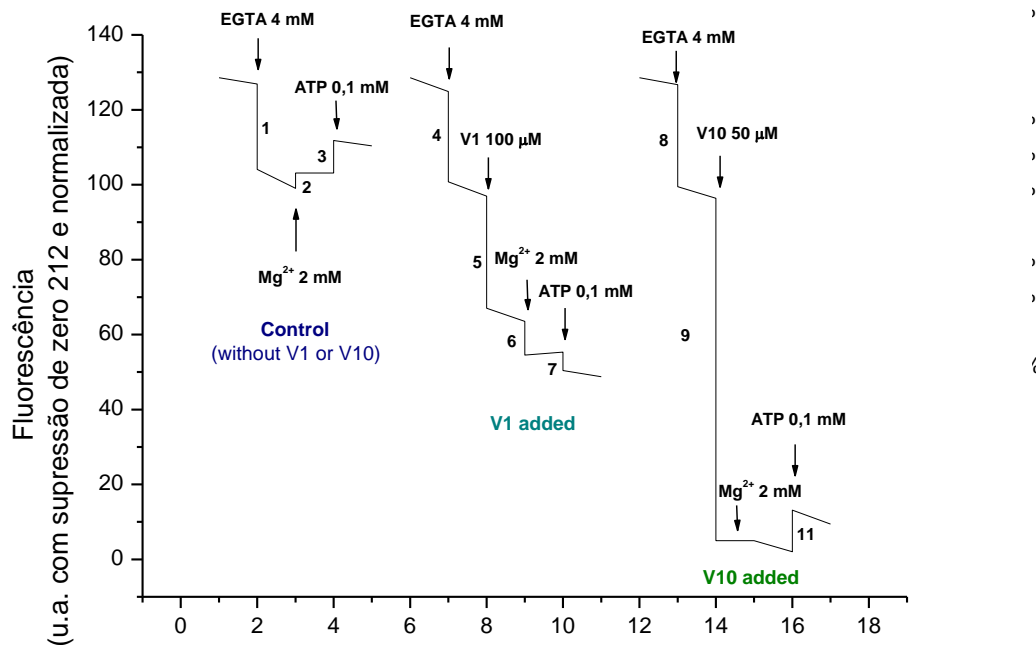


Figura III.12 – Efeito de soluções de oxovanadato na ligação de ATP a VRS, posto em evidência por alterações nos “saltos” de fluorescência intrínseca ($\Delta F/F_0$) de Ca^{2+} -ATPase. A intensidade de fluorescência é dada em valores normalizados de u.a, e com supressão de zero igual a 212. “Control” refere-se a sarcovesículas na ausência de oxovanadatos, “V1” à adição de uma solução nominal de metavanadato 100 μM e “V10” à adição de uma solução nominal de decavanadato 50 μM . Em todos os casos, as sarcovesículas foram tratadas com EGTA 4 mM, Mg^{2+} 2 mM e ATP 0,1 mM e a fluorescência de Trp determinada a $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emis}} = 330 \text{ nm}$.

Como se pode observar, a adição de uma solução nominal de metavanadato 100 μM promoveu uma supressão acentuada na emissão de fluorescência intrínseca de SERCA; concomitantemente, verificou-se um decréscimo da intensidade de fluorescência após a adição de Mg^{2+} e de ATP, substratos que em situações de controlo levam a um aumento desta. Isto poderia explicar-se mediante a existência de efeito de filtro interno, que se sabe ser promovido por espécies monoméricas de vanadato (Tiago, 2005); este resultado, contudo, não foi reproduzido na presença de soluções nominais de decavanadato contendo espécies decaméricas indutoras de um efeito de filtro interno mais intenso (Tiago, 2005), que levaram ao desaparecimento do sinal de ligação de Mg^{2+} e ao aumento do de união de ATP.

Deste modo, pode-se pressupor que, se por um lado as soluções de “metavanadato” promovem um *quenching* na fluorescência de Ca^{2+} e bloqueiam a enzima na conformação E2, a adição de soluções de “decavanadato”, por seu turno, não impede a união de ATP ao domínio N. Pode-se conjecturar, igualmente, que as espécies monoméricas predominantemente presentes na solução “metavanadato” não perdem a capacidade de absorvência, indicando que, ou permaneceram livres em solução, ou se ligaram à enzima num local que as mantém acessíveis à radiação. Ora, sendo a solução de “metavanadato” adicionada quando a enzima está na conformação E2, não

Tabela III.7 – Efeito de soluções de oxovanadato na ligação de ATP a VRS: valores quantificados (%) dos “saltos” de fluorescência intrínseca ($\Delta F/F_0$) de Ca^{2+} -ATPase. “Controlo” refere-se a sarcovesículas na ausência de oxovanadatos, “V1” à adição de uma solução nominal de metavanadato 100 μM e “V10” à adição de uma solução nominal de decavanadato 50 μM . Em todos os casos, as sarcovesículas foram tratadas com EGTA 4 mM, Mg^{2+} 2 mM e ATP 0,1 mM e a fluorescência de Trp determinada a $\lambda_{exc} = 290$ nm e $\lambda_{emis} = 330$ nm. Os valores positivos e negativos correspondem, respectivamente, a um aumento e a uma diminuição da fluorescência intrínseca de Ca^{2+} -ATPase.

Situação	$\Delta F/F_0$ (%)
1) Controlo: VRS + EGTA	- 21,9
2) Controlo: VRS + EGTA + Mg^{2+}	+ 4,1
3) Controlo: VRS + EGTA + Mg^{2+} + ATP	+ 8,4
4) VRS + EGTA	- 19,3
5) VRS + EGTA + V1	- 30,8
6) VRS + EGTA + V1 + Mg^{2+}	- 14,1
7) VRS + EGTA + V1 + Mg^{2+} + ATP	- 8,9
8) VRS + EGTA	- 21,5
9) VRS + EGTA + V10	- 94,8
10) VRS + EGTA + V10 + Mg^{2+}	0
11) VRS + EGTA + V10 + Mg^{2+} + ATP	+ 5,5

parece viável que a espécie monomérica tenha acesso ao local de ligação nucleotídico que, nesta conformação, não apresenta o *pocket* hidrofóbico que acessibiliza o sitio de ligação de ATP. O local de fosforilação, todavia, e especificamente no, ou perto do, residuo aspártico que recebe ortofosfato, não só está acessível, como permitiria às espécies V1 continuar a absorver radiação. Tal está de acordo com o que tem sido descrito na literatura sobre a hipótese de este ser um dos mecanismos de actuação de espécies monoméricas, que se traduz no mimetismo da acção de ortofosfato (Aureliano & Madeira, 1994 e 1998).

No que respeita à espécie decamérica, o facto de uma sua solução produzir um aumento na intensidade da fluorescência, sugere ou uma passagem ao estado E1 ou uma diminuição de absorção de radiação por parte deste oxovanadato. Se não houver impedimento da ligação de ATP, é natural que se dê a tendência para adoptar a forma E1; por outro lado, se existir antes uma diminuição da absorção de radiação, a espécie V10 terá de estar posicionada de uma forma que a embeba ou na membrana ou no seio da cadeia polipeptídica; parece viável, sabendo, como já se descreveu em secções anteriores, que esta espécie inibe tanto a acumulação como a união de Ca^{2+} , a existência de uma interacção com o domínio transmembranar da bomba, ou até mesmo com os sitios de ligação do catião. Esta união poderia bloquear a bomba e não permitir o rearranjo conformacional que, ao reorientar os sitios de ligação de Ca^{2+} , torna inacessível a população de triptofanos.

O efeito de filtro interno poder ser corrigido, no entanto, para a excitação e a emissão, obtendo-se factores de correcção através de equações como as propostas por Lackowicz (1999) e Tiago (2005). Estas correcções, contudo, não foram objecto do presente trabalho, optando-se por uma interpretação aproximada e pela utilização de outras técnicas, esta última no que respeitou à análise do câmbio conformacional E1/E2; este efeito esteve demasiado presente nas análises do câmbio E1/E2 efectuadas por técnicas de fluorescência intrínseca, pelo que estas não são aqui consideradas.

3.1.2. Por Fluorescência Extrínseca

A fluoresceína isotiocianato (FITC) é um forte inibidor covalente da actividade hidrolítica de SERCA, que se constituiu como uma sonda fluorescente amplamente utilizada em ATPases, uma vez que emite uma fluorescência intensa e é específica para o sítio de ligação de ATP. Possuindo uma afinidade selectiva para o resíduo de lisina 515 da Ca^{2+} -ATPase de RS de músculo esquelético, este derivado de fluoresceína conduz à cessação completa da fosforilação, hidrólise e translocação de Ca^{2+} promovida por ATP, ao se ligar estequiometricamente à bomba de cálcio (1:1), sem que sejam significativamente afectadas as reacções parciais potenciadas por ortofosfato ou a ligação de Ca^{2+} aos chamados “locais de alta afinidade” citoplas-máticos. Isto acontece porque, a molécula de FITC compete com ATP pela ligação a Lys 515, derivatizando este resíduo, modificando e bloqueando o local de ligação de ATP, mas sem perturbar toda a estrutura e função da ATPase (Pick, 1981; Pick & Bassilian, 1981; Clore *et al.*, 1982; Bigelow & Inesi, 1992).

O ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase compreende diversos intermediários, que são geralmente classificados como sendo confórmeros E1 ou E2 e que incluem espécies com iões Ca^{2+} oclusos (Sokes & Green, 2003). As transições entre alguns desses intermediários têm sido estudadas com recurso a FITC como grupo repórter de fluorescência extrínseca, dado que a fluorescência emitida por FITC ligada a SERCA é bastante sensível ao meio específico e característico dos estados conformacionais principais. A SERCA-FITC é incapaz de utilizar MgATP como substrato, mas mantém a sua capacidade de bombear iões Ca^{2+} para o interior de sarcovesículas, utilizando, por exemplo, acil-fosfato (McIntosh *et al.*, 2008). A molécula de FITC exhibe uma fluorescência elevada quando está inserida no bolso hidrofóbico de ligação de ATP do confórmero E2 da Ca^{2+} -ATPase (Pick, 1981; Bigelow & Inesi, 1992); o confórmero E1 de SERCA-FITC, assim, será o que menor fluorescência emite. De notar que a Ca^{2+} -ATPase vesicular marcada covalentemente com FITC é extremamente sensível à presença de ligandos e possui a particularidade de experimentar alterações de fluorescência que se devem, especificamente, a alterações conformacionais desta enzima. Deste modo, a passagem à forma E2 de ATPase-FITC será caracterizada por um aumento significativo da fluorescência emitida por FITC (Pick & Bassilian, 1981; Higgsmith *et al.*, 1985).

Assim, ao se marcar selectivamente a Ca^{2+} -ATPase de RS com FITC, foi possível detectar as alterações conformacionais E1/E2 experimentadas pela enzima, através de excitação ao comprimento de onda de 495 nm e medição de fluorescência no máximo de emissão centrado a 525 nm (Henao *et al.*, 1991; Henao *et al.*, 2005). Os câmbios conformacionais detectados em SERCA-FITC, na presença de PDC 25 μM , BMOV 40 μM ou HAIDA 325 μM (concentrações de IC50 relativas à inibição da “hidrólise” de ATP e determinadas por Aureliano *et al.*, 2008), podem ser visualizados na Figura III.13; o valor dos “saltos” ($\Delta F/F_0$) encontra-se registado na tabela III.8 (em %).

Mediante análise da figura III.3, verifica-se que a presença do quelante EGTA se traduz num aumento significativo da fluorescência, indicador da passagem do estado E1 ao estado E2. Dado que este reagente sequestra os iões de cálcio disponíveis no meio, induz a ATPase a adoptar a forma de baixa afinidade para o catião, E2, pelo que um “salto” na fluorescência de FITC era o resultado esperado numa amostra de VRS. Ao se

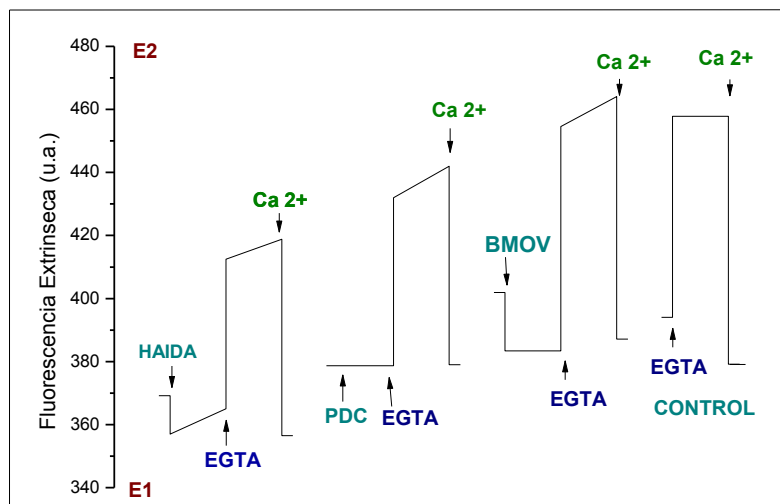


Figura III.13 – Efeito de complexos coordenados de oxovanádio no câmbio conformacional E1/E2 da bomba de cálcio, posto em evidência por alterações nos “saltos” de fluorescência extrínseca ($\Delta F/F_0$) de Ca^{2+} -ATPase marcada com FITC. A intensidade de fluorescência é dada em valores não-normalizados de u.a (unidades absolutas). “Control” refere-se a sarcovescículas na ausência de complexos coordenados, “DPC” à presença de PDC-V(V) 25 μ M, “HAIDA” à presença de HAIDA-V(IV) 325 μ M e “BMOV”, refere-se ao tratamento com BMOV-V(IV) 40 μ M. Em todos os casos, as sarcovescículas foram tratadas com EGTA 2 mM e Ca^{2+} 3 mM; a fluorescência de SERCA-FITC foi determinada para um λ_{exc} = 495 nm e um λ_{emis} = 525 nm.

adicionar iões Ca^{2+} , contudo, observa-se uma diminuição acentuada na fluorescência, um reflexo da passagem de SERCA ao seu estado de elevada afinidade para os catiões, E1.

Na presença de 25 μ M do complexo insulino-mimético PDC-V(V), não se verifica nenhuma alteração imediata na fluorescência extrínseca; dado que o valor absoluto desta fluorescência é relativamente baixo quando comparado numa situação com EGTA presente, pode-se deduzir que o equilíbrio conformacional estaria deslocado no sentido da forma E1 e que a presença do complexo coordenado de oxovanadato não a altera. Tal parece sugerir, novamente, uma preferência de PDC-V(V) para o estado E1 (cálcio-sensível) da Ca^{2+} -ATPase de RS, o que é corroborado por todos os resultados obtidos no presente trabalho, permitindo concluir que, nas condições aqui descritas, este complexo insulino-mimético “prefere” a bomba de cálcio na sua forma cálcio-sensível (E1), reforçando a hipótese de que é um sério adjuvante terapêutico em distúrbios metabólicos derivadas de perturbações na homeostasia celular de cálcio e, mais concretamente, em estados de cardiomiopatia e distúrbios do músculo esquelético associadas a *diabetes mellitus*. Ao se adicionar EGTA, contudo, verifica-se um aumento elevado da fluorescência de FITC, indicando a adopção da conformação E2 na presença de PDC-V(V). Este complexo, aparentemente, não bloqueia a enzima no conformero E1, apesar de o “preferir”. A adição de iões cálcio, do mesmo modo, promoveu novo câmbio conformacional, sem que a presença de PDV-V(V) o afectasse.

Assim, apesar de existir uma tendência para a deslocação do equilíbrio no sentido da forma E1 da ATPase de RS, a união do complexo de vanadato insulino-mimético, PDC, não impede as reorganizações concertadas E1/E2 e E2/E1. Todavia, viu-se anteriormente que era susceptível de competir com ATP pela ligação à enzima, o que sugere que a ligação de PDC-V(V) poderá fazer-se nas imediações do *pocket* catalítico, levantando impedimentos estéricos ou alostéricos à união de ATP (explicando-se assim a inibição hidrolítica observada por Aureliano *et al*, 2008).

No que respeita ao composto de vanadilo BMOV, verifica-se que induziu (Figura III.13 e tabela III.8) a diminuição da fluorescência, parecendo induzir o equilíbrio conformacional a adoptar o sentido de E1, como foi descrito por Aureliano & Madeira (1994 e 1998) para soluções nominais de metavanadato; tal como no caso do complexo PDC-V(V), a presença de BMOV não aparenta afectar as transições conformacionais E1/E2 e E2/E1 posteriores. Tal é compatível com a hipótese de PDC e BMOV serem capazes de se ligar tanto a E1 como a E2, embora induzindo o primeiro estado; poderá existir, ainda, uma ligação ou interacção num local alostérico que afecta não só a união de ATP, como também, a ligação de iões Ca^{2+} , o que é corroborado pelos efeitos vislumbrados anteriormente na eficiência energética de Ca^{2+} -ATPase de RS e o que levanta a hipótese de existir interferência na comunicação transmembranar entre o local de ligação de ATP e o local de ligação de Ca^{2+} , embora a enzima não pareça perder a sua capacidade de reorganização estrutural.

Tabela III.8 – Efeito de complexos coordenados de oxovanádio no câmbio conformacional E1/E2 da bomba de cálcio: valores quantificados (%) dos “saltos” de fluorescência ($\Delta F/F_0$) de Ca^{2+} -ATPase marcada com FITC. A intensidade de fluorescência é dada em valores não-normalizados de u.a (unidades absolutas). “Controlo” refere-se a sarcovesículas na ausência de complexos coordenados, “DPC” à presença de PDC-V(V) 25 μM , “HAIDA” à presença de HAIDA-V(IV) 325 μM e “BMOV”, refere-se ao tratamento com BMOV-V(IV) 40 μM . Em todos os casos, as sarcovesículas foram tratadas com EGTA 2 mM e Ca^{2+} 3 mM; a fluorescência de SERCA-FITC foi determinada para um $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ e um $\lambda_{\text{emis}} = 525 \text{ nm}$. Os valores positivos e negativos correspondem, respectivamente, a um aumento e a uma diminuição da fluorescência intrínseca de Ca^{2+} -ATPase.

Situação	$\Delta F/F_0$ (%)
Controlo: VRS + EGTA	+ 16,2
Controlo: VRS + EGTA + Ca^{2+}	- 17,4
VRS + HAIDA	- 3,1
VRS + HAIDA + EGTA	+ 13
VRS + HAIDA + EGTA + Ca^{2+}	- 14
VRS + PDC	0
VRS + PDC + EGTA	+ 14,1
VRS + PDC + EGTA + Ca^{2+}	- 14,3
VRS + BMOV	- 4,6
VRS + BMOV + EGTA	+ 18,6
VRS + BMOV + EGTA + Ca^{2+}	+ 16,6

O análogo de amavadina, HAIDA-V(IV), tb mostrou uma certa preferência pela forma E1 da ATPase, mas a sua interacção com a enzima não impede, tal como no caso dos restantes complexos analisados, a progressão dos câmbios estruturais E1/E2 e E2/E1; em secções prévias descreveu-se a inibição significativa tanto da união como da translocação de iões Ca^{2+} na presença deste composto, pelo que é mais plausível uma interacção com os locais de ligação do catião.

Dado que não se observaram interferências na fluorescência de FITC e, contudo, se detectaram, por fluorescência de triptofanos, estrangimentos à ligação de ATP, sugere-se que o efeito promovido pelos compostos de vanádio testados passe por um impedimento estérico ou uma interferência alostérica com a união de ATP à bomba de cálcio de RS; a perda de função hidrolítica seria assim explicada. O efeito dos três compostos

de vanádio poderia ser analisada mediante estudos de competição com a sonda extrínseca FITC e outras (PLP ou nucleótido de TNP, por exemplo), verificando-se deste modo a influência de vanádio no nível de marcação fluorescente e inferindo-se se se poderiam unir, efectivamente, ao local catalítico de SERCA e, mais especificamente, em que imediações.

Os câmbios conformacionais detectados em SERCA-FITC também foram estudados na presença de soluções nominais de metavanadato 100 e 200 μM e de decavanadato 50 e 100 μM . Na Figura III.14 ilustram-se as alterações experimentadas na fluorescência emitida nessas condições; o valor dos “saltos” ($\Delta F/F_0$) encontra-se registado na tabela III.9 (em %); o controlo considerado é o mesmo que se apresenta na Figura III.13 e na tabela III.8. Verifica-se que a adição de solução nominal de metavanadato promoveu um pequeno aumento na fluorescência de FITC, indicando uma ligeira preferência pelo estado E2, mas

não significando a adopção em larga escala dessa conformação; pelo contrário, os baixos valores de fluorescência obtidos apontam para uma permanência no estado E1, o que está de acordo com o que é descrito por Aureliano (1995). O aumento da concentração de vanádio total reflectiu a dependência que as acções deste metal têm na própria concentração: a fluorescência de FITC diminui, mostrando uma clara preferência de soluções de “metavanadato” 100 μM pelo confórmero E1. Ao se aumentar a concentração de vanádio total, numa solução nominal de metavanadato, promove-se a formação de espécies oligoméricas, que coexistem com a espécie monomérica; sugere-se, assim, que a espécie monomérica possa induzir um pequeno desvio para a forma E2 e que a presença de espécies com um grau de oligomerização crescente irá induzir a adopção do confórmero E1. De notar que esta sugestão vai de encontro ao que já foi descrito, mediante outras técnicas experimentais, por Aureliano & Madeira (1994 & 1998).

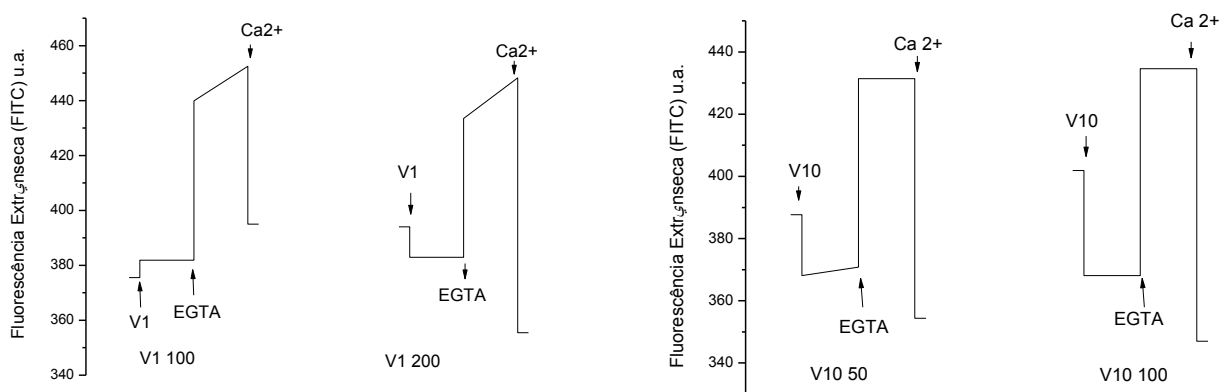


Figura III.14 – Efeito de soluções de oxovanadato no câmbio conformacional E1/E2 da bomba de cálcio, posto em evidência por alterações nos “saltos” de fluorescência intrínseca ($\Delta F/F_0$) de Ca^{2+} -ATPase marcada com FITC. A intensidade de fluorescência é dada em valores não-normalizados de u.a (unidades absolutas). “Control” refere-se a sarcovesículas na ausência de complexos coordenados, “V1 100” à presença de solução nominal de metavanadato 100 μM , “V1 200” à presença de solução nominal de metavanadato 200 μM ; “V10 50”, refere-se ao tratamento com solução nominal de decavanadato 50 μM e “V10 100” ao tratamento com solução nominal de decavanadato 100 μM . Em todos os casos, as sarcovesículas foram tratadas com EGTA 2 mM e Ca^{2+} 3 mM; a fluorescência de SERCA-FITC foi determinada para um $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ e um $\lambda_{\text{emis}} = 525 \text{ nm}$.

Tabela III.9 – Efeito de soluções de oxovanadato no câmbio conformacional E1/E2 da bomba de cálcio: valores quantificados (%) dos “saltos” de fluorescência ($\Delta F/F_0$) de Ca^{2+} -ATPase marcada com FITC. A intensidade de fluorescência é dada em valores não-normalizados de u.a (unidades absolutas). “Controlo” refere-se a sarcovesículas na ausência de complexos coordenados, “V1 100” à presença de solução nominal de metavanadato 100 μM , “V1 200” à presença de solução nominal de metavanadato 200 μM ; “V10 50”, refere-se ao tratamento com solução nominal de decavanadato 50 μM e “V10 100” ao tratamento com solução nominal de decavanadato 100 μM . Em todos os casos, as sarcovesículas foram tratadas com EGTA 2 mM e Ca^{2+} 3 mM; a fluorescência de SERCA-FITC foi determinada para um $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ e um $\lambda_{\text{emis}} = 525 \text{ nm}$. Os valores positivos e negativos correspondem, respectivamente, a um aumento e a uma diminuição da fluorescência intrínseca de Ca^{2+} -ATPase.

Situação	$\Delta F/F_0$ (%)
Controlo: VRS + EGTA	+ 16,2
Controlo: VRS + EGTA + Ca^{2+}	- 17,4
VRS + V1 100	- 2,8
VRS + V1 100 + EGTA	+ 13,2
VRS + V1 100 + EGTA + Ca^{2+}	- 20
VRS + V1 200	+ 1,7
VRS + V1 200 + EGTA	+ 15,2
VRS + V1 200 + EGTA + Ca^{2+}	-12,7
VRS + V10 50	- 5
VRS + V10 50 + EGTA	+ 16,3
VRS + V10 50 + EGTA + Ca^{2+}	- 17,8
VRS + V10 100	- 8,4
VRS + V10 100 + EGTA	+ 18,1
VRS + V10 100 + EGTA + Ca^{2+}	- 20,1

De notar que as soluções de “metavanadato” não impediram, de um modo geral, o prosseguimento dos câmbios, sendo os seus pequenos efeitos contrariados pela presença de EGTA, que, no caso da solução 100 μM levou a um aumento da fluorescência extrínseca ligeiramente inferior ao da situação controlo. Se se admitir que esta solução será maioritariamente constituída por espécies monoméricas, poder-se-ia inferir que esta espécie de oxovanadato produz um pequeno deslocamento no sentido do confórmero E2. Ao se duplicar a concentração de vanádio total, o que, presumivelmente, levaria ao aparecimento de espécies diméricas e tetraméricas, o aumento de fluorescência torna-se comparável ao da situação controlo, exibindo-se uma certa tendência para adoptar a forma E1. A presença de uma solução nominal de decavanadato 50 μM , contudo, produziu uma diminuição bem visível na fluorescência de FITC, indicando claramente a passagem ao estado E1 imediatamente após a introdução desta solução no meio de ensaio. Ao se duplicar a concentração total de vanádio, duplicou-se essa tendência. Sabendo-se que a espécie decamérica de oxovanadato tende a unir-se ao confórmero E1 da Ca^{2+} -ATPase, parece tornar-se claro que o comportamento observado na presença de soluções “decavanadato” se deve a uma preferência da espécie decamérica pela forma E1 da enzima, num modo que inibe significativamente a hidrólise de ATP (impedindo a ligação do nucleótido e/ou a formação do intermediário fosfoenzimático) e de acordo com o que já foi registado por Stokes *et al.* (1998), Aureliano (2007a) e Aureliano & Crans (2009).

Finalmente, é de salientar o facto de o comportamento da bomba de cálcio, exibido na presença de soluções de oxovanadato, ter demonstrado ser distinto do que foi registado mediante adição dos três complexos

coordenados de vanádio em estudo. Tal observação, a somar ao que já foi descrito no presente trabalho e ao que outros autores referem (como já se referenciou), é uma indicação de que o mecanismo

de acção dos compostos insulino-miméticos PDC e BMOV, e do análogo de amavadina HAIDA, não pode ser explicado somente com base na formação de oxovanadatos em solução e que, possivelmente, é o próprio complexo, a par dos oxovanadatos que se poderão produzir, que estará a interactuar com a Ca^{2+} -ATPase de RS e em locais distintos na estrutura proteica, que levam à modificação funcional da mesma.

3.2. Efeito de soluções de oxovanadatos na extinção da fluorescência em VRS: acessibilidade de KI ao FITC

Quando ligado ao resíduo de Lys 515 da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático, o fluoróforo ex-trínseco FITC vê a sua mobilidade bastante restringida, sendo, adicionalmente, insensível à viscosidade do meio; estas observações são consistentes com a sua ligação numa fenda ou bolso (*pocket*) como o que envolve o sítio de ligação de ATP, na bomba. Ao se estudar a acessibilidade do solvente a este local de ligação nucleotídica, pode-se inferir se um determinado ligando é susceptível de perturbar esta protecção experimentada por FITC e atestar, assim, se existirão rearranjos estruturais neste local (Highsmith *et al.*, 1985; Bigelow & Inesi, 1992). É interessante notar que, após a ligação de Ca^{2+} aos seus locais de “alta afinidade” na proteína, o derivado de fluoresceína torna-se mais acessível ao solvente, indicando uma abertura do bolso, característica da conformação E1 da enzima. Mediante a formação do intermediário fosfo-enzimático de SERCA, contudo, o grupo repórter FITC torna-se menos acessível ao grosso do solvente, reflectindo o fecho do *pocket* catalítico característico da forma E2 da enzima (Highsmith *et al.*, 1985). A exclusão do solvente é uma parte mecânica essencial às reacções de enzimas que catalizam a transferência de grupos fosforilo (Bigelow & Inesi, 1992).

