



Universidade do Algarve  
Unidade de Ciências Exactas e Humanas

## Interacção de oligómeros de vanadato com miosina de músculo esquelético



Relatório de estágio de Licenciatura em Bioquímica

Teresa Paula Martins Tiago

Orientado por: Prof. Doutor Manuel Alves

Faro, 2000

“Toda a nossa ciência, contraposta à realidade, é primitiva e infantil. No entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein (1879-1955)

## Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Manuel Alves, meu orientador científico, pela oportunidade que me concedeu na realização deste trabalho, pela orientação e conhecimentos que me transmitiu, pela revisão atenta desta dissertação e sobretudo pela amizade.

Ao Prof. Dr. Rui Duarte, pela sempre disponibilidade, pela amizade e por todo o apoio prestado durante este último ano lectivo.

Ao Prof. Doutor José Moura, pelo apoio, perspectivas futuras e por me ter concedido a utilização do aparelho de RMN instalado no departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, fundamental para a realização do presente estudo.

À Dra. Maria do Rosário Caras Altas, pela ajuda preciosa na utilização do aparelho de RMN.

Ao corpo docente da Licenciatura em Bioquímica da Universidade do Algarve, por tudo o que me transmitiram ao longo destes cinco anos de curso.

Aos meus colegas de curso, em especial à Vanessa, ao Luís e ao Vítor, pelos muitos bons momentos passados, pelos muitos trabalhos realizados em conjunto, por todo o apoio e pela grande Amizade.

Ao Pedro, por toda a atenção, amor e incentivo que me transmitiu ao longo do curso e a toda a sua família, pelo apoio incondicional, amizade e carinho ajudando a transformar estes cinco anos de curso, nos melhores da minha vida.

Ao meu irmão, Daniel, pela sua colaboração na realização deste trabalho e especialmente pelo companheirismo, paciência e amizade que teve sempre para comigo.

Aos meus pais, por desde cedo me terem inculcido o “bichinho” da Ciência e a paixão pelo conhecimento, por todo o amor, carinho, amizade e compreensão que sempre tiveram para comigo, por serem responsáveis por eu ter conseguido chegar até aqui e a quem eu devo tudo o que sou. Ficarei eternamente grata!

E a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para o meu sucesso, os meus sinceros agradecimentos.

## Resumo

Grande parte da importância biológica que se atribui ao vanádio, está associada à sua forma pentavalente (vanadato), que por virtude de ser um análogo estrutural do ortofosfato, tem efeitos inibitórios, estimulatórios e regulatórios em processos bioquímicos que, em muitos casos se devem à formação de complexos enzima-vanadato via substrato. Um exemplo disso, é o da inibição da actividade ATPásica da miosina pelo vanadato, a qual se deve à formação de um complexo ternário estável M-ADP- $V_i$  no sítio activo da proteína. Contudo, nas soluções de vanádio (+5),  $V_i$  pode coexistir em equilíbrio com diferentes espécies oligoméricas ( $i = 1 - 10$ ), tais como a monomérica ( $V_1$ ), dimérica ( $V_2$ ), tetramérica ( $V_4$ ) e decamérica ( $V_{10}$ ). Por este motivo, a contribuição de diferentes espécies oligoméricas de vanadato na inibição da actividade ATPásica da miosina foi estudada, combinando-se estudos de cinética enzimática com espectroscopia de  $^{51}\text{V}$ -RMN.

Os estudos cinéticos indicaram que a solução de “decavanadato” contendo essencialmente duas espécies de vanadato,  $V_1$  e  $V_{10}$ , tem um poder inibitório muito superior à solução de “metavanadato” contendo uma mistura de pelo menos quatro espécies de vanadato diferentes ( $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_4$  e  $V_5$ ) e ainda que, a inibição da actividade ATPásica da miosina pelas espécies oligoméricas  $V_4$  e  $V_{10}$  é diminuída na presença de ATP. Para além disso, os estudos espectroscópicos por  $^{51}\text{V}$ -RMN indicaram que  $V_4$  exhibe uma resposta, em adição ao ATP, oposta e mais profunda relativamente a  $V_1$ , sugerindo que contrariamente à interacção de  $V_1$  com a miosina, a interacção de  $V_4$  é desfavorecida na presença de ATP.

