

Universidade do Algarve

**Efeitos *in vivo* de oligómeros de
vanadato em marcadores de stresse
oxidativo**

Relatório de estágio científico da Licenciatura em
Bioquímica

Ricardo Miguel da Cruz Gândara

Orientadores: Professor Doutor Manuel Aureliano Alves (FCT)
Professor Doutor Carlos Gutiérrez-Merino (UnEx)
Doutora Natércia Joaquim (FCMA)

Faro
2003

Este trabalho é da exclusiva responsabilidade do autor.

Este trabalho é dedicado ao meu avô

Luis Ferreira Gândara Sobrinho

“O Saber não ocupa lugar”

Agradecimentos

Este relatório não estaria completo sem um agradecimento aos que me proporcionaram a realização deste trabalho. Sozinho não teria conseguido, Obrigado!

Gostava de agradecer ao Professor Doutor Manuel Aureliano Alves, porque me acolheu prontamente no seu laboratório, incentivando-me a trabalhar neste projecto. Pela sua amizade ao longo deste trabalho e orientação preocupada, Obrigado!

Ao professor Doutor Carlos Guriérrez-Merino, por me ter orientado numa “aventura”, possibilitada pelo projecto Sócrates-Erasmus. A sua orientação demonstrou-me o quão sou “pequeno”, contrastando com a “grandeza” do seu conhecimento, o que me incentivou a tentar sempre ser melhor, Obrigado!

Ao Grupo de Fisopatologia Cardiovascular Comparada, principalmente, à Doutora Natércia Joaquim, por me ter permitido a elaboração deste trabalho orientando-me na parte “fisiológica” do trabalho. Um agradecimento também à Gisela que me auxiliou no início do trabalho de estágio. Obrigado!

Um agradecimento especial à Sandra Soares, que me acompanhou na aventura espanhola, tornando-a mais agradável e de facilitando a minha adaptação. Obrigado!

Obrigado ao “pessoal” do “meu” laboratório. Teresa, Adélia, Adriana, Andrea, sem vocês para alegrar os meus dias tudo era mais cinzento. Obrigado!

Obrigado ao Alejandro e ao Fran pelo seu auxílio em terras de “nuestros hermanos”.

O agradecimento maior é dirigido à minha família. Eles são os meus alicerces e tudo o que sou é obra deles, espero nunca os desapontar! Obrigado Mãe, Pai e Joana, pelo vosso amor incondicional.

Às minhas avós, porque estão sempre comigo, ajudando-me a pensar que o dia de amanhã será sempre melhor, um beijinho muito grande.

Para a Amy: o meu agradecimento só pode ser tão grande como o Amor que sinto por ti! Obrigado por estares sempre a meu lado!

A todos os meus amigos, principalmente ao meu primo Tiago, ao Patrício, Leo, Vasco, Favinha, Rui, Carlos (Baco), Ana Lúcia, Sara, que fizeram deste ano, um ano não só de trabalho, mas também de diversão suportada pela vossa grande amizade. Obrigado!

Abstract

Nowadays it is accepted that disturbances in transition metals homeostasis are related to changes in the oxidative status, depleting antioxidant substances and/or raising prooxidant ones or altering the activities of key enzymes in the antioxidant defence. Vanadium is probably involved in such effects. However when its toxicity is studied it is normally misregarded the formation of different vanadate oligomers with different structures, chemical properties and biochemical effects. Liver is one of the organs affected by transition-metals toxicity due to its accumulation.

This work's goal was to seek evidences that show different effects promoted by different vanadate oligomers. We have monitored several markers of oxidative stress by using fluorometric and spectroscopic techniques, and we analysed the ***in vivo* effect of** an acute exposure (12, 24 hours and 7 days), to a sub-lethal concentration (5 mM; 1 mg/kg) of two vanadium solutions (**metavanadate** and **decavanadate**), on hepatic tissue of *Halobatrachus didactylus* (toadfish).

We observed that decavanadate promote different effects than metavanadate in several parameters, namely catalase activity, glutathione content, lipid peroxidation, mitochondrial superoxide anion production and vanadium accumulation. The results show that under defined experimental conditions, both solutions seem to equally depress ROS production as well as total intracellular reducing power.

Resumo

Actualmente é aceite que perturbações na homeostasia de metais de transição estão de certa forma ligados a com variações ao nível oxidativo, quer promovendo a depleção de substâncias anti-oxidantes e/ou aumentando a promoção de espécies pro-oxidantes ou alterando a atividade de enzimas com papel fundamental na defesa anti-oxidante. O vanádio está provavelmente envolvido neste tipo de efeitos. No entanto grande parte dos estudos toxicológicos de vanádio, especialmente na forma vanadato, é simplesmente esquecida ou ignorada a formação de diferentes espécies com diferentes estruturas, propriedades químicas e efeitos bioquímicos. O tecido hepático é afectado pela toxicidade de metais de transição devido à acumulação destes no fígado.

O objectivo deste estágio científico é mostrar diferenças nos efeitos promovidos por decavanadato e por mono e metavanadatos *in vivo*. Foram analisados diversos marcadores de stresse, usando técnicas de espectroscopia de absorção e fluorescência, do tecido hepático de *Halobatrachus didactylus* (charroco), após exposição (12, 24 horas e 7 dias) de duas soluções de vanadato (**metavandato** e **decavanadato**), numa dose sub-letal (5 mM; 1 mg/kg).

Foi observado que o decavanadato promove efeitos distintos do metavandato em vários parâmetros nomeadamente na actividade da catalase, na concentração de GSH, produção de $\cdot\text{O}_2^-$, peroxidação lipídica e na acumulação de vanádio. Em condições experimentais definidas, tanto meta como decavandato diminuem a produção de ROS e a CRT.

Abreviaturas

AcPn	Ácido cis-Parinário
ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
AMPc	Adenina mono Fosfato cíclica
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
CAT	Catalase
cGMP	Guanina mono Fosfato cíclica
CoA	Coenzima A
Cl-VPO	CloroPeroxidase de Vanádio
CRT	Capacidade Redutora Total
DCF	Di-cloro Fluoresceína
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
ER	Retículo Endoplasmático
EAA	Espectroscopia de absorção atômica
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione dissulfídica
HIF-1	Factor de indução de hipóxia
HO-1	Gene da heme oxigenase
H-VPO	Haloperoxidases de vanádio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reduzida)
NF-kB	Factor nuclear kB

·OH	Radical hidroxilo
O ₂	Oxigénio molecular
·O ₂ ⁻	Anião superóxido
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
u.a.	Unidades arbitrárias
UAlg	Universidade do Algarve
U	Unidade de actividade enzimática
UnEx	Universidade da Extremadura
X ⁻	Haletos

Índice

<i>Agradecimentos</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>v</i>
<u>I. INTRODUÇÃO</u>	14
I.1. STRESSE OXIDATIVO	14
I.1.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA	14
I.1.2. QUÍMICA DAS ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO	15
I.1.3. PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO	17
I.1.3. ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	19
I.1.3.1. Efeitos nocivos em biomoléculas	19
I.1.3.2. Patologias associadas aos radicais livres	21
I.1.3.3. Mecanismos de defesa anti-oxidante	22
I.1.3.3.1. Enzimas anti-oxidantes	22
I.1.3.3.2. Glutathiona reduzida	24
I.1.3.4. Formas de regulação pelas espécies reactivas de oxigénio	24
I.2. VANÁDIO	27
I.2.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA	27
I.2.2. OCORRÊNCIA E USOS DE VANÁDIO	28
I.2.3. QUÍMICA DO VANÁDIO	29
I.2.3.1. Vanádio (IV): vanadilo	30
I.2.3.2. Vanádio (V): vanadato	30

I.2.4. BIOQUÍMICA DE VANÁDIO	32
I.2.4.1. Enzimas contendo vanádio	32
I.2.4.2. Modulação enzimática por vanádio	34
I.2.5. VANÁDIO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	36
I.2.5.1. Acumulação e metabolismo	36
I.2.5.2. Efeitos fisiológicos e toxicológicos	38
I.3. VANÁDIO & STRESSE OXIDATIVO.....	39
I.4. HALOBACTRACHUS DIDACTYLUS.....	41
I.5. OBJECTIVOS.....	41
<u>II. MÉTODOS</u>	43
II.1. CAPTURA E ACLIMATAÇÃO DOS INDIVÍDUOS	43
II.2. FORMAÇÃO DE GRUPOS DE ESTUDO	43
II.2.1. 1ª FASE	43
II.2.2. 2ª FASE	45
II.3. ELABORAÇÃO DE SOLUÇÕES DE VANADATO	45
II.4. ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA	46
II.5. SACRIFÍCIO E RECOLHA DE TECIDOS.....	47
II.6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS (1ª FASE)	47
II.6.1. PREPARAÇÃO DE FRACÇÃO TOTAL	47
II.6.2. PREPARAÇÃO DE FRACÇÕES SUBCELULARES	48
II.6.2.1. Fracção mitocondrial.....	48
II.6.2.2. Fracção citosólica	49
II.7. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS (2ª FASE)	49
II.7.1. FRACÇÃO TOTAL	49

II.7.2. FRACÇÃO MITOCONDRIAL.....	49
II.8. MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS	50
II.9. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	50
II.10. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE	51
II.11. QUANTIFICAÇÃO DE VANÁDIO	52
II.11.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE VANÁDIO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA	53
II.11.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA.....	54
II.11.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE VANÁDIO	55
II.11.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	56
II.12. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	56
II.13. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE PRO-OXIDANTE TOTAL	58
II.14. PRODUÇÃO DE ANIÃO SUPERÓXIDO E CAPACIDADE REDUTORA TOTAL	59
II.15. AVALIAÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	60
II.16. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA NADH OXIDASE	61
II.17. TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
 III. RESULTADOS	 63
 III.1. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE	63
III.2. QUANTIFICAÇÃO DE VANÁDIO	66
III.3. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	69
III.4. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE PRO-OXIDANTE TOTAL	70
III.5. PRODUÇÃO DE ANIÃO SUPERÓXIDO E CAPACIDADE REDUTORA TOTAL	71
III.6. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	73
 IV. DISCUSSÃO	 75

IV.1. EFEITOS DOS OLIGOVANADATOS NA ACTIVIDADE DA CATALASE	77
IV.2. EFEITOS DOS OLIGOVANADATOS NA ACUMULAÇÃO DE VANÁDIO NO TECIDO HEPÁTICO	79
IV.3. EFEITOS DOS OLIGOVANADATOS NA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA.....	81
IV.4. EFEITOS DOS OLIGOVANADATOS NA ACTIVIDADE PRO-OXIDANTE	83
IV.5. EFEITOS DOS OLIGOVANADATOS NA PRODUÇÃO DE ANIÃO SUPERÓXIDO E NA CAPACIDADE REDUTORA TOTAL	84
IV.6. EFEITOS DOS OLIGOVANADATOS NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	85
<u>V. CONCLUSÕES</u>	87
<u>VI. ESTUDOS FUTUROS</u>	89
<u>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	90

I. Introdução

I.1. Stresse Oxidativo

I.1.1. Perspectiva histórica

A ocorrência de stresse oxidativo num sistema celular foi descrito como uma alteração no balanço entre espécies pró-oxidantes e espécies anti-oxidantes a favor das primeiras (Sies, 1985). Dröge separou historicamente o conhecimento sobre os efeitos de espécies pró-oxidantes em três etapas: 1) a descoberta da existência de radicais livres em sistemas biológicos, à aproximadamente 50 anos, após a qual surgiu a hipótese dos radicais serem formados *in vivo* como sub-produtos de reacções enzimáticas, proposta por Denham Harman que mais tarde descreveu os radicais livres como a “caixa de Pandora” de males como o dano celular extensivo, a mutagénese, o cancro e o envelhecimento; 2) a introdução, por McCord e Fridovich após descobrirem a dismutase do superóxido (SOD), da ideia de que os radicais livres têm importância biológica, levando numerosos investigadores a estudar o dano oxidativo provocado por estas espécies ao nível de biomoléculas como ADN, proteínas, lípidos entre outros componentes celulares; 3) as primeiras indicações de efeitos biológicos vantajosos promovidos por radicais livres, como a activação da guanilato ciclase e a formação do “segundo mensageiro” cGMP por acção do radical hidróxilo ($\cdot\text{OH}$), a descoberta do papel regulatório do óxido nítrico (NO) no controlo do relaxamento do músculo liso, a indução da expressão do gene da heme oxigenase (HO-1) ou a activação da transcrição

do factor nuclear kB (NF-kB) pelo peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Dröge, 2002).

Assim, apesar das vantagens de uma forma de vida aeróbia, que permitiu o desenvolvimento de um mecanismo oxidativo de obtenção de energia, o metabolismo oxidativo leva à formação de radicais livres que provocam a destruição de estruturas e componentes celulares. No entanto, não só a célula desenvolveu diversos mecanismos de defesa contra radicais livres, tais como enzimas solúveis, como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), e compostos anti-oxidantes, glutathiona reduzida (GSH), ascorbato (vitamina c) e α -tocoferol (vitamina e) (Figura I.1), como também desenvolveu mecanismos que tiram vantagens dessas mesmas espécies químicas (Dröge, 2002; Thannickal & Fanburg, 2000).

I.1.2. Química das espécies reactivas de oxigénio



O anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) é produzido pela redução univalente do oxigénio molecular (O₂), quer através de catálise enzimática quer por “fugas” de electrões em reacções de transferência electrónica (Dröge, 2002; Thannickal & Fanburg, 2000). O $\cdot\text{O}_2^-$ é bastante estável em solventes orgânicos tendo uma “vida curta” em soluções aquosas, onde é rapidamente dismutado a peróxido de hidrogénio. Embora a dismutação ocorra espontaneamente em soluções, a

SOD aumenta a conversão de $\cdot\text{O}_2^-$ em H_2O_2 aproximadamente 10^4 vezes (Figura I.1) (Thannickal & Fanburg, 2000).

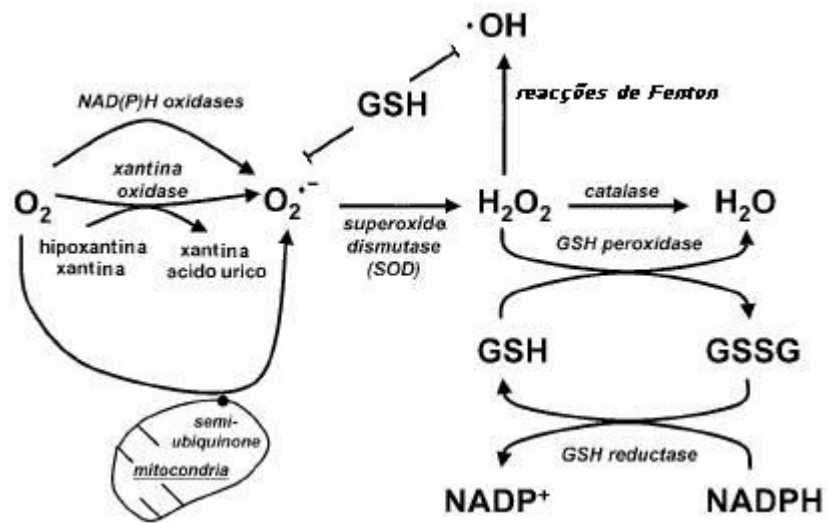
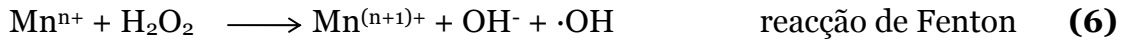


Figura I.1 – Vias de produção e destoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS). GSH – glutatona reduzida; GSSG – glutatona dissulfídica. Adaptado de Dröge (2000).

Apesar de grande parte do H_2O_2 produzido nas células eucarióticas provir de reacções de dimerização de $\cdot\text{O}_2^-$, o H_2O_2 pode ser formado a partir da redução bivalente do oxigênio (Thannickal & Fanburg, 2000). Ao contrário do $\cdot\text{O}_2^-$, o H_2O_2 não é um radical, sendo por isso muito mais estável em soluções aquosas, é no entanto, um agente oxidante mais fraco do que o $\cdot\text{O}_2^-$. O H_2O_2 é enzimaticamente transformado em água e oxigênio, sendo o substrato de enzimas como a catalase e glutatona peroxidase (Figura I.1) (Storey, 1996; Thannickal & Fanburg, 2000).

Na presença de metais de transição (p.e. ferro, cobre, cobalto, cromo ou vanádio) o H_2O_2 dá origem ao radical hidroxila uma espécie altamente reactiva e tóxica (Storey, 1996; Thannickal & Fanburg, 2000). A maior parte da produção de $\cdot\text{OH}$ *in vivo* ocorre a partir de redução de H_2O_2 pelo anião superóxido, via reacção de Haber-Weiss (equação 7), que é na realidade um

processo que ocorre em dois passos catalizados por metais de transição, um processo que envolve química de Fenton (equação 6) (Figura I.1) (Stohs & Bagchi, 1995; Storey, 1996; Thannickal & Fanburg, 2000; Kasprazak, 2002).



I.1.3. Produção de espécies reactivas de oxigénio

A produção de ROS pode ocorrer de forma enzimática ou não enzimática (Storey, 1996; Thannickal & Fanburg, 2000). Actualmente acredita-se que a maior parte de ROS sejam produzidas, de forma não enzimática, através da produção de anião superóxido na cadeia respiratória mitocondrial (Storey, 1996; Thannickal & Fanburg, 2000), no entanto estas espécies podem ser geradas dentro da célula noutros organelos e por outros mecanismos, como por exemplo:

- No retículo endoplasmático (ER), um organelo intracelular que está ligado à produção de proteínas e lípidos. Estes organelos contêm enzimas que catalisam uma série de reacções de destoxificação de xenobióticos solúveis em lípidos e outros produtos metabólicos potencialmente perigosos. As famílias dos citocromos P450 e das proteínas b_5 conseguem oxidar ácidos gordos insaturados e xenobióticos e reduzir o oxigénio a $\cdot\text{O}_2^-$ e/ou H_2O_2 (Thannickal & Fanburg, 2000).
- No núcleo, a membrana nuclear contém citocromo oxidases e sistemas transportadores de electrões que são similares aos do ER, sendo no entanto desconhecidas as suas funções fisiológicas. Pensa-se que

“fugas” de electrões nos sistemas que os transportam possam dar origem a ROS que por sua vez podem danificar o ADN celular (Thannickal & Fanburg, 2000).

- Nos peroxissomas, estes organelos contêm várias enzimas que produzem H_2O_2 , como a glicolato oxidase, D-aminoácidos oxidase, L- α -hidroxiácido oxidase e acil CoA oxidase, sendo então uma das mais importantes fontes celulares de H_2O_2 . A catalase peroxissomal utiliza o H_2O_2 para oxidar alguns substratos em reacções peroxidativas, estas reacções são importantes em células hepáticas e renais para destoxificar algumas moléculas tóxicas (como o etanol) que entram na circulação (Storey, 1996; Thannickal & Fanburg, 2000).
- Além de oxidases associadas às membranas existem também outras enzimas que produzem ROS no seu ciclo catalítico e que são solúveis como a xantina oxidase, aldeído oxidase, flavoproteína desidrogenase e outras. A xantina oxidase é currentemente usada *in vitro* para causar situações de stresse oxidativo (Thannickal & Fanburg, 2000).
- A auto-oxidação de pequenas moléculas, como a dopamina, epinefrina, flavinas e hidroquinonas, pode ser importante na produção de ROS dentro da célula. Na maior parte dos casos o principal produto da auto-oxidação destas moléculas é $\cdot O_2^-$ (Thannickal & Fanburg, 2000).
- Na membrana plasmática, as oxidases a ela associadas estão implicadas na produção de oxidantes, estimuladas por factores de crescimento e citoquinas. É reconhecido que em células fagocíticas a NADPH oxidase, tem uma função protectora contra microorganismos. Esta oxidase produz $\cdot O_2^-$ no exterior da célula, no entanto quando ocorre a

fagocitose, a produção desta espécie reactiva ocorre no interior da vesícula fagocítica. Em células não fagocíticas foi descrita uma oxidase de membrana similar à NADPH oxidase referida (Storey, 1996; Thannickal & Fanburg, 2000).

I.1.3. Espécies reactivas de oxigénio nos sistemas biológicos

I.1.3.1. Efeitos nocivos em biomoléculas

O estado redox das células é uma consequência do balanço entre os níveis de equivalentes redutores e oxidantes. O aumento do nível de espécies reactivas de oxigénio (ROS), acima da capacidade redutora celular (que funciona como um tampão do estado redox) e da actividade enzimática envolvida na destoxificação de ROS, dá origem a um, potencialmente citotóxico, stresse oxidativo (Stohs, 1995; Storey, 1996; Dröge, 2000; Davis *et al.*, 2001).

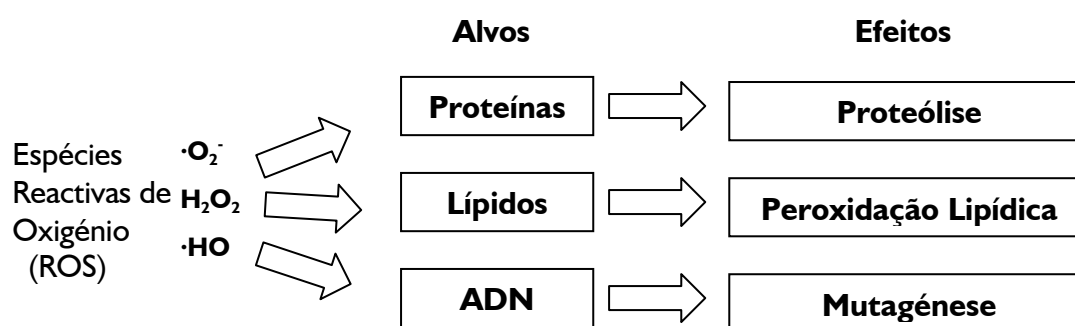


Figura I.2 – Alvos e consequências do poder oxidativo de espécies reactivas de oxigénio em biomoléculas.

