

**UNIVERSIDADE FEDERAL
FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

DIOGO GOMES GARCIA

**EFEITO DO MONOTERPENO ÁLCOOL
PERÍLICO NA ATIVIDADE DA ENZIMA
 Na^+ , K^+ ATPase**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM NEUROIMUNOLOGIA**

**Orientadoras: Lídia M^a. da Fonte de Amorim
Patricia Burth**



**NITERÓI
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DIOGO GOMES GARCIA

**EFEITO DO MONOTERPENO ÁLCOOL
PERÍLICO NA ATIVIDADE DA ENZIMA
Na⁺, K⁺ ATPase**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Oncologia Molecular
do Departamento de Biologia Celular e Molecular,
Instituto de Biologia – UFF.

Dissertação submetida à
Universidade Federal Fluminense
como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Neuroimunologia.

**Orientadoras: Lídia M^a. da Fonte de Amorim
Patricia Burth**

**NITERÓI
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

G216 - Garcia, Diogo Gomes.

Efeito do monoterpene álcool perílico na atividade da enzima Na⁺, K⁺ ATPase./Diogo Gomes Garcia – Niterói: [s.n.], 2009.

61f.

Dissertação – (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, 2009.

1. Adenosina trifosfatase. 2. Álcool perílico. 3. Glioblastoma multiforme. 4. Terpenos. I. Título.

CDD: 574.19253

DIOGO GOMES GARCIA

**EFEITO DO MONOTERPENO ÁLCOOL
PERÍLICO NA ATIVIDADE DA ENZIMA
Na⁺, K⁺ ATPase**

Dissertação submetida à
Universidade Federal Fluminense como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Neuroimunologia.

Niterói, 31 de março de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Janaina Fernandes – UFRJ (Membro 1)

Dr. Clóvis Orlando P. da Fonseca – UFF (Membro 2)

Dr^a. Elizabeth Giestal de Araújo – UFF (Membro 3)

Dr^a. Thereza F. Quírico Santos – UFF (Revisora e suplente)

Dr^a. Lídia M^a. da F. de Amorim – UFF (Presidente)

**NITERÓI
2009**

Dedico este trabalho aos pesquisadores que passam ou passaram parte de suas vidas buscando uma cura para o câncer e que fazem da ciência um bem para TODOS.

Dedico este trabalho aos pacientes vítimas do câncer, inclusive aqueles que vieram a falecer.

Dedico este trabalho às famílias e amigos que perderam seus entes queridos por conta desta doença tão cruel, em especial à minha avó Helena Cabral Garcia, pela perda do seu irmão, seu esposo e seus dois filhos.

Dedico este trabalho ao meu avô Antônio da Silveira Garcia, aos meus tios avós Oscar Cabral e Emília Augusta Cabral, e aos meus tios e grandes amigos José Fernando Cabral Garcia e Amelia Josepha Cabral Garcia por terem lutado.

AGRADECIMENTOS

*“Quem viaja acompanhado encurta mais o caminho.
Tudo que no mundo existe, se achando sozinho é triste”
(Patativa de Assaré)*

Às minhas mais que orientadoras Lidia e Patricia, que considero minhas “madrinha e mãe científica”, respectivamente, pela orientação, amizade e exemplo de profissionalismo, que contribuíram não só na minha vida acadêmica, mas também na minha formação como pessoa. Obrigado por investirem e confiarem em mim, até quando nem eu mesmo tinha esperança. E também por me aturarem desde o meu primeiro dia de iniciação científica.

Ao Prof. Mauro Velho de Castro Faria, pela ajuda financeira, análise estatística e pela presença constante e indispensável na realização deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Santelli e a Eliane Pádua, pela colaboração com a quantificação do Rb⁺.

Aos professores membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para a avaliação do presente trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Neuroimunologia da UFF, em especial, às Prof^{as}. Elizabeth Araujo e Thereza Quírico, pelo apoio na seleção do Mestrado.

À minha turma de Mestrado, em especial, à amiga Juliana “nada funciona”, pelo companheirismo e amizade e, pelos momentos de sufoco que passamos juntos durante esses dois anos.

À Isis Moraes, pela paciência e enorme boa vontade em esclarecer diversas dúvidas encontradas por mim e pela Juliana nos artigos da seleção do Mestrado.

A todos os amigos do Laboratório ENZITOX do Departamento de Biologia Celular e Genética da UERJ, pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos de laboratório Monique, Elaine, Ana, Guto, Daniel, Bruno e Chubby (The rat), pela amizade, incentivo e principalmente pelas boas risadas.

À Danielle, minha futura esposa, sempre amiga e eterna namorada, pelo respeito, compreensão e amor. Te amo muito!

Aos meus amigos e familiares, que estão sempre presentes em minha vida e orgulham-se de mim.

Aos meus pais: Vanda e Antônio Carlos, que sempre me incentivaram mesmo eu fazendo Biologia e não Direito (não é pai?), pelo amor, dedicação e amizade. Amo muito vocês! A você mãe, fica minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos e amigos: Fernanda e Antônio, pelo amor incondicional dedicado a mim. Também amo muito vocês!

A Deus, pela vida e por ter posto estas pessoas maravilhosas em meu caminho.

MUITO OBRIGADO!!!

“Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei demais. Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe? Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei... Penso que cumprir a vida seja simplesmente compreender a marcha, ir tocando em frente, como um velho boiadeiro levando a boiada eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou, estrada eu sou... Cada um de nós compõe a sua história e cada ser em si carrega o dom de ser capaz de ser feliz”.

(Almir Sater e Renato Teixeira).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Na ⁺ , K ⁺ ATPase	1
1.1.1 Definição e aspectos funcionais e estruturais	1
1.1.2 Isoformas da Na ⁺ , K ⁺ ATPase	6
1.2 Regulação da Na ⁺ , K ⁺ ATPase	7
1.3 Na ⁺ , K ⁺ ATPase como um transdutor de sinais	9
1.4 Glicosídeos cardíacos e a Na ⁺ , K ⁺ ATPase	11
1.5 Glicosídeos cardíacos, Na ⁺ , K ⁺ ATPase e o câncer	12
1.6 Glioblastoma multiforme (GBM)	13
1.7 Álcool perfílico (POH)	15
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material	20
3.2 Obtenção de preparação de Na ⁺ , K ⁺ ATPase a partir de tecidos de cobaios	20
3.2.1 Animais	20
3.2.2 Preparação de fração membranas de cérebro de cobaio	21
3.2.3 Preparação de fração membranas de rim de cobaio	22
3.2.4 Preparação de homogeneizado de cérebro e rim de cobaio	22
3.3 Microensaio para a determinação da atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase	22
3.3.1 Cinética da inibição da Na ⁺ , K ⁺ ATPase pelos monoterpênicos POH e PA	23
3.3.2 Cinética da inibição da Na ⁺ , K ⁺ ATPase purificada de cérebro e rim por POH em função das concentrações de Na ⁺ , K ⁺ e ATP	24
3.4 Microensaio para a determinação do efeito do POH sobre a atividade da p-nitrofenilfosfatase ativada por K ⁺	24

3.5	Determinação de proteínas totais	25
3.6	Determinação da atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase em cultura de células da linhagem A172 de GBM humano	26
3.6.1	Manutenção das células	26
3.6.2	Determinação da atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase em cultura de células da linhagem A172 pela captação de Rb ⁺	27
3.6.3	Avaliação da viabilidade celular	28
3.7	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Efeito do POH e do PA na atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase purificada de rim e cérebro de cobaio	30
4.2	Efeito do POH sobre a atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase de homogeneizado de rim e cérebro de cobaio	31
4.3	Efeito da variação das concentrações de Na ⁺ , K ⁺ e ATP sobre a cinética de inibição da atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase purificada de rim e cérebro de cobaio em presença de POH	33
4.3.1	Variação na concentração de Na ⁺	33
4.3.2	Variação na concentração de K ⁺	33
4.3.3	Variação na concentração de ATP	38
4.4	Efeito do POH na atividade da p-nitrofenilfosfatase ativada por K ⁺	40
4.5	Determinação da atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase em cultura de células da linhagem A172 pela captação de Rb ⁺	41
4.5.1	Relação do número de células e captação de Rb ⁺	41
4.5.2	Padronização do tempo de incubação e concentração de ouabaína na captação de Rb ⁺	41
4.5.3	Efeito do POH na atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase de cultura de células da linhagem A172 pela captação de Rb ⁺	42
4.6	Efeito do POH na viabilidade celular de células da linhagem A172	44
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	50
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Adenosina Trifosfato

DMEM F12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium – com mistura de nutrientes F12

DMSO – Dimetilsulfóxido

E1 – Primeiro Estado Conformacional da Na^+ , K^+ ATPase

E2 – Segundo Estado Conformacional da Na^+ , K^+ ATPase

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra acético

EGFR – Receptor para Fator de Crescimento Epidérmico

ERK – Quinase Regulada por Sinais Extracelulares

GBM – Glioblastoma Multiforme

GTPases – Família de enzimas que hidrolisam GTP

HEPES – N-(2 – hidroxí etil) piperazina – N'-(2 – ácido etano sulfônico)

IC₅₀ – Concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática

K⁺ p-NPPase – p-Nitrofenilfosfatase ativada por K^+

Mg⁺²ATPase – Adenosina Trifosfatase ativada por Magnésio

NFκB – Fator Nuclear Kappa B

Na⁺, K⁺ ATPase – Adenosina Trifosfatase ativada por Sódio, Potássio e Magnésio

OMS – Organização Mundial da Saúde

OUA – Ouabaína

PA – Ácido Perílico

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PI3K – Fosfatidilinositol 3 Quinase

PKA – Proteína Quinase A

PKC – Proteína Quinase C

PKG – Proteína Quinase G

POH – Álcool Perílico

Raf – Proteína Raf

Ras – Proteína Ras

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SDS – Duodecilsulfato de Sódio

Src – Sarcoma da retina de galinha

Tris – Tri (hidroximetil) - amino-metano

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1: Distribuição das isoformas da Na ⁺ , K ⁺ ATPase nos tecidos humanos.	7
Tabela 2: Classificação dos tumores astrocíticos.	13
Figura 1: Esquema da inserção da Na ⁺ , K ⁺ ATPase na membrana plasmática.	3
Figura 2: Etapas do ciclo de atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase.	5
Figura 3: Esquema da regulação da Na ⁺ , K ⁺ ATPase.	8
Figura 4: Esquema de formação do sinalossoma.	10
Figura 5: Estrutura química dos monoterpenos: limoneno, POH e PA.	17
Figura 6: Inibição de Na ⁺ , K ⁺ ATPases purificadas.	31
Figura 7: Inibição de Na ⁺ , K ⁺ ATPases de homogeneizados.	32
Figura 8: Inibição de Mg ⁺² ATPases de homogeneizados.	32
Figura 9: Curva de ativação por Na ⁺ - Na ⁺ , K ⁺ ATPase cerebral.	34
Figura 10: Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por Na ⁺ - Na ⁺ , K ⁺ ATPase cerebral.	34
Figura 11: Curva de ativação por Na ⁺ - Na ⁺ , K ⁺ ATPase renal.	35
Figura 12: Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por Na ⁺ - Na ⁺ , K ⁺ ATPase renal.	35
Figura 13: Curva de ativação por K ⁺ - Na ⁺ , K ⁺ ATPase cerebral.	36

- Figura 14:** Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por K^+ - Na^+ , K^+ ATPase cerebral. 36
- Figura 15:** Curva de ativação por K^+ - Na^+ , K^+ ATPase renal. 37
- Figura 16:** Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por K^+ - Na^+ , K^+ ATPase renal. 37
- Figura 17:** Curva de ativação por ATP - Na^+ , K^+ ATPase cerebral. 38
- Figura 18:** Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por ATP - Na^+ , K^+ ATPase cerebral. 38
- Figura 19:** Curva de ativação por ATP - Na^+ , K^+ ATPase renal. 39
- Figura 20:** Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por ATP - Na^+ , K^+ ATPase renal. 39
- Figura 21:** Efeito do POH sobre a atividade K^+ p-NPPásica de Na^+ , K^+ ATPases. 40
- Figura 22:** Curva de captação de Rb^+ em função da concentração de ouabaína em diferentes intervalos de tempo. 42
- Figura 23:** (A) Captação de Rb^+ , em 30 minutos. (B) Efeito inibitório do POH sobre a atividade da Na^+ , K^+ ATPase. 43
- Figura 24:** Viabilidade celular das células da linhagem A172. 44

RESUMO

A enzima Na^+ , K^+ ATPase é essencial para manter o potencial de membrana das células em geral, entre outras funções. A ampla distribuição da Na^+ , K^+ ATPase e o seu envolvimento em funções fisiológicas sugere que a alteração enzimática possa ter importante papel em muitos processos biológicos e patológicos. Neste trabalho nós avaliamos o efeito do álcool perfílico (POH), terpeno de origem vegetal utilizado no tratamento de diversos tumores, sobre a atividade da enzima Na^+ , K^+ ATPase purificada, não purificada e em células da linhagem A172 de glioblastoma humano em cultura. O POH mostrou ser um inibidor da Na^+ , K^+ ATPase, com maior especificidade para a subunidade α_1 (renal) do que para as isoformas predominantes no cérebro (α_2 e α_3), embora a isoforma renal tenha uma sensibilidade menor. Estudos cinéticos com as preparações purificadas mostraram um efeito do POH não competitivo, em relação aos íons Na^+ e K^+ e incompetitivo em relação ao ATP. O fato da p-nitrofenilfosfatase ativada por K^+ , não ser inibida pelo POH, indica que essa droga atua na fase inicial do ciclo catalítico da Na^+ , K^+ ATPase. A determinação da atividade da Na^+ , K^+ ATPase em células, mostrou-se reprodutível, revelando sensibilidade à inibição pelo POH (IC_{50} aproximadamente 1,5 mM) similar àquela da enzima purificada de rim. Os dados obtidos indicam que o POH é um inibidor que apresenta uma especificidade para a isoforma α_1 da Na^+ , K^+ ATPase. Experimentos futuros permitirão determinar se de modo semelhante aos glicosídeos cardíacos, o POH também atua sobre as diversas cascatas de sinalização, moduladas via Na^+ , K^+ ATPase.

ABSTRACT

The Na⁺, K⁺ ATPase is essential for maintenance of membrane potential of most cell, among other functions. The ubiquitous distribution of Na⁺, K⁺ ATPase and its involvement in physiological functions suggest that enzymatic alterations may play important roles in many biological and pathological processes. In the present work, we analyzed the effect of perillyl alcohol (POH), a vegetal-derived terpene currently used in the treatment of several tumours, in the activity of purified and non purified Na⁺, K⁺ ATPase and also the human glioblastoma lineage A172 in culture. POH inhibited the Na⁺, K⁺ ATPase, with a higher specificity for α_1 subunit (kidney) than the predominant brain isoforms (α_2 e α_3), although the kidney isoform has a lower sensibility. Kinetic studies with guinea pig purified Na⁺, K⁺ ATPase showed a non competitive POH inhibition to Na⁺ and K⁺ and a competitive inhibition towards ATP. Lack of K⁺- activated p-nitrophenylphosphatase sensibility to POH implies that this drug may act in the initial phase of the Na⁺, K⁺ ATPase catalytical cycle. Determination of the Na⁺, K⁺ ATPase activity on cells, was reproducible, revealing sensibility to POH inhibition (IC₅₀ near to 1,5mM), a similar result to that obtained for kidney purified Na⁺, K⁺ ATPase. The overall results indicate that POH present inhibitory effect shows some specificity upon the Na⁺, K⁺ ATPase with further specificity to the α_1 isoform. It is important to conduct further experiments in an attempt to verify if the POH, similarly to cardiac glycosides can also act via Na⁺, K⁺ ATPase-modulated cascade.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Na⁺, K⁺ ATPase

1.1.1 Definição e aspectos funcionais e estruturais

A adenosina trifosfatase ativada por sódio, potássio e magnésio (Na⁺, K⁺ ATPase; bomba de sódio; EC 3.6.1.37) é um complexo proteico associado à membrana plasmática encontrado em células animais, que atua acoplando a energia estocada na molécula de ATP ao transporte de íons Na⁺ e K⁺ através da membrana celular. Para cada três íons Na⁺ bombeados para fora da célula, dois íons K⁺ são bombeados para dentro (Skou, 1957; 1965; 2004). Este transporte produz um gradiente químico e elétrico através da membrana celular, o qual é essencial para manter o potencial de membrana das células e para a atividade excitável do músculo e células nervosas.

