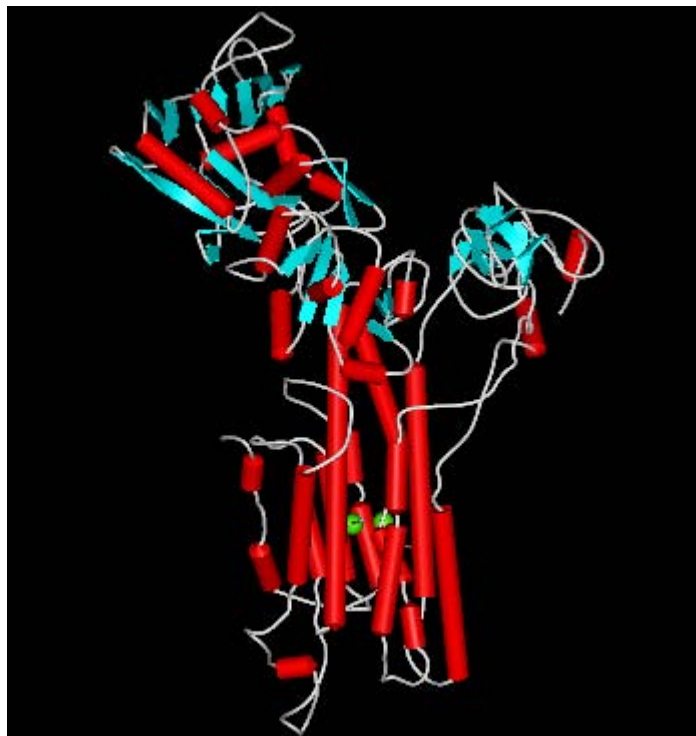


Tese de Estágio Curricular de Licenciatura em Bioquímica



Monitorização da actividade bioelectroquímica da Bomba de Cálcio de Retículo Sarcoplasmático

Autor: Miguel Jorge Rodrigues Guerreiro

Orientador: Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves

Prof. Doutor Henrique Leonel Gomes

Prof. Doutora Leonor Cancela

Faro, Janeiro de 2003

“Research consists in seeing what everyone else has seen and thinking what no one else has thought.”

- Anonymous

“If we knew what we were doing, it wouldn't be called research, would it?”

- Albert Einstein (1879-1955)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer...

...aos meus pais pelo apoio incondicional nos momentos bons e maus...

...aos meus familiares também pelo seu apoio...

...aos meus amigos pelos momentos de lazer que me proporcionaram...

...aos professores pelo que me ensinaram...

...a todos os que estiveram lá quando precisei e que me ajudaram a ser quem sou hoje...

Abreviaturas

ACh – acetilcolina;

ADP – adenosina difosfato;

AM – complexo actina-miosina;

ATP – adenosina trifosfato;

BSA – albumina de soro bovino, do inglês “**Bovine Serum Albumine**”;

Ca²⁺-ATPase – bomba de cálcio de Retículo Sarcoplasmático;

FET – transístor de efeito de campo, do inglês “**Field-Effect Transistor**”;

F-actina – actina filamentosa (oligómero de G-actina);

G-actina – actina globular (forma monomérica da actina);

IC₅₀ – concentração inibitória de 50% (inibe 50% da actividade enzimática);

RS – retículo sarcoplasmático (organelo existente no músculo estriado);

P/P_i – fosfato inorgânico (PO₄³⁻);

RMN – ressonância magnética nuclear;

SDS-PAGE – electroforese desnaturante, do inglês “**PolyAcrylamide Gel Electrophoresis**”;

V_n – oligómeros de vanádio presentes nas soluções utilizadas: metavanadato (n<10) e decavanadato (n=10);

VRS – vesículas de Retículo Sarcoplasmático;

Vsa13/Vsa16 – linhas celulares de células derivadas de osso de *Sparus aurata* (dourada);

1. Resumo

Neste trabalho foram isoladas vesículas contendo uma proteína, a Ca^{2+} -ATPase, a partir do músculo esquelético de *Halobatrachus dydactylus*. Essas vesículas foram testadas quanto à sua capacidade de ejeção de prótons, acoplada à translocação de Ca^{2+} (que por sua vez está acoplada à hidrólise de ATP), utilizando um novo método mais rápido e mais preciso de monitorização. O novo sistema, acoplado a um computador pessoal correndo um programa especificamente desenvolvido para o efeito (utilizando a linguagem de programação LabVIEW 5.0), permitiu observar a ejeção de prótons por estas vesículas, bem como o efeito de um potente inibidor de P-ATPases, o vanádio. Comparando os resultados obtidos com estudos anteriores (Aureliano, M. e Madeira, V.M.C., 1994)^[1] utilizando VRS de *Oryctolagus cuniculus*, foi possível determinar que estas vesículas eram menos eficientes na ejeção de H^+ / acumulação de Ca^{2+} (com um valor médio de 24,2 contra 35 $\text{nmol H}^+ \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, sendo também mais susceptíveis à acção inibitória dos vanadatos. Numa segunda fase, foram estudadas células derivadas de osso de *Sparus aurata* (linhas celulares Vsa13 e Vsa16), as quais apresentavam um comportamento semelhante às VRS, i. é, acumulavam Ca^{2+} ejectando prótons, como foi verificado neste estudo. Também se verificou existir uma diferença funcional entre as duas linhas, já que as Vsa16 apresentavam uma maior ejeção de H^+ / acumulação de Ca^{2+} face às Vsa13.

2. Índice

Agradecimentos	3
Abreviaturas.....	4
1. Resumo	5
2. Índice	6
3. Objectivo	7
4. Introdução.....	8
4.1. Tecidos musculares	8
4.2. O tecido muscular esquelético.....	9
4.3. Mecanismo da contracção muscular.....	11
4.4. A bomba de Cálcio.....	14
4.5. O vanádio.....	16
4.6. Field-Effect Transistors (FET's).....	18
5. Materiais e Métodos	20
5.1. Isolamento de VRS a partir do músculo esquelético de <i>Halobatrachus dydactylus</i>	20
5.1.1. Material:.....	20
5.1.2. Procedimento:.....	21
5.2. Quantificação pelo método do biureto	22
5.2.1. Material	22
5.2.2. Procedimento.....	23
5.3. Electroforese SDS-PAGE	24
5.3.1. Material	24
5.3.2. Procedimento.....	25
5.4. Ensaios potenciométricos	26
5.4.1. Material	26
5.4.2. Procedimento.....	26
6. Resultados e Discussão	29
6.1. Estudos em VRS	29
6.1.1. Quantificação pelo método do Biureto	29
6.1.2. SDS-PAGE.....	30
6.1.3. Ejeção de H ⁺ pela Ca ²⁺ -ATPase.....	31
6.1.4. Efeitos dos oligómeros de vanádio presentes nas soluções de metavanadato e decavanadato.....	33
6.1.5. Efeitos dos oligómeros de vanádio na ejeção de H ⁺ pela Ca ²⁺ -ATPase	35
6.1.6. Comparação entre efeitos dos oligómeros presentes nas soluções de metavanadato e decavanadato	37
6.2. Estudos em osteoblastos de <i>Sparus aurata</i> (linhas celulares Vsa13 e Vsa16)	38
6.2.1. Ejeção de H ⁺ pelas células Vsa13 e Vsa16	38
6.2.2. Ejeção de H ⁺ pelas células Vsa13 (controlos).....	39
6.2.3. Ejeção de H ⁺ pelas células Vsa16 (controlos).....	40
6.2.4. Resposta ao ATP pelos osteoblastos Vsa13 e Vsa16	42
7. Conclusão	44
8. Perspectivas Futuras	45
9. Bibliografia.....	46

3. Objectivo

O objectivo deste trabalho foi, primariamente constituir um estudo da função de acumulação de Ca^{2+} no RS (pela Ca^{2+} -ATPase) em *Halobatrachus dydactylus* e efeito de um metal de transição (mais especificamente vanádio) na actividade de ejeção de H^+ desta enzima. Secundariamente, transpôr os estudos anteriores para células derivadas de osso de *Sparus aurata*, de modo a permitir uma possível aplicação a este método de um dispositivo desenvolvido recentemente. Os “microelectrode arrays” são capazes de detectar variações ínfimas em células, pelo que se tornam dispositivos óptimos para este tipo de estudos não invasivos.

4. Introdução

4.1. Tecidos musculares

A maior parte das actividades que levamos a cabo no nosso quotidiano baseiam-se na utilização da força muscular. O nosso corpo é maioritariamente constituído por músculos, existindo, no organismo, três tipos distintos de tecido muscular: liso, cardíaco e esquelético, sendo estes dois últimos subtipos de músculo estriado. Os músculos lisos estão associados aos movimentos involuntários do corpo (movimentos peristálticos no tubo digestivo, contracção dos vasos sanguíneos, etc.); o músculo cardíaco, tal como o nome indica, existe exclusivamente no miocárdio sendo responsável pelo batimento cardíaco; por último o músculo esquelético está associado aos movimentos voluntários do corpo (caminhar, respirar, falar, etc.). Existem diferenças morfológicas, estruturais e funcionais entre os três tipos de tecido muscular. O músculo liso é controlado, como já foi referido, involuntariamente (por estímulos hormonais, neurotransmissores, controle neurogénico ou mesmo por alterações induzidas na própria célula), a sua morfologia é a de células alongadas, sem evidenciar bandas (ou estrias) como nos músculos estriados. O músculo cardíaco é controlado por uma célula *pacemaker* (controlo neurogénico), sendo as células de forma tubular com ramificações que interligam várias células. Este estudo debruça-se sobre o funcionamento do músculo esquelético, pelo que pormenores acerca da constituição e mecanismo dos outros tecidos musculares não serão aprofundados.

Introdução

4.2. O tecido muscular esquelético

O músculo esquelético é formado por fascículos, os quais são compostos de fibras musculares. Estas fibras musculares são, por sua vez, formadas por miofibrilas, onde se encontram os miofilamentos proteicos de actina e de miosina, os quais se encontram organizados paralelamente de forma hexagonal em volta uns dos outros. Esta organização molecular confere a morfologia em estrias característica destas células (de onde advém a denominação de músculo estriado), sendo também a razão pela qual os músculos estriados conseguem gerar maior força muscular que os músculos lisos. As estrias nada mais são que a sequência alternada de bandas claras e outras mais escuras, denominadas respectivamente de bandas I e bandas A.

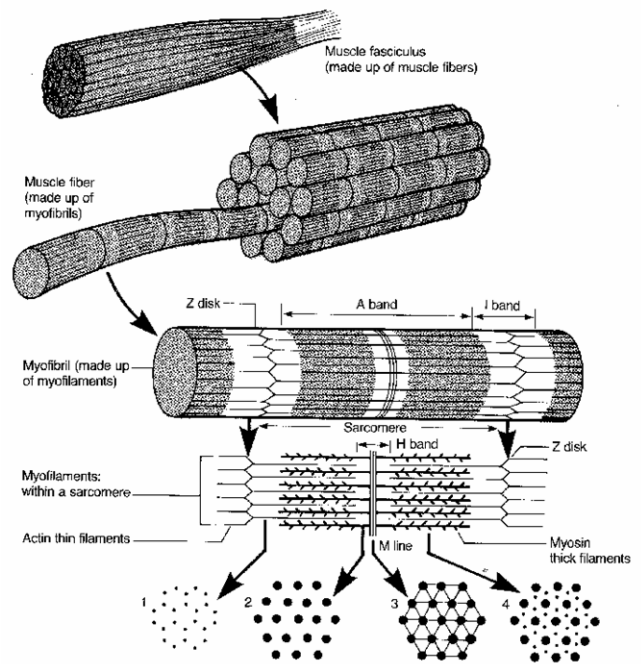


Figura 1. – Estrutura esquematizada da constituição do músculo estriado esquelético, mostrando os fascículos, fibras e miofibrilas musculares. Também é possível observar um esquema do arranjo tridimensional dos miofilamentos grossos (miosina) e finos (actina).

advém a denominação de músculo estriado), sendo também a razão pela qual os músculos estriados conseguem gerar maior força muscular que os músculos lisos. As estrias nada mais são que a sequência alternada de bandas claras e outras mais escuras, denominadas respectivamente de bandas I e bandas A.