Conclui-se que para além de  $V_1$ , também as espécies oligoméricas  $V_4$  e  $V_{10}$  interagem com a miosina, contribuindo para a inibição da enzima. Como tal, as diferentes espécies oligoméricas de vanadato são passíveis de serem utilizadas como sondas no estudo da hidrólise do ATP pela proteína envolvida no processo de contracção muscular.

## Abstract

Most of the biological importance of vanadium is associated with its pentavalent form (vanadate) that by virtue of being a structural analogue of orthophosphate, has inhibitory, stimulatory and regulatory effects in biochemical processes, which in many cases are due to the formation of enzyme-vanadate complexes through substrate. An example of that is the myosin ATPase activity inhibition by vanadate, caused by the formation of a stable ternary M-ADP- $V_i$  complex in the protein active site. Nevertheless, in vanadium (+5) solutions,  $V_i$  can coexist in equilibrium with different oligomeric species ( $i = 1 - 10$ ), such as monomeric ( $V_1$ ), dimeric ( $V_2$ ), tetrameric ( $V_4$ ) and decameric ( $V_{10}$ ). In this purpose, the contribution of different oligomeric vanadate species to the inhibition of myosin ATPase activity was studied by combining kinetic studies with  $^{51}\text{V}$ -NMR spectroscopy.

The kinetic studies showed that the “decavanadate” solution, containing essentially two different vanadate species,  $V_1$  and  $V_{10}$ , has a stronger inhibitory effect than “metavanadate” solution, containing a mixture of at least four different vanadate species ( $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_4$  and  $V_5$ ), and also that, the inhibition of myosin ATPase activity by  $V_4$  and  $V_{10}$  oligomeric species, is reverted by the presence of ATP. Besides, the  $^{51}\text{V}$ -NMR spectroscopic studies showed that  $V_4$  exhibit an opposed and deeper response to the ATP addition than  $V_1$ , suggesting that contrarily to  $V_1$ , the interaction of  $V_4$  with myosin is not favoured by ATP.

It is concluded that besides  $V_1$ , also  $V_4$  and  $V_{10}$  interact with myosin, contributing to the inhibition of the enzyme. Therefore, the different oligomeric species can be use as probes in the study of the hydrolysis of ATP by myosin involved in the muscle contraction process.

## Abreviaturas

ADP – adenosina 5'-difosfato

AMP – adenosina 5'-monofosfato

AMPc – AMP cíclico

AMPPNP – adenosina paranitrofenilfosfato

Ar – argon

ATP – adenosina 5'-trifosfato

ATPase – adenosina 5'-trifosfatase

Coa – coenzima A

Da – Dalton

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FAD – flavina adenina dinucleotido

g – aceleração da gravidade

GSH – glutationa reduzida

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

HMM – meromiosina pesada

Hz – ciclos por segundo (hertz)

IC<sub>50</sub> – concentração inibitória, 50%

LB – alargamento da banda

LMM – meromiosina leve

M – miosina

Mios – miosina

NADH – nicotinamida adenina dinucleotido (forma reduzida)

NADP – nicotinamida adenina dinucleotido fosfato

Pi – ortofosfato (sem especificar o grau de protonação)

PPi – pirofosfato

pKa – log da constante de dissociação

PMSF – fluoreto de fenil metil sulfunil

ppb – partes por bilhão

ppm – partes por milhão

RMN – ressonância magnética nuclear

RPE – ressonância paramagnética electrónica

S<sub>1</sub> – subfragmento 1

S<sub>2</sub> – subfragmento 2

SDS – dodecil sulfato de sódio

TCA – ácido tricloroacético

TEMED – (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina)