O gradiente de Na⁺ é utilizado para direcionar numerosos processos de transporte, incluindo a translocação de glicose, aminoácidos e outros nutrientes para as células, além da manutenção da estabilidade osmótica (Albers, 1967; Preiss e Banaschak, 1979). Além da sua função na homeostasia iônica, a Na⁺, K⁺ ATPase também apresenta um papel na sinalização celular (Jaitovich e Bertorello, 2006) e em eventos relacionados à apoptose, como alterações no nível de K⁺ intracelular. Diversas doenças, que se apresentam com alteração na atividade e/ou expressão da Na⁺, K⁺ ATPase, provocando mudanças na função enzimática, poderiam disparar a morte celular programada (Yu, 2003; Panayiotidis *et al.*, 2006).

A macromolécula enzimática funcional é composta de subunidades α (112-kDa) e β (55-kDa), interagindo não covalentemente (Jørgensen, 1982). A subunidade γ , um membro da família das proteínas de membrana denominadas FXYD (10-kDa), foi identificada inicialmente em células do túbulo renal (Therien *et al.*, 2001). A Figura 1 mostra um modelo do complexo enzimático inserido na membrana plasmática.

A subunidade α ou catalítica apresenta 10 domínios hidrofóbicos transmembranares, contendo todos os sítios de ligantes que estimulam ou inibem a atividade enzimática. Os ligantes necessários para a fosforilação da enzima interagem nos sítios da subunidade α , localizados na superfície citoplasmática da membrana, enquanto que os íons K^+ necessários para a hidrólise enzimática e os inibidores clássicos desta enzima (glicosídeos cardíacos) ligam-se à superfície extracelular. A subunidade β tem um simples domínio hidrofóbico transmembranar e sua superfície extracelular é altamente glicosilada. Acredita-se que a função desta subunidade seja orientar e estabilizar a subunidade α na membrana, além de regular a afinidade desta pelo íon K^+ e pelos glicosídeos cardíacos. A presença da subunidade β é essencial para o funcionamento enzimático (Abriel *et al.*, 1999; Mobasher *et al.*, 2000).

Quanto a isoforma γ , a última a ser descoberta, é um proteolípídio presente principalmente em células renais, atuando como moduladora da afinidade da enzima por diferentes ligantes (Béguin *et al.*, 1997; Therien *et al.*, 2001) e apresenta um efeito direto e positivo sobre a velocidade máxima da hidrólise de ATP (Cortes *et al.*, 2006).

A Na^+ , K^+ ATPase é um membro da classe das ATPases do tipo P. Estas tem ciclos catalíticos semelhantes, os quais envolvem a participação intermediária da enzima sob a forma fosforilada. Na fosforilação, a molécula proteica sofre uma transição conformacional de hélice α para folha β (Jørgensen, 1986; Kühlbrandt, 2004). A transição conformacional resulta em fosforilação da enzima por ATP em presença de Mg^{+2} e íons Na^+ e a desfosforilação em presença de íons K^+ (Mobasher *et al.*, 2000; Kaplan, 2002). Um modelo deste ciclo reacional está mostrado na Figura 2. Três íons Na^+ ligam-se à enzima (estado E1) no lado citoplasmático e a enzima é fosforilada pelo ATP. Uma mudança conformacional ocorre (estado E2) e os

sítios de ligação ao sódio são expostos para a superfície extracelular. Os três íons Na^+ são liberados e os dois íons K^+ , extracelulares, ligam-se à enzima. A desfosforilação com nova ligação de ATP ocorre acompanhada por mudança conformacional (retorno ao estado E_1), permitindo que os íons K^+ sejam liberados no citoplasma (Mobasher *et al.*, 2000; Kaplan, 2002; Köksoy, 2002; Kühlbrandt, 2004).

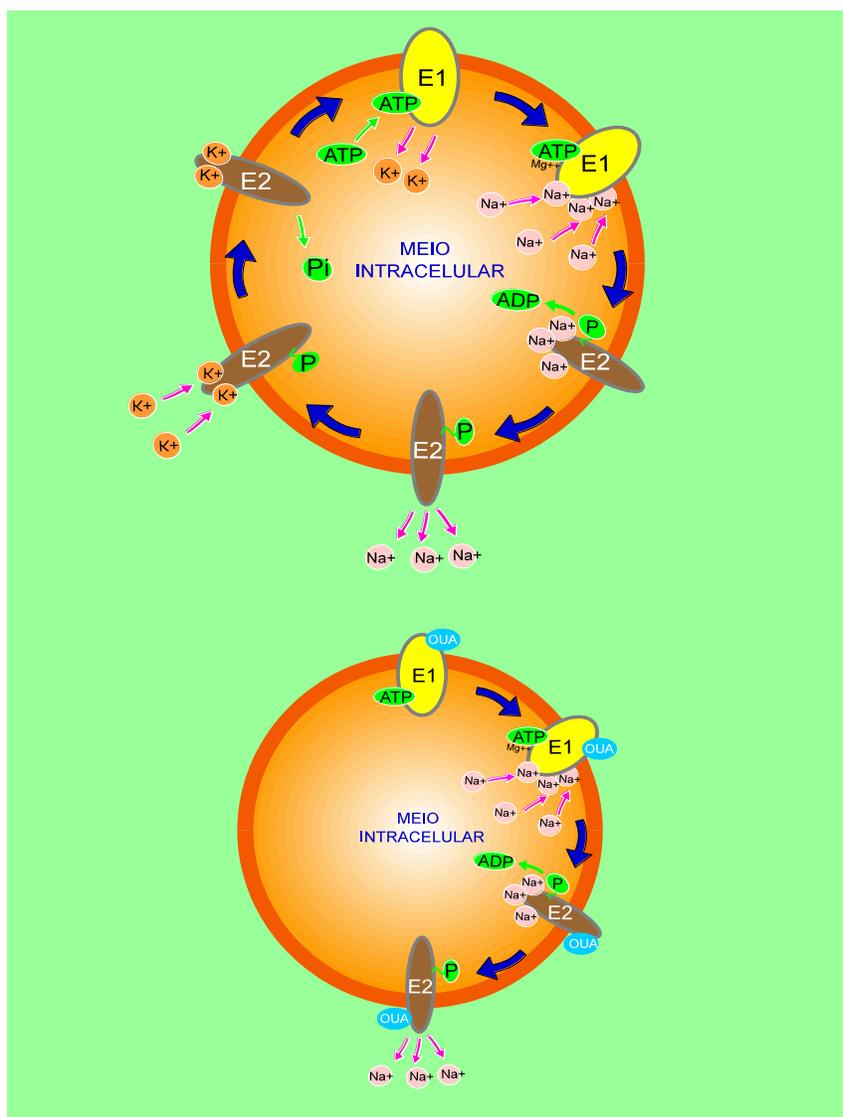


Figura 2: Etapas do ciclo de atividade da Na^+ , K^+ ATPase.

Na figura superior são mostradas as 2 conformações E_1 e E_2 e suas interações com Na^+ , ATP.Mg^{++} e K^+ . Abaixo, é indicado o mecanismo de ação de glicosídeos cardíacos (OUA) - ouabaína, que paralisa a reação enzimática na etapa E_2 – fosforilada (Burth, 1997).

1.1.2 Isoformas da Na^+ , K^+ -ATPase

A Na^+ , K^+ ATPase existe como múltiplas isoenzimas, resultante da combinação de diferentes isoformas das subunidades α e β . Existem isoformas para ambas as subunidades: α (α_1 , α_2 , α_3 e α_4) e β (β_1 , β_2 e β_3) (Blanco *et al.*, 1998).

As quatro isoformas α são expressas diferentemente ao longo do desenvolvimento do organismo em diferentes tecidos. A isoforma α_1 ocorre na maioria dos tecidos, enquanto que a α_2 predomina no músculo esquelético e também foi detectada (em menor quantidade) no cérebro e coração. A isoforma α_3 está limitada essencialmente ao tecido nervoso e ao coração e a α_4 é encontrada somente nos testículos e espermatozóides. Estas isoformas têm diferentes propriedades funcionais com respeito à afinidade por ligantes como Na^+ e ouabaína, embora a função essencial de transporte de íons seja a mesma (Blanco e Mercer, 1998, Blanco *et al.*, 2000, Mobasheri *et al.*, 2000; Kaplan, 2002). O tecido renal parece expressar unicamente a isoforma α_1 , embora Barlet-Bas *et al.* (1993) tenham detectado a presença, também, da isoforma α_3 em segmentos de túbulos renais isolados.

As isoformas β_1 e β_2 são as predominantes nas células de mamíferos, sendo a β_1 expressa ubiquamente, enquanto que a β_2 aparece principalmente no tecido nervoso. A isoforma β_3 foi identificada no músculo esquelético, pulmão e principalmente no tecido nervoso (Appel *et al.*, 1996).

Até o momento sete membros da família de proteínas FXYD (subunidade γ) foram descritos (FXYD1-7). Este grupo de proteínas pode ser encontrado associado à bomba de Na^+ e K^+ no coração, fígado e músculo esquelético (FXYD1), túbulos renais (FXYD2 e FXYD4),

útero, pele e estômago (FXVD3), tecidos cancerosos (FXVD5), diversos tecidos normais (FXVD6), cérebro (FXVD7) (Mijatovic *et al.*, 2007). Os dados acima estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição das isoformas da Na⁺, K⁺ ATPase nos tecidos humanos.

Isoformas	Tecidos
α_1	Todos
α_2	Músculo esquelético, cérebro e coração
α_3	Tecido nervoso e coração
α_4	Testículos e espermatozóides
β_1	Todos
β_2	Cérebro
β_3	Principalmente no tecido nervoso
FXVD1	Coração, fígado e músculo esquelético
FXVD2 e 4	Túbulos renais
FXVD3	Útero, pele e estômago
FXVD5	Tecidos cancerosos
FXVD6	Diversos tecidos normais
FXVD7	Cérebro

1.2 Regulação da Na⁺, K⁺ ATPase

A ampla distribuição da Na⁺, K⁺ ATPase e o seu envolvimento em funções fisiológicas importantes sugere que a alteração da atividade enzimática, quer seja por fatores endógenos, quer por ação de xenobióticos, possa ter importante papel em muitos processos biológicos e patológicos, tais como a modulação da contratilidade cardíaca ou a liberação de neurotransmissores (MacGregor e Walker, 1993; Buckalew, 2005).

A modificação da atividade enzimática pode ocorrer em resposta a mudanças na regulação da velocidade de expressão de isoformas e/ou modulação por inibidores ou ativadores (Kaplan, 2002; Köksoy, 2002).

A Na^+ , K^+ ATPase pode ser regulada por diferentes mecanismos (ver Figura 3), incluindo a fosforilação direta da enzima por quinases, tais como PKA, PKG ou PKC em vários resíduos de serina na seqüência proteica; o aumento da concentração intracelular de sódio ou extracelular de potássio afetando a atividade da bomba; associação direta ou indireta com elementos do citoesqueleto, tais como ancorina e actina, que direcionam a enzima para o compartimento apropriado da membrana; o nível de ATP, especificamente uma redução intracelular, que pode reduzir a atividade da bomba; e inibidores endógenos circulantes, tais como ouabaína, hormônios corticosteróides e peptídeos. A regulação hormonal pode, em curto prazo, afetar diretamente o comportamento cinético da enzima ou, em longo prazo, alterar a síntese ou a degradação da enzima (Panayiotidis *et al.*, 2006).

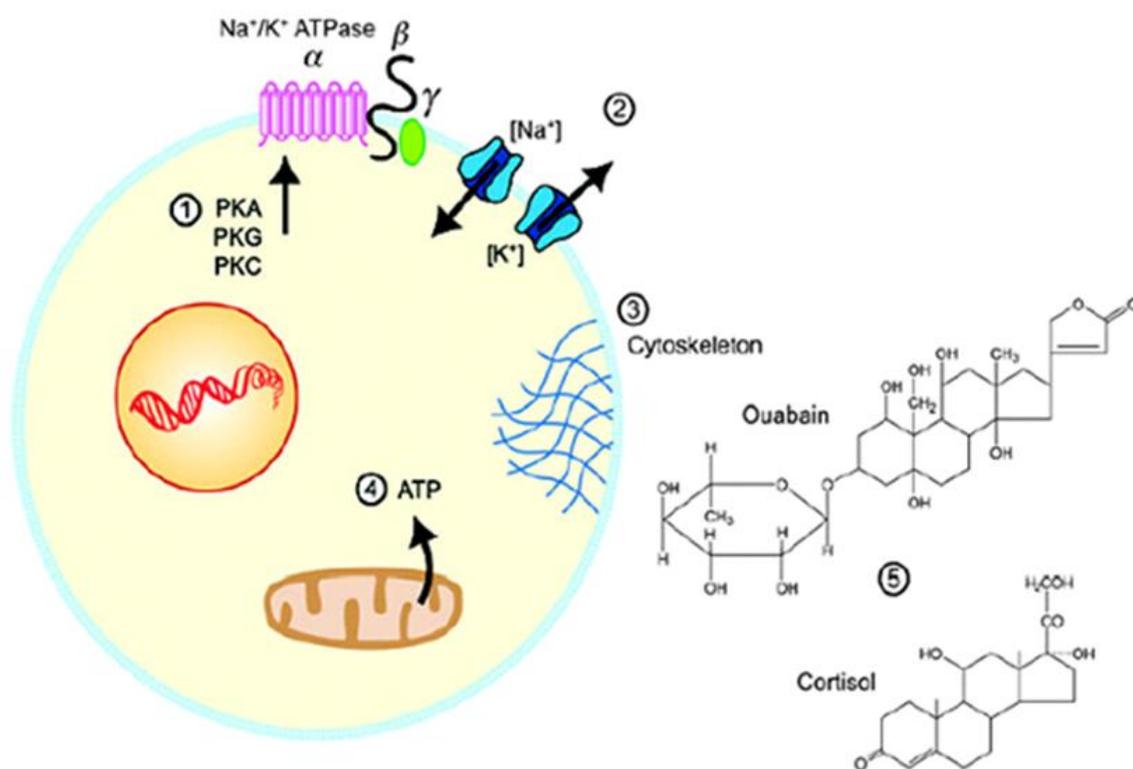


Figura 3: Esquema da regulação da Na^+ , K^+ ATPase (Panayiotidis *et al.*, 2006).

1.3 Na⁺, K⁺ ATPase como um transdutor de sinal

Além do seu funcionamento como uma bomba de íons, a Na⁺, K⁺ ATPase tem sido apresentada também como um transdutor de sinal. Sua função na sinalização intracelular parece ter sido adquirida na evolução através da incorporação de muitos domínios que interagem com proteínas e ligantes (Xie e Cai, 2003). Esta enzima pode interagir, nas cavéolas, com diferentes proteínas de sinalização, incluindo Src (Xie e Cai, 2003), PKC, PKA e PI3K (Therien e Blostein, 2000) e caveolinas (Liu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004).

O estudo do efeito de ligantes na estrutura da bomba de Na⁺ e K⁺ tem mostrado que a interação da Na⁺, K⁺ ATPase com Src quinase, EGFR e outras proteínas, forma um microdomínio de sinalização - sinalossoma (Figura 4), restrito às caveolas (Haas *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003; Xie e Cai, 2003; Wang *et al.* 2004; Pierre e Xie, 2006; Liang *et al.*, 2007; Li e Xie, 2008). Esses achados suportam a proposta de que a ativação do complexo Na⁺, K⁺ ATPase-Src é o ponto inicial para a sinalização, a partir da interação da ouabaína com a enzima, para o EGFR e outras vias de sinalização intracelular. Sendo assim, a ligação da ouabaína à Na⁺, K⁺ ATPase regula a interação entre esta enzima e a caveolina e estimula a Src citoplasmática. A Src ativada, transativa EGFR, o qual recruta proteínas adaptadoras, dando seguimento a ativação da cascata Ras-Raf-Erk1/2 (Haas *et al.*, 2000; Li e Xie, 2008). Estes eventos resultam em mudanças na expressão de múltiplos genes, além da regulação da concentração de Ca⁺² intracelular (Aizman *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2003). Oscilações de Ca⁺² intracelular ativam NFkB. Este fator de transcrição pluripotente ativa genes que modulam a proliferação celular, apoptose e desenvolve respostas do sistema imune (Miyakawa-Naito *et al.*, 2003). Além disso, a ativação de Src estimula outras vias, incluindo o aumento na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo este considerado um

importante passo na indução da apoptose (Xie e Cai, 2003). Entretanto, a resposta final da sinalização intracelular ativada por glicosídeos cardíacos é dependente do tipo de tecido celular, tempo de exposição e concentração da droga (Mijatovic, *et al.*, 2007).

A função de transdução de sinal da Na^+ , K^+ ATPase parece ocorrer através de propriedades que são independentes de sua função como uma bomba de íons (Liang *et al.*, 2007). É importante notar que o efeito da ouabaína sobre a Src é independente de mudanças nas concentrações intracelulares de Na^+ e K^+ (Xie e Cai, 2003; Pierre e Xie, 2006).