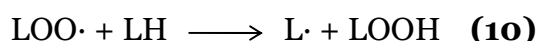
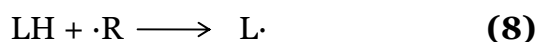
Todos os componentes celulares são susceptíveis ao ataque de ROS e especialmente do radical hidróxilo (Figura I.2). O ataque de agentes oxidantes em proteínas pode levar a modificações em aminoácidos, a oxidação de grupos sulfidrilo levando a alterações conformacionais, “*crosslinking*”, quebra de ligação peptídica e perda de actividade enzimática, assim como alterações nos

grupos glicídicos de glicoproteínas e remoção do metal de metaloproteínas (Storey, 1996; Dröge, 2000; Kasprzak, 2002). As alterações oxidativas provocadas em proteínas diminuem-lhes o tempo de meia-vida promovendo a proteólise ou degradação via proteossoma, podendo também originar respostas imunológicas devido à alteração da estrutura de antigénios, alteração no transporte membranar via canais ou transportadores proteicos (Storey, 1996; Dröge, 2000).

A acção de ROS também se faz sentir ao nível do ADN, provocando alterações estruturais como dissociação da dupla cadeia, modificações em bases, deleções, inserções e amplificação de sequências. Alterações estas que podem provocar mutações pontuais responsáveis pela inactivação de genes supressores de tumores ou activação de proto-oncogenes (Storey, 1996; Wiseman & Halliwell, 1996; Kasprzak, 2002).

Os ácidos gordos poli-insaturados, como os que estão presentes nas membranas biológicas, são particularmente susceptíveis ao ataque por radicais. A remoção de um átomo de hidrogénio dá origem a radical lipídico (equação 8) que reage com oxigénio para formar a um radical peróxido (hidroperóxido lipídico) (equação 9), dá-se início a uma reacção em cadeia que se propaga de forma descontrolada – a peroxidação lipídica (Cheeseman, 1993; Palace, 1996; Storey, 1996). A peroxidação lipídica, pode alterar a fluidez membranar permitindo a difusão livre de iões que tem como consequência a activação de fosfolipases, formação de outras espécies reactivas e em casos extremos pode provocar disrupção membranar (Cheeseman, 1993; Storey, 1996). Devido aos efeitos que promove a peroxidação lipídica foi considerada o principal responsável da perda de função celular em situações de stresse oxidativo (Storey, 1996). A medição da

ocorrência de peroxidação lipídica em membranas celulares, fornece assim uma indicação do estado oxidativo das membranas biológicas, necessárias para a manutenção da integridade celular.



I.1.3.2. *Patologias associadas aos radicais livres*

Devido a todos os efeitos nocivos provocados por radicais livres e espécies reactivas de oxigénio, descritos na secção anterior (I.1.2.1), são muitas as patologias que lhes estão associadas. Dependendo do órgão mais afectado por espécies oxidantes, diferentes doenças podem surgir ou ser aceleradas, devido a um aumento de ROS (Tabela I).

Tabela I – Patologias relacionadas com a ocorrência de stresse oxidativo em diferentes órgãos do corpo humano. SIDA, síndrome de imunodeficiência adquirida. *Dados recolhidos em* Stohs (1995) e Dröge (2000).

Órgão/ Zona do corpo Humano	Patologias
Tracto Gastrointestinal	Diabetes; Pancreatite; Dano hepático.
Cérebro e Sistema Nervoso	Doença de Parkinson; Doença de Alzheimer; Hipertensão; Esclerose múltipla.
Coração e Vasos Sanguíneos	Arteriosclerose; Trombose Coronária.
Pulmões	Asma; Efisema pulmonar.
Olhos	Cataratas; Retinopatia.
Articulações	Artrite Reumatóide.
Rins	Glomerulonefrite.
Pele	“Manchas de idade”; Rugas.
Corpo em geral	Envelhecimento acelerado; Cancro; Doenças Auto-imunitárias; Estados inflamatórios; SIDA; Lupus.

I.1.3.3. Mecanismos de defesa anti-oxidante

Os sistemas biológicos contêm uma variedade de mecanismos de defesa anti-oxidante para prevenir e combater alterações no balanço oxidativo celular em favor de espécies pro-oxidantes (Stohs, 1995). Três níveis de protecção devem ser considerados: 1) prevenção de formação de ROS, 2) terminação da propagação de ROS, e 3) reparação dos danos provocados por ROS. Enzimas como a dismutase do superóxido (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (Figura I.1), bem como outras moléculas sem actividade enzimática como o tocoferol- α (vitamina E), o β -caroteno, o ascorbato (vitamina C) e a glutathione reduzida (GSH), são substâncias que podem, em baixas concentrações, competir com compostos oxidáveis inibindo ou atrasando significativamente a sua oxidação (Halliwell & Gutteridge, 1990). Além destes, outras substâncias com menor “actividade” anti-oxidante, quando em elevadas concentrações podem actuar como captadores de ROS. Um exemplo deste tipo de substâncias são os aminoácidos livres e as proteínas (Dröge, 2000).

I.1.3.3.1. Enzimas anti-oxidantes

A SOD, a GPx e a catalase são as enzimas que desempenham o papel principal como reguladoras da “homeostasia redox” dentro das células. Embora outras enzimas, como as enzimas que participam no ciclo de reciclagem da GSH, tenham um papel secundário mas de elevada importância na manutenção dos níveis de glutathione reduzida. Palace & Klaverkamp (1993) consideraram as enzimas anti-oxidantes como excelentes indicadores precoces da susceptibilidade celular à lesão provocada pelo stress oxidativo.

A dismutase do superóxido (SOD) é a proteína que tem a importante função de proteger o organismo dos efeitos lesivos do anião superóxido (McCord & Fridovich, 1969; Comporti, 1985; Cheeseman, 1993), dismutando-o e formando peróxido de hidrogénio (Figura I.1). Existem três tipos de SOD que variam com o centro metálico que possuem. A forma predominante, cerca de 80 %, encontra-se no citosol e o seu núcleo é composto por cobre e zinco (CuZnSOD) (McCord & Fridovich, 1989). Os restantes 20 % correspondem a um tipo de SOD que contém um centro metálico de manganês (MnSOD) (Ahmad, 1995), o terceiro tipo tem como ião metálico o ferro (FeSOD) sendo encontrada apenas em algumas bactérias (Mathews & VanHolde, 1996).

A catalase é uma enzima homotetramérica contendo um grupo prostético hémico (protoporfirina IX), e esta distribuída amplamente em todos os tecidos. Está presente na maioria das células eucarióticas, estando em maior quantidade nos peroxissomas (Ahmad, 1995). Esta enzima desempenha um papel importante na destoxificação do peróxido de hidrogénio, catalisando a redução deste em água (Figura I.1) (Livingstone *et al.*, 1992).

A glutathione peroxidase é uma proteína que pertence a uma superfamília de proteínas que contêm um resíduo de seleno-cisteína no seu centro catalítico. Estas enzimas são altamente eficientes e têm como substrato vários peróxidos. Existem pelo menos quatro formas conhecidas em mamíferos: a GPx citosólica (cGPx), a GPx extracelular ou plasmática (pGPx), a GPx que catalisa a peroxidação de hidroperóxidos fosfolipídicos (PHGPx) e a GPx encontrada no trato gastrointestinal (giGPx). A GPx reduz o peróxido de hidrogénio e outros peróxidos tendo como dador de hidrogénio a GSH (Figura I.1) (Ahmad, 1995; Flohé *et al.*, 1997).

I.1.3.3.2. Glutathiona reduzida

A glutathiona reduzida (GSH) é considerada como um dos mais importantes componentes na defesa oxidante das células (Storey, 1996). A GSH é um captador de radical hidróxilo e participa em variadas funções celulares, como a síntese de ADN e proteínas, como intermediário no metabolismo (p.e. do H₂O₂, como doador de hidrogénio para a GPx) (Storey, 1996) (Figura I.1) e destoxicador de xenobióticos, através da conjugação enzimática através GSH s-transferases, facilitando a excreção (Hasspieler *et al.* 1994).

A GSH é o maior componente de um “tampão redox endógeno” composto de tióis, estando em concentrações intracelulares entre 0.1 e 10 mM (Davis 2001). Devido à sua elevada concentração intracelular existe uma probabilidade elevada de uma ROS ser captada pela GSH, antes de iniciar as reacções oxidativas com outras biomoléculas (Storey, 1996). Quando as ROS estão presentes em elevadas quantidades, aumentando assim a ocorrência de stresse oxidativo, a formação de glutathiona dissulfídica (GSSG) aumenta, diminuindo a razão GSH/GSSG (Hasspieler *et al.* 1994). Esta razão é usada normalmente como indicador da extensão do stresse oxidativo em células. A manutenção dos níveis intracelulares de GSH é crucial em organismos que periodicamente entram em stresse oxidativo (Storey, 1996).

I.1.3.4. Formas de regulação pelas espécies reactivas de oxigénio

As células e tecidos permanecem estáveis se a velocidade de produção de espécies pro-oxidantes e a capacidade de remoção destas se mantenhem

constantes e balanceadas (Figura I.3.i.). A regulação redox requer que este balanço seja perturbado, ou por um aumento da produção de ROS ou pela diminuição da actividade de um ou vários sistemas anti-oxidantes (Figura I.3.ii.) (Dröge, 2000). Este tipo de eventos pode ser promovido pela activação de sistemas de produção de ROS ou pela diminuição de GSH intracelular (Dröge, 2000, Thannickal & Fanburg, 2000). No entanto, se a capacidade anti-oxidante não for suficiente para compensar o aumento de ROS,

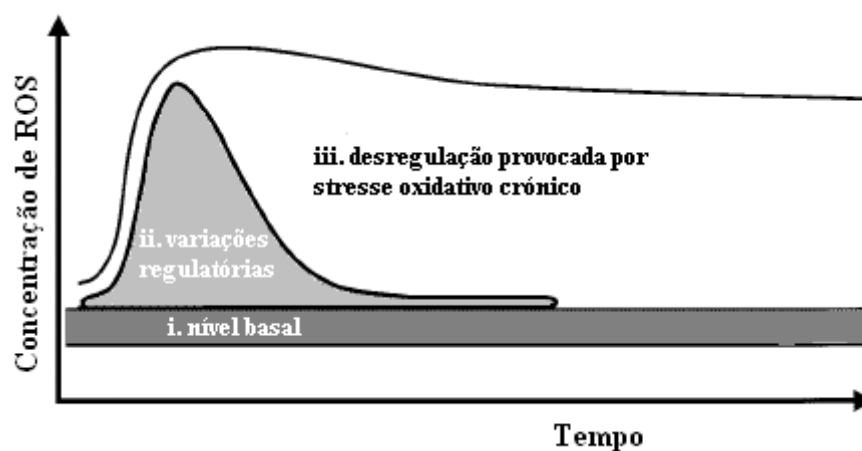


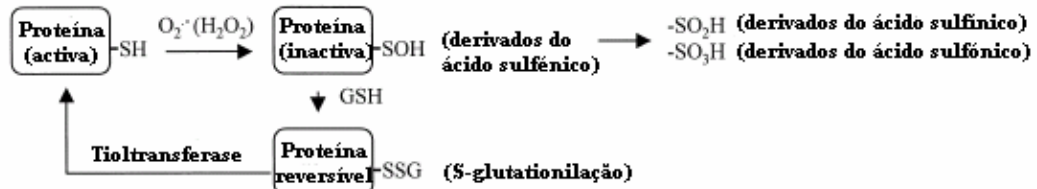
Figura I.3 – Os efeitos regulatórios e a sua desregulação depende da magnitude e duração da variação na concentração de ROS. Um aumento controlado na produção de ROS está na base da regulação redox. Um aumento persistente pode dar origem a lesões e danos celulares. *Adaptado de Dröge (2000)*

probabilidade de ocorrência de graves danos celulares aumentará (Figura I.3.iii).

Após estimulação por factores de crescimento ou citoquinas, as NAD(P)H oxidases vasculares produzem anião superóxido e outros ROS que activam várias vias de sinalização celular (Dröge, 2000). As formas de regulação por ROS podem ser separadas em dois mecanismos de acção geral: 1) alteração no estado redox intracelular; 2) modificações oxidativas em proteínas (Figura I.4) (Thannickal & Fanburg, 2000). Ao contrário do meio extracelular, o interior da célula é mantido a condições bastante redutoras,

devido à capacidade de “tampão redox” que é mantido principalmente pela GSH. Os níveis de GSH na célula são mantidos pela GSH reductase. A diminuição de GSH está associada à diminuição da proliferação celular das

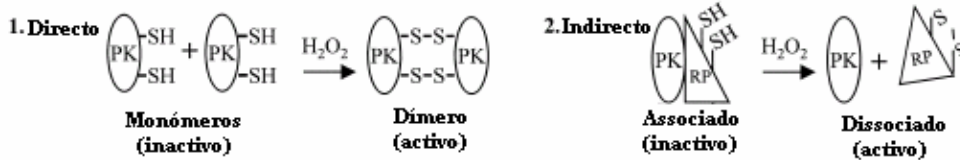
A -- Modificação por oxidação de resíduos de Cisteína



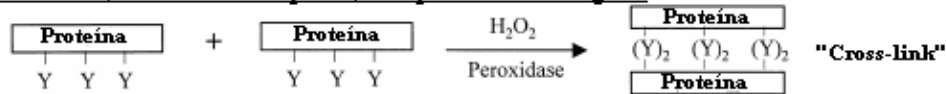
B -- Formação de ligações dissulfídicas intra-moleculares



C -- Dimerização proteica por formação de ligações dissulfídicas inter-moleculares



D -- Formação de di-tirosinas por acção de peróxido de hidrogénio



E -- Oxidação de proteínas catalisado por metais (via reacções de Fenton)

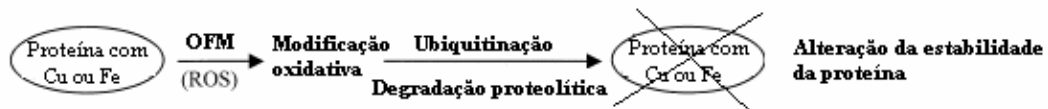


Figura I.4 - Oxidação de proteínas como um mecanismo de sinalização celular via espécies reactivas de oxigénio. PK, cinase; RP, Proteína regulatória; OFM, oxidases de função mista. *Adaptado de Thannickal & Fanburg (2000)*

células vasculares endoteliais e ao aumento da produção de fibroblastos. No núcleo a razão entre GSH e GSSG está aparentemente relacionada com a ligação do factor de transcrição Sp-1 ao ADN (Thannickal & Fanburg, 2000). Alterações oxidativas em resíduos de aminoácidos importantes num domínio funcional de determinada proteína, podem alterar a capacidade catalítica de uma enzima ou a habilidade de um factor de transcrição se ligar ao ADN (Thannickal & Fanburg, 2000). Modulação conformacional do factor de

transcrição p53 através da oxidação-redução de resíduos de cisteínas junto à interface p53-ADN aparentemente regula tanto a ligação deste factor ao ADN como a sua transactivação (Dröge, 2000; Thannickal & Fanburg, 2000) (Figura I.4).

A cada dia novas descobertas na regulação por ROS da actividade de enzimas, na mediação de cascatas de sinalização celular, na modulação da ligação transactivação de factores de transcrição entre outros efeitos fisiológicos, são efectuadas, confirmando a ideia de que as ROS não são afinal a “caixa de Pandora” que Denham Harman descreveu.

1.2. Vanádio

1.2.1. Perspectiva histórica

O vanádio foi descoberto por Andrés Manuel del Rio (1764-1849) em 1802, quando este preparava sais de um material proveniente do México que continha (Nriagu, 1998; Rehder, 1999). Del Rio suspeitou ter descoberto um novo elemento e teve a intenção de o chamar “pancrómio” (da palavra grega “panchromium” que significa muitas cores) um nome apropriado para as várias cores dos óxidos de vanádio. No entanto, alterou-o para “eritrónio” (do grego “erythronium”) como referência aos sais vermelhos formados quando tratado com ácidos (Nriagu, 1998). Infelizmente, H. V. Collect-Descotils, um químico francês, declarou incorrectamente que o novo elemento descoberto por Del Rio era não mais do que crómio impuro. Del Rio julgou ele próprio estar enganado e aceitou o julgamento do químico francês.

O elemento foi re-descoberto em 1831 pelo químico sueco Nils Sefstrom (1787-1845) que descobriu que certos minérios de ferro após fundidos

tornavam-se muito mais maleáveis, e que por isso deviam conter um elemento adicional que ele posteriormente identificou. Atribuiu-lhe o nome de “*vanadin*”, em honra da deusa nórdica Vanadis, deusa da beleza, juventude e amor, devido aos belos compostos multicolores que produz (Chasteen, 1983; Nriagu, 1998). Posteriormente, o minério de “chumbo castanho”, encontrado por Del Rio, foi novamente analisado, demonstrando-se que continha realmente vanádio em vez de crómio.

I.2.2. Ocorrência e usos de vanádio

Tabela II – Isótopos de vanádio e os correspondentes tempos de meia vida.

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

O vanádio é o elemento químico com número 23 na tabela periódica, na qual pertence ao grupo VB. O vanádio que ocorre naturalmente é uma mistura de dois isótopos ⁵⁰V (0,24 %) e ⁵¹V (99,76 %), embora existam outros isótopos menos estáveis (tabela II) (Chasteen, 1983). É considerado o décimo quinto metal de transição mais abundante, estando distribuído (de uma forma não uniforme) no meio ambiente em rochas, solos, plantas, animais e numa menor extensão na água (Nriagu, 1998). Os minérios “*carnotite*” [K₂(UO₂)₂(VO₄)₂] e “*vanadinite*” [Pb(VO₄)₃Cl] são duas fontes importantes de vanádio, estando este também presente no crude na forma de complexos orgânicos de porfirinas. Na crosta terrestre existe numa concentração entre 100 a 200 ppm com uma abundância de 0.014 %. O vanádio não ocorre na natureza como metal livre mas sim associado a outros metais (Mamane & Pirrone, 1998).

Este elemento pode ser encontrado em diversos alimentos consumidos pelo homem, tais como: salsa, cogumelos, pimenta preta e mariscos em maiores quantidades e nas frutas, vegetais, cereais, gorduras e óleos em quantidades mais reduzidas (Chasteen, 1983). A maioria dos países extrai o vanádio a partir de combustíveis fósseis, como o crude, o carvão e alguns fósseis carbonáceos, onde o metal se encontra em elevadas quantidades na sob a forma de porfirinas de vanadilo (Mamane & Pirrone, 1998).

O vanádio é largamente usado na indústria química, especialmente na síntese de H_2SO_4 , polímeros e compostos orgânicos; na indústria metalúrgica na produção de ligas metálicas; na indústria electroquímica como componente de baterias; na elaboração de pesticidas e herbicidas para a agricultura; e na medicina e indústria farmacêutica na elaboração de fármacos para o tratamento da diabetes (Nriagu, 1998; Shechter *et al.*, 2003).

A vasta utilização de compostos de vanádio na indústria química, e as elevadas concentrações deste elemento no crude, contribuíram para o aumento da disponibilidade deste metal no meio ambiente e para o crescente interesse em estudar os efeitos causados por ele. Um dos factores que contribuiu largamente para o aumento de vanádio no ambiente foi a guerra do Golfo (1991), devido aos incêndios nos poços de petróleo que enviaram para atmosfera enormes quantidades deste elemento. Além das já mencionadas, as principais fontes naturais de vanádio para o ambiente são a erosão da crosta terrestre e a actividade vulcânica (Nriagu, 1998).

1.2.3. Química do vanádio

O vanádio é um metal de transição de configuração $[Ar]3d^34s^2$, e massa molecular 50,94. Apresenta estados de oxidação que podem variar entre -1 e

+5, sendo os mais comuns e biologicamente activos o +3, +4 e o +5, denominados vanádico (V(III)), vanadilo (V(IV)) e vanadato (V(V)), respectivamente. O V(IV) e o V(V) são os estados predominantemente encontrados em condições fisiológicas podendo, nestas condições, interconverterem um no outro (Domingo *et al.*, 1993). O vanádio tem uma química bastante rica, devido à flexibilidade de adopção de várias geometrias de coordenação (Figura I.5) e devido à sua capacidade redox (Crans *et al.*, 1998; Barceloux, 1999). A coordenação e geometria dos compostos e minerais de vanádio estão dependentes do estado de oxidação do vanádio e do tipo de ligando coordenado (Greenwood & Earnshaw, 1997).

I.2.3.1. Vanádio (IV): vanadilo

Em solução aquosa, a química do vanádio (IV) é essencialmente centrada no ião oxovanádio ou vanadilo, VO^{2+} . Quando em soluções com valores de pH superiores a 3 o vanádio (IV) tende a ser oxidado e convertido em vanádio (V) (Chasteen, 1983; Barceloux, 1999). A pH 7, forma forma-se um precipitado de $VO(OH)_2$ e somente em soluções com carácter alcalino forte volta a formar um composto solúvel, $VO(OH)_3^-$ (Chasteen, 1983).

