

Universidade do Algarve



Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Ciências Biológicas e Bioengenharia

Licenciatura em Bioquímica

Ano lectivo 2011/2012

ATPases do tipo P como alvos terapêuticos

Orientador: Professor Doutor Manuel Aureliano Alves

Aluno: Pedro Brás nº 36960

Resumo

As ATPases do tipo P ou P-ATPases são enzimas transmembranares que controlam o fluxo de iões, tais como, K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , em diferentes células e organelos celulares. Esses iões desempenham um papel fundamental no controlo da homeostasia e dos gradientes electroquímicos nas células. Devido a esse seu papel importante as ATPases têm sido alvos de estudo nestas últimas décadas. A sua modulação por inibidores é promissora para o tratamento de doenças, tais como, cancro da próstata, isquemia do coração e doenças gástricas. De 18 principais inibidores das bombas Na^+/K^+ ; K^+/H^+ e Ca^{2+} -ATPase são conhecidos os mecanismos de acção de 10 (palitoxina, omeprazol, PCAB, ácido scopadulcico B, tapsigargina, ácido ciclopiazónico, curcumina, 2,5-(*t*-butil)-dihidroxibenzeno, ouabaína e vanádio). Para os outros apenas se sabe que inibem ou que se ligam a determinada região mas as alterações conformacionais que promovem continuam incertas. Com a utilização da cristalografia de raio x e de estudos de mutação génica têm sido fabricados inibidores cada vez mais específicos e menos tóxicos para as células. Espera-se que num futuro próximo a utilização de inibidores para ATPases do tipo P seja muito vantajosa para o tratamento de várias patologias.

Abstract

The ATPases of P type or P-ATPases are transmembrane enzymes which control ions flux, such as K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , in different cells and cellular organelles. These ions play a fundamental role in control of homeostasis and electrochemical gradients in cells. Due to that important role, ATPases, have been study in these last decades. They modulation by inhibitors is promising for treating diseases, as prostate cancer, heart ischemia and gastric diseases. Of 18 major pump inhibitors are known mechanisms of action of 10 (Palytoxin, Omeprazole, PCAB, Scopadulcic Acid B, Thapsigargin, Cyclopiazonic acid, Curcumin, 2,5-di-(t-butyl)-dihydroxybenzene, ouabain and vanadium). For others only known they inhibit or bind it to a certain region but conformational changes that promote remain uncertain. Through x-ray crystallography and mutagenic studies have been produced inhibitors more specific and less toxic to cells. In near future is expected that utilization of inhibitors for ATPase of P type it's very advantageous for the treatment of several diseases.

Abreviaturas: CTS – Esteróides cardiotónicos; PPIs – Inibidores da bomba de prótons; PCABs - Bloqueadores ácidos competitivos com o potássio; SERCA – Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase; TG – Tapsigargina; CPA - Ácido ciclopiazónico; Src – Complexo tirosina cinase/ Na^+/K^+ -ATPase; GERD - Doença de refluxo gastro esofágico; TM – Hélices transmembranares;

1) Introdução.....	1
2) Métodos de estudo.....	2
3) Descrição das ATPases do tipo P ou P-ATPases.....	3
4) As bombas iónicas como alvo de drogas/inibidores.....	5
4.1) Inibidores da Na^+/K^+ -ATPase.....	6
4.2) Inibidores da H^+/K^+ -ATPase.....	7
4.3) Inibidores das SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase).....	10
5) Mecanismos moleculares da inibição das ATPases do tipo P.....	12
5.1) Modo de actuar do inibidor CTS na Na^+/K^+ -ATPase	12
5.2) Modo de actuar do inibidor PPI na H^+/K^+ -ATPase	15
5.3) Modo de actuar dos inibidores TG e CPA na SERCA	16
6) Conclusão/Discussão/Perspectivas futuras.....	19
7) Referências Bibliográficas.....	21

1) Introdução

As ATPases do tipo P catalisam o transporte específico de cátions, tais como H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , através da bicamada lipídica utilizando uma molécula de ATP por ciclo. Assim, mantêm os gradientes electroquímicos e a homeostasia celular. Devido a este importante papel, as P-ATPases estão muitas vezes associadas a doenças nos organismos, tais como, cancro da próstata, isquemia do coração e doenças gástricas e, por isso, são alvos promissores para futuras drogas. Ao longo das últimas décadas têm sido criados inibidores capazes de bloquear estas enzimas de forma eficiente e não tóxica para o organismo alvo [1,2]. Técnicas como a cristalografia de raios X [3] e mutação génica [4] têm sido fundamentais para a caracterização das estruturas das bombas e dos locais de ligação dos inibidores. As ATPases do tipo P destacadas neste trabalho são a Na^+/K^+ , que tem como principais inibidores os CTS; a H^+/K^+ , cujos inibidores são os PPIs e os PCABs; e a Ca^{2+} , com a tapsigargina, o ácido ciclopiazónico e o vanádio como principais inibidores [1,2].

2) Métodos de estudo

Os métodos de estudo utilizados para o desenvolvimento e/ou fabrico de inibidores são a cristalografia de raios X e os estudos mutagénicos.

O primeiro consiste na passagem de um feixe de luz pela molécula cristalizada que permite determinar a sua estrutura molecular. Através da cristalografia determinou-se a estrutura da Ca^{2+} -ATPase (primeira estrutura molecular de uma ATPase a ser conhecida), que serviu de modelo para as ATPases, mais concretamente as do tipo P [3].

A mutação génica consiste na alteração de uma sequência de nucleótidos do DNA de um gene devido à inserção, deleção ou substituição de um ou mais nucleótidos, alterando ou não a sequência de aminoácidos. Através desta técnica e para este caso é possível alterar a sequência de aminoácidos das bombas com o objectivo de definir o local de ligação para os inibidores em estudo [4].

3) Descrição das ATPases do tipo P ou P-ATPases

As ATPases são enzimas transmembranares que transportam catiões, tais como, Na^+ , K^+ , H^+ e Ca^{2+} , e dividem-se em cinco subfamílias de P_1 a P_5 que por sua vez se dividem em mais quatro categorias A, B, C e D. Estas classificações estão associadas com o transporte específico de catiões, por exemplo, $\text{P}_{2\text{B}}$ representa as SERCA. Estas proteínas mantêm os gradientes electroquímicos e por isso são essenciais para a sobrevivência celular. A característica comum a todas as P-ATPases é a formação de um intermediário fosfato-aspartil, pela autofosforilação da subunidade catalítica da bomba, dando origem a um resíduo aspártico. Muitos destes enzimas realizam o transporte de dois iões em simultâneo e o mecanismo de reacção é descrito pelo esquema de Post-Albers (figura 1) [1,2]. Este mecanismo consiste na alteração da conformação do enzima entre dois estados funcionais E1 e E2. O substrato x liga-se ao enzima na conformação E1, ocorre a fosforilação pelo ATP e o enzima muda para a conformação E2P na qual é libertado o substrato x. Depois o substrato y, para o caso da Na^+/K^+ e K^+/H^+ , liga-se ao enzima, este liberta o fosfato e só depois regressa à conformação original (E1). No caso da Ca^{2+} -ATPase, o enzima muda de E2P para E2 sem a ligação de outro ião. Estes ciclos repetem-se enquanto existir substrato [1].