A acessibilidade ao solvente, apresentada por uma sonda extrínseca como FITC, covalentemente ligada a uma proteína, pode ser determinada medindo-se a extinção dessa fluorescência (*quenching*) na presença de um agente extintor solúvel e colisional (*quencher*) como o iodeto de potássio (KI) (Henaó *et al.* 2005). Titulando-se uma amostra de VRS marcadas com FITC, seguiu-se o *quenching* promovido por KI na presença de soluções nominais de metavanadato 100 μM e de decavanadato 50 μM (IC_{50} relativos à hidrólise da actividade catalítica de SERCA). As constantes de Stern-Volmer, apresentadas na Tabela III.10 (juntamente com as equações de Stern-Volmer) foram obtidas a partir das equações clássicas de Stern-Volmer, por seu turno determinadas mediante as rectas mostradas na Figura III.15. Os resultados aqui apresentados são preliminares e reportam-se a um ensaio experimental.

Da análise da Figura III.14 ressalta que, nas condições descritas (1 mg/mL de VRS em Tricina-Tris 10 mM, pH 8, sacarose 0,3 M, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 0,01 mM, à temperatura ambiente e pH 7,4) e para as concentrações indicadas de oxovanádio total, a extensão da supressão da fluorescência de FITC por KI não é alterada mediante a presença de oxovanadatos, nomeadamente de espécies monoméricas, diméricas, tetraméricas e decaméricas (se avaliarmos a constituição das soluções com base em previsões teóricas). As equações destas rectas, que

apresentaram coeficientes de regressão linear aceitáveis, demonstraram ser do tipo de equação clássica de Stern-Volmer (Tabela III.10).

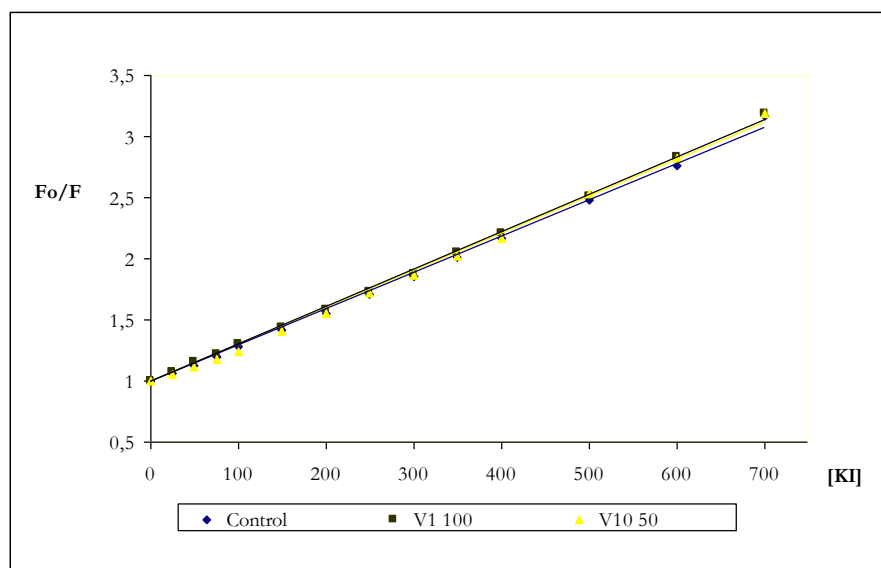


Figura III.14 – Efeito de soluções de oxovanadato na acessibilidade de KI ao FITC: gráfico de Stern-Volmer do quenching por KI da Fluorescência extrínseca de Ca^{2+} -ATPase marcada com FITC. A fluorescência de SERCA-FITC foi determinada para um $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ e um $\lambda_{\text{emis}} = 525 \text{ nm}$, num tampão contendo Tricina-Tris 10 mM, pH 8, sacarose 0,3 M, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 0,01 mM, à temperatura ambiente e pH 7,4. “Control” refere-se a sarcovesículas na ausência de soluções; “V1 100” indica a presença de solução nominal de metavanadato 100 μM e “V10 50”, a adição de solução nominal de decavanadato 50 μM .

Não é de admirar que se tenha estimado, tanto na ausência (controlo) como na presença de soluções de “metavanadato” e “decavanadato” (nas concentrações de IC_{50} para a hidrólise de ATP), um mesmo valor para a constante de Stern-Volmer (K_{SV}), 0,003. Tais resultados preliminares indicam, portanto, que a intensidade da fluorescência de FITC e a susceptibilidade desta sonda ao *quenching* por KI são insensíveis à presença de espécies de oxovanadato, oligoméricas ou não. Não se observando variações na acessibilidade de KI a FITC, e, portanto, do solvente a FITC, deduziu-se que, à partida, a ligação de oxovanadatos à Ca^{2+} -ATPase não produz alterações conformacionais ou estruturais extensivas no sítio de ligação de ATP. Este resultado sugere que a ligação de oxovanadatos. Assim, a perda de função hidrolítica seria assim explicada se a acção de oxovanadatos, neste caso e nestas condições, estiver a dar-se através de um impedimento estérico ou uma interferência alostérica com a união de ATP à bomba de cálcio de RS. Isto poderá sugerir, ainda, que ou a ligação de oxovanádio no sítio de união nucleotídica não promove qualquer alteração conformacional, ou não existe uma união neste local, mas sim num próximo, como o de fosforilação.

Tabela III.10 – Efeito de soluções de oxovanadato na acessibilidade de KI ao FITC: equação e constante de Stern-Volmer determinadas para Ca^{2+} -ATPase marcada com FITC. A fluorescência de SERCA-FITC foi determinada para um $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ e um $\lambda_{\text{emis}} = 525 \text{ nm}$, num tampão contendo Tricina-Tris 10 mM, pH 8, sacarose 0,3 M, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 0,01 mM, à temperatura ambiente e pH 7,4. “Controlo” refere-se a sarcovesículas na ausência de soluções; K_{sv} corresponde à constante de Stern-Volmer.

Situação	Equação	K_{sv}
Controlo	$F_o/F = 1 + 0,003 [\text{KI}]$	0,03
Solução “metavanadato” 100 μM	$F_o/F = 1 + 0,003 [\text{KI}]$	0,03
Solução “decavanadato” 50 μM	$F_o/F = 1 + 0,003 [\text{KI}]$	0,03

Seria necessário um estudo mais exaustivo e completo para se poder confirmar tais hipóteses, utilizando-se diferentes concentrações de oxovanadato e estabelecendo-se um paralelo com análises de competição entre vanádio e sondas específicas do local nucleotídico (FITC) e do de fosforilação (PLP), por exemplo. As observações preliminares aqui efectuadas, no entanto, não deixam de ser promissoras quanto a uma possível elucidação do local exacto de complexação das várias espécies e compostos de vanádio (estes últimos não foram objecto deste ensaio em particular) com a bomba de cálcio de RS.

4. EFEITO DE COMPLEXOS DE VANÁDIO NA FLUIDEZ DA MEMBRANA DE VRS: DETERMINAÇÃO DA ANISOTROPIA OU POLARIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA

A possibilidade de que os efeitos promovidos por compostos de vanádio possa dever-se aos restantes componentes de preparações de VRS de músculo esquelético, e não apenas à Ca^{2+} -ATPase, tem sido considerada, sabendo-se, por exemplo, que o elemento metálico vanádio é susceptível de inibir a actividade de fosforilase de glicogénio (Parsadianian *et al.*, 1989). Essa inibição poderá afectar a actividade da própria bomba de cálcio, se se levar em conta o papel fundamental do complexo glucogenolítico, associado ao RS (Cuenda *et al.*, 1995) Por outro lado, é interessante notar que existem aproximações terapêuticas de *diabetes mellitus* baseadas, precisamente, na inibição de glicogénio fosforilase (McCormarck *et al.*, 2001), permitindo antever um mecanismo de acção de insulina que passa, de facto, pelo retículo sarcoplasmático.

Determinações efectuadas recentemente por Aureliano *et al.* (2008), contudo, indicaram uma interacção pouco extensiva com fosforilase de glicogénio. Por outro lado, as VRS utilizadas no presente estudo foram preparadas mediante o protocolo de Cuenda *et al.* (1994), tendo-se removido o GL-RS associado. Adicionalmente, mesmo que os compostos de vanádio estejam a interactuar com outras proteínas que não a SERCA, a resposta observada irá sempre depender da existência de quantidades relativamente elevadas de uma proteína com elevada afinidade para vanádio, como é o caso da Ca^{2+} -ATPase embebida em VRS. A hipótese de uma acção devida a outras proteínas foi excluída, assim.

Dado que a união de Ca^{2+} a VRS é inibida especificamente no que diz respeito à presença do análogo de amavadina HAIDA-V(IV) e estimulada, embora numa extensão bastante inferior, por PDC-V(IV), tornou-se necessário avaliar, por outro lado, se tais efeitos se deveriam a uma interacção com os aminoácidos do sistema ou, pelo contrário, com a bicamada lipídica na qual a enzima se encontra embebida. De facto, em estudos anteriores já se evidenciou um efeito directo de vanádio em lípidos de membranas celulares, tendo-se descrito a adsorção de vanádio nas cabeças polares de fosfolípidos, em vesículas de fosfatidilcolina (Cortizo, 2001), um dos fosfolípidos mais abundantes da membrana de retículo sarcoplasmático (Mintz & Guillain, 1996). Há que salientar que não existem muitas referências concretas à existência de uma interacção via lípidos membranares; na maioria dos

estudos envolvendo a Ca^{2+} -ATPase, costuma-se considerar que esta existe em quantidade suficiente para que um possível efeito na bicamada lipídica possa considerar-se negligenciável.

No entanto, sabe-se que o ambiente lipídico que envolve proteínas membranares integrais é essencial ao seu funcionamento correcto, e que, qualquer alteração que interfira com as interacções lípido/lípido ou proteína/lípido, irá promover perturbações na actividade enzimática (Dannenberg *et al.*, 1989). Assim, pretendo-se inferir se a perturbação do correcto funcionamento da bomba de cálcio de RS se poderá dever a alterações na fluidez da membrana em que está integrada, recorreu-se a uma técnica de espectroscopia de anisotropia (polarização) de fluorescência, mediante incorporação da sonda TMA-DPH, como já se descreveu na secção 4.3 do Procedimento Experimental (Capítulo II). Os dados de fluorescência, obtidos na ausência (controlo) e presença de PDC-V(V) 0,1, 0,5 e 1 mM, BMOV-V(IV) 0,2, 0,5 e 1 mM, bem como HAIDA-V(IV) 1 e 2 mM foram tratados de forma a se calcularem os valores de anisotropia e polarização registados na tabela III.11.

Tabela III.11 – Efeito de complexos de oxovanádio na fluidez da membrana de VRS: valores de polarização (P) e anisotropia (γ) determinados para Ca^{2+} -ATPase incubada com a sonda TMA-DPH, relativos ao meio MOPS-Tris 200 mM pH = 7,4, EGTA 2 mM e MgCl_2 5 mM; utilizou-se um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um de emissão de 442 nm. “Controlo” refere-se a 0,2 mg/mL de sarcovesículas na ausência de complexos.

	P	γ
Controlo	0,347 ± 0,017	0,262 ± 0,015
PDC 0,2 mM	0,364 ± 0,026	0,298 ± 0,044
PDC 0,5 mM	0,367 ± 0,03	0,279 ± 0,02
PDC 1 mM	0,376 ± 0,04	0,287 ± 0,03
BMOV 0,2 mM	0,316 ± 0,041	0,236 ± 0,04
BMOV 0,5 mM	0,357 ± 0,014	0,179 ± 0,007
BMOV 1 mM	0,366 ± 0,0062	0,279 ± 0,012
HAIDA 1 mM	0,384 ± 0,04	0,272 ± 0,018
HAIDA 2 mM	0,367 ± 0,014	0,279 ± 0,012

Os valores de anisotropia determinados não variaram de um modo especialmente significativo, apenas se registando um ligeiro aumento do seu valor, em relação ao controlo, na presença de PDC-V(V) e uma ligeira diminuição que é revertida com o aumento de concentração de complexo, na presença de BMOV-V(IV) (não se tendo considerado o valor obtido com BMOV 0,4 mM). O composto HAIDA-V(IV) não levou modificações apreciáveis na anisotropia exibida por VRS.

De um modo geral, portanto, não aparenta existir uma alteração mensurável na fluidez lipídica da face membrana exposta ao meio de ensaio utilizado (fracção das VRS na qual a sonda utilizada se incorporou), nas condições testadas e nas concentrações de vanádio indicadas. Contudo, se se atender às pequenas diferenças encontradas, pode-se inferir que o composto PDC-V(V) aparenta induzir uma ligeira polarização da radiação emitida, reflectindo uma reorientação da sonda à superfície membrana correspondente à fracção citosólica de VRS; um aumento na anisotropia significa, geralmente, que os efeitos de difusão rotacional da molécula fluorófora

se viram diminuídos mediante o aumento da microviscosidade do meio (a membrana tornar-se-à menos fluída). Ora, em estudos anteriores foi observado que o complexo PDC-V(V) é capaz de penetrar numa superfície lipídica modelo (Crans *et al.*, 2006); sugere-se, assim, que este complexo possa interactuar com fosfolípidos, exercendo um pequeno efeito ao diminuir a fluidez da bicamada lipídica que, de alguma forma, introduziria algumas modificações na zona da ATPase exposta ao citoplasma (fracção catalítica).

Por outro lado, sabe-se que o composto BMOV-V(IV) é termodinamicamente estável, neutro (sem carga eléctrica) e possuidor de uma bio-compatibilidade relativamente ao balanço hidrofílico/lipofílico, o que o torna de fácil absorção pelas células (Aureliano *et al.*, 2008). A despolarização verificada na presença de concentrações reduzidas (0,2 mM) deste complexo de vanadilo aparenta reflectir uma maior liberdade de movimentos de reorientação da sonda fluorescente incorporada, o que está relacionado com um aumento da fluidez membranar; ao se aumentar a concentração de composto, contudo, a membrana parece recuperar a sua “fluidez controlo”.

O composto HAIDA-V(IV), por seu turno, não demonstrou alterar mensuravelmente a fluidez membranar da porção citoplasmática da biomembrana de VRS, apontando para uma interacção preferencial e específica com a Ca^{2+} -ATPase de RS. Tendo em conta que este composto é neutro e estável, sugere-se que as alterações de fluidez verificadas na presença de PDC-V(V) e BMOV-V(IV) se devam à formação de oxavanadatos, que se sabe serem adsorvidos por membranas de fosfatidilcolina (como já se referiu).

Seriam necessários mais estudos, contudo, para se poder completar esta análise, titulando-se a anisotropia na presença de soluções e complexos de vanádio e de uma sonda que se incorpore no interior da bicamada lipídica de VRS. Os tempos de incubação com os compostos de oxovanádio também poderiam ser variados. Considerando-se, todavia, que os compostos utilizados estavam em excesso, comparativamente à quantidade de lípidos presentes em preparações de VRS, considerou-se que os resultados obtidos em análises da interacção de compostos coordenados de oxovanádio se devem primariamente a efeitos na Ca^{2+} -ATPase (Aureliano *et al.*, 2008).

IV. CONCLUSÃO GERAL

O Vanádio é um dos elementos de transição mais importantes em termos biológicos, devido à sua complexidade bioquímica e aos fortes efeitos que os seus compostos exibem *in vitro* e *in vivo*. Apesar de estar presente em pequenas quantidades nos tecidos de, virtualmente, todos os mamíferos e de se lhe começar a delinear um papel como oligoelemento essencial em humanos, a função fisiológica específica e propriamente dita deste metal está longe de estar totalmente compreendida ou cabalmente comprovada. Este papel indefinido é uma consequência, principalmente, do comportamento químico extremamente complexo que o elemento exhibe em solução e da excepcional quantidade de sistemas enzimáticos que inibe e/ou activa, facto que o leva a promover uma grande diversidade de efeitos biológicos.

As inúmeras evidências dos vastos efeitos positivos que exerce numa larga gama de seres vivos transformaram o elemento tóxico de antes no agente terapêutico e multifacetado de hoje. O uso farmacológico de compostos de vanádio administrados oralmente, vai sempre requerer que se tenha em consideração factores dietéticos (incluindo a concentração de outros elementos vestigiais), antioxidantes e agentes quelantes presentes, e factores como a idade, o sexo e condição fisiológica, entre outros. Tendo em conta o que hoje se sabe sobre dos efeitos deste elemento na fisiologia animal, é de considerar que as respostas individuais a um tratamento com vanádio vão sempre ser influenciadas pela severidade da doença em causa, pelas proteínas celulares e plasmáticas que a ele se podem ligar, ao stresse, exercício e predisposição genética para a doença, que, no seu conjunto, contribuem para o estabelecimento da dose apropriada ao tratamento e da dose que terá efeitos tóxicos.

O presente estudo permitiu inferir que os compostos insulino-miméticos piridinadicarboxilato de vanádio(V) e bis-maltolato de oxovanádio(IV), bem como o análogo de amavadina bis (N-hidroxihamidoiminoacetato) de vanádio(IV), interferem comprovadamente com a actividade hidrolítica e de transporte da Ca^{2+} -ATPase de Retículo Sarcoplasmático, embora de um modo distinto. Para além disso, as concentrações de IC50 que inibem a hidrólise do intermediário fosfoenzimático da enzima, não têm um efeito significativo na translocação de iões Ca^{2+} , sugerindo o descolamento funcional e bioenergético da enzima, com uma diminuição da eficiência energética no caso de HAIDA e BMOV e um aumento da mesma no caso de PDC.

Surgiram ainda evidências de uma interacção diferencial com várias conformações da enzima. Enquanto que o análogo de amavadina e o insulino-mimético PDC promovem um deslocamento do equilíbrio conformacional no sentido da forma E1, o composto BMOV aparenta possuir uma preferência pela conformação E2 de SERCA. Adicionalmente, mostrou-se existir um efeito na própria união de cálcio à proteína: HAIDA-V(IV), o composto que menos inibe a hidrólise de ATP, reduz de um modo bastante significativo a ligação do catião, levantando a hipótese de uma interacção directa e específica com os locais de transporte de iões Ca^{2+} ; o complexo PDC-V(V), por seu turno, interfere estrutural e funcionalmente com as funções catalítica e de transporte, sugerindo-se a hipótese de interactuar tanto com o domínio transmembranar como com o de união de ATP. Já o insulino-mimético BMOV, o inibidor mais potente da actividade hidrolítica do sistema em estudo, aparenta interactuar preferencialmente com a porção catalítica da enzima.

Todas as observações efectuadas no presente trabalho são consistentes com a formação de um aducto entre a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático, que induzirá alterações conformacionais capazes de pôr em causa a integridade funcional da enzima. Pressupõe-se, portanto, que a complexação ao local catalítico (PDC e BMOV) ou ao local de união de cálcio (HAIDA), bem como a interacção com a zona transmembranar (PDC e HAIDA), sejam modos de actuação dos compostos de vanádio estudados, conduzindo à alteração das propriedades estruturais, funcionais e bioenergéticas do sistema analisado.

Conclui-se, assim, que qualquer dos três compostos de vanádio é capaz de promover uma resposta na homeostasia intracelular de cálcio e, por acréscimo, tanto no sistema de contracção muscular como nas vias de acção da insulina, através da sua interacção com a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático. Levanta-se então a forte sugestão de que a bomba de cálcio constitui um alvo celular não só de compostos insulino-miméticos de vanádio, como também de outros complexos e soluções de oxovanádio.

Dado que os diversos compostos de oxovanádio promovem respostas estruturais e bioenergéticas distintas na SERCA, mais uma vez se coloca em evidência o facto de que o vanádio exhibe uma actividade biológica e fisiológica diversa, consoante a espécie, o ambiente de coordenação do complexo ou composto metálico e o equilíbrio simultâneo de espécies oligoméricas (por vezes, em diferentes estados de protonação e conformações). Contudo, na maioria das vezes, não é possível restringir as experiências a um único composto do metal, especialmente quando estão envolvidas células ou órgãos; dada a facilidade com que as espécies de vanádio se interconvertem em condições fisiológicas, quaisquer estudos com estes compostos, sejam eles químicos, biológicos, toxicológicos ou ambientais, têm de considerar sempre a bioquímica subjacente envolvida. A importância da caracterização e especificação de compostos insulino-miméticos de vanádio antes da sua aplicação terapêutica assevera-se, assim, como crucial.

Por fim, e para além do que já foi referido, os complexos insulino-miméticos e outros compostos de vanádio afirmaram-se como ferramentas importantes no estudo das vias gerais de acção da insulina e do envolvimento de Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático na génese e manutenção do estado diabético, envolvendo este que cada vez mais assume contornos visíveis. É necessário continuar, pois, os estudos que visam elucidar com exactidão os mecanismos moleculares que medeiam a acção de Vanádio nos organismos vivos, o que por seu turno irá definir a contribuição biológica e terapêutica concreta deste oligoelemento potencialmente essencial em mamíferos e humanos.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2007, **Diabetes Atlas**, third edition © *International Diabetes Federation*
- Amado, A.; Aureliano, M.; Ribeiro-Claro, P.; Teixeira-Dias, J. (1993). **Combined Raman and ^{51}V -NMR spectroscopic study of vanadium (V) oligomerization in aqueous alkaline solutions.** *Journal of Raman Spectroscopy* 24: 699-703.
- Andersen, J. (1989) **Monomer-oligomer equilibrium of SR Ca^{2+} -ATPase and the role of subunit interaction in the Ca^{2+} mechanism.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 988: 47-72.
- Ahmad, F.; Considine, R.; Goldstein B. (1995) **Increased abundance of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR accounts for the elevated insulin receptor dephosphorylating activity in adipose tissue of obese human subjects** *Journal of Clinical Investigation* 95: 2806-2812.
- Algenstaedt, P.; Antonetti, D.; Yaffe, M.; Kahn, C. (1997) **Insulin Receptor Substrate Proteins Create a Link between the Tyrosine Phosphorylation Cascade and the Ca^{2+} -ATPases in Muscle and Heart.** *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 23696-23702.
- Aravind, L.; Galperin, M.; Koonin, E. (1998) **The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold.** *Trends in Biochemistry Science* 23: 127-129.
- Atkinson, M.; Maclaren, N. (1990) **What Causes Diabetes?** *Scientific American* 262(7): 62-71
- Aureliano, M.; Amado, A. M., et al. (1993) **Combined Raman and ^{51}V NMR spectroscopy study of vanadium (V) oligomerization in aqueous alkaline solutions.** *Journal of Raman Spectroscopy*, 24: 699-703.
- Aureliano, M.; Madeira, (1994) **Interactions of vanadate oligomers with sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1221(3): 259-71
- Aureliano, M.; Leta, J.; Madeira, V.; de Meis, L. (1994) **The Cleavage of Phosphoenolpyruvate by Vanadate** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201 (1): 155-159.
- Aureliano (1995) **Transdução e Conjugação Energética na Ca^{2+} -ATPase do Retículo Sarcoplasmático: interação de vanadatos.** *Dissertação para prestação de provas de Doutoramento* em Bioquímica, na especialidade de Bioenergética. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Coimbra.

- Aureliano, M.; Madeira, V. (1998) **in Energy transduction mechanisms as affected by vanadium (V) species: Ca²⁺ pumping in sarcoplasmic reticulum.** *Vanadium in the Environment, part 1: Chemistry and Biochemistry.* Edited by Nriagu, J.; Wiley: 333-357.

- Aureliano, M. (2000a) **Vanadate oligomer inhibition of passive and active Ca²⁺ translocation by the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum.** Short Communication. *Journal of Inorganic Biochemistry* 80: 145–147

- Aureliano, M. (2000b) **Vanadate oligomer interactions with myosin.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 80: 141-143.

- Aureliano, M; Gândara, R. (2005) **Decavanadate effects in biological systems.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99: 979–985

- Aureliano, M.; Tiago, T.; Gândara, R.; Sousa, A.; Moderno, A.; Kaliva, M.; Salifoglou, A.; Duarte, R.; Moura, J. (2005) **Interactions of vanadium(V)-citrate complexes with the sarcoplasmic reticulum calcium pump.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99: 2355-2361.

- Aureliano, M (2007a) **Decavanadate interactions with sarcoplasmic reticulum calcium pump.** *Vanadium Biochemistry.* Edited by Aureliano, M. Research Signpost: 117- 134.

- Aureliano, M.; Soares, S.; Tiago, T.; Ramos, S.; Gutierrez-Merino, C. (2007b) **Biological effects of decavanadate: muscle contraction, in vivo oxidative stress and mitochondrial toxicity.** *Vanadium: The versatile Metal.* Edited by Kustin, K.; Pessoa, J. & Crans, D. ACS Symposium Series: 249- 263.

- Aureliano, M.; Henao, F.; Tiago, T.; Duarte R.; Moura, J.; Baruah, B.; Crans, D. (2008) **Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase Is Inhibited by Organic Vanadium Coordination Compounds: Pyridine-2,6-dicarboxylatodioxovanadium(V), BMOV, and an Amavadine Analogue** *Journal of Inorganic Chemistry*, 47 (13): 5677–5684

- Aureliano, M.; Crans, D. (2009) **Decavanadate and oxovanadates: oxometalates with many biological activities.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 103(4): 536-46

- Avecilla, F. (2007) **Decavanadates in supramolecular structures.** *Vanadium Biochemistry.* Edited by Aureliano, M. Research Signpost: 33-43.

- Baes, C.; Mesmer, R. (1976) **The hydrolysis of cations.** Wiley: 197–210.

- Bagshaw, C. (1982) **Muscle Contraction.** *Outline studies in biology.* Champan and Hall Ed.

- Baran, E. (1998) **Vanadium Detoxification.** *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects.* Edited by Nriagu, J., Wiley: 316 – 340.

- Barceloux, D. (1999) **Vanadium**. *Clinical Toxicology*, 37: 265-278.
- Barth, A.; Kreutz, W.; Mantele, W. (1997) **Ca²⁺ release from the phosphorylated and unphosphorylated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase results in parallel structural changes: an infrared spectroscopy study**. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 25507-25510.
- Bayer, E. (1995) **Amavadin, the vanadium compound in amanitae**. *Metals Ions in Biological Systems*. Edited by Siegel, H. and A. Siegel, A., 31. Marcel Dekker: 407-422.
- Belcastro, A.; Gilchrist, J.; Scrubb, J. (1993) **Function of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles with exercise**. *Journal of Applied Physiology*, 75 (6): 2412-2418.
- Bell, M.; Kelly, K.; Sargent, J. (1979) **Sodium ortovanadate, a powerful vasoconstrictor in the gills in the common eel, *Anguilla anguilla***. *J. Mer. Biol. Assoc.* 59: 429-435.
- Berry, R.; Armstrong, E.; Beddoes, R.; Collison, D.; Ertok, S.; Helliwell, M.; Garner, C. (1999). *The Structural Characterization of Amavadin*. *Angewandte Chemie International Edition* **38**: 795–797.
- Bertini, I. (1994) **Bioinorganic Chemistry**, University Science Books.
- Bhanot, S.; Michoulas, A.; McNeill, J. (1995) **Antihypertensive effects of vanadium compounds in hyperinsulinemic, hypertensive rats**. *Molecular Cell Biochemistry* 153: 205-209.
- Bhanot, S.; McNeill, J. (1996) **Insulin and Hypertension: a casual relationship?** *Cardiovascular Research* 31: 212-221
- Bidasee, K.; Zhang, Y.; Shao, C.; Wang, M.; Patel, K.; Dincer, U.; Besch, H. (2004) **Diabetes Increases Formation of Advanced Glycation End Products on Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase**, *Diabetes*, 53: 463–473.
- Bigelow, D.; Inesi, G. (1992) **Contributions of chemical derivatization and spectroscopic studies to the characterization of the Ca²⁺ transport ATPase of sarcoplasmic reticulum**. *Biochimica et Biophysica Acta* 1113: 323-333
- Bode, H. ; Friebel, C.; Fuhman, G. (1990) **Vanadium uptake by yeast cells**. *Biochimica et Biophysica Acta* 1022 (2): 163-70.
- Bootman, M.; Collins, T.; Peppiatt, C.; Prothero, L.; Mackenzie, L. ; De Smet, P.; Travers, M.; Tovey, S.; Seo, J.; Berridge, M.; Ciccolini, F.; Lipp, P. (2001) **Calcium signalling: an overview**. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 12: 3-10.