Em geral o vanádio (IV) forma complexos com proteínas bem como com outros ligandos mais pequenos como o citrato, ATP, catecoleminas ou aminoácidos livres, reduzindo a possibilidade de o vanadilo existir na forma livre em sistemas biológicos (Chasteen, 1983).

I.2.3.2. Vanádio (V): vanadato

O vanádio de valência +5, V(V), é a forma redox deste metal que apresenta maior estabilidade em sistemas aquosos. A pH ácido existe na

forma de catião *cis*-VO₂⁺ que complexa com agentes quelantes, por exemplo EDTA (Crans *et al.*, 1998), enquanto que a valores de pH fisiológico ou superiores surgem os vanadatos, que são aniônicos e nos quais o metal está tetraedricamente coordenado (Chasteen, 1983). As soluções aquosas de vanadato consistem numa mistura de formas oligoméricas (Chasteen, 1983; Correia *et al.*, 1994; Lobert *et al.*, 1994) com diferentes estados de protonação e formas que dependem do pH, da concentração total de vanadato e da força

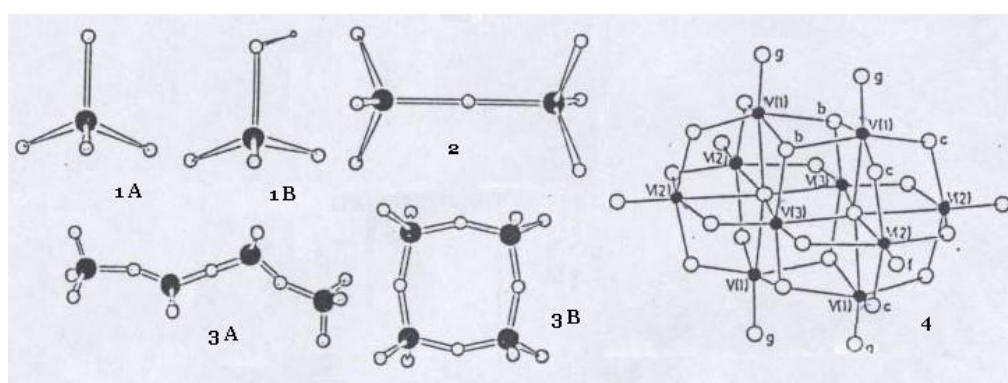


Figura I.5 – Estruturas propostas para os vários oligovanadatos. 1 A – VO₄³⁻, 1 B – HVO₄²⁻, 2 – V₂O₇⁴⁻, 3 A – V₄O₁₂⁴⁻ (linear), 3 B - V₄O₁₂⁴⁻ (cíclica), 4 – V₁₀O₂₈⁶⁻. Adaptado de Amado *et al.* (1993)

iónica (Figura I.5) (Baes & Mesmer, 1976; Chasteen, 1983; Amado *et al.*, 1993; Crans *et al.*, 1998). As espécies de vanadato (VO₄)_n, (V₂O₇) e (VO₃)_n são designadas por ortovanadatos, pirovanadatos e metavanadatos, respectivamente (Baes & Mesmer, 1976).

Em condições neutras e ao longo da gama de concentrações entre μM e mM, frequentemente usadas em estudos bioquímicos, as formas predominantes de vanadato são o monómero (V₁), o dímero (V₂), o tetrâmero cíclico (V₄) e o pentâmero cíclico (V₅) (Crans, 1994) como proposto na figura I.5. O V₄ é a espécie predominante em soluções de vanadato mais concentradas, sendo referida como “metavanadato”. A pH entre 2 e 6 há a

formação de um polianião decamérico (Figura I.2), currentemente designado por decavanadato (V_{10}) (Crans, 1994), sendo predominante quando a concentração de vanadato é superior a $100 \mu\text{M}$ (Stankiewicz *et al.*, 1995).

A importância biológica do vanádio está associada em grande parte ao monómero VO_4^{3-} , devido à sua similaridade quer estrutural quer electrónica com o ião fosfato (PO_4^{3-}) (Plass, 1999). No entanto Stankiewicz *et al.* (1995) considerou o decavanadato como o oligómero com maior importância bioquímica.

I.2.4. Bioquímica de vanádio

I.2.4.1. Enzimas contendo vanádio

São actualmente conhecidas duas classes de enzimas contendo vanádio, as nitrogenases de vanádio e as haloperoxidasas dependentes de vanádio (Rehder, 1999; Plass, 2002).

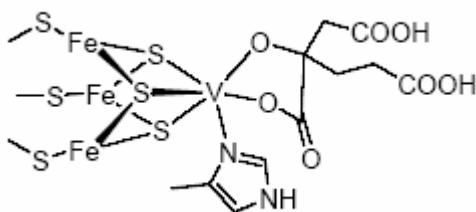


Figura I.6 - Ambiente do proposto do vanádio em nitrogenases de vanádio. *In* Rehder (1999)

As nitrogenases são metaloenzimas que catalizam a formação de amónia a partir de nitrogénio molecular. As nitrogenases de vanádio possuem um centro de ferro-enxofre (Fe-S) ao qual está

coordenado um átomo de vanádio (Figura I.6). Estas enzimas foram identificadas numa bactéria fixadora de nitrogénio – a *Azotobacter* (Rehder, 1999; Plass, 2002).

As haloperoxidasas dependentes de vanádio (H-VPO), como a cloroperoxidase de *Carvularia inaequalis* (Cl-VPO) (Figura I.7.A), catalizam a

oxidação de haletos (X⁻) por peróxidos. Nas H-VPO, o vanádio presente no local activo da enzima está no estado pentavalente de oxidação, directamente ligado por uma ligação axial a um resíduo de histidina, estando “embebido” na

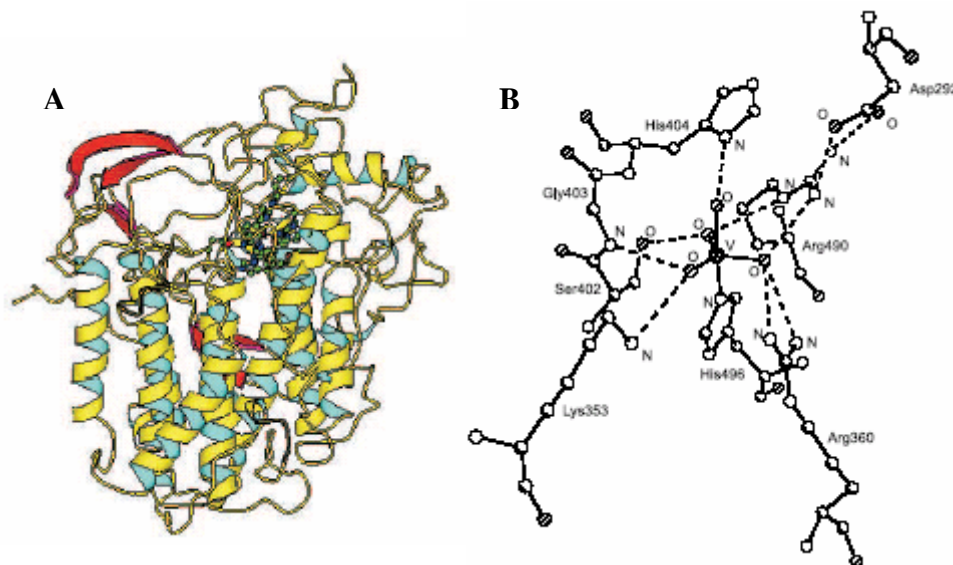


Figura I.7 – Cloroperoxidase dependente de vanádio do fungo *Carvularia inaequalis*. **A**, estrutura determinada por cristalografia de raio-X; **B**, estrutura do local activo (as linhas a tracejado representam coordenação por pontes de hidrogénio. *In Plass* (2001)

proteína coordenado por uma extensa rede de pontes de hidrogénio (Figura I.7.B). Estudos por infravermelho demonstraram a formação de um complexo de peroxovanadato como intermediário activo (Rheder, 1999), não se verificando a redução do vanadato, já que o vanadilo inactiva a enzima (Bora, 2001). O local activo desta Cl-VPO apresenta bastantes similaridades com o local activo de fosfatases ácidas (Hemrika *et al.*, 1997).

Recentemente foram descritas proteínas que ligam especificamente vanádio em ascídeos (ou tunicatos), animais que acumulam grandes quantidades de vanádio no sangue. Essas proteínas, designadas por “vanabinas” (do inglês *vanabins*), são encontradas no sangue deste tipo de

animais, e providenciam uma primeira pista relativamente à forma como o vanádio é acumulado neste animais (Ueki *et al.*, 2003).

1.2.4.2. Modulação enzimática por vanádio

As diferentes espécies de vanadato que se formam em solução podem apresentar diferentes alvos e tipos de modulação enzimática devido principalmente ao tipo de estruturas que são formadas. A modulação directa do vanádio na actividade de enzimas está principalmente associada à similaridade química do vanadato com o ortofosfato, e aos locais de ligação de fosfatos nas enzimas.

A modulação pelo vanádio da actividade de enzimas foi descrita pela primeira vez por Lindquist *et al.* (1973, *in* Tiago, 2000) quando fez referência à inibição da ribonuclease pelo vanádio. Para tal foi usado um complexo vanadilo-uridina, que posteriormente se mostrou útil no isolamento do ARN mensageiro (ARNm) de linfócitos, até então impossível com os inibidores de ARNm usados na altura. O grande impulsionador do estudo de vanádio na modulação enzimática foi Cantley e os seus colaboradores, que identificaram o vanádio como uma impureza presente no ATP comercial (Sigma) preparado a partir de músculo esquelético de cavalo, responsável pela inibição da bomba de sódio, Na⁺/K⁺-ATPase.

A espécie monomérica (VO₄³⁻) de vanadato pode formar uma estrutura bipiramidal trigonal, idêntica à estrutura proposta como intermediária na hidrólise de grupos fosfato (PO₄³⁻) e na transferência de grupos fosforilo (PO₃⁻) (Chasteen, 1983). Estudos de inibição por monovanadato foram efectuados em várias enzimas verificando-se constantes de inibição entre 10⁻⁵ a 10⁻⁹ (tabela III).

Tabela III – Valores de constantes de inibição para algumas enzimas, atribuídas à forma monomérica de vanadato. *Adaptado de Chasteen (1983)*

Enzima (fonte)	K_i (M)
Ribonuclease (linfócitos humanos)	1 x 10 ⁻⁵
Fosfatase ácida (fígado humano)	2 x 10 ⁻⁷
Fosfatase alcalina (<i>Escherichia coli</i>)	4 x 10 ⁻⁷
ATPase de miosina (músculo esquelético de coelho)	< 10 ⁻⁷
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (rim de cão)	4 x 10 ⁻⁹
Ca ⁺ -ATPase (eritrócitos humanos)	1.5 x 10 ⁻⁶

A analogia estrutural entre a espécie dimérica de vanadato e o pirofosfato, sugerem que o V₂O₇⁴⁻ pode interactuar com locais de ligação de cofactores como NAD, NADP, FAD e CoA. Estudos indicam que o V₂O₇⁴⁻ inibe competitivamente a interacção de NADP e NAD com a enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (Crans & Schelble, 1990), ou que actua como um inibidor competitivo de fructose-1,6-bifosfato aldolase e não competitivo de glicerol-3-fosfato desidrogenase (Stankiewicz *et al.*, 1995).

As espécies tetraméricas de vanadato (V₄O₁₂⁴⁻), não apresentam analogia estrutural com nenhum cofactor ou substrato. No entanto, V₄O₁₂⁴⁻ inibe a enzima 6-fosfogluconato desidrogenase de forma competitiva em relação ao substrato e de forma não competitiva em relação ao cofactor (Stankiewicz *et al.*, 1995). Outros estudos efectuados posteriormente atribuem efeitos inibitórios por parte do V₄O₁₂⁴⁻ noutras enzimas.

O decavanadato (V₁₀O₂₈⁶⁻) é das formas de vanadato que inibe as enzimas de forma mais potente. Foi demonstrado que o V₁₀O₂₈⁶⁻ é um bom inibidor não competitivo da hexocinase e da fosfofrutocinase (Stankiewicz *et al.*, 1995). Este polivanadato inibe a cinase dependente de AMPc de forma não competitiva em relação ao ATP e de forma competitiva em relação ao

substrato. Na maior parte dos casos conhecidos o decavanadato liga-se em locais de ligação específicos de polifosfatos em enzimas ou receptores, quer no domínio do substrato, quer num local alostérico (Stankiewicz *et al.*, 1995). Tiago *et al.* (2002a,2002b) demonstrou que o decavanadato inibe a actividade da actividade ATPásica da miosina de forma mais acentuada do que as espécies mono e tetraméricas ($K_i = 5 \mu\text{M}$).

Além da propriedade inibitória que é atribuída ao vanadato, este também exerce efeitos estimulatórios na actividade de algumas enzimas, como a adenilato ciclase, a glucose 6-fosfato desidrogenase, a fosfoglicerato mutase e a fosfoglicerato fosfatase (Crans, 1994).

1.2.5. Vanádio em sistemas biológicos

1.2.5.1. Acumulação e metabolismo

A maior concentração de vanádio conhecida em qualquer sistema vivo é encontrada nas células sanguíneas especializadas dos ascídeos, os vanadócitos, onde atingem concentrações de 1 M (Kustin & Mcleod, 1983). O vanádio é capturado nas formas HVO_4^{2-} ou H_2VO_4^- presentes no mar, sendo depois transportado, provavelmente através de canais aniónicos para vacúolos (vanadóforos) onde é reduzido a V(III) (Fraústo & Williams, 1997). Para além dos ascídeos, algumas espécies de anelídeos tubiformes, bactérias (*Saccharomyces cerevisiae*) e fungos (*Amanita amanita*) também apresentam concentrações de vanádio elevadas (Bode *et al.*, 1990). À parte dos organismos mencionados acima, os restantes organismos não acumulam níveis de vanádio muito elvados a partir do meio ambiente (Tabela IV).

Tabela IV – Concentração de vanádio em organismos marinhos. *Adaptado de Miramand & Fowler (1998).*

Organismo	Concentração de vanádio (mg/kg peso seco)
Fitoplâncton	1.5–4.7
Zooplâncton	0.07–290
Macroalgas	0.4–8.9
Ascídeos	25–10 000
Anelídeos	0.7–786
Outros invertebrados	0.004–45.7
Peixes	0.08–3
Mamíferos	<0.01–1.04 (peso fresco)

Nos peixes, as vias a partir das quais o vanádio é incorporado são a água ou os alimentos. No entanto pouco conhecimento existe sobre a acumulação de vanádio nos peixes. Em estudos feitos por Bell *et al.* (1979), onde espécimes de *Anguilla anguilla* foram sujeitos a 10^{-5} M de ortovanadato de sódio, verificou-se que ao fim de 8 e 13 semanas a concentração de vanádio aumentou principalmente no fígado e no rim. Um outro estudo analisou a distribuição sub-celular de vanádio no intestino, fígado, rim e braquias de *Carassius auratus*, verificando-se que o núcleo e as mitocôndrias apresentaram maior taxa de acumulação (Edel & Sabbioni, 1993).

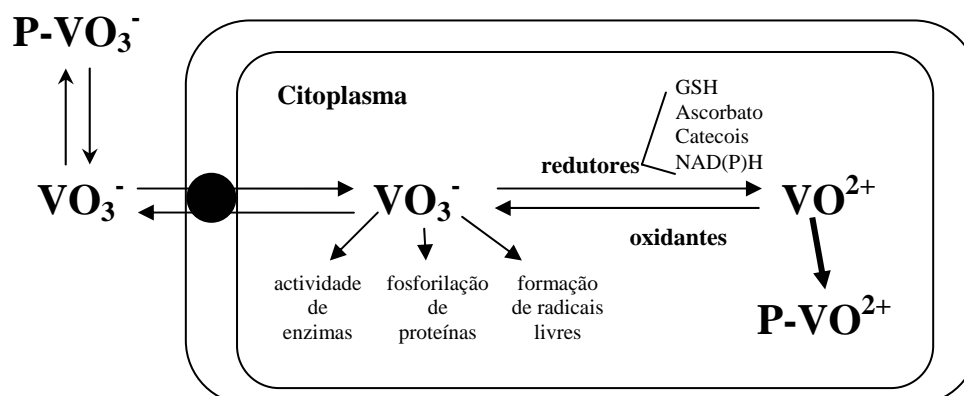


Figura I.8 – Transporte e metabolismo intracelular de vanádio. P, proteína; GSH, glutationa reduzida. *Adaptado de Zaporowska & Ścibior (1998)*

O tipo de administração ou exposição ao vanádio influencia a distribuição tecidual de vanádio em ratos. Verificou-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. Após vários dias de exposição o vanádio é acumulado preferencialmente no tecido ósseo, seguido do fígado e rim (Roschin *et al.* 1980).

Uma vez captado e nos fluidos extracelulares, julga-se que o vanádio entra na célula através de um sistema de transporte aniónico utilizado pelo fosfato, sendo alvo de redução por parte de agentes redutores presentes na célula (Figura I.8) (Zaporowska e Scibor, 1998). Num estudo recente, foi demonstrado que o vanadato entra nos eritrócitos através de canais aniónicos, ainda não identificados (Yang *et al.*, 2003). A biorredução de vanádio (V) a vanádio (IV) parece constituir um mecanismo natural de destoxificação por parte do organismo, na medida em que o vanadilo é menos tóxico para a célula. Para além disso a incorporação do vanadilo na albumina ou em proteínas como ferritina ou a transferrina é um factor adicional de diminuição dos efeitos tóxicos pelo vanadato pois impede a posterior reoxidação de vanadilo (Baran, 1998).

1.2.5.2. Efeitos fisiológicos e toxicológicos

O vanádio é um elemento vestigial, e embora não sendo essencial para a maioria dos animais, foi demonstrado que é essencial para o normal crescimento de ratos e frangos (Erdmann *et al.*, 1984). Estes animais quando criados com uma dieta pobre em vanádio (< 10 ppb), apresentaram várias deficiências como malformações ósseas, crescimento retardado, aumento do níveis de colesterol no plasma, entre outras (Chasteen, 1983). A administração

intravenosa de metavanadato de amónia (NH_4VO_3) na dose de 1.5-2 g/kg de peso é letal em coelhos. No entanto em ratos só se verifica esse efeito em doses superiores (20-30 g/kg peso). Os efeitos fisiológicos do vanádio parecem ser bastante diversificados: reduz a biossíntese do colesterol e os níveis de triglicéridos no plasma; estimula o consumo de glicose e aumenta a produção de glicogénio, mimetizando os efeitos da insulina (Shechter, 1990); existem evidências que possa induzir a mineralização dos dentes e ossos em animais; promove efeitos na força de contração do músculo cardiovascular (Chasteen, 1983). Estudos toxicológicos de vanádio no sistema cardiovascular indicaram que este induz vasoconstrição em vários órgãos e várias modificações cardiovasculares fisiológicas (Carmignani *et al.*, 1991). Em peixes verificou-se também um efeito vasoconstritor nas brânquias (Bell *et al.*, 1979).

Actualmente os estudos tóxicológicos e fisiológicos do vanádio estão centrados essencialmente nos efeitos fármaco-cinéticos, tóxicos e fisiológicos de compostos de vanádio com propriedades insulino-miméticas (Heinemann *et al.*, 2003), em estudos do efeito do vanádio como supressor de tumores, como por exemplo do cancro de cólon (Kanna *et al.*, 2003), e no desenvolvimento de substâncias com actividade espermicida e anti-HIV (D'Cruz *et al.*, 2003).

1.3. Vanádio & Stresse Oxidativo

O vanádio como metal de transição que é, pode promover o aumento de espécies reactivas de oxigénio (ROS) através da ocorrência de reacções de Fenton. A bio-redução de vanádio ocorre por intermédio de flavoenzimas ou de NAD(P)H oxidases, promovendo a formação de anião superóxido (Figura I.9). A presença de vanádio em concentrações elevadas pode elevar o nível de ROS,

aumentando a susceptibilidade da célula à lesão oxidativa. Muitos são os estudos que relacionam a promoção de efeitos tóxicos pelo vanádio com o aumento na produção de espécies reactivas de oxigénio. A figura I.9 ilustra um mecanismo proposto para a toxicidade celular provocada pelo vanadato (Capella *et al.*, 2002). Tal como foi descrito na secção I.1.3.4., o aumento da produção de espécies pro-oxidantes, está envolvido em vários mecanismos de transdução de sinal, activação ou desactivação de factores de transcrição e de enzimas, entre outros. A citotoxicidade do vanádio em células de osteoblasto está relacionada com o stress oxidativo (Cortizo *et al.*, 2000); a transactivação do p53 e ocorrência de apoptose induzidas por vanádio, em células epidérmicas de rato, ocorrem pela indução da produção de peróxido de

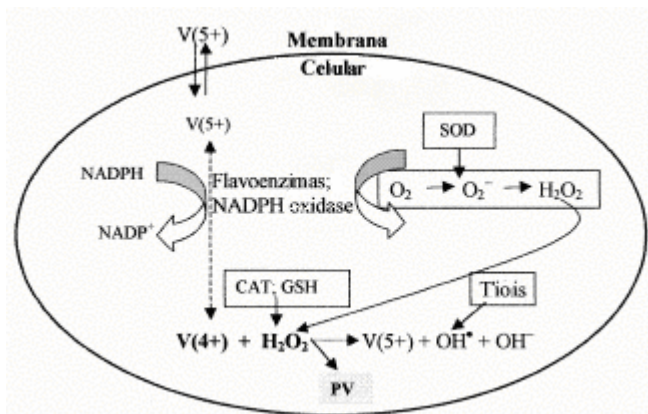


Figura I.9 – Proposta de um mecanismo de acção do vanadato. CAT, catalase; SOD, dismutase do superóxido; PV, peroxovanadato. *Adaptado de Capella et al. (2002)*

hidrogénio (H_2O_2) (Huang *et al.*, 2000); o H_2O_2 parece também mediar a activação do factor nuclear de células T activadas (NFAT), um factor de transcrição responsável pela regulação de citoquinas envolvidas na inflamação e promoção

tumoral (Huang *et al.*, 2001); o vanadato também mostrou promover a transcrição de um factor de transcrição, o HIF-1, que activa genes relacionados com a angiogénese e crescimento de tumores, através da produção de ROS (Gao *et al.*, 2002). Estes são alguns exemplos da relação a

toxicidade promovida por vanadato é mediada pela produção de ROS e consequente stresse oxidativo.