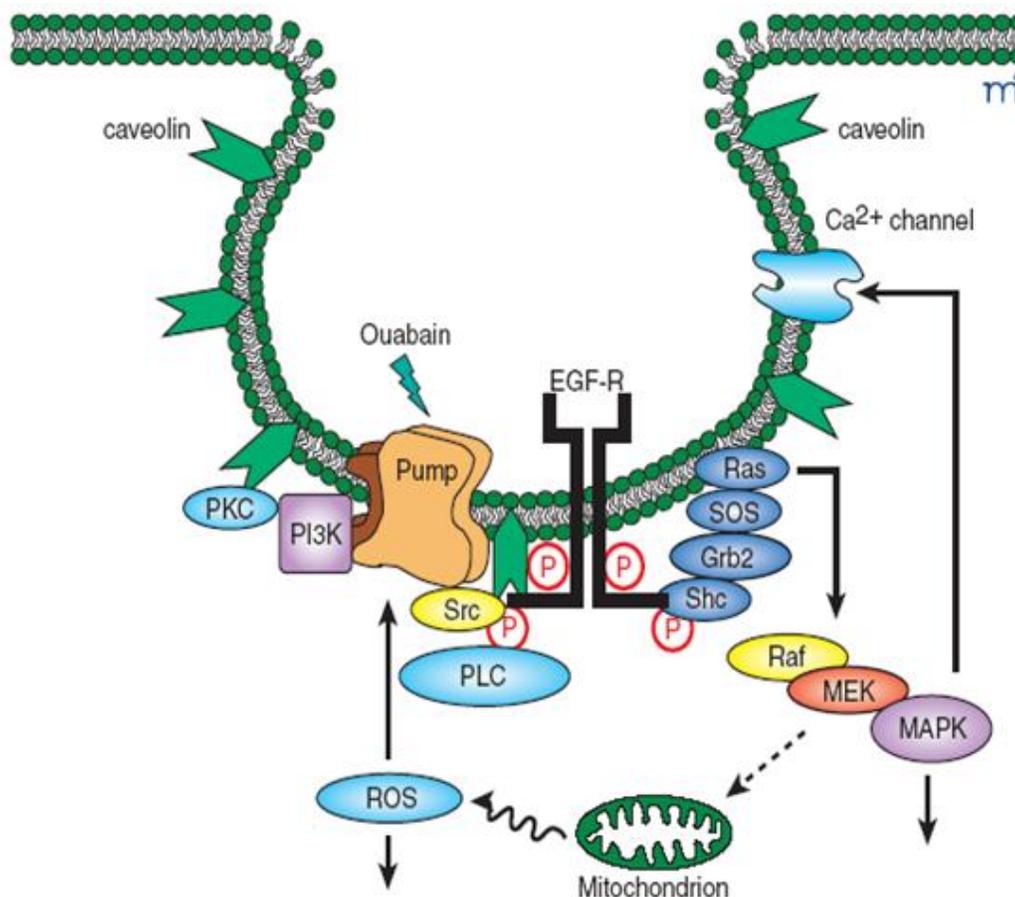


Figura 4: Esquemática de formação do sinalossoma (Xie e Cai, 2003).

1.4 Glicosídeos cardíacos e a Na^+ , K^+ -ATPase

Os glicosídeos cardíacos (digitálicos) são os inibidores clássicos da Na^+ , K^+ ATPase, derivados de extratos de plantas do gênero *Digitalis*, *Strophanthus* e *Uregenia*. A digoxina é obtida das folhas de *Digitalis lanata* e a ouabaína das sementes de *Strophanthus gratus* (MacGregor e Walker, 1993). Estes compostos são esteróides C_{23} que tem um ou mais resíduos de açúcar no C_3 e um anel lactona no C_{17} e são utilizados em todo o mundo no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca, por serem os mais potentes agentes inotrópicos (que aumentam a força de contração cardíaca) conhecidos. Seus efeitos são mediados pela capacidade destes compostos em inibir a bomba de Na^+ e K^+ ao ligarem-se especificamente à subunidade α , na superfície extracelular da membrana, bloqueando a enzima no estado conformacional E_2 fosforilado (Rose e Valdes Jr., 1994; Buckalew, 2005; Wasserstrom e Aistrup, 2005) - (Ver Figura 2).

O mecanismo proposto para o efeito inotrópico dos glicosídeos cardíacos é iniciado com a inibição da Na^+ , K^+ ATPase, o que leva à inibição do efluxo de Na^+ , causando um aumento na concentração intracelular deste íon. Isto altera a atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, causando uma elevação transitória de Ca^{+2} citoplasmático e, portanto, maior contratilidade do músculo cardíaco. A elevação da concentração intracelular de Ca^{+2} pode também ser a responsável pela sintomatologia observada na intoxicação por estas drogas (MacGregor & Walker, 1993; Hauptman e Kelly, 1999; Schwinger *et al.*, 2003; Wasserstrom e Aistrup, 2005).

A presença de um sítio altamente conservado de ligação de alta afinidade na subunidade α para a ouabaína sugere a existência de moduladores endógenos circulantes que

controlem a atividade da Na^+ , K^+ ATPase, ligando-se ao sítio da ouabaína. A existência de tais ligantes, poderia ter implicações em muitos processos fisiológicos, tais como na modulação da contractilidade cardíaca, excreção renal de Na^+ , sensibilidade à insulina, hipertensão, neurotransmissão e alterações no crescimento e proliferação celular. Substâncias semelhantes aos digitálicos têm sido purificadas de diversos tecidos e fluidos corporais humanos (MacGregor e Walker, 1993; Buckalew, 2005; Weidemann, 2005).

1.5 Glicosídeos cardíacos, Na^+ , K^+ ATPase e o câncer

Os efeitos dos glicosídeos cardíacos sobre a atividade da Na^+ , K^+ ATPase e o uso dessas drogas na terapia de doenças cardiovasculares têm sido amplamente divulgados. Porém, alguns estudos que mostraram baixa taxa de mortalidade de pacientes com câncer que receberam tratamento com glicosídeos cardíacos, em especial, mulheres com câncer de mama (Stenkvist, 1999), e o fato da Na^+ , K^+ ATPase também atuar como um transdutor de sinal, despertaram novos interesses nas propriedades anticancer dessas drogas (Kometiani *et al.* 2005). Estudos subsequentes *in vivo* e *in vitro* confirmaram essas observações iniciais e substâncias baseadas em glicosídeos cardíacos têm sido utilizadas em ensaios clínicos para o tratamento do câncer (Winnick *et al.*, 2006; Mijatovic *et al.* 2007).

Além disso, estágios iniciais da tumorigênese, mesmo antes de evidências morfológicas do tumor, já apresentam mudanças na atividade da Na^+ , K^+ ATPase (Shen *et al.* 1978; Weidemann, 2005). Alguns trabalhos, inclusive, apontam para a supressão ou estímulo da expressão de isoformas da enzima, principalmente α_1 e α_3 , de acordo com o tipo de câncer em questão. Por exemplo, a expressão de α_1 seria estimulada em câncer de cérebro, pulmão e

pele, e inibida em câncer de intestino e bexiga; já α_3 seria estimulada em câncer de cólon e reto, principalmente (Sakai *et al.*, 2004; Mijatovic *et al.*, 2008).

Neste contexto, a Na^+ , K^+ ATPase pode ser um importante alvo para a terapia anticancer (Aperia, 2007), especialmente, a subunidade α_1 , em células de glioblastomas resistentes à apoptose (Lefranc *et al.*, 2008; Lefranc e Kiss, 2008).

1.6 Glioblastoma multiforme (GBM)

Diferentes tipos de tumores gliais (gliomas) têm sido identificados e classificados de acordo com os tipos celulares predominantes no tecido tumoral. Os tumores astrocíticos (originados de astrócitos) correspondem a aproximadamente 75% dos casos de gliomas e apresentam uma subclassificação por graus, que variam de I a IV, quanto à malignidade. O grau I denominado astrocitoma pilocítico é considerado um tumor benigno e o glioblastoma multiforme (GBM) é caracterizado como grau IV, dado ao seu elevado grau de malignidade (Vescovi *et al.*, 2006; Ohgaki e Kleihues, 2007). A classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), utilizada como padrão de classificação internacional de tumores astrocíticos, apresenta as diferentes classes existentes (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação dos tumores astrocíticos. Estabelacida pela OMS, em 2002 (Vescovi *et al.*, 2006).

Origem do tumor	Classificação
Astrocítico	Astrocitoma pilocítico (grau I)
	Astrocitoma difuso (grau II)
	Astrocitoma anaplásico (grau III)
	Glioblastoma (grau IV)

O GBM é o mais freqüente e maligno tumor cerebral humano. É caracterizado como um astrocitoma de alto grau por apresentar capacidade infiltrante e ausência de limitação. As células tumorais dos GBMs ajustam sua forma e volume rapidamente ao invadirem o parênquima cerebral, sendo essencial para este processo a atividade de mecanismos de transporte de íons (Lefranc, *et al.*, 2008). Estas células apresentam um modelo de distribuição tecidual difuso no cérebro, que impede a retirada total cirúrgica do tumor, tornando o prognóstico para o GBM bastante desanimador, pois a sobrevida média, quando combinadas radioterapia e quimioterapia, é de aproximadamente 14,6 meses (Vescovi *et al.*, 2006).

Os GBMs podem ser classificados em primários, quando se manifestam rapidamente, não havendo evidência de lesão maligna precursora e acometem pessoas com idade média de 55 anos; ou secundários, quando se desenvolvem mais lentamente, a partir da progressão de um astrocitoma de grau II ou III e acometem preferencialmente adultos jovens, com idade média de 40 anos (Ohgaki *et al.*, 2004). Apesar destes tipos de tumores serem pouco diferenciados, ainda mantêm características que permitem sua classificação histológica, sendo este o método diagnóstico atualmente utilizado para a escolha da terapia mais adequada e determinação do prognóstico. Entretanto, a determinação do grau de malignidade pode variar com o observador, não garantindo a objetividade necessária para um diagnóstico preciso (Louis *et al.*, 2001). Com o advento da classificação diagnóstica molecular, melhorias significantes têm sido reportadas nesta área (Louis, 2006).

As estratégias terapêuticas convencionais utilizadas na atualidade que visam a erradicação do tumor são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia baseia-se na aplicação de compostos que levem à inibição do crescimento ou à morte da célula cancerosa. Porém, a capacidade das células tumorais em evadir-se da morte celular, bem como sua

resistência à quimioterapia, constituem um desafio para a clínica. Por esse motivo, existe um grande interesse na identificação de novos compostos que sejam efetivos no tratamento de pacientes que não respondem aos quimioterápicos disponíveis. Os terpenos, por exemplo, são compostos naturais com propriedades antimitóticas que podem ser usados nesses casos (Belanger, 1998).

1.7 Álcool perfílico (POH)

Novas drogas quimioterápicas têm sido desenvolvidas, sendo a maioria originada de fontes naturais, como os vegetais. Os terpenos são exemplos de tais compostos com propriedades antimitóticas de grande interesse médico (Belanger, 1998; Fernandes *et al.*, 2005). Esses hidrocarbonetos são classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas formadoras em: hemiterpenos (C_5 , 1 unidade isoprênica), monoterpenos (C_{10} , 2 unidades isoprênicas), sesquiterpenos (C_{15} , 3 unidades isoprênicas), diterpenos (C_{20} , 4 unidades isoprênicas) e politerpenos (C_5)_n (McGarvey e Croteau, 2005).

Monoterpenos tendem a ser altamente voláteis e frequentemente constituem os componentes primários de óleos essenciais, a fragrância principal das plantas. Os óleos essenciais são utilizados em perfumes e como aromatizantes para cosméticos e alimentos (Boik, 2001). O limoneno (Figura 5) é um monoterpeno monocíclico presente em cascas de frutos cítricos, principalmente de limão e laranja. Este composto de baixa toxicidade possui atividade quimiopreventiva e quimioterapêutica contra vários tipos de tumores, devido a sua capacidade de inibir a isoprenilação pós-traducional de GTPases, incluindo membros da família Ras. A isoprenilação é importante para a associação das GTPases com a membrana

plasmática, tornando estas proteínas capazes de atuarem na via de sinalização requerida para o crescimento e proliferação celular (Gelb, *et al.*, 1995; Holstein e Hohl, 2003; Nakada *et al.*, 2007).

A alta dose de limoneno (1000mg/Kg/dia) necessária para os efeitos benéficos tem limitado seu uso. Por este motivo, outros monoterpenos passaram a ser investigados, principalmente seus metabólitos álcool perílico (POH) e ácido perílico (PA) (Figura 5). Em humanos, aproximadamente 40% do limoneno é metabolizado a PA. O POH também é metabolizado a PA, porém numa taxa mais alta, quando comparada com a do limoneno (Boik, 2001).

O POH e o PA também são inibidores da isoprenilação da proteína Ras, atuando desta forma, no controle da proliferação celular (Holstein e Hohl, 2003), na ativação das vias pró-apoptóticas e bloqueando o ciclo celular de diferentes células tumorais *in vitro* (Xu, *et al.*, 2004; Fernandes, *et al.*, 2005; Yeruva *et al.*, 2007).

O POH, um monoterpeno monocíclico hidroxilado também encontrado principalmente nos óleos essenciais de limão, lavanda, hortelã, sálvia, sementes de aipo, bergamota selvagem, gengibre e cerejas, por possuir uma atividade antitumoral mais potente, é considerado como uma substância com potencial atividade regressora de diferentes tumores, incluindo mamários, pancreáticos e cerebrais (Yuri, *et al.*, 2004; Da Fonseca *et al.*, 2006a, 2006b e 2007; Matos, *et al.*, 2008). Apresenta também efeito radiosensibilizador (Rajesh *et al.*, 2003) e significativa inibição angiogênica (Loutrari, *et al.*, 2004).

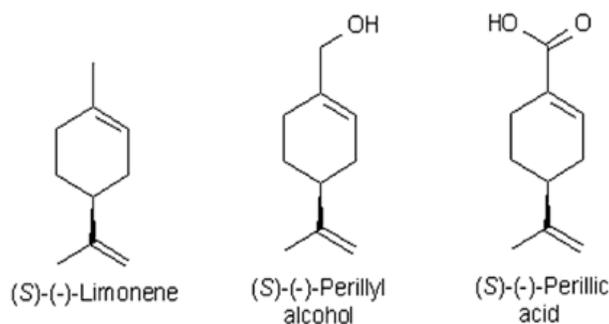


Figura 5: Estrutura química dos monoterpênos: limoneno, POH e PA.
Adaptado de Holstein e Hohl (2003).

Estudos clínicos da administração oral de POH (Fase I/II) a pacientes portadores de diferentes tumores sólidos malignos encontram-se em andamento (Ripple *et al.*, 2000; Hudes *et al.*, 2000; Azzoli *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2004; Stearns *et al.*, 2004). Nenhuma evidência de toxicidade hepática, renal ou neurobiológica tem sido relatada. Porém foram observados efeitos colaterais afetando o trato gastrointestinal (Hudes *et al.*, 2000; Azzoli *et al.*, 2003).

De acordo com essas evidências, os Doutores Thereza F. Quírico Santos e Clóvis Orlando P. da Fonseca, da UFF, iniciaram de forma inédita, a administração do álcool perílico a pacientes portadores de gliomas malignos recidivos através da via intranasal (estudo em Fase II – CONEP registro 9681 número 25000.009267/2004-25, 2004). Estes estudos têm mostrado o efeito antitumoral, com diminuição da morbidade, melhora do quadro clínico-laboratorial, diminuição significativa da massa tumoral e aumento da sobrevida (maior que 18 meses) em vários pacientes, além de reduzir consideravelmente os efeitos colaterais que afetam o trato gastrointestinal (Da Fonseca *et al.*, 2006a, 2006b, 2007 e 2008).

2 OBJETIVOS

Drogas que inibem a atividade da enzima Na^+ , K^+ ATPase podem ter importante papel no tratamento do câncer. Devido a isso, uma análise aprofundada acerca de um possível papel inibitório que pode ser exercido pelo POH sobre esta enzima pode ajudar na busca por alternativas no tratamento de tal doença. Sendo assim, foram estabelecidos os seguintes objetivos para este trabalho:

Objetivo Geral:

- Avaliar o efeito do monoterpene POH na atividade da enzima Na^+ , K^+ ATPase.

Objetivos Específicos:

- Comparar o efeito inibitório do POH e seu principal metabólito o PA sobre a atividade da enzima Na^+ , K^+ ATPase purificada.
- Comparar o efeito inibitório do POH e do PA sobre a atividade das diferentes isoformas (cerebrais e renais) da Na^+ , K^+ ATPase.
- Determinar o efeito inibitório do POH sobre a atividade da Na^+ , K^+ ATPase em homogeneizado de rim e cérebro de cobaio.