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

V<sub>i</sub> – ortovanadato (sem especificar o grau de protonação)<sup>ix</sup>

---

# Índice

Agradecimentos .....	iv
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
Abreviaturas .....	ix
<b>I – Introdução</b> .....	<b>1</b>
I.1 – História, ocorrência e uso do vanádio .....	1
I.2 – A química do vanádio.....	3
I.2.1 – Vanádio (IV): vanadilo .....	4
I.2.2 – Vanádio (V): vanadato .....	4
I.3 – O vanádio em sistemas biológicos.....	7
I.3.1 – Acumulação e metabolismo do vanádio pelos seres vivos .....	7
I.3.2 – Efeitos fisiológicos do vanádio .....	8
I.3.3 – Efeito do vanádio na actividade de enzimas .....	10
I.3.3.1 – Espécie monomérica .....	11
I.3.3.2 – Espécie dimérica e tetramérica .....	12
I.3.3.3 – Espécie decamérica .....	13
I.3.3.4 – Activação de enzimas.....	13
I.4 – Utilização do vanádio (V) como sonda cinética e espectroscópica no estudo da ATPase da miosina .....	14
I.4.1 – Miosina: um motor celular.....	14
I.4.1.1 – A molécula de miosina .....	15
I.4.1.2 – Mecanismo genérico da contracção .....	17
I.4.2 – Efeito do vanádio (V) no mecanismo da contracção .....	18
I.4.3 – Estudo da ligação de vanadato à miosina por <sup>51</sup> V-RMN.. ..	21
I.4.3.1 – Aspectos gerais da espectroscopia de RMN.....	21
I.4.3.2 – Características espectroscópicas do núcle de <sup>51</sup> V.....	22
I.5 - Objectivo .....	24
<b>II – Procedimento Experimental</b> .....	<b>25</b>
II.1 – Material .....	25
II.1.1 – Material biológica .....	25
II.1.2 – Equipamento .....	25
II.1.3 – Reagentes .....	25
II.2 – Isolamento e caracterização da miosina .....	27

II.2.1 – Isolamento .....	27
II.2.2 –Análise quantitativa da proteína.....	29
II.2.3 –Análise do estado de pureza do material isolado.....	29
II.3 – Preparação das soluções stock de vanadato .....	31
II.4 – Ensaio enzimáticos .....	31
II.5 – Espectroscopia de <sup>51</sup> V-RMN .....	32
II.6 – Tratamento de resultados .....	33
II.6.1 – Cinética enzimática .....	33
II.6.2 – Espectroscopia de <sup>51</sup> V-RMN .....	33
III – Resultados e Discussão .....	34
III.1 – Isolamento e caracterização da miosina .....	34
III.1.1 – Isolamento: considerações gerais .....	34
III.1.2 – Caracterização .....	36
III.1.2.1 – Análise quantitativa da proteína .....	36
III.1.2.2 – Análise do estado de pureza do material isolado .....	36
III.1.2.3 – Análise da actividade enzimática .....	37
III.2 – Caracterização das soluções de vanadato .....	38
III.2.1 – Identificação das espécies .....	39
III.2.2 – Efeito da concentração .....	41
III.2.3 – Estabilidade das soluções de vanadato .....	43
III.2.4 – Complexos de vanadato .....	44
III.3 – Inibição da ATPase da miosina por espécies de vanadato .....	45
III.3.1 – Cinética enzimática .....	45
III.3.1.1 – Efeito do ATP .....	45
III.3.1.2 – Efeito da incubação .....	50
III.4 – Interação de espécies de vanadato com a miosina.....	52
III.4.1 – Interação de V <sub>1</sub> e V <sub>4</sub> .....	52
III.4.2 – Efeito do ATP na interação de V <sub>1</sub> e V <sub>4</sub> com a miosina.....	55
IV – Conclusões .....	60
V – Estudos futuros .....	62
VI – Referências Bibliográficas .....	63
Anexos	

## I – Introdução

Apesar de hoje em dia estar bem estabelecido que o vanádio exerce potentes efeitos numa vasta gama de sistemas vivos, a função do vanádio *in vivo* permanece uma questão em aberto (Chasteen, 1983). Na verdade, a química excepcionalmente complexa que o vanádio apresenta tem originado sucessivas interpretações incorrectas desde o momento em que este elemento foi descoberto, constituindo um problema adicional que certamente os cientistas não esperavam quando descobriram importantes acções biológicas deste elemento vestigial, nomeadamente como inibidor de determinadas ATPases, como por exemplo, a miosina do músculo esquelético, estudada no presente trabalho. Desta forma, é de particular importância caracterizar a química deste metal antes de se tentar caracterizar a sua interacção com o sistema em estudo (Crans, 1985). Nesse sentido, as propriedades químicas e espectroscópicas do vanádio que são relevantes para o estudo da bioquímica deste elemento, receberão aqui uma atenção especial. Para além disso, serão ainda brevemente abordados todos aqueles aspectos da bioquímica e fisiologia relacionados com o vanádio, que actualmente são bem conhecidos.