1.4. Halobatrachus didactylus

A espécie utilizada neste estudo foi *Halobatrachus didactylus*, vulgarmente designado charroco, é um peixe bentónico e sedentário, que habita solos arenosos ou lodosos. Segundo Benitez *et al.* (1994), o *H.didactylus* é um bom modelo para estudos relacionados com fisiologia e toxicologia e, recentemente tem sido utilizado como organismo-teste para estudos de efeitos de metais tóxicos, nomeadamente, cádmio e vanádio no sistema cardiovascular (Coucelo *et al.*, 2000; Aureliano *et al.*, 2002). A sua fácil captura e manutenção em laboratório fazem desta espécie um excelente modelo experimental (Muñoz-Cueto *et al.*, 1996). Kelly *et al.* (1998) referem a utilidade de peixes em estudos relacionados com o stresse oxidativo, uma vez que estes exibem respostas toxicológicas e adaptativas similares à dos mamíferos.

Em estudo feitos em *Mullus barbados*, um peixe teleósteo bântico (Lionetto *et al.*, 2003) e em *Wallago attu*, um peixe de água doce (Pandey *et al.*, 2003) foram medidos parâmetros de stresse oxidativo em peixes como referência do índice de poluição em rios e lagos. Demonstrando que os marcadores de stresse oxidativo são óptimos indicadores da ocorrência de efeitos fisiológicos provocados por xenobióticos.

1.5. Objectivos

Os estudos realizados no presente estágio científico tiveram como principal objectivo a observação dos efeitos promovidos por diferentes

oligovanadatos, designados como META (metavanadatos) e DECA (decavanadatos), ao longo de diferentes tempos de exposição, 1 e 7 dias (1ª fase) ou 12 e 24 horas (2ª fase), no tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. As formas de observação dos efeitos promovidos pelas diferentes espécies de vanadato centraram-se em marcadores de stresse oxidativo enzimáticos (actividade da catalase e da oxidase de NADH) e não enzimáticos (conteúdo em GSH, produção de pró-oxidantes e de $\cdot\text{O}_2^-$, CRT e peroxidação lipídica), bem como na análise da acumulação de vanádio nas células e fracções celulares de tecido hepático. Estas experiências além de comprovar que as diferentes espécies de vanadato promovem efeitos diferentes, poderão também dar informações sobre a bioquímica e metabolismo do vanádio no tecido hepático.

II. Métodos

O presente trabalho de estágio foi realizado em duas fases: a primeira fase foi desenvolvida na Universidade do Algarve (UAlg) enquanto que a segunda fase foi desenvolvida na Universidade da *Extremadura* (UnEx), em Badajoz (ao abrigo do programa Sócrates-Erasmus).

II.1. Captura e aclimação dos indivíduos

Indivíduos da espécie de teleósteo marinho *Halobatrachus didactylus* foram capturados na Ria Formosa, costa sul de Portugal, tendo sido posteriormente aclimatizados durante um período não inferior a duas semanas. Durante o período de aclimação foram mantidos em tanques de 450 litros com água salgada, temperatura controlada entre os 18 e os 20 °C, arejamento constante, com vigilância a factores abióticos como salinidade, concentração de nitritos, amónia e oxigénio dissolvido. Os animais foram alimentados com polvo até dois dias antes do sacrifício. Os indivíduos capturados eram de ambos os sexos e pesavam 339.8 ± 117.7 g e 130.3 ± 28.6 g e mediam 26.9 ± 3.2 cm e 20.2 ± 1.3 cm, na primeira e segunda fase, respectivamente.

II.2. Formação de grupos de estudo

II.2.1. 1ª Fase

Na primeira fase do estágio foram formados quatro grupos sujeitos a condições de exposição distintas, nomeadamente:

- 1º grupo – grupo **controle** (CTRL1), não sujeito a administração. Este grupo reportará os valores basais, sendo sacrificados cinco indivíduos.
- 2º grupo – grupo **placebo**, sujeito à administração de uma solução de NaCl a 0,9 % e pH 7,0. Este grupo livre de contaminação por vanadato reportará para a influência do insulto fisiológico que é a administração intravenosa (i.v.), ou seja reportando o efeito placebo. Sendo sacrificados cinco indivíduos após um dia (PLA1) e após sete dias (PLA7) da administração, num total de dez indivíduos.
- 3º grupo – grupo **metavanadato**, sujeito à administração i.v. de uma solução contendo espécies orto e meta de vanadato (solução metavanadato). Este grupo reportará os possíveis efeitos promovidos por metavanadato. Sendo sacrificados cinco indivíduos após um dia (META1) e após sete dias (META7) da administração de vanádio, num total de dez indivíduos.
- 4º grupo – grupo **decavanadato**, sujeito à administração i.v. de uma solução contendo espécies decaméricas de vanadato (solução decavanadato). Este grupo reportará os possíveis efeitos promovidos por decavanadato. Sendo sacrificados cinco indivíduos: DECA1 e DECA7, um e sete dias após a administração de vanádio, respectivamente.

Após o sacrifício, procedeu-se ao isolamento conforme descrito na secção II.6.

II.2.2. 2ª Fase

Na segunda fase foram formados os mesmos grupos no que diz respeito ao tipo de administração, à exceção do grupo placebo que não foi realizado.

Foram alterados os tempos de exposição e o número de indivíduos sujeitos:

- grupo **controle** (CTRL2), não sujeito a administração. Este grupo reportará para valores basais, sendo sacrificados três indivíduos.
- grupo **metavanadato**, sujeito à administração i.v. de uma solução contendo espécies orto e meta de vanadato (solução metavanadato). Este grupo reportará os possíveis efeitos promovidos por metavanadato. Sendo sacrificados três indivíduos após doze horas de exposição (META12) e dois indivíduos após 24 horas de exposição (META24), num total de cinco indivíduos.
- grupo **decavanadato**, sujeito à administração i.v. de uma solução contendo espécies decaméricas de vanadato (solução decavanadato). Este grupo reportará os possíveis efeitos promovidos por decavanadato. Sendo sacrificados três indivíduos após doze horas de exposição (DECA12) e dois indivíduos após 24 horas de exposição (DECA24), num total de cinco indivíduos.

II.3. Elaboração de soluções de vanadato

Foram preparadas, e posteriormente armazenadas a 4 °C, duas soluções stock de metavanadato e decavanadato de concentração 50 mM a

partir de metavanadato de amónia (NH_4VO_3 , pureza $\geq 98,5\%$, de Riedel-de Häen). A solução metavanadato foi preparada em água do tipo miliQ (com condutividade <0.05), resultando numa solução com $\text{pH} \approx 6.7$. A solução de decavanadato foi efectuada da mesma forma do que a anterior, sendo o pH da solução levado a 4.0 com a adição de HCl. Imediatamente antes da administração i.v. as soluções stock foram diluídas em solução fisiológica (0.9 % NaCl) para 5 mM de concentração final, acertando o pH da solução de decavanadato 5 mM a $\text{pH} 7.0$ (Aureliano *et al.*, 2002). Estas soluções contêm orto e metaméricas de vanadato (solução metavanadato) e espécies decaméricas de vanadato (solução decavanadato) de acordo com estudos anteriores (Amado *et al.*, 1993; Aureliano e Madeira, 1994).

II.4. Administração intravenosa



Figura II.1 - Administração intravenosa, após anestesia, de uma solução de decavanadato em *Halobatrachus didactylus*.

Depois de formados os grupos de estudo, foi administrado a cada indivíduo a solução de vanádio correspondente. A administração i.v. é efectuada após anestesia com éter etilenoglicolmonofenilcol ($\approx 1\text{ ml/l}$ de água salgada). Assim, após anestesiados, aos indivíduos pertencentes ao grupo **placebo** foi administrada solução fisiológica (aproximadamente $300\mu\text{l}$); aos

indivíduos pertencentes aos grupos **metavanadato** e **decavanadato** foram administradas na dose 1 mg/kg as soluções metavanadato e decavanadato, respectivamente, entre 200 a 400 µl de solução de vanádio, dependente do peso (Figura II.1).

II.5. Sacrifício e recolha de tecidos

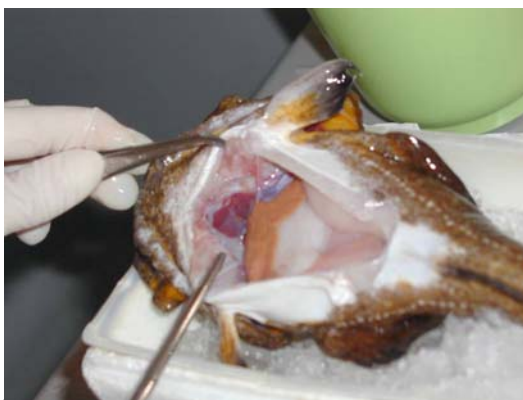


Figura II.2 – Dissecação de indivíduos *Halobatrachus didactylus* para recolha do tecido hepático.

Passado o tempo de exposição definido, os animais foram sacrificados. O sacrifício foi precedido de anestesia e recolha dos dados morfométricos (sexo, peso e comprimento). Os indivíduos foram colocados numa caixa com gelo procedendo-se à dissecação desde a região abdominal até à região

do coração (Figura II.2). Na primeira fase do trabalho, o fígado de cada indivíduo foi retirado e colocado numa caixa de petri colocada sobre o gelo sendo imediatamente pesado, enquanto na segunda fase o fígado foi imediatamente congelado em azoto líquido e armazenado a -80 °C, para posterior preparação e análise das amostras.

II.6. Preparação das amostras (1ª fase)

II.6.1. Preparação de fracção total

Mantendo sempre a caixa de petri em gelo, foi removido todo o tecido conjuntivo, e seccionado um pedaço do fígado com aproximadamente 1 g. A secção obtida foi então homogeneizada em 10 ml de solução tampão **A**,

contendo Tris-HCl 20 mM, pH 7.6, sacarose 0.5 M, KCl 0.15 M, EDTA 1 mM e ditioneitol 1 mM, num homogeneizador Ultraturrax X-600 a 20500 rpm, durante cerca de 1 minuto e 30 segundos. Deste homogenato inicial foi retirada uma aliquota de 1 ml que se destinava à quantificação de vanádio na fracção total do tecido hepático (secção II.11). Os restantes 9 ml foram utilizados para a preparação de fracções subcelulares (mitocondrial e citosólica).

II.6.2. Preparação de fracções subcelulares

Foi usado o método de centrifugação diferencial, recorrendo a uma centrífuga Beckman J2-MC, iniciado com uma centrifugação a 460 g, durante dez minutos, e mantida a 4 °C que visava a precipitação de membranas, fragmentos celulares, núcleos e células intactas. O sobrenadante foi sujeito a outra centrifugação a 10000 g, durante trinta minutos e a 4 °C, após a qual o sedimento e o sobrenadante foram recolhidos e preparados como se descreve em seguida.

II.6.2.1. Fracção mitocondrial

O precipitado resultante da última centrifugação foi ressuspenso em 5 ml de tampão A e novamente centrifugado a 10000 g, durante 30 minutos e a 4 °C. O precipitado desta centrifugação, contendo a fracção mitocondrial) foi ressuspenso em 3 ml de tampão A. Uma aliquota de 1 ml foi separada para posterior quantificação de vanádio (secção II.11), sendo o restante destinado à avaliação da actividade da catalase (secção II.10).

II.6.2.2. Fracção citosólica

O sobrenadante resultante da segunda centrifugação foi submetido a uma centrifugação a 50000 *g* durante duas horas a 4 °C. Descarta-se o precipitado, e obtém-se fracção citosólica a partir do sobrenadante. Tal como nas fracções anteriores 1 ml foi destinado à quantificação de vanádio (secção II.11) e o restante destinado à avaliação dos efeitos causados na actividade da catalase (secção II.10).

II.7. Preparação das amostras (2ª fase)

II.7.1. Fracção Total

Para preparação dos homogenatos de fígado de charroco foi seccionado e pesado cerca de 1 grama de tecido ainda congelado, a homogenização foi realizada a 25 % (m/v) em solução tampão **B**, contendo Tris-HCl 20 mM, pH 7.6 e EDTA 1 mM, efectuada num homogeneizador Ultraturrax X-600 a 20500 rpm, durante cerca de 1 minuto e 30 segundos. Imediatamente após a preparação do homogenato foi separada uma alíquota de 300 µl para quantificação de glutathiona reduzida (GSH) (secção II.12). Ao restante homogenato foram adicionados sacarose, KCl e ditioneitol com concentrações finais de 0.5 M, 0.15 M e 1 mM, respectivamente, obtendo-se assim a fracção total de tecido hepático de cada indivíduo.

II.7.2. Fracção mitocondrial

A separação da fracção mitocondrial foi efectuada numa centrífuga de bancada Eppendorf 5415C, colocada numa câmara fria (4 °C). Foi realizada uma primeira centrifugação a 735 *g* durante 10 minutos que visava a

precipitação de membranas, fragmentos celulares, núcleos e células intactas. Descartado o precipitado, o sobrenadante foi sujeito a uma centrifugação a 9880 *g*, durante vinte minutos. O precipitado obtido foi ressuspenso em 500 μ l de solução tampão **A** e novamente centrifugado a 9880 *g* durante 10 minutos. O precipitado desta centrifugação foi ressuspenso em 250 μ l de solução tampão **A**, obtendo-se assim a fracção mitocondrial.

II.8. Manutenção das amostras

Os fígados recolhidos para a segunda fase do trabalho de estágio foram mantidos congelados durante a viagem (Faro-Badajoz-Faro) recorrendo a uma mala térmica com gelo seco, tendo-se verificado a perfeita integridade dos tecidos à chegada à Universidade da *Extremadura* (UnEx). Todas as amostras preparadas (fracções totais, mitocondriais e citosólicas) a partir de tecido hepático de charroco, foram armazenadas a -80 °C. Sempre que necessário utilizar alguma das amostras, esta era descongelada o mínimo de tempo possível, sendo posteriormente mantida em gelo.

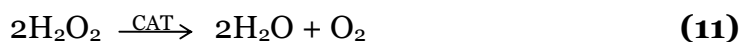
II.9. Quantificação de proteína

O conteúdo proteico das amostras foi quantificado recorrendo ao método de Bradford. Este método é indicado para determinação de proteína total. Baseado na absorção do complexo formado entre proteínas e o corante “Briliant Blue G” (reagente de Bradford). Este complexo tem um máximo de absorção a um comprimento de onda de 595 nm, sendo a absorção do complexo proporcional à quantidade de proteína presente, (Bradford, 1976; Zaia *et al.*, 1998).

Para quantificar a proteína total de cada amostra, foi elaborada uma recta de calibração, recorrendo a uma solução de albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão, com concentrações de proteína padrão até 8.0 µg/ml, sendo as medições efectuadas em triplicado. Na primeira fase do trabalho foi usado reagente de Bradford proveniente da Sigma®, as medições de absorvância foram efectuadas num espectrofotómetro Helios® Thermospectronic λ. Na segunda fase do trabalho foi usado o reagente “Comassie® Plus Protein Assay Reagent” proveniente da Pierce®, as análises foram efectuadas num espectrofotómetro Shimadzu® UV mini1240.

II.10. Avaliação da actividade enzimática da catalase

A catalase (CAT) catalisa a redução divalente de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a duas moléculas de água com libertação de oxigénio.



A actividade cinética da catalase pode ser avaliada a partir da decomposição de peróxido de hidrogénio medida directamente a 240 nm ($\epsilon = 39.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

O ensaio é efectuado em tampão C, contendo KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.5, mantido num banho de água a 25 °C de forma a poder controlar a temperatura de reacção (Aebi, 1984; Claireborn, 1985). A reacção é iniciada com a adição de H₂O₂ (concentração final de 10 mM, Riedel-de Hæen) (Aebi, 1984). Foi usado em cada ensaio 50 µg de proteína, ou o necessário para se obter uma recta com declive de ≈ 0.05 unidades de Absorvância/min sem que se observe a formação de bolhas de oxigénio em quantidade suficiente que possam interferir na leitura.

Foram ainda realizados estudos *in vitro*, medindo a actividade enzimática da catalase na presença de diferentes concentrações de META e DECA, com o intuito de avaliar se os diferentes oligovanadatos promoviam efeitos de estimulação ou inibição da actividade enzimática. Este ensaio foi realizado com as amostras CTRL, da mesma forma que os anteriores, com a adição de META ou DECA, concentrações finais de 100 e 300 μM .

Previamente foram elaborados ensaios controlo na ausência de amostra e na ausência de H_2O_2 , com e sem META e DECA nas diferentes concentrações, para verificar a contribuição destes na absorção a 240 nm durante o tempo de reacção (1 min).

A variação da absorção durante o tempo de reacção foi medida em triplicado usando um espectrofotómetro Helios® Thermospectronic λ . A actividade da catalase é expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

II.11. Quantificação de vanádio

A distribuição sub-celular de vanádio foi determinada, nas amostras preparadas na primeira fase do trabalho (secção II.6), recorrendo à espectroscopia de absorção atómica (EAA). Esta técnica espectroscópica é uma das mais usadas na quantificação de elementos metálicos (Jensen & Jørgensen, 1984), sendo também o método mais usado para a detecção de vanádio em tecidos e fracções sub-celulares (Ray, 1994).

Na análise por EAA, a amostra é sujeita a uma temperatura elevada que tem como resultado a atomização do elemento em estudo. A atomização caracteriza-se pela dissociação das ligações químicas estabelecidas pelo elemento, trazendo-o para o nível mais baixo de energia (“*ground state*”)

(Jensen & Jørgensen, 1984; Alloway & Ayres, 1993). Isto significa que o átomo pode absorver radiação a um comprimento de onda específico de acordo com os níveis de energia correspondentes ao seu espectro não-linear (Jensen & Jørgensen, 1984). A absorção de radiação segue a lei de Beer-Lambert, o que permite através de uma curva de calibração adequada quantificar o elemento em estudo, neste caso o vanádio (Jensen & Jørgensen, 1984; Alloway & Ayres, 1993; Ray, 1994).

II.11.1. Preparação das amostras para quantificação de vanádio por espectroscopia de absorção atômica

Após a separação das fracções sub-celulares do tecido hepático (secção II.6), as amostras foram pesadas em frascos de vidro, para avaliação do peso húmido, e colocadas numa estufa a 60 °C até atingirem peso seco constante. O material de vidro usado foi previamente descontaminado com água régia (HCL:HNO₃, 3:1) (Aureliano *et al.* 2002).

Obtido o valor de peso seco, foram submetidas as amostras ao método de decomposição por via húmida, que visa, por acção de um agente oxidante, a destruição de toda a matéria orgânica que interferiria na detecção (Solchaga *et al.*, 1986; Gonçalves, 1990; Ray, 1993). O método de decomposição por via húmida consistiu na digestão das amostras após adição de ácido nítrico (HNO₃) (concentração final de 65 %, de BDH Aristar) na razão de 20 ml de HNO₃ por grama de tecido seco, tal como descrito por Bryan *et al.* (1985), Greenberg *et al.* (1993) e Aureliano *et al.* (2002). A digestão foi realizada sobre uma placa térmica à temperatura de 100 °C até à obtenção de um resíduo amarelo claro. O resíduo obtido foi retomado em 1 ml de ácido

clorídrico (concentração final de 10 %, de BDH Aristar) (Aureliano *et al.*, 2002).

II.11.2. Espectroscopia de absorção atômica

A análise espectroscópica da absorção atômica de vanádio foi realizada num espectrofotômetro de absorção atômica Varian® SpectrAA20, com câmara de grafite que permite detecção na ordem de partes por bilhão (ppb). O espectrofotômetro foi configurado como descrito nas tabelas V e VI. Tal como descrito anteriormente (Aureliano *et al.*, 2002) foram elaboradas soluções de trabalho (10, 20 e 40 ppb) a partir de uma solução padrão de vanádio (40 ppb) para a determinação de uma curva de calibração usada para quantificar vanádio.

Tabela V – Parâmetros operatórios usados na espectroscopia de absorção atômica de vanádio no espectrofotômetro Varian® SpectrAA20.