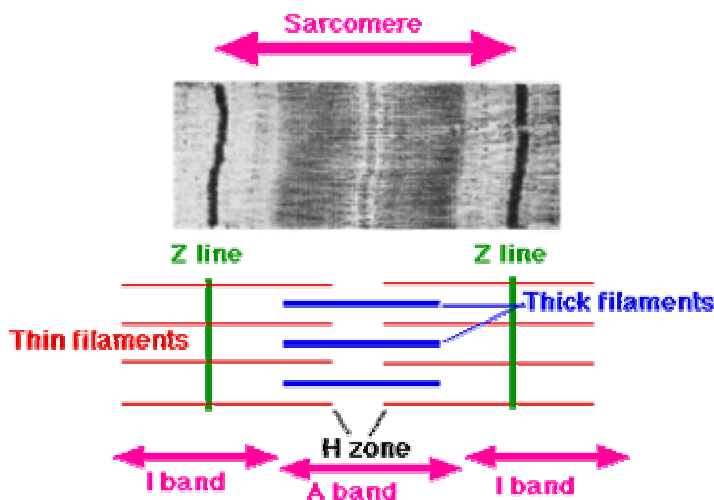


Figura 2. – Imagem ao microscópio e respectiva interpretação esquemática das bandas e linhas observadas no sarcómero.

Ao analisar uma célula destas ao microscópio óptico, podem-se discernir outras bandas e linhas. No meio de cada banda A existe uma zona um pouco mais clara

Introdução

denominada banda H, contendo uma linha mais escura (linha M), também visível é uma outra linha (linha Z) situada no meio de uma banda I. As miofibrilas musculares são subdivididas por estas últimas linhas Z e regiões denominadas sarcómeros, onde estão situados os miofilamentos referidos anteriormente. Na divisão entre sarcómeros adjacentes, a membrana forma invaginações denominadas por túbulos T (fig. 5), necessários para desencadear a contracção muscular. O miofilamento de miosina (fig. 3) é composto exclusivamente por moléculas de miosina, ao passo que o miofilamento de actina (fig. 4) compõe-se por moléculas de F-actina (oligómero

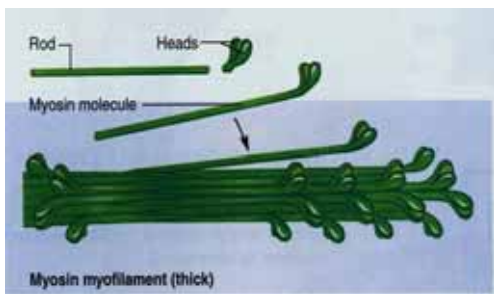


Figura 3. – Representação esquemática da constituição do miofilamento de miosina

de miofilamentos existe um organelo celular de extrema importância (tal como poderemos ver adiante) no mecanismo da contracção muscular: o retículo sarcoplasmático (fig. 5). Este

de G-actina) ladeadas por dois filamentos de tropomiosina que se ligam à F-actina por moléculas de troponina. A rodear todo este arranjo tridimensional

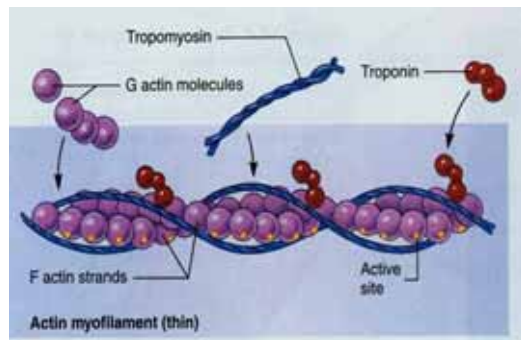


Figura 4. – Representação esquemática da constituição do miofilamento de actina.

organelo regula a concentração de cálcio (Ca^{2+}) no sarcoplasma.

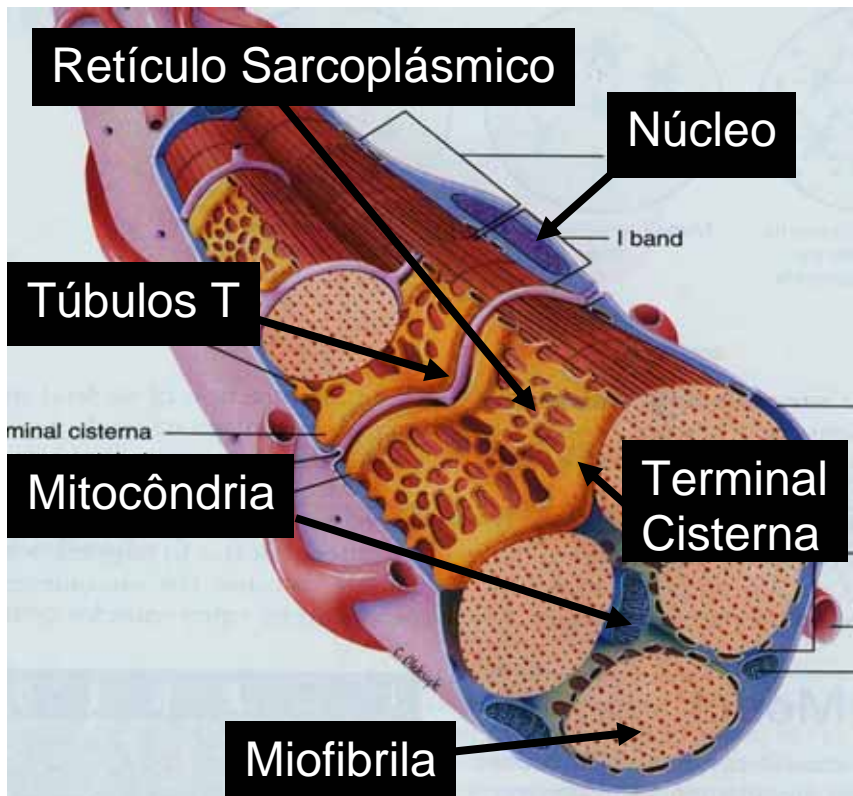


Figura 5. – Esquema de uma fibra muscular evidenciando a posição de alguns organelos de interesse: túbulos T, retículo sarcoplasmático (incluindo os terminais cisternae). É também possível ver na figura as miofibrilas contendo os miofilamentos, bem como o núcleo e algumas mitocôndrias.

4.3. Mecanismo da contracção muscular

Tal como foi referido anteriormente, os músculos esqueléticos são controlados voluntariamente, i. é, pelo sistema nervoso central simpático, implicando a necessidade de um estímulo neuronal que desencadeie todo o processo de contracção. Naturalmente existem terminações nervosas associadas aos músculos em zonas denominadas de junções neuromusculares, onde ocorrerá a transdução do estímulo nervoso para o músculo. O sarcómero, na junção neuromuscular consiste em uma membrana excitável, contendo receptores de acetilcolina (ACh) associados a canais de Na^+/K^+ . A acetilcolina (neurotransmissor libertado pelas terminações nervosas na junção neuromuscular) abre os canais de Na^+/K^+ , iniciando um estímulo que varre a fibra muscular a partir daquele ponto, propagado através dos túbulos T.

Introdução

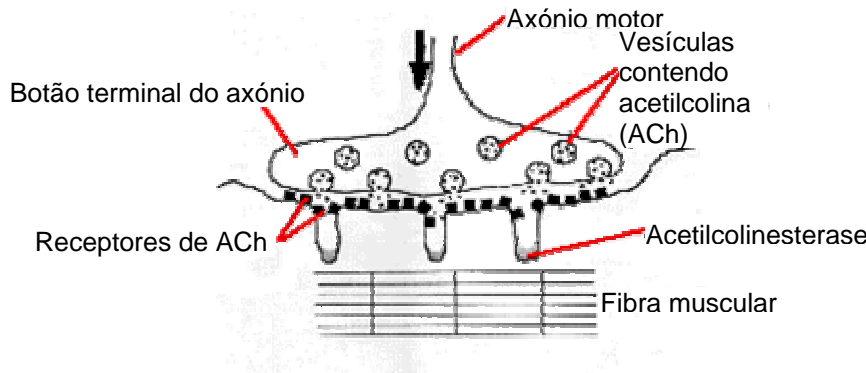


Figura 6. – Figura representativa de uma junção neuromuscular mostrando o axónio motor, o botão terminal, e as vesículas com ACh aí existentes, bem como os receptores de ACh e a acetilcolinesterase na parte muscular da junção.

O mecanismo pelo qual o impulso é transmitido dos tubulos T para o RS não é conhecido mas sabe-se que quer através de uma ligação directa entre os dois sistemas, quer pela abertura induzida por voltagem (“voltage-gated”) ou ainda por acção de segundos mensageiros, os canais de Ca^{2+} das *cisternae* do RS abrem-se, libertando o Ca^{2+} para o sarcoplasma. A repentina libertação do Ca^{2+} no sarcoplasma regula um dos passos do mecanismo da contracção muscular conhecido como “cross-bridge cycle” (Squire, J.M., 1983)^[2].

O mecanismo da contracção muscular é descrito como um ciclo, sendo convencionalmente que o primeiro passo deste ciclo seria aquele em que o ATP entrava na reacção (fig. 7). Assim sendo, no início (passo 1) temos ambos os miofilamentos (miosina e actina) acoplados, formando o complexo actomiosina com a cabeça da miosina a fazer a “ponte” entre os miofilamentos numa posição inclinada (não perpendicular). Neste estado, o

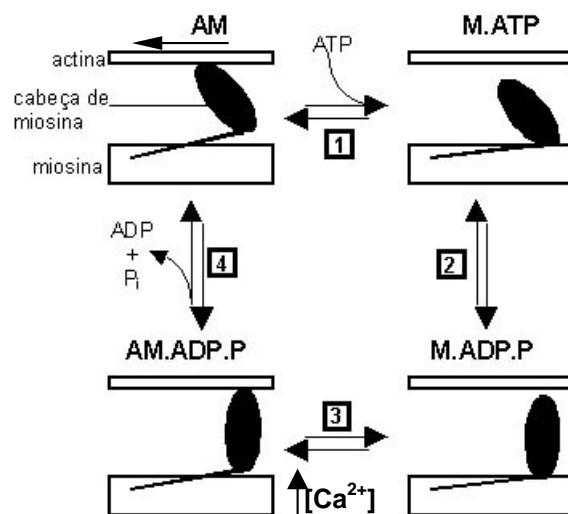


Figura 7. – Mecanismo da contracção muscular “cross-bridge cycle”

Introdução

ATP liga-se à cabeça da miosina, a qual perde a sua afinidade para a actina, desligando-se (passo 2). Seguidamente ocorre uma alteração conformacional que leva a que a cabeça da miosina tome uma posição perpendicular aos miofilamentos (passo 3). Neste mesmo passo ocorre a degradação do ATP a ADP.P, sendo a energia libertada por esta reacção que induz a mudança conformacional. Na presença de Ca^{2+} a cabeça da miosina readquire afinidade para com a actina, ligando-se de novo a esta. O complexo actomiosina formado hidrolisa então o fosfato, libertando-o juntamente com o ADP (passo 4), originando uma nova mudança conformacional, o que resulta num deslização relativo dos miofilamentos. Com este passo o ciclo completa-se, pois retornámos às condições iniciais do ciclo (passo 1). No 3º passo do ciclo, para que se dê, necessita da presença de Ca^{2+} , o qual é libertado do lúmen do RS para o sarcoplasma, passando a sua concentração de $\sim 10^{-7}\text{M}$ para $\sim 10^{-5}\text{M}$. Isto dá-se, como foi referido anteriormente, pela abertura induzida dos canais de Ca^{2+} existentes nos terminais *cisternae* do RS. Após a sua libertação, os canais de Ca^{2+} fecham-se e o Ca^{2+} é reacumulado no RS pela acção de uma outra enzima: a Ca^{2+} -ATPase, a qual bombeia os iões de volta para o lúmen do RS utilizando para tal a energia contida no ATP. É esta enzima que serve de base para o estudo aqui descrito.