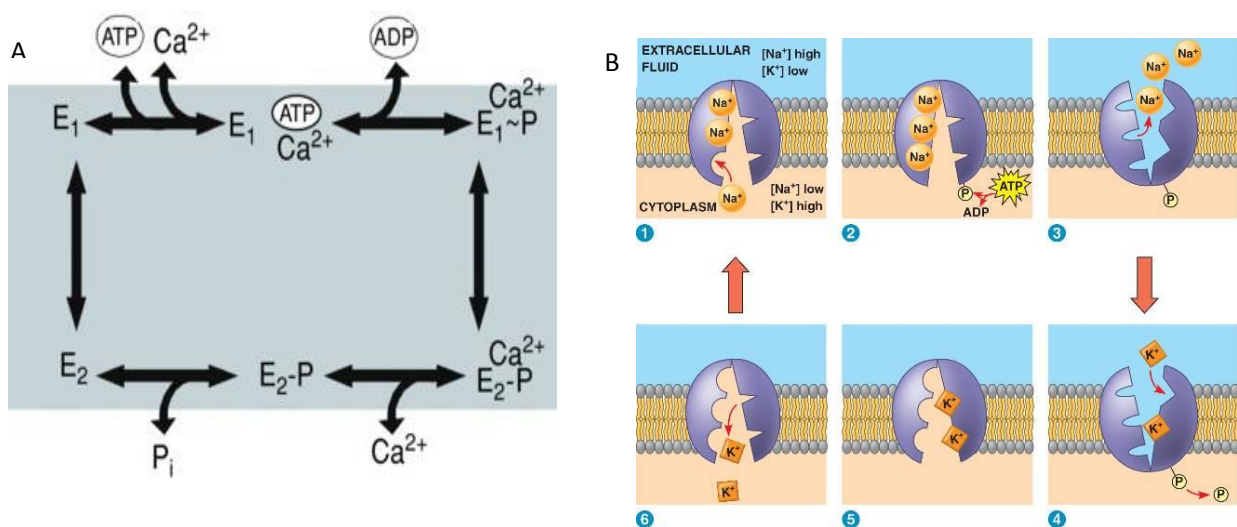


Figura 1 – Esquemas de Post-Albers para o transporte dos iões: A) cálcio [5] e B) sódio/potássio [6]

Os mecanismos associados às bombas iônicas foram melhor compreendidos quando a primeira estrutura atômica de uma bomba iônica foi determinada. Essa estrutura revelou a arquitetura geral da subunidade catalítica das P-ATPases que consiste em três domínios citoplasmáticos A, P e N (A de actuator, P de fosforilação e N de local de ligação dos nucleótidos) e um segmento transmembranar com dez hélices α que tem incorporado os dois locais de ligação dos íons [1] (figura 2).

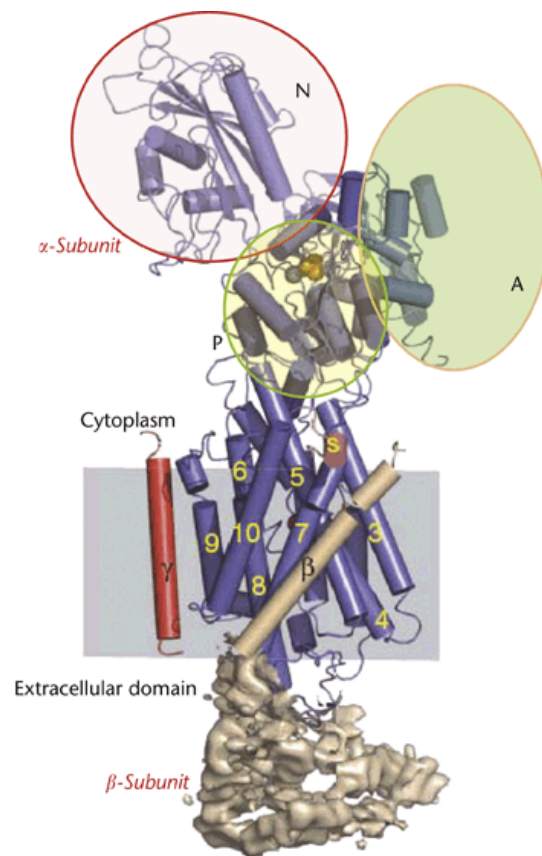


Figura 2 – Estrutura geral das ATPases do tipo P [7]

O conhecimento destas estruturas é fundamental para o desenvolvimento e fabrico de inibidores específicos para as P-ATPases.

4) As bombas iônicas como alvo de drogas/inibidores

Um grande número de plantas, animais e minerais são utilizados na produção de drogas. Algumas das quais mostram ser inibidores dos sistemas de transporte iônico (incluindo as bombas). Devido ao importante papel das P-ATPases na regulação do metabolismo celular têm sido desenvolvidos e produzidos novos e específicos inibidores para essas proteínas [1,2]. A tabela 1 apresenta uma lista dos mais importantes inibidores para a Ca^{2+} ; H^+/K^+ ; Na^+/K^+ -ATPases [1,2,8,9].

Tabela 1 – Lista dos mais importantes inibidores da Ca^{2+} ; H^+/K^+ ; Na^+/K^+ -ATPases

	Inibidor	Aplicações terapêuticas
Inibidores da Na^+/K^+-ATPase	Ouabaína (CTS)	Tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e arritmia cardíaca
	Clorpromazina	Droga anti-psicótica fototóxica
	Cloroquina	Droga anti-malária
	Procaína	Anestesia local
	Palitoxina	Promotor tumoral
	Gramicidina A	Antibiótico
Inibidores da H^+/K^+-ATPase	Omeprazol (PPI)	Agente anti-úlceras (duodenais e gástricas)
	Bloqueadores ácidos competitivos com o potássio (PCAB)	Agente anti-úlceras
	Ácido scopadulcico B	Agente anti-viral
	Dio-9	Antibiótico
	Prodigosinas	Antibiótico
Inibidores da SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase)	Tapsigargina (TG)	Prodroga para a terapia do cancro da próstata
	Ácido ciclopiazónico (CPA)	Ação cardioprotectiva na isquemia do miocárdio
	Ciclosporina A	Agente imunossupressor
	Curcumina	Agente anti-tumoral, anti-oxidante e anti-inflamatório
	Ácido ciclopiazónico 2,5-(<i>t</i> -butil)-dihidroxibenzeno	Agente anti-oxidante
	Celecoxib	Droga anti-inflamatória
	Vanádio	Anti-diabético

4.1) Inibidores da Na^+/K^+ -ATPase

Os glicosídeos cardíacos, também conhecidos como esteróides cardiotônicos (CTS) são inibidores da Na^+/K^+ -ATPase que consistem num núcleo esteróide com uma lactona ligada na posição 17 e açúcares de diferentes naturezas e tamanhos na posição 3, um exemplo é a ouabaína (figura 3). Embora se liguem a diferentes estados conformacionais da bomba preferem a conformação E2P [1,10,11].

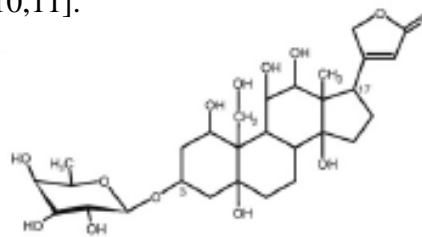


Figura 3 – Esteróide Cardiotónico (ouabaína) [1]

O CTS inibe a Na^+/K^+ -ATPase ao ligar-se do lado extracelular da bomba provocando um aumento da concentração de Na^+ intracelular. O transporte de Ca^{2+} para fora da célula através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) é menor e a contractilidade do músculo cardíaco aumenta (figura 4). Por isso, os CTS são muito úteis no combate à insuficiência cardíaca [1,10,11].