Modo do Instrumento	Absorção
Modo de Calibração	Concentração
Modo de Medida	Altura do Pico
Corrente (mA)	18
Comprimento de Onda (nm)	318.2
Largura da Fenda (nm)	0.2
Introdução da Amostra	Mistura Automática
Constante de Tempo	0.0
Tempo de Medida (seg)	1.0
Replicados	3
Correcção de Fundo	não

Tabela VI – Resumo das etapas realizadas na fornalha do espectrofotómetro Varian® SpectrAA20 com câmara de grafite na quantificação de vanádio.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Tempo de Espera (s)	Tipo de Gás
1	Injecção da Amostra			
2	85	2	1	Aux
3	95	1	35	Aux
4	120	5	2	Aux
5	1200	5	1	Inerte
6	1200	1	1	-
7	2700	0.8	2	-
8	2700	0.1	2	Inerte

II.11.3. Determinação da concentração de vanádio

De modo a avaliar a distribuição intracelular de vanádio no tecido hepático após intoxicação com metavanadato e decavanadato foi determinada a concentração de vanádio, expressa em $\mu\text{g V / g}$ de tecido, nas diferentes fracções (total, mitocondrial e citosólica) segundo as equações 12, 13 e 14.

$$\text{Fracção Total} \quad [F_{\text{total}}] = A \times \left(\frac{V_{\text{retoma}}}{P_{\text{seco total}}} \right) \quad (12)$$

$$\text{Fracção Mitocondrial} \quad [F_{\text{mitocondrial}}] = A \times \left(\frac{V_{\text{retoma}}}{P_{\text{seco total}}} \right) \times \left(\frac{P_{\text{seco mit}}}{P_{\text{húmido mit}}} \right) \quad (13)$$

$$\text{Fracção Citosólica} \quad [F_{\text{citosólica}}] = A \times \left(\frac{V_{\text{retoma}}}{P_{\text{seco total}}} \right) \times \left(\frac{P_{\text{seco cit}}}{P_{\text{húmido cit}}} \right) \quad (14)$$

A = Valor de concentração obtido fornecido pelo espectrofotómetro (ppb)

V_{retoma} = Volume de HCl usado na retoma (1 ml)

$P_{\text{seco total}}$ = Peso seco da fracção total

$P_{\text{seco mit}}$, $P_{\text{seco cit}}$ = Peso seco da fracção mitocondrial e citosólica, respectivamente

$P_{\text{húmido mit}}$, $P_{\text{húmido cit}}$ = Peso húmido da fracção mitocondrial e citosólica, respectivamente

II.11.4. Validação do método

O método foi validado por intermédio do uso de material biológico de referência certificado (MRC), TORT-1 (hepatopâncreas de lagosta), proveniente do *National Research Council of Canada* (NRCC). O MRC foi preparado para análise de EAA como descrito na secção II.11.1. O desempenho do MRC foi calculado segundo Castro (1997), por intermédio do teste “*Z-scores*”, usando a equação [5].

$$Z = \frac{(X_{\text{lab}} - X_v)}{S} \quad [5]$$

X_{lab} = Valor obtido na análise por EAA

X_v = Valor certificado pelo MRC

S = Unidade de desvio admissível, que pode ser o desvio padrão da média dos resultados ou a incerteza de X_v

O resultado obtido foi avaliado segundo os parâmetros a seguir descritos:

$0 < |Z| \leq 2$: Satisfatório

$2 < |Z| \leq 3$: Questionável

$|Z| > 3$: Incorrecto

II.12. Quantificação de glutathiona reduzida (GSH)

Foi determinada a quantidade de GSH nos homogenatos de fígado de charroco após exposição com diferentes oligovanadatos (metavanadatos e decavanadatos), como descrito na secção II.7.1. A determinação da quantidade de GSH, é realizada com base na redução do ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) na presença de grupos do tipo sulfidrilo. O composto resultante apresenta um máximo de absorção a 412 nm.

Os ensaios foram realizados logo após a obtenção dos homogenatos (secção II.7) a fim de prevenir a oxidação de GSH a GSSG. A preparação das amostras foi realizada tal como descrito por Tietze (1969, *in* Martín-Romero *et al.*, 2002).

Foi mantida em gelo, durante 10 minutos, uma aliquota de 300 μ l à qual foi adicionada 60 μ l de ácido perclórico a 20% (HClO₄) para precipitar as proteínas. A mistura foi centrifugada a 16000 *g* durante 10 minutos numa centrífuga de bancada Eppendorf 5415C, colocada numa câmara fria (4 °C). O sobrenadante resultante foi neutralizado (pH = 7) adicionando KOH, de modo a evitar a redução do DTNB. Foram seguidamente repetidos 10 minutos em gelo e subsequente centrifugação. Desprezado o precipitado, a amostra estava pronta a ser analisada quanto ao seu conteúdo em GSH.

Foi realizado um ensaio preliminar onde se adicionou solução tampão **B** que seguiu todos os passos de preparação das outras amostras, com a finalidade de verificar a contribuição dos passos de preparação na redução do DTNB. Os ensaios foram realizados em tampão **D**, contendo KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.0, KCl 100 mM, ao qual é adicionado DTNB (concentração final de 0.5 mM), sendo lida a absorção a 412 nm, num espectrofotómetro Shimadzu® UV mini1240, antes e após cada adição de amostra, no total de três adições (uma de 50 μ l e duas de 100 μ l). A quantidade de GSH é expressa em nmol de GSH por mg de proteína, sendo calculada tendo em conta o coeficiente de extinção molar do DTNB reduzido ($\epsilon = 13.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e a variação do volume resultante das adições de amostra.

II.13. Avaliação da actividade pro-oxidante total

A avaliação da actividade pro-oxidante total foi calculada recorrendo ao a sonda dicloro-dihidrofluoresceína diacetato (DH₂DCF-DA) (Zhang *et al.*, 2001; Martin-Romero *et al.*, 2002). Esta sonda difunde através da membrana, sendo enzimaticamente hidrolizada a dicloro-dihidrofluoresceína (DH₂DCF) que é rapidamente oxidada a diclorofluoresceína (DCF), um composto altamente fluorescente, por acção de agentes oxidantes (Zhang *et al.*, 2001).

As medições de fluorescência foram efectuadas num espectrofotómetro de fluorescência Perkin-Elmer 650-40, com banho a 25 °C, a comprimento de onda de excitação e de emissão de 495 nm e 520 nm, respectivamente. O ensaio foi realizado em tampão **D** ao qual é adicionado a sonda DH₂DCF-DA (concentração final de 2 ng/ml). A reacção é iniciada por adição de 20 µg de proteína, das amostras isoladas na secção II.7, sendo registado o aumento da fluorescência durante 30 minutos (-NADH), ao fim deste tempo é adicionado NADH (concentração final de 100 µM), de modo a potenciar a produção de ROS, ao meio de reacção, sendo registado durante 15 minutos (+NADH).

A partir dos registos foram calculados diversos intervalos de variação de fluorescência, -NADH: $\Delta t = 30$ min ($t_{\text{inicial}} = 0$ min, $t_{\text{final}} = 30$ min) e $\Delta t = 5$ min ($t_{\text{inicial}} = 25$ min, $t_{\text{final}} = 30$ min); +NADH: $\Delta t = 4$ min ($t_{\text{inicial}} = 2$ min, $t_{\text{final}} = 6$ min) e $\Delta t = 5$ min ($t_{\text{inicial}} = 10$ min, $t_{\text{final}} = 15$ min). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (u.a.) de fluorescência por minuto por mg de proteína. O valor de fluorescência foi corrigido segundo Lackowicz (1999), usando os valores de absorção da mesma concentração de amostra aos comprimentos de onda de excitação e emissão (medida num

espectrofotómetro Shimadzu® UV mini1240) para cálculo do factor de correcção.

II.14. Produção de anião superóxido e capacidade reductora total

A produção de anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e a capacidade reductora total (CRT) é avaliada medindo a velocidade de redução do nitrobenzotetrazólio (NBT) (Martin-Romero *et al.*, 2002), que por acção de radicais (espécies reactivas como $\cdot\text{O}_2^-$, semiquinona ($\cdot\text{Q}$) e radical hidróxilo ($\cdot\text{OH}$)) forma formazan, um composto que apresenta um valor máximo de absorção a 560 nm ($\varepsilon = 15 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Os ensaios foram efectuados num espectrofotómetro Shimadzu® UV mini1240, com banho a 25 °C. O meio reaccional é composto de tampão **D** ao qual é adicionado EDTA (concentração final de 0.1 mM) de modo a eliminar a ocorrência de reacções de Fenton. O ensaio ocorre com 120 µg de proteína das amostras preparadas na secção II.7.1 e a reacção é iniciada após a adição de NADH (concentração final de 50 µM) sendo medida, durante cerca de 10 minutos, a velocidade de redução de NBT. Após o tempo referido foram adicionadas 350 unidades (U) de dismutase de superóxido (SOD), continuando a monitorização da redução de NBT durante 5 minutos.

A produção de $\cdot\text{O}_2^-$ é calculada a partir da diminuição da velocidade de redução de NBT após a adição de SOD e é expressa em nmol de $\cdot\text{O}_2^-$ por min por mg de proteína. A CRT é calculada a partir da velocidade inicial de redução de NBT e é expressa em nmol de NBT reduzido por min por mg de proteína.

II.15. Avaliação de peroxidação lipídica

A avaliação da variação de peroxidação lipídica foi realizada recorrendo a um cromóforo natural, o ácido *cis*-parinárico (AcPn). Este ácido gordo poliinsaturado possui quatro ligações duplas e tem uma conformação similar à dos ácidos gordos que fazem parte de dos fosfolípidos de membrana (Tyurina *et al*, 2000). Esta similaridade permite, em condições fisiológicas, a incorporação deste ácido gordo nos sistemas membranares. A destruição oxidativa de qualquer parte do sistema de ligações duplas do AcPn elimina a emissão de fluorescência que lhe é característica a ≈ 420 nm (Tyurina *et al*, 2000). Sendo assim, é possível analisar de forma fidedigna o estado oxidativo das membranas celulares e avaliar a extensão da peroxidação lipídica através da diminuição da fluorescência característica do AcPn.

Os ensaios foram levados a cabo num espectrofotómetro de fluorescência Perkin-Elmer 650-40, com banho a 25 °C, a comprimento de onda de excitação e de emissão de 332 nm e 416 nm, respectivamente. Para cada amostra preparada na secção II.7, foram feitos dois ensaios, usando volumes de amostra diferentes 12.5 e 25 μ l. As medições foram realizadas em tampão **D** e a reacção foi iniciada após a adição de AcPn (concentração final de 4 μ M). Foi registado a diminuição progressiva de fluorescência de AcPn durante 15 minutos.

Os resultados foram obtidos considerando um intervalo temporal igual em todos os casos e estão expressos em unidades arbitrárias (u.a.) de fluorescência por minuto por mg de proteína. O valor de fluorescência foi corrigido segundo Lackowicz (1999), usando os valores de absorção da mesma concentração de amostra aos comprimentos de onda de excitação e emissão

(medida num espectrofotómetro Shimadzu® UV mini1240) para cálculo do factor de correcção.

II.16. Avaliação da actividade enzimática da NADH oxidase

A actividade enzimática da oxidase de NADH foi avaliada nas amostras isoladas como indicado na secção II.7.1.

O NADH é um cromóforo natural com um pico de absorção a 340 nm. Esta análise é realizada com base na diminuição da absorvância ao comprimento de onda referido, devido à oxidação do NADH provocada pela NADH oxidase. Utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) é então possível calcular a actividade enzimática da NADH oxidase.

O ensaio foi realizado em tampão **D** com 5 μl de volume de amostra (posteriormente quantificada como indicado em na secção II.9), sendo inicialmente registado o valor de absorção durante 2 minutos. A reacção é então iniciada após o registo inicial com a adição de NADH (concentração final de 250 μM), monitorizando-se a diminuição da absorção a 340 nm. As medições foram efectuadas num espectrofotómetro Shimadzu® UV mini1240, com banho a 25 °C.

Os resultados obtidos não foram considerados válidos devido à existência de interferência na absorção, ao comprimento de onda a que os ensaios foram efectuados (340 nm), por parte da amostra e que impediu a realização de leituras fiáveis. Por este motivo os resultados correspondentes aos estudos realizados não serão descritos no presente relatório.

II.17. Tratamento de dados e análise estatística

A análise dos efeitos provocados pela administração diferencial de diferentes oligovanadatos, representados pelas soluções META (orto e metavanadatos) e DECA (decavanadatos), é um dos objectivos deste trabalho. Para o efeito foram feitas diversas análises em amostras obtidas a partir de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*, sujeito a intoxicação pelas soluções supracitadas, tal como descrito na secção II.2. Os valores obtidos foram processados e analisados recorrendo ao software Microcal™ Origin® versão 6.0. A análise estatística foi feita usando o "t-test" com duas variáveis independentes, com $p < 0.05$ para os valores considerados como significativamente diferentes dos controlos ou placebos.

III. Resultados

Neste trabalho foram monitorizados diversos marcadores de stress oxidativo em diversas fracções de homogenato de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus* sujeito a intoxicação por metavanadatos (grupo META) e decavanadatos (grupo DECA). Na UAlg foram analisadas a actividade enzimática da catalase e a distribuição subcelular de vanádio e na UnEx foram analisados o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), a produção de espécies pro-oxidantes, a produção de anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), a capacidade redutora total (CRT) e a ocorrência de peroxidação lipídica.

III.1. Avaliação da actividade enzimática da catalase

Após efectuados os ensaios preliminares, foi verificado que durante o tempo de reacção (1 minuto) a variação da absorção a 240 nm na ausência de amostra e de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) era inferior a 0.002 unidades de absorvância. Este valor não alteraria os resultados obtidos de forma significativa, pelo que a contribuição na variação da absorvância a 240 nm por parte da amostra e por parte da auto-oxidação do H_2O_2 foi tomada negligível.

A actividade enzimática da catalase foi determinada nas fracções mitocondrial e citosólica de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus* verificando-se valores de actividade basal 2.5 vezes superior na fracção mitocondrial. A resposta enzimática da catalase dada pelos diferentes grupos (secção II.2.1) apresentou padrões diferentes (Figura III.1). Esperar-se-ia ver um efeito mais proeminente nos grupos sujeitos a intoxicação por vanadato, no entanto o grupo denominado placebo (PLA), o qual não esteve sujeito a

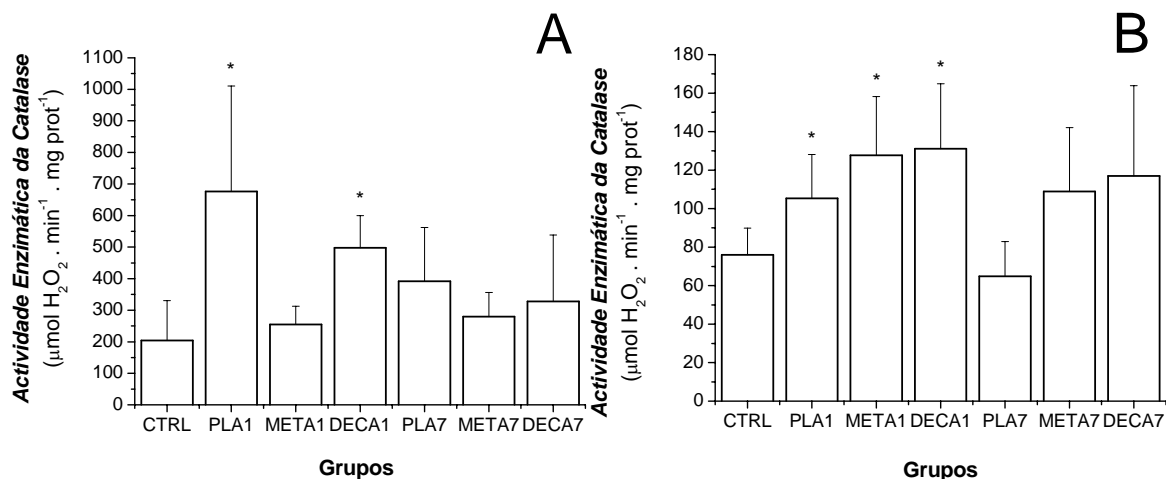


Figura III.1 – Actividade enzimática da catalase nas fracções mitocondrial (A) e citosólica (B) de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. A média da actividade (barras) e respectivo desvio padrão (linhas) de cada grupo (n=5) é expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína. Os grupos diferem em contaminação e em tempo de exposição. CTRL, PLA, META e DECA referem-se aos grupos controlo, placebo, metavanadato (5 mM, 1 mg/kg) e decavanadato (5 mM, 1 mg/kg), respectivamente. Os números 1 e 7 referem-se a um e sete dias de exposição. A proteína foi quantificada usando o método de Bradford. (* significativamente diferente do controlo, $p < 0.05$)

vanadato, apresentou um valor bem distinto do valor basal (valor determinado no grupo CTRL), principalmente passado um dia do insulto (injecção intravenosa (i.v.)) e obtendo-se valores na ordem dos $677 (\pm 335) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína (PLA1) *versus* (*vs*) $204 (\pm 127) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína (CTRL), na fracção mitocondrial (Figura III.1.A), o que representa um aumento de aproximadamente 230 % ($p < 0.05$), enquanto na fracção citosólica o aumento foi menos acentuado, aproximadamente 40 % ($p < 0.05$), $76 (\pm 14) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína (PLA1) *vs* $105 (\pm 23) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína (CTRL) (figura III.1.B). Os valores obtidos sugerem que o insulto provocado pela injecção i.v. aumenta significativamente a actividade da catalase.

Tendo em conta os resultados obtidos nos grupos placebo, os resultados dos grupos contaminados serão comparados numa base percentual com os valores dos grupos placebo, para o mesmo tempo de exposição, tendo sempre presentes os valores basais (grupo CTRL) determinados.

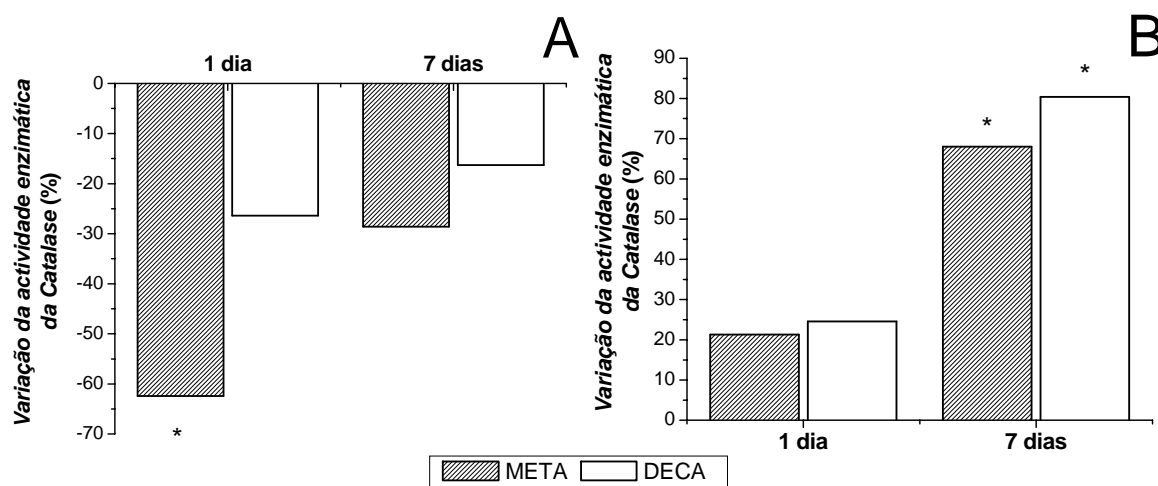


Figura III.2 – Variação da actividade enzimática da catalase nas fracções mitocondrial (A) e citosólica (B) de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. A variação foi calculada em relação ao valor obtido no grupo placebo com o mesmo tempo de exposição dos grupos contaminados META e DECA. Os grupos diferem em contaminação e em tempo de exposição. META e DECA referem-se aos grupos metavanadato (5 mM, 1 mg/kg) e decavanadato (5 mM, 1 mg/kg), respectivamente. Os números 1 e 7 referem-se a um e sete dias de exposição. (* significativamente diferente do grupo placebo, $p < 0.05$)

Relativamente à fracção mitocondrial os resultados indicam que a exposição a vanadato reprime o efeito observado no grupo placebo aproximando os valores de actividade dos grupos expostos aos vanadatos do valor basal (Figura III.1.A). A repressão é mais pronunciada no grupo META ao fim de um dia de exposição, em que diminui aproximadamente 60 % ($p < 0.05$) a actividade enzimática da catalase, $254 (\pm 58) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína (PLA1) vs $677 (\pm 335) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína (META1), enquanto que variações inferiores (até 25 %) foram observados nos restantes grupos estudados (Figura III.2.A). Verifica-se ainda que ao fim de sete dias de

exposição os valores de actividade enzimática da catalase obtidos nos diversos grupos (PLA, META e DECA) são muito próximos do valor basal (Figura III.1).

Na fracção citosólica os resultados apontam para efeitos distintos dos obtidos na fracção mitocondrial. Enquanto que na fracção mitocondrial a exposição a vanadatos indicia uma repressão aos efeitos evidenciados nos grupos PLA, na fracção citosólica o que se verifica é uma promoção da actividade enzimática da catalase (Figuras III.1.B e III.2.B). Tanto META como DECA promovem um aumento, da actividade enzimática da catalase mais evidente após sete dias de exposição, quando o valor do grupo placebo, $65 (\pm 18) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ (PLA7), é próximo do valor basal, em que ambos promovem aumentos de 68 % ($p < 0.05$) com $109 (\pm 33) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ (META7) e 80 % ($p < 0.05$) com $117 (\pm 47) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ (DECA7) (Figura III.2).

Verificou-se que concentrações inferiores a $300 \mu\text{M}$ tanto de META como de DECA não alteram significativamente a actividade enzimática da catalase. Nestes estudos realizados *in vitro*, as alterações foram inferiores a 10 % do valor basal, tanto na fracção mitocondrial como na fracção citosólica. No entanto, na fracção mitocondrial verificou-se que concentrações mais elevadas de DECA promovem uma inibição de cerca de 10% na actividade enzimática da catalase (resultados não apresentados).