- Borges, G.; Mendonça, P.; Joaquim, N.; Coucelo, J.; Aureliano, M. (2003) **Acute effects of vanadate oligomers on heart, kidney, and liver histology in the lusitanian toadfish (*Halobatrachus didactylus*)**. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45 (3):415-422.
- Bradford, M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brichard, S.; Henquin, J. (1995) **The role of vanadium in the management of diabetes**. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16: 265-270.
- Buglyo, P.; Crans, D.; Nagy, E.; Lindo, R.; Yang, L.; Smee J.; Jin, W.; Chin, H.; Godzala, M.; Willsky, G. (2005) **Aqueous chemistry of the vanadium(III) (V(III)) and the V(III)-dipicolinate systems and a comparison of the effect of three oxidation states of vanadium compounds on diabetic hyperglycemia in rats**. *Journal of Inorganic Chemistry* 44: 5416–5427.
- Buse, J.; Polonski, K.; Burant, C. (2002) **Type 2 Diabetes mellitus**. *Williams Textbook of Endocrinology*, 10th ed, Saunders: 1427-1483.
- Byczkowski, J.; Kulkarni, P. (1998). **Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium**. *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects*. Edited by Nriagu, J.: 235-263.
- Campbell, K.; MacLennan, D. (1981) **Purification and characterization of the 53,000-dalton glycoprotein from the sarcoplasmic reticulum**. *Journal of Biological Chemistry* 256(9): 4626-4632
- Campbell, K.; MacLennan, D. (1982) **A calmodulin-dependent protein kinase system from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Phosphorylation of a 60,000-dalton protein**. *Journal of Biological Chemistry*, 257(3): 1238-1246.
- Cândido, R.; Forbes, J.; Thomas, M.; Thallas, V.; Dean, R.; Burns, W.; Tikellis, C.; Ritchie, R.; Twigg, S.; Cooper, M.; Burrell, L. (2003) **A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes**. *Circulation Research* 92: 785–792.
- Cantor, C.; Shimmel, P. (1997). **Techniques for the study of biological structure and function**. *Biophysical Chemistry, Part II*, W.H. Freeman and Company.
- Caravan, P.; Gelmini, P.; Glover, N.; Herring, F.; Li, H.; McNeill, J.; Rettig, S.; Setyawati, I.; Shuter, E.; Sun, Y.; Tracey, A.; Yuen, V.; Orvig, C. (1995) **Reaction chemistry of BMOV, bis(maltolato)oxovanadium(IV), a potent insulin mimetic agent**. *Journal of the American Chemical Society* 117: 12759–12770.
- Carmignani, M.; Boscolo, P.; Volpe, A.; Togna, G.; Masciocco, L.; Preziosi, P. (1991). **Cardiovascular system and kidney as specific targets of chronic exposure to vanadate in the rat: functional and morphological findings**. *Archives of Toxicology*, 14: 124-127.

- Carvalho, A.; Leo, B. (1967). **Effects of ATP on the interaction of Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺ with fragmented sarcoplasmic reticulum isolated from skeletal muscle.** *The Journal of General Physiology*. 50: 1327-1331.
- Centeno, F.; Fernandez-Salguero, P.; Gutiérrez-Merino, C. (1992) **Differential scanning calorimetry study of glycogen phosphorylase b-detergent interactions.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24: 625-634.
- Champeil, P.; Maire, M.; Moller, J.; Riollet, S.; Guillain, F.; Green, N. (1986) **Does intrinsic fluorescence reflect conformational changes in the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum?** *FEBS Letters* 206(1): 93-98
- Chasteen, N. (1983) **The biochemistry of vanadium.** *Structure and bonding* 53: 105-138.
- Clore, G.; Gronenborn, A.; Mitchinson, C.; Green, M. (1982) **¹H-NMR Studies on Nucleotide Binding to the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase,** *European Journal of Biochemistry*, 128: 113-117.
- Coan, C.; Scales, J.; Murphy, A. (1986). **Oligovanadate binding to sarcoplasmic reticulum ATase: evidence for substrate analogue behaviour.** *Journal of Biological Chemistry*, 261 (22): 10394-10403.
- Compton, S.; Jones, C. (1985) **Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay.** *Analytical Biochemistry* 151: 369-374
- Cortizo, A. (2001) **Effect of vanadium compounds on the lipid organization of liposomes and cell membranes.** *Biological trace elements research*, 80: 269-270.
- da Costa, A.; Madeira, V. (1986) **Magnesium and manganese ions modulate Ca²⁺ uptake and its energetic coupling to sarcoplasmic reticulum.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 249: 199-206.
- Crans, D.; Schelbe, S. (1990) **Vanadate dimer and tetramer both inhibit glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*.** *Biochemistry*, 29 (28): 6698-6706.
- Crans, D. (1994) **Aqueous Chemistry of labile oxovanadates: relevance to biological studies.** *Comments in Inorganic Chemistry* 16: 1-33.
- Crans, D. (1994) **Enzyme interactions with labile oxovanadates and other polyoxometalates.** *Comments in Inorganic Chemistry* 16: 35-76.
- Crans, D.; Amin, S.; Keramidis, A. (1998) **Chemistry of relevance to vanadium in the environment.** *Vanadium in the Environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry.* Edited by Nriagu, J., Wiley & Sons: 73-95.

- Crans, D. (2000) **Chemistry and insulin-like properties of vanadium(IV) and vanadium(V) compounds** *Journal of Inorganic Biochemistry* 80 : 123-131.
- Crans, D.; Yang, L.; Jakusch, T.; Kiss, T. (2000) **Aqueous Chemistry of Ammonium Dipicolinatooxovanadium(V): The First Organic Vanadium(V) Insulin-Mimetic Compound.** *Journal of Inorganic Chemistry* 39: 4409–4416.
- Crans, D.; Smee, J.; Gaidamauskas, E.; Yang, L. (2004). **The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds.** *Chem. Rev.*, 104 (2): 849-902.
- Crans, D.; Rithner, C.; Baruah, B.; Gourley, B.; Levinger, N. (2006) **Molecule Probe Location in reverse Micelles Determined by NMR Dipolar Interactions.** *Journal of American Chemical Society*, 128: 4437–4445.
- da Cruz, O.; Dong, Y. ; Uckun, F. (2003) **Potent dual anti-HIV and spermicidal activities of a novel oxovanadium (V) complexes with thiourea non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302 (2): 253-264.
- Csermely, P.; Martonosi, A.; Levy, G.; Ejckart, A. (1985). **⁵¹V-NMR analysis of the binding of vanadium (V) oligoanions to sarcoplasmic reticulum.** *Biochem. J.*, 203: 807-815.
- Cuenda, A.; Centeno, F.; Gutiérrez-Merino (1991) **Modulation by phosphorylation of glycogen-phosphorylase-sarcoplasmic reticulum interaction.** *FEBS Letters*, 283 (2): 273-276.
- Cuenda, A.; Nogues, M.; Gutiérrez-Merino, C.; de Meis, L. (1993) **Glycogen Phosphorolysis Can Form a Metabolic Shuttle to Support Ca²⁺ Uptake by Sarcoplasmic Reticulum Membranes in Skeletal Muscle.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196 (3):1127-1132.
- 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.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1194: 35-43.
- Cuenda, A.; Nogues, M.; Henao, F.; Gutierrez-Merino, C. (1995). **Interaction between glycogen phosphorylase and sarcoplasmic reticulum membranes and its functional implications.** *Journal of Biological Chemistry*, 270 (20): 11998- 12004.
- Dannenberg, A.; Rotenberg, M.; Zakim, D. (1989) **Regulation of UDP-glucuronosyltransferase by lipid-protein interactions. Comparison of the thermotropic properties of pure reconstituted enzyme with microsomal enzyme.** *Journal of Biological Chemistry*, 264: 238-242.
- Day V.; Klemperer, G.; Maltbie, D. (1987) **Where are the protons in H₃V₁₀O₂₈³⁻ questionable.** *Journal of American Chemical Society* 109: 2991-3002.

- Delfert, D. & McDonald, J. (1985) **Vanadyl and vanadate inhibit Ca²⁺ transport systems of the adipocyte plasma membrane and endoplasmic reticulum.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 241(2): 665-672.

- Desoize, B.; Briois, F.; Carpentier, Y. (1994) **Reversion of resistance to adriamycin by vanadate on four friend cell sublines.** *International Journal of Oncology* 5: 87-91.

- Deutcher, M. (1990) **Guide to protein purification.** *Methods in Enzymology*, 182. Academic Press Inc.

- Ding, W.; Crans, D. (2006) **Chemical species of vanadium: evidence of different biological activity.** *5th International Vanadium Symposium*, Oral Communication n° 13: 18.

- Duarte, R. (2002) **Diabetologia Clinica**, 3^a edição, LIDEL – edições técnicas Lda.

- Dubyak, G.; Kleinzellner, A. (1980) **The insulin mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes.** *Journal of Biological Chemistry*, 255: 5306-5312.

- Dupont, Y.; Bennet, N. (1982) **Vanadate inhibition of the Ca²⁺-dependent conformational change of the SR Ca²⁺-ATPase.** *FEBS Letters*, 139: 237-240.

- Dupont, Y.; Guillain, F.; Lacapere, J. (1988) **Fluorimetric detection and significance of conformational changes in Ca²⁺-ATPase.** *Methods in Enzymology*, 157: 206 – 219.

- Dux, L.; Martonosi, A. (1983) **Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca²⁺-ATPase vesicles treated with vanadate.** *Journal of Biological chemistry*, 258: 2599-2603.

- Ebashi, S.; Lipmann, F. (1962) **Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle.** *The Journal of Cell Biology*, 14: 389-400.

- Eckert, R.; Randall, D.; Burggren.; French, K.; Fernald, R. (1997) **Eckert Animal Physiology – mechanisms and adaptations**, 4^a ed, W.H. Freeman and Company.

- Elberg, G.; Li, J.; Shechter, Y. (1998) **Mechanisms of actions of vanadium in mediating the biological effects of insulin.** *Vanadium in the environment. Part 2: Health Effects*. Edited by Nriagu, J.: 277-295

- Entman, M.; Keslensky, S.; Chu, A.; Winkle, B. (1989) **The sarcoplasmic reticulum-glycogenolytic complex in mammalian fast twitch skeletal muscle.** *Journal of Biological Chemistry* 255: 6245–6252.

- Erdman, E.; Werdn, K.; Krawietz, W.; Scmitz, W.; Scholz, H. (1984) **Vanadate and its significance in biochemistry and pharmacology.** *Biochemical Pharmacology*, 33: 945-950.
- Evangelou, A. (2002) **Vanadium in cancer treatment.** *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 42: 249-265.
- Foresta, B.; Champeil, P.; Maire, M. (1990) **Different classes of tryptophan residues involved in the conformational changes characteristic of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase cycle.** *European Journal of Biochemistry*, 194: 383-388.
- Fraústo *et al.* (1997) *Química* 64: 21-31.
- Galina, A.; de Meis, L.; (1991) **Ca²⁺ translocation and catalytic activity of the sarcoplasmic reticulum ATPase. Modulation by ATP, Ca²⁺, and Pi.** *Journal of biological chemistry*, 266 (27): 17978-17982.
- Garcia-Martín, E.; González-Cabanillas, S.; Gutiérrez-Merino, C. (1990) **Modulation of calcium fluxes across synaptosomal plasma membrane by local anesthetics.** *Journal of Neurochemistry*, 55: 370-380.
- Garcia-Vicente, S. (2007) **Oral insulin-mimetic compounds that act independently of insulin.** *Diabetes*, 56: 486- 493.
- Garduño, E.; Nogues, M.; Merino, J.; Gutierrez-Merino, C; Henao, F. (2001) **The content of glycogen phosphorylase and glycogen in preparations of sarcoplasmic reticulum-glycogenolytic complex is enhanced in diabetic rat skeletal muscle.** *Diabetologia* 44: 1238 - 1246.
- Gardner, C.; Armstrong, E.; Berry, R.; Beddoes, R.; Collison, D.; Cooney, J.; Ertok, S.; Helliwell, M. (2000) **Investigations of Amavadin.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 80: 17-20.
- Gavin, J.; Alberti, K.; Davidson, M.; DeFronzo, R.; Drash, A.; Gabbe, S.; Genuth, S.; Harris, M.; Kahn, R.; Keen, H.; Knowler, W.; Lebovitz, H.; Maclaren, N.; Palmer, J.; Raskin, P.; Rizza, R.; Stern, M. (2003) **Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** *Diabetes Care*, 26 S(1): S5-S20.
- Gennis, R. (1989) **Biomembranes: molecular structure and function.** *Springler-Verlag*.
- Goldstein, M.; Murphy, D.; Winkle, W.; Entman, M. (1985) **Cytochemical studies of a glycogen-sarcoplasmic reticulum complex.** *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 6: 177-187.
- Goldwasser, I.; Gefel, D.; Gershonov, E.; Fridkin, M.; Shechter, Y. (2000). **Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 80: 21-25.
- Gorol, A.; May, L.; Mulley, L. (1995) *Cuidados Primários em Medicina*, McGrawHill: 531-533.

- Green, D.; Reed, J. (1998) **Mitochondria and apoptosis.** *Science*, 281: 1309-1312
- Greenwood, N.; Earnshaw, A. (1997) **Chemistry of the Elements**, 2nd Ed, *Butterworth-Heinemann*.
- Grimaldi, A. (2003) **Diabète de type 2: L'épidémie annoncée est en cours.** *La revue du praticien*, 10 (53) : 1067 :1068.
- Groof, J.; Fransen, J.; Errington, R.; Willems, P.; Wieringa, B.; Koopman, W. (2002) **The Creatine Kinase System Is Essential for Optimal Refill of the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Store in Skeletal Muscle.** *Journal of Biological Chemistry*, 277 (7): 5275–5284.
- Hargreaves, M. (2004) **Muscle glycogen and metabolic regulation.** *Proceedings of the Nutrition Society*, 63: 217–220
- Hasselbach, W.; Makinose, M. (1961) **The calcium pump of relaxing granules of muscle and its dependence on ATP-splitting.** *Biochemische Zeitschrift*, 333: 518-528.
- Hasselbach, W.; Makinose, M. (1962) **ATP and active transport.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7: 132-136.
- Hasselbach, W.; Medda, P. (1983) **The vanadate complex of the calcium transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum: its formation and dissociation.** *European Journal of Biochemistry*, 137: 7-14.
- Harrison (1998) **Medicina Interna**, 14^a Ed.
- Heinemann, G.; Fichtl, B.; Vogt, W. (2003) **Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution.** *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55(3): 241-245.
- Henao, F.; Gutierrez-Merino, C. (1989) **Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺Mg²⁺-ATPase by Zn(II).** *Biochimica et Biophysica Acta*, 984: 135-142.
- Henao, F.; Foresta, B.; Orłowski, S.; Cuenda, A.; Gutiérrez-Merino, C.; Champeil, P. (1991) **Kinetic characterization of the normal and procaine-perturbed reaction cycles of the sarcoplasmic reticulum calcium pump.** *European Journal of Biochemistry*, 202: 559-567.
- Henao, F.; Soares, S.; Aureliano, M. (2005) **Propriedades Funcionais e Estruturais da Ca²⁺-ATPase de Retículo Sarcoplasmático de músculo esquelético de coelho.** *Curso de Trabalhos Práticos Dirigidos*, Laboratório de Bioquímica e Bioenergética, FCT, Universidade do Algarve.

- Heuson-Stiennon, J.; Wanson, J.; Drochmans, P. (1972) **Isolation and characterization of the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle.** *Journal of Cell Biology*, 55: 471-488.
- Heyliger., C.; Tahiliani, A.; McNeill, J. (1985) **Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats.** *Science* 227: 1474.
- Hidalgo, C.; Gonzalez, M. Lagos, R. (1983) **Characterization of the Ca²⁺ or Mg²⁺-ATPase of transverse tubule membrane isolated from rabbit skeletal muscle.** *Journal of Biological Chemistry*, 258: 13937-13945.
- Hidalgo, C.; Parra, C.; Riquelme, G.; Jaimovich, E. (1986) **Transverse tubules from frog skeletal muscle. Purification and properties of vesicles sealed with the inside-out orientation.** *Biochimica et Biophysica Acta* 855: 79-88.
- Highsmith, S.; Barker, D.; Scales, D. (1985) **High-affinity and low affinity vanadate binding to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase labelled with fluorescein isothiocyanate.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 817: 123-133.
- Holman, G.; Kasuga, M. (1997) **From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport.** *Diabetologia* 40: 991-1003.
- Holme, D.; Peck, H. (1993) **Analytical Biochemistry.** 2nd ed. *Longman Group* Ltd.
- Howarth, O.; Jarold, M. (1978). **Protonation of the decavanadate(6-)ion: a vanadium-51 nuclear magnetic resonance study.** *Journal of Chemical Society, Dalton*: 503-506.
- Howarth, O. (1990) **Vanadium-51 NMR.** *Progress in Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*, 22: 453-483.
- Hua, S.; Fabris, D.; Inesi, G. (1999) **Characterization of calcium, nucleotide, phosphate and vanadate bound states by derivatization of sarcoplasmic reticulum ATPase with Thioglo1.** *Biophysical Journal*, 77: 2217-2225.
- Inesi, G.; de Meis, L. (1989) **Regulation of steady state filling in sarcoplasmic reticulum. Roles of back-inhibition, leakage, and slippage of the calcium pump.** *Journal of Biological Chemistry*, 264 (10): 5929-5936.
- Inesi, G.; Lewis, D.; Nikic, D.; Hussain, A.; Kirtley, M. (1992). **Long-range intramolecular linked functions in the Ca²⁺ transport ATPase.** *Offprints from advances in Enzymology and related areas of Molecular Biology*, 65, John Wiley & Sons: 185-215.

- Ingri, N.; Brito, F. (1959) **Equilibrium studies of polyanions: polyvanadates in alkaline NaCl medium.** *Acta Chemica Scandinavica* 13: 1971-1996.
- Ishii, T.; I. Nakai, I. (1995) **Biochemical significance of vanadium in a polychaete worm.** *Metal Ions in Biological Systems*, edited by Sigel and Sigel, 31, Marcel Dekker: 491-510.
- Jencks, W. (1989) **How does a calcium pump pumps calcium?** *Journal of Biological Chemistry*, 264: 18855-18858.
- Josephson, L.; Cantley, L. (1977). **Isolation of a potent (Na-K)ATPase inhibitor from striated muscle.** *Biochemistry*, 16 (21): 4572-4578.
- Kanna, P.; Mahendrakumar, C.; Chakraborty, T.; Hemalatha, P.; Banerjee, P.; Chatterjee, M. (2003) **Effect of vanadium on colonic aberrant crypt foci induced in rats by 1,2 dimethyl hydrazine.** *World Journal of Gastroenterology*, 9 (5): 1020-1027.
- Karlsson, H. (2005) **Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle.** Department of Surgical Science, section of Integrative Physiology, Kanolinska Institutet, Stockholm.
- Karpati, G.; Charuk, J.; Carpenter, S.; Jablecki, C.; Holland, P. (1986) **Myopathy caused by a deficiency of Ca²⁺-adenosine triphosphatase in sarcoplasmic reticulum (Brody's disease).** *Annals of Neurology*, 20: 38-49.
- Khan, M.; Chang, Y.; Chen, Q.; Hope, H.; Parkin, P.; Goshorn, D.; Zubieta, J. (1992) **Polyoxovanadium-organoarsonate clusters. Properties and molecular structures of the vanadium(V) species (NH₄)₂[(C₄H₉)₄N]₂[V₁₀(AsC₆H₄-4-NH₂)₃O₃₃] and of the mixed valence complex [(C₄H₉)₄N]₂[H₂V₆(AsC₆H₅)₆O₂₈]•2H₂O,** *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 31: 1197
- Korge, P.; Byrd, K.; Campbell; K. (1993) **Functional coupling between sarcoplasmic-reticulum-bound creatine kinase and Ca²⁺-ATPase.** *European Journal of Biochemistry*, 213: 973-980.
- Krejsa, C.; Nadler, S.; Esselstyn, J.; Kavanagh, T.; Ledbetter, J.; Schieven, G. (1997) **Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF-kappaB.** *Journal of Biological Chemistry* 272: 11541 – 11549
- Kustin, K.; McLeod, G. (1983) **Vanadium and other metal ions in the physiological ecology of marine organisms.** *Structure and Bonding* 53: 139-160.
- Laakso, M. (2008) **Epidemiologia da Diabetes tipo 2,** Goldstein B. & Muller-Wieland *Diabetes Tipo 2, princípios e prática*, segunda edição, Editora Novartis: 1-12.
- Laemmli, U. (1970) **Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the bacteriophage T4.** *Nature*, 227: 680-685.

- Lakowicz, J. (1999) **Principles of Fluorescence Spectroscopy** 2nd Ed., Kulwer Academic/Plenum.
- Landersdorfer, C.; Jusko, W. (2008) **Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling in *diabetes mellitus***. *Clinical Pharmacokinetics*, 47 (7): 417-448.
- Lee, S.; Jay, H. (2004) **Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum glycogen status influences Ca uptake supported by endogenously synthesized ATP**. *American Journal of Physiology; Cell Physiology* 286: 97-104
- Lees, S.; Chen, Y.; Williams, J. (2004) **Glycogen debranching enzyme is associated with rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum**. *Acta Physiologica Scandinavica* 181: 239–245
- Léonard, A.; Gerber, G. (1994) **Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds**. *Mutation Research*, 317: 81- 88.
- Leonardo, L. (2002) **Interação de vanádio e de cádmio com a Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de *Halobatrachus didactylus***. *Relatório de estágio de Licenciatura em Bioquímica*, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve.
- Li, C. & Oberlies, N. (2005) **The most widely recognized mushroom: chemistry of the genus *Amanita***. *Life Sciences*, 78: 532 – 538.
- Lindquist, R. ; Lynn, J. ; Lienhard, G. (1973). **Possible transition-state analogs for ribonuclease. The complexes of uridine with oxovanadium(IV) ion and vanadium(V) ion**. *Journal of the American Chemical Society*, 95(26): 8762-8768.
- Llobet, J. & Domingo, J. (1984) **Acute toxicity of vanadium compounds in rats and mice**. *Toxicology Letters*, 23: 227–231.
- Lodish, H.; Baltimore, D.; Berck, A.; Darnell, J.; Matsudaira, P.; Zipursky, S. (2000) **Molecular Cell Biology**, 4th ed, *WH Freeman & Company*.
- Loura, L. & Almeida, R. (2004) **Tópicos de Biofísica de Membranas**. *Lidel*, edições técnicas Lda.
- MacLennan, D. (1970). **Purification and properties of an Adenosine Triphosphatase from sarcoplasmic reticulum**. *Journal of Biological Chemistry*, 245: 4508-4518.
- MacLennan, D.; Yip, C. (1972) **Isolation of sarcoplasmic reticulum proteins**. *Symposium on Quantitative Biology*, 37: 469-477.

- MacLennan, D.; Ostwald, T. (1974) **Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum.** *Journal of Biological Chemistry*, 249 (3): 974-979
- MacLennan, D.; Brandl, C.; Korczak, B.; Green, N. (1985) **Aminoacid sequence of a Ca²⁺ Mg²⁺-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence.** *Nature*, 316: 696-700.
- MacLennan, D.; Leberer, E.; Timms, B.; Campbell, K. (1990). **Purification, calcium binding properties and ultrastructural localization of the 53,000- and 160,000 (Sarcalumenin) - Dalton glycoproteins of the sarcoplasmic reticulum.** *Journal of Biological Chemistry*, 265: 10118-10124.
- MacLennan, D.; Phillips, M. (1992) **Malignant hyperthermia.** *Science*, 256: 789 - 794.
- MacLennan, D. (1997). The mechanism of Ca²⁺ transport by Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 28815-28818.
- MacLennan, D.; Green, M. (2000). **Pumping Ions.** *Nature*, 405: 633-634.
- MacLennan; D. (2000) **Ca²⁺ signalling and muscle disease.** Minireview. *European Journal of Biochemistry* 267: 5291 – 5297.
- Mahaney, J.; Thomas, D.; Froehlich, J. (2004). **The time-dependent distribution of phosphorylated intermediates in native sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase from skeletal muscle is not compatible with a linear kinetic model.** *Biochemistry*, 43: 4400-4416.
- Makino, N.; Dhala, K.; Elimban, V.; Dhala, N. (1987) **Sarcolemmal Ca²⁺ transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats** *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 253: E202-E207.
- Mamane, Y.; Pirrone, N. (1998). *Vanadium in the atmosphere. Vanadium in the Environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry*, Edited by J. Nriagu, John Wiley & Sons: 37-71.
- Marques, A.; Ramos, P. (2002). **Protocolo Experimental de SDS-PAGE.** Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve.
- Martonosi, A. (1995) The structure and interactions of Ca²⁺-ATPase. *Bioscience Reports*, 15: 263-281
- Maurer A.; Fleischer, S. (1984) **Decavanadate is responsible for vanadate-induced two-dimensional crystals in sarcoplasmic reticulum.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 16: 491-505.

- McIntosh, D.; Montigny, C.; Champeil, P. (2008) **Unexpected Phosphoryl Transfer from Asp351 to Fluorescein Attached to Lys515 in Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase.** *Biochemistry*, 47: 6386–6393.
- McCormack, J.; Westergaard, N.; Kristiansen, M.; Brand, C.; Lau, J. (2001) **Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy.** *Current Pharmaceutical Design*, 7: 1451-1474.
- de Meis, L.; Hasselbach, W. (1971) **Acetyl phosphate as substrate for Ca²⁺ uptake in skeletal muscle microsomes. Inhibition by alkali ions.** *Journal of Biological Chemistry*. 246 (15): 4759-63
- de Meis, L. (1981) **The Sarcoplasmic Reticulum**, edited by Bittar, E., Wiley.
- de Meis, L. (1989) **Role of water in the energy of phosphate compounds: energy transduction in biological membranes.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 973: 333-349.
- de Meis, L; Chini, E.; Toledo, F.; Albuquerque, M (1993). **The Ca²⁺ -transporting ATPases of rabbit and trout exhibit different pH- and temperature-dependences.** *Biochemical Journal*. 293: 469-473.
- de Meis, L. (1993) **“The concept of energy rich phosphate compounds: Water, Transport ATPases and Entropic Energy”**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 306(2) Academic Press: 287-296.
- de Meis, L. *et al* (1997) **“Control of energy fluxes by the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase: ATP hydrolysis, ATP synthesis and heat production”**, *FEBS Letters*, 406: 201-204.
- de Meis, L. (2000) **“Energy Interconversion by the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase: ATP hydrolysis, Ca²⁺ transport, ATP synthesis and heat production”** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72 (3): 369-379.
- Melchior, M.; Rettig, S.; Liboiron, B.; Thompson, K.; Yuen, V.; McNeill, J.; Orvig, C. (2001) *Journal of Inorganic Chemistry*, 40, 4686–4690.
- Merck & Co. (2007) **Potenciar as incretinas para potenciar a resposta: uma nova abordagem no controlo da glicemia na Diabetes Tipo 2.** *Monografia do produto JANUVIA* (sitagliptina, MSD).
- Merino, J.; Gutiérrez-Merino, C. (1999) **pH and ligand binding modulate the strength of protein-protein interactions in the Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum membranes.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1420: 203-213.
- Micera, G. & Sanna, D. (1998) **Spectroscopic Methods for the characterization of vanadium complexes.** *Vanadium in the environment. Part I: Chemistry and Biochemistry*. Edited by Nriagu, J. John Wiley e Sons, Inc.

- Michibata, H.; Uyama, T.; Ueki, T. (2002) **Vanadocytes, cells hold the key to resolving the highly selective accumulation and reduction of vanadium in ascidians.** *Microscopy Research and Technique*, **56** (6): 421–434

- Mintz, E.; Guillain, F. (1997) **Ca²⁺ transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase.** *Biochimica et Biophysica Acta*, **1318**: 52-70

- Miramand, P.; Fowler, S. (1998). **Bioaccumulation and transfer of vanadium in marine organisms.** *Vanadium in the Environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry*, edited by Nriagu, J. John Wiley & Sons: 167-197.

- Moderno, A. (2003). **Efeito de vanadatos na Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de coelho.** *Relatório de estágio de Licenciatura em Bioquímica*, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve.

- Molnar, E.; Varga, S.; Martonosi, A. (1991) **Differences in the susceptibility of various cation transport ATPases to vanadate-catalyzed photocleavage.** *Biochimica et Biophysica Acta* , **1068**: 17-26.

- Mukherjee, B.; Patra, B.; Mahapatra, S.; Banerjee, P.; Tiwari, A.; Chatterjee, M. (2004) **Vanadium, an element of atypical biological significance.** *Toxicology Letters*, **150**(2): 135-43.

- Nakai, M.; Watanabe, H.; Fujiwara, C.; Kakegawa, H.; Satoh, T.; Takada, J.; Matsushita, R.; Sakurai, H. (1995) **Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds.** *Biological Pharmaceutical Bulletin* **18**: 719-725.

- Nechay, B. (1984) **Mechanisms of action of vanadium.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **24**: 501-24.

- Nelson, D.; Cox, M. (2000) **Lenhinger: Principles of Biochemistry.** 3rd Edition. Worth Publishers.