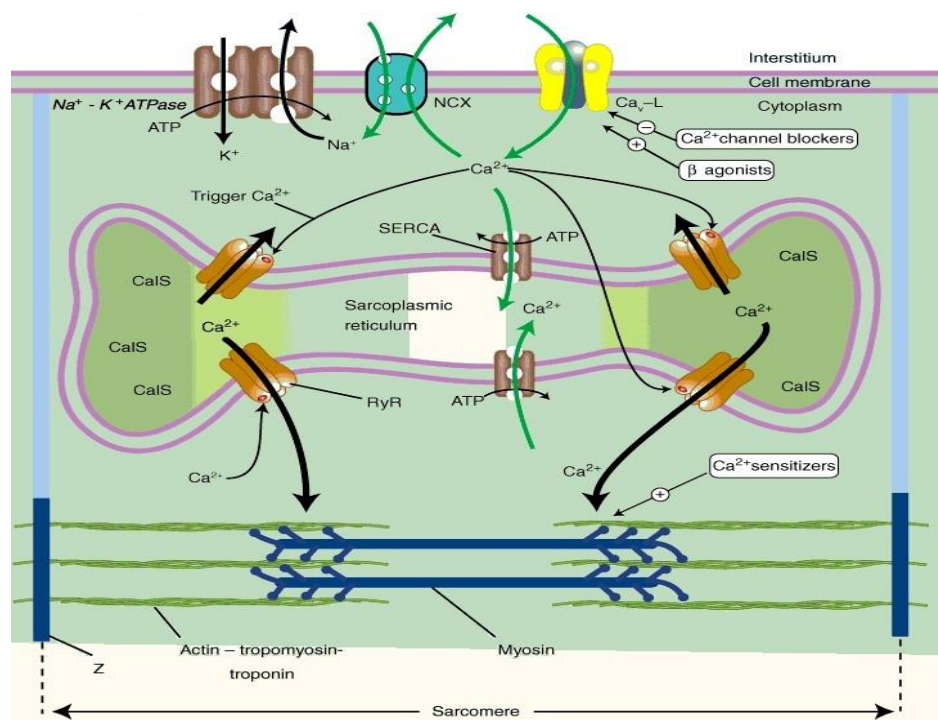


Figura 4 – Célula do músculo cardíaco [12]

Recentemente foi proposto que a Na^+/K^+ -ATPase forma um complexo com a tirosina cinase (Src) que após a sua activação induz a ligação do CTS à bomba, iniciando assim uma série de fosforilações dentro da célula. O CTS pode exercer um efeito na fisiologia celular e conduzir a um largo espectro de respostas celulares tais como, activação de genes, contacto célula-célula, proliferação e apoptose celular. O novo papel da Na^+/K^+ -ATPase como transdutor de sinal abriu uma nova perspectiva para o desenvolvimento de drogas anticancerígenas derivadas do CTS para o tratamento, por exemplo, do cancro da mama [1,13].

Existem muitos outros compostos que inibem a Na^+/K^+ -ATPase e que são utilizados para fins terapêuticos, tais como, a droga anti psicótica clorpromazina, o agente anti malária cloroquina [14] e o antibiótico gramicidina A [15].

4.2) Inibidores da H^+/K^+ -ATPase

As duas maiores doenças patológicas associadas à acidificação do tracto digestivo são as úlceras pépticas [16] que consistem na destruição da mucosa da parede do esófago e/ou do duodeno, e a doença de refluxo gastro esofágico (GERD) que se define como a passagem do conteúdo gástrico para o esófago na ausência de vômito [17].

O transporte dos prótons para o lúmen do estômago pela H^+/K^+ -ATPase constitui o último passo da segregação ácida, logo a inibição da bomba gástrica é alvo de estratégias terapêuticas no tratamento das complicações gástricas [1].

Os primeiros inibidores da H^+/K^+ -ATPase, derivados do benzimidazol, foram denominados de inibidores da bomba de prótons (PPIs) (figura 5).

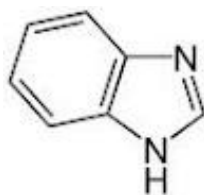


Figura 5 – Benzimidazol [1]

O omeprazol (figura 6), pertencente a família dos PPIs, é o inibidor mais utilizado no tratamento das úlceras pépticas e da GERD [1,18,19].

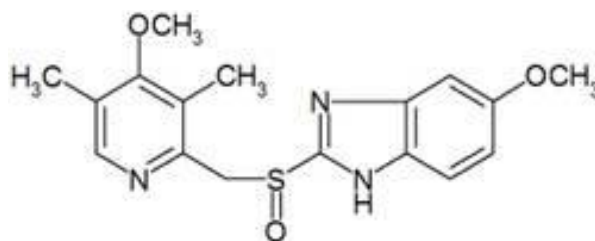


Figura 6 – Omeprazol [20]

Os PPIs ligam-se no lado extracelular da H^+/K^+ -ATPase sendo essa uma ligação irreversível. Para serem activados requerem a acidificação do meio envolvente pela activação dos transportadores de H^+ . Os inibidores são convertidos na forma activa chamada ácido sulfénico ou amidosulfano (figura 7) pelo ácido gástrico antes de reagirem com as cisteínas localizadas na superfície luminal da bomba [1,18,19].

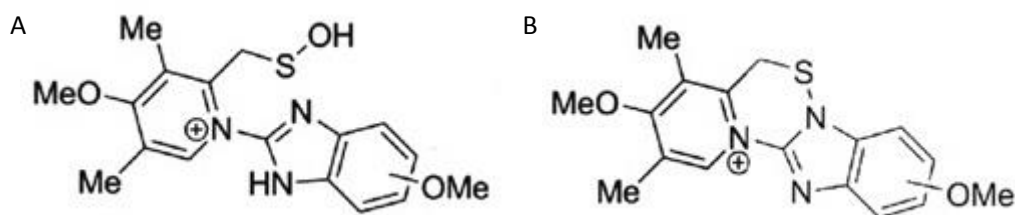


Figura 7 – A) Ácido sulfénico e B) amidosulfano [1]

Devido à existência de um mecanismo de activação, verifica-se um atraso da resposta celular à absorção dos PPIs. Por esta razão estão a ser criados inibidores de mais rápida actuação e independentes do meio envolvente. Esses novos inibidores denominam-se bloqueadores ácidos competitivos com o potássio (PCABs) e actuam como antagonistas de K^+

da H^+/K^+ -ATPase e a sua ligação à bomba pelo lado luminal da membrana é reversível. Os PCABs (figura 8) actuam mais rapidamente do que os PPIs uma vez que não necessitam de ser convertidos numa forma activa. A sua ligação à bomba é não covalente e por isso são necessárias grandes doses de modo a produzir um efeito comparável com o observado pela utilização de PPIs [1,18,19].

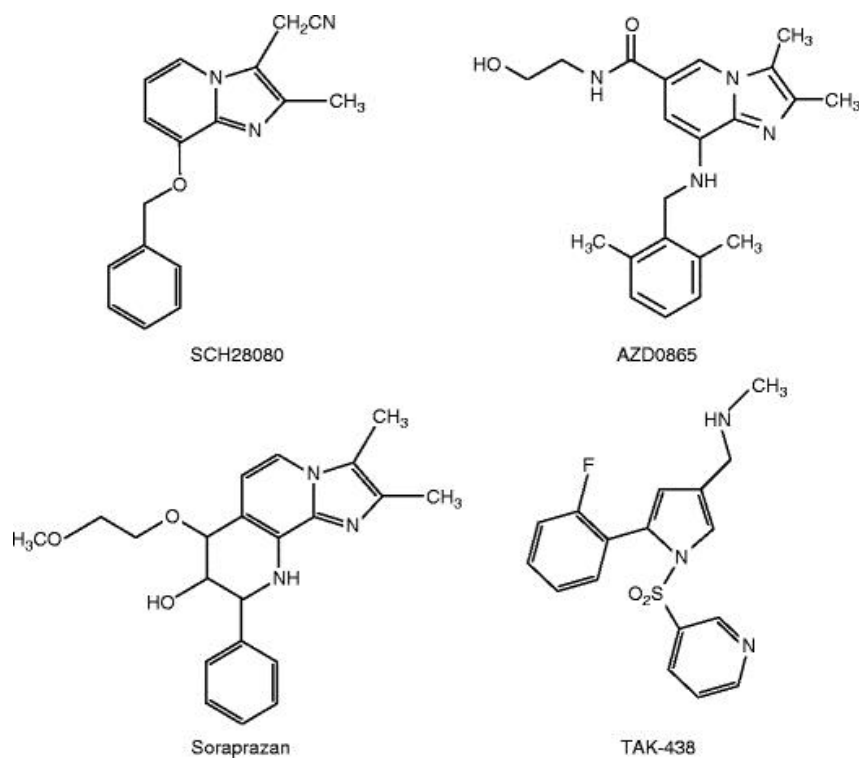


Figura 8 – Exemplos de PCABs [21]

Outros inibidores da H^+/K^+ -ATPase são o ácido scopadulcico B e os seus derivados que são agentes antivirais e actuam contra o vírus do herpes do tipo 1 [22], e as prodigiosinas que inibem vários tipos de bombas transportadoras de prótons incluindo a H^+/K^+ -ATPase [23].