III.2. Quantificação de Vanádio

A acumulação de vanádio e a sua distribuição nas fracções mitocondrial e citosólica no tecido hepático de *Halobatrachus didactylus* foram determinadas por espectroscopia de absorção atómica. O método foi validado

recorrendo a material biológico de referência certificado (MRC), TORT-1 (hepatopâncreas de lagosta), sendo o valor de $Z = 0.012$ (Tabela III) o que de acordo com os parâmetros estabelecidos resulta num desempenho satisfatório.

Nos resultados obtidos, e tendo uma perspectiva global relativamente a todas as fracções estudadas, verifica-se que, no que diz respeito à acumulação e distribuição de vanádio, não há diferenças substanciais entre os grupos controlo e placebo (após um e sete dias de exposição) e que a exposição mais prolongada a espécies decaméricas de vanadato, grupo DECA7, promove maior acumulação de vanádio (Figura III.3).

Tabela III – Resultados obtidos para a validação do método usado na quantificação de vanádio por EAA.

MRC	V (mg/Kg)	Teste “Z-scores”
Valor certificado (X_v)	1.4 ± 0.3	$Z = 0.012$
Valor obtido (X_{lab})	1.4 ± 0.005	

O grupo controlo apresenta valores de acumulação de vanádio no tecido hepático de $0.43 (\pm 0.03) \mu\text{g/g}$ tecido, um valor 20 vezes superior ao obtidos nas fracções mitocondrial e citosólica, $0.023 (\pm 0.004) \mu\text{g/g}$ tecido e $0.022 (\pm 0.002) \mu\text{g/g}$ tecido, respectivamente (Figura III.3).

Em todas as fracções, a acumulação de vanádio é sempre mais elevada na exposição à solução decavanadato. Na fracção total, a acumulação de vanádio sofre aumentos, em relação ao grupo controlo, de 49 % e de 125 % após exposição de um e sete dias, respectivamente. Relativamente às fracções subcelulares, os aumentos em relação aos controlos são ainda superiores. Na fracção citosólica os aumentos são de 155 % ao fim de um dia de exposição e de 200 % ao fim de sete dias de exposição, na fracção mitocondrial observam-

se aumentos de 122 % após um dia de exposição e de 490 % após um sete dias de exposição (Figura III.3).

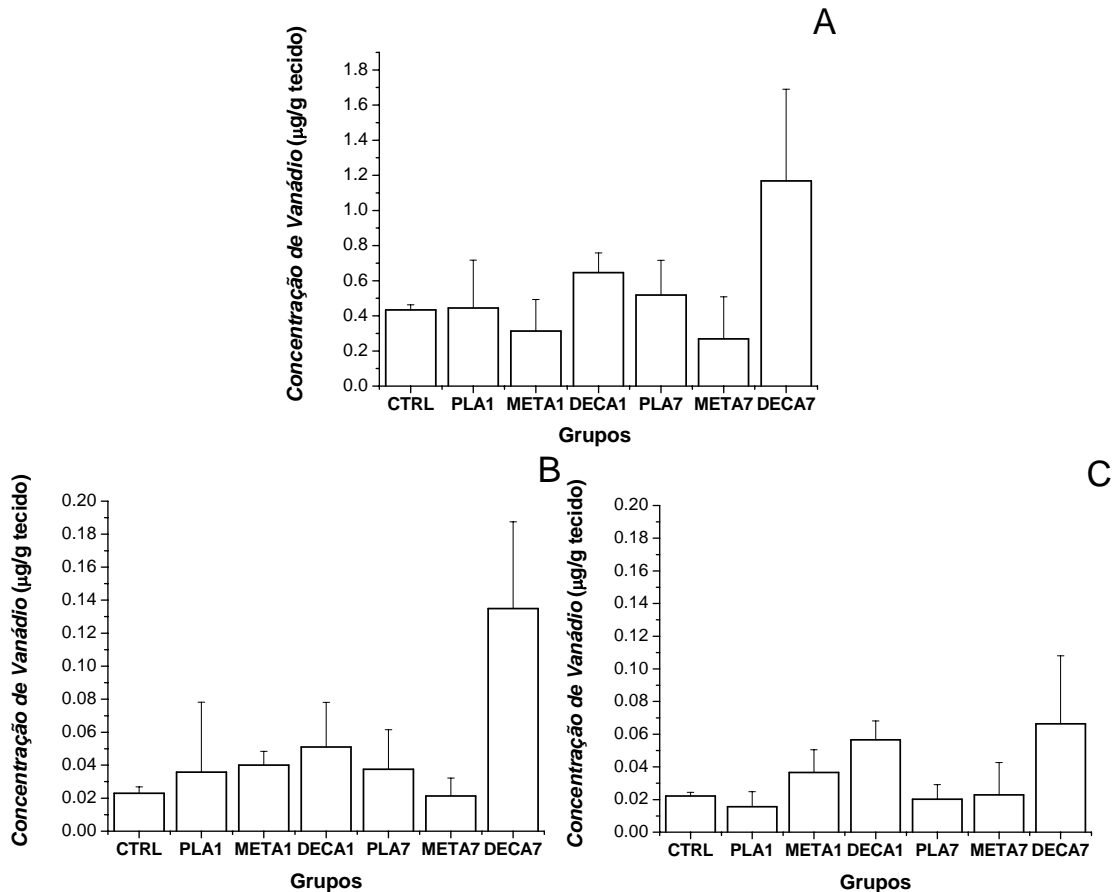


Figura III.3 – Quantificação de vanádio por espectroscopia de absorção atômica no tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. Fracção total (A), fracção mitocondrial (B) e fracção citosólica (C). Os grupos (n = 5 indivíduos) diferem em contaminação e em tempo de exposição. CTRL, PLA, META e DECA referem-se aos grupos controlo, placebo, metavanadato (5 mM, 1 mg/kg) e decavanadato (5 mM, 1 mg/kg), respectivamente. Os números 1 e 7 referem-se a um e sete dias de exposição. (* significativamente diferente do controlo, $p < 0.05$)

Nos grupos contaminados com espécies orto e metaméricas de vanadato, grupos META1 e META7, as variações são mais significativas ao fim de um dia de exposição com aumentos de 65 % na fracção citosólica e de 75 % na fracção mitocondrial. Os restantes valores aproximam-se dos valores obtidos no grupo controlo, sendo que na fracção total os resultados indicam uma diminuição de 25 % na acumulação de vanádio no tecido hepático, ainda

que se registem aumentos na acumulação de vanádio nas fracções subcelulares estudadas (Figura III.3).

III.3. Quantificação de glutathiona reduzida (GSH)

Foi determinada nos homogenatos de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus* a quantidade de glutathiona reduzida (GSH) por mg de proteína. Verificou-se que a intoxicação por DECA não altera a concentração intracelular de GSH, sendo o valor determinado próximo do valor basal, $\approx 7.8 (\pm 3.0)$ nmol.mg⁻¹ proteína (Figura III.4). Por outro lado, aparentemente a intoxicação por META promove uma variação na concentração intracelular de GSH entre 20 % (após 12 horas) e 35 % (após 24 horas) com um valor máximo de $10.6 (\pm 1.8)$ nmol.mg⁻¹ proteína (Figura III.4).

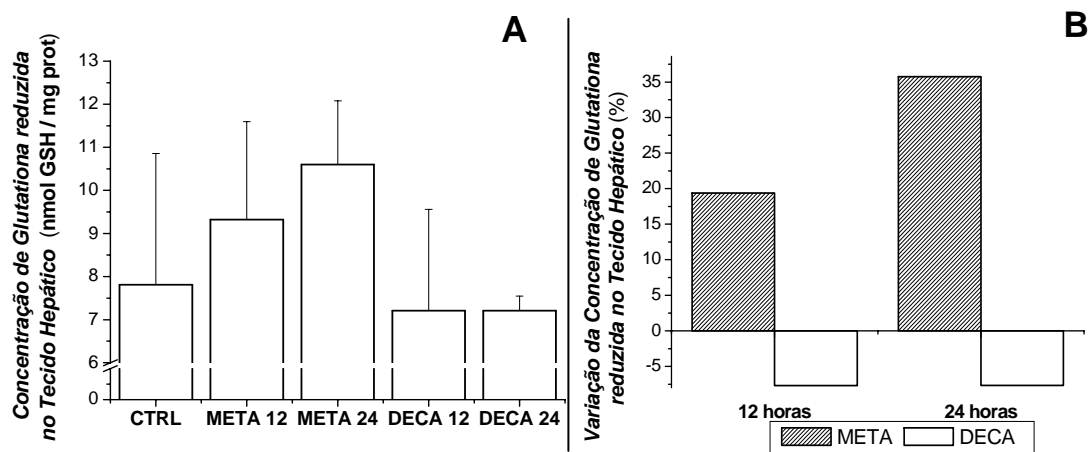


Figura III.4 – Concentração de glutathiona reduzida (A) e Variação da Concentração de Glutathiona reduzida (B) no tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. A variação foi calculada em relação ao valor obtido no grupo controlo. Os grupos diferem em contaminação e em tempo de exposição. CTRL, META e DECA referem-se aos grupos controlo, metavanadato (5 mM, 1 mg/kg) e decavanadato (5 mM, 1 mg/kg), respectivamente. Os números 12 e 24 referem-se a doze e vinte e quatro horas de exposição.

III.4. Avaliação da actividade pro-oxidante total

A actividade pro-oxidante total foi determinada nos homogenatos de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. Os resultados apresentados na Figura III.4 foram obtidos a partir do registo da variação de fluorescência no intervalo $+NADH:\Delta t = 4$ min ($t_{\text{inicial}} = 2$ min, $t_{\text{final}} = 6$ min), tendo optado por não colocar os restantes intervalos registados, pois estes apresentaram um padrão de variação semelhante.

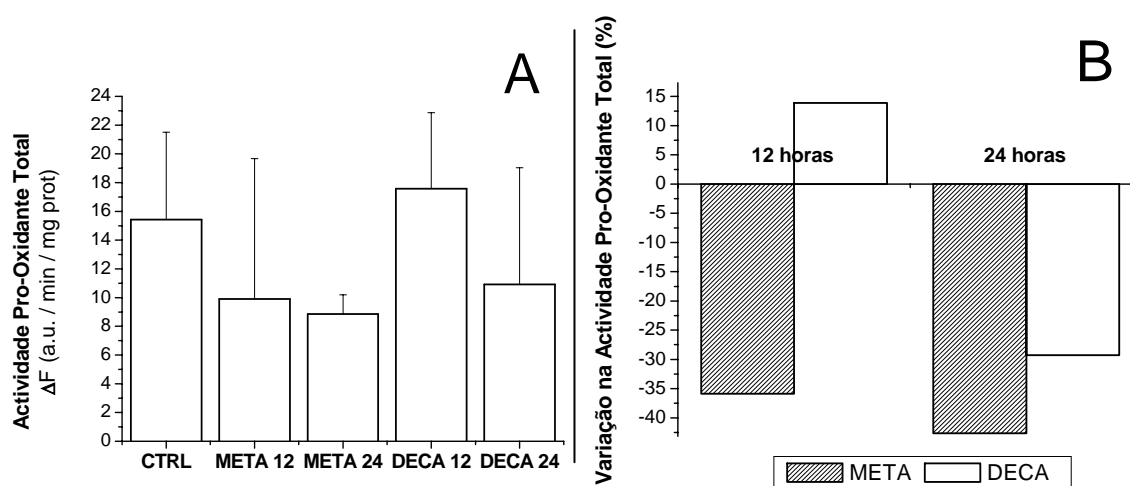


Figura III.5 – Actividade Pro-Oxidante Total (A) e Variação da Actividade Pro-Oxidante Total (B) no tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. A variação foi calculada em relação ao valor obtido no grupo controlo. Os grupos diferem em contaminação e em tempo de exposição. CTRL, META e DECA referem-se aos grupos controlo, metavanadato (5 mM, 1 mg/kg) e decavanadato (5 mM, 1 mg/kg), respectivamente. Os números 12 e 24 referem-se a doze e vinte e quatro horas de exposição.

Esta análise deu indícios que os oligovanadatos, presentes nas soluções META e DECA, não promovem aumentos significativos de espécies com capacidade oxidante (Figura III.5.A). Pelo contrário, nos indivíduos sujeitos a intoxicação por metavanadatos, grupo META, a velocidade de produção de espécies pro-oxidantes diminui na ordem de 40 %, um efeito que se verifica ao fim de 12 horas e que se estende até às 24 horas de exposição. Nos indivíduos

expostos a decavanadato, grupo DECA, não se observam alterações significativas às 12 horas de exposição, no entanto ao fim de 24 horas verifica-se também uma diminuição em cerca de 30 % na actividade pro-oxidante total (Figura III.5.B).

III.5. Produção de anião superóxido e capacidade redutora total

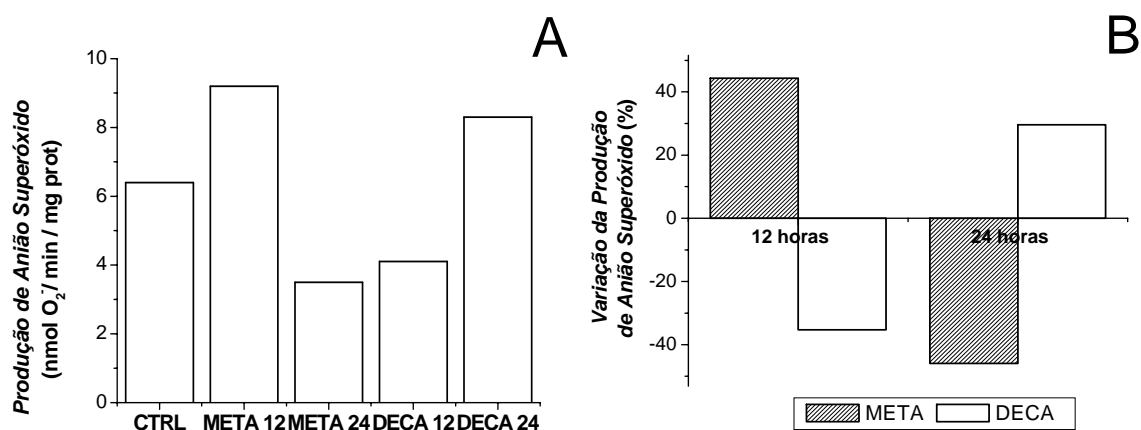


Figura III.6 – Produção de anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (A) e variação da produção de anião superóxido (B) na fracção mitocondrial de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. A variação foi calculada em relação ao valor obtido no grupo controlo. Os grupos diferem em contaminação e em tempo de exposição. CTRL, META e DECA referem-se aos grupos controlo, metavanadato (5 mM, 1 mg/kg) e decavanadato (5 mM, 1 mg/kg), respectivamente. Os números 12 e 24 referem-se a doze e vinte e quatro horas de exposição.

Foi avaliada a produção de anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) na fracção mitocondrial dos homogenatos de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. Verificou-se que os efeitos provocados pelos diferentes oligovanadatos em META e DECA são inversos (Figura III.6). Assim, ao fim de 12 horas os indivíduos aos quais foi administrada solução de metavanadato, grupo META, sofreram um aumento de $\approx 45\%$ ($9.2 \text{ nmol} \cdot \text{O}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) na produção de $\cdot\text{O}_2^-$, enquanto que os indivíduos sob administração

de decavanadato, grupo DECA, apresentaram um decréscimo de $\approx 35\%$ ($4.1 \text{ nmol} \cdot \text{O}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$) (Figura III.6).

Após 24 horas de exposição, os efeitos revertem-se, já que os resultados apontam para uma diminuição de 45% ($3.5 \text{ nmol} \cdot \text{O}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$), no grupo META, e para um aumento de 30% ($8.3 \text{ nmol} \cdot \text{O}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$), no grupo DECA, na produção de anião superóxido (Figura III.7).

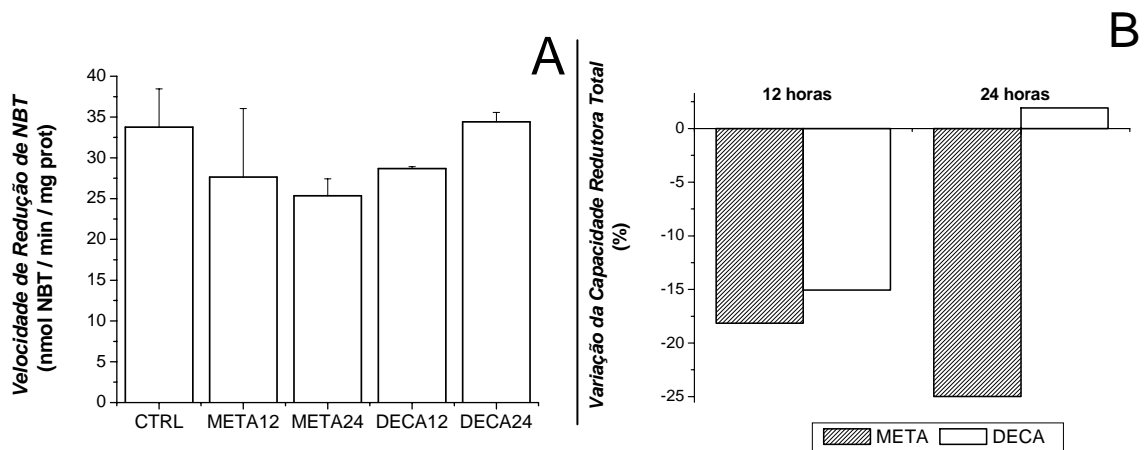


Figura III.7 – Estimativa da capacidade redutora total através da redução do nitrobenzotetrazólio (NBT) (A) e variação capacidade redutora total (B) na fracção mitocondrial de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. A variação foi calculada em relação ao valor obtido no grupo controlo. Os grupos diferem em contaminação e em tempo de exposição. CTRL, META e DECA referem-se aos grupos controlo, metavanadato (5 mM, 1 mg/kg) e decavanadato (5 mM, 1 mg/kg), respectivamente. Os números 12 e 24 referem-se a doze e vinte e quatro horas de exposição.

No que diz respeito à determinação da capacidade redutora total (CRT), os resultados mais significativos ocorrem passados 24 horas de exposição. A exposição a espécies decaméricas de vanadato não promove qualquer alteração na CRT, mantendo-se os valores próximos dos valores basais (grupo controlo), enquanto que a exposição a espécies monoméricas e metaméricas

de vanadato, grupo META, promove uma diminuição na capacidade redutora total em cerca de 25 % (Figura III.7).

III.6. Avaliação da Peroxidação Lipídica

A ocorrência de peroxidação lipídica foi avaliada medindo a diminuição da fluorescência do ácido cis-Parinário (AcPn), sendo que quanto maior a variação, maior será a ocorrência de peroxidação lipídica.

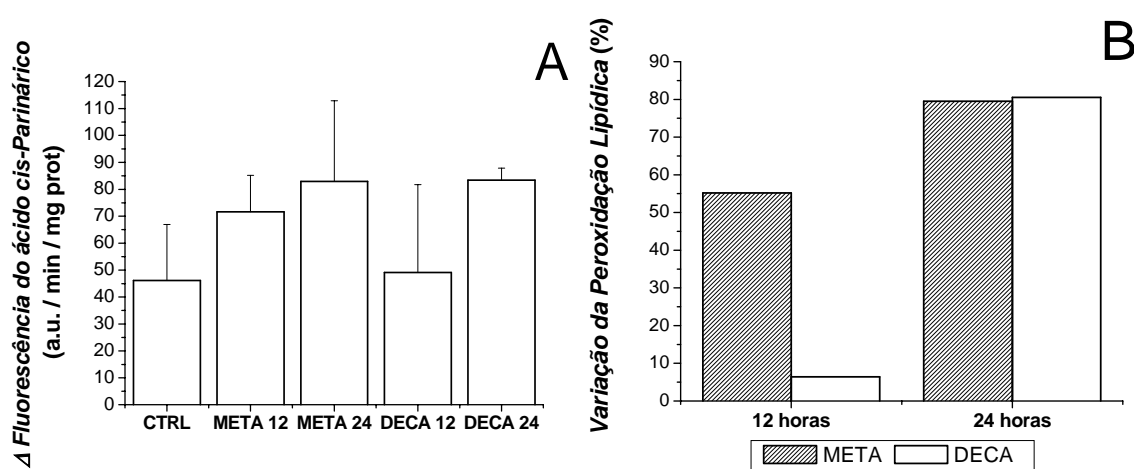


Figura III.8 – Avaliação da peroxidação lipídica através da variação da fluorescência do ácido cis-Parinarico (A) e Variação da Peroxidação Lipídica (B) no tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. A variação foi calculada em relação ao valor obtido no grupo controlo. Os grupos diferem em contaminação e em tempo de exposição. CTRL, META e DECA referem-se aos grupos controlo, metavanadato (5 mM, 1 mg/kg) e decavanadato (5 mM, 1 mg/kg), respectivamente. Os números 12 e 24 referem-se a doze e vinte e quatro horas de exposição.

Os resultados obtidos indicam que a exposição a metavanadato, grupo META, promove um aumento na peroxidação lipídica de aproximadamente 55 % (com $\Delta F = 72 (\pm 14)$ a.u..min⁻¹.mg⁻¹ proteína) ao fim de 12 horas, relativamente ao valor basal (grupo controlo, $\Delta F = 46 (\pm 21)$ a.u..min⁻¹.mg⁻¹ proteína). Os efeitos promovidos pela solução metavanadato mantêm-se passadas 24 horas, pois verificou-se que o aumento em relação ao valor

controlo foi de $\approx 80\%$ (com $\Delta F = 86 (\pm 30)$ a.u.. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína) (Figura III.8).