- Netticadan, T.; Tamsah, R.; Kent, A.; Elimban, V.; Dhalla, N. (2001) **Depressed levels of Ca²⁺ cycling proteins may underlie sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic heart.** *Diabetes* **50**: 2133–2138.

- Nogues, M.; Cuenda, A.; Henao, F.; Gutierrez-Merino, C. (1996) **Ca²⁺ uptake coupled to glycogen phosphorylation in the glycogenolytic-sarcoplasmic reticulum complex from rat skeletal muscle.** *Zeitschrift für Naturforschung* **51c**: 591-598.

- Nriagu, J. (1998) **History, occurrence and uses of vanadium.** *Vanadium in the Environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry*, edited by Nriagu, J. John Wiley & Sons: 1-24.

- Pereira, A. (2003). **Inibição da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático por oligómeros de vanadato: efeito de pH, temperatura e incubação.** *Relatório de Estágio de Licenciatura em Bioquímica*, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve.
- Pereira, M.; Carvalho, E.; Eriksson, J.; Crans, D.; Aureliano, M. (2009) **Effects of decavanadate and insulin enhancing vanadium compounds on glucose uptake in isolated rat adipocytes.** *Journal of Inorganic Biochemistry* (in press).
- Peres (1994) *Revista Portuguesa de Clínica Geral* 11: 284-295.
- Petersen, K. & Shulman, G. (2002) **Pathogenesis of Skeletal Muscle Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus.** *American Journal of Cardiology*, 90(supplement): 11G–18G.
- Pettersson, L.; Andersson, (1985). **Multicomponent polyanions. 37. A potentiometric and 51V-NMR study of equilibria in the H^+ - HVO_4^{2-} system in 3.0 M $\text{Na}(\text{ClO}_4)$ medium.** *Chemica Scripta* 25: 309-317.
- Pfeiffer, A. (2008) **Agentes hipoglicemiantes orais.** *Diabetes Tipo 2, princípios e prática*, edited by Goldstein, B. & Muller-Wieland. segunda edição. Editora Novartis: 97-106.
- Pick, U. (1981) **Interaction of Fluorescein Isothiocyanate with Nucleotide-Binding Sites of the Ca-ATPase from Sarcoplasmic Reticulum** *European Journal of Biochemistry*. Z21, 187-135.
- Pick, U.; Bassilian, S. (1981) **Modification of the ATP binding site of the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum by fluorescein isothiocyanate.** *FEBS Letters*, 123(1): 127-130.
- Pick, U. (1982) **The interaction of vanadate ions with the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum.** *Journal of Biological Chemistry*, 257(11): 6111-6119
- Pickart, C.; Jencks, W. (1982) **Slow dissociation of ATP from the calcium ATPase.** *Journal of Biological Chemistry*, 257: 5319-5322.
- Plummer, D. (1987) **An Introduction to Practical Biochemistry.** 3rd ed. McGraw-Hill Book Company.
- Pope, M. (1983) **Heteropoly and Isopoly Oxometalates.** Springer-Verlag.
- Pope, M.; Muller, A. (editors) (1994) **Polyoxometalates: from platonic solids to anti-retroviral activity.** Kluwer Academic Publishers.
- Quintas, A.; Freire, A.; Videira, A.; Azevedo, C.; Oliveira, C.; Halpern, M. (2008) **Bioquímica: organização molecular da vida;** LIDEL, edições técnicas.

- Ramasarma, T. (2007) **A redox profile of vanadium.** *Vanadium Biochemistry*, edited by Ed. Aureliano, M. Research Signpost: 45-74.
- Ramos, S; Manuel, M; Tiago, T; Duarte, R; Martins, H; Gutiérrez-Merino, C.; Moura, J.; Aureliano, M. (2006) **Decavanadate interactions with actin: Inhibition of G-actin polymerization and stabilization of decameric vanadate.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100: 1734–1743
- Rehder, D.; Jantzen, S. (1998) **Structure, function and models of biogenic vanadium compounds.** *Vanadium in the environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry.* Edited by Nriagu, J.: 252-284,
- Rehder, D. (1999) **The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions.** *Coordination Chemistry Reviews*, 182: 297-322.
- Rehder, D.; Costa Pessoa, J.; Geraldés, C.; Castro, M.; Kabanos, T.; Kiss, T.; Meier, B.; Micera, G., Pettersson, L.; Rangel, M.; Salifoglou, A.; Turel, I.; Wang, D. (2002) **In vitro study of the insulin-mimetic behaviour of vanadium (IV,V) coordination compounds.** *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 80: 384.
- Rehder, D. (2003) **Biological and medicinal aspects of vanadium.** *Inorganic Chemistry Communication* 6: 604-617.
- Rickwood, D.; Hames, B. (1994) **Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach.** 2nd Edition. Oxford University Press.
- Rider, M.; Bartrons, R.; Hue, L. (1990) **Vanadate inhibits liver fructose-2,6-bisphosphatase.** *European Journal of Biochemistry* 190: 53-56.
- Rito, E. (2009) **Inibição da Ca²⁺-ATPase por oxometalatos: vanadato, molibdato e tungstato.** *Relatório de Estágio de Licenciatura em Bioquímica.* Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade do Algarve.
- Robson, R.; Eady, R. (1986) **The alternative nitrogenases of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme.** *Nature*, 322: 388-390.
- Robyt, J.; White, B. (1990) **Biochemical Techniques: Theory and Practice.** Waveland Press Inc.
- Roshchin, A.; Ordzhonikidze, E.; Shalganova, I. (1980) **Vanadium - toxicity, metabolism, carrier state.** *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology & Immunology*, 24(4): 377-383.
- Ross, D.; McIntosh, D. (1987) **Intramolecular cross-linking of domains at the active site links A1 and B subfragments of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum.** *Journal of Biological Chemistry*, 262: 2042-2049.

- Rossi, A.; Dirksen, R. (2006) **Sarcoplasmic Reticulum: the dynamic calcium governor of muscle.** *Muscle & nerve* 33: 715-731.
- Rossi, A.; Eppenberger, H.; Volpe, P.; Cotrufo, R.; Walliman, T. (1990) **Muscle MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios.** *Journal of Biological Chemistry*, 265: 5258-5266.
- Sanchez-Ferrer C.; Marin. J.; Lluch, M.; Valverde, A.; Salaices, M. (1988) **Actions of vanadate on vascular tension and sodium pump activity in cat isolated cerebral and femoral arteries.** *Brazilian Journal of Pharmacology*, 93: 53–60.
- Sakurai, H. (2002) **A new concept: the use of vanadium complexes in the treatment of diabetes mellitus.** *The Chemical Record*, 2: 237–248.
- Santos, M.; Carvalho, A. (1978). **Propriedades do retículo sarcoplasmático do músculo esquelético isolado a baixa força centrífuga.** *Ciências Biológicas*, 3: 41-56
- Scopes, R. (1982). **Protein purification: principles and practice.** Springer-Verlag NY Inc.
- Schechter, Y.; Karlsh, S. (1980) **Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions.** *Nature*, 284: 556.
- Shechter, Y. (1990) **Perspective in diabetes: insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatments of diabetes.** *Diabetes*, 39: 1-5.
- 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.** *Coordination Chemistry Reviews*, 237: 3-11.
- Shenaan, D. (2000) **Physical Biochemistry: Principles and Applications.** 2nd ed. Wiley & Sons, Inc.
- Shin, J.; Goldshleger, R.; Munson, K.; Sachs, G.; Karlsh, S. (2001). **Selective Fe²⁺-catalized Oxidative Cleavage of gastric H⁺K⁺-ATPase. Implications for the energy transduction mechanism of P-Type cation pumps.** *Journal of Biological Chemistry*, 276: 48440-48450.
- Shutova, A.; Storey, K.; Lopina.; Rubtsov, A. (1999) **Comparative characteristics of sarcoplasmic reticulum preparations from skeletal muscles of the ground squirrel *Spermophilus undulatus*, rats and rabbits.** *Biokhimiya*, 64: 1480-1488.
- Silva, J.; Williams, R. (1997) **The biological chemistry of the elements.** Clarendon Press: 427-429.
- Sitprija, V; Eiam-Ong, S. (1998) **Vanadium and metabolic problems.** *Vanadium in the environment. Part 2: health Effects*, edited by Nriagu, J.: 92-93

- Smith, P.; Berry, R.; Harben, S.; Beddoes, R.; Helliwell, M.; Collison, D.; Garner, C. (1997) **New vanadium-(IV) and -(V) analogues of Amavadin.** *Dalton Transactions*: 4509–4516.
- Soares, S.; Martins, H.; Aureliano, M. (2006) **Vanadium distribution following decavanadate administration.** *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(1): 60-64.
- Soares, S.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007) **Decavanadate induces mitochondrial membrane depolarization and inhibits oxygen consumption.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(5): 789-96.
- Sorrentino, V. (2006) **Molecular determinants of the structural and functional organization of the sarcoplasmic reticulum.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1742: 113– 118
- Sousa, A. (2004) **Interacção de compostos de vanádio-citrato com a bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático.** *Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.* Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade do Algarve.
- Spenelakis, N. (1998). **Cell Physiology Source Book**, 2^a ed, Academic Press.
- Srivastava, A.; Mehdi, M. (2005) **Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds.** *Diabetic Medicine*, 22: 2–13.
- Stankiewicz, P.; Tracey, A. (1995) **Inhibition of phosphate-metabolizing enzymes by oxovanadium(V) complexes.** *Metal ions in biological systems*, 31, edited by Sigel & Sigel, Marcel Dekker: 287-323.
- Stryer, L.; Berg, J.; Tymoczko, J. (2002). **Biochemistry**, 5th Ed., W. H. Freeman and Company: 347-351.
- Stokes, D.; Ogawa, H.; Sasabase, H.; Toyoshima, C. (1998). **Structure of the Ca²⁺-pump of Sarcoplasmic Reticulum: a view along the lipid bilayer at 9 Å resolution.** *Biophysical Journal*, 75: 41-52.
- Stokes, D.; Wagenknecht, T. (2000). **Calcium transport across Sarcoplasmic Reticulum: structure and function of Ca²⁺-ATPase and the Ryanodine Receptor.** *European Journal of Biochemistry*, 267: 5274-5279
- Stokes, D.; Green, M. (2003) **Structure and function of the calcium pump.** *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 32: 445-468.
- Stumvoll, M.; Goldstein, B.; Haefliger, T. (2008) **Patogénese da Diabetes tipo 2.** *Diabetes Tipo 2, princípios e prática.* Goldstein, B. & Muller-Wieland, segunda edição, Editora Novartis: 13-26.

- Stumvoll, M.; Haring, H.; Matthaei, S. (2008) **Metformina** *Diabetes Tipo 2, princípios e prática*, Goldstein, B. & Muller-Wieland, segunda edição, Editora Novartis: 107-120.
- Swislocki, A.; Goodman, M.; Khuu, D.; Fann, K. (1997) *Insulin Resistance and Hypertension In Vivo and In Vitro Insulin Action in Skeletal Muscle in Spontaneously Hypertensive and Wistar Kyoto Rats. American Journal of Hypertension*, 10: 1159–1164.
- Tada, M.; Yamamoto, T.; Tonomura, Y. (1978) **Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum.** *Physiological Reviews*, 58: 1-79.
- Takahashi, M.; Kondou, Y.; Toyoshima, C. (2007) **Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 5800-5805.
- Taussky, H.; Shorr, E. (1953) **A microcalorimetric method for the determination of inorganic phosphorus.** *Journal of Biological Chemistry*, 202: 675-685.
- Thompson, K.; Orvig, C. (1995) **Vanadium and its role in biology.** *Metal ions in biological systems*, 31. Siegel, Siegel & Dekker Inc: 575-594.
- Thompson, K.; Battell, M.; McNeill, J. (1998) **Toxicology of vanadium in mammals.** *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects*. Edited by Nriagu: 20 – 33.
- Thompson, K.; McNeill, J.; Orvig, C. (1999) **Vanadium compounds as insulin mimics** *Chemical Reviews*, 99: 2561-2571.
- Thompson, K.; Orvig, C. (2001) **Coordination chemistry of vanadium in metallo-pharmaceutical candidate compounds.** *Coordination Chemistry Reviews*, 219-221: 1061-1081.
- Thompson, K.; Orvig, C. (2004) **Vanadium Compounds in treatment of diabetes.** *Metal Ions in Biological Systems*, 41: 221-52.
- Thompson, K.; Orvig, C. (2006) **Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 100: 1925–1935
- Tiago, D.; Laizé, V.; Cancela, M.; Aureliano, M. (2008) **Impairment of mineralization by metavanadate and decavanadate solutions in a fish bone-derived cell line.** *Cell Biology and Toxicology*, 24(3): 253-263
- Tiago, T.; Aureliano, M.; Duarte, R.; Moura, J. (2002) **Vanadate oligomers interaction with phosphorylated myosin.** *Inorganica Chimica Acta*, 339: 317 – 321

- Tiago, T.; Aureliano, M.; Moura, J. (2004) **Decavanadate as a biochemical tool in the elucidation of muscle contraction regulation.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98: 1902–1910
- Tiago, T. (2005) **Vanádio (V) como sonda na contracção muscular.** *Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, na especialidade de Bioquímica Inorgânica.* Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve.
- Tiago, T.; Martel, P.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007) **Binding modes of decavanadate to myosin and inhibition of the actomyosin ATPase activity.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774 (4): 474–80.
- Tiago, T.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. (2007) **Monomeric versus decameric vanadate in the elucidation of muscle contraction regulation: a kinetic, spectroscopic and structural overview.** *Vanadium Biochemistry.* Edited by Aureliano Alves, Research Signpost: 75-96.
- Tolman, E.; Barris, E.; Burns, M.; Pansini, A.; Partridge, R. (1979) **Effects of Vanadium on Glucose Metabolism in Vitro.** *Life Sciences*, 25, (13): 1159-1164.
- Toyoshima, C.; Sasabe, H.; Stokes, D. (1993) **Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane** *Nature*, 362(6419): 467-471.
- Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Ogawa, H. (2000). **Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution.** *Nature*, 405: 647-655.
- Toyoshima, C. (2008) **Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476: 3-11.
- Tracey, A.; Gresser, M.; Galeffi, B. (1988) **Vanadium (V) oxoanions – interactions of vanadate with methanol and methanol phosphate.** *Journal of Inorganic Chemistry*, 27: 157-161.
- Trost, S.; Belke, D.; Bluhm, W.; Meyer, M.; Swanson, E.; Dillmann, W. (2002) **Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy.** *Diabetes* 51: 1166–1171.
- Tsiani, E.; Fantus, I. (1997) **Vanadium Compounds - Biological Actions and Potential as Pharmacological Agents.** *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 8 (2): 51-58.
- Tupling, A. (2004). **The sarcoplasmic reticulum in muscle fatigue and disease: Role of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.** *Canadian Journal of Applied Physiology* 29(3): 308-329
- Ueki, T.; Adachi, T.; Kawano, S.; Aoshima, M.; Yamaguchi, N.; Kanamori, K.; Michibata, H. (2003) **Vanadium-binding proteins (vanabins) from a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*,** *Biochimica et Biophysica Acta* 1626 (1-3): 43–50.

- UK prospective diabetes study group (1995) **Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease.** *Diabetes*, 44: 1249-1258.
- Valente, A.; Barrabin, R.; Jorge, R.; Paes, M.; Scofano, H. (1990) **Isolation and characterization of the Mg^{2+} -ATPase from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum membrane preparations.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1039: 297-304.
- Valeur, B. (2002) **Molecular Fluorescence**, Wiley-VCH.
- Varga, S.; Csermely, P.; Martonosi, A. (1985). **The binding of vanadium (V) oligoanions to sarcoplasmic reticulum.** *European Journal of Biochemistry* 148: 119-126.
- Etten, R.; Waymack, P.; Rehkp, D. (1974) **Transition metal ion inhibition of enzyme-catalyzed phosphate ester displacement reaction.** *Journal of American Chemical Society* 96: 6782-6785.
- Vegh, M.; Molnar, E.; Martonosi, A. (1990) **Vanadate-catalyzed, conformationally specific photocleavage of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 1023:168-183.
- Verma, S.; Cam, M.; McNeill, J. (1998) **Nutritional Factors that Can Favorably Influence the Glucose/Insulin System: Vanadium,** *Journal of the American College of Nutrition* 17: 11-18
- Vetter, R.; Rehfeld, U.; Reissfelder, C.; Weiss, W.; Wagner, K.; Gunther, J.; Hammes, A.; Tschope, C.; Dillmann, W.; Paul, M. (2002) **Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase improves reticular Ca^{2+} handling in normal and diabetic rat hearts.** *FASEB Journal*, 16: 1657–1659.
- Vilter, H. (1995) **Vanadium-dependent haloperoxidases.** *Metals Ions in Biological Systems*. Edited by Siegel, H. and Siegel, A., Vol. 31. Marcel Dekker, New York, pp. 325-362.
- Vinagre, M. (2007) **Interacción de 4-hidroxi-2-nonenal con la Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de conejo. Implicaciones funcionales y estructurales.** *Trabajo de Grado de Licenciado en Ciências Biológicas*. Faculdade de Ciências, Universidade de Extremadura.
- Voet, D.; Voet, J. (1995) **Biochemistry**, 2^a ed, John Wiley & Sons, USA.
- Voet, D.; Voet, J.; Pratt, C. (2008) **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular.** 2^a edição, John Wiley & Sons.
- Xu, K.; Zweier, J.; Becker, L. (1995) **Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport.** *Circulation Research* 77: 88-97.

- Xu, K.; Becker, L. (1998) **Ultrastructural localization of glycolytic enzymes on sarcoplasmic reticulum vesicles.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 46(4): 419-427.
- Wanson, J.; Drochmans, P. (1972) **Role of the sarcoplasmic reticulum in glycogen metabolism.** *Journal of Cell Biology*, 54: 206:224.
- Weber, K.; Osborn, M. (1969) **The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis.** *Journal of Biological Chemistry*, 244: 4406-4412.
- White, M. (1998) **The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182: 3–11.
- Wild, S.; Roglic, G.; Green, A. (2004) **Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.** *Diabetes Care*, 27: 1047-1053.
- Willsky, G.; Goldfine, A.; Kostyniak, P.; Yang, L.; Khan, H.; Crans, D. (2001) **Effect of vanadium (IV) compounds in the treatment of diabetes: *in vivo* and *in vitro* studies with vanadyl sulfate and Bis(maltolato)oxovanadium (IV).** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 85: 33-42
- Wilson, K.; Walker, J. (1999) **Principles and Techniques of Practical Biochemistry.** 5th Edition. Cambridge University Press.
- Wittenkeller, L.; Abraha, A.; Ramasamy, R.; Mota de Freitas, D.; Theisen, L.; Crans, D. (1991) **Vanadate interactions with bovine Cu, Zn-Superoxid Dismutase as probed by ⁵¹V-NMR spectroscopy.** *Journal of the American Chemical Society*, 113: 7872-7881.
- Wittenkeller, L.; Lin, W.; Diven, C.; Ciaccia, A.; Wang, F.; Mota de Freitas, D. (2001) **Ion pairing between Cl⁻ or ClO₄⁻ and alkali metal complexes of ionophore antibiotics in organic solvents: a multinuclear NMR and FT-IR study.** *Journal of Inorganic Chemistry* 40: 1654–1662.
- Wold, L.; Dutta, K.; Mason, M.; Ren, J.; Cala, S.; Schwanke, M.; Davidoff, A. (2005) **Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats,** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39: 297–307.
- Ye, G.; Metreveli, N.; Ren, J.; Epstein, P. (2003) **Metallothionein prevents diabetes induced deficits in cardiomyocytes by inhibiting reactive oxygen species production.** *Diabetes* 52: 777–783.
- Zaporowska, H.; Scibior, A. (1998) **Vanadium and its significance in animal cell metabolism.** *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects.* Edited by Nriagu, J.: 121-133
- Zucchi, R.; Ronca-Testoni, S. (1997) **The Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Channel/Ryanodine Receptor: Modulation by Endogenous Effectors, Drugs and Disease State.** *Pharmacological Reviews.* 49 (1): 1-52.

Anexo I

Bioenergética: considerações relevantes

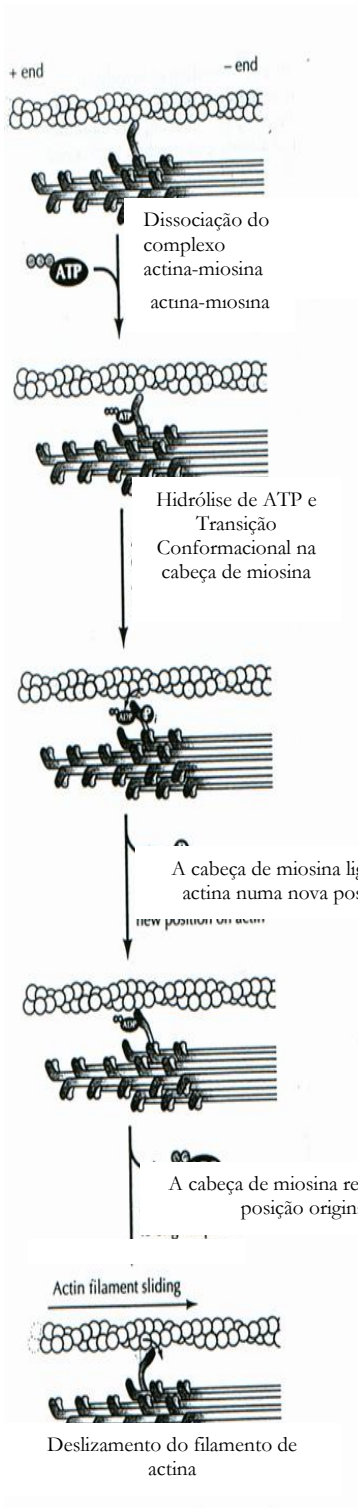
A capacidade para usufruir de energia, adquirindo-a, armazenando-a e canalizando-a de modo a que qualquer trabalho biológico possa ser levado a cabo, é uma propriedade fundamental em todos os organismos vivos, tendo sido adquirida, decerto, nos estádios primários da evolução celular (Lodish *et al.*, 2000). Com efeito, toda a vida está dependente dos fenómenos de transdução energética, que acoplam o metabolismo celular às fontes de energia provenientes do meio ambiente, seja sob a forma de luz ou de compostos reduzidos. Estas matrizes primárias de energia são posterior e eficientemente convertidas em novas formas, susceptíveis de serem utilizadas nos inúmeros processos de manutenção celular: biossínteses, mobilidade, transporte de substâncias, regulação e outras funções metabólicas (Quintas *et al.*, 2008; Voet *et al.*, 2008). A transdução de energia refere-se, pois, às diferentes conversões de energia que permitem o trabalho biológico, seja mediante o uso da energia química contida em moléculas específicas, para a síntese de macromoléculas complexas, seja por conversão desta em gradientes electroquímicos (e de concentração), em movimento ou em calor (Voet *et al.*, 2008).

A energia que as células necessitam e estão aptas a usar é a chamada Energia Livre. As células heterotróficas obtêm-na sob uma forma química, no catabolismo (reações exergónicas de oxidação que promovem o *input* energético) de moléculas nutrientes, usando-a depois para sintetizar Trifosfato de Adenosina (ATP) a partir de di-fosfato de Adenosina (ADP) e fosfato inorgânico (Pi, ou ortofosfato) ou outros “compostos energéticos”, onde fica armazenada. O ATP, que constitui o intermediário de energia livre mais dissimulado e universalmente utilizado pelas células, vai então doar alguma da sua energia química aos processos endergónicos e termodinamicamente desfavoráveis que sustentam a célula, de forma a que a energia livre resultante das reações de *input* possa ser particionada em quantidades úteis e utilizáveis (Quintas *et al.*, 2008; Voet *et al.*, 2008). O ATP energiza inúmeros processos fisiológicos endergónicos, entre eles a contracção muscular e, a um nível celular, o transporte transmembranar de iões e moléculas contra o seu gradiente de concentração; os processos de transporte activo levados a cabo por *Ion-Motive* ATPases são dos maiores consumidores de ATP na célula e possuem um papel crucial na homeostasia iónica celular de todos os organismos vivos (Lodish *et al.*, 2000)

Anexo II

NOTAS ADICIONAIS À ALÍNEA 2 DA INTRODUÇÃO (CAPÍTULO I)

1. Mecanismo de Contração Muscular



ra AII.1 – Modelo para a acção da miosina - a ligação de ATP à ATPase de miosina promove a dissociação do complexo actina-miosina. A hidrólise do ATP induz, depois, uma alteração conformacional que modifica as cabeças de miosina; isto é seguido da ligação dessas cabeças numa nova posição, no filamento de actina, com libertação de P_i . O ADP é libertado em seguida e as cabeças de miosina retomam as suas posições iniciais, provocando o deslizamento dos filamentos de actina. Ao nível do sarcómero, isso traduz-se na interpenetração de filamentos grossos e finos, que acciona a contração do músculo (adaptado de Lodish *et al*, 2000).

2. Regulação da Contração Muscular

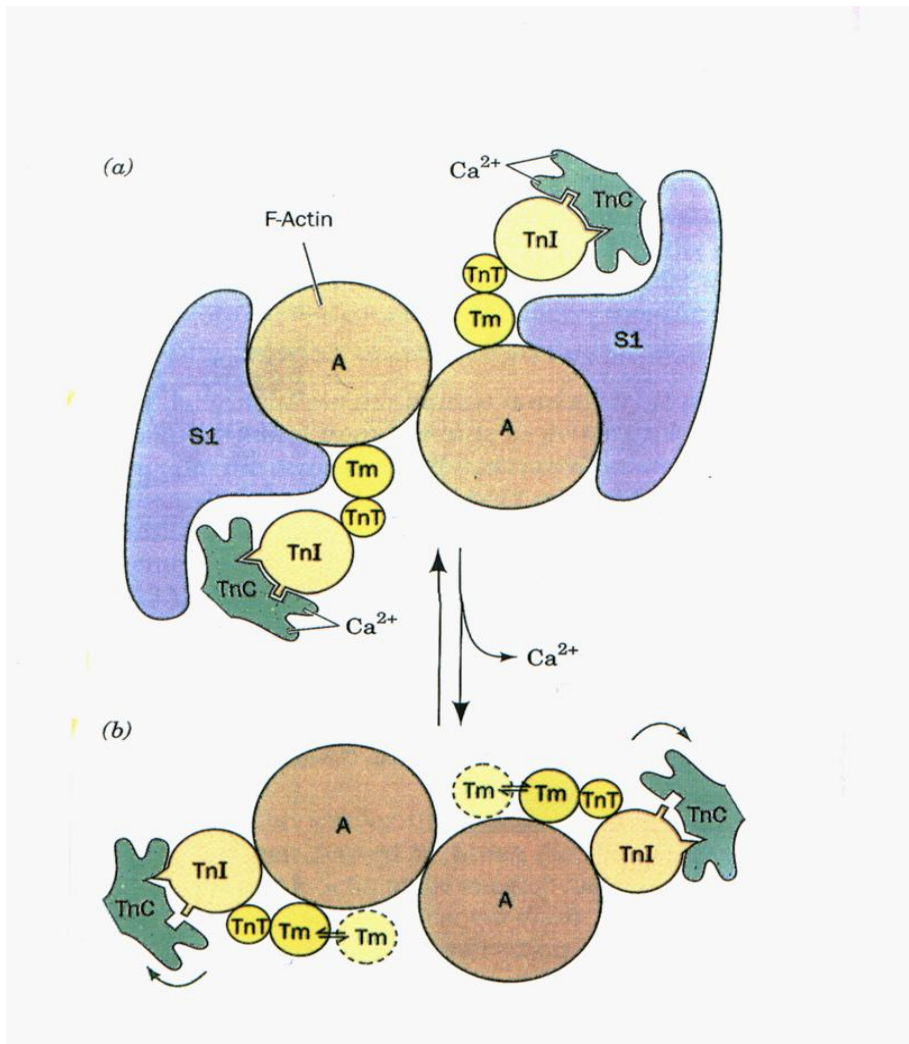


Figura AII.2 – Regulação da contração muscular por troponina e tropomiosina: No músculo contraído, as cabeças S₁ da miosina podem ligar-se livremente aos filamentos da actina (a); o músculo relaxa quando o Ca²⁺ se dissocia da troponina-C (TnC), movendo alostericamente a tropomiosina (Tm) para uma posição que bloqueia estericamente a interação actina-miosina (*in Voet & Voet, 1995*).