### I.1 – História, ocorrência e uso do vanádio

Poucos elementos descobertos durante os dois últimos séculos, tiveram uma história tão romântica como a do vanádio. O próprio nome dá-nos, alegoricamente, ligações entre a química, a mitologia e a música.

O vanádio foi descoberto em 1801 por Andrés Manuel del Rio, que o designou por pancrómio devido à extraordinária gama de cores que os sais deste elemento apresentam. Infelizmente, del Rio perdeu confiança na sua descoberta, pensando que afinal esse elemento era apenas o crómio, descoberto recentemente por Fourcroy. Passados trinta anos, o vanádio foi redescoberto por Nils Gabriel Sefstrom, que assim o designou, em

honra da deusa da mitologia nórdica, Vanadis, que representa a beleza e o amor (Chasteen, 1983).

Na crosta terrestre, o vanádio é o décimo nono elemento mais abundante, com uma concentração de 136 ppm. Encontra-se amplamente distribuído em rochas, solos, plantas, animais e numa menor extensão em águas, onde os níveis raramente excedem 0,1 ppb (Chasteen, 1983). A sua abundância é cerca de duas vezes a do cobre, dez vezes a do chumbo e dez vezes a do molibdénio. É o décimo quinto metal de transição mais abundante a seguir ao Fe, Ti, Mn e Zr (Grenwood e Earnshaw, 1997). No ambiente, não existe como metal, mas antes como um mineral. A maioria dos países extrai o vanádio a partir de combustíveis fósseis como o crude (4%), o carvão ou o alcatrão. Nestes fósseis, o vanádio encontra-se maioritariamente na forma de porfirinas de vanadilo, existentes também em sistemas vivos. Estes complexos são depois convertidos no óxido  $V_2O_5$  em fornos, constituindo o principal material de origem para a produção de todos os compostos de vanádio. Durante este processo acabam por ser libertados para a atmosfera grandes quantidades deste composto, que podem causar problemas tais como o de catalizar a conversão de  $SO_2$  em  $SO_3$ , produzindo chuvas ácidas (Etchevery e Cortizo, 1998). A guerra do Golfo (1991) fez aumentar significativamente a quantidade de vanádio na atmosfera, sob esta forma, contribuindo por isso, para um renovado interesse deste elemento.

O vanádio é largamente usado na indústria química, especialmente na produção de  $H_2SO_4$  e plásticos, na produção de diversos tipos de aço, na energia atômica, na tecnologia espacial e outras indústrias de alta tecnologia. Em menos de 100 anos, o vanádio passou de um metal raro e obscuro, para se tornar num de grande importância militar bem como um pilar da tecnologia moderna (Nriagu, 1998).

## I.2 – A química do vanádio

O vanádio é um metal de transição do bloco d, cuja configuração electrónica a partir do Ar é  $4s^2 3d^3$ . Tem um número atómico de 23 e uma massa molecular de 51. A sua química é caracterizada por múltiplos estados de oxidação que vão desde (-1) a (+5). Na Tabela I.1 mostra-se a relação entre os quatro estados de oxidação mais altos do vanádio.

Tabela I.1 – Compostos de vanádio em solução (adaptado de Heslop e Jones, 1987).

Número de Carga do vanádio	+5	+4	+3	+2
Espécie correspondente mais comum e agentes redutores apropriados	$\text{VO}_3^-$	$\xrightarrow{\text{Fe}^{2+}}$ $\text{VO}_2^+$	$\xrightarrow{\text{Sn}^{2+}, \text{Ti}^{3+} \text{ ou } \text{SO}_2}$ $\text{V}^{3+}$	$\xrightarrow{\text{Zn} \text{ ou } \text{Cr}^{2+}}$ $\text{V}^{2+}$
Cor em solução aquosa	incolor	azul	verde	violeta
Potencial redox		+1,0 V	+0,3 V	-0,2 V
Compostos típicos	$\text{NH}_4\text{VO}_3$	$\text{VOCl}_2$ $\text{VOSO}_4$	$\text{V}_2(\text{SO}_4)_3$	$\text{VSO}_4$
Complexos típicos		$\text{VO}(\text{SCN})_4^{2-}$	$\text{V}(\text{NH}_3)_6^{3+}$	$\text{V}(\text{CN})_6^{4-}$

Dos quatro estados de oxidação apresentados, apenas o V(III), V(IV) e V(V) são biologicamente importantes, já que o V(II) é demasiado redutor para existir em qualquer organismo conhecido, e destes, os mais comuns são o V(IV) e o V(V). A química do vanádio é extremamente rica devido à facilidade que este elemento tem em assumir diferentes números e geometrias de coordenação, algumas das quais estão ilustradas na Fig. I.1 (Crans et al., 1998).