Relativamente à intoxicação por decavanadato, grupo DECA, apenas se verificou um aumento no valor de peroxidação lipídica ao fim de 24 horas. Após intoxicação de 12 horas com DECA, o valor de peroxidação lipídica é próximo do valor basal, $\Delta F = 49 (\pm 33)$ a.u.. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína, enquanto após 24 horas de exposição observa-se um aumento em relação ao valor basal de 80% (com $\Delta F = 83 (\pm 5)$ a.u.. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína) (Figura III.8).

Assim a solução metavanadato promove desde logo (12 horas) a propagação da peroxidação lipídica, enquanto que o efeito promotor de decavanadato é apenas observado ao fim de 24 horas, sendo que após 12 horas de exposição nenhum efeito significativo é observado (Figura III.8).

IV. Discussão

Indivíduos da espécie *Halobatrachus didactylus* foram sujeitos à administração de duas soluções de vanádio: solução metavanadato, que contém espécies monoméricas e metaméricas de vanadato; e solução decavanadato, que contém espécies decaméricas de vanadato (Amado *et al.*, 1993; Aureliano & Madeira, 1994). A administração de duas soluções contendo diferentes oligovanadatos foi efectuada pois em estudos toxicológicos de vanádio, especialmente *in vivo*, é muitas vezes ignorada a contribuição das espécies que este pode formar quando na forma pentavalente (Aureliano *et al.*, 2002). Foi já demonstrado que estas espécies promovem efeitos diferentes em diversos processos enzimáticos e mecanismos bioquímicos (Aureliano & Madeira, 1994; Aureliano, 1995; Stankiewicz *et al.*, 1995; Aureliano, 2000; Aureliano *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003). Neste trabalho demonstra-se que a exposição a diferentes oligómeros de vanadato promovem efeitos diferentes, já que nos sete parâmetros avaliados e nas diversas fracções e exposições analisados apenas por três ocasiões se registaram valores semelhantes (Tabela VII).

O nível de toxicidade provocada por determinado xenobiótico está dependente, além de outros factores, da forma a que o indivíduo é exposto. Num estudo anteriormente realizado por Aureliano *et al.* (2002), os indivíduos foram sujeitos a administração de soluções de vanadato por injeccção intraperitoneal, um tipo de injeccção que não tem um alvo perfeitamente definido. No presente estudo foi usado um tipo de administração que maior potencia o efeito de qualquer substância externa ao

organismo, a administração intravenosa (i.v.), que visa a introdução do tóxico directamente na circulação sanguínea, promovendo uma distribuição equivalente em todos os indivíduos. Devido ao tipo de administração adoptada foi colocada a hipótese de a dose administrada (5 mM, 1 mg/kg) poder provocar a morte de alguns indivíduos, embora Aureliano *et al.* (2002) tenha reportado a mesma dose como sendo sub-letal. Noutros estudos realizados em *Nuria dendricus* (teleosteo de água doce) (Abbasi, 1998) e em trutas (Ernest & Garside, 1987), que recorreram a administração oral e com doses inferiores, indicaram a ocorrência de mortes nos indivíduos contaminados. No entanto, neste estudo não houve morte de nenhum dos indivíduos submetidos a administração i.v. de soluções de vanadato, confirmando-se o que a dose administrada é de facto sub-letal.

Tabela VII – Comparação dos resultados obtidos na análise dos efeitos provocados pela exposição, em indivíduos *Halobatrachus didactylus*, das soluções metavanadato e decavanadato. META e DECA indicam os grupos intoxicados por metavanadato e decavanadato, respectivamente. F.T. – Fracção Total, F.M. – Fracção Mitocondrial, F.C. – Fracção Citosólica; + – maior variação, - – menor variação, = – variação semelhante.

PARÂMETRO		META			DECA		
		12 horas	1 dia	7 dias	12 horas	1 dia	7 dias
Actividade enzimática da catalase	F.M.	/	+	+	/	-	-
	F.C.	/	=	-	/	=	+
Distribuição de vanádio	F.T.	/	-	-	/	+	+
	F.M.	/	-	-	/	+	+
	F.C.	/	-	-	/	+	+
Conteúdo em glutathiona reduzida		+	+	/	-	-	/
Actividade Pro-oxidante		+	+	/	-	-	/
Produção de anião superóxido		+	=	/	-	=	/
Capacidade Redutora Total		+	+	/	-	-	/
Peroxidação Lipídica		=	+	/	=	-	/

Em 1985, Sies definiu stresse oxidativo como uma alteração no balanço entre pro-oxidantes e anti-oxidantes a favor dos primeiros. A toxicidade de metais de transição está relacionada com a produção de radicais que podem provocar danos em diversas biomoléculas e tecidos, bem como modular a actividade de enzimas relacionadas com a defesa ao stresse oxidativo (Aust, 1989; Stohs & Bagchi, 1995; Storey, 1996; Byczkowski & Kulkarni, 1998; Kasprzak, 2002). Ao vanádio é atribuída a habilidade de induzir a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Figura I.9) (Kalyani *et al.*, 1992; Stohs & Bagchi, 1995; Zhang *et al.*, 2001), bem como a indução de efeitos tóxicos no tecido hepático (Stohs & Bagchi, 1995; Aureliano *et al.*, 2002). Este trabalho analisa, no tecido hepático de indivíduos *Halobatrachus didactylus* expostos a vanádio, diversos parâmetros marcadores da ocorrência de stresse oxidativo.

IV.1. Efeitos dos oligovanadatos na actividade da catalase

A catalase é uma enzima que faz parte da linha de defesa enzimática antioxidante realizando a destoxificação de peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Neste trabalho, a actividade da enzimática da catalase revelou-se sempre superior na fracção mitocondrial do que na fracção citosólica, sendo afectada, em ambas as fracções, de forma diferente por metavanadato e por decavanadato. O grupo placebo registou variações significativas em relação aos valores basais principalmente após um dia de exposição e mais pronunciada na fracção mitocondrial, com um aumento de ≈230 % (p<0.05), indicando que a injeção intravenosa provoca um efeito fisiológico que promove um aumento na actividade enzimática da catalase (Figura III.1).

Na fracção mitocondrial verificou-se uma diminuição da actividade enzimática da catalase nos grupos contaminados, META e DECA, quando comparados com os grupos placebo (Figura III.2.A). O metavanadato revelou maior diminuição logo após um dia de exposição, 60 % ($p < 0.05$), com um valor próximo do valor basal, sugerindo um eventual efeito protector do metavanadato em relação ao efeito observado no grupo placebo. Após sete dias de exposição, os valores de actividade obtidos aproximam-se dos valores basais, com diminuições inferiores a 25 % em ambos os grupos contaminados em relação ao grupo placebo (Figura III.1.A). Ainda que se tenha verificado um aumento significativo do conteúdo de vanádio na fracção mitocondrial, logo ao fim de um dia de exposição com decavanadato, a acumulação de vanádio não parece estar relacionada com o aumento ou supressão da actividade da catalase (Figura III.3).

Na fracção citosólica o efeito é inverso, registando-se aumentos em todos os grupos contaminados, sendo estes mais significativos após sete dias de exposição com aumentos de 68 % ($p < 0.05$) em META e 80 % ($p < 0.05$) em DECA (Figura III.2.B). O facto de os grupos contaminados com decavanadato apresentarem efeitos próximos dos efeitos promovidos por metavanadato, após 7 dias de exposição, poderá ser devido ao facto de as espécies decaméricas de vanadato em soro e a pH 7 serem instáveis, com tempo de meia vida de 15 horas, promovendo o aumento de espécies monoméricas (Aureliano *et al.*, 2002; Tiago *et al.*, 2002).

O padrão de variação obtido neste estudo difere do padrão obtido num trabalho anteriormente realizado (Figueiredo, 2002), no qual foi utilizada uma administração intraperitoneal tal como Aureliano *et al.* (2002), o que

indica que o tipo de administração tem influência na modulação enzimática promovida pelos diferentes oligovanadatos.

Nos estudos *in vitro* realizados não foram verificadas quaisquer variações significativas na actividade da catalase na presença de concentrações $\leq 300 \mu\text{M}$ de orto e metavanadatos ou de decavanadatos, o que confirma o que foi reportado por Serra *et al.* (1992). Outros estudos apontam para uma inibição da actividade da catalase por vanadatos devido a sequestração do H_2O_2 e consequente formação de peroxovanadatos, muito mais estáveis à degradação por esta enzima (Rao *et al.*, 1998). No entanto os ensaios preliminares realizados não mostraram qualquer diminuição significativa na concentração de H_2O_2 durante o tempo de ensaio, o que indica que a quantidade de H_2O_2 utilizada no ensaio é suficiente para ser desprezado o efeito da diminuição de H_2O_2 devido à eventual formação de peroxovanadatos.

Os resultados obtidos na análise da actividade enzimática da catalase indicam que apesar de *in vitro* não se observar qualquer alteração na actividade na presença de metavanadato ou decavanadato, *in vivo* observam-se alterações na actividade promovidas pelos diferentes oligovanadatos. Esta observação sugere que a modulação enzimática promovida por vanadatos *in vivo* não seja efectuada por acção directa na enzima, mas por outras vias ainda não determinadas.

IV.2. Efeitos dos oligovanadatos na acumulação de vanádio no tecido hepático

A acumulação de vanádio no tecido hepático foi largamente promovida pela intoxicação por decavanadato, principalmente após sete dias da

administração com um aumento de 125 % ($p < 0.05$), enquanto que os grupos META não apresentaram aumentos na acumulação de vanádio (Figura III.3.A). A tendência foi seguida nas fracções sub-celulares, verificando-se também aumentos promovidos por metavanadatos, apenas ao fim de um dia de exposição e mais ténues do que os promovidos por decavanadatos em ambas as fracções (Figuras III.3.B e III.3.C). A fracção mitocondrial apresentou o aumento mais pronunciado, 490 % ($p < 0.05$), promovido por decavanadato após sete dias de exposição (Figura III.3.B), na fracção citosólica verificou-se o maior aumento promovido por metavanadatos (-75 %) (Figura III.3.C).

Segundo Zaporowska & Ścibior (1998) a acumulação de vanádio nos tecidos está dependente do modo de administração, o que se veio a verificar já que os resultados de acumulação e distribuição celulares de vanádio no tecido hepático feitos por Figueiredo (2002) com uma metodologia idêntica, usando uma administração intraperitoneal, revelam-se diferentes dos obtidos neste trabalho com uma administração intravenosa. Assim, no trabalho efectuado por Figueiredo, a maior acumulação verificou-se nos grupo contaminados com metavanadato, não se verificando alterações significativas nos grupos contaminados por decavanadato. Portanto no presente estudo a acumulação de vanádio, em particular no tecido hepático, é favorecida pela administração de decavanadato, sendo que as mitocôndrias aparecem como um possível alvo intracelular.

Estudos elaborados por Yang *et al.* (2003) em eritrócitos humanos, reportam que o transporte membranal de vanadato é feito via canais aniónicos, enquanto que outros complexos de vanadato e vanadilo atravessam a membrana por simples difusão e de forma mais rápida do que o vanadato.

No entanto não existem estudos reportando o transporte de decavanadato. O presente estudo poderá indicar que o metavanadato possa ser capturado pelos eritrócitos, ao contrário do que pode suceder com decavanadato. Nesse sentido, justificar-se-ia o não aumento da concentração de vanádio no tecido hepático após exposição com metavanadato. Por outro lado, o aumento de vanádio na fracção citosólica e principalmente na fracção mitocondrial após intoxicação por decavanadato levanta a hipótese de as espécies decaméricas poderem usarem um canal específico ou difundir através da membrana das células hepáticas.

IV.3. Efeitos dos oligovanadatos na concentração de glutathiona reduzida

A glutathiona reduzida (GSH) é considerada um dos mais importantes componentes da defesa antioxidante intracelular (Hasspieler *et al.*, 1994). Como está presente em grande quantidade dentro da célula (0.1-10 mM), é elevada a probabilidade de reagir com espécies reactivas de oxigénio (ROS) antes de estas provocarem danos oxidativos (Storey, 1996). Sendo assim, como resultado de um aumento na velocidade de produção de ROS, se esta se tornar superior à produção de GSH haverá consequentemente uma depleção do conteúdo intracelular de GSH.

Diversos estudos sugerem que após entrada na célula o vanadato é bio-reduzido a vanadilo por acção de GSH com produção de ROS (Figura I.9) (Ghe *et al.* 1985 ; Kalyani *et al.*, 1992; Ferrer *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001). Como a GSH parece ser um dos alvos primários de ROS, no presente estudo foi analisado o conteúdo de GSH. Os valores basais de

GSH em animais marinhos são bastante diferentes entre espécies de peixes de água doce, estudos realizados por Hasspieler *et al.* (1994) reportam valores de 930 nmol GSH/g tecido em *Ictalus punctatos*, e de 440 nmol GSH/g de tecido em *Ameriurus nebulosos*, enquanto que outro estudo realizado por Pandey *et al.* (2003) refere valores de 10 nmol GSH/g de tecido em *Wallago attu*.

Neste trabalho de estágio o valor basal, 7.8 ± 3 nmol/mg de proteína (150 ± 53 nmol /g de tecido), está entre os valores reportados (Figura III.4.A). Aparentemente verifica-se a manutenção da concentração de GSH nos indivíduos intoxicados com decavanadato, já que após 12 horas e 24 horas da administração as variações são de 5 %. No caso dos indivíduos expostos a metavanadato verifica-se um aumento da concentração de GSH de 20 % após 12 horas, mantendo-se a tendência de aumento após 24 horas para valores 35 % superiores aos valores basais (Figura III.4). Estes resultados indicam que não há depleção de GSH por intoxicação com vanadatos verificando-se que há um aumento de GSH intracelular promovido por metavanadato (Figura III.4.B). O facto de não ter ocorrido diminuição de GSH indica que o possível aumento de ROS e/ou diminuição de GSH intracelular provocadas pela bio-redução de vanadato não é suficiente para reduzir o nível de GSH intracelular. A verificação do nível de glutathiona oxidada (GSSG) poderá ser um ensaio complementar no futuro, já que razão entre GSH e GSSG é considerado um parâmetro mais fiável como medidor da ocorrência de stresse oxidativo (Storey, 1996).

IV.4. Efeitos dos oligovanadatos na actividade pro-oxidante

A actividade pro-oxidante total mede de forma geral a produção de espécies que tenham habilidade de provocar oxidação em biomoléculas, aumentando assim o stresse oxidativo, tal como definido por Sies (1985). A capacidade de o vanadato participar em reacções do tipo Fenton (ver secção I.1.2. e Figura I.1.) (Stohs & Bagchi, 1995), assim como os mecanismos de acção de vanadato que envolvem a sua bio-redução (Figuras I.8 e I.9) (Huang *et al.*, 2001; Capella *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003) tornam o vanadato como potencial promotor de espécies pro-oxidantes. Neste estudo, sugere-se que no tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*, os diferentes oligovanadatos não promovem a formação de espécies pro-oxidantes. Nos grupos META a produção de espécies pro-oxidantes diminui cerca de 40 % após 12 horas da administração mantendo-se semelhante aumento ao fim de 24 horas (Figura III.5). Estes resultados estão de acordo com o aumento verificado na quantificação de GSH nos grupos intoxicados com metavanadatos (Figura III.4). Considerando que os principais promotores da diminuição de GSH intracelular são as espécies pro-oxidantes, uma diminuição na produção de espécies pro-oxidantes provoca um aumento nos níveis de GSH.

A intoxicação por decavanadato aumenta em 15 % a produção de espécies pro-oxidantes após 12 horas da administração. No entanto, este efeito é invertido passadas 24 horas onde se verifica um efeito semelhante ao promovido por metavanadato com uma diminuição na produção de pro-oxidantes de 30 % (Figura III.5.B). Mais uma vez o facto de os efeitos

promovidos por decavanadatos se aproximarem, após exposição mais prolongada, dos observados nos grupos META poderá estar relacionado com a instabilidade do decavanadato em soro (Aureliano *et al.*, 2002). Porém, isso não significa que metavanadato e decavanadato tenham a mesma via a actuação.

IV.5. Efeitos dos oligovanadatos na produção de anião superóxido e na capacidade redutora total

É reconhecido que a maior fonte de produção intracelular de anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) é a mitocondria e que esta espécie oxidante é uma das mais relevantes no que diz respeito às reacções oxidativas dentro da célula. As propostas de acção do vanadato dentro da célula envolvem a formação de anião superóxido mediada por NADPH oxido-reductases da cadeia respiratória (Figuras I.8 e I.9) (Huang *et al.*, 2001; Capella *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003).

Verificou-se que metavanadatos e decavanadatos promovem efeitos inversos na produção de anião superóxido na fracção mitocondrial de tecido hepático de *Halobatrachus didactylus*. Assim, após 12 horas de exposição observa-se um aumento de 45 % no grupo META, e uma diminuição de 40 % no grupo DECA, ao fim das 24 horas de exposição os efeitos são invertidos (Figura III.6). Se considerarmos o mecanismo de detoxificação proposto para o vanádio (Figura I.8) e o mecanismo de acção do vanádio (Figura I.9), em que ocorre redução de vanadato a vanadilo com produção de anião superóxido é possível sugerir que o decavanadato, pelo menos até às 12 horas de exposição está “imune” a esse tipo de redução. Por outro, verificou-se ao fim

de 24 horas de exposição a decavanadato, um aumento significativo de vanádio na mitocondria, ao contrário do que acontece com o metavanadato. Nesse sentido, verifica-se uma relação entre a velocidade de produção de anião superóxido e a quantidade de vanádio acumulado.

Vários são os estudos que demonstram a habilidade de os oligovanadatos oxidarem NADH/NADPH quer directamente quer via NADPH oxido-reductase (Kalyani *et al.*, 1992; Ghe *et al.*, 1995; Capella *et al.*, 2002). Considerando que vanadato pode ser reduzido intracelularmente a vanadilo por acção de GSH (Ferrer *et al.*, 1993), isto pode levar a uma diminuição da capacidade redutora intracelular, importante para a cadeia respiratória mitocondrial e para algumas reacções de detoxificação celular. A exposição a metavanadato provocou diminuição de 25 % ao fim de 24 horas enquanto no grupo DECA o valor manteve-se próximo do valor basal (Figura III.7).

IV.6. Efeitos dos oligovanadatos na peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é das uma das grandes consequências bioquímicas do ataque de ROS. Este fenómeno oxidativo ocorre nas membranas celulares por acção de radicais que atacam ácidos gordos poli-insaturados, necessários para manter a integridade membranar (Figura (I.2) (Palace *et al.*, 1996). A reacção é propagada de forma autocatalítica e descontrolada formando-se peróxidos e hidroperóxidos lipídicos que podem reagir com outras macromoléculas dando origem a novas ROS (Cheeseman, 1993; Stohs, 1995).

Nos grupos contaminados por metavanadato é observado, logo ao fim de 12 horas de exposição, um aumento de 55 % da peroxidação lipídica, um efeito que é mantido após 24 horas com um aumento de 80 % (Figura III.8). Por outro lado as espécies decaméricas não promovem um aumento da peroxidação lipídica após 12 horas de exposição, embora depois de 24 horas o valor da peroxidação lipídica se aproxima do valor que foi obtido na intoxicação por metavanadato. Esta é mais uma indicação de que a instabilidade do decavanadato poderá estar relacionada com os efeitos promovidos. Se assim for e tendo em consideração que as espécies decaméricas estão em equilíbrio com as espécies monoméricas de vanadato (Tiago *et al.*, 2002) é possível sugerir que as espécies responsáveis pelo aumento da peroxidação lipídica são as espécies monoméricas, apresentando o decavanadato um efeito retardado, não promovendo por si só reacções peroxidativas na membrana.

V. Conclusões

O estudo efectuado no estágio científico que este relatório reporta permitiu demonstrar, que a administração de duas soluções de vanadato com diferentes espécies oligoméricas promovem efeitos diferentes, de acordo com o que já tinha sido descrito por Aureliano *et al.* (2002) mas usando outro tipo de ensaios que avaliaram a possibilidade de ocorrência de stresse oxidativo

A utilização de um tipo de administração intravenosa deu origem a resultados diferentes do que os obtidos anteriormente por Figueiredo (2002) na actividade enzimática da catalase, peroxidação lipídica e acumulação e distribuição subcelular de vanádio no tecido hepático de *H.didactylus*, indicando que o tipo de administração também afecta a resposta dada por diferentes marcadores de stresse oxidativo.

Apesar dos estudos *in vitro* realizados não indicarem qualquer alteração na actividade da catalase por parte de metavanadato ou decavanadato, foi verificado que as espécies oligoméricas alteram a actividade da catalase *in vivo*, sugerindo que a modulação exercida pelos vanadatos possa não ocorrer por acção directa destes na enzima referida.

A acumulação de vanádio no tecido hepático é induzido fortemente pela administração de decavanadato, sendo o aumento mais pronunciado na fracção mitocondrial, sugerindo que o decavanadato poderá ser acumulado na célula tendo como alvo preferencial a mitocôndria.

Os níveis de GSH são aumentados por metavanadato enquanto que estas espécies promovem uma diminuição na produção de espécies pro-oxidantes. Este parâmetro também é diminuído após 24 horas de intoxicação de decavanadato. Tendo em conta a instabilidade do decavanadato no soro é possível inferir que estes efeitos sejam provocados por acção de espécies monoméricas de vanadato.