3. Reacções Parciais na Ca^{2+} -ATPase de Retículo Sarcoplasmático

Reacções Parciais	Constantes de Equilíbrio (Keq)
$\text{E} + 2\text{Ca}_{\text{out}}^{2+} \leftrightarrow \text{E Ca}_2$	$(3 \times 10^{12} \text{ M}^{-2})$ (1)
$\text{E Ca}_2 + \text{ATP} \leftrightarrow \text{ATP E Ca}_2$	$(1 \times 10^5 \text{ M}^{-1})$ (2)
$\text{ATP E Ca}_2 \leftrightarrow \text{ADP E-P Ca}_2$	(0.3) (3)
$\text{ADP E-P Ca}_2 \leftrightarrow \text{E-P Ca}_2 + \text{ADP}$	$(7 \times 10^{-4} \text{ M})$ (4)
$\text{E-P Ca}_2 \leftrightarrow \text{E-P} + 2\text{Ca}_{\text{in}}^{2+}$	$(3 \times 10^{-6} \text{ M}^2)$ (5)
$\text{E-P} \leftrightarrow \text{E P}_i$	(1) (6)
$\text{E P}_i \leftrightarrow \text{E} + \text{P}_i$	$(1 \times 10^{-2} \text{ M})$ (7)

Figura AII.3 – Esquema de reacções parciais que ocorrem na bomba de cálcio de retículo sarcoplasmático (*in Inesi et al., 1992*).

4. Aspectos Estruturais da Ca^{2+} -ATPase do RS

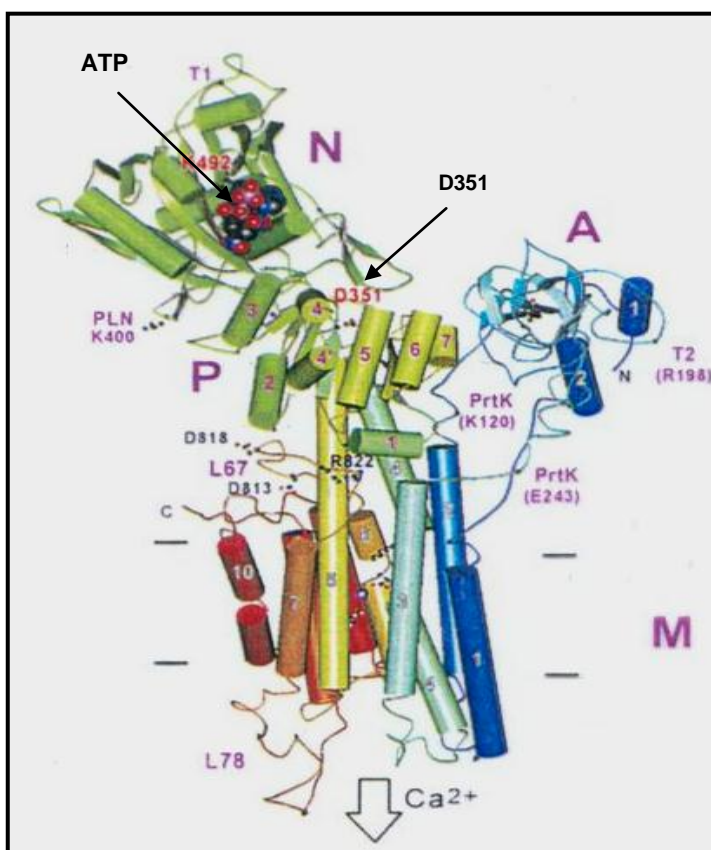


Figura AII.4 – Arquitectura da Ca^{2+} - ATPase de RS com cálcio ligado. As hélices α estão representadas por cilindros e as folhas β por setas. Os 3 domínios citoplasmáticos estão representados pelas letras A, N e P; a letra M representa a membrana e as hélices transmembranares estão marcadas ($M_1 - M_{10}$). O resíduo que sofre fosforilação, o aspartato 351, está representado como D351 (adaptado de Toyoshima *et al.*, 2000).

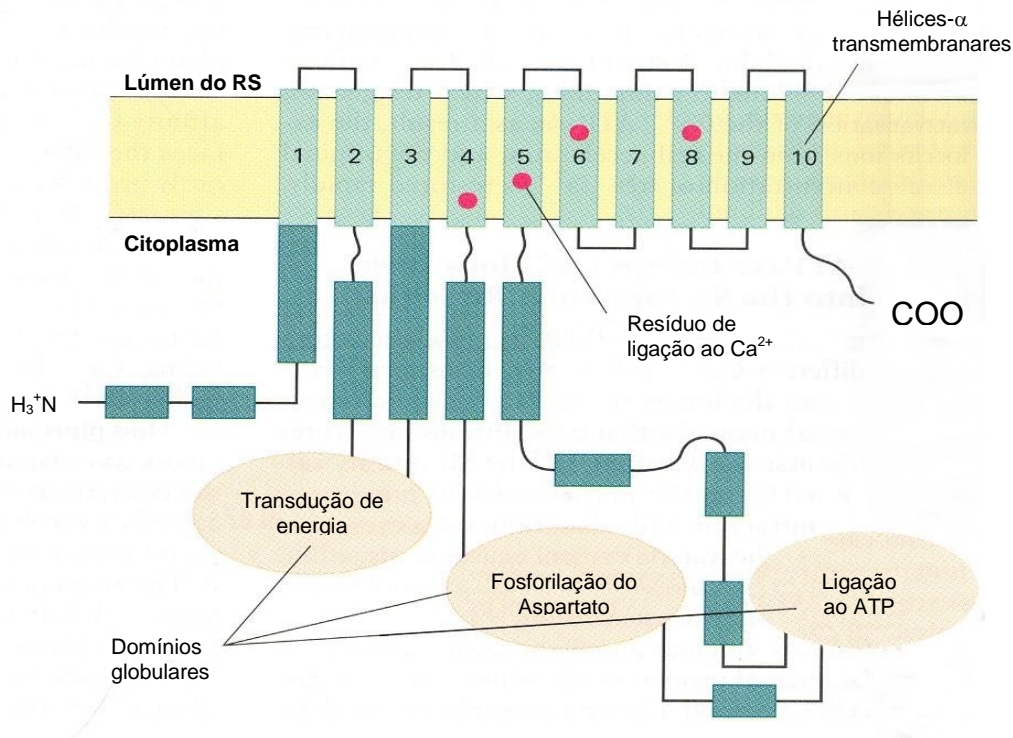


Figura AII.5 – Modelo estrutural esquematizado da subunidade catalítica α da Ca^{2+} -ATPase. As 10 hélices transmembranares formam um canal através do qual os íons Ca^{2+} se movimentam. Estudos de mutagênese identificaram 4 resíduos (pontos vermelhos) nas hélices transmembranares que participam na ligação ao Ca^{2+} (adaptado Lodish *et al.*, 2000).

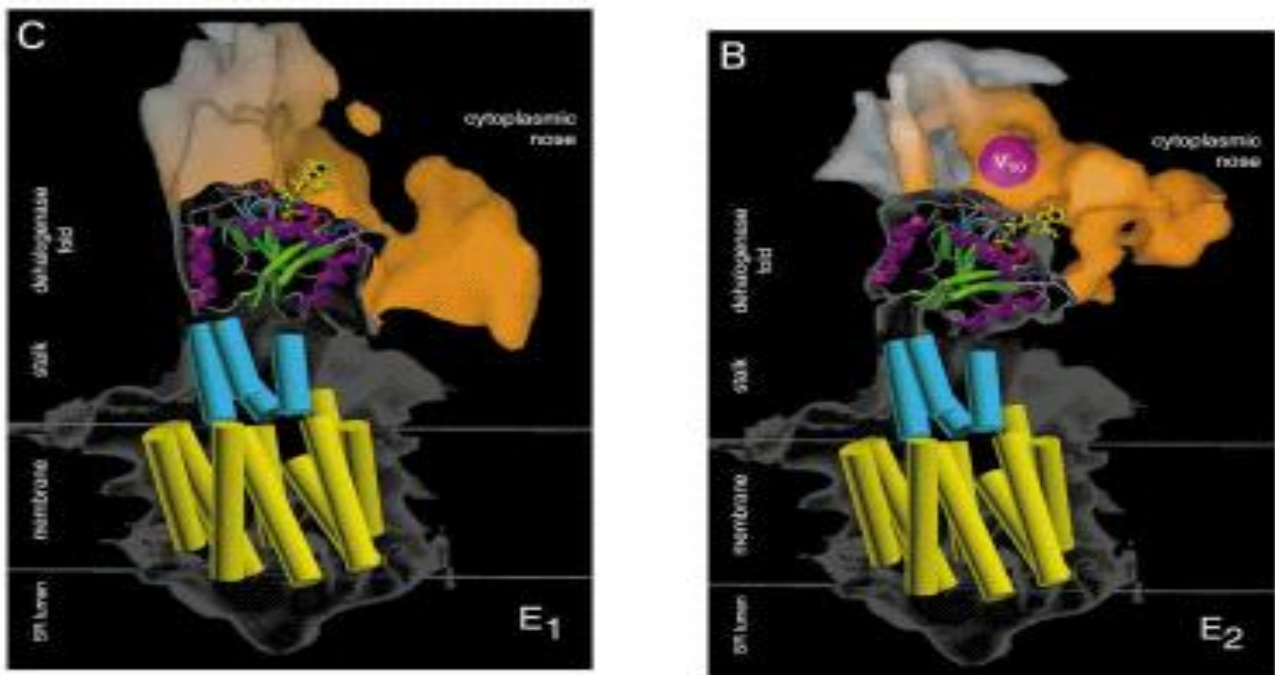


Figura AII.6 – Modelo da arquitetura conformacional da Ca^{2+} -ATPase. À direita (B), interpretação da estrutura a 8 Å da Ca^{2+} -ATPase de cristais tubulares, que se pensa estar na conformação E_2 . As hélices transmembranares são mostradas a amarelo; as hélices do *stalk* a azul; o local putativo do agente de cristalização, decavanadato (V_{10}), é mostrado a púrpura. À esquerda (C), estrutura hipotética para a conformação E_1 , híbrida dos domínios citoplasmáticos da H^+ -ATPase, que se pensa estarem na conformação E_1 ; as zonas transmembranares são mostradas como em B) (*in* Stokes & Wagenknecht, 2000).

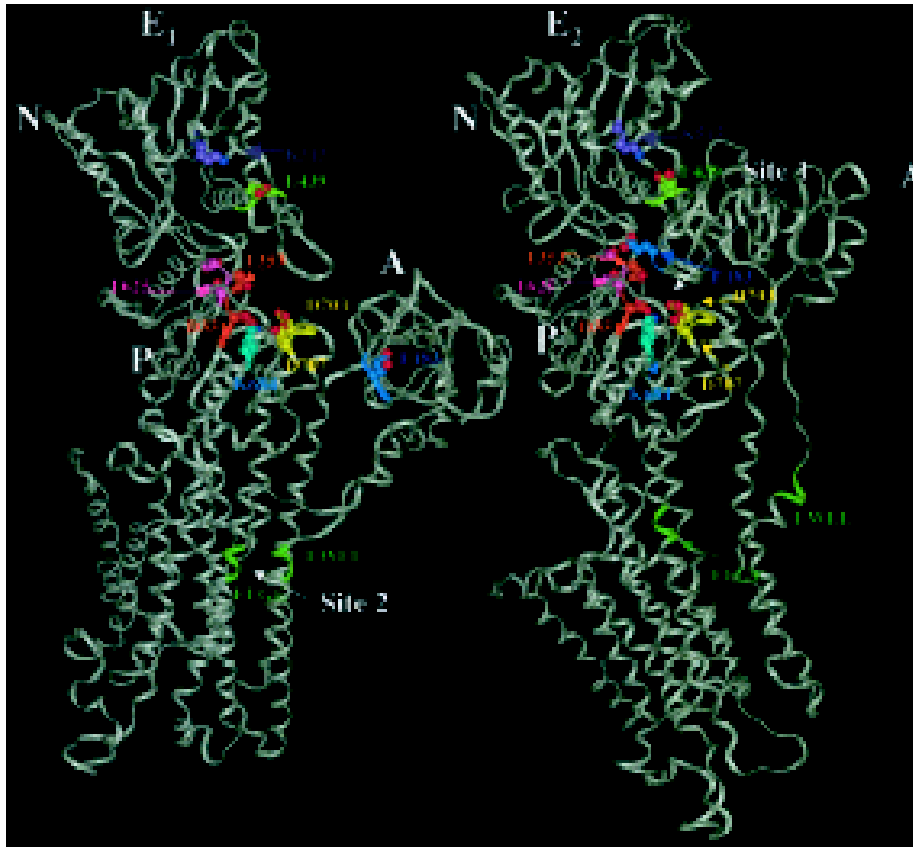


Figura AII. 7 – Estrutura da Ca^{2+} -ATPase na conformação E_1 (esquerda), delineada a partir de padrões de clivagem selectiva, e um modelo teórico do conformero E_2 (direita), deduzido por aproximação dos domínios N, P e A mediante rearranjos das hélices transmembranares de E_1 (in Shin *et al.*, 2001).

5. Interconversão Energética na Ca^{2+} -ATPase do RS

A Bomba de Cálcio do Retículo Sarcoplasmático do músculo esquelético é capaz de interconverter diferentes formas de energia. Efectivamente, esta *Ion-Motive* P-ATPase transforma (transduz) a **energia química** primariamente contida no ATP em **energia mecânica** (trabalho), ao translocar e acumular os iões Ca^{2+} no lúmen do retículo. Após a acumulação dos catiões, forma-se um **gradiente de Ca^{2+}** ao longo da membrana do RS que promove o revertimento do ciclo catalítico da enzima, conduzindo à síntese de ATP a partir de ADP e P_i (energia química). Neste processo, a **energia osmótica** (energia entrópica) derivada do gradiente é novamente transformada em **energia química** (de Meis, 1989; de Meis *et al.*, 1997; de Meis, 2000).

5.1. Uso da Energia Entrópica: ciclo reverso e síntese de ATP

Colocando-se vesículas de RS intactas, e previamente saturadas com Ca^{2+} , num meio desprovido de Ca^{2+} que, por outro lado, contém Mg^{2+} , ADP e P_i , é possível observar o invertimento da direcção do ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase. A ausência de Ca^{2+} no meio externo é um pré-requisito absoluto para a fosforilação da enzi-

ma pelo Pi, tal como a presença do catião nos sítios de transporte de alta afinidade o é para a fosforilação pelo ATP. Por outro lado, sabe-se que pHs ácidos favorecem a protonação da ATPase, associada à fosforilação pelo Pi, e que os pHs alcalinos favorecem a ligação do Ca^{2+} e, conseqüentemente, a fosforilação pelo ATP; assumindo a hipótese de que a bomba de cálcio ejecta prótons, por constituir um sistema de antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, a troca de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ nos locais de transporte pode ser considerada responsável pela reactividade química, isto é, determina a fosforilabilidade ou pelo ATP ou pelo Pi (Mintz & Guillain, 1997).

O ciclo reverso da bomba de cálcio observado em vesículas de RS pode ser descrito sucintamente como se segue. Num primeiro passo, a ATPase deprivada de Ca^{2+} (E_2) é fosforilada espontaneamente pelo Pi, na presença de Mg^{2+} e ausência de Ca^{2+} exteriores. Se também não se tiver Ca^{2+} lumenal (isto é, se as vesículas estiverem vazias) o intermediário fosfoenzimático que se forma, $\text{E}_2\text{-P}$, é estável; contudo, quando se enchem as vesículas com Ca^{2+} , a formação de $\text{E}_2\text{-P}$ é seguida pela ligação do Ca^{2+} lumenal, originando-se $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$; a alteração conformacional é impulsionada pela ligação do Ca^{2+} lumenal nos seus locais de baixa afinidade em $\text{E}_2\text{-P}$ (de notar que, aqui, uma espécie de baixa energia, $\text{E}_2\text{-P}$, é transformada numa mais energética, $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$). Devido à acumulação lumenal de Ca^{2+} , a fosfoenzima $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$ é estável, mesmo havendo ADP no meio. Posteriormente, o fosfato covalentemente ligado no resíduo Asp351 é transferido para o ADP (entretanto ligado a $\text{Ca}_2\text{E}_1\text{-P}$, que é ADP sensível), originando-se ATP. Segue-se a clivagem do ATP (desfosforilação) ao mesmo tempo que o Ca^{2+} é libertado no meio exterior, deixando a enzima livre e na conformação E_2 . A síntese de ATP durante o ciclo reverso da Ca^{2+} -ATPase está pois acoplada ao efluxo de cálcio e prossegue em novos ciclos (uma molécula de ATP é sintetizada mediante o efluxo de dois iões cálcio), até que não haja Ca^{2+} suficiente no lúmen das vesículas e quantidades bastantes de ADP e Pi no meio externo (de Meis, 1993; Mintz & Guillain, 1997).

Num sistema fechado, a entropia tende a aumentar à medida que o sistema flui para o estado inicial, na direcção do equilíbrio. No caso de um gradiente osmótico, a entropia aumenta à medida que a concentração dos solutos é equalizada nos dois compartimentos; para que a entropia decresça, o gradiente tem de ser restaurado e, para isso, tem de se fornecer energia ao sistema. As ATPases translocadoras operam segundo este princípio, recorrendo à energia química derivada do ATP para acumular iões e formar, assim, gradientes osmóticos; no processo reverso, o aumento da entropia está associado à dissipação do gradiente e é usado para sintetizar ATP em solução. Deste modo, o gradiente de Ca^{2+} que se gera na bomba do RS vai reverter o ciclo de reacção e, à medida que se dissipa, fornecer energia entrópica/osmótica para a síntese de ATP. Daí que exista um efluxo de iões Ca^{2+} acoplado à formação do nucleótido (de Meis, 1993; 1997; 2000).

Todavia, o gradiente osmótico de Ca^{2+} não é mandatório ou imprescindível, como se pode inferir pelo facto de a Ca^{2+} -ATPase embebida em vesículas “furadas” (*leaky vesicles*) poder sintetizar ATP; tais vesículas não conseguem formar o gradiente de Ca^{2+} , dado que a $[\text{Ca}^{2+}]$ nos dois lados da membrana é igual. Nestas vesículas, contudo, tanto os locais lumenais como os citoplasmáticos competem simultaneamente pela ligação do Ca^{2+} , pelo que foi sugerido que a ligação aos locais citoplasmáticos propõe o ciclo na direcção da desfosforilação de $\text{E}_2\text{-P}$, enquanto que a ligação aos locais lumenais conduz à síntese de ATP. O ATP é sintetizado, mesmo na ausência do gradiente, porque a ligação do Ca^{2+} lumenal é mais rápida do que a desfosforilação de $\text{E}_2\text{-P}$ e por o

ADP se poder ligar quase instantaneamente a $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$. Esta explicação parece válida quando aplicada ao sistema experimental formado por vesículas furadas mas não levam em conta o facto de a Ca^{2+} -ATPase fisiológica formar um gradiente de Ca^{2+} ; o ATP pode não derivar apenas dessa energia osmótica, mas a verdade é que ela lá está. Teria de existir um mecanismo que regulasse a quantidade de ATP sintetizado por uma e por outra via. Para além disso, não parece provável que, nestas condições, o Ca^{2+} tenha acesso simultâneo aos locais de ambos os lados do retículo, dado que a bomba controla os acessos de entrada e de saída de modo a que nunca se abram ao mesmo tempo, seja no ciclo reverso, seja no processo directo. A competição pelos locais não seria significativa (de Meis, 2000).

Por outro lado, é sabido que a energia de hidrólise do ATP varia consoante a concentração de ca-tiões divalentes, o pH, ω_a (actividade da água) e a temperatura do meio externo; todos estes parâmetros alteram a contribuição da energia entrópica ($T\Delta S^\circ$) na reacção. Quando extrapolados para o ciclo reverso da Ca^{2+} -ATPase, tais dados indicam que a bomba é capaz de detectar alterações entrópicas no sistema e usá-las para sintetizar ATP a partir de ADP e Pi. Assim, a enzima pode sintetizar ATP mediante a formação (e dissipação) de gradientes de pH, temperatura, ou até de água, para além de usar os gradientes de Ca^{2+} (de Meis, 1993).

A alteração conformacional que permite a conversão da fosfoenzima $\text{E}_2\text{-P}$ na forma de alta energia ($\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$) é promovida pela ligação de Ca^{2+} a um sítio luminal de baixa afinidade. Ora, a afinidade desse sítio para com o catião varia conforme o pH ou a temperatura do meio. Assim, posto de outro modo, a ATPase pode sintetizar ATP na ausência de um gradiente de Ca^{2+} desde que existam diferentes valores de pH ou temperatura num e noutro lado da membrana: alterando a afinidade da enzima para o Ca^{2+} estes parâmetros inter-ferem com a $[\text{Ca}^{2+}]$ necessária para promover a conversão de $\text{E}_2\text{-P}$ em $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$ (de Meis, 1993; 1997; 2000).

5.2. Fluxos de Energia na Ca^{2+} -ATPase do RS

Durante o revertimento do ciclo catalítico da Bomba de Cálcio, o Ca^{2+} é transportado por esta para fora do retículo, num processo que está acoplado à síntese de ATP; por esta razão, este efluxo de Ca^{2+} diz-se acoplado. Em condições similares às encontradas numa célula viva em repouso, estabelece-se um estado estacionário durante o qual a $[\text{Ca}^{2+}]$ é elevada no lúmen reticular e baixa no sar-coplasma; neste caso, a bomba opera tanto reversa como directamente, clivando e sintetizando ATP continuamente. A síntese e “hidrólise” simultâneas de ATP é referida na literatura como sendo a reacção de troca $\text{ATP} \Leftrightarrow \text{Pi}$. Durante esta troca, apenas uma parte do efluxo de Ca^{2+} está acoplado à produção de ATP; a outra parte escapa-se do RS sem o promover, num processo denominado de efluxo desacoplado de Ca^{2+} . A velocidade dos efluxos acoplado e desacoplado pode ser modificada por compostos como a heparina e o dimetilsulfóxido (de Meis, 1993; 1997; 2000).

Apenas uma parte da energia química libertada na clivagem do ATP é convertida em trabalho (transporte dos Ca^{2+} pela bomba) e, por conseguinte, em energia osmótica. A outra parte é transformada em calor (termogénese), que a célula muscular aproveita no mecanismo de manutenção da temperatura corporal (num processo denominado *nonshivering thermogenesis*, ou “termogénese por arrepio”); o modo como este mecanismo

opera é incerto. Sugeriu-se que o calor derivaria de uma hidrólise extra de ATP, necessária para remover do sarcoplasma o Ca^{2+} que tende a escapar-se do lúmen (efluxo), mantendo-se assim uma $[\text{Ca}^{2+}]$ sarcoplasmática suficientemente baixa. Nesta formulação, contudo, assume-se que a quantidade de calor produzido durante a “hidrólise” de uma molécula de ATP é sempre a mesma, não se modificando mediante a formação do gra-diente de Ca^{2+} , como se a energia libertada pela “hidrólise” do ATP se dividisse em duas partes não-intercon-vertíveis: uma seria transformada em calor e a outra seria usada para o transporte de Ca^{2+} (de Meis, 2000).

É possível observar-se a formação de um gradiente transmembrantar de Ca^{2+} quando se incubam vesículas de RS num meio contendo ATP; isto não acontece em vesículas permeadas (*leaky vesicles*) porque a membrana destas não está intacta. Com o auxílio desses sistemas experimentais, demonstrou-se, recentemente, que é produzido calor durante o efluxo desacoplado de Ca^{2+} e que tanto na presença como na ausência do gradiente a quantidade de ATP hidrolisado é proporcional à quantidade de calor libertado. Porém, é produzido mais calor (por molécula de ATP hidrolisada) na presença do gradiente do que na ausência deste; esta diferença é uma das observações que levaram à sugestão de que a Ca^{2+} ATPase consegue converter uma parte da energia osmótica, derivada do gradiente, em calor e que esta conversão energética está associada ao fluxo desacoplado de Ca^{2+} ; isto para além de converter calor a partir da energia química libertada pelo ATP, como mostra o facto de as vesículas permeadas (que não têm energia osmótica derivada de um gradiente de Ca^{2+}) serem capazes de libertar calor, associado a um efluxo desacoplado de Ca^{2+} (de Meis, 1993; 1997; 2000).

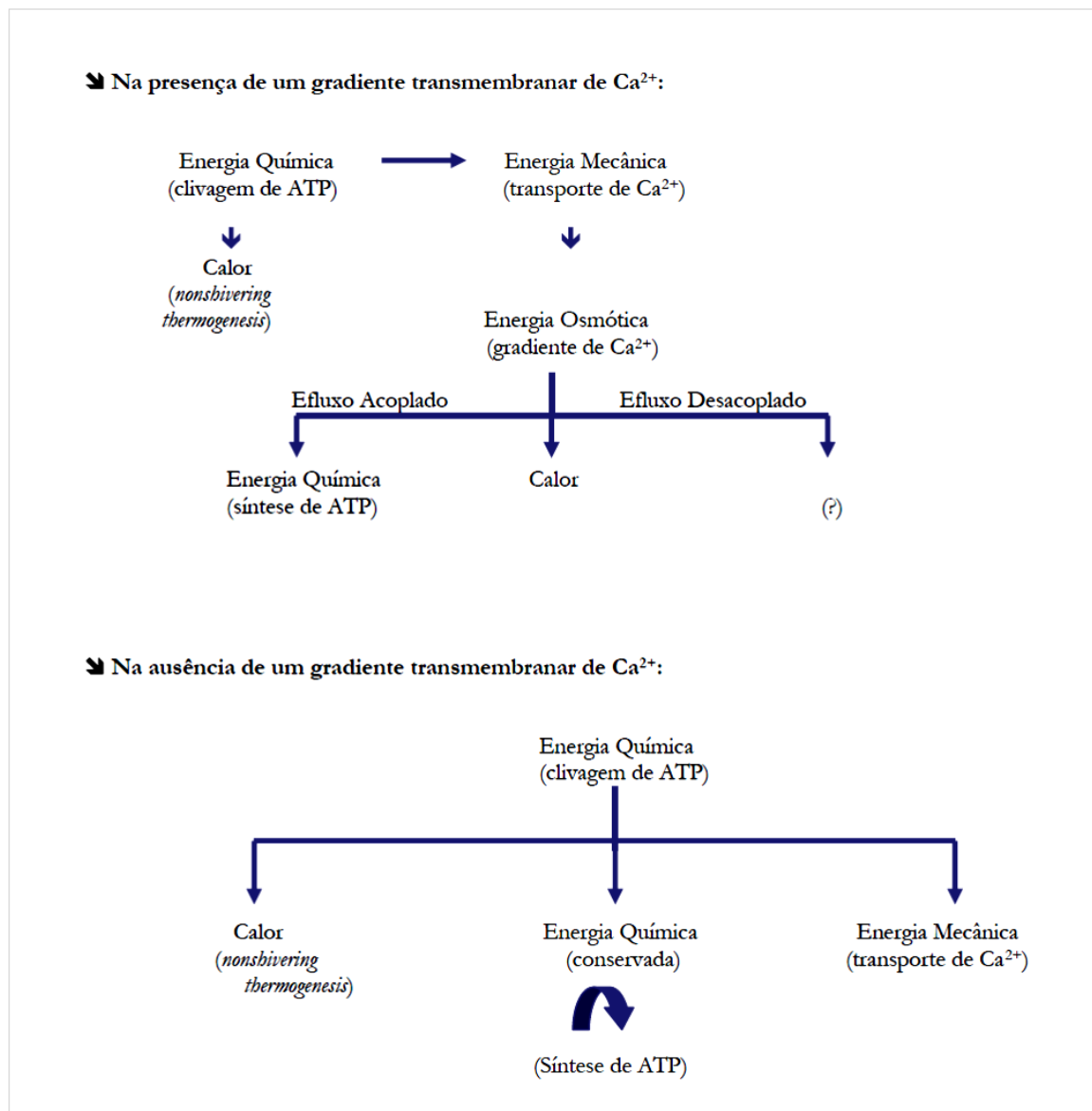
Os efluxos acoplado e desacoplado representam, assim, duas vias distintas de conversão da energia osmótica na Ca^{2+} -ATPase: numa, a energia osmótica derivada do gradiente de Ca^{2+} é usada para sintetizar ATP (mediada pelo efluxo acoplado); na outra, é dissipada para o meio sob a forma de calor (mediada pelo efluxo desacoplado). Assim, como ambos os tipos de efluxos podem ser alterados (por exemplo, com heparina e dimetilsulfóxido), é possível variar também a quantidade de calor libertado durante a hidrólise de ATP. O balanço entre estas duas vias poderia ser determinado pela razão entre as velocidades dos efluxos acoplado e desacoplado na enzima e, portanto, regular a quantidade de energia osmótica que vai servir a síntese de ATP, por um lado, e a formação de calor, por outro. Num extremo (induzido experimentalmente com dimetilsulfóxido) haveria um grau elevado de conservação, onde a maior parte da energia derivada da clivagem do ATP é conservada sobre a forma de energia osmótica (gradiente de Ca^{2+}) e onde praticamente todo o Ca^{2+} que sai do retículo é usado para sintetizar ATP (efluxo acoplado). No outro extremo (heparina), o RS opera como se fosse, por si mesmo, uma fonte de energia calorífica (uma “fornalha”): pouco Ca^{2+} é retido no lúmen (efluxo desacoplado), pelo que a maioria da energia química derivada primariamente do ATP é convertida em calor. No meio termo, a energia osmótica é convertida tanto em energia química (síntese do ATP), mediante o efluxo acoplado de Ca^{2+} , como em calor, mediante o efluxo desacoplado de Ca^{2+} (de Meis, 1993; 1997; 2000).