4.4. A bomba de Cálcio

Existente na membrana do retículo sarcoplasmático, esta enzima tem um papel regulatório sobre o mecanismo da contracção em músculos esqueléticos. A Ca^{2+} -ATPase (fig. 8) tem uma massa molecular de aproximadamente 110kDa e possui dois domínios: um transmembranar e outro extramembranar. O domínio

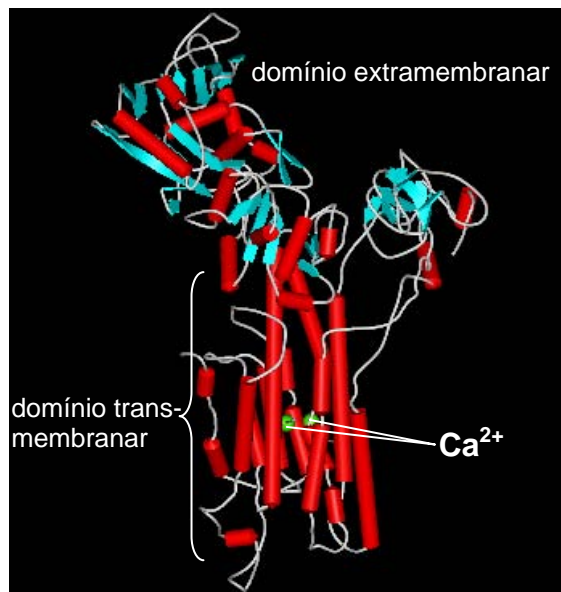


Figura 8. – Representação tridimensional da estrutura da Ca^{2+} -ATPase (adaptado de PDB; PDBID: 1EUL).

transmembranar é composto maioritariamente por hélices- α e serve de canal iónico, por onde é translocado o Ca^{2+} . O domínio extramembranar contém, por sua vez, um sítio de ligação ao Ca^{2+} e outro onde se liga o ATP. O mecanismo proposto (Lee, A.G. e East, J.M., 2001)^[3] para o funcionamento desta bomba é do tipo E_1 - E_2 (fig. 9), no qual a enzima adota duas conformações distintas (E_1

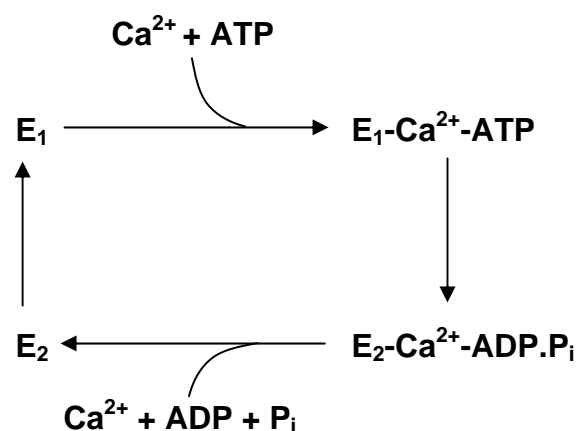


Figura 9. – Representação esquemática do mecanismo E_1 - E_2 proposto para o funcionamento da Ca^{2+} -ATPase.

e E_2). Neste caso específico, a enzima encontra-se no seu estado E_1 , tendo elevada afinidade para o Ca^{2+} e para o ATP, os quais se ligam aos respectivos sítios de ligação no domínio extramembranar. Um dos resíduos existentes no sítio de ligação do ATP é fosforilado pela

Introdução

transferência do grupo γ -fosfato do ATP, a energia da reacção induz uma mudança conformacional na proteína, que passa para o estado E_2 . Neste passo o canal iónico é aberto e o Ca^{2+} passa para o interior deste. No estado E_2 a enzima perde a afinidade para o Ca^{2+} (libertando-o para o lúmen do RS) e para o ATP, que entretanto foi hidrolizado em ADP e P_i (os quais também são libertados, mas para o exterior do RS). Quando ocorre a libertação do ADP, a enzima sofre uma nova alteração conformacional retornando ao estado E_1 . Mais recentemente foi proposto um novo mecanismo semelhante ao anterior, com a diferença de existir um ião Ca^{2+} “oculto” no canal iónico, o qual é empurrado por um novo ião Ca^{2+} que entra, sendo o anterior libertado para o lúmen enquanto que o novo ião toma o seu lugar. Terá também sido proposto (Aureliano, M. e Madeira, V.M.C., 1994)^[1] que esta enzima funcionaria não unicamente como uma bomba, mas como um translocador Ca^{2+}/H^+ , ejectando prótons conforme bombeia cálcio. Para confirmar esta hipótese, e baseando-nos em estudos anteriores (Aureliano, M. e Madeira, V.M.C., 1994; Carafoli, E. e Caroni, P., 1981; Champeil, P., *et al.*, 1988; Davidson, G.A. e Berman, M.C., 1988; Petretski, J.H., *et al.*, 1989; de Meis, L., 1991)^[1,4,5,6,7,8], foi decidido estudar o comportamento desta ATPase pela medição da ejeção protónica, ao invés de fazê-lo pela acumulação de cálcio. Foi também estudado o efeito de um conhecido inibidor desta enzima: o vanádio. Através de um método experimental descrito por Carvalho e Leo (1967) modificado posteriormente por Costa e Madeira (1986) é possível isolar esta enzima em vesículas a partir do RS por centrifugação diferencial.

4.5. O vanádio

O vanádio (^{51}V) é o elemento 23 da tabela periódica, encontra-se no 4^o período, grupo 5. Tem um peso atómico de 50.95, um raio atómico de 131.1pm, funde a 2183K e entra em ebulição a 3680K. A sua configuração electrónica é $[\text{Ar}] 3d^3 4s^2$ e compreende vários estados de oxidação (entre -2 e +5). Foi denominado vanádio em alusão à deusa nórdica da beleza, Vanadis, devido à riqueza das cores apresentada pelos seus complexos em solução aquosa.

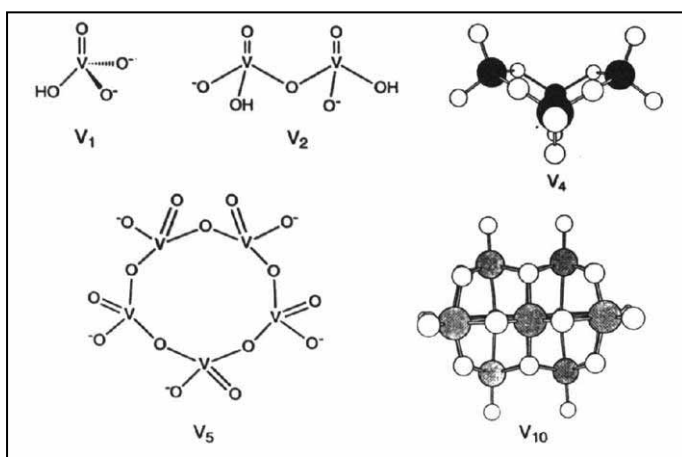
As suas propriedades fisico-químicas foram inicialmente descritas por Berzelius em 1831, o qual tinha, na realidade, caracterizado o seu óxido (VO). Erro que foi mais tarde corrigido por Roscoe (1865), publicando finalmente as verdadeiras propriedades físicas e químicas deste metal. Foi inicialmente detectado em minérios extraídos de minas de cobre e de chumbo, entrando na composição de diversos minerais como a apatite, autunite, etc. Está amplamente distribuído pelo cosmos e na crosta terrestre, a sua abundância estimada é de $\sim 100\mu\text{g/g}$ (10 vezes mais que o chumbo e 100 vezes a do molibénio). As suas possíveis utilizações incluem a indústria metalúrgica, a produção de pigmentos (devido à gama de cores que austenta), como catalizador químico e foi inclusivé utilizado em terapêuticas medicinais. A inclusão de pequenas quantidades de vanádio na fabricação do aço confere-lhe maior resistência a choques e ao uso (útil para equipamento e maquinarias pesadas), enquanto que noutras ligas metálicas confere, entre outras coisas, resistência a altas temperaturas. Na primeira parte do séc. XX terá sido extensivamente utilizado em agentes terapêuticos na França, compreendendo

Introdução

aplicações farmacológicas no tratamento de anemias, infecções como a pneumonia e a gripe, a tuberculose, reumatismo, etc.

A biotoxicidade do vanádio terá sido estudada primeiramente por Priestley (1876) que falou acerca dos seus intensos efeitos tóxicos em pombos, coelhos, gatos e cães. Ele descobriu que a injeção subcutânea de 9.2-15mg de V_2O_3 /kg de peso corporal em coelhos é letal, observando-se um abrandamento e enfraquecimento do coração, acompanhada de perda de pressão sanguínea. Desde então vários autores terão estudado a toxicidade deste metal: Gamgee e Larmuth (1877), Dowdesdell (1878), ou mais recentemente Jackson (1911, 1912), sendo o principal efeito verificado, a vasoconstrição intensa no baço, rim e intestino com aumento da pressão sanguínea. Sendo o vanádio um ião metálico d^0 o vanádio-51 é um núcleo activo para RMN, providenciando um bom método para o estudo da sua química. Este método é, aliás, o que tem revelado maior parte da informação disponível acerca deste ião. Em organismos, o estado de oxidação mais comum é +5, sendo a sua química em

solução vasta e complexa, já que este metal forma complexos oligoméricos abrangendo até uma dezena de átomos: VO_4^{3-} , $V_2O_7^{4-}$, $V_4O_{12}^{4-}$, $V_5O_{15}^{5-}$ e $V_{10}O_{28}^{6-}$



(Howarth,1990). Existe no nosso corpo em concentrações vestigiais, e é

Figura 10. – Representação dos vários oligómeros de vanádio presentes em solução aquosa. Neste estudo foram utilizadas soluções de metavanadato (V_1 , V_2 , V_4 e V_5) e de decavanadato (maioritariamente V_{10}).

Introdução

encontrado em muitos outros organismos, havendo inclusivé alguns que o acumulam (algumas espécies de ascídias) e incorporam em compostos (amavadina em cogumelos *Amanita*) ou mesmo em proteínas. Torna-se então interessante o estudo de um metal, que apesar dos seus efeitos tóxicos, está amplamente distribuído pela biosfera. Principalmente na proteína que serve de objecto a este estudo, o efeito deste e de outros metais de transição tem sido bastante estudado (Aureliano, M. e Madeira, V.M.C., 1994; Verbost, P.M., *et al.*, 1989; Yu, X. e Inesi, G., 1995; Aureliano, M., 2000; Henao, F., *et al.*, 1992)^[1,9,10,11,12].

4.6. Field-Effect Transistors (FET's)

Uma técnica bastante recente que vem sendo aplicada ao estudo de células é o uso de transistores de efeito de campo (“field-effect transistors”, ou “microelectrode arrays”) (Martinoia, S., *et al.*, 2001)^[13]. Estes aparelhos são capazes de detectar variações ínfimas num campo eléctrico aplicado sobre uma amostra em estudo, fazendo-o com grande precisão e com grande resolução temporal. Como é esquematizado na figura 11, estes dispositivos são construídos numa placa de silício, com eléctrodos extremamente finos de ouro alternados (“source” e “drain”), entre os quais se aplica uma diferença de potencial eléctrico. No “gate” é induzida uma força electrostática positiva ou negativa para induzir um ambiente carregado positiva ou negativamente nas amostras. O amperímetro conectado no terminal source medirá as alterações, na corrente eléctrica aplicada, resultantes da acção das amostras.

Introdução

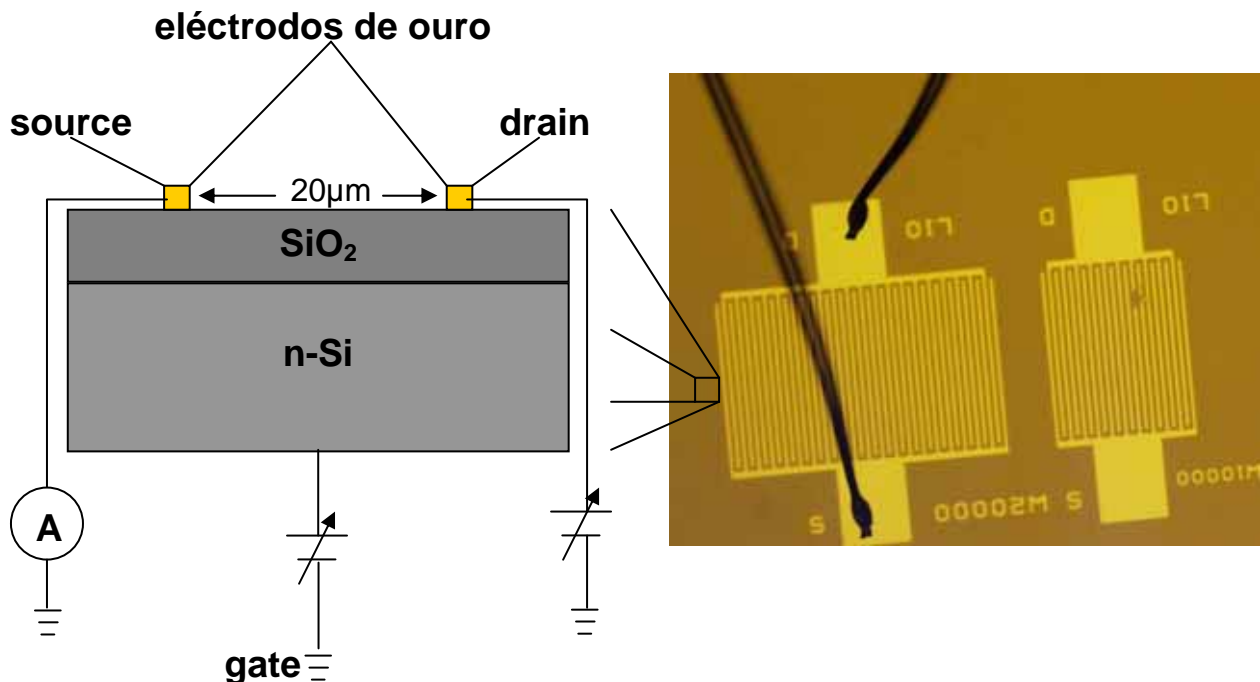


Figura 11. – Imagem de um microelectrode array e constituição de cada secção. É aplicada uma voltagem constante entre os eléctrodos (“source” e “drain”), enquanto que o “gate” induz um potencial electrostático sob as amostras. O amperímetro detecta variações de intensidade de corrente induzidas por uma amostra situada entre os dois eléctrodos. O comprimento total de cada eléctrodo é de cerca de 20000μm.