- Determinar o efeito da variação das concentrações de Na^+ , K^+ e ATP na cinética de inibição da atividade da Na^+ , K^+ ATPase purificada de rim e cérebro de cobaio em presença de POH.
- Determinar o efeito do POH na atividade da p-nitrofenilfosfatase ativada por K^+ (2ª etapa do ciclo catalítico da Na^+ , K^+ ATPase).
- Adaptar modelo experimental de captação de Rb^+ em cultura de células da linhagem A172 de GBM humano para a determinação da atividade da Na^+ , K^+ ATPase.
- Determinar o efeito do POH sobre a atividade da Na^+ , K^+ ATPase em células da linhagem A172 de GBM humano.
- Determinar o efeito do POH sobre a viabilidade celular em células da linhagem 172 de GBM humano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os monoterpenos (S)-(-)-álcool perílico, 96% e (S)-(-)-ácido perílico, 95%, a ouabaína, o DMSO, 99,9% e os demais reagentes utilizados foram adquiridos da firma Sigma (Sigma Chem. Co. MO, USA). Os reativos que devem ser diferenciados quanto à origem e fornecedor serão mencionados oportunamente.

3.2 Obtenção de preparação de Na⁺, K⁺ ATPase a partir de tecidos de cobaios

3.2.1 Animais

Cobaios (*Cavia porcellus*) machos, pesando entre 300 - 320g, mantidos no biotério do Departamento de Biologia Celular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), foram usados em todos os experimentos. Os animais foram manipulados no laboratório ENZITOX de acordo com as regras de trato animal registradas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. Department of Health and Human Services, N.I.H* e em concordância com as normas da UERJ, onde foram feitas as preparações.

3.2.2 Preparação de fração membranar de Cérebro de cobaio

Os cobaios foram anestesiados com éter, sendo seus cérebros retirados e lavados com salina 0,9% gelada. Usou-se uma modificação da metodologia descrita por Jørgensen (1977) para purificação de enzima, conforme Burth *et al.* (1997). Os cérebros frescos de cobaios foram homogeneizados, em banho de gelo, em 6 volumes de solução EDTA-Tris 5mM pH 7,4. Após centrifugação a 3.000 x g 10 minutos (4°C), o sedimento foi homogeneizado em 6 volumes da solução EDTA-Tris 5mM pH 7,4, sendo o volume anotado e a concentração de proteína determinada. Um volume adequado de solução de duodecilsulfato de sódio (SDS) a 10mg/mL foi lentamente adicionado, à temperatura ambiente e sob suave agitação, até que a proporção de 0,1mg de SDS por mg de proteína fosse alcançada. Esta suspensão continha 3mM de ATP para proteção da atividade da enzima. A preparação continuou a ser suavemente agitada por mais 30 minutos a temperatura ambiente e então foi centrifugada a 12.000 x g 15 minutos a 20°C. O sobrenadante e a camada pouco aderida, localizada acima do sedimento rígido, foram removidos, homogeneizados e centrifugados por 90 minutos a 35.000 x g (15°C). O volume desse novo sobrenadante foi anotado (V_s). O sedimento foi lavado duas vezes com esse volume (V_s) de tampão Tris-HCl 2,5mM – EDTA 1mM, pH 7,4, por centrifugação (35.000 x g , 90 minutos, 4°C) e ressuspensão em $V_s/2$ de tampão Tris-HCl 2,5mM – EDTA 1mM EDTA, pH 7,4, contendo 1% de sacarose. A preparação final foi alíquotada e liofilizada. Os liofilizados foram selados sob atmosfera de nitrogênio e estocados a -20°C. Sob estas condições, a preparação enzimática permaneceu estável por meses. O conteúdo de cada frasco foi ressuspensão em EDTA-Tris 1mM, pH 7,6 no momento de uso. A atividade específica da Na^+ , K^+ ATPase desta preparação foi de 105 $\mu\text{mol Pi/h/mg}$ de proteína e a contaminação por Mg^{+2} ATPase foi menor que 3%.

3.2.3 Preparação de fração membranar de rim de cobaio

O protocolo de preparação da enzima renal foi o descrito no item 3.2.1, para a enzima cerebral, exceto que a proporção do detergente usado foi a de 0,2mg de SDS por mg de proteína. A atividade específica da preparação final obtida foi de 100 μ moles de Pi/h/mg de proteína, enquanto a contaminação por Mg⁺² ATPase foi menor que 2%.

3.2.4 Preparação de homogeneizado de cérebro e rim de cobaio

O cérebro e os rins foram picados e homogeneizados, em banho de gelo, em 6 volumes de EDTA-Tris 5mM, pH 7,4. Uma parte foi diluída 40x para ser utilizada no microensaio e o restante estocado para posterior dosagem de proteínas (Item 3.5).

3.3 Microensaio para a determinação da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase

Para a determinação da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase foi utilizado o protocolo descrito por Burth *et al.* (1997), onde os microensaios foram realizados em microplacas de ELISA com volume final de incubação de 120 μ L contendo 110mM NaCl, 20mM KCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, pH 7,6, preparação de enzima (adicionada em todos os ensaios correspondendo sempre a uma atividade de 0,12 - 0,15 μ mol de Pi formado por hora) e 5mM de ATP. Para a medida da atividade da Mg⁺² ATPase incluiu-se, também, ouabaína (concentração final 3,6mM). Essa mistura, não contendo ATP, foi pré-incubada a 37°C por 10 minutos. A reação foi, então, iniciada pela adição de 10 μ L de solução 60mM ATP (ajustada a pH 7,6 com Tris) e paralisada, após 40 minutos, com 100 μ L de suspensão de carvão ativado

(isento de fosfato) a 20% em ácido nítrico 0,3N. A determinação do Pi liberado foi feita colorimetricamente (Espectrofotômetro Micronal – modelo B582) a 380 nm, 15 minutos após adição do reagente molibdato/vanadato (4/1).

Curvas padrão com concentrações adequadas de fosfato (0,01 – 0,1 μ mol) e brancos (onde a enzima só era adicionada após a paralização da reação) foram corridos simultaneamente. A atividade da Na⁺, K⁺ ATPase foi determinada pela diferença entre a atividade ATPásica total e a da Mg⁺² ATPase.

3.3.1 Cinética da inibição da Na⁺, K⁺ ATPase pelos monoterpenos POH e PA

Para os ensaios de avaliação do efeito dos monoterpenos sobre a Na⁺ K⁺ ATPase cerebral e renal, as substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração de monoterpenos testada variou de 0,25 a 5mM e a de ouabaína de 0 a 0,0125 mM no meio de incubação. Brancos com cada concentração dos inibidores foram feitos, assim como controles com e sem o solvente DMSO. Comparou-se, então, a atividade da enzima com e sem a presença de inibidores, calculando-se, assim, a porcentagem de inibição. A concentração de DMSO no meio de incubação nunca excedeu a 0,8 %, não interferindo na atividade enzimática.

3.3.2 Cinética da inibição da Na⁺, K⁺ ATPase purificada de cérebro e rim por POH em função das concentrações de Na⁺, K⁺ e ATP

Para a realização de cada teste, foi adicionado ao tampão de incubação diferentes concentrações de NaCl (20; 40; 60; 80 e 110mM), KCl (0,75; 2,5; 10; 20; 40; 80 e 100mM) ou ATP (0,8; 1,6; 2,5; 3,3 e 5mM). A concentração de POH nesses experimentos foi mantida na concentração fixa de 1mM para a enzima Na⁺, K⁺ ATPase de origem cerebral e de 1,5mM para a enzima Na⁺, K⁺ ATPase de origem renal, concentrações essas capazes de inibir 50% a atividade enzimática.

O procedimento utilizado para a determinação da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase cerebral e renal purificada sob estas condições foi o mesmo que o descrito anteriormente.

3.4 Microensaio para a determinação do efeito do POH sobre a atividade da p-nitrofenilfosfatase ativada por K⁺

Para a determinação da atividade fosfatásica da Na⁺, K⁺ ATPase (p-nitrofenilfosfatase) ativada por K⁺ (conformação E2) (Figura 2), utilizou-se p-nitrofenilfosfato como substrato (Arnaiz et al., 2003). Os microensaios foram realizados em microplacas de ELISA, volume final de incubação de 200µL contendo 200mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 20mM KCl (controle) ou 1mM ouabaína (para a medida da atividade da Mg⁺²p-nitrofenilfosfatase), preparação de enzima (correspondendo a uma atividade de 0,08 – 0,1µmol de p-nitrofenol formado por hora) e POH (em várias concentrações de 0,5 a 2,5mM). Essa mistura foi pré-incubada a 37°C por 10 minutos. A reação foi então, iniciada pela adição de 10mM de p-nitrofenil (em 0,8M Tris-HCl pH 7,4) e paralisada após 10 minutos, com 50µL de NaOH

0,5M. A determinação do produto, p-nitrofenol, liberado foi feita colorimetricamente (Espectrofotômetro Micronal – modelo B582) a 420nm, imediatamente após a adição de NaOH.

Para os ensaios de avaliação do efeito do POH sobre a p-nitrofenilfosfatase (cerebral e renal), as substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO). Brancos com cada concentração dos inibidores foram feitos, assim como controles com e sem o solvente DMSO. Comparou-se, então, a atividade da enzima com e sem a presença de inibidores, calculando-se, assim, a porcentagem de inibição. A concentração de DMSO no meio de incubação nunca excedeu a 0,8 %, não interferindo na atividade enzimática.

Curvas padrão com concentrações adequadas de p-nitrofenol e brancos (onde a enzima só era adicionada após a paralização da reação) foram corridos simultaneamente. A atividade da p-nitrofenilfosfatase dependente de K^+ foi determinada pela diferença entre a atividade total (controle) e a da Mg^{+2} p-nitrofenilfosfatase.

3.5 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais das diversas preparações foi determinada segundo o método de Peterson (1977), o qual é uma modificação do método clássico de Lowry, adequado para a dosagem de proteínas de membrana. Soluções de albumina bovina (0,2mg/mL) foram utilizadas como padrões.

3.6 Determinação da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase em cultura de células da linhagem A172 de GBM humano

3.6.1 Manutenção das células

A linhagem celular A172, derivada de glioblastoma multiforme humano, cedida pelo Dr. Clóvis Orlando da Fonseca (UFF), foi mantida em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, em garrafas de poliestireno (TPP) com meio DMEM F12 (Invitrogen), acrescido de 10 % de soro fetal bovino (Invitrogen) previamente inativado a 56°C por 1 hora. O meio também continha 100 U/mL de penicilina (Invitrogen), 100 U/mL de estreptomicina (Invitrogen) e 2,25g/L de NaHCO₃. As células eram repicadas duas vezes por semana, em fluxo laminar (Tox - Modelo FLV – Série 491) previamente limpo com álcool 70% e iluminado por luz UV por 30 minutos. Após desprezar o meio, as células eram lavadas por duas vezes com PBS/EDTA (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, 0,03mM EDTA, pH 7,4 ajustado com HCl) e mantidas por 5 minutos com tripsina (Invitrogen) 0,25% a 37°C. Após a soltura total das células, meio de cultura era adicionado e as células repicadas na concentração de 2×10^4 células/cm².

3.6.2 Determinação da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase em cultura de células da linhagem A172 pela captação de Rb⁺

A determinação da atividade ATPásica em células foi realizada segundo Gill e colaboradores (2004), onde foi possível quantificar a concentração de Rb⁺, o qual mimetiza o K⁺, incorporado pelas células.

No dia anterior ao ensaio, uma placa de 24 poços (TPP) foi preenchida com 3×10^5 células/poço, para que as células pudessem aderir à placa. No dia do ensaio, todo o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados 1 vez com 1,5mL/poço de PBS 1x. Após a lavagem, foi adicionado 1,2mL/poço de solução de Hanks (NaCl 136,9mM, MgSO₄ 0,8mM, NaHCO₃ 5mM, Na₂HPO₄ 0,33mM, NaH₂PO₄ 0,44mM, CaCl₂ 1,5mM, Glicose 3mM, Hepes 5mM e RbCl 5,4mM) com POH nas concentrações de 0,5 a 6mM, com DMSO a 0,4% ou com ouabaína 0,5mM. As células então, foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 30 minutos. Decorrido este tempo, os poços foram lavados 3 vezes com 1,5mL de PBS 1x. Após o término da terceira lavagem, foi adicionado 0,6mL/poço de SDS 0,15% para lisar as células. Uma alíquota de cada amostra foi encaminhada para a quantificação do Rb⁺. A quantificação do Rb⁺ foi realizada no Instituto de Química da UFF, em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Santelli, utilizando o aparelho ICP-OES fornecido pela Jobin Yvon (Longjumeau, França).

3.6.3 Avaliação da viabilidade celular

O efeito citotóxico do POH foi avaliado através do teste colorimétrico utilizando o corante vermelho neutro (Reagen), segundo Borenfreund e Puerner (1985). O ensaio avalia a capacidade de células vivas reterem o corante vermelho neutro adicionado ao meio de cultura.

Neste ensaio foi utilizada uma modificação na metodologia descrita no item 3.6.2, onde após os 30 minutos de incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 1,5mL de PBS 1x. Terminada a terceira lavagem, as células foram incubadas com 1mL/poço de meio de cultura contendo o corante vermelho neutro (50µg/mL) por 3 horas, a 37 °C. Após este período, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x e adicionou-se 0,7mL de solução de descoloração (1% de ácido acético, 50% de etanol e 49% de água destilada) às culturas tratadas, e estas foram mantidas sob agitação por 10 minutos até o total rompimento das células e solubilização do corante. O conteúdo da placa foi repassado para uma placa de 96 poços a fim de fazer-se a leitura no leitor de microplacas (Thermo Plate, modelo TP – Reader) e obter-se a densidade óptica a 545nm, possibilitando a determinação do potencial citotóxico das concentrações de POH testadas em relação ao controle tratado com o veículo DMSO. Os ensaios foram realizados em seis replicatas, e cada experimento repetido duas vezes. Foram utilizados controles negativos com DMSO e sem DMSO, além do controle contendo ouabaína.

3.7 Análise estatística

A análise estatística, assim como os gráficos foram feitos utilizando-se o Programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad software Inc. EUA). A existência de diferenças significativa entre dois grupos foi estabelecida pelo teste de t de *Student*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do POH e do PA na atividade da Na⁺, K⁺ ATPase purificada de rim e cérebro de cobaio

Inicialmente (Figura 6), mostramos que os monoterpenos POH e PA inibem preparações purificadas de Na⁺, K⁺ ATPase a partir de rim (contendo basicamente a isoforma α_1) e de cérebro (onde predominam as isoformas α_2 e α_3) de cobaio. Nota-se que as curvas de inibição obtidas por POH e PA para as duas fontes de enzima, respondem de maneira dose dependente. Com relação ao POH, a inibição máxima foi alcançada na faixa de concentração de 5mM para ambas enzimas, enquanto que o IC₅₀ para as enzimas cerebrais e renais foram de 1mM e 1,5mM respectivamente, indicando uma menor sensibilidade da isoforma α_1 pelo POH ($p < 0,05$). O PA mostrou uma capacidade inibitória inferior ao POH ($p < 0,05$), mesmo na mais alta concentração testada (10mM), não atingindo uma inibição máxima em nenhuma das isoformas.

Devido ao baixo índice de inibição da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase encontrado pelo monoterpeno PA, os resultados dos experimentos a seguir foram obtidos apenas com o monoterpeno POH.

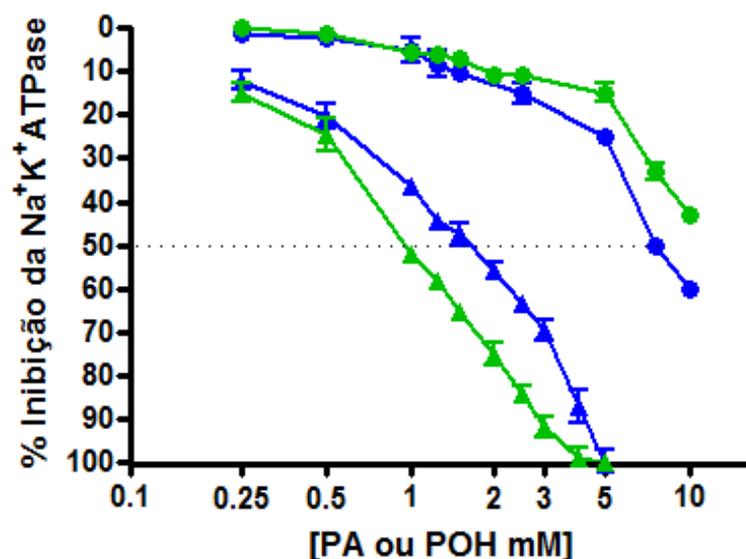


Figura 6: Inibição de Na⁺, K⁺ ATPases purificadas.