Não parece provável, contudo, que a energia osmótica possa ser transformada espontaneamente em calor; tem de existir um dispositivo que promova essa conversão. No retículo sarcoplasmático esse dispositivo é, provavelmente, a própria Ca^{2+} -ATPase que, em adição a interconverter energia química em calor e em energia osmótica, pode também converter a energia osmótica em calor. É provável que o processo de termogénese aqui implicado seja semelhante ao calor produzido a partir da energia química do ATP, dado que ambos se associam a

um efluxo desacoplado de Ca^{2+} (de Meis, 2000).

Na ausência de um gradiente verifica-se, por outro lado, que a Ca^{2+} -ATPase é capaz de reter uma parte da energia derivada da clivagem do ATP, mesmo após a dissociação de ADP e P_i ; a energia retida pode ser usada na síntese de uma nova molécula de ATP. Isto parece ser promovido pela ligação do Ca^{2+} a um local de baixa afinidade no lúmen que, por seu turno, tem sido associado ao calor libertado por vesículas *leaky*, que deriva de um efluxo desacoplado de Ca^{2+} . Daqui, alvitrou-se que essa ligação do Ca^{2+} nos locais lumenais poderia regular a fracção de energia que se irá dissipar como calor, sendo isto aproveitado na síntese de novo ATP^+ (Mintz & Guillain, 1997; de Meis, 2000).

Concluindo, pode-se dizer que a Ca^{2+} -ATPase do RS é capaz de regular os seus fluxos de energia, fazendo variar a fracção de energia química, derivada da clivagem do ATP, que vai ser dissipada sob a forma de calor. Isto é observado tanto na presença como na ausência de um gradiente transmembranar. Assim, e de acordo com de Meis, sugerem-se as seguintes sequências de interconversão energética (de notar que nenhuma das sequências tem em conta a participação de gradientes de pH, de temperatura ou de água) (de Meis, 2000, 1997):



6. Transdução de Energia na Ca^{2+} -ATPase do RS

O grupo aspartil-fosfato que se forma na reacção de transferência do grupo fosforilo do ATP para o resíduo Asp 351 do sítio de fosforilação da Ca^{2+} -ATPase tem a mesma energia livre de hidrólise que o ATP, sugerindo que a energia química contida no ATP foi transferida para a ligação aspartil-fosfato. Por outro lado, há que atender ao facto de a energia livre se tornar disponível para o transporte dos cationes antes da clivagem hidrolítica da fosfoenzima. Com efeito, tanto a transferência do γ -fosforilo como a desfosforilação possuem K_{eq} próximas de 1, o que indica que essas reacções não são acompanhadas por uma variação significativa de energia; portanto, o passo associado ao uso da energia não pode ser nem a clivagem do ATP (fosforilação), nem a hidrólise da ligação aspartil-fosfato da fosfoenzima (desfosforilação). Resta uma hipótese, bastante plausível: o passo que medeia estas duas reacções, ou seja, a conversão $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{-P}$ (de Meis, 1989; Inesi *et al*, 1992).

Efectivamente, é durante a alteração conformacional $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{-P}$ que o Ca^{2+} é vectorialmente transportado. Parece lógico, então, que a transdução da enzima esteja associada às modificações conformacionais extensas que ocorrem. Sabe-se que, durante esta conversão, há uma queda drástica na afinidade da enzima para com o Ca^{2+} ; assim, a energia livre, inicialmente contida no ATP e subsequentemente transferida para a ligação aspartil-fosfato da ATPase, manifesta-se nessa redução de afinidade, ou seja, numa diminuição da energia de ligação entre a enzima e o Ca^{2+} . Entendendo a transdução da energia como a transferência da energia livre do ATP para o catione em questão, facilmente se compreende um mecanismo transdutor baseado na relação entre as afinidades e as energias de ligação: para sequestrar Ca^{2+} numa zona onde a concentração deste é relativamente baixa (sarcoplasma), a afinidade da ATPase para o catione tem de ser suficientemente elevada e, por conseguinte, o ΔG° (fisiológico) para essa ligação deverá ser muito negativo (para o processo ser termodinamicamente favorável). Conversamente, para que os iões Ca^{2+} possam ser libertados numa região de concentração elevada (lúmen do RS), a afinidade da enzima para este tem de ser consideravelmente reduzida; o ΔG° da ligação do Ca^{2+} terá de ser tornado menos negativo. Posto de outro modo, a energia é necessária para reduzir a afinidade da ATPase para com o Ca^{2+} e deve derivar, portanto, das interacções entre a bomba, o ATP e o aspartil-fosfato (Inesi *et al*, 1989).

O aspartil-fosfato que se forma durante o *turnover* catalítico possui dois níveis diferentes de reactividade: $\text{E}\sim\text{P}$ e $\text{E}\text{-P}$. $\text{E}\sim\text{P}$ é um intermediário termodinamicamente instável, com uma ΔG° de hidrólise elevada e capaz, portanto, de transferir o seu fosfato de volta ao ADP, num processo reverso, sintetizando ATP. A forma $\text{E}\text{-P}$, contudo, é estável, possuindo um baixo potencial de transferência de grupos fosforilo e que pode formar-se espontaneamente a partir de E e P_i (em solução). As denotações “ \sim ” e “-” referem-se a uma ligação com alto e baixo potencial de transferência de grupos fosforilo, respectivamente (de Meis, 1989 e 1993). Na Ca^{2+} -ATPase, $\text{E}\sim\text{P}$ e $\text{E}\text{-P}$ correspondem aos intermediários fosfoenzimáticos $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$ e $\text{E}_2\text{-P}$. Isto é corroborado por estudos de sensibilidade que indicam o facto de o intermediário $\text{E}\sim\text{P}$ ser estabilizado pela presença de iões Ca^{2+} ; no ciclo catalítico, estes induzem a adopção da forma E_1 . Portanto, $\text{E}\sim\text{P}$ corresponde à forma E_1 o que, por seu turno,

está associado a $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$. A forma $\text{E}_2\text{-P}$ não revelou afinidade significativa para o Ca^{2+} ; corresponde então a $\text{E}_2\text{-P}$ (Stokes *et al*, 1998).

Entre as duas formas da fosfoenzima, $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$ e $\text{E}_2\text{-P}$, apenas $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$ possui uma energia livre de hidrólise elevada, não se observando um grande êxodo de energia quando a ligação aspartil-fosfato de $\text{E}_2\text{-P}$ é clivada pela água. Tal assumption foi deduzida também mediante a descoberta de que, no processo reverso do ciclo catalítico, a enzima livre E_2 pode ser fosforilada espontaneamente pelo P_i , sem ser necessário fornecer-se energia, o que só pode ser explicado se $\text{E}_2\text{-P}$ for um composto com baixo potencial de transferência de grupos fosforilo. É interessante notar que se uma $[\text{Ca}^{2+}]$ elevada for adicionada (mais que 1 mM) ao meio, a fosfoenzima das vesículas permeadas usadas nestes estudos (estas *leaky vesicles* não conseguem formar o gradiente de Ca^{2+} que se pensa conduzir a síntese de ATP no processo reverso) é convertida de uma forma ADP-insensível numa ADP-sensível; esta conversão é promovida pela ligação do Ca^{2+} à enzima. Assim, à luz do que já foi dito, o transporte e dissociação do cálcio estão associados à conversão contrária $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{-P}$; isto também é consistente com as evidências de que a ligação do Ca^{2+} activa a enzima, induzindo perturbações conformacionais que lhe permitem ser fosforilada e, subsequentemente, passar para uma forma de menor energia que lhe permita translocar e dissociar o ião (de Meis, 1989 e 1993; Stokes *et al*, 1998).

Portanto, durante as alterações conformacionais que correspondem ao passo de trans-locação do Ca^{2+} ocorre, em simultâneo com o decréscimo de afinidade da enzima para o catião (energia de ligação), uma redução significativa na K_{eq} da hidrólise da fosfoenzima e, consequentemente, na sua energia livre (energia química) (de Meis, 1989 e 1993). Deve notar-se o facto de as estruturas covalentes nas ligações aspartil-fosfato de $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$ e $\text{E}_2\text{-P}$ serem similares. Então, a estabilização e consequente diminuição da energia livre na ligação acil-fosfato de $\text{E}_2\text{-P}$ irá dever-se ao aumento das interacções não-covalentes do fosfato com a proteína, que reforçam a ligação entre ambos. Por outras palavras, a energia química contida na ligação aspartil-fosfato em $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$ é libertada para essas interacções em $\text{E}_2\text{-P}$ (e o nível de energia desta ligação diminui), quando a Ca^{2+} -ATPase passa de $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P}$ para $\text{E}_2\text{-P}$. Esta energia libertada vai assim como que substituir a energia de ligação que teve de ser perdida na diminuição da afinidade da bomba para o Ca^{2+} , ou seja, “foi usada” para reduzir essa afinidade (através da conversão da energia química em energia de ligação, não directamente). Ao mesmo tempo, dá-se a mudança conformacional $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{-P}$ que fornece os requisitos estruturais para que a enzima possa transduzir a energia inicialmente contida no ATP no transporte e libertação do Ca^{2+} no lúmen do RS (de Meis, 1989 e 1993; Mintz & Guillain, 1997). Há ainda um facto notório a apontar: o envolvimento do domínio associado à transdução de energia nas extensas transformações que ocorrem durante essa transição (Andersen, 1989). Isto só reforça o que tem vindo a ser afirmado: a conversão $\text{Ca}_2\text{E}_1\sim\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{-P}$ corresponde ao passo de transdução energética nos ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase. A alteração $\text{E}_1 \rightarrow \text{E}_2$ pode ser, à luz desta perspectiva, resultado da diminuição dessa afinidade; se o Ca^{2+} promove modificações estruturais significativas, tanto ao ligar-se como ao dissociar-se (onde as primeiras são revertidas), então o fenómeno conformacional que acompanha a redução da energia de ligação é um resultado estrutural directo dessa necessidade (Barth *et al*, 1997; Jencks, 1989; Stokes *et al*, 1998).

ANEXO III

MINERAIS DE VANÁDIO (EXEMPLOS)

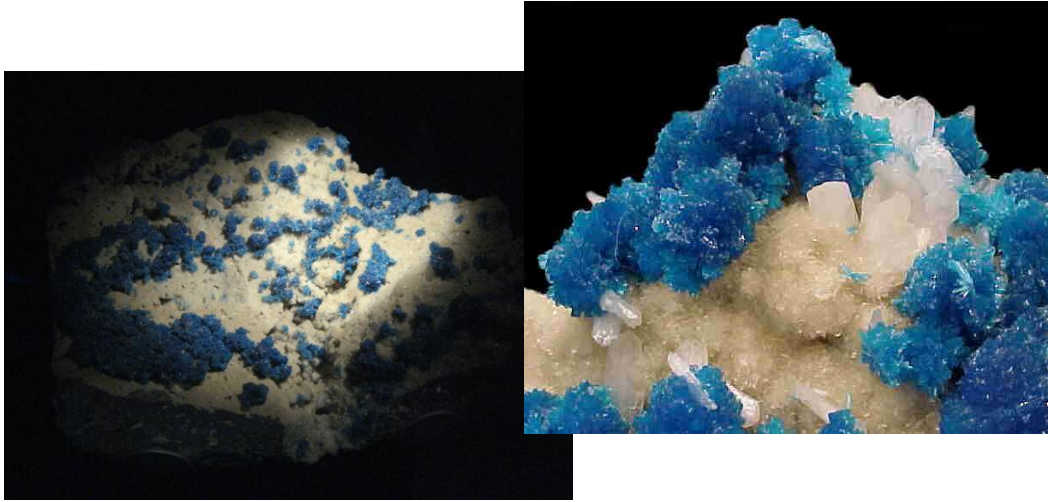


Figura III.1 – Cristais de Cavansite. Um dos maiores exemplares conhecidos de cristais de Cavansite está exposto no Museu de História Natural de Londres. A Cavansite é um mineral de vanádio, azul e muito raro (encontrado, apenas, no Oregon –EUA – e em Waghhol – Índia), cujo nome deriva da sua composição química: trata-se de um silicato de cálcio e vanádio, hidratado (fórmula química: $\text{Ca}(\text{VO})\text{Si}_4\text{O}_{10} \cdot 4 (\text{H}_2\text{O})$). Ocorre como mineral com o basalto, bem como com uma grande variedade de minerais zeolíticos. Devido à sua cor e relativa raridade, a Cavansite é um mineral de colecionador bastante procurado, mais do que como fonte de vanádio.



Figura III.2 – Cristais de Carnotite. A Carnotite é um mineral de vanadato de potássio e urânio, com a fórmula química $\text{K}_2(\text{UO}_2)_2(\text{VO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; o conteúdo em água pode variar e, na maioria das vezes, associa-se a pequenas quantidades de cálcio, bário, magnésio, ferro e sódio. De um amarelo brilhante e, por vezes, esverdeado, este mineral de vanádio ocorre tipicamente nas rochas areníticas sedimentares, como uma crosta ou como flocos, em climas áridos (EUA, Zaire, Marrocos, Austrália, Casaquistão). A carnotite é uma fonte importante de urânio e, por isso mesmo, radioativa. Existem espécies minerais relacionadas, como a margaritasite ($(\text{Cs}, \text{K}, \text{H}_3\text{O})_2(\text{UO}_2)(\text{VO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e a tiuamunite ($\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{VO}_4)_2 \cdot 5-8 \text{H}_2\text{O}$).

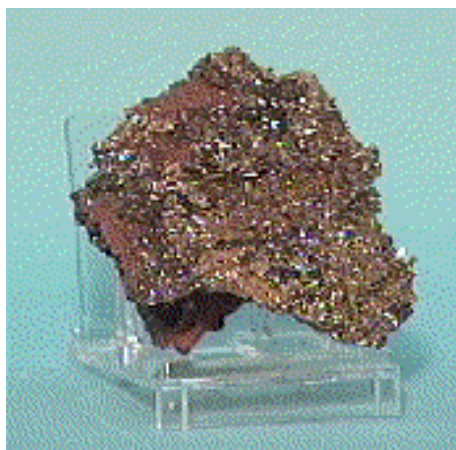


Figura III.3 – Cristais de Vanadinite. A Vanadinite é um mineral anisotrópico de cloro-vanadato de chumbo, que pertence ao grupo apatite dos fosfatos, com a fórmula química $Pb_5(VO_4)_3Cl$. Trata-se de um mineral denso e quebradiço muito pouco comum, dado que se forma pela oxidação do chumbo em depósitos como os de galena. Encontrado, geralmente, sob a forma de cristais hexagonais, que reflectem a sua simetria hexagonal interna, este mineral pode formar diferentes séries químicas com a piromorfite ($Pb_5(PO_4)_3Cl$) ou a mimetite ($Pb_5(AsO_4)_3Cl$). A Vanadinite tem uma coloração vermelha ou alaranjada, podendo ainda ser vermelho-acastanhada, verde, amarela ou incolor, podendo ser transparente, translúcida ou opaca e resinosa ou adamantina; estas propriedades distintivas tornam o mineral num dos mais procurados pelos colecionadores. Juntamente com a carnotite e a roscoelite, a Vanadite é uma das maiores procedências industriais do elemento vanádio, e uma fonte menor de chumbo. O mineral é, adicionalmente, encontrado um pouco por todo o mundo, em depósitos mineiros na Àustria, Espanha, Escócia, Àfrica do Sul, Namíbia, Marrocos, Argentina e EUA.

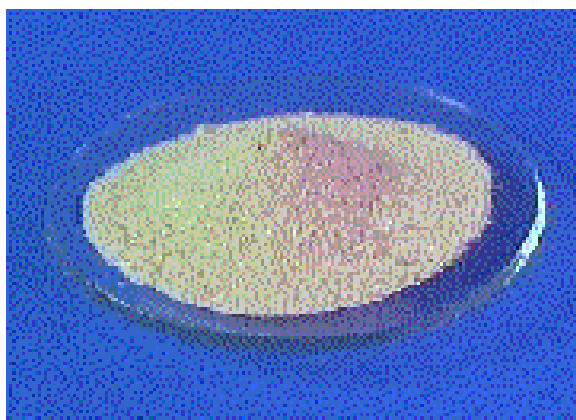


Figura III.4 – Sal cristalino de vanadato: Metavanadato de amónio. O metavanadato de amónio é um dos sais mais utilizados em investigação, como fonte do ião vanadato.

ANEXO IV

PROPRIEDADES GERAIS DE VANÁDIO

Tabela IV.1 – Algumas **propriedades** atômicas, físico-químicas, espectroscópicas e bioinorgânicas do elemento **vanádio** (adaptado de Greenwood & Earnshaw, 1997; Chang, 1994; Bertini, 1994).

Propriedade	
Nº atômico e Massa atômica relativa	23 e 50,9415 (resp.)
Configuração eletrônica	[Ar] 3d ³ 4s ²
Tipo de elemento	Metal de transição (bloco d, grupo VB)
Estado à T ambiente	Sólido
Estrutura cristalina	Cúbica (estrutura bcc)
Descrição física do elemento	Metal brilhante, acinzentado-prateado. Macio e dúctil quando puro (o que é raro).
Estados de oxidação	-1, 0, +2, +3, +4, +5
Electronegatividade (Pauling)	1,83
Raio atômico (pm)	172
Raio covalente (pm)	116
Raio iônico (pm)	V(V): 54; V(IV): 58; V(III): 64; V(II): 62; V(I): 79
Densidade (18°C; g/cm ³)	6,11
Ponto de ebulição ΔH _{vap} (Kj/mol)	3350 e 459,7 (resp.)
Ponto de fusão (°C) e ΔH _{fus} (Kj/mol)	1915 e 17,5 (resp.)
ΔH _f (gás monoatômico; Kj/mol)	510 8 (+/-29)
Resistividade eléctrica (20°C; μohmcm)	25
Solubilidade do elemento (Temp. ambiente)	Insolúvel: água, ácidos hidrolórico e sulfúrico, alcalis. Solúvel: ácidos hidroluórico e nítrico.
Propriedades ácido-base	Anfotérico
Classe Geoquímica	Litófilo
Composição isotópica	
<ul style="list-style-type: none"> • Nº de isótopos naturais • Nº de massa • % abundância 	2
	50 51
	0,250 99,750
Fontes principais	Carnotite, Vanadinite, Patronite, Roscoelite (minerais), óleo crude (origem fóssil), fósseis carbonáceos, meteoritos. Na dieta alimentar: cogumelos, pimenta preta, beterraba, cereais, , leite.
Bioacumulação	Tunicados (tunicromos em vanadócitos), cogumelos (amavadina), algas vermelhas e castanhas (Br e I-peroxidases), azotobactérias (F, V e S “clusters”).

Tabela IV.2- Isótopos de vanádio e tempos de meia vida correspondentes (*in* Chasteen, 1983).

Isótopos	Tempo de meia-vida
^{48}V	15,98 dias
^{49}V	337,0 dias
^{50}V	1,4E17 anos
^{51}V	Estável
^{52}V	3,76 minutos

Tabela IV.3. – Estados de oxidação e estereoquímica (geometria) de compostos de Vanádio (*in* Greenwood & Earnshaw, 1997).

Estado de Oxidação	Nº de Coordenação	Geometria	Exemplo
- 3 (d^8)	5	Octaédrica	$[\text{V}(\text{CO})_5]^{3-}$
- 1 (d^5)	6	Octaédrica	$[\text{V}(\text{CO})_6]^-$
0 (d^5)	6	Octaédrica	$\text{V}(\text{CO})_6$
+ 1 (d^4)	6	Octaédrica	$[\text{V}(\text{bipy})_3]^+$
+ 2 (d^3)	6	Octaédrica	$[\text{V}(\text{CN})_6]^{4+}$
	6	Prisma Trigonal	VS
+ 3 (d^2)	3	Planar	$\text{V}\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}_3$
	4	Tetraédrica	$[\text{VCl}_4]^-$
	5	Bipirâmide Trigonal	$\text{VOCl}_3(\text{NMe}_3)_2$
	6	Octaédrica	$[\text{V}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$
+ 4 (d^1)	4	Tetraédrica	VCl_4
	5	Bipirâmide Trigonal	$\text{VOCl}_2(\text{NMe}_3)_2$
	5	Quadrado Piramidal	$\text{VO}(\text{acac})_2$
	6	Octaédrica	$\text{VCl}_4(\text{bipy})$
	8	Dodecaédrica	$\text{VCl}_4(\text{diars})_2$
	8	Anti-prisma quadrado	$\text{V}(\text{S}_2\text{CMe})_4$
+ 5 (d^0)	4	Tetraédrica	VOCl_3
	5	Bipirâmide Trigonal	VCl_5
	5	Quadrado Piramidal	$[\text{VOF}_4]^-$
	6	Octaédrica	$[\text{VF}_6]^-$
	7	Bipiramide pentagonal	$\text{VO}(\text{S}_2\text{CNEt}_3)_3$
	8	Dodecaédrica	$[\text{V}(\text{O}_2)_4]^{3-}$

ANEXO V

Vanádio em Sistemas Biológicos: bioacumulação e compostos biogênicos contendo vanádio

Tabela V.1 – Concentração de vanádio em organismos vivos. (Adaptado de Miramand & Fowler, 1998).

Organismo	Concentração de Vanádio (mg/Kg peso fresco)
Fitoplâncton	1,5 – 4,7
Zooplâncton	0,07 – 290
Macroalgas	0,4 – 8,9
Ascídeos	25 – 10000
Anelídeos	0,7 – 786
Outros invertebrados	0,004 – 45,7
Peixes	0,08 – 3
Mamíferos	< 0,01 – 1,04 (peso fresco)

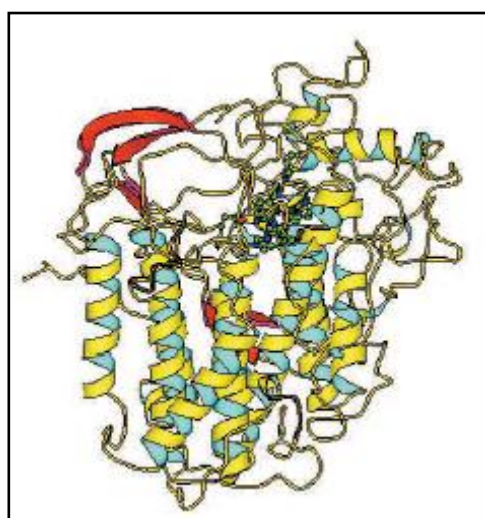


Figura V.1 – Cloroperoxidase dependente de vanádio do fungo *Carvularia Inaequalis*: estrutura determinada por cristalografia de raio-X (Vilter, 1995).

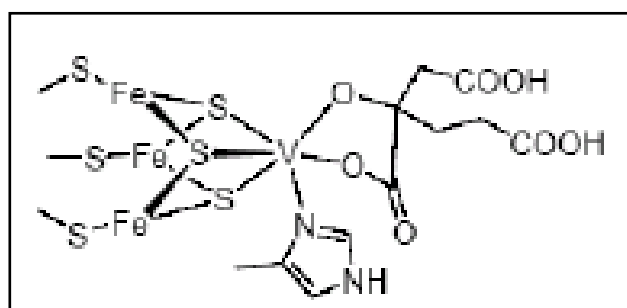


Figura V.2 – Ambiente de vanádio, proposto para as nitrogenases dependentes de vanádio (Robson *et al.*, 1986).

ANEXO VI

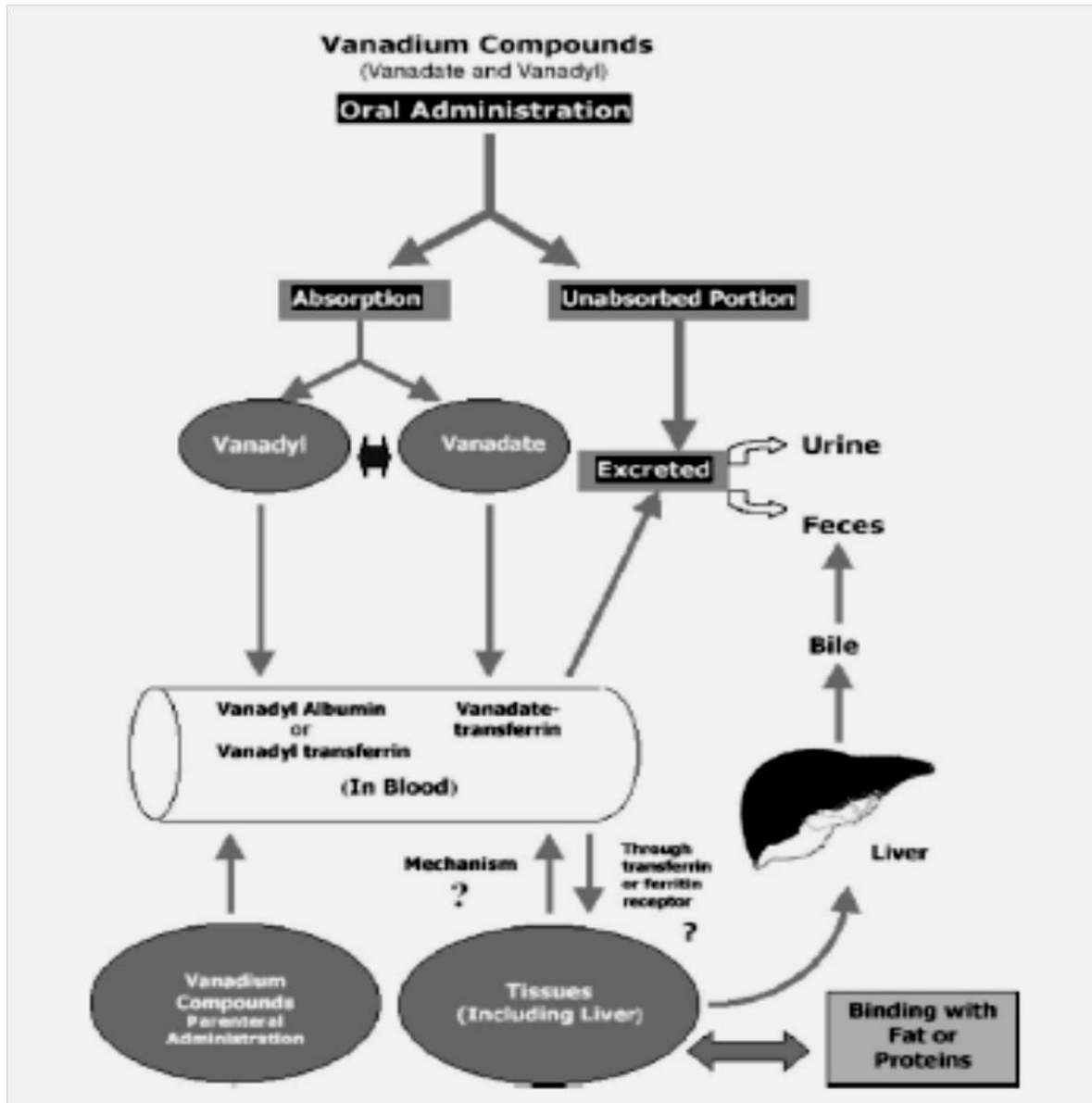


Figura VI.1 – Principais vias de absorção, distribuição e excreção de compostos de vanádio V(IV) e V(V) nos mamíferos superiores, após administração oral (in Mukherjee, *et al.*, 2004).

ANEXO VII

MECANISMO MOLECULAR DE INSULINO-MIMETISMO DE VANÁDIO

Para compreender os mecanismos que envolvem a acção antidiabética de Vanádio, é necessário compreender os principais eventos implicados nas vias de sinalização da insulina. Estas vias podem ser divididas em três níveis fundamentais (Rehder, 2003):

1) ligação da insulina ao seu receptor transmembranar, uma cinase de tirosina (Figura VII.1a); quando a insulina se liga no lado extracelular deste receptor, a tirosina interior é fosforilada;

2) uma complexa cascata de eventos de transdução de sinal é accionada e a entrada de glicose na célula por meio de um transportador é estimulada (Figura VII.1b);

3) modulação de várias moléculas efectoras, como o transportador da glicose, enzimas chave do metabolismo do glicogénio e lípidos e factores de transcrição. A fosforilação do receptor da insulina é contrariada por uma fosfatase de tirosina (PTN) que cataliza a ruptura hidrolítica da ligação fosfoéster e que está totalmente activa na ausência de insulina ou no caso de tolerância à hormona (Figura VII.1c).