4.3) Inibidores das SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase)

As SERCA são inibidas por vários compostos, tais como, tapsigargina (TG), ácido ciclopiazónico (CPA) e vanádio [1,7,8,24,25].

A tapsigargina (figura 9) é um dos inibidores mais eficazes para as SERCA.

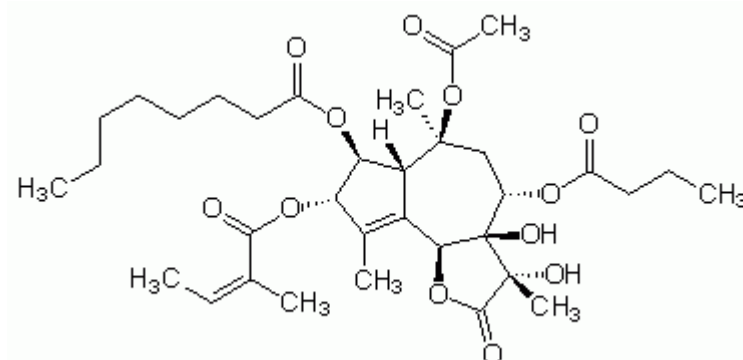


Figura 9 – Tapsigargina [26]

Vários estudos comprovam que a tapsigargina pode induzir a apoptose em diferentes tipos de células cancerígenas. A tapsigargina bloqueia a Ca^{2+} -ATPase aumentando a concentração intracelular de cálcio devido à sua passagem por difusão a partir do retículo endoplasmático. Este aumento de cálcio estimula a translocação de algumas proteínas para a membrana plasmática, entre elas o receptor IP3R e o complexo anexina V. Posteriormente verifica-se um aumento do influxo de cálcio para o citoplasma o que activa factores apoptóticos provocando a morte celular. A tapsigargina bloqueia todas as SERCA independentemente do tipo celular e a sua citotoxicidade é demasiado elevada para ser considerada um agente antitumoral comum [1,24]. Uma nova estratégia baseia-se na síntese de drogas inactivas que contenham a molécula de tapsigargina acoplada a um pequeno péptido. A tapsigargina é activada pela clivagem do péptido por proteases específicas. Através desta estratégia é possível sintetizar uma droga específica para um determinado alvo pela selecção de um péptido que seja apenas reconhecido por proteases presentes num determinado tipo celular. Este inibidor ou os seus derivados podem ser úteis na indução da apoptose das

células do cancro da próstata, uma vez que estas produzem proteases específicas que são segregadas para o fluido extracelular [1,27]. Para além disso, estas células crescem lentamente e por isso são difíceis de destruir por quimioterapia.

O ácido ciclopiazónico (figura 10) pode ter uma acção cardioprotectiva na isquemia do miocárdio, porque modula a actividade da bomba, o que afecta o ciclo relaxação/contractilidade do músculo cardíaco [1,24].

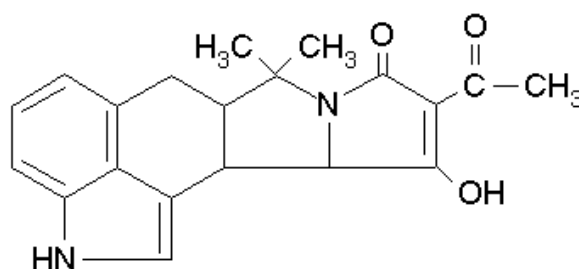


Figura 10 – Ácido ciclopiazónico [28]

Estudos cinéticos sugerem que o modo de inibição do vanádio, mais precisamente o vanadato e o decavanadato (figura 11), consiste na formação de um estado de transição semelhante ao intermediário fosforilado, bloqueando a bomba na conformação E2.

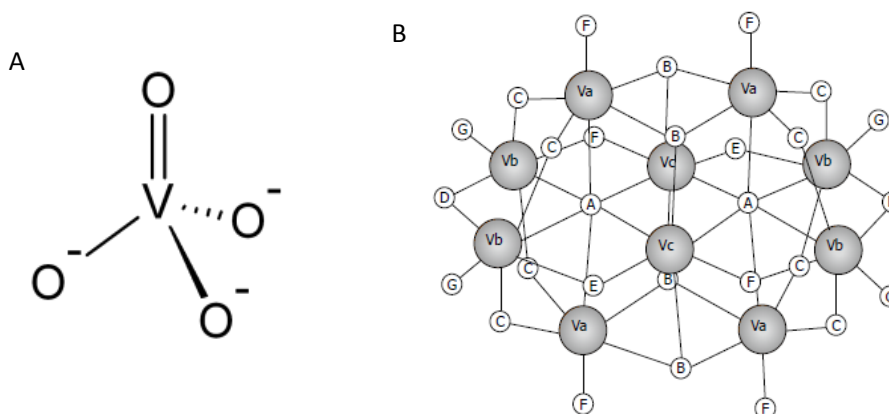


Figura 11 – A) vanadato [29] e B) decavanadato [8]

A interacção do vanadato e do decavanadato com as proteínas é favorecida pela existência de um local de ligação para o ATP, por isso, estas duas moléculas são bons inibidores das ATPases do tipo P, mais concretamente das SERCA [8,9].

Existem muitos outros agentes terapêuticos que inibem as SERCA, tais como, a ciclosporina A, que é utilizada como agente imunossupressor [30] e a celecoxib, que é uma droga anti-inflamatória [31].

5) Mecanismos moleculares de inibição das ATPases do tipo P

Através de vários estudos é possível definir os locais de ligação dos inibidores CTS, PCAB, PPI, TG e CPA à P-ATPase. O conhecimento da estrutura da bomba e o modo como os inibidores se ligam possibilita a produção de drogas específicas para alvos específicos.

5.1) Modo de actuação do inibidor CTS na Na^+/K^+ -ATPase

Os CTS interagem do lado extracelular da bomba mas a razão da sua grande afinidade continua desconhecida. Devido à inexistência de estruturas 3D de alta resolução do complexo inibidor-bomba não há uma completa compreensão do modo como os CTS actuam [1,32].

Estudos mutagénicos sugerem que os resíduos Gln111 e Asn122 das hélices transmembranares TM1 e TM2 são fundamentais na interacção dos CTS com a Na^+/K^+ -ATPase. Outros resíduos que poderão estar envolvidos na ligação do inibidor à bomba são: Cys104, Tyr108 e 124, Pro118 e Asp121 da TM1 e TM2; Tyr308, Leu330, Ala331, Thr338 e Cys367 da TM3 e TM4; Phe783 e 786, Leu793 e Thr797 do loop entre a TM5 e TM6; Phe863 e Arg880 do loop entre a TM7 e TM8; e Phe982 da TM10 [1,33].

Um dos estudos realizados para determinar o modo de interação dos inibidores com a bomba consistiu, através de técnicas de NMR, na utilização da Na^+/K^+ -ATPase de rim de porco e do inibidor da bomba (ouabaína). Concluiu-se que a parte esteróide da ouabaína é estabilizada por pontes de hidrogénio com os aminoácidos vizinhos enquanto a parte do açúcar fica para fora da superfície da proteína [34].