Na⁺, K⁺ ATPases purificadas de cérebro (círculos e triângulos verdes) e rim de cobaio (círculos e triângulos azuis) pelos monoterpenos: PA (círculos) e POH (triângulos). Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos ± o desvio padrão.

4.2 Efeito do POH sobre a atividade da Na⁺, K⁺ ATPase de homogeneizado de rim e cérebro de cobaio

Com o objetivo de avaliarmos o grau de especificidade do POH para a enzima Na⁺, K⁺ ATPase, construímos as curvas de inibição deste monoterpeno também em homogeneizados totais dos órgãos estudados, como mostram as Figuras 7 e 8. O POH inibiu a atividade da Na⁺, K⁺ ATPase, presente em homogeneizado de rim, de maneira bastante similar em relação à enzima purificada, com um IC₅₀ em torno 1,5mM. Para o homogeneizado de cérebro, o IC₅₀ ficou em aproximadamente 2,5mM (Figura 7).

Ainda em relação à especificidade do POH pela Na⁺, K⁺ ATPase, avaliamos a capacidade de inibição dessa droga sobre a atividade de Mg⁺² ATPases. O POH demonstrou ser capaz de inibir a atividade destas enzimas somente em concentrações elevadas (Figura 8). Juntos,

estes resultados (Figuras 7 e 8) indicam certo grau de especificidade do POH para a Na^+ , K^+ ATPase, em especial, pela isoforma renal.

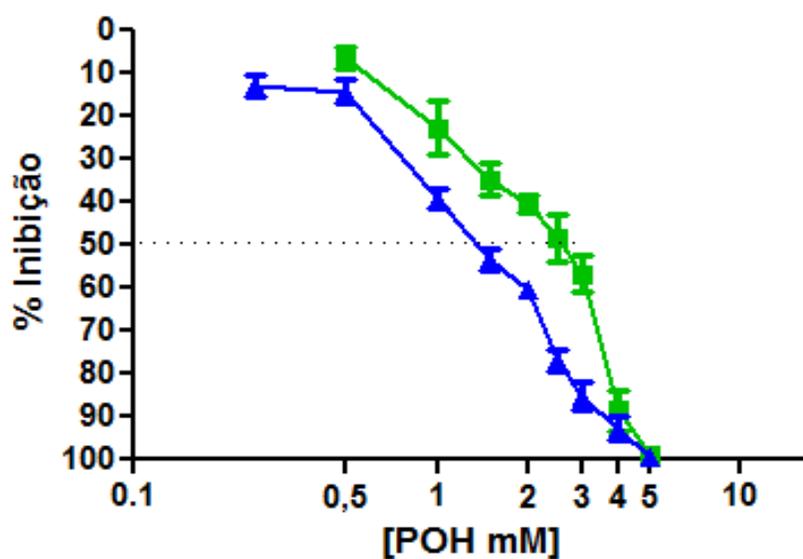


Figura 7: Inibição de Na^+ , K^+ ATPases de homogeneizados.

Na^+ , K^+ ATPases de homogeneizados de cérebro (quadrados verdes) e rim de cobaio (triângulos azuis) pelo POH. Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos \pm o desvio padrão.

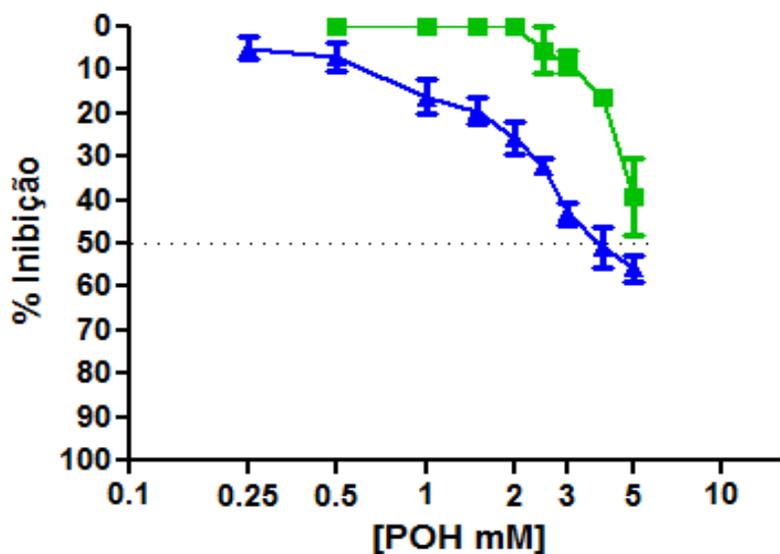


Figura 8: Inibição de Mg^{+2} ATPases de homogeneizados.

Mg^{+2} ATPases de homogeneizados de cérebro (quadrados verdes) e rim de cobaio (triângulos azuis) pelo POH. Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos \pm o desvio padrão.

4.3 Efeito da variação das concentrações de Na^+ , K^+ e ATP sobre a cinética de inibição da atividade da Na^+ , K^+ ATPase purificada de rim e cérebro de cobaio em presença de POH

Com o intuito de verificarmos a presença de uma possível competição do POH com algum dos substratos da enzima Na^+ , K^+ ATPase, realizamos curvas de concentração de Na^+ , K^+ e ATP em presença do inibidor POH nas concentrações de 1mM, para enzima cerebral e de 1,5mM, para enzima renal, concentrações correspondentes aos IC_{50} , respectivamente.

4.3.1 Variação na concentração de Na^+

As Figuras 9 e 10 (enzima cerebral) e 11 e 12 (enzima renal) mostram as velocidades de reação das duas enzimas purificadas em função da concentração do íon Na^+ , em presença ou ausência de POH. Pela avaliação dos gráficos de duplo recíproco (Figuras 10 e 12), fica claro que, tanto para as formas cerebrais quanto renais, o tipo de inibição do POH é não competitivo.

4.3.2 Variação na concentração de K^+

Com relação ao íon K^+ , como é classicamente sabido, a velocidade máxima é alcançada na concentração de 20mM de KCl no meio de incubação e concentrações maiores inibem a atividade, como pode ser visto nas Figuras 13 (enzima cerebral) e 15 (renal). Os gráficos do tipo duplo recíproco (Figuras 14 e 16) mostram que a inibição, em relação ao K^+ , também é de natureza não competitiva.

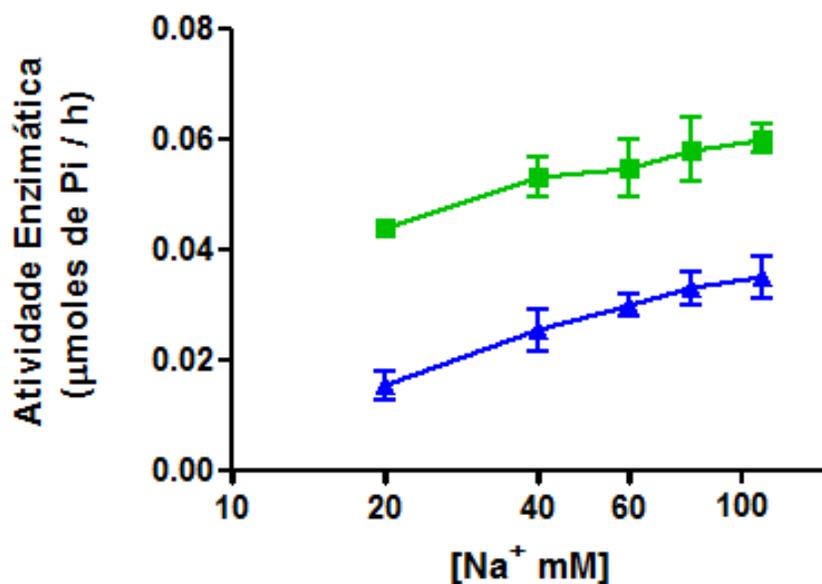


Figura 9: Curva de ativação por Na⁺ - Na⁺, K⁺ ATPase cerebral. Na⁺, K⁺ ATPase cerebral sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1mM (triângulos azuis). Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos \pm o desvio padrão.

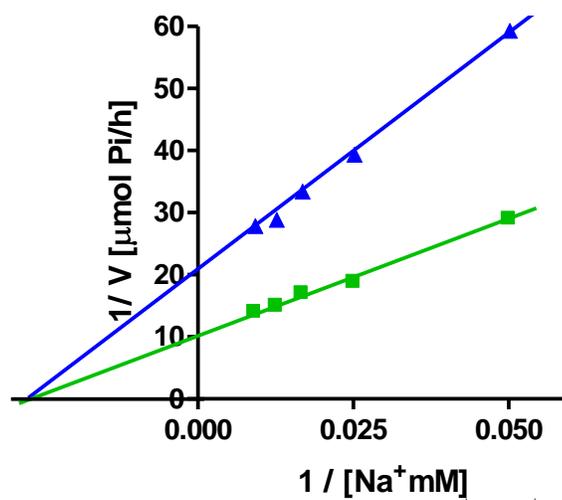


Figura 10: Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por Na⁺ - Na⁺, K⁺ ATPase cerebral. Na⁺, K⁺ ATPase cerebral sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1mM (triângulos azuis).

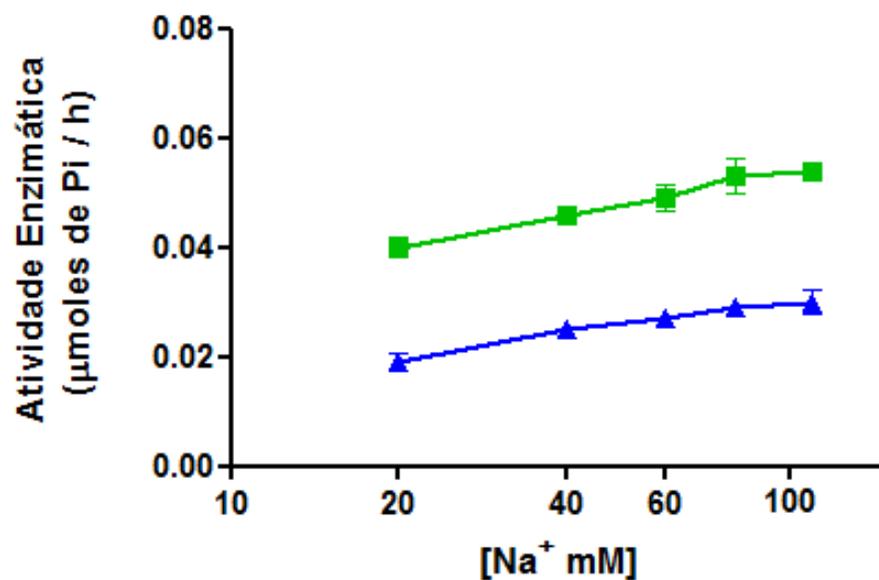


Figura 11: Curva de ativação por Na⁺ - Na⁺, K⁺ ATPase renal. Na⁺, K⁺ ATPase renal sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1,5mM (triângulos azuis). Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos \pm o desvio padrão.

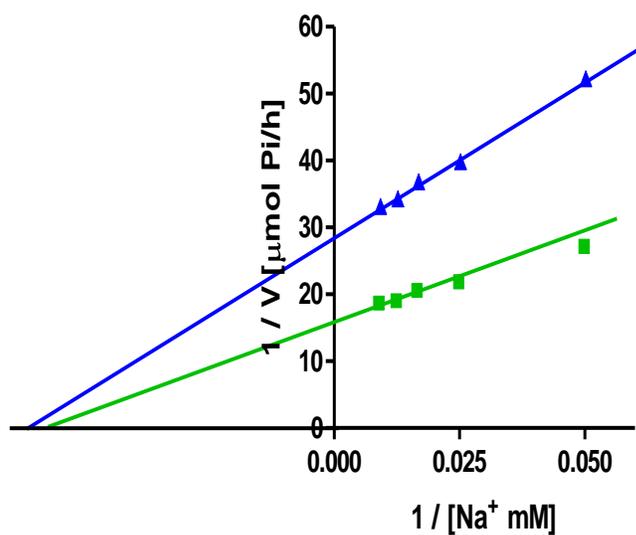


Figura 12: Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por Na⁺ - Na⁺, K⁺ ATPase renal. Na⁺, K⁺ ATPase renal sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1,5mM (triângulos azuis).

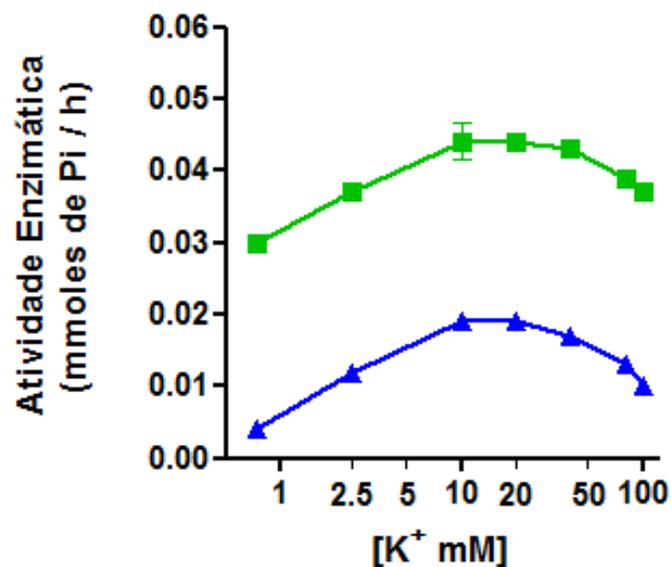


Figura 13: Curva de ativação por K⁺ - Na⁺, K⁺ ATPase cerebral. Na⁺, K⁺ ATPase cerebral sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1mM (triângulos azuis). Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos \pm o desvio padrão.

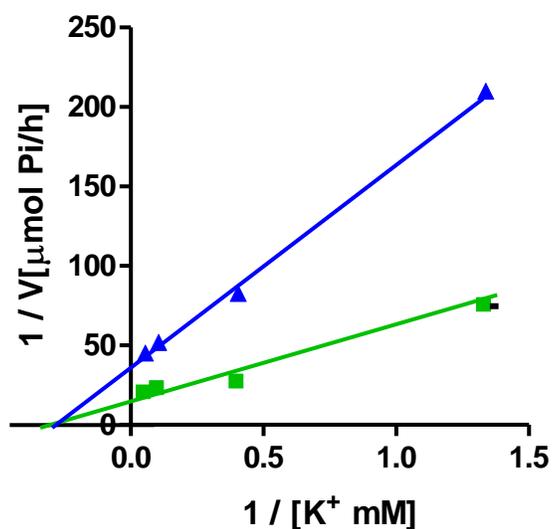


Figura 14: Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por K⁺ - Na⁺, K⁺ ATPase cerebral. Na⁺, K⁺ ATPase cerebral sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1mM (triângulos azuis).

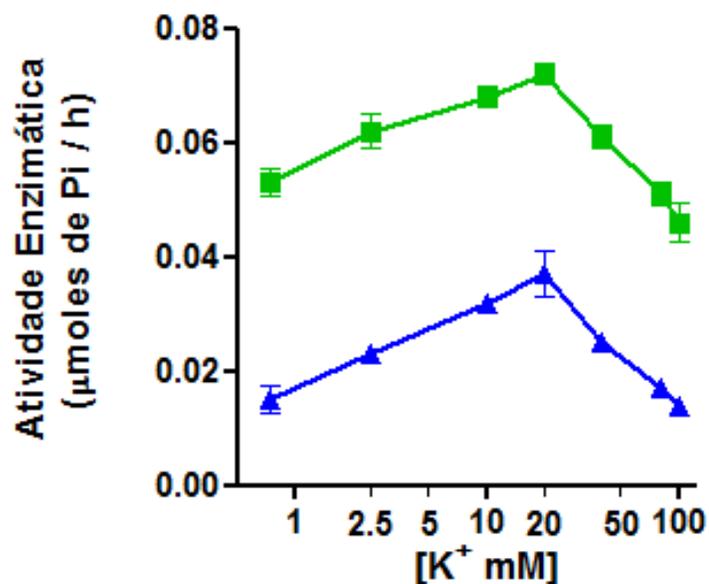


Figura 15: Curva de ativação por K⁺ - Na⁺, K⁺ ATPase renal. Na⁺, K⁺ ATPase renal sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1,5mM (triângulos azuis). Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos ± o desvio padrão.