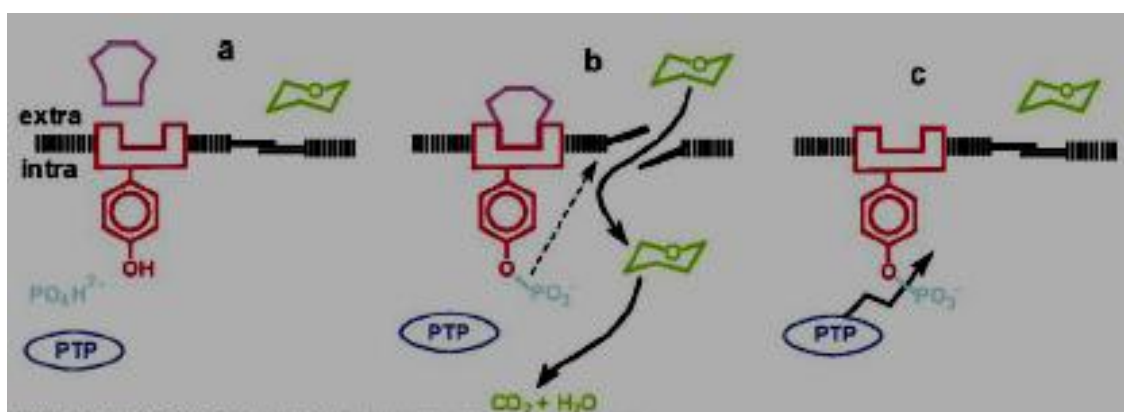


Figura VII.1 – Transdução de Sinal Promovida pela Insulina: o esquema a) ilustra a aproximação da insulina e em b) esquematiza-se a sua ligação ao receptor. Em c) está representada a acção inibitória da PTP (adaptado de Rehder, 2003)

A cascata de eventos que se segue à fosforilação da tirosina do receptor da insulina envolve a activação da proteína IRS-1 (substrato 1 do receptor da insulina) que, por seu turno, induz diversas vias de transdução de sinal, como a via da cinase Ras-MAP (proteína activada mitogenicamente por radicais livres), a da cinase de PI3 (fosfatidil inositol 3) e a da SHPTP2 (fosfatase da fosfotirosina) (Rehder, 2003; Shechter *et al.*, 2003).

Apesar de se ter demonstrado *in vitro* que o vanádio afecta a maioria das vias de transdução da insulina, os mecanismos *in vivo* exactos ainda estão por elucidar completamente; existem várias hipóteses para o mecanismo de acção do vanádio no que diz respeito ao metabolismo da glicose, que a seguir se apresentam.

1. Inibição de Fosfatases da Tirosina

A inibição das fosfatases de tirosina e a estimulação indirecta resultante da fosforilação da tirosina tem sido apontada como o modo principal de promoção de insulino-mimetismo na presença de compostos de vanádio. No caso de compostos de vanadato, apesar de se esperar que o receptor da insulina esteja envolvido, há provas experimentais de que os efeitos insulino-miméticos de vanádio (V) são independentes desse receptor, como por exemplo o facto de a inibição desse receptor não suprimir uma série de efeitos no metabolismo da glicose (Thompson & Orvig, 1995; Thompson & Orvig, 2006).

Tem-se avançado que o Vanádio (IV) pode mostrar algumas propriedades insulino-miméticas mediante a activação de uma cinase de tirosina citosólica que, por seu turno, actuará nas vias de sinalização da insulina. Também há autores que argumentam a existência de um aumento da actividade dos receptores da insulina em condições de sub-saturação insulinémica e na presença de vanadatos, que assim conduziriam a um acréscimo aparente na sensibilidade à insulina e à prolongação dos seus efeitos; assim, o vanadato conseguiria que baixas concentrações de insulina endógena e exógena se tornassem muito mais eficazes (Elberg *et al.*, 1998).

Já no caso de compostos de peroxovanadato têm-se registado evidências de que estes actuam preferencialmente através do receptor da insulina. Isto pode estar relacionado com a capacidade e a especificidade destes compostos como inibidores de fosfatases de tirosina, bem como com uma maior ou menor facilidade de entrada nos tecidos vivos (Tolman *et al.*, 1979).

A hipótese de que a actividade anómala das fosfatases da tirosina é responsável por algumas formas de insulino-resistência características da DMNID e o facto de os compostos de vanádio modularem a actividade destas proteínas, tem sido um dos aspectos principais a ter em conta no desenvolvimento de fármacos de vanádio para o tratamento de certos tipos desta diabetes (Tolman *et al.*, 1979; Ahmad *et al.*, 1995).

2. Estímulo do Transporte de Glicose

Aparte da activação de cinases de tirosina, os compostos de vanádio podem estimular sinais transdutores que por seu turno actuam ao nível do transporte de glicose para a célula (figura VII.2). Pensa-se que o fazem por vias alternativas que requerem a fosforilação de tirosinas e activação subsequente dos receptores PTK (cinases de fosfotirosina); estas vias permanecem ainda por esclarecer, e não envolvem necessariamente o IRS ou o receptor da insulina nem obrigatoriamente a cinase de PI3 (Sakurai & Tsuji, 1998).

Apesar de a activação da cinase de PI3 ser essencial ao transporte de glicose estimulado pela insulina, os compostos de vanádio conseguem estimular esse transporte mesmo havendo supressão da PI3K, o que indica que existem outras vias de activação do transportador de glicose independentes da acção da insulina. Provavelmente estas consistem em transdução mediante cinases de tirosina, onde o vanádio actua (do modo descrito no ponto anterior) (Elberg *et al.*, 1998). Por outro lado, verificou-se que a destruição do citoesqueleto de actina bloqueia o estímulo induzido tanto por compostos de vanádio como por insulina; isto parece evidenciar a existência de um mecanismo de dois passos para o transporte de glicose, um dependente e outro independente da acção directa da insulina, passos estes que convergem entre si (Tolman *et al.*, 1979).

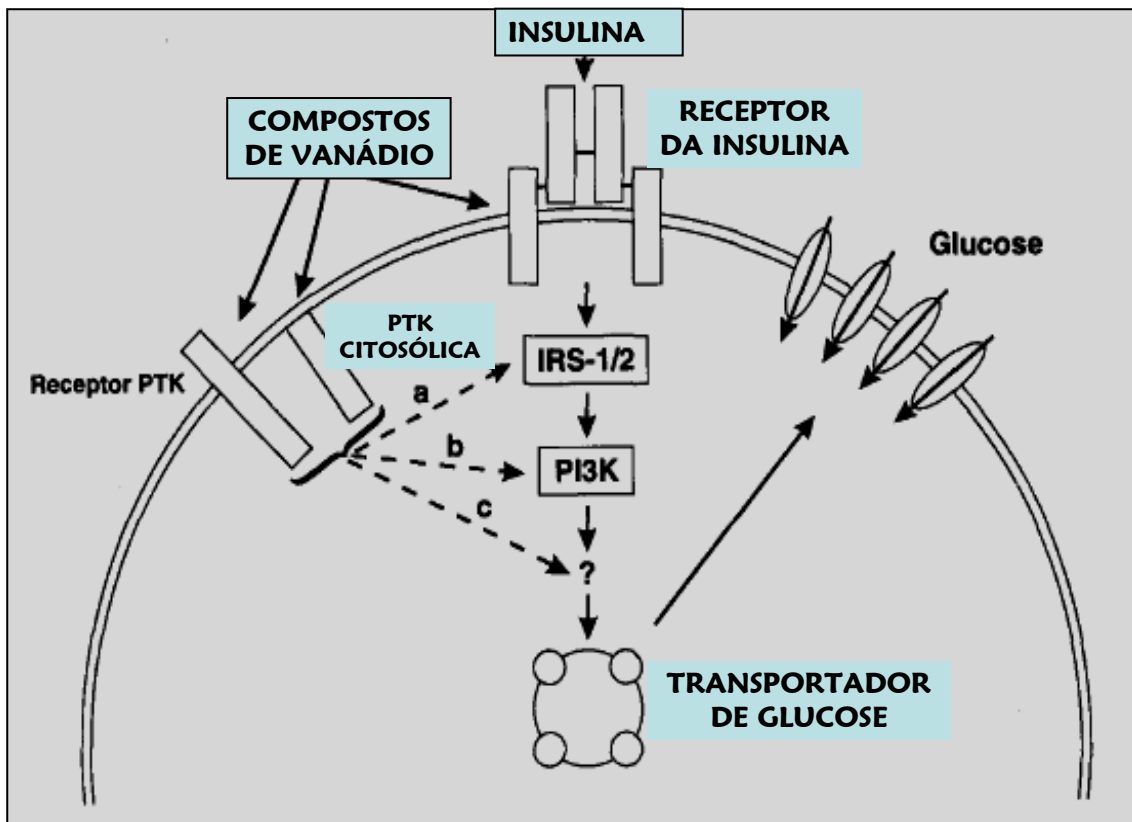


Figura VII.2 – Estímulo do transporte de glicose por compostos de vanádio. A sinalização da insulina para que o transporte de glicose seja facilitado é mediada pela fosforilação do IRS-1 ou 2, com consequente activação da cinase de PI3 (PI3K) (adaptado de Tolman *et al.*, 1979).

ANEXO VIII

NOTAS ADICIONAIS AO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL (Capítulo II)

1. Preparação de mini-géis para SDS-PAGE (Ponto 1.4.2. do Procedimento Experimental)

Tabela VIII.I. Reagentes e volumes utilizados na preparação dos géis de resolução e concentração.

Reagentes	Gel resolução 10% ^(a) Volume (µL)	Gel concentração 4% ^(b) Volume (µL)
Acrilamida 30%	1670	400
Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1250	-
Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	750
SDS 10%	50	30
H ₂ O mQ	2030	1830
Volume final	5000	3000
+ PSA 10%	25	15
+ TEMED	3,33	5

^(a) - **Gel de resolução 10%**: 1,67 ml de acrilamida 30%, 1,25 ml de tampão de resolução contendo Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (4x concentrado), 50 µL de SDS 10% e 2,03 ml de água mili-Q. Iniciou-se a polimerização com 25 µL de PSA 10% e induziu-se a catálise com 3,33 µL de TEMED. Deixou-se polimerizar durante cerca de 30 minutos no sistema de vidros do aparelho de electroforese.

^(b) - **Gel de concentração 4%**: 400 µL de acrilamida 30%, 750 µL de tampão de concentração contendo Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (4 x concentrado), 30 µL de SDS 10% e 1,83 ml de água mili-Q. Após polimerização do gel de separação, adicionou-se 15 µL de PSA 10% e 5 µL de TEMED e introduziu-se sobre o gel de separação, deixando-se polimerizar durante cerca de 30 minutos.

2. Marcadores HMW e LMW utilizados (Ponto 1.4.2. do Procedimento Experimental)

Tabela VIII.I - Constituintes dos marcadores (proteínas padrão), e respectivas massas moleculares, utilizados na electroforese para determinação, por regressão linear, da curva de calibração.

Marcadores Moleculares (Kit Sigma)			
HMW ^(a)	kDa	LMW ^(a)	kDa
Miosina	205	Albumina	66
B-galactosidase	116	Ovalbumina	45
Fosforilase b	97	Gliceraldeído 3-P desidrogenase	36
Frutose 6-P cinase	84	Anidrase carbónica	29
Albumina	66	Tripsinogénio	24
Desidrogenase glutâmica	55	Inibidor tripsina	20
Ovalbumina	45	α -lactalbumina	14,2
Gliceraldeído 3-P desidrogenase	36	Aprotinina	6,5

a) HMW – High Molecular Weight – Massa Molecular Elevada

b) LMW – Low Molecular Weight – Massa Molecular Baixa

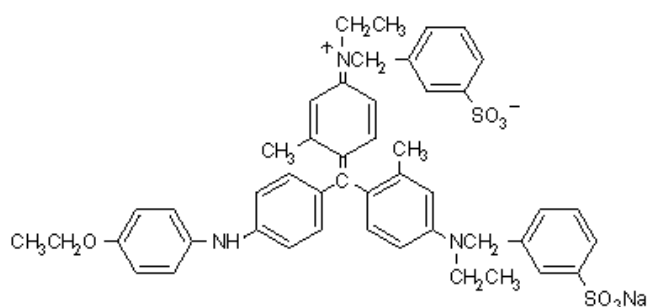


Figura VIII.1 – Estrutura molecular do corante *Coomassie Brilliant Blue*.

3. Velocidade de Hidrólise de ATP (Ponto 1.4.3. do Procedimento Experimental)

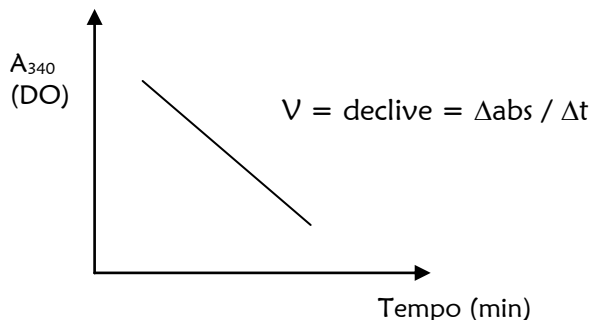


Figura VIII.1. - A velocidade de hidrólise de ATP é dada pelo decréscimo da absorvância em cada minuto; este valor é depois transformado em nmol de NADH oxidado por minuto (6,2 mDO = 1 nmol NADH), que por seu turno corresponde, directamente, à quantidade de ATP hidrolizada por minuto).

4. Processos que ocorrem após a absorção de luz: diagrama de Jablonski (ponto 5 do Procedimento Experimental)

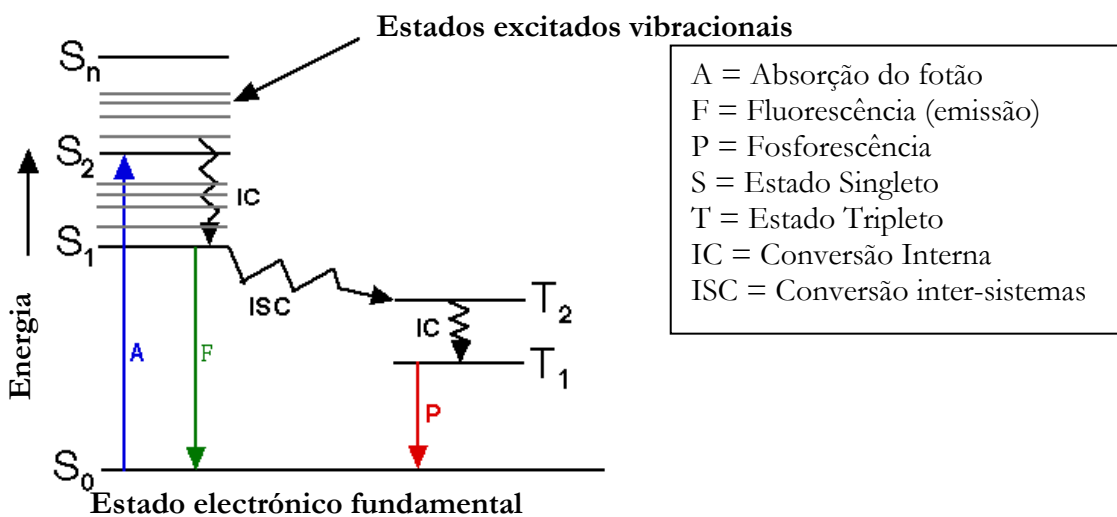


Figura VIII.2 – Ilustração de uma representação do Diagrama de Jablonski (in Tiago, 2005).

5. Espectroscopia de emissão: fluorescência extrínseca com marcação por FITC (ponto 5.1.2. do Procedimento Experimental)

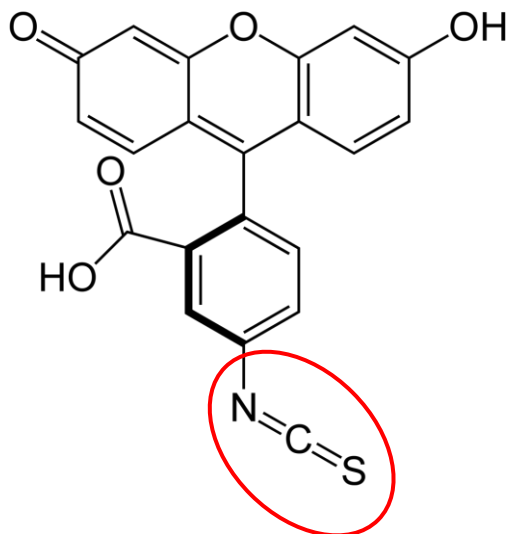


Figura VIII.3 – Estrutura Molecular de Isotiocianato de Fluoresceína. Trata-se de um composto que deriva da fluoresceína, modificada por adição de um grupo reactivo de isotiocianato ($-N=C=S$, indicado na figura com círculo vermelho). O derivado NHS-fluoresceína é reactivo na medida em que é atraído por grupos aminas e sulfidrilo de proteínas, possuindo maior especificidade que muitas outras aminas na presença de outros nucleófilos.

6. Espectroscopia de emissão: *quenching* de fluorescência (ponto 5.2. do Procedimento Experimental)

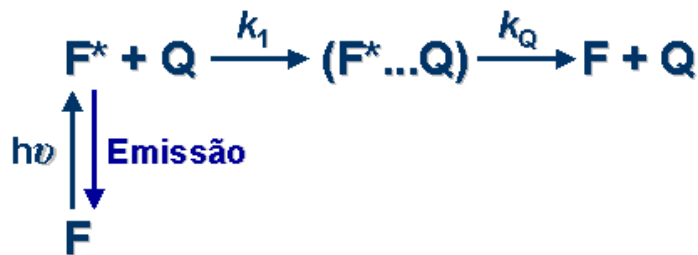


Figura VIII.4 – Representação Esquemática das Reações típicas de *Quenching* Colisional (simplificada): F – fluoróforo, Q – *quencher*, F^* – fluoróforo no estado excitado, $(FQ)^*$ – complexo fluoróforo-*quencher*, k_1 – constante bimolecular colisional, k_Q – constante bimolecular de *quenching*. No processo de *quenching*, o fluoróforo sofre excitação e, neste estado, colide com o *quencher* com uma constante biomolecular colisional (k_1), formando um complexo colisional com o *quencher* (com tempo de vida infimo); o fluoróforo excitado regressa ao estado fundamental com uma constante bimolecular de *quenching* (k_Q) (adaptado de Lakowicz, 1999).

ANEXO VIV

NOTAS ADICIONAIS AOS RESULTADOS E SUA DISCUSSÃO (Capítulo III)

1. Quantificação da proteína total em amostras de VRS e GL-RS (ponto 1.2. do capítulo III)

Tabela VIV.1. Quantificação de proteína total em amostras de VRS e GL-RS: concentrações, volumes, massas e rendimentos de suspensão estimados em preparações de sarcovesículas isoladas a partir de músculo esquelético de coelho. O rendimento total (0,114 %), considerando que a suspensão foi dividida, foi calculado mediante a soma dos dois valores de massa de proteína total obtida.

Preparação	Concentração de Proteína Total (mg/mL)	Volume de suspensão obtida (mL)	Massa de proteína total obtida (mg)	Massa inicial de músculo (mg)	Rendimento da operação (%)
VRS	23,13	3,9	90,2	162 x 10 ³	0,056
GL-RS	19,9	4,75	94,5	162 x 10 ³	0,058

2. Efeito de complexos coordenados de vanádio na acumulação de cálcio por VRS (ponto 2.2.1 do Capítulo III)

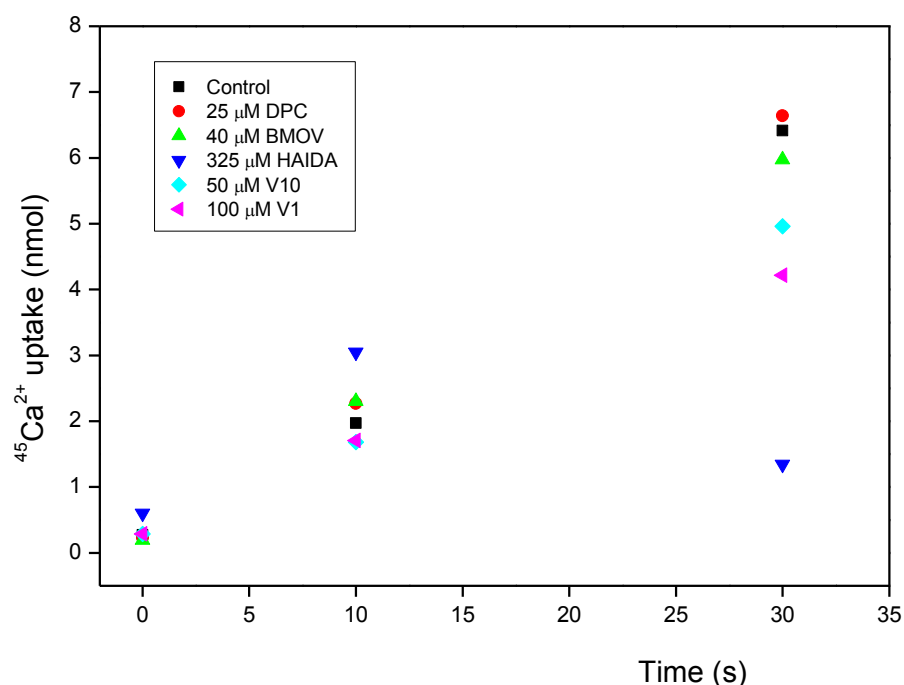


Figura VIV.1 – Curva de progressão obtida para a acumulação de ⁴⁵Ca na presença de PDC-V(V) 25 µM, BMOV-V(IV) 40 µM, HAIDA-V(IV) 325 µM, solução “decavanadato” 50 µM (V10) e solução “metavanadato” 100 µM (V1), a pH 7, 25°C e utilizando-se oxalato; ao controlo (Control), corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção. ⁴⁵Ca uptake refere-se ao sequestro observado do isótopo radioactivo de cálcio e está representado em valores de nmol; a concentração de proteína utilizada foi 0,01 mg/mL. Time refere-se ao tempo de transporte desse isótopo e é dada em segundos. Os valores observados no tempo 30 s foram convertidos em actividades de µmol/min.mg de VRS.

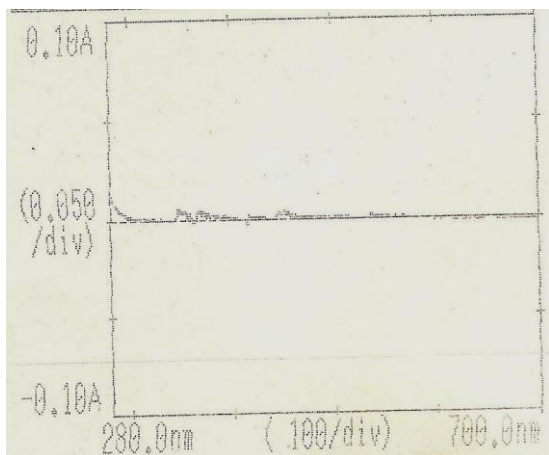


Figura VIV.2 – Espectro de absorção ultravioleta/visível de soluções de oxalato 5 mM, a pH 7 e 25 °C (intervalo de comprimentos de onda: 280-700 nm).

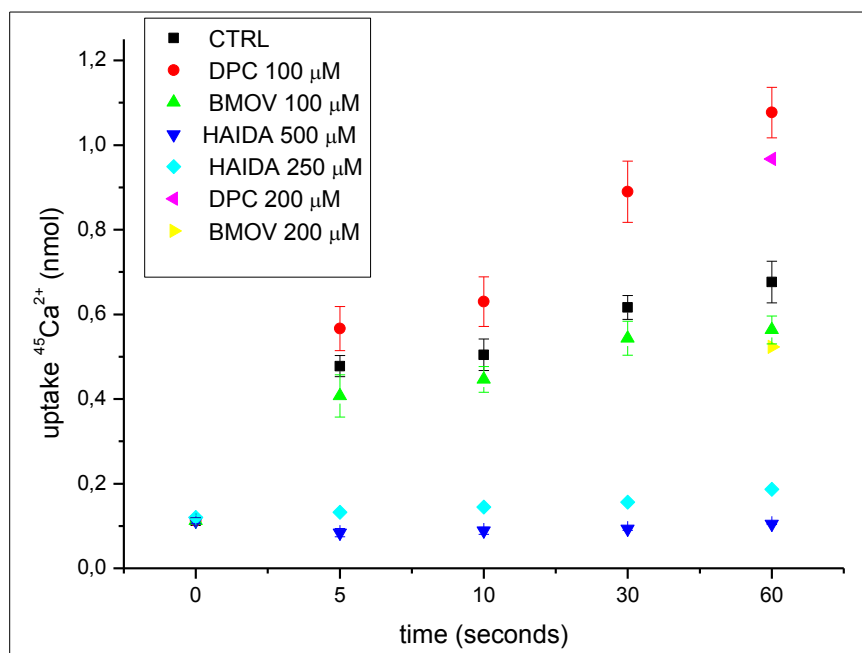


Figura VIV.3 – Curva de progressão de produtos obtida para a acumulação de ^{45}Ca na presença de PDC-V(V) 100 e 200 μM (DPC), BMOV-V(IV) 100 e 200 μM , HAIDA-V(IV) 200 μM e 500, a pH 7, 25°C e na ausência de oxalato; ao controlo (CTRL), corresponde uma situação de ausência de vanádio no meio de reacção. ^{45}Ca uptake refere-se ao sequestro observado do isótopo radioactivo de cálcio e está representado em valores de nmol; a concentração de proteína utilizada foi 0,01 mg/mL. Time refere-se ao tempo de transporte desse isótopo e é dada em segundos. Os valores observados no tempo 30 s foram convertidos em actividades de $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ de VRS.

ANEXO VV

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE SOLUÇÕES DE VANÁDIO

O vanádio, e particularmente no seu estado de oxidação +5 (ião vanadato), apresenta uma química em solução excepcionalmente complexa, na medida em que co-existem vários equilíbrios de protonação, oxidação-redução e oligomerização cuja direcção, por seu turno, depende da força iónica, pH, concentração total de vanádio, temperatura e presença de outras substâncias (Amado, 1993; Crans, 1994; Rehder, 1999; Tiago *et al.*, 2002). Como estes equilíbrios se desencadeiam em milissegundos, torna-se difícil a preparação de uma solução que contenha, especificamente, uma determinada espécie de oxovanádio. Mesmo apesar de estar estabelecido que as espécies individuais do metal podem influenciar a actividade de enzimas de um modo distinto entre si (Crans, 1994; Aureliano & Madeira, 1998; Pereira, 2003; Tiago *et al.*, 2007; Aureliano *et al.*, 2007), a maioria dos estudos não pondera a especiação dos oxovanádios responsáveis por um determinado efeito.

Assim, a análise correcta dos efeitos promovidos por vanádio em sistemas biológicos implica a caracterização prévia das soluções reaccionais, nomeadamente no que respeita à composição e estabilidade das espécies presentes. Tal caracterização pode ser conseguida através das técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e de absorção na região do ultravioleta/visível (UV/Vis).

A ressonância magnética nuclear é uma técnica espectroscópica que monitoriza a absorção de energia associada a transições de núcleos entre níveis de energia magnética nuclear adjacentes; a energia medida em função do campo magnético externo aplicado resultará num espectro de absorção em função da força do campo. As características dos sinais de um espectro de RMN de um determinado núcleo fornecem informações sobre a estrutura da molécula em estudo, as interacções intermoleculares ou ainda sobre processos dinâmicos em solução (Cantor & Schimmel, 1997).

O núcleo do isótopo 51 de vanádio tem propriedades magnéticas que se adequam bem a estudos como estes, permitindo retirar informação qualitativa e quantitativa importante. Este isótopo tem uma abundância natural perto de 100% e uma sensibilidade de 39% relativamente à do protão e, apesar de apresentar um spin nuclear de 7/2 e de, por conseguinte, possuir um momento quadrupolar, os sinais de ^{51}V geralmente detectados não são excessivamente largos, dependendo da coordenação dos átomos de vanádio. Estas características tornam o núcleo de ^{51}V num dos mais bem sucedidos em estudos de RMN e particularmente nos que envolvam as espécies diamagnéticas de vanádio (V), uma vez que as bandas das espécies paramagnéticas, como as do vanádio (IV), alargam tanto que deixam de se observar (Chasteen, 1983; Micera & Sanna, 1998). Dado que cada oxovanadato origina uma ressonância bem resolvida no espectro de ^{51}V -RMN, a distribuição das espécies pode ser calculada a partir da integração dos sinais correspondentes. Isto torna possível correlacionar a actividade de uma enzima, como a Ca^{2+} -ATPase do RS, com a concentração das diferentes espécies de vanadato em solução e, eventualmente, identificar a espécie responsável pela inibição observada. Acresça-se que, este método é o

responsável pela maioria da informação actualmente disponível para descrever este elemento no estado de oxidação +5 (Crans & Schelbe, 1990; Micera & Sanna, 1998).

As técnicas associadas às regiões ultravioleta e visível do espectro electromagnético são provavelmente as que mais frequentemente se empregam e que se baseia na absorção da radiação ultravioleta e visível por parte de um grupo cromóforo (unidade estrutural de determinado composto que absorve mensuravelmente a radiação incidente); esta absorção é proporcional à concentração de cromóforo (logo, de composto que o possui), de acordo com a lei de Beer-Lambert. Deste modo, não só constitui um método de análise quantitativa, aproveitando o facto de certos compostos absorverem comprimentos de onda específicos, como também permite a identificação de certas classes de uma substância, tanto no seu estado puro como em misturas biológicas, uma vez que muitas possuem espectros de absorção característicos nas regiões ultravioleta e visível. Adicionalmente, a técnica pode fornecer informação sobre possíveis alterações no ambiente físico e químico do cromóforo (Plummer, 1987; Robyt & White, 1990; Wilson & Walker, 1999).