Naturalmente, por possuir estas qualidades, estes dispositivos são uma ótima maneira de estudar de uma forma não invasiva células excitáveis (neurónios, células musculares, etc). No presente estudo ir-se-á utilizar o dispositivo para monitorizar células vivas. De modo a tornar-se possível isolar alguns dos muitos processos celulares, nomeadamente, os referentes a ATPases do tipo P, pois com a utilização do vanádio (inibidor de P-ATPases) pode-se inibir completamente este sinal. Assim, pela monitorização com e sem vanádio, poder-se-á verificar a contribuição destas proteínas para qualquer processo celular mensurável.

5. Materiais e Métodos

5.1. Isolamento de VRS a partir do músculo esquelético de

Halobatrachus dydactylus

5.1.1. Material:

- Solução tampão de isolamento e homogeneização (0.1 M KCl; 10 mM Tris-HCl pH 7.0; 2.5 mM β -mercaptoetanol; 5 μ M PMSF);
- Solução tampão de lavagem (0.6 KCl; 10 mM Tris-HCl pH 7.0);
- N₂ líquido;
- H₂O_{dd} refrigerada;
- Solução de sacarose 2 M;
- Balanças analíticas e semi-analíticas;
- Triturador de carne;
- Homogeneizador de lâminas (Waring Blender Comercial);
- Centrífuga (Beckman J2-MC Centrifuge);
- Vortex (Labinco L46);
- Copos de plástico arrefecidos (x2);
- Provetas arrefecidas;
- Tinas c/ gelo;
- Bisturi;
- Faca;
- Espátulas;
- Micropipetas Gilson (P5000, P1000, P200);
- Funis;

Materiais e Métodos

- Gaze esterilizada lavada e refrigerada;
- Tubos de centrífuga de 250 ml (JA-14 Beckman);
- Tubos de centrífuga de 20 ml (JA-20 Beckman);
- Potter de tipo Elvehjem;
- Tubos de ensaio (x4);

5.1.2. Procedimento:

Após sacrificar o animal, retiraram-se cuidadosamente os músculos da parte posterior do animal, com a ajuda de um bisturi, sendo colocados num copo previamente refrigerado. Adicionaram-se ~50 ml de solução de isolamento aos 57.89 g de músculo obtido, após o que, foram triturados para um novo copo também refrigerado. A suspensão obtida foi colocada no homogeneizador de lâminas e foi adicionada mais solução de isolamento (~350 ml). A suspensão foi homogeneizada, primeiro a velocidade baixa durante 5 segundos, depois a velocidade alta durante 15 segundos, deixando-se repousar durante 30 segundos. Repetiu-se a homogeneização, desta vez por 20 segundos a velocidade baixa e outros 20 segundos a velocidade alta. A suspensão homogeneizada foi dividida por seis tubos de centrífuga de 250 ml e procedeu-se a uma centrifugação a 8000g a uma temperatura de 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de 4 camadas de gaze lavada e refrigerada, sendo novamente submetido a centrifugação de 8000g. Repetiu-se a filtração. O filtrado foi centrifugado durante 60 minutos, a 4°C e 40000g. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi ressuscitado em solução tampão de lavagem. A ressuspensão foi efectuada utilizando um potter do tipo Elvehjem

Materiais e Métodos

com a ajuda de um berbequim a uma velocidade média de 200 rpm. Esta ressuspensão foi novamente submetida a centrifugação durante mais 60 minutos a 4°C e 40000g. Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 5 ml de solução de isolamento. Os 5 ml de suspensão de VRS obtidos foram divididos em aliquotas de 250 µl, às quais se adicionou 250 µl de solução de sacarose 2 M. As aliquotas foram rapidamente mergulhadas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C.

5.2. Quantificação pelo método do biureto

5.2.1. Material

- Solução de BSA (Bovine Serum Albumine) 5 mg/ml;
- Solução de biureto (CuSO₄ 3 g.l⁻¹; Na⁺/K⁺ tartarato 9 g.l⁻¹; KI 5 g.l⁻¹; NaOH 0,2M);
- Solução de isolamento (ver 2.1.1.);
- Solução SDS 10% (m/v);
- Amostras retiradas do isolamento de VRS;
- Vortex (Labinco L46);
- Banho termostatizado (SPSelecta Precistern);
- Espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic 1201);
- Micropipetas Gilson (P5000, P1000, P200, P100);
- Tubos de ensaio e suporte para tubos;
- Cuvette;

5.2.2. Procedimento

Foram preparados os tubos de ensaio com as concentrações conhecidas de BSA (de forma a elaborar uma recta padrão) e os tubos com as amostras, tal como é descrito na tabela seguinte (Tab. I).

Tubo	Descrição	V _{prot} (μl)	V _{tampão} (μl)	V _{SDS} (μl)
P ₀	Branco	0	1960	40
P ₁	BSA (5 mg/ml)	200	1760	40
P ₂		400	1560	40
P ₃		600	1360	40
P ₄		1000	960	40
P ₅		1960	0	40
A ₅₀ ¹		Ca ²⁺ -ATPase	50	1910
A ₅₀ ²	50		1910	40
A ₁₀₀ ¹	Ca ²⁺ -ATPase	100	1860	40
A ₁₀₀ ²		100	1860	40

Tabela I. – Esquema da composição dos tubos utilizados para efectuar a recta-padrão de BSA (P₀-P₅) e das amostras a quantificar.

Foi medida a absorvância a 540 nm de comprimento de onda para os tubos P₀ a P₅ e foi traçada a recta padrão de absorvância da BSA. Após obtida uma recta padrão pela regressão linear dos pontos medidos, procedeu-se ao ajuste a esta recta dos valores de absorvância a 540 nm das amostras.

5.3. Electroforese SDS-PAGE

5.3.1. Material

- Solução tampão do gel de resolução (4x concentrado) (Tris-HCl 1,5M; pH 8,8);
- Solução tampão do gel de concentração (4x concentrado) (Tris-HCl 0,5M; pH 6,8);
- Solução tampão da tina superior (Tris 25mM; glicina 192mM; 0,1% (m/v) SDS; pH 8,3);
- Solução tampão da tina inferior (Tris 25mM; glicina 192mM; 0,1% (m/v) SDS; $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$ 0,1M; pH 8,3);
- Solução tampão de amostra (4x concentrado) (Tris-HCl 320mM; β -mercaptoetanol 0,4M; 8% (m/v) SDS; 15% (v/v) glicerol; 0,024% (m/v) roxodem-cresol; pH 6,8);
- Solução de acrilamida (29,2% (m/v) acrilamida; 0,8% (m/v) N,N'-metilbisacrilamida);
- Solução de PMSF 25mM;
- Solução de PSA 10%;
- Solução de SDS 10%;
- TEMED;
- Solução corante (0,1% (m/v) CBB R-250; 45% (v/v) metanol; 10% (v/v) CH_3COOH glacial);
- Solução descorante (50% (v/v) metanol; 50% (v/v) CH_3COOH glacial);
- Marcadores de massa molecular (Sigma High Molecular Weight Marker);
- Amostras de VRS obtidas pelo método de isolamento (ver 2.1.);

Materiais e Métodos

- Tina de electroforese (Amersham/Pharmacia Biotech, Hoefer Electrophoresis Unit SE600 Series);
- Unidade de alimentação (Bio-Rad PowerPac 300);
- Unidade de refrigeração (Savant Refrigerated Circulator RWC825);

5.3.2. Procedimento

Foram preparadas as soluções para os géis de resolução e de concentração, os quais foram postos a polimerizar nos vidros de electroforese (primeiro o gel de resolução e depois o gel de concentração por cima). Entretanto foram adicionados 25 μ L de β -mercaptoetanol às amostras, sendo estas colocadas em banho-maria (100°C) durante 5 minutos. O mesmo foi efectuado com os marcadores de peso molecular. O aparelho de electroforese foi montado com refrigeração, a solução tampão da tina inferior e os vidros contendo o gel previamente polimerizado. As amostras foram colocadas nos poços e, após terminado este procedimento, colocou-se a solução tampão da tina superior e correu-se a electroforese durante cerca de 2 horas a aproximadamente 200 mV. Após o término da electroforese, o gel obtido foi retirado e colocado em solução corante durante cerca de 5-6 dias, sendo posteriormente transferido para a solução descorante. Foi registado o resultado por intermédio de uma fotografia.

5.4. Ensaios potenciométricos

5.4.1. Material

- Solução tampão HEPES 0,5 mM (com KCl 0,1 M e MgCl₂ 5 mM);
- Solução de CaCl₂ 10 mM;
- Solução de HCl 10 mM;
- Solução de Mg²⁺-ATP 100 mM;
- Solução de metavanadato 50 mM pH 6,54;
- Solução de decavanadato 50 mM pH 6,48;
- Cuvette refrigerada;
- Agitador magnético;
- Eléctrodo de pH (Crison Cat nº 52-09);
- Multímetro (Keithley 2000 Multimeter);
- Cabo de série RS-232C;
- PC (IBM compatível);

5.4.2. Procedimento

Os ensaios potenciométricos foram efectuados usando um sistema em que o eléctrodo de pH estava ligado a um multímetro, estando este, por sua vez, conectado a um computador pessoal através de um cabo de série (RS-232), tal como é esquematizado na figura seguinte (fig. 12). O software utilizado para registar as medições foi programado especificamente para este fim em LabVIEW (ver Anexo I).

Materiais e Métodos

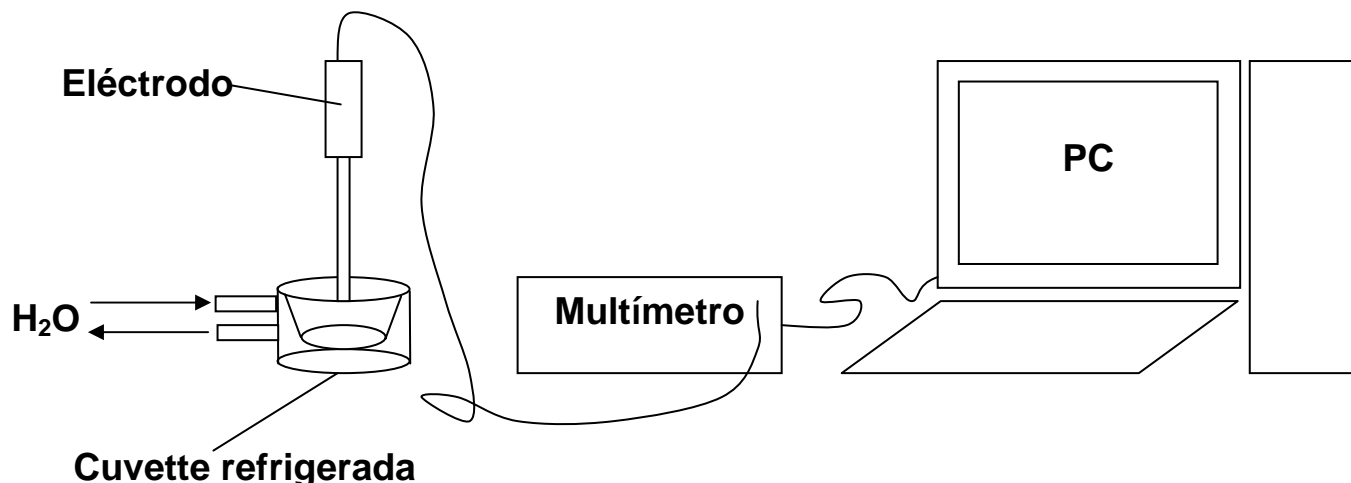


Figura 12. – Esquemática do sistema elaborado para efectuar estes estudos potenciométricos. A refrigeração da cuvette faz-se por ligação a um banho termostatzado com circulação de água.