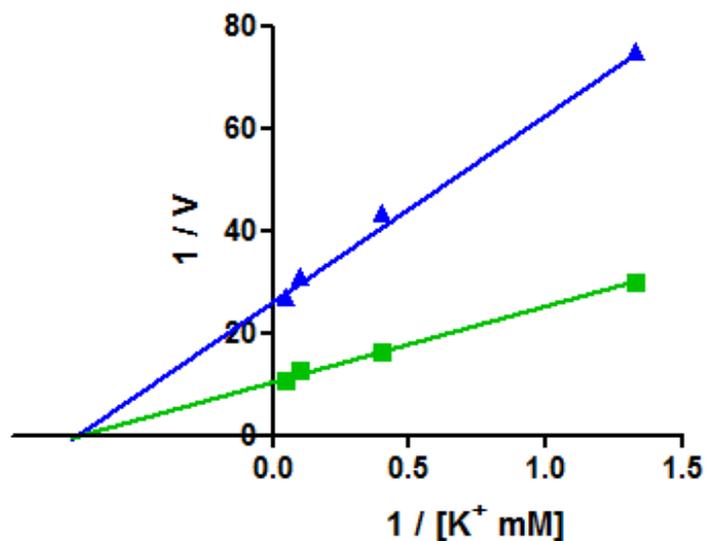


Figura 16: Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por K⁺ - Na⁺, K⁺ ATPase renal. Na⁺, K⁺ ATPase renal sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1,5mM (triângulos azuis).

4.3.3 Variação na concentração de ATP

Para o substrato ATP, tanto para enzima cerebral (Figuras 17 e 18) quanto para a renal (Figuras 19 e 20) o tipo de inibição foi acompetitivo.

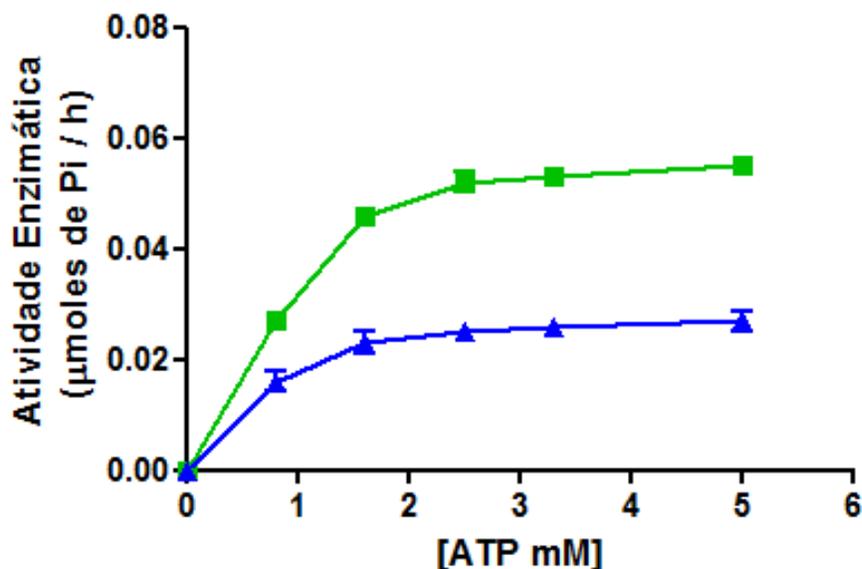


Figura 17: Curva de ativação por ATP - Na^+ , K^+ ATPase cerebral. Na^+ , K^+ ATPase cerebral sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1mM (triângulos azuis). Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos \pm o desvio padrão.

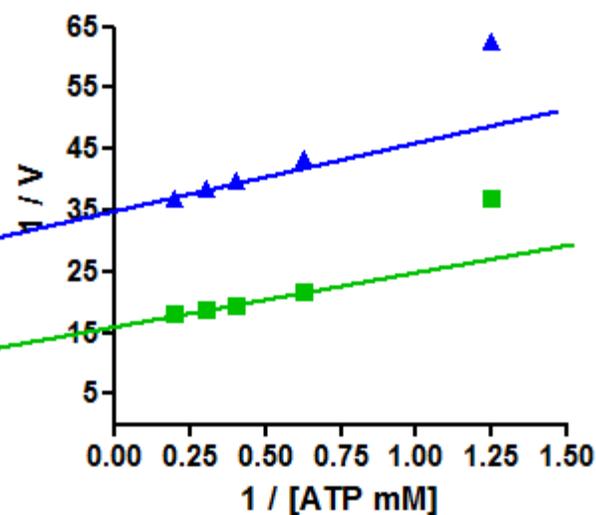


Figura 18: Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por ATP - Na^+ , K^+ ATPase cerebral. Na^+ , K^+ ATPase cerebral sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1mM (triângulos azuis).

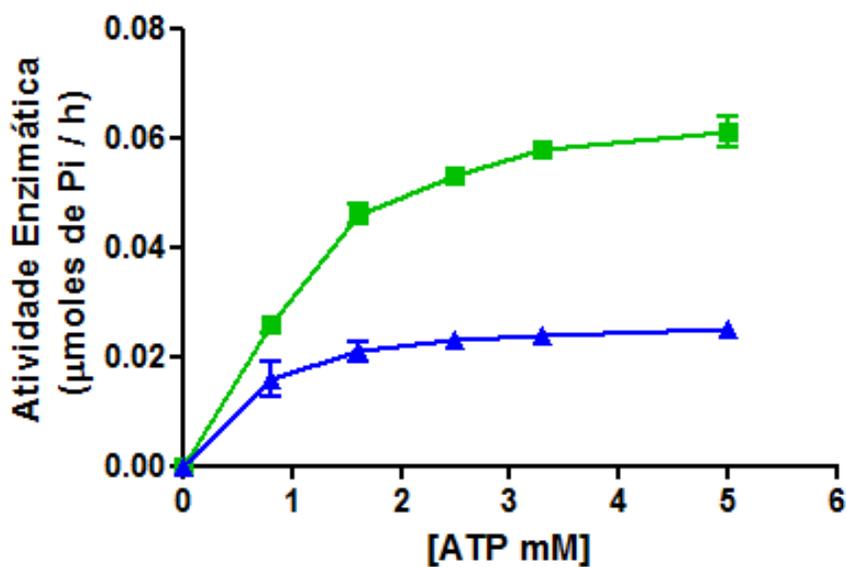


Figura 19: Curva de ativação por ATP - Na^+ , K^+ ATPase renal. Na^+ , K^+ ATPase renal sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1,5mM (triângulos azuis). Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos \pm o desvio padrão.

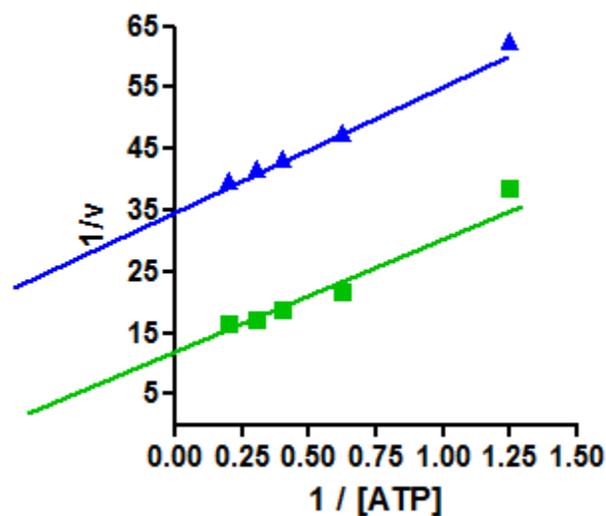


Figura 20: Gráfico Duplo Recíproco da Curva de ativação por ATP - Na^+ , K^+ ATPase renal. Na^+ , K^+ ATPase renal sem POH (quadrados verdes) e em presença de POH 1,5mM (triângulos azuis).

4.4 Efeito do POH na atividade da p-nitrofenilfosfatase ativada por K^+

A atividade enzimática correspondente a p-nitrofenilfosfatase ativada por K^+ de preparações purificadas de Na^+ , K^+ ATPase (ou K^+ p-NPPase) é uma medida da atividade da 2ª etapa, ativada por K^+ , da Na^+ , K^+ ATPase. Podemos ver na Figura 21 que esta fosfatase é pouco sensível ao POH, tanto para enzima cerebral quanto para a renal, indicando que o mecanismo de ação desse inibidor não parece estar associado a uma interferência nesta 2ª fase da bomba Na^+ , K^+ .

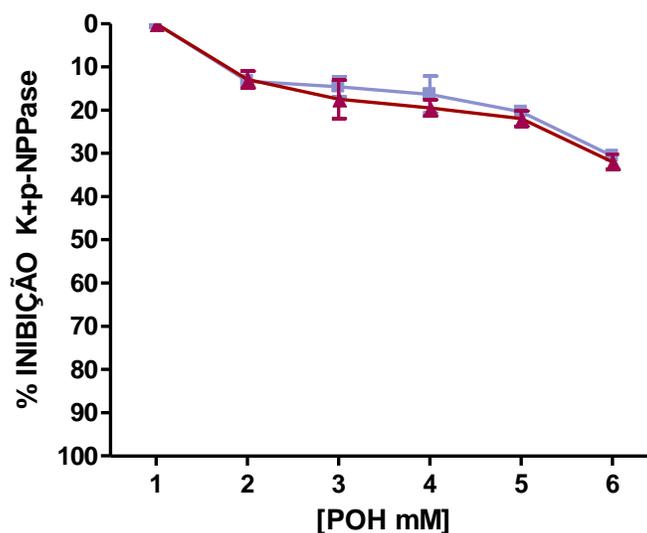


Figura 21: Efeito do POH sobre a atividade K^+ p-NPPásica de Na^+ , K^+ ATPases. Atividade K^+ p-NPPásica de Na^+ , K^+ ATPases purificadas de rim (quadrado azul) e de cérebro (triângulo vermelho). Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos \pm o desvio padrão.

4.5 Determinação da atividade da Na^+ , K^+ ATPase em cultura de células da linhagem A172 pela captação de Rb^+

4.5.1 Relação do número de células e captação de Rb^+

Para encontrarmos a concentração ideal de células a serem usadas no trabalho, fizemos um experimento preliminar no qual variou-se o número de células/poço e mediu-se a captação de Rb^+ em um tempo fixo de 60 minutos de incubação. Os resultados mostraram que a incorporação desse íon foi diretamente proporcional à quantidade de células até, pelo menos, a quantidade de 4×10^5 células por poço. Escolhemos o ponto de 3×10^5 células/poço para a realização dos experimentos seguintes, pois nessa condição houve sensibilidade para detecção de Rb^+ .

4.5.2 Padronização do tempo de incubação e concentração de ouabaína na captação de Rb^+

Para encontrarmos uma faixa de concentração de Rb^+ , captado pelas células, sensível ao aparelho utilizado para a quantificação deste íon, fizemos também uma curva de captação de Rb^+ em função da concentração de ouabaína em diferentes intervalos de tempo (Figura 22). Escolhemos o intervalo de 30 minutos e a concentração de ouabaína de 0,5 mM para a realização dos experimentos seguintes, pois nessa condição verificamos que a atividade enzimática relativa à Na^+ , K^+ ATPase era completamente inibida.

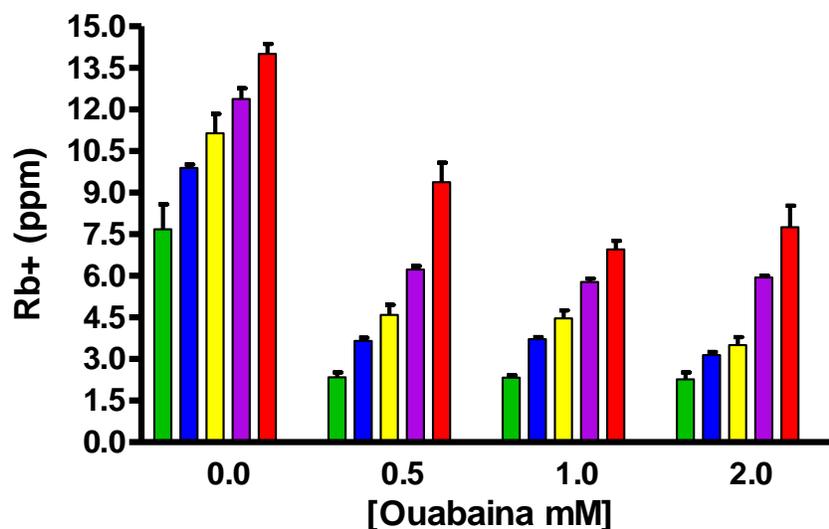


Figura 22: Curva de captação de Rb^+ em função da concentração de ouabaína em diferentes intervalos de tempo.

30 minutos (verde), 45 minutos (azul), 60 minutos (amarelo), 90 minutos (roxo) e 120 minutos (vermelho). Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos \pm o desvio padrão.

4.5.3 Efeito do POH na atividade da Na^+ , K^+ ATPase em cultura de células da linhagem A172 pela captação de Rb^+

O efeito do POH sobre a incorporação de Rb^+ , comparado com o da ouabaína está mostrado na figura 23. Como pode ser visto no gráfico, existe cerca de 48% de incorporação que é insensível à ouabaína, representando uma entrada do íon através de canais passivos de transporte (Gill *et al.*, 2004; Santos, 2009). Na realidade, a atividade da Na^+ , K^+ ATPase corresponde à porção sensível a ouabaína, ou seja, a diferença entre a incorporação total e a ouabaína insensível. Essa mesma figura (B) mostra a inibição, pelo POH da Na^+ , K^+ ATPase destas células, a partir dos dados obtidos no gráfico A. O IC_{50} calculado é em torno de 1,5 mM.

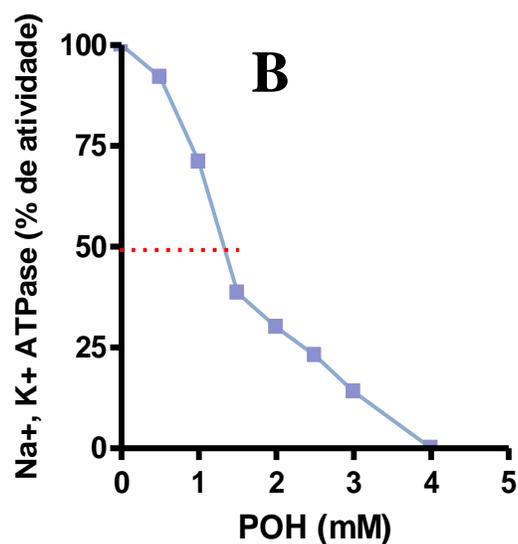
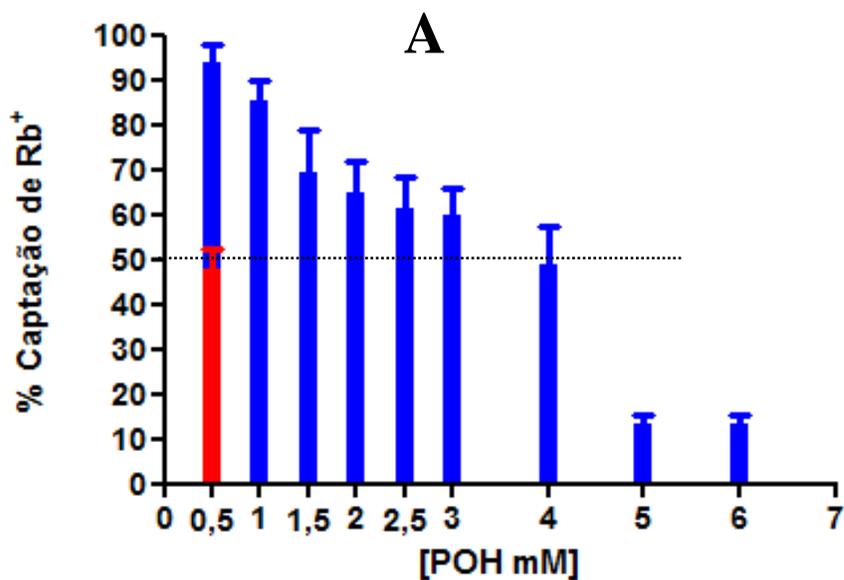


Figura 23: (A) Captação de Rb⁺, em 30 minutos.

Células da linhagem A172 em presença de ouabaína 0,5mM (em vermelho) e em diferentes concentrações de POH (em azul). Cada ponto é a média de, pelo menos, 3 experimentos \pm o desvio padrão.

(B) Efeito inibitório do POH sobre a atividade da Na⁺, K⁺ ATPase.

Calculado pela diferença entre as médias totais e ouabaína insensíveis definidas no gráfico A.