Num outro estudo foi construída a Na^+/K^+ -ATPase e introduziu-se manualmente o inibidor (ouabaína) do lado extracelular da bomba. Na conformação E2P o canal de entrada dos catiões está aberto do lado extracelular da membrana ficando o local de ligação dos catiões acessível aos K^+ extracelulares (figura 13) [1].

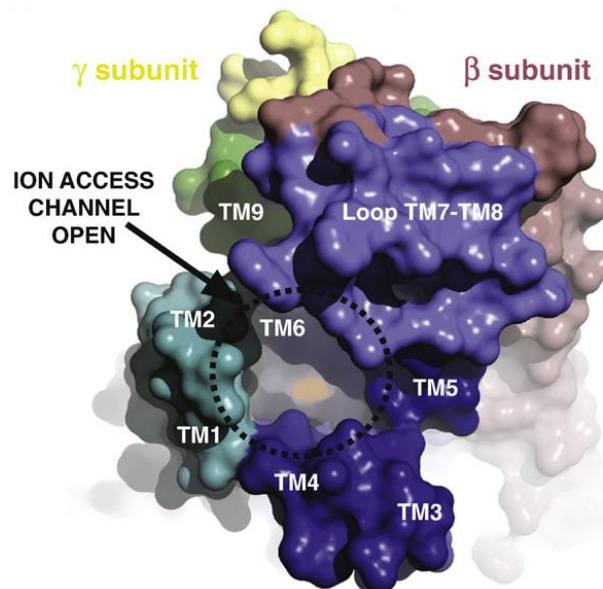


Figura 13 – Canal da Na^+ , K^+ -ATPase aberto [1].

Devido ao facto da bomba se encontrar na conformação E2P, uma grande cavidade está disponível (local de ligação dos catiões) no topo da região transmembranar para acomodar a ouabaína ou outro CTS (figura 14).

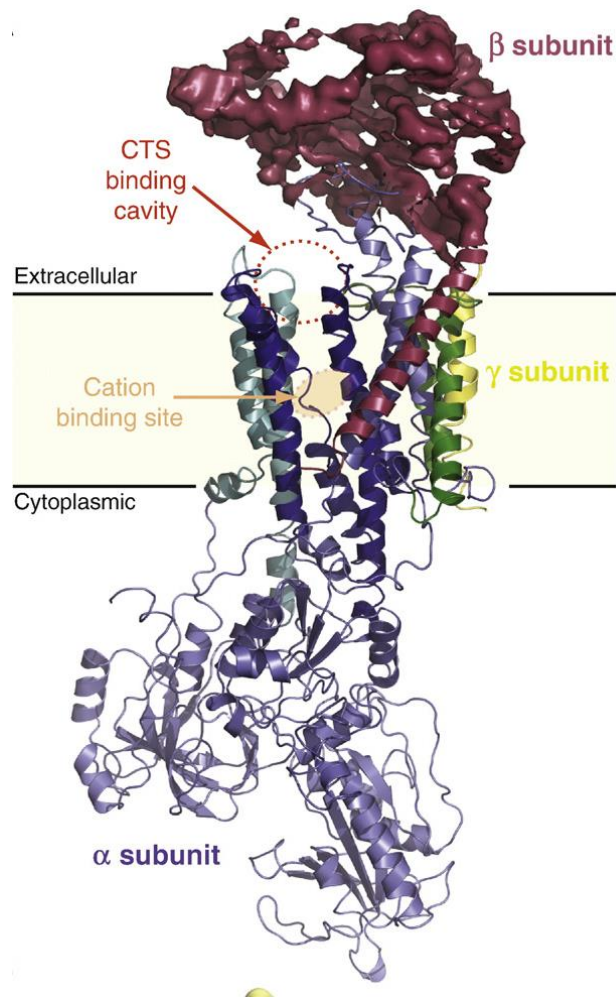


Figura 14 – Na⁺, K⁺-ATPase [1].

O inibidor ouabaína é posicionado próximo do loop entre a TM1 e TM2 e do loop entre a TM3 e TM4 (figura 15). Verificou-se que os resíduos envolvidos na ligação do inibidor à bomba são o Gln111, o Asn122, o Tyr308 e o Glu312, sendo o Phe783, o Leu793 e Thr797 (pertencem ao loop entre a TM5 e TM6) também são importantes nesta ligação.

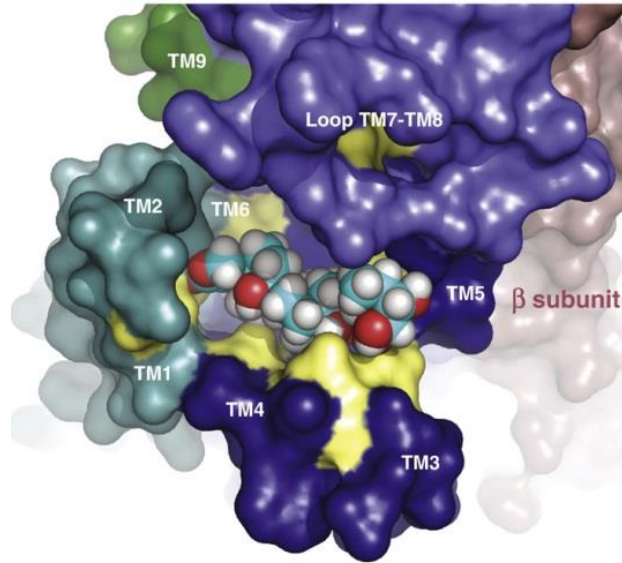


Figura 15 – Ouabaína na ATPase [1].

Quando o inibidor se liga à bomba na conformação E2P induz um rearranjo da estrutura proteica o que leva à formação de um complexo “sem saída”, no qual o loop TM5-TM6 se aproxima do loop TM3-TM4. Deste modo estreita-se a fenda quando o CTS se encontra ligado à P-ATPase, dificultando ou impedindo a passagem de catiões [1].

Pensa-se que nem todos os CTS bloqueiam o local de entrada de catiões com a mesma eficácia, uma vez que estes inibidores podem ter uma grande variedade de tamanhos.

5.2) Modo de actuação do inibidor PPI na H^+/K^+ -ATPase

Os PPIs ligam-se à bomba na conformação E2P, actuam como antagonistas dos catiões e bloqueiam a passagem dos iões K^+ provenientes do lado luminal da membrana. Quando são activados formam pontes dissulfeto com grupos tióis da H^+/K^+ -ATPase originando um complexo “sem saída” [19].

Através de estudos concluiu-se que os PPIs se ligam aos resíduos de cisteína 321, 813, 822 e 892 (figura 16) sendo o mais importante o resíduo 813 uma vez que todos os PPIs se ligam a este [35].

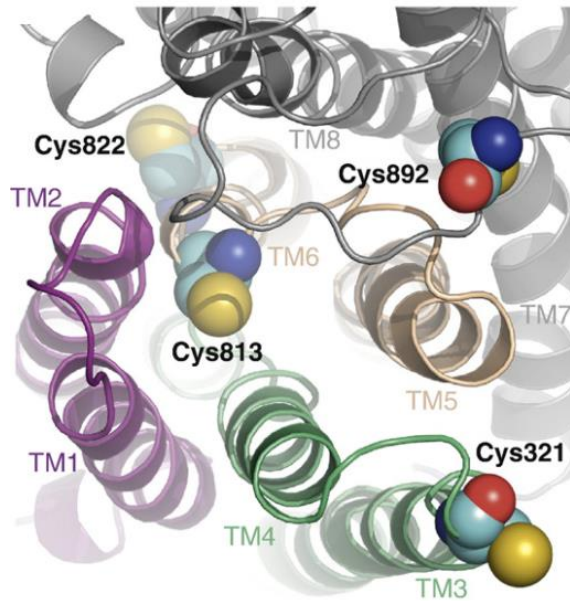


Figura 16 – Cisteínas envolvidas na ligação dos PPIs [1].