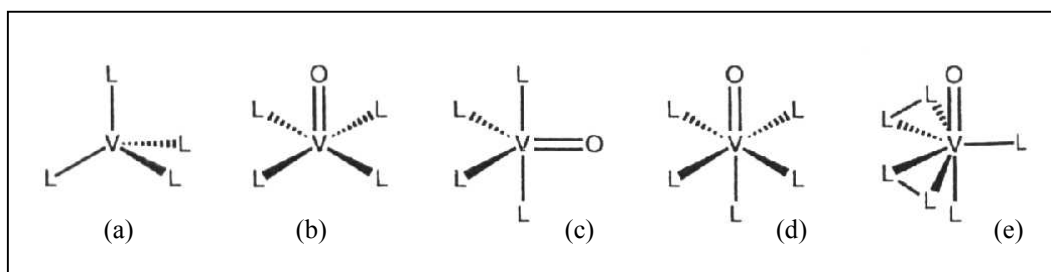


Figura I.1 – Geometrias idealizadas de complexos de vanádio com diferentes números de coordenação. (a) tetraédrica, (b) pirâmide quadrangular, (c) bipirâmide trigonal, (d) octaédrica e (e) bipirâmide pentagonal.

### I.2.1 - Vanádio (IV): vanadilo

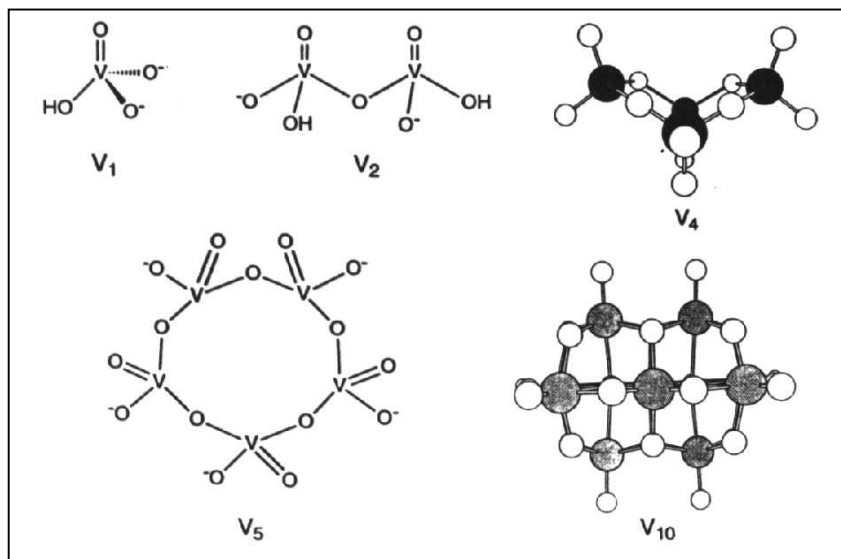
Em solução aquosa, a química do vanádio (IV) encontra-se em torno do ião oxovanádio ou vanadilo,  $\text{VO}^{2+}$ , que forma complexos penta e hexa coordenados. Permanece estável apenas em meios ácidos, sendo rapidamente oxidado a valores de pH superiores a 3. A pH fisiológico, forma-se um precipitado de  $\text{VO}(\text{OH})_2$  e somente em soluções muito alcalinas se apresenta novamente como uma espécie solúvel,  $\text{VO}(\text{OH})_3^-$ .

O vanádio (IV) é rapidamente formado a partir de vanádio (V) na presença de qualquer agente redutor em solução aquosa, nomeadamente aqueles muito comuns em células como o ácido ascórbico, a glutathione (GSH), a cisteína ou o NADH. Por este motivo, é muito provavelmente o principal estado de oxidação existente nos sistemas biológicos. Por formar fortes complexos com diversos ligandos, tais como proteínas, citrato, ATP, PPI e aminoácidos livres, é muito improvável que o  $\text{VO}^{2+}$  exista livre nestes sistemas, excepto talvez, em vacúolos ácidos como os lisossomas (Chasteen, 1983).