4.6 Efeito do POH na viabilidade celular de células da linhagem A172

Para averiguar se o efeito da inibição da captação do Rb^+ era consequência da morte das células o experimento descrito em 4.5.3 foi feito em replicata e a viabilidade celular, medida através da incorporação do corante vermelho neutro, em presença de diferentes concentrações de POH ou de ouabaína na concentração de 0,5mM (Figura 24). O POH só diminuiu significativamente a viabilidade dessas células em concentrações de 4mM ou acima. Nessa condição, 100% da atividade da Na^+ , K^+ ATPase está inibida. A ouabaína, na concentração usada, não promoveu alteração na viabilidade celular.

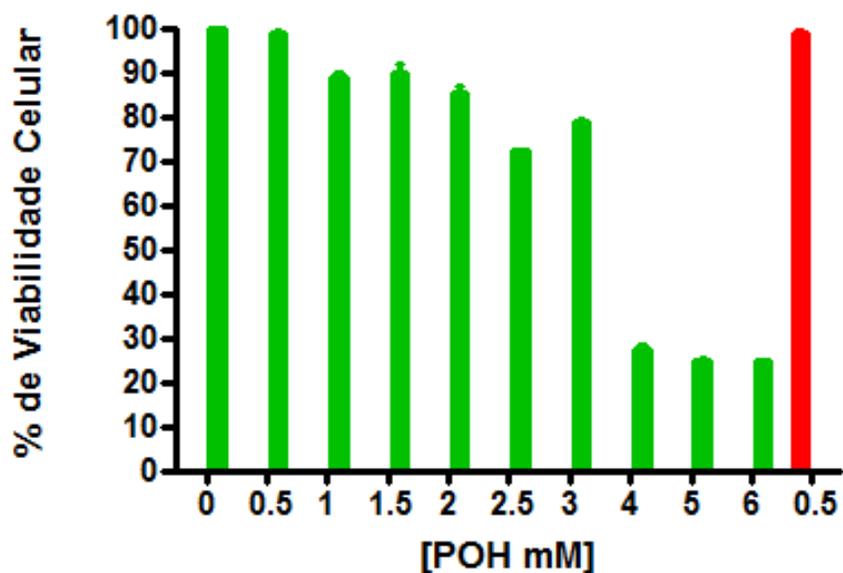


Figura 24: Viabilidade celular das células da linhagem A172. Células da linhagem A172 em presença de ouabaína 0,5mM (em vermelho) e em diferentes concentrações de POH (em verde), após 30 minutos de incubação. Cada ponto é a média de 3 experimentos \pm o desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

Mostramos, pela primeira vez, que o álcool perílico (POH), substância capaz de induzir apoptose em células de glioblastoma humano (Fernandes *et al.*, 2005), é um inibidor da Na⁺, K⁺ ATPase. Sua potência inibitória é na ordem de 10³ vezes menor que a do inibidor específico clássico ouabaína, para os mesmos tipos de Na⁺, K⁺ ATPases purificadas usadas no presente trabalho (Garcia *et al.*, 2009). Um de seus metabólitos, no entanto, o ácido perílico, é, apenas, um inibidor extremamente fraco. Estudos de especificidade do POH para com as diversas isoformas da subunidade α da Na⁺, K⁺ ATPase parecem mostrar que ele possui menor afinidade, porém maior especificidade para a subunidade α_1 do que para α_2 e α_3 , pois, suas capacidades inibitórias permaneceram praticamente as mesmas para a enzima renal (α_1), quer purificada (IC₅₀ cerca de 1,5mM) ou em homogeneizado total do órgão (IC₅₀ também em torno de 1,5 mM), o que não ocorreu em relação as isoformas predominantes no cérebro (α_2 e α_3). A comparação entre as diferenças nas taxas de inibição encontradas entre a forma purificada e a bruta da enzima é uma importante indicação de especificidade, já que, caso existissem outras moléculas ligantes de POH no homogeneizado, haveria, logicamente, uma diminuição do efeito inibidor sobre a Na⁺, K⁺ ATPase. No entanto, as atividades de Mg⁺²ATPases do tecido renal foram afetadas, embora em concentrações bem mais elevadas da substância. Podemos, portanto, sugerir que o POH possui um grau elevado de especificidade para a isoforma α_1 . Cabe ressaltar que o IC₅₀ do homogeneizado de tecido renal para a

ouabaína, considerada um inibidor específico da Na^+ , K^+ ATPase, foi cerca de 1,2 vezes maior do que para a mesma enzima purificada (Garcia *et al.*, 2009).

O estudo cinético que mediu o papel do POH (em concentração fixa) sobre as alterações da atividade da Na^+ , K^+ ATPase em função da variação da concentração de substratos e cofatores (Na^+ , K^+ e ATP) mostrou um efeito não competitivo em relação aos íons Na^+ e K^+ , e incompetitivo em relação ao ATP. Considerando as duas fases (I e II) do ciclo de atividade da Na^+ , K^+ ATPase e, levando em conta que a p-nitrofenilfosfatase ativada por K^+ (que representa a atividade da fase II) é muito pouco sensível ao POH (como mostra a Figura 21), podemos propor que essa droga atue, ao contrário da ouabaína, na fase I do ciclo. Tal ciclo inicia-se com a ligação do ATP seguido da fosforilação da enzima pelo ATP, ativada pela presença de Na^+ , liberando ADP. Nessa situação, uma inibição não competitiva em relação ao Na^+ não seria incompatível com o mesmo tipo de inibição em relação ao K^+ (que ativa a fase II). Em relação ao ATP, que é o primeiro ligante da enzima na fase I, poderia ser esperado um tipo incompetitivo. Esse tipo caracteriza-se pelo fato de que o inibidor liga-se, apenas, ao complexo substrato-enzima. Assim sendo, seria primeiramente necessária a formação do complexo enzima - ATP para que o efeito inibitório pudesse se passar quando da ligação ao Na^+ , acarretando uma diminuição da fosforilação da enzima de uma forma não competitiva e, conseqüentemente, inibindo, também, a fase II. Nossos resultados não garantem que haja uma interação direta da enzima com o POH, ou seja, que algum sítio da enzima esteja diretamente envolvido. É muito possível que essa interação se passe com o microambiente lipídico que envolve a enzima, mesmo em sua forma purificada. Talvez isto possa explicar por que o PA, molécula menos hidrofóbica, não tenha as mesmas propriedades inibitórias.

Tendo em vista que o modelo em célula em cultura traz inúmeras vantagens para o estudo de compostos que possam atuar por interações com a Na^+ , K^+ ATPase, padronizamos, inicialmente, a dosagem dessa enzima em células da linhagem A172 de GBM humano, um dos tumores que tem sido investigado quanto a sensibilidade ao POH. Sabe-se que nesses tumores existe uma super expressão da subunidade α_1 da Na^+ , K^+ ATPase, situada na estrutura das cavéolas e provavelmente responsável pelo papel sinalizador atribuído a essa enzima, especialmente em relação a mecanismos apoptóticos, de migração e de proliferação celulares (Lefranc *et al.*, 2008; Lefranc e Kiss, 2008). Nossos resultados, baseados na avaliação da atividade da Na^+ , K^+ ATPase por incorporação de íon Rb^+ , um substituto do K^+ , mostraram uma sensibilidade à inibição pelo POH (IC_{50} aproximadamente 1,5mM) similar a vista para a enzima purificada de rim, órgão que expressa apenas a subunidade α_1 . Se calcularmos o volume das 3×10^5 células usadas por poço (sem que fosse descontado o volume das organelas), baseando-nos na informação de que células de glioblastoma humano possuem um volume de cerca de $3,95 \times 10^{-15} \text{L}$ (Ross *et al.*, 2007), podemos transformar a atividade calculada pela incorporação de Rb^+ em quantidade de Pi formado por hidrólise de ATP (transporte de 2Rb^+ por ATP hidrolisado). Cálculos aproximados mostraram que a atividade da enzima Na^+ , K^+ ATPase de células da linhagem A172 de GBM usada em nossos experimentos foi menos de 2 vezes a da enzima renal purificada. Como os IC_{50} para POH de ambas são similares, isto é um reforço ao fato de que as isoformas encontradas nesses dois tipos de células sejam as mesmas (α_1).

Embora o mecanismo de ação do POH não esteja elucidado, foi sugerido que essa droga diminui a síntese ou aumenta a degradação da proteína RAS, inibindo, em consequência, a proliferação celular (Hohl e Lewis, 1995; Stayrook *et al.*, 1998). Alguns

dados indicam que o POH induz apoptose em linhagens de glioblastoma humano (Fernandes *et al.*, 2005), além de inibir a migração celular em glioblastomas de roedores (Balassiano *et al.*, 2002). Neste ponto, é importante enfatizar que inibidores da Na^+ , K^+ ATPase, como os glicosídeos cardíacos, podem também, dependendo da concentração, produzir efeitos similares (Xie e Cai, 2003; Kulikov *et al.*, 2007; Prassas e Diamandis, 2008).

Comparando o grau de inibição da Na^+ , K^+ ATPase e a viabilidade das células de glioblastoma (Figuras 23 e 24), verificamos que, nas concentrações de POH próximas ao IC_{50} (1,5 mM), a viabilidade é igual a do controle, decaindo rapidamente em concentrações superiores a 3,0 mM, quando 100% da enzima está inibida. Em doses elevadas, acima de 4mM, a incorporação total de Rb^+ sofreu uma drástica redução, associada a grande diminuição de viabilidade, indicando que, provavelmente, houve uma intensa destruição celular.

Não existem evidências de que os metabólitos do POH, como o ácido perílico (PA), rapidamente formados no organismo após administração de POH, exibam as mesmas propriedades do POH (Azzoli *et al.*, 2003). É interessante notar que o PA também não é eficiente inibidor da Na^+ , K^+ ATPase, talvez em função de sua menor hidrofobicidade.

As doses de POH aplicadas a pacientes em condições experimentais variam na faixa de gramas/m² de superfície corporal por dia, em varias doses, por via oral (Azzoli *et al.*, 2003) e na ordem de 220mg/dia, divididos em 4 doses por via intranasal (Da Fonseca *et al.*, 2008). No entanto, os baixos valores plasmáticos de POH não podem ser medidos com precisão, apenas os níveis de seus metabólitos (PA e ácido diidroperílico) são detectáveis, talvez em função da rápida degradação do POH (Bailey *et al.* 2004). Dessa forma, torna-se difícil uma comparação com nossos dados, no intuito de avaliar se as concentrações plasmáticas atingidas poderiam

estar exercendo efeito inibitório sobre a Na^+ , K^+ ATPase dos pacientes. Cálculos bastante genéricos, considerando as altas doses empregadas, poderiam sugerir que sim. É curioso notar que as doses terapêuticas usadas de POH são bastante superiores às usadas para glicosídeos cardíacos, com a mesma finalidade (Lopes-Lazaro *et al.*, 2005).

Em resumo, podemos dizer que o POH é um inibidor que apresenta certa especificidade especialmente para a isoforma α_1 da Na^+ , K^+ ATPase, considerada como mediadora de mecanismos de transdução de sinais. Considerando os fatos já discutidos, cabe, agora, formular experimentos que possam definir se o POH, da mesma forma que os glicosídeos cardíacos em diferentes concentrações, pode também atuar sobre as diversas cascatas de sinalização, moduladas via Na^+ , K^+ ATPase, que comandam o crescimento e/ou a morte celulares.

Um outro importante aspecto que necessita investigação refere-se a modelagem química da molécula do POH, pois a introdução de grupamentos químicos em sua molécula, alterando propriedades físico-químicas, como por exemplo, a polaridade, podem também acarretar importantes mudanças no efeito biológico.

6 CONCLUSÃO

- O POH é um inibidor da Na^+ , K^+ ATPase, com potência inibitória na ordem de 10^3 vezes menor que a do inibidor específico clássico ouabaína. Um dos metabólitos do POH, o PA, é um inibidor extremamente fraco;
- O POH possui maior especificidade para a subunidade α_1 (renal) do que para as isoformas predominantes no cérebro α_2 e α_3 , embora a isoforma renal tenha uma sensibilidade menor (IC_{50} de 1,5mM) do que as presentes no cérebro (IC_{50} de 1,0 mM), efeito semelhante ao dos glicosídeos cardíacos;
- Estudos cinéticos mostraram um efeito do POH não competitivo em relação aos íons Na^+ e K^+ e incompetitivo em relação ao ATP; esses dados, juntamente com a insensibilidade da p-nitrofenilfosfatase ativada por K^+ ao POH, apontam para o fato de que essa droga atua na fase inicial (fase I) do ciclo catalítico da Na^+ , K^+ ATPase, ao contrário dos glicosídeos cardíacos;
- A determinação da atividade da Na^+ , K^+ ATPase em células de GBM humano por incorporação de íon Rb^+ , um substituto do K^+ , mostrou-se reprodutível, revelando

sensibilidade à inibição pelo POH (IC_{50} aproximadamente 1,5mM) similar a vista para a enzima purificada de rim, órgão que expressa apenas a subunidade α_1 ;

- Estudos adicionais são necessários para avaliar se o POH, da mesma forma que os glicosídeos cardíacos, pode também atuar sobre as diversas cascatas de sinalização, moduladas via Na^+ , K^+ ATPase, que comandam as funções celulares envolvidas na diferenciação e na morte celular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRIEL, H.; HASLER, U.; GEERING, K. AND HORISBERGER, J.D. 1999. Role of the intracellular domain of the β subunit in Na^+, K^+ pump function. *Biochim et Biophys Acta*. 1418(1): 85-96.
- AIZMAN, O., UHLEN, P., LAL, M., BRISMAR, H. AND APERIA, A. 2001. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 98(23): 13420-4.
- ALBERS, R.W. 1967. Biochemical aspects of active transport. *Annu Rev Biochem* 36: 727–56.
- APERIA, A. 2007. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med*. 261(1): 44-52.
- APPEL, C.; GLOOR, S.; SCHMALZING, G.; SCHACHNER, M. AND BERNHARDT, R.R. 1996. Expression of a Na^+, K^+ -ATPase beta 3 subunit during development of the zebrafish central nervous system. *J Neurosci Res*. 46(5): 551-64.
- ARNAIZ, G.R.L.; HERBIN, T. AND PEÑA, C. 2003. A comparative study between a brain Na^+, K^+ -ATPase inhibitor (endobain E) and ascorbic acid. *Neurochem Res*. 28(6): 903-10.
- AZZOLI, C.G.; MILLER, V.A.; NG K.K.; KRUG, L.M.; SPRIGGS, D.R.; TONG, W.P.; RIEDEL, E.R. AND KRIS, M.G.A. 2003. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 51(6): 493- 8.
- BAILEY, H.H.; WILDING, G; TUTSCH, K.D., ARZOOMANIAN, R.Z.; ALBERTI, D. FEIERABEND, C.; SIMON, K.; MARNOCHA, R.; HOLSTEIN, S.A.; STEWART, J.; LEWIS, K.A. AND HOHL, R.J. 2004. A phase I trial of perillyl alcohol administered

- four times daily for 14 days out of 28 days. *Cancer Chemother Pharmacol.* 54(4): 368-76.
- BALASSIANO, I.T.; DE PAULO, S.A.; SILVA, N.H.; CABRAL, M.C.; GIBALDI, D.; BOZZA, M.; DA FONSECA, C.O. AND CARVALHO, M.G.C. 2002. Effects of perillyl alcohol in glial C6 cell line in vitro and anti-metastatic activity in chorioallantoic membrane model. *Intern J Mol Med.* 10: 785-88.
- BARLET-BAS, C.; ARYSTARKHOVA, E.; CHEVAL, L.; MARSY, S.; SWEADNER, K.; MODYANOV, N. AND DOUCET, A. 1993. Are there several isoforms of Na⁺, K⁺-ATPase α subunit in the rabbit kidney? *J Biol Chem.* 268(16): 11512-5.
- BÉGUIN, P.; WANG, X.; FIRSOV, D.; PUOTI, A.; CLAEYS, D.; HORISBERGER, J.D. AND GEERING, K. 1997. The gamma subunit is a specific component of the Na⁺, K⁺-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* 16(14): 4250-60.
- BELANGER, J.T., 1998. Perillyl alcohol: applications in oncology. *Altern Med Rev.* 3(6): 448-57.
- BORENFREUND, E. AND PUERNER, J.A. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 24(2-3): 119-24.
- BLANCO, G. AND MERCER, R.W. 1998. Isozymes of the Na⁺, K⁺-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* 275(5): 633-50.
- BLANCO, G.; SANCHEZ, G. AND MERCER, R.W. 1998. Differential regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isozymes by protein kinases and arachidonic acid. *Arch Biochem Biophys.* 359(2): 139-50.
- BLANCO, G.; SANCHEZ, G.; MELTON, R. J.; TOURTELLOTTE, W.G. AND MERCER, R.W. 2000. The alpha 4 isoform of the Na⁺, K⁺-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. *J Histochem Cytochem.* 48(8): 1023-32.
- BOIK, J. 2001. Natural compounds in cancer therapy. 1st ed. *Oregon Medical Press.* Princeton, Minnesota, U.S.A.