Um outro modo de actuação dos PPIs consiste na obstrução das mudanças conformacionais necessárias para que a bomba passe de E2P para E2.

5.3) Modo de actuação dos inibidores TG e CPA na SERCA

Através de estudos provou-se que os inibidores TG e CPA se ligam à SERCA na conformação E2, actuam como antagonistas do ião Ca^{2+} e previnem a ligação deste à bomba [1].

A TG e o CPA possuem locais diferentes de ligação à bomba (figura 17) e podem ser ocupados em simultâneo sem afectar as respectivas afinidades desses compostos para a SERCA.

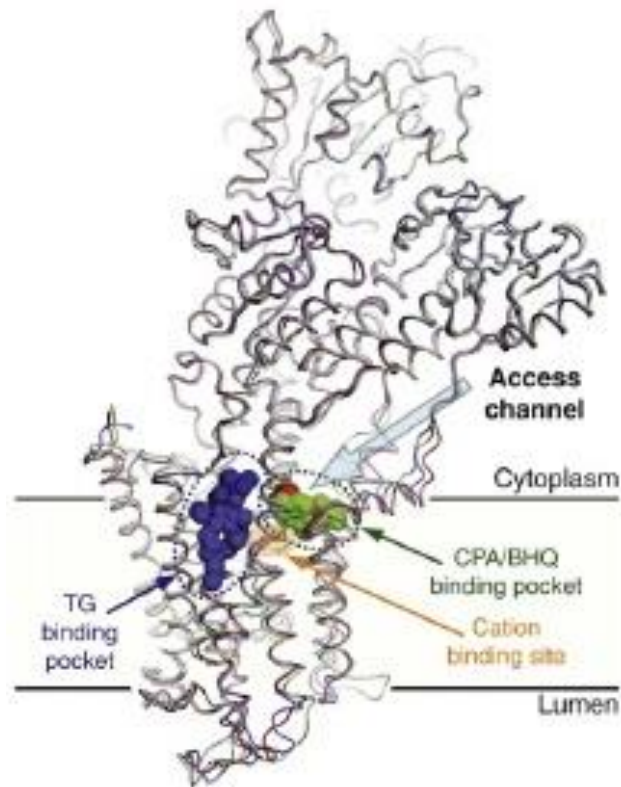


Figura 17 – Estrutura da Ca^{2+} -ATPase na conformação E2 e os diferentes locais de ligação do TG e CPA [1].

O local de ligação da TG está entre as hélices transmembranares TM3, TM4, TM5 e TM7 enquanto que o do CPA está entre as TM1, TM2, TM3 e TM4 (figura 18) [25,36].

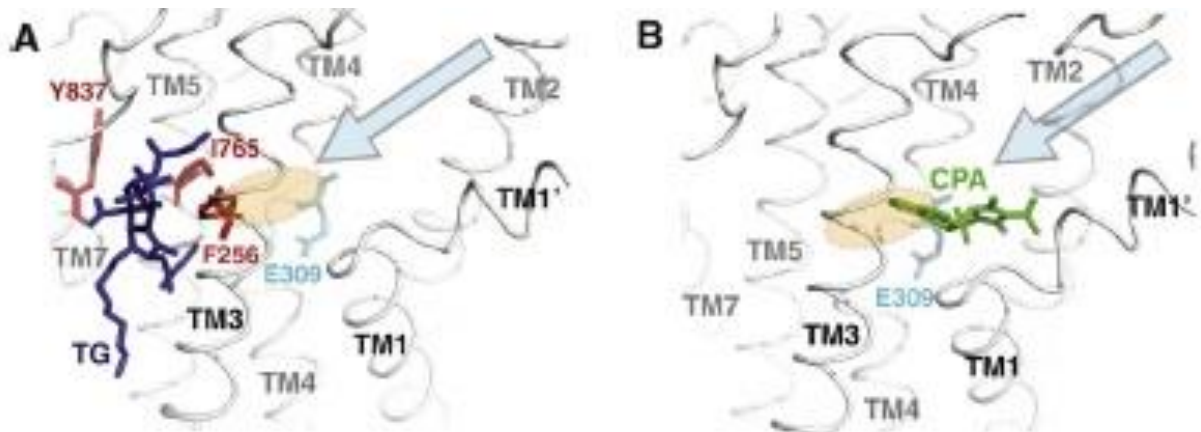


Figura 18 – Locais de ligação A) TG e B) CPA [1].

O CPA obstrui a entrada do cálcio citosólico e estabiliza a conformação E2. A sua interação com os resíduos vizinhos ajuda a empurrar o TM1 e o TM2 para TM4 fechando o canal de acesso dos íons. O resíduo de Glu309 (E309, representado em azul claro na figura 5) funciona como uma porta e é bloqueado pelo inibidor. O CPA previne que a cadeia lateral do resíduo E309 se estenda para a entrada do canal [1,36].

A TG tem um modo de inibição diferente que consiste na imobilização das TM3, TM5 e TM7 em posições que são incompatíveis com a ligação do cálcio. Os resíduos envolvidos na ligação da TG à bomba são Phe256, Ile765 e Tyr837. O Phe256 sofre uma mudança conformacional dentro da proteína quando os íons de cálcio se ligam. Com a TG presente não ocorre a mudança conformacional por parte do resíduo Phe256 levando a proteína a ficar presa num complexo “sem saída” irreversível devido à grande afinidade da TG para a SERCA [37].

Em suma, dos 5 inibidores analisados, os CTS, os PPIs e os PCABs ligam-se preferencialmente à conformação E2P, enquanto que a TG e o CPA se ligam à conformação E2 (figura 19).

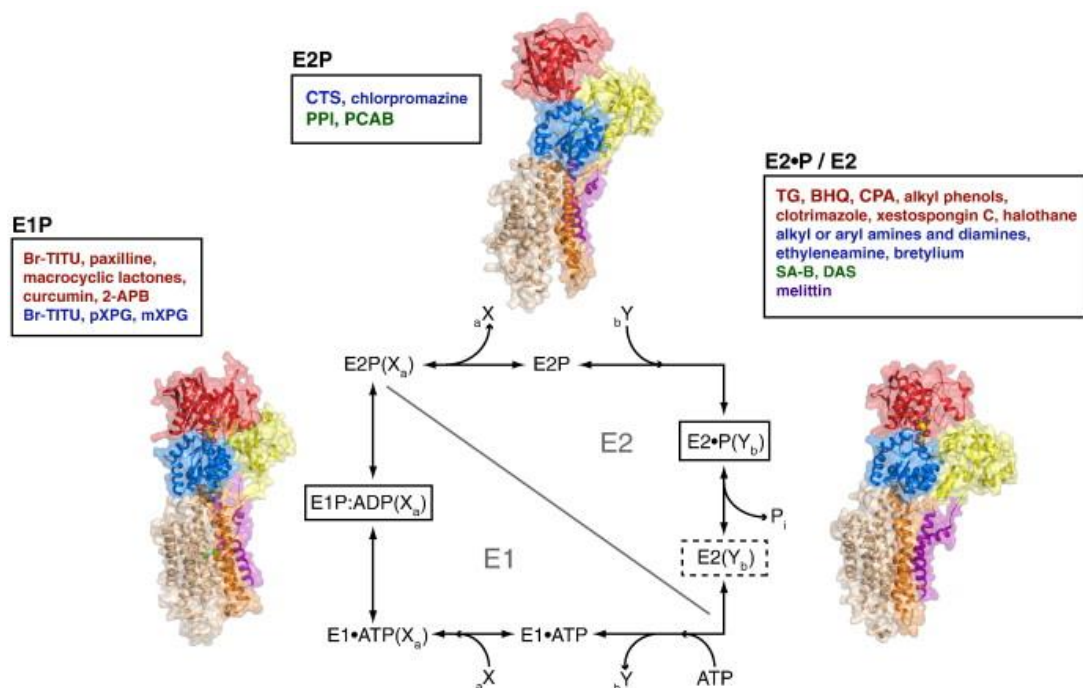


Figura 19 – Locais de ligação dos inibidores estudados [1]

6) Conclusão/Discussão/Perspectivas futuras

As ATPases do tipo P ou P-ATPases são enzimas transmembranares que controlam o fluxo de iões, tais como K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , em diferentes células e organelos celulares. Estes iões controlam muitas funções celulares, por exemplo, a contracção muscular e apoptose. Devido ao importante papel enzimático, a modulação da actividade das ATPases do tipo P pode ser útil para o tratamento de várias doenças, desde cancros a isquemia do miocárdio.