Na cuvette refrigerada são colocados 2 mL de solução tampão HEPES. É iniciada a monitorização e são posteriormente colocados os restantes reagentes na seguinte ordem:

- 1- 10 μ L da solução de Ca²⁺ 10mM;
- 2- volume calculado de amostra de VRS para obter uma concentração de 1mg de proteína por mL de solução (final);
- 3- nos estudos apropriados, volume calculado de solução de vanadatos para obter a concentração final desejada;
- 4- adicionar 10 μ L da solução de ATP 100mM ao meio para iniciar a reacção;
- 5- adicionar 2 vezes 10 μ L e uma vez 20 μ L de HCl 10mM para efectuar a calibração;

A monitorização é terminada assim que o meio reaccional atinja um patamar. É da mesma forma necessário que o meio atinja um equilíbrio após a introdução de um novo reagente (passos 1-5). O início das medições (até 30 segundos antes da adição de ATP) foi desprezado, pois não continha

Materiais e Métodos

informação relevante para o estudo, servindo apenas para posterior tratamento e normalização dos gráficos obtidos. Após a adição de ATP a reacção era seguida por 300 segundos (5 minutos) sendo efectuada de seguida a calibração com HCl, que consiste na adição de 10nmol, 10nmol e 20 nmol, respectivamente (com um intervalo de 30 segundos entre cada) de HCl. Os resultados foram tratados (como é descrito no Anexo II) e os gráficos resultantes analisados. Nas experiências utilizando as células Vsa, foi introduzida uma quantidade de meio de cultura contendo aproximadamente 10^6 células e a quantidade de ATP utilizada foi de 100 μ L, procedendo-se de igual modo nos restantes passos. Com estes ajustes permitiram obter uma resposta equiparável à obtida com as VRS.

6. Resultados e Discussão

6.1. Estudos em VRS

6.1.1. Quantificação pelo método do Biureto

Foi quantificada a proteína total na solução de VRS proveniente do isolamento (2.1.) através do método do biureto (2.2.). Foi traçada uma curva padrão utilizando várias concentrações de BSA (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 e 4.9 mg.ml⁻¹). Após obter a curva padrão com a BSA mediu-se a A⁵⁴⁰ para duplicados de concentrações da solução de VRS com diluições de 1/20 e 1/10 (fig. 13).

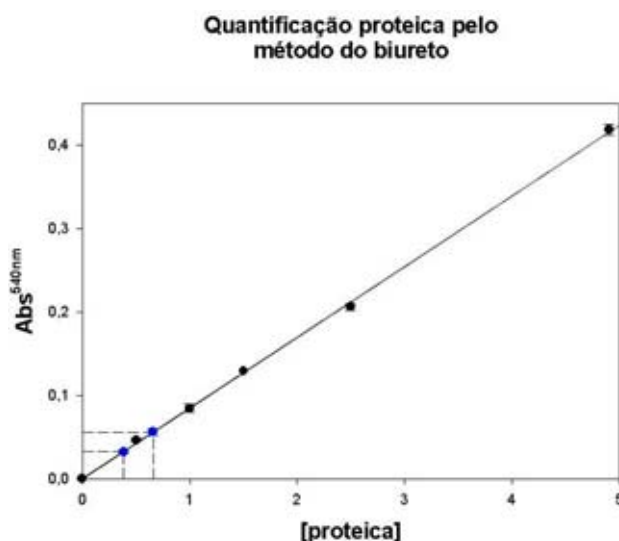


Figura 13. – Determinação da concentração de proteína total na solução de VRS através do método do biureto.

A concentração de proteína total na solução de VRS foi determinada como sendo de 14.25 mg.ml⁻¹.

6.1.2. SDS-PAGE

Este gel de SDS-PAGE foi feito segundo o protocolo (ver 5.3.) utilizando os marcadores especificados. A banda indicada existe a ~110 KDa e corresponde à proteína que é objecto deste estudo (fig. 14). Comparativamente, as outras proteínas existentes estão presentes apenas em baixa percentagem; podemos estimar que cerca de 80% das proteínas existentes na solução de VRS correspondem à Ca^{2+} -ATPase.

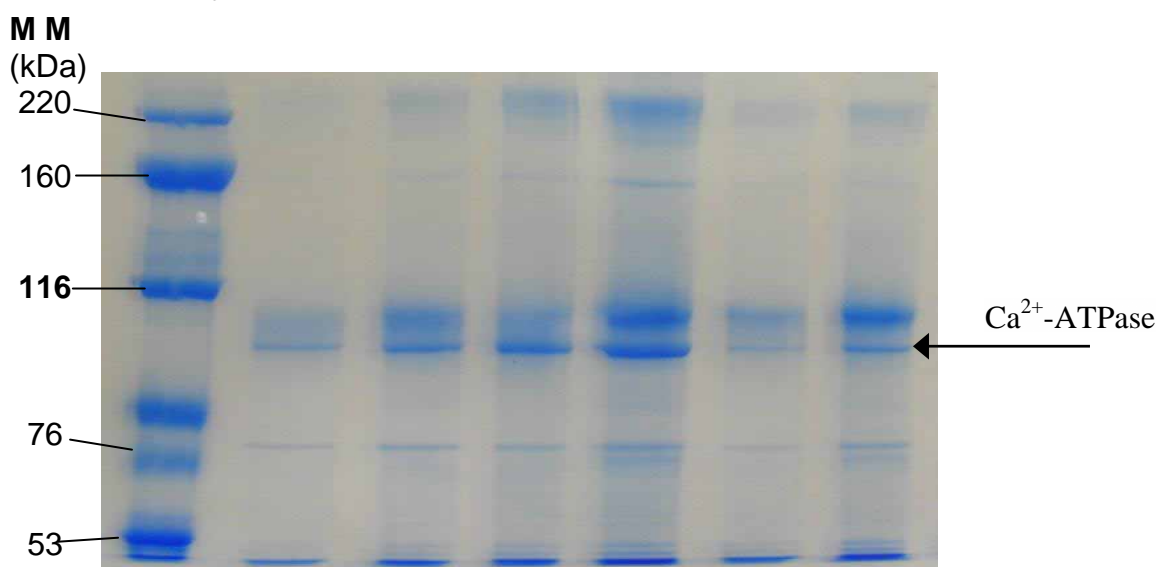


Figura 14. – Gel SDS-PAGE da solução de VRS efectuada segundo o protocolo. A seta (→) indica a banda a 110 KDa correspondente à Ca^{2+} -ATPase.

O objectivo desta análise é, neste caso, determinar a pureza da proteína em estudo (Ca^{2+} -ATPase), pois a existência de demasiadas “impurezas” na solução de VRS pode adulterar os resultados obtidos em posteriores experiências. É possível que se evidenciem efeitos dessas mesmas impurezas, mascarando os verdadeiros efeitos da proteína-alvo deste estudo. Neste caso, porém, uma percentagem de cerca de 80% de Ca^{2+} -ATPase na proteína total é uma boa base para o estudo.

6.1.3. Ejeção de H⁺ pela Ca²⁺-ATPase

Foram efectuados estudos da ejeção de protões pela Ca²⁺-ATPase do Retículo Sarcoplasmático (conforme o protocolo). Fizeram-se os controlos da ejeção (n=4; foram retirados dois dos gráficos, pois afastavam-se demasiado da média) e trataram-se os gráficos obtidos (ver Anexo II) para cada um dos controlos (fig. 15):

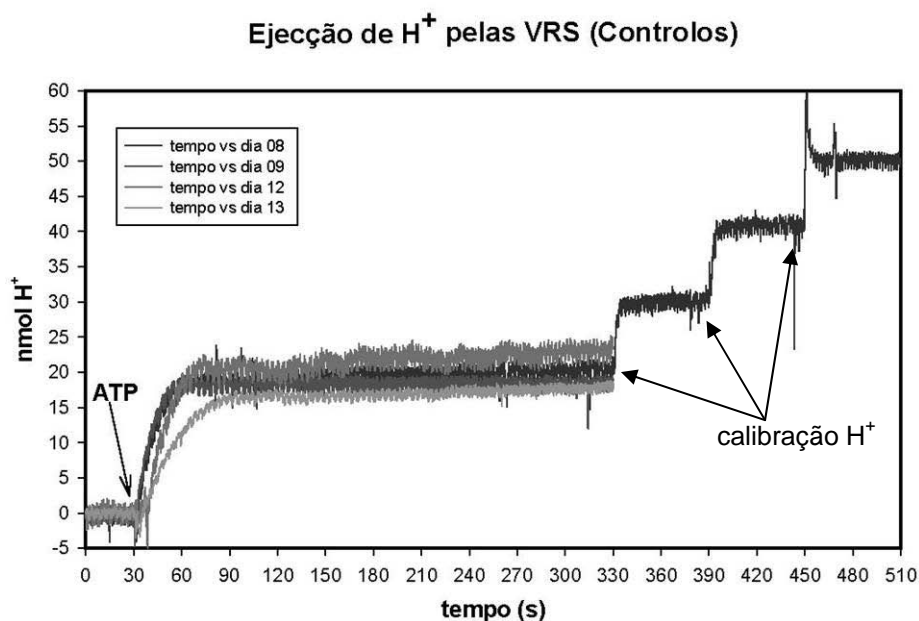


Figura 15. – Gráfico dos controlos da ejeção de H⁺ pela Ca²⁺-ATPase do RS. Quantidade de H⁺ ejectados por unidade de tempo (Nota: a quantidade de proteína testada é de ~0.8 mg). Resultados obtidos em tampão HEPES 0,5mM, pH 6,5 a 25°C.

Calculou-se a ejeção de H⁺ total para cada controlo (relativamente à quantidade de proteína testada), a média destes e o correspondente desvio padrão. Obteve-se um valor médio de 24,2±2,7 nmol H⁺.mg⁻¹ proteína (Fig. 16).

Resultados e Discussão

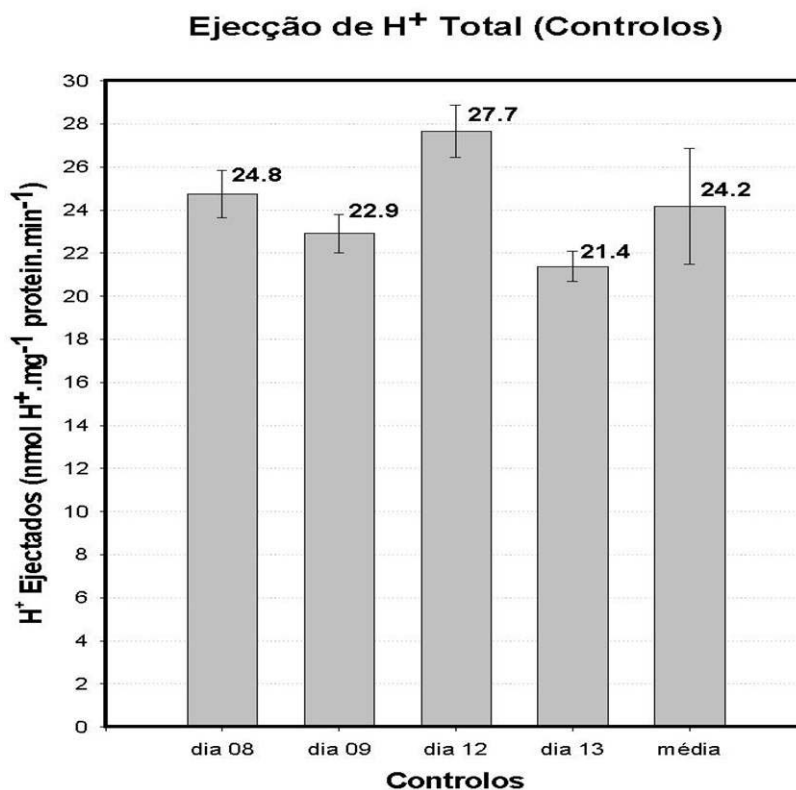


Figura 16. – Valores da ejeção de H⁺ e média dos controlos. Obtido para 4 ensaios com VRS, em meio HEPES 0,5mM, pH 6,5 a 25°C.

Os resultados obtidos nas experiências controlo (Figs. 15 e 16) indicam que as vesículas do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de *Halobatrachus dydactilus* (Charroco) têm uma ejeção de protões de 24.2 ± 2.7 nmol H⁺.mg⁻¹.min⁻¹ (em média). Este valor, quando comparado com estudos anteriormente efectuados utilizando VRS de *Oryctolagus cuniculus* (Coelho), é mais baixo, sendo o valor obtido para estas últimas de 34 ± 5 nmol H⁺.mg⁻¹.min⁻¹ (Aureliano, M. e Madeira, V.M.C., 1994)^[1].