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível foi uma das primeiras práticas a esclarecer alguns aspectos da química do vanádio (V), caracterizando-se várias espécies oligoméricas. Tendo em conta que o vanádio (V) é um ião metálico d^0 (sem electrões na orbital d), não sofre transições na região visível do espectro electromagnético; a cor amarela que se observa em algumas soluções de vanádio pentavalente, nomeadamente a de decavanadato, deve-se a uma intensa absorção na cauda do ultravioleta (Ingri e Brito, 1959; Borgen *et al*, 1997). O desaparecimento da espécie decamérica, em particular, pode ser facilmente detectado mediante esta espectroscopia e, por derivação do espectro de absorção de uma solução nominal de decavanadato, obtêm-se bandas negativas a 360 nm e 400 nm; estas bandas apresentam uma dependência linear em relação à concentração da espécie decamérica, demonstrando que as absorções electrónicas que ocorrem a 360 e 400 nm estão relacionadas com decavanadato (Aureliano, 1995; Aureliano & Madeira, 1998).

1. Composição e estabilidade de soluções de vanadato

Uma solução aquosa de vanadato contém uma série de espécies iónicas de oxovanádio (+5) cuja abundância relativa depende da concentração, pH, força iónica, temperatura e presença de outras substâncias (Pettersson *et al*, 1985; Pope, 1983; Rehder, 1991). Em condições neutras e na gama de concentrações mais frequentemente utilizadas em estudos bioquímicos (μM a mM), as espécies de vanadato predominantes são o monómero (V_1), o dímero (V_2), o tetrâmero (V_4) e o pentâmero (V_5). Estas espécies, em solução, atingem o equilíbrio muito rapidamente, dado que a troca de átomos de vanádio e de oxigénio se dá numa escala tempo - ral de milissegundos (Crans *et al*, 1994).

Deste modo, com o intuito de se ter presente a composição de soluções nominais de metavanadato e decavanadato preparadas para os diferentes estudos e, assim, se poder correlacionar com os resultados obtidos, consideraram-se os espectros de ^{51}V -RMN geralmente obtidos para uma solução de “metavanadato” ou de

“decavanadato” 4 mM, representados nas figuras VV.1 e VV.2, respectivamente. Estes espectros, conseguidos mediante diferentes valores de pH (Pereira, 2003), estão de acordo com os registados por Aureliano (1995; 1998; 2009), Tiago *et al.* (2002; 2005; 2007), Sousa (2004) e Soares *et al.* (2007), bem como com Crans *et al.* (1998).

Pela análise do espectro representado na figura VV.1 é possível discernir os sinais correspondentes às espécies monomérica, dimérica, tetramérica e pentamérica, identificadas numa solução de “metavanadato” 4 mM, a pH 8 e 7. A pH 6, para além de se verificar uma diminuição significativa na intensidade dos picos das espécies monomérica, tetramérica, e especialmente dimérica, observa-se o desaparecimento da espécie pentamérica. Constatou-se, por outro lado, o aparecimento de 3 novas bandas (em relação aos pHs 7 e 8), que correspondem aos sinais de RMN típicos de átomos de vanádio da espécie decamérica.

O termo “metavanadato”, com origem na analogia ao metafosfato (PO_3^-), é habitualmente empregue na descrição de uma mistura incolor de oxovanadatos com a fórmula empírica VO_3^- , em solução aquosa. Após um ajuste de pH, podem ser obtidas soluções contendo a mesma mistura de oxovanadatos, quer por dissolução de metavanadato, na forma de NaVO_3 (metavanadato de sódio) ou NH_4VO_3 (metavanadato de amónio), ou de ortovanadato, na forma de Na_3VO_4 (ortovanadato de sódio). Para além dos metavanadatos, podem-se formar outros oxovanadatos, alguns dos quais estão limitados a concentrações e condições de pH específicas. Certos derivados, que se formam em concentrações de vanádio total muito baixas, incluem o trimero e o tetrâmero lineares (observados a valores de pH ligeiramente alcalinos) ou o hexâmero (reportado a concentrações mais elevadas de vanadato) (Pope, 1983; Howarth, 1990; Aureliano, 1995; Tiago, 2005).

Sob condições ácidas ($\text{pH} < 6$), forma-se o decâmero, cuja solução pode apresentar uma cor amarela, laranja ou vermelha, dependendo da concentração da espécie. Apesar de ser termodinamicamente instável a pH neutro ou básico, o vanadato decamérico permanece intacto a $\text{pH} \geq 7$ por períodos de tempo limitado (até 2 dias); contrariamente aos oxovanadatos lábeis nas soluções de metavanadato, a sua velocidade de hidrólise é lenta (Pope, 1983; Howarth, 1990; Aureliano, 1993; Tiago, 2005). Com efeito, estudando-se o espectro ilustrado na figura VV.2, pode-se dizer que a solução “decavanadato” analisada contém essencialmente espécie decamérica, nos 3 pHs estudados, e ainda, em menor extensão, espécie monomérica, cuja banda aparece com maior intensidade a pH 7.

De acordo com os desvios químicos registados por Pereira, 2003, na solução “metavanadato” a espécie monomérica e dimérica encontram-se na forma protonada H_2VO_4^- e $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$, a tetramérica na forma cíclica $\text{V}_4\text{O}_{12}^-$ e a pentamérica na forma $\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$. A espécie decamérica está sob a forma protonada $\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$, e de acordo com Crans *et al.* (1998).

Nas figuras VV.3 e VV.4 estão registadas e ilustradas as concentrações relativas de cada oligómero identificado por ^{51}V -RMN em soluções nominais de metavanadato e decavanadato 4 mM, respectivamente.

Como se pode verificar, na solução “metavanadato” 4 mM, a pH 6, está presente a espécie decamérica; a composição da solução a pH 7 é essencialmente semelhante àquela a pH 8. Na solução “decavanadato”, por seu turno, encontra-se uma concentração de oligómeros decaméricos essencialmente idêntica em todos os pHs. A concentração de monómero, contudo, tende a variar, o que pode ser entendido se se tiver em conta que a variação

do monómero terá de provir da desoligomerização do decâmero. Deste modo, compreende-se que apesar de, no geral, a concentração do oligómero parecer não variar significativamente nesta gama de pH, por cada decâmero que se decompõe obtêm-se, contudo, dez monómeros.

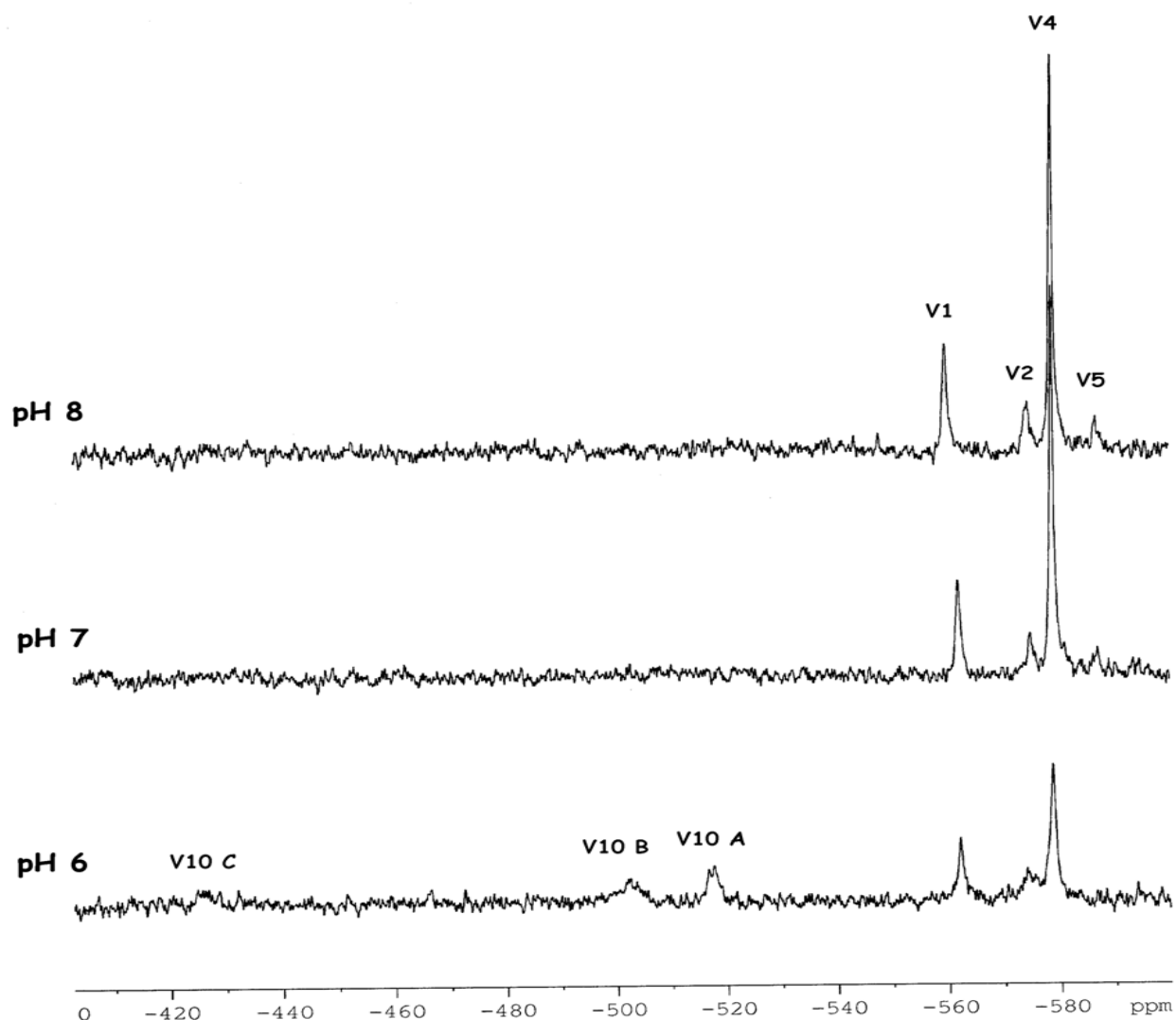


Figura VV.1 – Espectro de ^{51}V -RMN a 105,2 MHz de uma solução de “metavanadato” 4 mM num meio contendo 0,1 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 250 μM CaCl_2 e 25 mM Trizma, para diferentes valores de pH (6, 7 e 8). V1, V2, V4 e V5 correspondem a espécies monomérica, dimérica, tetramérica e pentamérica, respectivamente. V10C, V10B e V10A correspondem a sinais de RMN dos átomos de vanádio da espécie decamérica (Pereira, 2003).

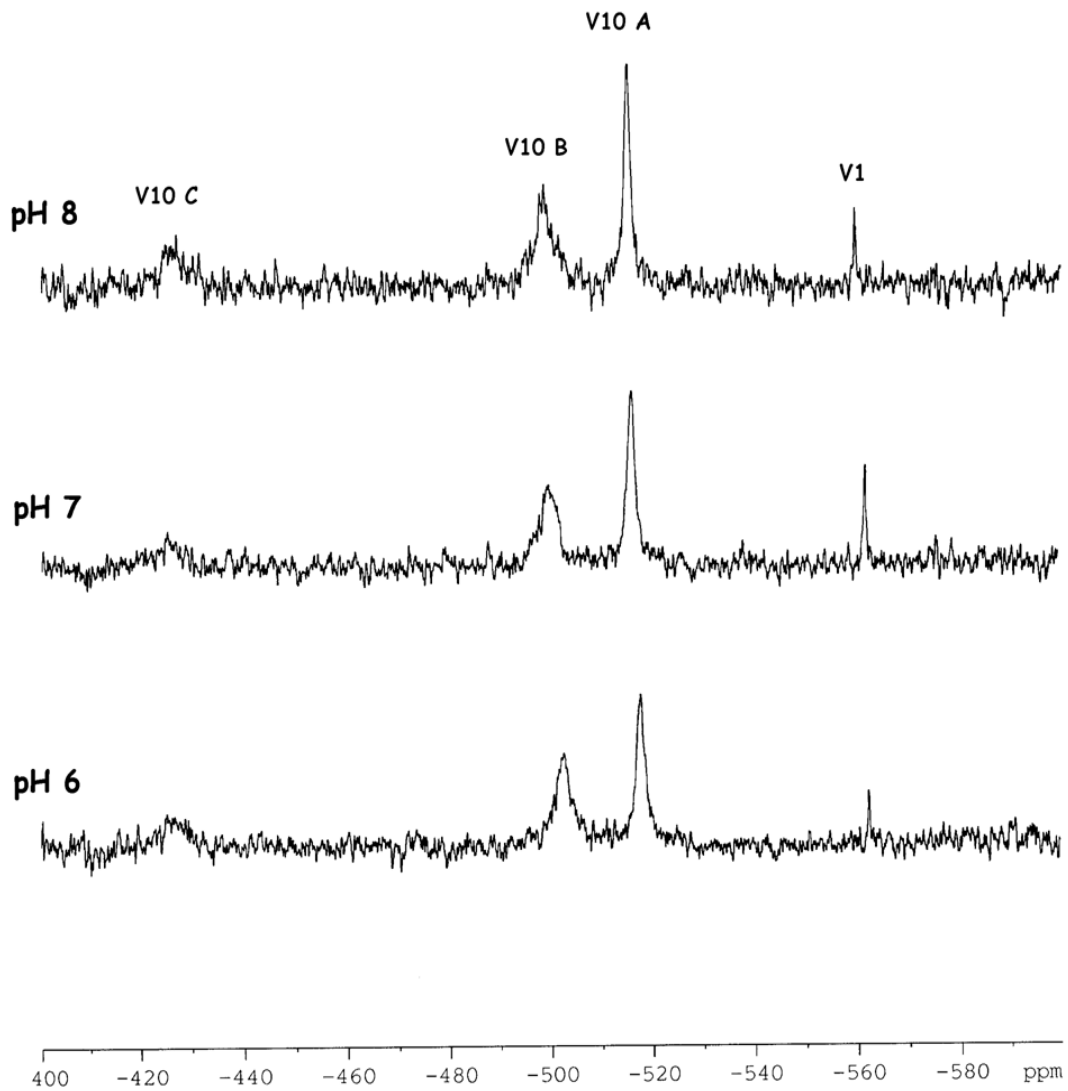


Figura VV.2 - Espectro de ^{51}V -RMN a 105,2 MHz de uma solução de “decavanadato” 4 mM num meio contendo 0,1 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 250 μM CaCl_2 e 25 mM Trizma, para diferentes valores de pH (6, 7 e 8). V1 corresponde à espécie monomérica; V10C, V10B e V10A correspondem a sinais de RMN dos átomos de vanádio da espécie decamérica (Pereira, 2003).

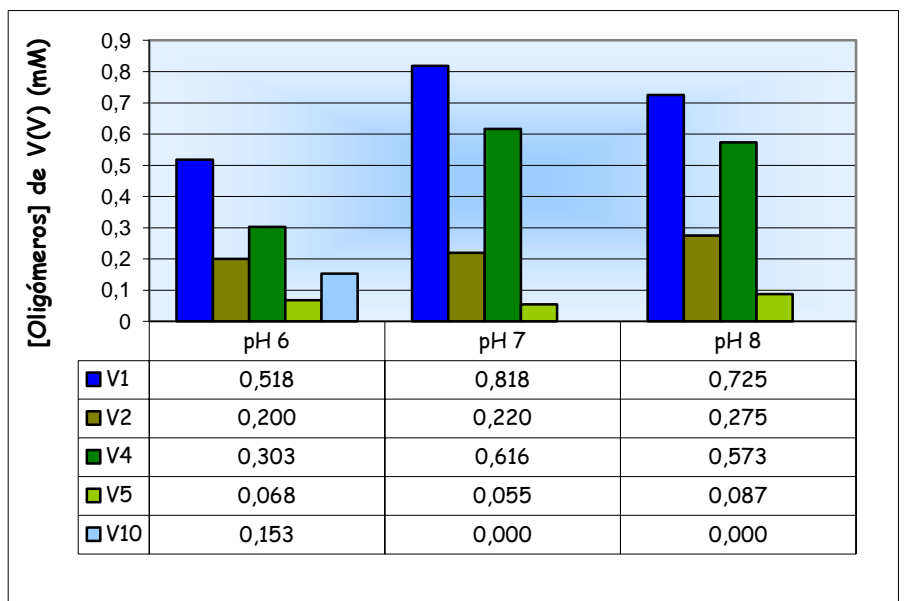


Figura VV.3 - Concentração relativa de oligómeros de vanadato a pH 6, 7 e 8, em função das espécies presentes na solução de “metavanadato” 4 mM, a 25°C, identificadas por ^{51}V -NMR (Pereira, 2003).

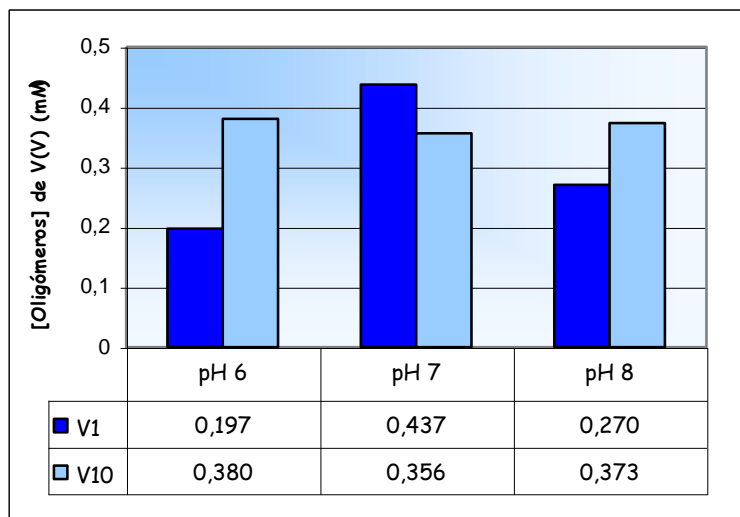


Figura VV.4 - Concentração relativa de oligómeros de vanadato a pH 6, 7 e 8, em função das espécies presentes na solução nominal de decavanadato 4 mM, a 25°C, identificadas por ^{51}V -NMR.

Dado que as soluções de “metavanadato” contêm uma mistura de várias espécies de oxovanádios (Figura VV.1) num equilíbrio dependente do pH e da temperatura, quando há diluição num meio de ensaio, estabelecem um novo equilíbrio no espaço de milissegundos. Uma vez atingido esse equilíbrio, esta solução mantém-se estável ao longo do tempo (Crans, 1994). Contudo, o mesmo não acontece com as soluções de “decavanadato” (Figura VV.2), nas quais a espécie decamérica sofre uma desoligomerização, quando diluída, ao longo do tempo (Aureliano & Madeira, 1998). Na figura VV.5 está representado um desses espectros de absorção ultravioleta/visível de uma solução nominal de decavanadato 1 mM, obtido a pH 7 e 25 °C, a título de exemplo.

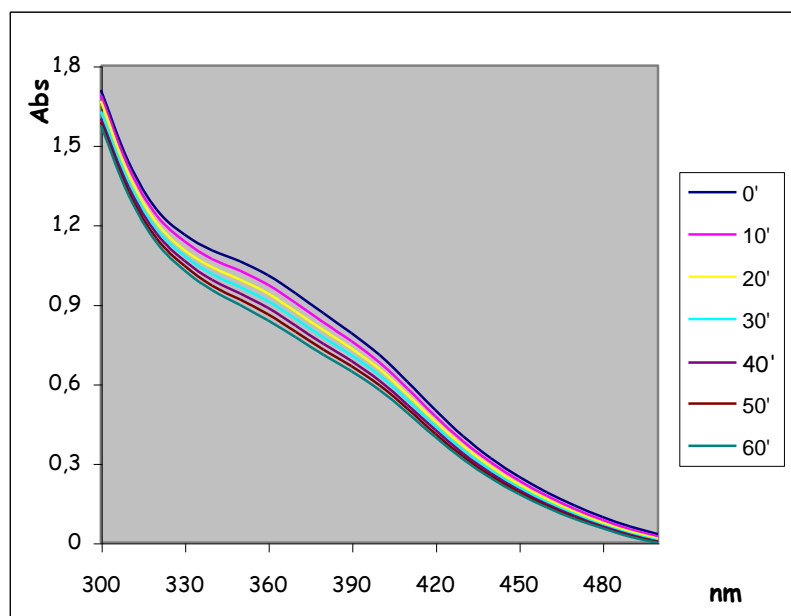


Figura VV.5 - Exemplo de um espectro de absorção UV/VIS de uma solução nominal de decavanadato 1 mM (V_{total}) em meio de pH 7 contendo KCl 0,1 M, Trizma 25 mM, Mg Cl_2 5mM e CaCl_2 250 μM , e a 25 °C (Pereira, 2003).

É possível seguir o decaimento da espécie decamérica a partir da sua absorvância a 400 nm em função do tempo, verificando-se que este decaimento, ou seja, a desoligomerização da espécie, segue a tendência de

estabilidade $\text{pH } 6 > \text{pH } 7 > \text{pH } 8$, o que de resto está de acordo com a literatura (Aureliano, 1995; Crans *et al.*, 1998). Também se verifica que o aumento da temperatura acentua pronunciadamente a desoligomerização nos meios com os pH estudados, como esperado (Aureliano & Madeira, 1998).

Apartir das linhas de tendência calculadas a partir de gráficos Abs 400 nm *versus* tempo, determinam-se os tempos de meia-vida da espécie decamérica nas condições referidas. Esses valores estão compilados e ilustrados na figura VV.6. Pode-se inferir que a tendência para a desoligomerização é superior a 37 °C, em especial para meios com pH 6. A pH 7 e 25 °C, a espécie decamérica mantém-se estável até cerca de 3 horas e meia (Pereira, 2003).

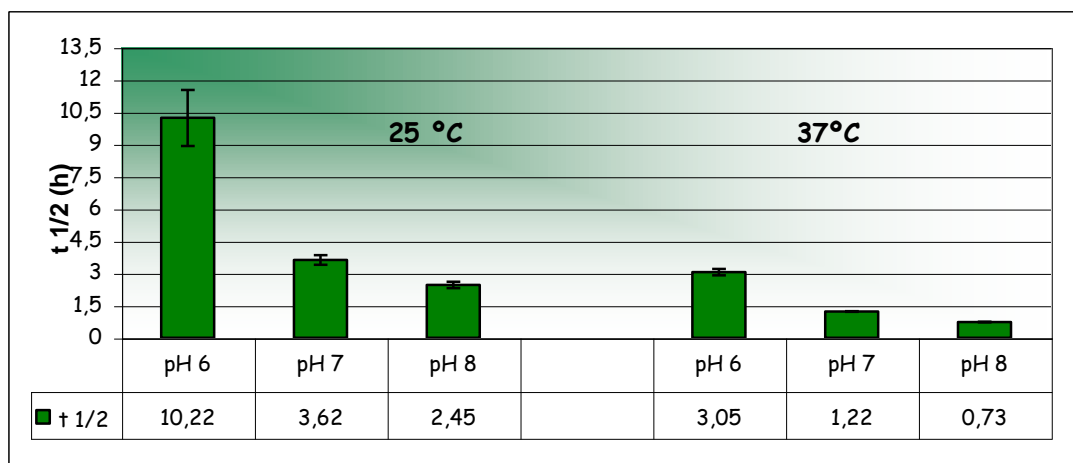


Figura VV.6 – Tempos de meia vida calculados para a espécie decamérica em meios de reacção com pH 6, 7 ou 8 e para temperatura ambiente (25 °C) ou fisiológica (37 °C) (Pereira, 2003).

2. Composição e estabilidade de soluções de complexos orgânicos coordenados de vanádio

O espectro de ^{51}V -RMN do complexo PDC-V(V) já foi determinado (Aureliano *et al.*, 2008) e demonstra que o próprio oxovanádio complexado PDC-V(V) é a espécie predominante em solução (nas condições descritas anteriormente por Aureliano *et al.*, 2008). A adição de sarcovesículas de RS ao meio de ensaio provoca um alargamento do sinal de RMN, tendo-se descrito uma tendência de diminuição desse sinal com concentrações de proteína crescentes (Figura VV.7); este alargamento traduz-se, normalmente, na existência de uma interacção de derivados do metal de transição com várias proteínas (Wittenkeller *et al.*, 2001). Uma solução de PDC-V(V) é, adicionalmente, muito sensível à temperatura, pelo que, mesmo o ligeiro aquecimento que é utilizado na dissolução de soluções deste oxovanádio, tende a libertar oligómeros de vanadato. Assim, os espectros de ^{51}V -RMN destas soluções vão apresentar, além de um sinal correspondente ao PDC-V(V), os sinais que assinalam a presença de vanadato monomérico, dimérico e tetramérico (cíclico) (Aureliano *et al.*, 2008).

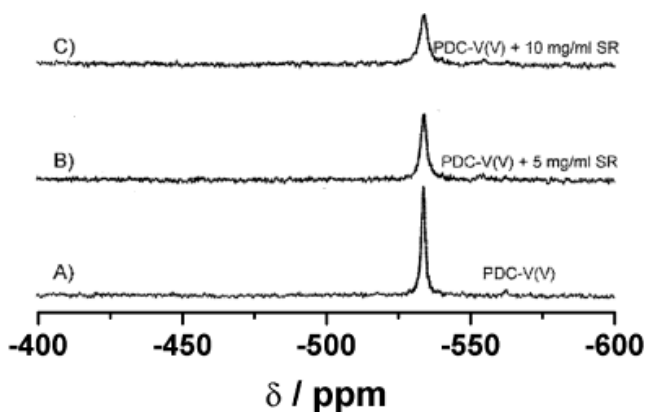


Figura VV.7 – Espectro de ^{51}V -RMN a 105,2 MHz de 4 mM de PDC-V(V) dissolvido num meio contendo 25 mM HEPES (pH 7), 0,1 M KCl, 5 mM MgCl_2 . Estes estudos foram levados a cabo na ausência (A) ou presença de sarcovesículas de RS numa concentração de 5 mg/mL de proteína total (B) ou de 10 mg/mL (C) (in Aureliano *et al.*, 2008).

Em solução aquosa, o complexo de oxovanádio BMOV-V(IV) (que contém a espécie vanadato) por seu turno, é lentamente oxidado na presença de oxigénio molecular, a V(V)-maltol ($\text{VO}_2(\text{ma})_2^-$) (Caravan *et al.*, 1995); nas condições de ensaio utilizadas por Aureliano *et al.* (2008), a formação de $\text{VO}_2(\text{ma})_2^-$ é mais imediata. Através da análise por ^{51}V -NMR é possível verificar que o complexo oxidado V(V)-maltol está presente em condições de pH neutro, a par da existência da espécie complexada $\text{VO}_2(\text{ma})(\text{H}_2\text{O})_2$ (Figura VV.8).

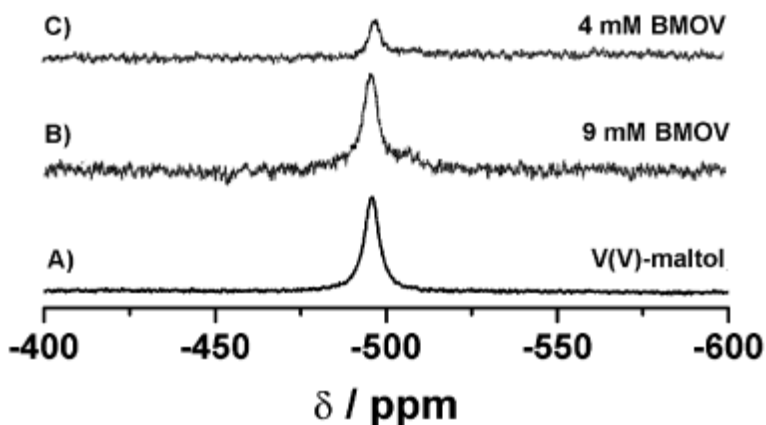


Figura VV.8 – Espectro de ^{51}V -RMN a 105,2 MHz, e a 22°C, de 9 mM de V(V)-maltol em solução aquosa (A), 9 mM de complexo BMOV-V(IV) (B) e 4 mM de complexo BMOV-V(IV), ambos preparados nos meios de reacção descritos por Aureliano *et al.* (2008). Os sinais nos espectros B) e C) derivam de um equilíbrio entre as formas oxidadas do oxovanádio complexado BMOV.

As soluções do análogo da amavadina apenas contêm o complexo HAIDA-V(IV) original, não se detectando nenhum sinal de ^{51}V -NMR que reporte a presença de outras espécies, para além do composto HAIDA-V(IV) dissolvido. Tal observação resulta do facto de, nas condições geralmente empregues, não existir oxidação mensurável a um complexo V(V) (Gardner *et al.*, 2000; Aureliano *et al.*, 2009).