Existe uma grande diversidade de inibidores para as ATPases do tipo P. De 18 principais inibidores das bombas Na^+/K^+ ; K^+/H^+ e Ca^{2+} -ATPase são conhecidos os mecanismos de acção de 10 (palitoxina, omeprazole, PCAB, ácido scopadulcico B, tapsigargina, ácido ciclopiazónico, curcumina, 2,5-(*t*-butil)-dihidroxibenzeno, oubaína e vanádio).

Os CTS são utilizados para combater a insuficiência cardíaca. Estes inibidores interagem do lado extracelular da bomba mas a razão da sua grande afinidade é desconhecida. Os CTS podem ter uma grande variedade de tamanhos e por isso não é certo que todos bloqueiem a bomba com a mesma eficácia. O complexo formado pela Na^+/K^+ -ATPase com tirosina cinase poderá ter um papel importante como transdutor de sinal. Novos inibidores derivados dos CTS têm vindo a ser desenvolvidos com o objectivo de tratar o cancro da mama.

A inibição da H^+/K^+ -ATPase é muito útil para o tratamento de complicações gástricas. Os PPIs foram os primeiros inibidores deste enzima, dos quais se destaca o omeprazol, que é utilizado para o tratamento de úlceras pépticas e da GERD. Este tipo de inibidor liga-se à bomba irreversivelmente e tem de ser convertido numa forma activa, o que atrasa a resposta celular à sua absorção. Os PCABs são mais rápidos a actuar, independentes do meio envolvente e não precisam de activação. Estes actuam com antagonistas do catião K^+ (substrato da bomba), ligam-se não covalentemente e essa ligação é reversível e, por isso, são necessárias grandes doses para produzir um efeito comparável com o observado pelos PPIs.

A SERCA é um enzima importante para o funcionamento das células. Os inibidores mais utilizados são a tapsigargina, o ácido ciclopiazónico e o vanádio. O primeiro bloqueia todas as SERCA independentemente do tipo celular e a sua citotoxicidade é muito elevada para ser considerado um agente anti-tumoral comum. A tapsigargina induz a apoptose em diferentes tipos de células cancerígenas. Desenvolveu-se uma nova estratégia de maneira a que derivados da tapsigargina actuem especificamente num tecido alvo e não sejam tóxicos para todos os outros tecidos ou células. Esta nova estratégia pode ser promissora para o tratamento do cancro da próstata. O ácido ciclopiazónico pode ter uma acção cardioprotectiva na isquemia do miocárdio, uma vez que controla a actividade da bomba, o que afecta o ciclo relaxação/contractilidade. O vanádio, mais precisamente o vanadato e o decavanadato, são inibidores muito específicos para as SERCA e a sua ligação à bomba é favorecida pela existência de um sítio de ligação do ATP.

Num futuro próximo, espera-se que o conhecimento da estrutura dos complexos enzima-inibidor levará ao desenvolvimento de inibidores cada vez mais específicos e menos tóxicos para as células; assim como novas estratégias, de inibição das P-ATPases, promissoras para o tratamento de várias doenças, como cancros.

Referências bibliográficas:

[1] L. Yatime, M. J. Buch-Pedersen, M. Musgaard, J. P. Morth, A. M. L. Winther, B. P. Pedersen, C. Olesen, J. P. Andersen, B. Vilsen, B. Schiøtt, M. G. Palmgren, J. V. Møller, P. Nissen, N. Fedosova, P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science, *Biochimica et Biophysica Acta* 1787 (2009) 207-220

[2] D. S. Perlin, Ion pumps as targets for therapeutic intervention, *Electronic Journal of Biotechnology* volume 1 (1998)

[3] http://cbme.usp.br/cbme/index.php/news_site/como_funciona/como_funciona_a_cristalografia_por_difracao_de_raios_x (10/7/2012)

[4] http://www.uff.br/genetica_animal/mutacao.pdf (10/7/2012)

[5] http://www.google.pt/imgres?q=mechanism+e1+e2+calcium&hl=pt-PT&biw=1241&bih=584&tbnid=Zm9FwNxHkqtsQM:&imgrefurl=http://www.comprehensivephysiology.com/WileyCDA/CompPhysArticle/refId-c110034.html&docid=oooPAoosXsV4YM&imgurl=http://media.wiley.com/mrw_images/compphys/articles/c110034/image_n/nc11003402.jpg&w=550&h=272&ei=a211UMafOsq10QWX4oD4Dw&zoom=1&iact=hc&vpx=773&vpy=20&dur=2464&hovh=159&hovw=320&tx=157&ty=111&sig=102299735750958295396&page=1&tbnh=79&tbnw=158&start=0&ndsp=24&ved=1t:429,r:13,s:0,i:107 (5/9/2012)

[6] http://bio1151b.nicerweb.com/Locked/media/ch07/07_16SodiumPotassiumPum_7-L.jpg (5/9/2012)

[7] http://www.google.pt/imgres?q=atpase+p+type+regions&hl=pt-PT&biw=1241&bih=584&tbnid=3FyeZiF5UQQzRM:&imgrefurl=http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0001379.html&docid=YZBPs4SL7dNGeM&imgurl=http://media.wiley.com/mrw_images/els/articles/a0001379/image_n/nfgz004.gif&w=351&h=559&ei=hG11UPHGLOSn0QWSk4DYDA&zoom=1&iact=hc&vpx=429&vpy=46&dur=421&hovh=283&hovw=17&t

x=80&ty=173&sig=102299735750958295396&page=3&tbnh=121&tbnw=75&start=56&ndsp=33&ved=1t:429,r:19,s:56,i:306 (5/9/2012)

[8] M. Aureliano, Recent perspectives into biochemistry of decavanadate, *World Journal of Biological Chemistry* 10 (2011) 215-225

[9] M. Aureliano, R. M. C. Gândara, Decavanadate effects in biological systems, *Journal of Inorganic Biochemistry* 99 (2005) 979-985

[10] S. Paula, M.R. Tabet, W.J. Ball Jr, Interactions between cardiac glycosides and sodium/potassium-ATPase: three-dimensional structure–activity relationship models for ligand binding to the E2-Pi form of the enzyme versus activity inhibition, *Biochemistry* 44 (2005) 498–510.

[11] W. Schoner, G. Scheiner-Bobis, Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action, *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 7 (2007) 173–189.

[12] http://www.google.pt/imgres?q=atpase+p+type+in+cardiac+cell&start=171&um=1&hl=pt-PT&biw=1241&bih=584&tbn=isch&tbnid=jDxfhBtPzGAFIM:&imgrefurl=http://basic-clinical-pharmacology.net/chapter%252013_%2520drugs%2520used%2520in%2520heart%2520failure.htm&docid=zGOYWzrOrs3BOM&imgurl=http://basic-clinicalpharmacology.net/chapter%25252013_%252520drugs%252520used%252520in%252520heart%252520failure_files/image007.gif&w=739&h=982&ei=6bN1UPfUFpGzhAeqw4HYAg&zoom=1&iact=hc&vpx=97&vpy=106&dur=327&hovh=260&hovw=196&tx=109&ty=140&sig=102299735750958295396&page=7&tbnh=132&tbnw=100&ndsp=28&ved=1t:429,r:21,s:171,i:339
(5/9/2012)

[13] S.V. Pierre, Z. Xie, The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership, *Cell Biochem. and Biophys.* 46 (2006) 303–315.