6.1.4. Efeitos dos oligómeros de vanádio presentes nas soluções de metavanadato e decavanadato

Efectuaram-se estudos sobre o efeito da presença de oligómeros de vanádio (V_n ; $n=1,2,3,\dots,10$). Foram testadas várias concentrações de uma solução de metavanadato ($n<10$) e decavanadato ($n=10$), sendo as concentrações utilizadas de 1.00 mM, 0.50mM, 0.25mM e 0.10mM para cada solução, sob condições iguais às aplicadas aos controlos. Os gráficos obtidos foram submetidos a um tratamento similar ao dos gráficos controlo (ver Anexo II).

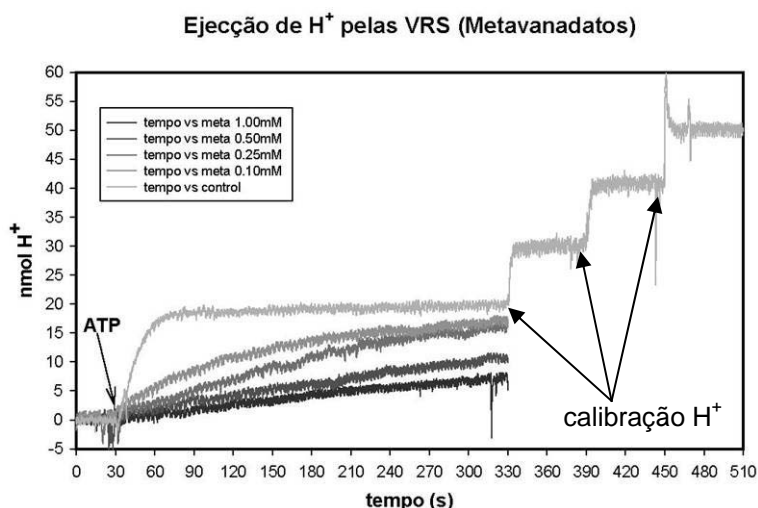


Figura 17. – Gráficos da ejeção de H^+ pelas VRS sob o efeito de várias concentrações de uma solução de metavanadato (V_n ; $n<10$)

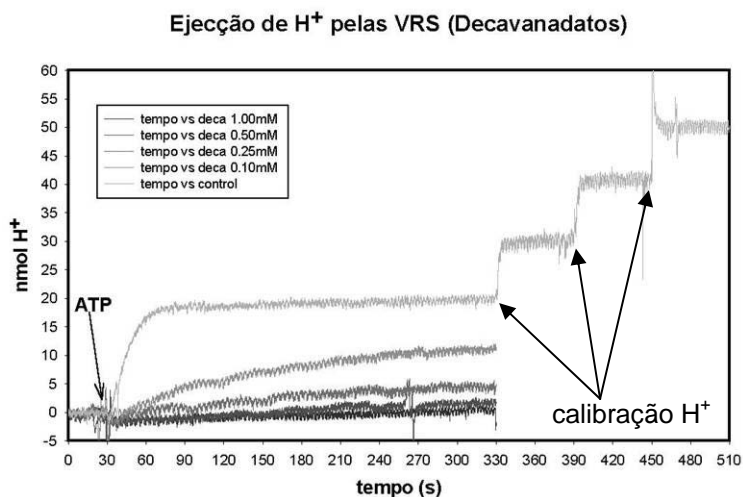


Figura 18. – Gráficos da ejeção de H^+ pelas VRS sob o efeito de várias concentrações de uma solução de decavanadato (V_n ; $n=10$)

Resultados e Discussão

Quando comparamos estes resultados com o gráfico obtido para os controlos, é bem visível que a presença destes oligómeros (meta e decavanadato) influencia a actividade da Ca^{2+} -ATPase, sendo os efeitos observados inversamente proporcionais à concentração utilizada do oligómero. Ou seja, uma maior quantidade de meta ou decavanadato presentes no meio reaccional induzem uma maior inibição da actividade da Ca^{2+} -ATPase.

Se, por outro lado comparamos os gráficos obtidos para o metavanadato contra os obtidos para o decavanadato, nota-se claramente que o efeito da presença de decavanadato é, em muito, superior ao efeito da presença dos metavanadatos. Se considerarmos que a concentração destes últimos oligómeros é dez vezes menor que a concentração indicada (que corresponde à $[\text{vanadato}]_{\text{total}}$), os efeitos observados para ambas as soluções destes oligómeros distanciam-se ainda mais.

Nos resultados obtidos por Aureliano e Madeira (1994)^[1] com as VRS de coelho, a concentração mais baixa de vanadato total estudada foi de 1.0 mM. Deste modo, verificou-se que a Ca^{2+} -ATPase do charroco é mais sensível à presença deste metal que a proteína homóloga do coelho. Estes factos tornam-se mais claros quando transpomos os resultados do efeito dos vanadatos na ejeção de H^+ para variação na percentagem de actividade da enzima.

6.1.5. Efeitos dos oligómeros de vanádio na ejeção de H^+ pela Ca^{2+} -ATPase

Utilizando os dados retirados dos gráficos da ejeção de H^+ foram calculadas as percentagens de actividade da Ca^{2+} -ATPase *versus* o efeito de várias concentrações de meta e decavanadato (figs. 19 e 20) para dois tempos diferentes: 15” e 60” após a adição de ATP.

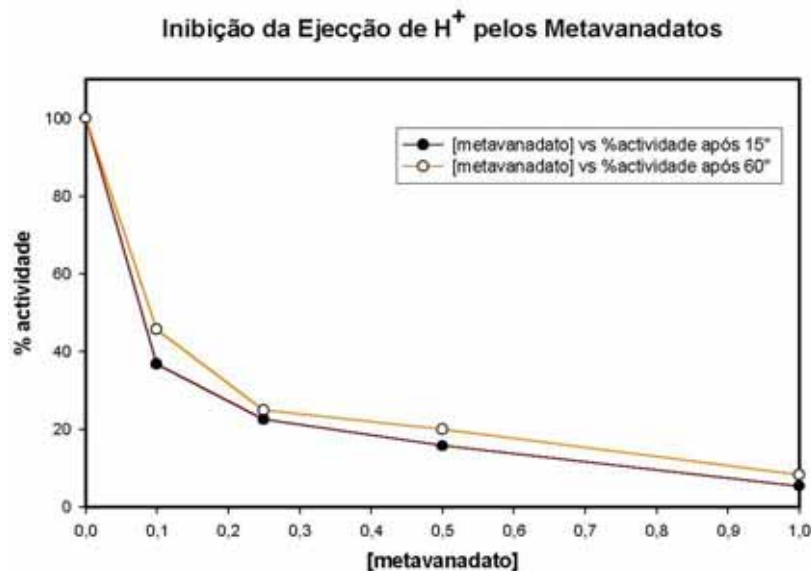


Figura 19. – Gráficos do efeito de várias concentrações de uma solução de decavanadato (V_n ; $n < 10$) sobre a actividade da Ca^{2+} -ATPase.

Como se pode observar no gráfico anterior, para as concentrações estudadas obteve-se um valor de IC_{50} de cerca de 0.1 mM. A serem efectuados mais estudos utilizando os mesmos métodos e as mesmas condições será possível confirmar este resultado.

Resultados e Discussão

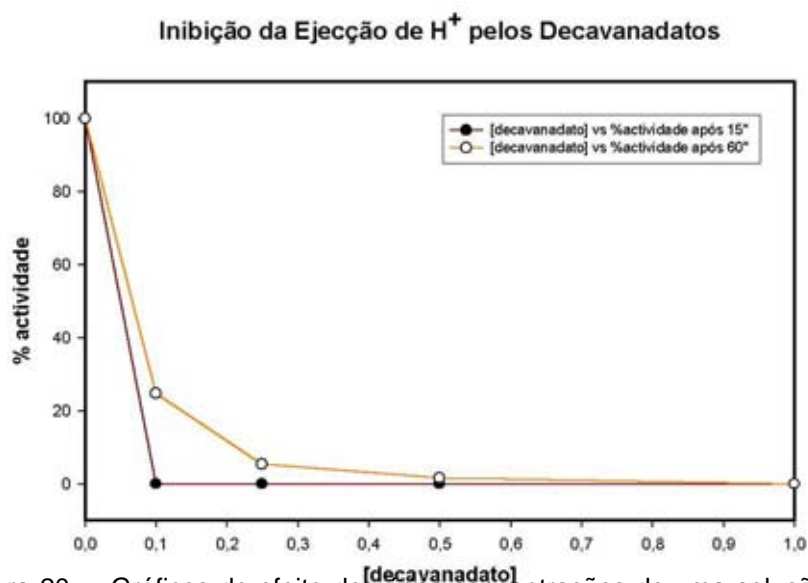


Figura 20. – Gráficos do efeito de várias concentrações de uma solução de metavanadato (V_{n_i} ; $n=10$) sobre a actividade da Ca^{2+} -ATPase.

Tal como no caso do metavanadato, também aqui não foi possível determinar um valor exacto para o IC_{50} , no entanto, podemos afirmar que, com certeza, este será bastante mais baixo que 0.10 mM. Para uma concentração de 1.00 mM de decavanadato, a ejeção de protões pela Ca^{2+} -ATPase foi completamente anulada. Observou-se aqui um efeito curioso, pois ao determinar a ejeção após 15" da adição de ATP verificou-se que, para qualquer uma das concentrações utilizadas, esta era nula (efeito também verificado por Aureliano, 1994^[1]). O mesmo já não acontece quando determinámos o mesmo parâmetro para 60" após a adição de ATP. Aparentemente dá-se um efeito de retardamento do início da ejeção de protões. Isto está presente não só nos ensaios utilizando decavanadato, como também nos ensaios em que se utilizou metavanadato, embora tenha sido menos evidente, no entanto, como se pode observar na figura 6, os valores de actividade da enzima para 15" após a adição de ATP são menores, em todos os casos que os valores para 60" após esta mesma adição.

6.1.6. Comparação entre efeitos dos oligómeros presentes nas soluções de metavanadato e decavanadato

De modo a comparar os efeitos dos diferentes oligómeros de vanádio sobre a ejeção de H^+ pela Ca^{2+} -ATPase, foram compilados os resultados apresentados nos gráficos 19 e 20 num único gráfico:

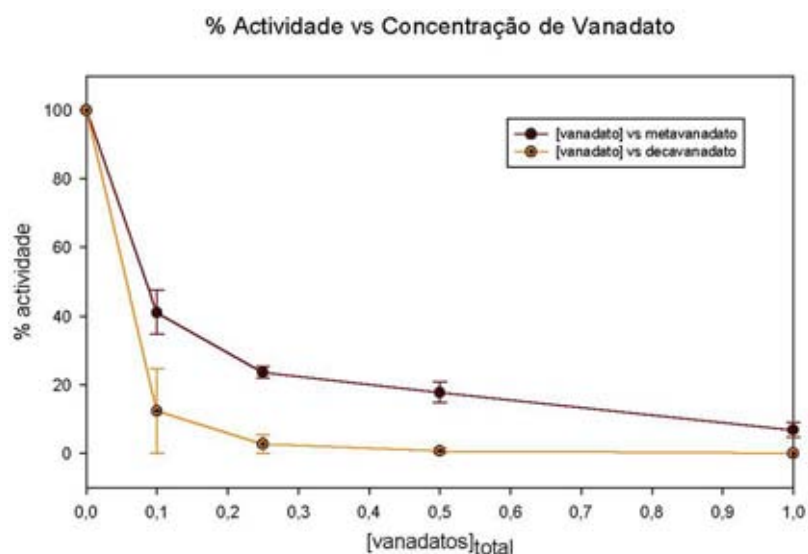


Figura 21. – Gráfico dos efeitos de várias concentrações de oligómeros de vanádio (meta e decavanadato) sobre a actividade da Ca^{2+} -ATPase.

Assim, verifica-se que a solução de decavanadato é mais eficiente na inibição da actividade da Ca^{2+} -ATPase que a solução de metavanadato. Estes resultados estão de acordo com estudos previamente conduzidos, pois a “eficácia” do decavanadato para inibir P-ATPases foi demonstrada em estudos vários (Aureliano, M. e Madeira, V.M.C., 1994; Aureliano, M., 2000; Desrosiers, M.G., *et al.*, 1996; Niggli, V., *et al.*, 1980; Peiffer, W.E., *et al.*, 1996)^[1,11,14,15,16]. Supõe-se que a forma decamérica do vanadato mimetiza o ATP, ligando-se ao sítio de ligação deste na enzima, substituindo-o. Da mesma forma ficará aí ligado mais tempo que o ATP, prolongando a inibição enzimática.