O aumento da produção de anião superóxido e a diminuição da capacidade redutora total na fracção mitocondrial estão de acordo com o que está proposto relativamente a forma de acção dos vanadatos dentro da célula, onde se espera que haja produção de anião superóxido e consequente diminuição da capacidade redutora. Os resultados mostraram que embora haja aumento da acumulação de decavanadato na fracção mitocondrial, não parece haver redução deste até às 12 horas de exposição.

O aumento da peroxidação lipídica observado após intoxicação com os diferentes oligovanadatos, sugere uma interacção destas com as biomembranas, promovendo reacções oxidativas, por exemplo devido a reacções de Fenton, que lesam os lipídios membranares. O aumento da peroxidação lipídica após intoxicação com decavanadato ao fim de 24 horas de exposição, sugerem, se considerarmos a instabilidade destas espécies quando em soro, uma vez mais que serão as espécies monoméricas de vanadato as responsáveis por alterações no status oxidativo.

VI. Estudos Futuros

Tendo em consideração os resultados apresentados e que após obtidas algumas respostas outras questões se levantam, sugerem-se alguns estudos que melhor elucidem as formas de acção das diferentes espécies oligoméricas de vanadato:

- Sendo a membrana plasmática a primeira barreira à entrada dos diferentes vanadatos, sugere-se a elaboração de estudos *in vitro* que analisem a ocorrência de peroxidação lipídica por acção de diferentes espécies oligoméricas de vanadato.
- Estudos *in vivo* com administração de soluções metavanadato e decavanadato e exposições inferiores a 12 horas e posterior análise a diversos parâmetros marcadores de stresse como a razão entre GSH e GSSG e produção de espécies oxidantes (ROS e NOS).
- Estudo da distribuição de vanádio em diversas fracções sub-celulares além das já estudadas após administração de soluções metavanadato e decavanadato e exposições inferiores a 12 horas.
- Estudar o tipo de transporte e os efeitos dos oligovanadato na membrana plasmática, o efeito na fluidez membranar, e a interacção em proteínas de membrana. Sugere-se a elaboração de um estudo similar ao elaborado por Yang *et al.* (2003).

VII. Referências Bibliográficas

- **Abbasi, S.** (1998). Water quality criteria for vanadium with reference to impact studies on freshwater teleost *Nuria dendricus* (Hamilton). *in*: “Vanadium in the Environment”. Part 1: “Chemistry and Biochemistry” (J. Nriagu), John Wiley & Sons, pp. 125-130.
- **Aebi, H.** (1984) “Catalase *in vitro*”. *Methods in Enzymology*. **105**(13): 121-126.
- **Ahmad, S.** (1995). Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. *in*: “Oxidative stress and antioxidant defenses in biology” (S.Ahmad, ed), Chapman & Hall, U.S.A., pp. 238-265.
- **Alloway, B.; Ayres, D.** (1993). *Chemical principles of environmental pollution*. Black Academic & Professional, Oxford, pp. 88-97; 148-149.
- **Amado, A.; Aureliano, M.; Ribeiro-Claro, P.; Teixeira-Dias, J.** (1993). Vanadium (V) oligomerization in aqueous alkaline solutions: A combined raman and ^{51}V NMR spectroscopic study. *J. Raman Spect.*, **24**: 669-703.
- **Aureliano, M.** (1995). Transdução e conjugação energética da Ca^{2+} ATPase do reticulo sarcoplasmático: interacção de vanadatos. Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- **Aureliano, M.** (2000). Vanadate oligomers interactions with myosin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **80**: 141-143.
- **Aureliano, M.; Madeira, V.M.C.** (1994). Vanadate oligoanion interact with the proton ejection by the Ca^{2+} pump of the

sarcoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **205** (1): 161-167.

- **Aureliano, M.; Joaquim, N.; Sousa, A.; Martins, H.; Coucelo, J.M.** (2002). Oxidative stress in toad fish (*Habactrachus didactylus*) cardiac muscle – acute exposure to vanadate oligomers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **90**: 159-165.
- **Aust, S.D.** (1989). Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibliotheca Nutritio et Dieta*, **43**: 266-277.
- **Baes, C.F.; Mesmer, R.E.** (1976) The hydrolysis of cations. Willey-Interscience. New York, pp. 197-210.
- **Baran, E.** (1998). Vanadium detoxification. *in*: “Vanadium in the Environment”. Part 2: “Health effects” (J. Nriagu), John Wiley & Sons, pp. 318-345.
- **Barceloux, D.G.** (1999). Vanadium. *Clinical Toxicology*, **37** (2): 265-276.
- **Bell, M.; Kelly, K.; Sargent, J.** (1979). Sodium ortovanadate, a powerfull vasoconstrictor in the gills in the common eel, *Anguilla anguilla*. *J. Mer. Biol. Assoc.*, **59**: 429-435.
- **Benitez, A.; Gutiérrez-Rodríguez, M.; Sarasquete, M.; González-Canales, M.; Blanco, J.** (1994). El corazón e la estimulación medular espinal. Parte I. Nuevo modelo experimental. *Rev. Soc. Esp. DOLOR*, **3**: 172-177.
- **Bode, H.; Friebel, C.; Furhman, G.** (1990). Vanadium uptake by yeast cells. *Biochem. Biophy. Acta*, **1022**: 163-170.

- **Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-54.
- **Bryan, G.; Langstone, W.; Hummerstone, L.; Burt, G.** (1985). A guide of assesement of heavy-metals contamination in estuaries using biological indicators. *Marine Biology association of the United Kingdom*, **4**: 92.
- **Byczkowski, J.; Kulkarni** (1998). Oxidative stress and pro-oxidant biological effect of vanadium. *In: "Vanadium in the Environment. Part 2: Health effects "* (J. Nriagu), John Wiley & Sons, pp. 235-264.
- **Capella, L.; Gefé, M.; Silva, E.; Affonso-Mitidieri, E.; Lopes, A.; Rumjanek, V.; Capella, M.** (2002). Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **406**: 65-72.
- **Carmignani, M.; Boscolo, P.; Volpe, A.; Togna, P.; Masciocco, L.; Preziosi, P.** (1991). Cardiovascular system and kidney as specific targets of chronic exposure to vanadate in the rat: functional and morphological findings. *Arch. Toxicol.* **14** (Suppl.): 124-127.
- **Castro, A.** (1997) Validação de métodos em análise química. *III Seminário de validação e qualidade no laboratório químico – UNICAM*, Lisboa, p. 20.
- **Chasteen, N.** (1983) The biochemistry of vanadium. *Structure and Bonding*, **53**: 105-138.
- **Cheeseman, K.** (1993) Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molecular Aspects in Medicine.* **14**: 191-197.

- **Claireborn, A.** (1985) Catalase activity. *In* “Handbook of methods of oxygen radical research” (R.A.Greenwald, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.283-284.
- **Comporti, M.** (1985). Biology of disease – Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory Investigation*, **53**(6): 599-623.
- **Correia, J.J.; Lipscomb, L.D.; Dabrowiak, J.C.; Isern, N.; Zoubieta, J.** (1994). Cleavage of tubulin by vanadate ion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **309**: 94-104.
- **Coucelo, J.M.; Joaquim, N.; Correia, V.; Bebianno, M.J.; Coucelo, J.A.** (2000). Cellular responses to cadmium toxicity in heart, kidney and liver of *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicology and Environmental restoration*, **3**(1): 29-35.
- **Cortizo, A.; Bruzzone L.; Molinuevo, S.; Etcheverry, S.** (2000). A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines *Toxicology*, **147**: 89–99.
- **Crans, D.** (1994). Aqueous chemistry of labile oxovanadates: relevance to biological studies. *Comments Inorg. Chem.*, **16**(1-2): 1-33.
- **Crans, D.; Amin, S.; Keramidias, A.** (1998). Chemistry of relevance of vanadium in the environment. *In*: “Vanadium in the Environment”. Part 1: “Chemistry and Biochemistry” (J. Nriagu), John Wiley & Sons, pp. 73-95.

- **Crans, D.; Schelble, S.M.** (1990). Vanadate dimer and tetramer both inhibit glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochemistry* **29**: 6698-6706.
- **Davis, W.; Ronai, Z.; Tew, K.** (2001) Cellular Thiols and Reactive Oxygen Species in Drug-Induced Apoptosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **296**(1): 1-6.
- **D’Cruz, O.J.; Dong, Y., Uckun, F.M.** (2003) Potent dual anti-HIV and spermicidal activities of a novel oxovanadium (V) complexes with thiourea non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**(2): 253-264.
- **Domingo, J.; Bosque, M.; Luna, M.; Corbella, J.** (1993). Prevention by tiron (sodium-4,5-dihydroxybenzene-1,3-dissulfonate) of vanadate-induced developmental toxicity in mice. *Teratology*, **48**: 133-138.
- **Dröge, W.** (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, **82**: 47-95.
- **Edel, J.; Sabbioni, E.** (1993). Accumulation, distribution and form of vanadate in the tissue and organelles of the mussel *Mytilus edulis* and the goldfish *Carassius auratos*. *Science of the total environment*. **133**: 139-151.
- **Erdmann, E.; Werdn, K.; Krawietz, W.; Semitz, W.; Scholz, H.** (1984). Vanadate and its significance in biochemistry and pharmacology. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 945-950.

- **Ernest, W.; Garside, E.** (1987). Lethal effects of vanadium to two life stages of brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Can. J. Zool.*, **65**: 628-634.
- **Ferrer, E.G.; Williams, P.A.M.; Baran, E.J.** (1993). The interaction of the VO²⁺ cation with oxidized glutathione. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **50**: 253-262.
- **Figueiredo, I.** (2002). Stresse oxidativo induzido por oligómeros de vanadato no fígado e no rim de *Halobatrachus didactylus*: Exposição aguda. Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade do Algarve.
- **Flohé, L.; Wingender, E.; Brigelius-Flohé, R.** (1997) Regulation of glutathione peroxidases. *In:chapter 17*: 415-439
- **Fraústo, J.; Williams, R.** (1997). *Biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life*. Clarendon Press, Oxford, pp.64;428-429.
- **Gao, N.; Ding, M.; Zheng, J.; Zhang, Z.; Leonard, S.; Liu, K.; Shi, X.; Jiang, B.** (2002). Vanadate-induced Expression of Hypoxia-inducible Factor 1 α and Vascular Endothelial Growth Factor through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway and Reactive Oxygen Species. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**(35): 31963-31971.
- **Ghe, A.M.; Stefanelli, C.; Tsintiki, P.; Veschi, G.** (1985) Influence of some metal ions on oxidation of NADH and on formation of the superoxide anion radical (O₂⁻), during enzymatic catalysis by E.C. 1.2.3.2 xantine oxidase. *Talanta*. **32**(5): 359-362.

- **Gonçalves, M.** (1990). Métodos experimentais para análise de soluções – análise quantitativa. 2^a edição. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 789
- **Greenberg, A.; Clesceri, L.; Eaton, A.** (1993) *Standard Methods of the examination of water an wastewater*. 18th edition, American Public Health Association USA, pp. 3.1-3.56.
- **Greenwood, N.; Earnshaw, A.** (1997). *Chemistry of the elements*. Second edition, Butterworth-Heinemann, pp. 976-1001.
- **Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.** (1990) The antioxidants of Human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **280** (1): 1-8.
- **Hasspieler, B; Behar, J; Di-Giulio, R.** (1994). Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameriurus nebulous*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **28**: 82-90.
- **Heinemann, G.; Fichtl, B.; Vogt, W.** (2003). Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **55**(3): 241-245.
- **Hemrika, W.; Reinirie, R.; Dekker, H.; Barnett, P.; Wever, R.** (1997). From phosphatases to vanadium peroxidases: A similar architecture of the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 2145–2149.
- **Huang, C.; Zhang, Z.; Ding, M.; Li, J.; Ye, J.; Leonard, S.; Shen, H.; Butterworth, L.; Lu, Y.; Costa, M.; Rojanasakul, Y.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; Shi, X.** (2000). Vanadate Induces

p53 Transactivation through Hydrogen Peroxide and Cause Apoptosis.

The Journal of Biological Chemistry, **275**: 32516-32522.

- **Huang, C.; Ding, M.; Li, J.; Leonard, S.; Rojanasakul, Y.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; Jui, G.; Shi, X.** (2000). Vanadium-induced Nuclear Factor of Activated T Cells Activation through Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(25): 22397–22403.
- **Jensen; Jørgensen** (1984). “Analytical chemistry applied to metal Ions in the environment”, *in*: Metal Ions in biological systems. Vol **18**, (Marcell Dekker, Inc.) Helmut Siegel (Editor).
- **Kalyani, P.; Vijaya, S.; Ramasarma, T.** (1992). Characterization of oxygen free radicals generated during vanadate-stimulated NADH oxidation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **111**: 33-40.
- **Kanna, P.S., Mahendrakumar, C.B.; 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. J. Gastroenterol.*, **9**(5): 1020-1027.
- **Kasprzak, K.** (2002). Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, **32**(10): 958-967.
- **Kelly, S.A.; Havrilla, C.M.; Brady, T.C.; Abramo, K.H.; Levin, E.D.** (1998). Oxidative stress in toxicology. Established mammalian and emerging piscine model system. *Environmental Health Perspectives*, **106**(7): 175-376.

- **Kustin, K.; Mcleod, G.** (1984). Vanadium and other metal ions in the physiological ecology of marine organism. *Structure and Bonding*, **53**: 139-160.
- **Lackowicz, J.R.** (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy, second edition, Chapter 2, “Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy”, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp. 25-63.
- **Lionetto, M.; Caricato, R.; Giordano, M.E.; Pascariello, M.F.; Marinosci, L.; Schettino, T.** (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*, **46**: 324–330.
- **Livingstone, D.R.; Lips, F.; Garcia Martinez, P.; Pipe, R.K.** (1992). Antioxidant enzymes in the digestive glands of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, **112**: 265-276.
- **Lobert, S.; Isern, N.; Hennington, B.S.; Correia, J.J.** (1994) Interaction of tubulin and microtubule proteins with vanadate oligomers. *Biochemistry*, **33**: 6244-6252.
- **Mamane, Y.; Pirrone, N.** (1998). Vanadium in the atmosphere. *In*: “Vanadium in the Environment”. Part 1: “Chemistry and Biochemistry” (J. Nriagu), John Wiley & Sons, pp. 37-71.
- **Martín-Romero, F.J.; García-Martín, E.; Gutiérrez-Merino, C.** (2002). Inhibition of oxidative stress produced by plasma membrane NADH oxidase delays low-potassium-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*, **82**: 705-715.

- **Mathews, C.K.; VanHolde, K.E.** (1996). *Biochemistry. 2nd edition.* Benjamin/Cummings publishing company inc.. USA, 151.
- **Miramand, P.; Fowler, S.** (1998). Bioaccumulation and transfer of vanadium in marine organisms. *In: "Vanadium in the Environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry"* (J. Nriagu), John Wiley & Sons, pp. 167-197.
- **McCord, J.M.; Fridovich, I.** (1969). Superoxide dismutase – an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *The Journal of Biological Chemistry*, **244**(22): 6049-6055.
- **Muñoz-Cueto, J.A.; Alvarez, M.; Blanco, M.; Gonzalez de Canales, M.I.; Garcia-Garcia, A.; Sarrasquete, C.** (1996). Histochemical and biochemical study of lipids during the reproductive cycle of the toad fish *Halabatrachus didactylus* (Schneider, 1801). *Scientia Marina*, **60**(2-3): 289-296.
- **Nriagu, J.** (1998) History, occurrence and uses of vanadium. *In: "Vanadium in the Environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry"* (J. Nriagu), John Wiley & Sons, pp. 1-24.
- **Palace, V.P.; Klaverkamp, J.** (1993). Variation of hepatic enzymes in three species of freshwater from Precambrian shield lakes and the effect of cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **104C**(1): 147-154.
- **Palace, V.P.; Klaverkamp, J.F.; Lockhart, W.L.; Metner, D.A.; Muir, D.C.; Brown, S.B.** (1996). Mixed-function oxidase enzyme activity and oxidative stress in lake trout (*Salvelinus namaycush*)

exposed to 3,3',4,4'5, - pentachlorobiohenyl (PCB-126). *Environment Toxicology and Chemistry*, **15**(6): 995-960.

- **Pandey, S.; Parvez, S.; Sayeed, I.; Haque, R.; Bin-Hafeez, B.; Raisuddin, S.** (2003) Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.) *The Science of the Total Environment*, **309**:105–115
- **Plass, W.** (1999). Phosphate and vanadate in biological systems: chemical relatives or more? *Angew. Chem.* **38**: 909-912.
- **Plass, W.** (2002) Transition Metal Centers in Biological Matrices: Structure and Function of Vanadate in Vanadium Haloperoxidases and as Phosphate Analog. *NIC Symposium 2001, Proceedings*, Horst Rollnik, (Dietrich Wolf, Ed), John von Neumann Institute for Computing, NIC Series, Vol. 9, pp. 103-110, 2002.
- **Ray, S.** (1994). Cadmium. *in*: “Analysis of contaminants in edible aquatic resources” (Kiceniuk, J.; Ray, S., eds), VCH Publishers, USA, pp. 91-113.
- **Rao, A.V.S.; Ravishankar, H.N.; Ramasarma, T.** (1998). Diperoxovanadates participate in peroxidation reaction of H₂O₂ in presence of abundant catalase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1382**: 249-255.
- **Rehder, D.** (1999) The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions. *Coordination Chemistry Reviews*, **182**:297-322.

- **Roshchin, A.V., Ordzhonikidze, E.K., Shalghanova, I.V.** (1980). Vanadium - toxicity, metabolism, carrier state. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, **24**(4): 377-383.
- **Serra, M.Á.; Pintar, A.; Casella, Luigi; Sabbioni, E.** (1992) Vanadium effects on the activity of horseradish peroxidase, catalase, glutathione peroxide, superoxide dismutase *in vitro*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **46**: 161-174.
- **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.
- **Shi, S.J.; Preuss, H.G.; Abernethy, D.R.; Li, X.; Jarrell, S.T.; Andrawis, N.S.** (1997) Elevated blood pressure in spontaneously hypertensive rats consuming a high sucrose diet associated with elevated angiotensin II and is reversed by vanadium. *Journal of Hypertension*, **15**: 857-862.
- **Soares, S.S.; Aureliano, M.; Joaquim, N.; Coucelo, J.M.** (2003). Cadmium and vanadate oligomers effect on methaemoglobin reductase activity for Lusitan toadfish: *in vivo* and *in vitro* studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **94**(3): 285-290.
- **Solchaga, M.; Montoro, R.; Guardia, M.** (1986) Flame absorption spectroscopy determination of Cd, Cu, Fe, Pb and Zn in mussels. *Journal of Association of Analytical Chemistry*, **69**(5): 874-876.
- **Stankiewicz, P.; Tracey, A.; Crans, D.** (1995). Inhibition of phosphate-metabolizing enzymes by oxovanadium (V) complexes. *In*

“Vanadium and its role for life”, chapter 9 (Marcel Dekker, Inc), NY, **31**: 287-323.

- **Stohs, S.J.** (1995) The role of free radical in toxicity and disease. *Physiology and Pharmacology*, **6**(3-4): 205-228.
- **Stohs, S.J.; Bagchi, D.** (1995) Oxidative mechanisms in toxicity of metal ion. *Free Radical Biology and Medicine*, **18**(2): 321-336.
- **Storey, K.B.** (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**: 1715-1733.
- **Thannickal, V.; Fanburg, B.** (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **279**: 1005-1028.
- **Tiago, T.** (2000), Interação de oligómeros de vanadato com miosina de músculo esquelético. Tese de licenciatura em Bioquímica, Unidade de Ciências Exatas e Humanas, Universidade do Algarve.
- **Tiago, T.; Aureliano, M.; Gutiérrez-Merino, C.** (2002a). Quenching of myosin intrinsic fluorescence unravels existence of a high affinity binding site for decavanadate. *Journal of Fluorescence*, **12**(1):87-90.
- **Tiago, T.; Aureliano, M.; Duarte, R.; Moura, J.** (2002b), Vanadate oligomers interaction with phosphorylated myosin. *Inorganica Chimica Acta*, **339**: 317-321.
- **Tyurina, Y.Y.; Shvedova, A.A.; Kawai, K.; Tyurin, V.A.; Kommineni, C.; Quinn, P.J.; Schor, N.F.; Fabisiak, J.P.; Kagan, V.E.** (2000). Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization fo phosphatidyserine. *Toxicology*, **148**: 93-101.

- **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. *Biochem. Biophys. Acta.* **1626**(1-3): 43-50.
- **Wiseman, H.; Halliwell, B.** (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, **313**: 17-29.
- **Yang, X.; Wang, K.; Lu, J.; Crans, D.** (2003) Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane. *Coordination Chemistry Reviews* **237**: 103-111
- **Zaia, D.; Zaia, C.; Lichting, J.** (1998). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, **21**(6): 797-793
- **Zaporowska, H.; Ścibior, A.** (1998) Vanadium and its significance in animal cell metabolism. *In*: “Vanadium in the Environment”. Part 2: “Health effects” (J. Nriagu), John Wiley & Sons, pp. 121-133.
- **Zhang, Z.; Huang, C.; Li, J.; Leonard, S.S.; Lanciotti, R.; Butterworth, L.; Shi, X.** (2001). Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **392**(2): 311-320.
- **Zhang, Z.; Leonard, S.; Huang, C.; Vallyathan, V.; Castranova, V.; Shi, X.** (2003). Role of reactive oxygen species and MAPs in vanadate induced G₂/M Phase arrest. *Free Radical Biology & Medicine*, **34**(10): 1333-1342.