[14] D. Bhattacharyya, P.C. Sen, The effect of binding of chlorpromazine and chloroquine to ion transporting ATPases, *Mol. Cell. Biochem.* 198 (1999) 179–185

[15] Y. Takada, K. Matsuo, T. Kataoka, Gramicidin A directly inhibits mammalian Na⁺/K⁺-ATPase, *Mol. Cell. Biochem.* 319 (2008) 99–103.

[16] <http://www.manualmerck.net/?id=128&cn=1088> (consultado em 23/6/2012)

[17] http://www.hsm.min-saude.pt/contents/pdfs/GastroEnterologia/DOENCA_GASTROESOFAGICO.pdf (consultado em 23/6/2012)

[18] G. Sachs, J.M. Shin, O. Vagin, N. Lambrecht, I. Yakubov, K. Munson, The gastric H,K ATPase as a drug target: past, present, and future, *J. Clin. Gastroenterol.* 41 (2007) S226–2242.

[19] J.M. Shin, G. Sachs, Gastric H,K-ATPase as a drug target, *Dig. Dis. Sci.* 51 (2006) 823–833.

[20] http://www.google.pt/imgres?q=omeprazole+structure&num=10&um=1&hl=pt-PT&biw=1241&bih=584&tbm=isch&tbnid=iyNkCl7YuzYLxM:&imgrefurl=http://www.pharmainfo.net/reviews/proton-pump-inhibitors-overview&docid=KpCLz2dyTbmKlM&imgurl=http://www.pharmainfo.net/files/images/stories/article_images/Omeprazole.jpg&w=250&h=101&ei=b7Z1UOb8KJG2hAe8z4GoCA&zoom=1&iact=hc&vpx=120&vpy=197&dur=586&hovh=80&hovw=200&tx=47&ty=49&sig=102299735750958295396&sqi=2&page=1&tbnh=66&tbnw=160&start=0&ndsp=19&ved=1t:429,r:0,s:0,i:67 (5/9/2012)

[21] http://www.google.pt/imgres?q=potassium+competitive+acid+blockers+structure&hl=pt-PT&biw=1241&bih=584&tbm=isch&tbnid=JOIts8moNiHrM:&imgrefurl=http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007_s11894-010-0149-5-10&docid=Oj5fpggfk-n_bM&imgurl=http://www.springerimages.com/img/Images/Springer/JOU%253D11894/VOL%253D2010.12/ISU%253D6/ART%253D149/MediaObjects/MEDIUM_11894_2010_149_Fig11_HTML.jpg&w=535&h=470&ei=57d1UNi-KcjMhAf95YCIBw&zoom=1&iact=hc&vpx=83&vpy=130&dur=988&hovh=210&hovw=240&tx=81&ty=91&sig=102299735750958295396&page=1&tbnh=111&tbnw=125&start=0&ndsp=22&ved=1t:429,r:0,s:0,i:67 (5/9/2012)

[22] S. Asano, M. Mizutani, T. Hayashi, N. Morita, N. Takeguchi, Reversible inhibitions of gastric H⁺,K⁺-ATPase by scopadulcic acid B and diacetyl scopadol, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 22167–22173.

[23] H. Matsuya, M. Okamoto, T. Ochi, A. Nishikawa, S. Shimizu, T. Kataoka, K. Nagai, H.H. Wasserman, S. Ohkuma, Reversible and potent uncoupling of hog gastric (H⁺+K⁺)-ATPase by prodigiosins, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1855–1863.

[24] Y. Sagara, G. Inesi, Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13503–13506.

[25] K. Moncoq, C.A. Trieber, H.S. Young, The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 9748–9757.

[26] http://www.google.pt/imgres?q=thapsigargin+structure&hl=pt-PT&sa=X&biw=1241&bih=584&tbn=isch&tbnid=_RupPwJvAtVVnM:&imgrefurl=http://www.fermentek.co.il/thapsigargin.htm&docid=leELtAIzxMhZrM&imgurl=http://www.fermentek.co.il/struct/Thapsigargin.gif&w=388&h=213&ei=Erl1UIom1JiFB-v_gYgJ&zoom=1&iact=hc&vpx=64&vpy=156&dur=149&hovh=167&hovw=303&tx=113&ty=74&sig=102299735750958295396&page=1&tbnh=83&tbnw=151&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:0,s:0,i:67 (5/9/2012)

[27] H. Sørensen, A.M. Jensen, J.V. Møller, P. Nissen, S.R. Denmeade, J.T. Isaacs, C.E. Olsen, S.B. Christensen, Natural products as starting materials for development of second-generation SERCA inhibitors targeted towards prostate cancer cells, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 2810–2815.

[28] http://www.google.pt/imgres?q=cyclopiazonic+acid+structure&hl=pt-PT&sa=X&biw=1241&bih=584&tbn=isch&tbnid=gFSjJO9synYHaM:&imgrefurl=http://www.fermentek.co.il/cyclopiazonic_acid.htm&docid=55uOicKOsZkZpM&imgurl=http://www.fermentek.co.il/struct/cyclopiazonicacid.gif&w=350&h=177&ei=Ibp1UMyTGoWnhAefvYGICw&zoo

m=1&iact=hc&vpx=528&vpy=164&dur=53&hovh=141&hovw=280&tx=121&ty=95&sig=102299735750958295396&page=1&tbnh=72&tbnw=142&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:3,s:0,i:76 (5/9/2012)

[29] http://www.google.pt/imgres?q=vanadato&hl=pt-PT&biw=1241&bih=584&tbn=isch&tbnid=9QZ4BOGTFeR4dM:&imgrefurl=http://es.wikipedia.org/wiki/Vanadato&docid=VhXI0daJkzbcM&imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5c/Vanadate_diagram.png/150px-Vanadate_diagram.png&w=150&h=165&ei=ibt1UPC3NeGw0QWR6IHIBA&zoom=1&iact=hc&vpx=115&vpy=174&dur=231&hovh=132&hovw=120&tx=129&ty=55&sig=102299735750958295396&page=1&tbnh=122&tbnw=111&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:0,s:0,i:67 (5/9/2012)

[30] J.G. Bilmen, L.L. Wootton, F. Michelangeli, The inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by macrocyclic lactones and cyclosporine A, *Biochem. J.* 366 (2002) 255–263.

[31] A.J. Johnson, A-L. Hsu, H-P. Lin, X. Song, C-S. Chen, The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks, *Biochem. J.* 366 (2002) 831–837

[32] O. Hansen, Interaction of cardiac glycosides with $(\text{Na}^{++}\text{K}^{+})$ -activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced inotropy, *Pharmacol. Rev.* 36 (1984) 143–163.

[33] M.L. Croyle, A.L. Woo, J.B. Lingrel, Extensive random mutagenesis analysis of the $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase alpha subunit identifies known and previously unidentified amino acid residues that alter ouabain sensitivity — implications for ouabain binding, *Eur. J. Biochem.* 248 (1997) 488–495.

[34] D.A. Middleton, S. Rankin, M. Esmann, A. Watts, Structural insights into the binding of cardiac glycosides to the digitalis receptor revealed by solid-state NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 13602–13607.

[35] N. Lambrecht, Z. Corbett, D. Bayle, S.J. Karlish, G. Sachs, Identification of the site of inhibition by omeprazole of a alpha–beta fusion protein of the H,K-ATPase using site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13719–13728.

[36] M. Takahashi, Y. Kondou, C. Toyoshima, Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 5800–5805.

[37] C. Xu, H. Ma, G. Inesi, M.K. Al-Shawi, C. Toyoshima, Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the Ca²⁺ ATPase SERCA, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 17973–17979.