6.2. Estudos em osteoblastos de *Sparus aurata* (linhas celulares Vsa13 e Vsa16)

6.2.1. Ejeção de H⁺ pelas células Vsa13 e Vsa16

Com o intuito de testar células vivas utilizando este sistema, procederam-se a estudos de ejeção de prótons em células de osteoblasto de *Sparus aurata*, linhas celulares Vsa13 e Vsa16 (Pombinho *et al.*, 2002). Foram escolhidas estas células porque especulou-se que poderia existir uma P-ATPase semelhante à Ca²⁺-ATPase na membrana celular destas células. Nesta hipótese, esta enzima seria o meio de entrada do Ca²⁺ para a célula, pois o receptor de Ca²⁺ descrito anteriormente, não estaria presente na análise do DNA expresso (por PCR). Posta esta hipótese procedeu-se à fase experimental, i. é, testar estas células no sistema anteriormente utilizado.

O vanádio seria útil neste estudo, pois permite inibir ATPases do tipo P (como seria o caso de uma ecto-Ca²⁺-ATPase). Deste modo poder-se-ia isolar o contributo destas enzimas para o sinal total, observando-se também qual seria o efeito do anulamento da sua actividade.

Resultados e Discussão

6.2.2. Ejeção de H^+ pelas células Vsa13 (controles)

Foram efectuados os estudos de ejeção de protões pelas células Vsa13. Estudos preliminares (resultados não apresentados) indicaram que ao adicionar um volume contendo cerca de $1,0 \times 10^6$ células e adicionando uma quantidade de ATP 10x superior aquela adicionada às VRS, obter-se-iam resultados comparáveis com os estudos anteriores (fig. 22).

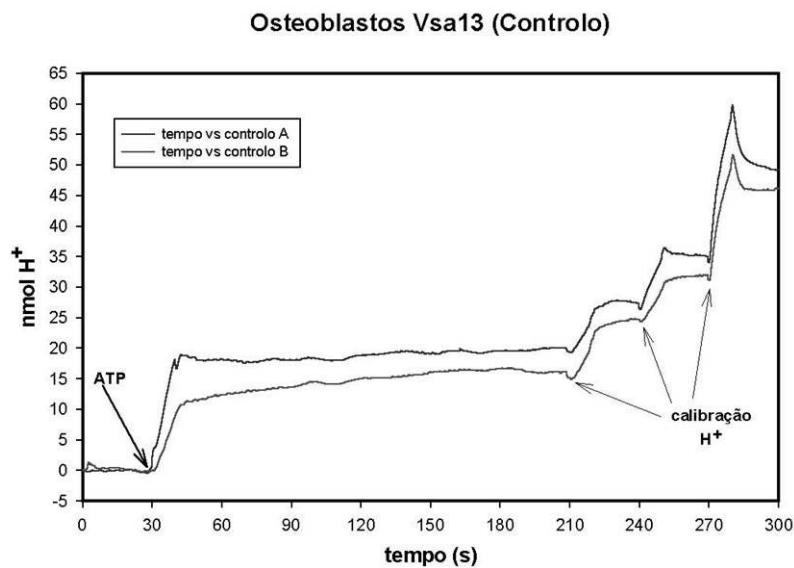


Figura 22. – Gráficos da ejeção de H^+ pelas células de osteoblasto Vsa13 (controles). Quantidade de H^+ ejectados (em nmol) vs. Tempo.

Como se pode observar, temos uma ejeção total próxima daquela observada no caso das VRS (± 20 nmol H^+), no entanto, esta é bastante mais rápida que a verificada nas VRS, ocorrendo em cerca de 30 segundos, ao passo que as VRS demoravam um pouco mais que o dobro (1 minuto). A calibração com quantidades fixas de H^+ também foi efectuada.

Resultados e Discussão

6.2.3. Ejeção de H^+ pelas células Vsa16 (controles)

Foram utilizadas as mesmas condições que no caso das Vsa13 ($1,0 \times 10^6$ células e utilizando a mesma quantidade de ATP).

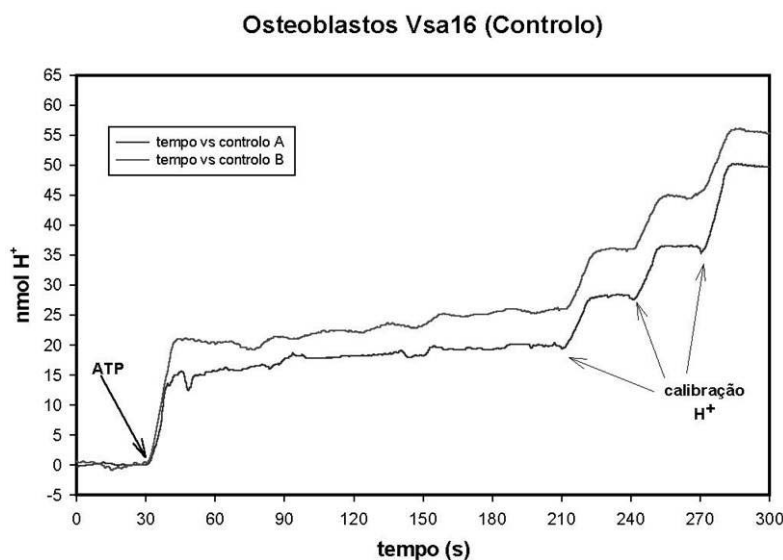


Figura 23. – Gráficos da ejeção de H^+ pelas células de osteoblasto Vsa16 (controles). Quantidade de H^+ ejectados (em nmol) vs. Tempo.

Como é observável na figura 11, a ejeção de H^+ é também na ordem dos 20 nmol H^+ , sendo igualmente rápida (cerca de 30 segundos até atingir o máximo). Mais uma vez procedeu-se à calibração com H^+ para normalizar os gráficos.

De modo a analisar melhor os resultados obtidos com as diferentes linhas celulares, decidiu-se juntar os gráficos obtidos com ambas as linhas celulares (fig. 24).

Resultados e Discussão

Linhas Celulares de Osteoblastos (Vsa13 e Vsa16)

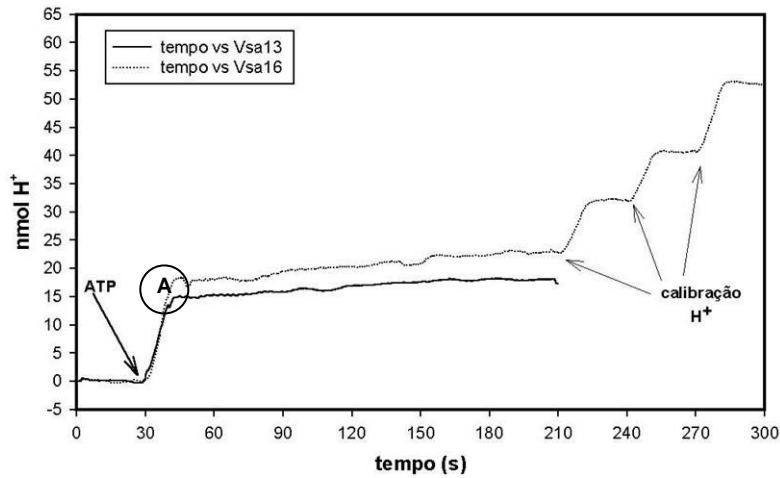


Figura 24. – Gráficos da ejeção de H⁺ pelas células de osteoblasto Vsa13 e Vsa16 . Quantidade de H⁺ ejectados (em nmol) vs. Tempo.

Neste gráfico é visível uma diferença entre a ejeção medida para ambas as linhas celulares, embora sejam necessários mais ensaios (foram utilizados dois para cada linha celular aqui). As Vsa16 tem uma ejeção aparentemente maior que as Vsa13, pelo que as diferenças podem dever-se à acção de uma ecto-Ca²⁺-ATPase presente na membrana celular. É também de notar que ambas as curvas no gráfico têm formas muito semelhantes até certo

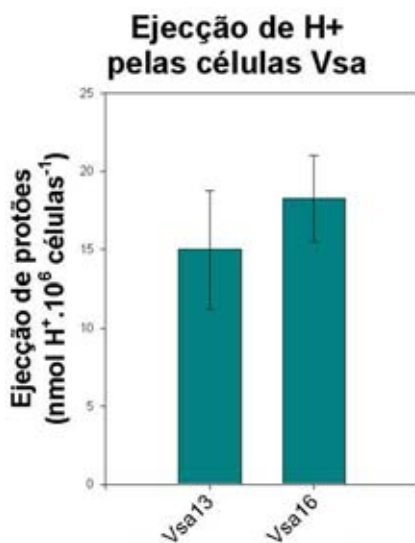


Figura 25. – Ejeção de prótons medida para ambas as linhas celulares de células derivadas de osso (Vsa13 e Vsa16).

ponto em que se separam (A). Passando estes valores para um gráfico de barras em nmol H⁺.10⁶ células⁻¹ (fig. 25), podemos ver que as células Vsa16 têm, de facto, uma maior actividade que as Vsa13. Isto pode indicar uma maior acumulação de Ca²⁺ no interior da célula, caso se trate realmente de uma proteína transportadora de Ca²⁺.

6.2.4. Resposta ao ATP pelos osteoblastos Vsa13 e Vsa16

Foi também testada a resposta ao ATP pelas células em estudo. Isto serve para correlacionar a introdução de ATP no meio com a variação de pH verificada pelo nosso sistema. Não sendo uma condição necessária e suficiente para provar que é mesmo o ATP que provoca o efeito descrito, serve, no entanto, para provar que existe uma correlação entre a quantidade de ATP e o efeito de ejeção de H^+ verificado (fig. 26).

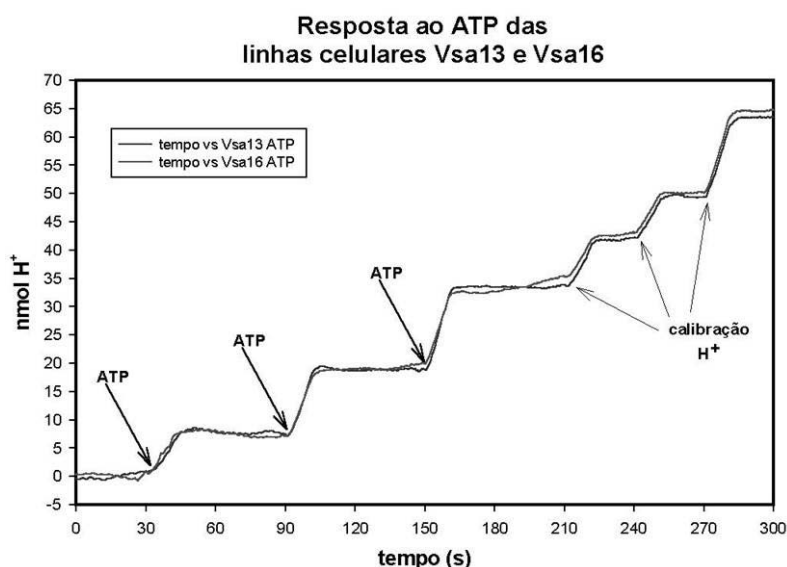


Figura 26. – Gráficos da ejeção de H^+ pela adição de ATP em células de osteoblasto Vsa13 e Vsa16 . Quantidade de H^+ ejetados (em nmol) vs. Tempo. As quantidades de ATP adicionadas são, respectivamente 5, 10 e 15 μ mol de uma solução de 100 mM.

Podemos ver que realmente existe um aumento no efeito conforme adicionamos maior quantidade de ATP, o que podemos verificar melhor neste gráfico de barras (fig. 27) construído a partir dos resultados descritos na figura anterior (fig. 26).

Resultados e Discussão

Resposta ao ATP pelas células Vsa

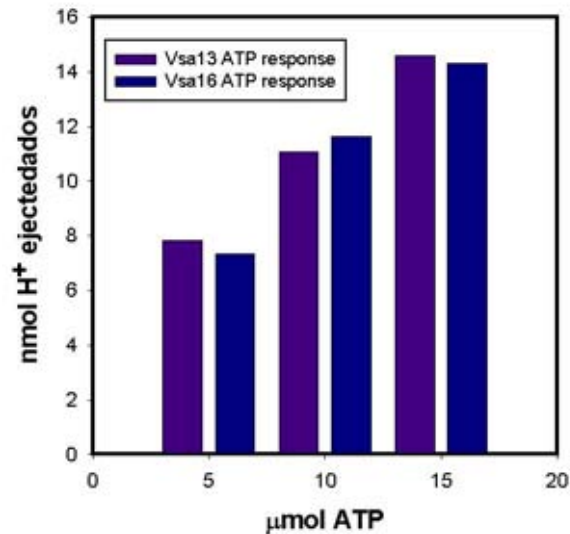


Figura 27. – Gráfico de barras da ejeção de H⁺ pelos osteoblastos Vsa13 e Vsa16 correlacionada com a quantidade de ATP adicionada.