- BUCKALEW, V. M. 2005. Endogenous digitalis-like factors. An historical overview. *Front Biosci.* 10: 2325-34.
- BURTH, P. 1997. Uma contribuição ao estudo da fisiopatologia da leptospirose: propriedades, purificação e identificação de inibidores da Na⁺, K⁺ ATPase presentes em endotoxina de *Leptospira interrogans*. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 130p. Tese de Doutorado em Ciências, Rio de Janeiro.
- BURTH, P.; YOUNES-IBRAHIM, M.; GONÇALVES, F.H.; COSTA, E.R. AND CASTRO FARIA, M.V. 1997. Purification and characterization of a Na⁺, K⁺ ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 65(4): 1557-60.
- CORTES, V.F.; VEIGA-LOPES, F.E.; BARRABIN, H.; ALVES-FERREIRA, M. AND FONTES, C.F.L. 2006. The γ subunit of Na⁺, K⁺ ATPase: Role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(11): 1901-13.
- DA FONSECA, C.O.; LANDEIRO, J.A.; CLARK, S.S.; QIRICO-SANTOS, T.; CARVALHO, M.G.C. AND GATTASS, C.R. 2006a. Recent advances in the molecular genetics of malignant gliomas disclose targets for antitumor agent perillyl alcohol. *Surg Neurol.* 65 suppl 1: S1:2-1: 8; discussion S1: 8-1:9.
- DA FONSECA, C.O.; MASINI, M.M.; FUTURO, D.; CAETANO, R.; GATTASS, C.R. AND QUIRICO-SANTOS, T. 2006b. Anaplastic oligodendroglioma responding favorably to intranasal delivery of perillyl alcohol: a case report and literature review. *Surg Neurol.* 66: 611-5.
- DA FONSECA, C.O.; FISCHER, J.S.G.; MASINI, M.M.; FUTURO, D.; CAETANO, R.; GATTASS, C.R. AND QUIRICO-SANTOS, T. 2007. Oligodendrogliomas: a genética molecular e o desenvolvimento de estratégia terapêutica adjuvante. *Arq Bras Neurocir.* 26(1): 8-15.
- DA FONSECA, C.O.; SCHWARTSMANN, G.; FISCHER, J.; NAGEL, J.; FUTURO, D.; QUIRICO-SANTOS, T. AND GATTASS, C.R. 2008. Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. *Surg Neur.* 70(3): 259-66.

- FERNANDES, J.; DA FONSECA, C.O.; TEIXEIRA, A. AND GATTASS, C.R. 2005. Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. *Oncol Rep.* 13: 943-7.
- GARCIA, D.G.; BIANCO, E.M.; SANTOS, M.D.; PEREIRA, R.C.; FARIA, M.V.; TEIXEIRA, V.L. AND BURTH, P. 2009. Inhibition of mammal Na(+)-K(+)-ATPase by diterpenes extracted from the Brazilian brown alga *Dictyota cervicornis*. *Phytother Res.* 23: 943-7.
- GELB, M.H.; TAMANOI, F.; YOKOYAMA, K.; GHOMASHCHI, K.E. AND GOULD, M.N. 1995. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. *Cancer Lett.* 91: 169-75.
- GILL, S.; GILL, R.; WICKS, D.; DESPOTOVSKI, S. AND LIANG, D. 2004. Development of an HTS assay for Na⁺, K⁺ -ATPase using nonradioactive rubidium ion uptake. *Assay Drug Dev Technol.* 2(5): 535-42.
- HAAS, M., ASKARI, A. AND XIE, Z. 2000. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺, K⁺ -ATPase. *J Biol Chem.* 275: 27832-37.
- HAUPTMAN, P.J. AND KELLY, R.A. 1999. Digitalis. *Circulation.* 99(9): 1265-70.
- HOHL, R.J. AND LEWIS, K. 1995. Differential effects of monoterpenes and lovastatin on Ras processing. *J Biol Chem.* 270: 17580-12.
- HOLSTEIN, S.A. AND HOHL, R. 2003. Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. *J Lipid Res.* 44(6): 1209-15.
- HUDES, G.R.; SZARKA, C.E.; ADAMS, A.; RANGANATHAN, S.; MCCAULEY, R.A.; WEINER, L.M. AND GALLO, J.M. 2000. Phase I pharmacokinetic trial of perillyl alcohol in patients with refractory solid malignancies. *Clin Cancer Res.* 6: 3071- 80.
- JAITOVICH, A.A. AND BERTORELLO, A.M. 2006. Na⁺, K⁺ -ATPase: An indispensable ion pumping – signaling mechanism across mammalian cell membranes. *Semin Nephrol.* 26(5): 386-92.

- JØRGENSEN, P.L. 1977. Purification and characterization of (Na⁺, K⁺)-ATPase. III. Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dodecylsulphate. *Biochim Biophys Acta*. 356: 36-52.
- JØRGENSEN, P.L. 1982. Mechanisms of the Na⁺, K⁺ pump-protein structure and conformations of the pure (Na⁺, K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 694: 27-68.
- JØRGENSEN, P.L. 1986. Structure, function and regulation of Na⁺, K⁺ -ATPase in the kidney. *Kidney Int*. 29: 10-20.
- KAPLAN, J.H. 2002. Biochemistry of Na⁺, K⁺ ATPase. *Annu Rev Biochem*. 71: 511-35.
- KÖKSOY, A.A. 2002. Na⁺, K⁺ ATPase: A review. *J Ankara Med School*. 24(2): 73-82.
- KOMETIANI, P.; LIU, L. AND ASKARI, A. 2005. Digitalis-induced signaling by Na⁺, K⁺ ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharm*. 67(3): 929-36.
- KÜHLBRANDT, W. 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(4):282-95.
- KULIKOV, A.; EVA, A.; KIRCH, U.; BOLDYREV, A. AND SCHEINER-BOBIS, G. 2007. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochim et Biophys Acta*. 1768: 1691-1702.
- LEFRANC, F. AND KISS, R. 2008. The sodium pump α 1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. *Neoplasia*. 10(3): 198-206.
- LEFRANC, F.; MIJATOVIC, T.; SAUVAGE, S.; ROLAND, I.; DEBEIR, O.; KRSTIC, D.; VASI, V.; GAILLY, P.; KONDO, S; BLANCO, G. AND KISS, R. 2008. Targeting the α 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. *Neurosurgery*. 62(1): 211-22.
- LI, Z. AND XIE, Z. 2008. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades. *Pflugers Arch*. 457(3): 635-44.

- LIANG, M.; TIAN, J.; PIERRE, S.; LIU, J.; SHAPIRO, J. AND XIE, Z. 2007. Identification of pool of non-pumping Na/K-ATPase. *J Biol Chem.* 282(14): 10585-93.
- LIU, L.; MOHAMMADI, K.; AYNASHAR, B.; WANG, H.; LI, D.; LIU, J.; IVANOV, A.V.; XIE, Z. AND ASKARI, A. 2003. Role of caveola in signal-transducing function of Na⁺, K⁺ ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284: C1550-60.
- LOPEZ-LAZARO, M.; PASTOR, N.; AZRAK, S.S.; AYUSO, M.J.; AUSTIN, C.A. AND CORTÉS, F. 2005. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *J Nat Prod.* 68: 1642-5.
- LOUIS, D.N.; HOLLAND, E.C. AND CAIRNCROSS, J.G. 2001. Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol.* 159(3): 779-86.
- LOUIS, D.N. 2006. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol.* 1: 97-117.
- LOUTRARI, H.; HATZIAPOSTOLOU, M.; SKOURIDOU, V.; PAPADIMITRIOU, E.; ROUSSOS, C.; KOLISIS, F.N. AND PAPAPETROPOULOS, A. 2004. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. *J Pharm Exper Therap.* 311(2): 568-75.
- MACGREGOR, S.E. AND WALKER, J.M. 1993. Inhibitors of the Na⁺, K⁺ -ATPase. *Comp Biochem Physiol.* 105C(1): 1-9.
- MATOS, J.M.; SCHMIDT, C.M.; THOMAS, H.J.; CUMMINGS, O.W.; WEIBKE, E.A.; MADURA, J.A.; PATRICK, L.J. AND CROWELL, P.L. 2008. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. *J Surg Res.* 147: 194-9.
- MCGARVEY, D.J. AND CROTEAU, R. 2005. Terpenoid metabolism. *Planta Cell.* 7(7): 1015-26
- MIJATOVIC, T.; VAN QUAQUEBEKE, E.; DELEST, B.; DEBEIR, O.; DARRO, F. AND KISS, R. 2007. Cardiotonic steroids on the road to anticancer therapy. *Biochem et Biophys Acta.* 1776: 32-57.

- MIJATOVIC, T.; INGRASSIA, L.; FACCHINI, V. AND KISS, R. 2008. Na, K-ATPase α subunits as new targets in anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 12(11): 1403–17.
- MIYAKAWA-NAITO, A.; UHLÉN, P.; LAL, M. AIZMAN, O.; MIKOSHIBA, K.; BRISMAR, H.; ZELENIN, S. AND APERIA, A. 2003. Cell signaling microdomain with Na,K-ATPase and Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor generates calcium oscillations. *J Biol Chem*. 278(50): 50355–61.
- MOBASHERI, A.; AVILA, J.; CÓZAR-CASTELLANO, I.; BROWNLEADER, M.D.; TREVAN, M.; FRANCIS, M.J.O.; LAMB, J.F. AND MARTÍN-VASALLO, P. 2000. Na,K-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Reports*. 20(2): 51–91.
- NAKADA, M.; NAKADA, S.; DEMUTH, T.; TRAN, N.L.; HOELZINGER, D.B. AND BERENS, M.E. 2007. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci*. 64: 458–78.
- OHGAKI, H.; DESSEN, P.; JOURDE, B.; HORSTMANN, S.; NISHIKAWA, T. AND PATRE, P. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 64(19): 6892-9.
- OHGAKI, H. AND KLEIHUES, P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 170(5): 1445-53.
- PANAYIOTIDIS, M.I.; BORTNER, C.D.; AND CIDLOWSKI, J.A. 2006. On the mechanism of ionic regulation of apoptosis: Would the Na⁺/K⁺ ATPase please stand up? *Acta Physiol (Oxf)*. 187(1/2): 205-15.
- PETERSON, G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 83: 346-56.
- PIERRE, S. AND XIE, Z. 2006. The Na⁺, K⁺ ATPase receptor complex: Its organization and membership. *Cell Biochem Biophys*. 16: 303-15.

- PRASSAS, I. AND DIAMANDIS, E.P. 2008. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov.* 7: 926-35.
- PREISS, R., BANASCHAK, H. 1979. Na,K-ATPase in excitation-contraction coupling of vascular smooth muscle from cattle. *Acta Biol Med Ger.* 38(1): 83-96.
- RAJESH, D.; STENZEL, R.A. AND STEVEN, P.H. 2003. Perillyl alcohol as a radio-/chemosensitizer in malignant glioma. *J Biol Chem.* 278(38): 35968-78.
- RIPPLE, G.H.; GOULD, M.N.; ARZOOMANIAN, R.Z.; ALBERTI, D.; FEIERABEND, C.; SIMON, K.; BINGER, K.; TUTSCH, K.D.; POMPLUN, M.; WAHAMAKI, A.; MARNOCHA, R.; WILDING, G. AND BAILEY, H.H. 2000. Phase I clinical and pharmacokinetic study of perillyl alcohol administered four times a day. *Clin Cancer Res.* 6: 390-6.
- ROSE, A.M. AND VALDES Jr., R. 1994. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin Chem.* 40(9): 1674-85.
- ROSS, S.B.; FULLER, C.M.; BUBIEN, J.K. AND BENOS, D.J. 2007. Amiloride-sensitive Na⁺ channels contribute to regulatory volume increases in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293: C1181-5.
- SAKAI, H.; SUZUKI, T.; MAEDA, M.; TAKAHASHI, Y.; HORIKAWA, N.; MINAMIMURA, T.; TSUKADA, K. AND TAKEGUCHI, N. 2004. Up-regulation of Na⁺, K⁺ ATPase α 3-isoform and down-regulation of the α 1-isoform in human colorectal cancer. *FEBS Lett.* 563: 151-4.
- SANTOS, M.C.B.; BURTH, P.; YOUNES-IBRAHIM, M.; GONÇALVES, C.F.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P. AND CASTRO-FARIA, M.V. 2009. Na/K-ATPase assay in the intact guinea pig liver submitted to *in situ* perfusion. *Anal Biochem.* 385(1): 65-8.
- SCHWINGER, R. H. G., BUNDGAARD, H, MÜLLER-EHMSSEN, J. AND KJELDSEN, K. 2003. The Na⁺, K⁺ ATPase in the failing human heart. *Cardiov Res.* 57: 913-20.

- SHEN, S.S.; HAMAMOTO, S.T.; BERN, H.A. AND STEINHARDT, R.A. 1978. Alteration of sodium transport in mouse mammary epithelium associated with neoplastic transformation. *Cancer Res.* 38: 1356-61.
- SKOU, J.C. 1957 The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem Biophys Acta.* 23: 394-401.
- SKOU, J.C. 1965. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. *Physiol Rev.* 45: 596-617.
- SKOU, J.C. 2004. The identification of the sodium pump. *Biosci Reports.* 24(4/5): 437-51.
- STAYROOK, K.R.; MCKINZIE, J.H.; BARBHAIYA, L.H. AND CROWELL, P.L. 1998. Effects of the antitumor agent perillyl alcohol on H-Ras vs. KRas farnesylation and signal transduction in pancreatic cells. *Anticancer Res.* 18: 823-8.
- STEARNS, V.; COOP, A.; SINGH, B.; GALLAGHER, A.; YAMAUCHI, H.; LIEBERMAN, R.; PENNANEN, M.; TROCK, B.; HAYES, D.F. AND ELLIS, M.J. 2004. A pilot surrogate end point biomarker trial of perillyl alcohol in breast neoplasia. *Clin Cancer Res.* 10: 7583-91.
- STENKVIST, B. 1999. Is digitalis a therapy for breast carcinoma? *Oncol Rep.* 6: 493-6
- THERIEN, A.G. AND BLOTEIN. 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(3): C541-66.
- THERIEN, A.G.; PU, H.P.; KARLISH, S.J.D. AND BLOSTEIN, R. 2001. Molecular and functional studies of the gamma subunit of the sodium pump. *J Bioenerg Biomem Bol* 33(5): 407-14.
- VESCOVI, A.L.; GALLI, R. AND REYNOLDS, B.A. 2006. Brain Tumor Stem Cells. *Nat Rev Cancer.* 6: 425-36.
- WANG, H.; HAAS, M.; LIANG, M.; CAI, T.; TIAN, J.; LI, S. AND XIE, Z. 2004. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na⁺, K⁺-ATPase. *JBiol Chem.* 279(17): 17250-9.

- WASSERSTROM, J.A. AND AISTRUP, G.L. 2005. Digitalis: new actions for an old drug. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289(5): H1781-93.
- WEIDEMANN, H. 2005. Na⁺, K⁺ ATPase, endogenous digitalis-like compounds and cancer development – a hypothesis. *Frontiers in Biosci.* 10: 2165-76.
- WINNICK, K.; BIELAWSKI, K. AND BIELAWSKI, A. 2006. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. *Acta Pol Pharm.* 63: 109-15.
- XIE, Z. AND CAI, T. 2003. Na⁺, K⁺ ATPase mediated signal transduction: From protein interaction to cellular function. *Mol Interventions.* 3(3): 157-64.
- XU, M.; FLOYD, H.S.; GRETH, S.M.; CHANG, W.L.; LOHMAN, K.; STOYANOVA, R.; KUCERA, G.L.; KUTE, T.E.; WILLINGHAM, M.C. AND MILLER, M.S. 2004. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. *Toxicol Applied Pharm.* 195: 232-46.
- YERUVA, L.; PIERRE, K.J.; ELEGBEDE, A.; WANG, R.C. AND CARPER, S.W. 2007. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptose in non small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* 257(2): 216-26.
- YU, S.P. 2003. Na⁺, K⁺ ATPase: The new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochim Pharm.* 66: 1601-9.
- YUAN, Z., CAI, T., TURNER, D., GIOVANNUCCI, D. AND XIE, Z. 2003. Sodium pump as a signal transducer: Proteomic identification of ouabain activated signaling modules. *Biophys J.* 83: 267a.
- YURI, T.; DANBARA, N.; TSUJITA-KYUTOKU, M.; KIYOZUKA, Y.; SENZAKI, H.; SHIKATA, N.; KANZAKI, H. AND TSUBURA, A. 2004. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Res Treat.* 84: 251-60.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)