Como se pode ver na figura 27, existe uma boa correlação entre a quantidade de ATP adicionada ao meio e a resposta (ejeção de H⁺) das células. Isto é um indício que, de facto, a ejeção de H⁺ verificada nestes estudos será induzida pela adição do ATP, i. é, que deverá existir na membrana destas células uma ecto-Ca²⁺-ATPase que introduz o Ca²⁺ no citosol. Esta hipótese poderá ser testada através da utilização de soluções de vanadatos, pois caso seja inibida pelo vanádio estaremos a tratar com uma ATPase do tipo P.

7. Conclusão

Podemos concluir, pelos resultados obtidos através deste estudo que a Ca^{2+} -ATPase do RS de *Halobatrachus dydactylus* é menos eficiente que a homóloga de *Oryctolagus cuniculus*: obteve-se uma ejeção média de 24,27 nmol H^+ .mg proteína⁻¹.min⁻¹ nas primeiras, contra os 34 nmol H^+ .mg proteína⁻¹.min⁻¹ obtidos para as VRS de coelho. Também é bastante mais susceptível à inibição pelos vanadatos, pois com metavanadato a percentagem de inibição foi de 68.4%, sendo de 84.2% para o decavanadato. O IC_{50} para a inibição pelo metavanadato foi determinado como sendo 0,1mM, enquanto que para o decavanadato será bem menor (embora não tenha sido determinado com exactidão), em estudos anteriores verificou-se um IC_{50} de 2mM estes oligómeros de vanádio.

As linhas celulares Vsa13 e Vsa16 foram estudadas com sucesso, visto que foi possível obter resultados comparáveis com os que foram obtidos nos estudos com as VRS. Verificou-se uma diferença a nível da ejeção de H^+ entre as diferentes linhas celulares, embora possa não ser significativa, pois apenas foram efectuados dois ensaios para cada linha celular. Verificou-se que a ejeção de H^+ pelas células Vsa está correlacionada com a adição de ATP ao meio.

Ficou assim provado que é possível monitorizar a actividade bioelectroquímica, tanto de vesículas do RS, como de células derivadas de osso através deste método experimental, utilizando o sistema aqui descrito.

8. Perspectivas Futuras

Futuramente, poder-se-á continuar o estudo das células Vsa utilizando os oligómeros de vanádio presentes nas soluções de metavanadato e decavanadato, de modo a afinar esta técnica e determinar as condições óptimas para o objectivo final que é a utilização dos “microelectrode arrays” nestes estudos. De interesse seria também utilizar outras concentrações das soluções de vanadatos para determinar com maior certeza os IC_{50} para a espécie *Halobatrachus dydactylus*, e talvez monitorizar em conjunto com a ejeção de H^+ , a acumulação de Ca^{2+} , o que não foi efectuado neste estudo.

9. Bibliografia

1. Aureliano, M. e Madeira, V.M.C., *Vanadate Oligoanions Interact with the Proton Ejection by the Ca^{2+} Pump of the Sarcoplasmic Reticulum*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994. **205**(1): p. 161-167.
2. Squire, J.M., *Molecular mechanisms in muscular contraction*. TINS, 1983: p. 409.
3. Lee, A.G. e East, J.M., *What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism*. Biochemical Journal, 2001. **365**: p. 655-683.
4. Carafoli, E. e Caroni, P., *Regulation of Ca^{2+} -pumping ATPase of Heart Sarcolemma by a Phosphorylation-Dephosphorylation Process*. Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**(18): p. 9371-9373.
5. Champeil, P., *et al.*, *ATP Regulation of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase: Metal-free ATP and 8-bromo-ATP bind with high affinity to the catalytic site of phosphorylated ATPase and accelerate dephosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(25): p. 12288-12294.
6. Davidson, G.A. e Berman, M.C., *Calcium Dependence during Single-cycle Catalysis of the Sarcoplasmic Reticulum ATPase*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(24): p. 11786-11791.
7. Petretski, J.H., Wolosker, H. e de Meis, L., *Activation of Ca^{2+} Uptake and Inhibition of Reversal of the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Pump by Aromatic Compounds*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(34): p. 20339-20343.
8. de Meis, L., *Fast Efflux of Ca^{2+} Mediated by the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(9): p. 5736-5742.

9. Verbost, P.M., *et al.*, *Cadmium Inhibition of the Erythrocyte Ca²⁺ Pump: A Molecular Interpretation*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(10): p. 5613-5616.
10. Yu, X. e Inesi, G., *Variable Stoichiometric Efficiency of Ca²⁺ and Sr²⁺ Transport by the Sarcoplasmic Reticulum ATPase*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(9): p. 4361-4367.
11. Aureliano, M., *Vanadate oligomer inhibition of passive and active Ca²⁺ translocation by the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum*. Journal of Inorganic Chemistry, 2000. **80**: p. 145-147.
12. Henao, F., *et al.*, *The Metal Sites on Sarcoplasmic Reticulum Membranes That Bind Lanthanide Ions with the Highest Affinity Are Not the ATPase Ca²⁺ Transport Sites*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(15): p. 10302-10312.
13. Martinoia, S., *et al.*, *Development of ISFET array-based microsystems for bioelectrochemical measurements of cell populations*. Biosensors & Bioelectronics, 2001. **16**: p. 1043-1050.
14. Desrosiers, M.G., *et al.*, *Purification and Characterization of the Ca²⁺-ATPase of Flavobacterium odoratum*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(7): p. 3945-3951.
15. Niggli, V., *et al.*, *Purified (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase of the Erythrocyte Membrane*. Journal of Biological Chemistry, 1980. **256**(1): p. 395-401.
16. Peiffer, W.E., Desrosiers, M.G. e Menick, D.R., *Cloning and Expression of the Unique Ca²⁺-ATPase from Flavobacterium odoratum*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(9): p. 5095-5100.

17. McIntosh, D.B. e Ross, D.C., *Reaction Cycle of Solubilized Monomeric Ca^{2+} -ATPase of Sarcoplasmic Reticulum Is the Same as That of the Membrane Form*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(25): p. 12220-12223.
18. Clarke, D.M., et al., *Functional Consequences of Glutamate, Aspartate, Glutamine, and Sparagine Mutations in the Stalk Sector of the Ca^{2+} -ATPase of Sarcoplasmic Reticulum*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(19): p. 11246-11251.
19. Ferreira, S.T. e Verjovski-Almeida, S., *Fluorescence Decay of Sarcoplasmic Reticulum ATPase: ligand binding and hydration effects*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(26): p. 15392-15397.
20. Maruyama, K., et al., *Functional Consequences of Alterations to Amino Acids Located in the Catalytic Center (Isoleucine 348 to Threonine 357) and Nucleotide-binding Domain of the Ca^{2+} -ATPase of Sarcoplasmic Reticulum*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(22): p. 13038-13042.
21. Nakamura, J., *pH and Temperature Resolve the Kinetics of Two Pools of Calcium Bound to the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(29): p. 17029-17031.
22. Seebregts, C.J. e McIntosh, D.B., *2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-8-Azido-adenosine Mono-, Di-, and Triphosphates as Photoaffinity Probes of the Ca^{2+} -ATPase of Sarcoplasmic Reticulum: regulatory/superfluorescent nucleotides label the catalytic site with high efficiency*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(4): p. 2043-2052.
23. Suzuki, H., et al., *Changes in the Steady-state Fluorescence Anisotropy of N-Iodoacetyl-N'-(5-Sulfo-1-Naphthyl) Ethylenediamine Attached to the*

Specific Thiol of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase throughout the Catalytic Cycle. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(2): p. 920-927.

24. Colyer, J. e Wang, J.H., *Dependence of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump Activity on the Phosphorylation Status of Phospholamban.* Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(26): p. 17486-17493.

25. Davidson, G.A. e Varhol, R.J., *Kinetics of Thapsigargin-Ca²⁺-ATPase (Sarcoplasmic Reticulum) Interaction Reveals a Two-step Binding Mechanism and Picomolar Inhibition.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(20): p. 11731-11734.

26. Engelen, S., Wolosker, H. e de Meis, L., *The Ca²⁺-ATPase Isoforms of Platelets Are Located in Distinct Functional Ca²⁺ Pools and Are Uncoupled by a Mechanism Different from That of Skeletal Muscle Ca²⁺-ATPase.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(36): p. 21050-21055.

27. Juul, B., et al., *Do Transmembrane Segments in Proteolyzed Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Retain Their Functional Ca²⁺ Binding Properties after Removal of Cytoplasmic Fragments by Proteinase K?* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(34): p. 20123-20134.

28. Lopez, M.M. e Kosk-Kosicka, D., *How Do Volatile Anesthetics Inhibit Ca²⁺-ATPases?* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(47): p. 28239-28245.

29. Mintz, E., et al., *The Modulation of Ca²⁺ Binding to Sarcoplasmic Reticulum ATPase by ATP Analogues Is pH-dependent.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(45): p. 27160-27164.

30. Reddy, L.G., *et al.*, *Functional Reconstitution of Recombinant Phospholamban with Rabbit Skeletal Ca²⁺-ATPase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(16): p. 9390-9397.
31. Chen, L., *et al.*, *Short and Long Range Functions of Amino Acids in the Transmembrane Region of the Sarcoplasmic Reticulum ATPase: a mutational study*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(18): p. 10745-10752.
32. Shivanna, B.D. e Rowe, E.S., *Preservation of the native structure and function of Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum : Solubilization and reconstitution by new short-chain phospholipid detergent 1,2-diheptanoyl-sn-phosphatidylcholine*. *Biochemical Journal*, 1997. **325**: p. 533-542.
33. Dalton, K.A., *et al.*, *Interaction of phosphatidic acid and phosphatidylserine with the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum and the mechanism of inhibition*. *Biochemical Journal*, 1998. **329**: p. 637-646.
34. Kargacin, M.E., Ali, Z. e Kargacin, G.J., *Anti-phospholamban and protein kinase A alter the Ca²⁺ sensitivity and maximum velocity of Ca²⁺ uptake by the cardiac sarcoplasmic reticulum*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **331**: p. 245-249.
35. Shi, D., *et al.*, *Three-dimensional Crystals of Ca²⁺-ATPase from Sarcoplasmic Reticulum: Merging Electron Diffraction Tilt Series and Imaging the (h, k, 0) Projection*. *Journal of Molecular Biology*, 1998. **284**: p. 1547-1564.
36. Duggleby, R.C., East, J.M. e Lee, A.G., *Luminal dissociation of Ca²⁺ from the phosphorylated Ca²⁺-ATPase is sequential and gated by Mg²⁺*. *Biochemical Journal*, 1999. **339**: p. 351-357.

37. Gutiérrez-Merino, C. e Merino, J.M., *pH and ligand binding modulate the strength of protein-protein interactions in the Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum membranes*. Biochimica et Biophysica Acta, 1999. **1420**: p. 203-213.
38. Yamada, A., et al., *Inhibition of smooth-muscle myosin-light-chain phosphatase by Ruthenium Red*. Biochemical Journal, 1999. **348**: p. 797-804.
39. Guerini, D., Zecca-Mazza, A. e Carafoli, E., *Single Amino Acid Mutations in Transmembrane Domain 5 Confer to the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump Properties Typical of the Ca²⁺ Pump of Endo(sarco)plasmic Reticulum*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(40): p. 31361-31368.
40. Chaudhary, J., et al., *Caloxin: a novel plasma membrane Ca²⁺ pump inhibitor*. American Journal of Physiology, 2001. **280**(Cell Physiology): p. 1027-1030.
41. Heal, R.D., et al., *Development of a neuronal pressure sensor*. Biosensors & Bioelectronics, 2001. **16**: p. 905-909.
42. Kargacin, G.J., et al., *Iodide and Bromide inhibit Ca²⁺ uptake by Cardiac Sarcoplasmic Reticulum*. American Journal of Physiology, 2001. **280**(Heart and Circulation Physiology): p. 1624-1634.
43. Vallot, O., Combettes, L. e Lompre, A.-M., *Functional coupling between the caffeine/ryanodine-sensitive Ca²⁺ store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells*. Biochemical Journal, 2001. **357**: p. 363-371.
44. Gutiérrez-Martín, Y., et al., *Synaptosomal Plasma Membrane Ca²⁺ Pump Activity Inhibition by Repetitive Micromolar ONOO⁻ Pulses*. Free Radical Biology & Medicine, 2002. **32**(1): p. 46-55.