### I.2.2 - Vanádio (V): vanadato

O vanádio pentavalente  $\text{V}(\text{V})$ , é a forma redox mais estável em sistemas aquosos. A pH ácido forma um catião,  $\text{cis-VO}_2^+$  que complexa com agentes quelantes, tais como o EDTA. A valores de pH fisiológicos ou mais elevados, aparecem os vanadatos, que são aniónicos e que tendem a formar complexos polinucleares. As soluções de vanadato, são normalmente preparadas a partir de ortovanadato de sódio,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , contendo espécies orto ( $\text{VO}_{4n}$ ) que são favorecidas a valor de pH entre 1 e 10, ou de metavanadato de sódio,  $\text{NaVO}_3$ , contendo espécies meta ( $\text{VO}_{3n}$ ) que são favorecidas a valores de pH intermédio (6-8). Estes sais, ao pH fisiológico, originam as mesmas espécies em solução após se estabelecer um equilíbrio (Chasteen, 1983).

Ao longo da gama de concentrações mais frequentemente empregues em estudos bioquímicos ( $\mu\text{M}$  –  $\text{mM}$ ), sob condições neutras, as formas predominantes de vanadato são o monómero ( $V_1$ ), dímero ( $V_2$ ), tetrâmero ( $V_4$ ), pentâmero ( $V_5$ ) e o decâmero ( $V_{10}$ ) (Fig. I.3).



**Figura I.3** – Estruturas propostas dos oxovanadatos  $V_1$  ( $\text{HVO}_4^{2-}$ ),  $V_2$  ( $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$ ),  $V_4$  ( $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ ),  $V_5$  ( $\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$ ) e  $V_{10}$  ( $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$ ) (Crans, 1993).

Grande parte da importância biológica que se atribui ao vanádio, está associada ao monómero,  $\text{VO}_4^{3-}$ , por ser um análogo estrutural e electrónico do fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Plass, 1999). Inclusivamente, presume-se que o  $\text{HVO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  e  $\text{H}_3\text{VO}_4$  que se formam por protonação do  $\text{VO}_4^{3-}$ , sejam análogos dos derivados de fosfato correspondentes. Por exemplo, as ligações V-O rondam os 0,17 nm comparados com os 0,152 nm da ligação P-O. Aparentemente, o vanadato pode adquirir uma geometria tetraédrica, análoga ao estado fundamental do fosfato, ou ainda uma geometria bipirâmide trigonal, análoga ao estado de transição do fosfato. Para além disso, o ácido vanádico,  $\text{H}_3\text{VO}_4$  ( $\text{pK}_a = 3,5; 7,8, 12,5$ ) é mais fraco do que o ácido fosfórico,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $\text{pK}_a = 1,7; 6,5; 12,1$ ), o que poderá justificar, em parte, a ligação preferencial do vanadato às enzimas (Chasteen, 1983).

O vanadato monomérico, oligomeriza para originar o dímero ( $V_2O_7^{4-}$ ), que dependendo do pH também pode existir em várias formas protonadas ( $HV_2O_7^{3-}$ ,  $H_2V_2O_7^{2-}$  e  $H_3V_2O_7^-$ ). No caso do  $V_2$ , a analogia com o pirofosfato, PPI, é usualmente presumida, apesar da falta de evidência da estrutura em solução aquosa. Após formação de  $V_2$ , é formado o vanadato tetramérico ( $V_4O_{12}^{4-}$ ). O  $V_4$  é a espécie maioritária em soluções mais concentradas e é muitas vezes referida como “metavanadato”. A última espécie a ser formada é a pentamérica ( $V_5O_{15}^{3-}$ ) (Crans, 1993).

O  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_4$  e  $V_5$  são os principais vanadatos presentes numa solução aquosa, embora possam ser formados ainda outros oligómeros, provavelmente o mais importante em termos bioquímicos seja o decavanadato ( $V_{10}O_{28}^{6-}$ ). Este último composto, é a espécie predominante em soluções moderadamente ácidas (pH 2-6) quando o vanadato está presente em concentrações superiores a 100  $\mu$ M (Stankiewicz et al., 1987).

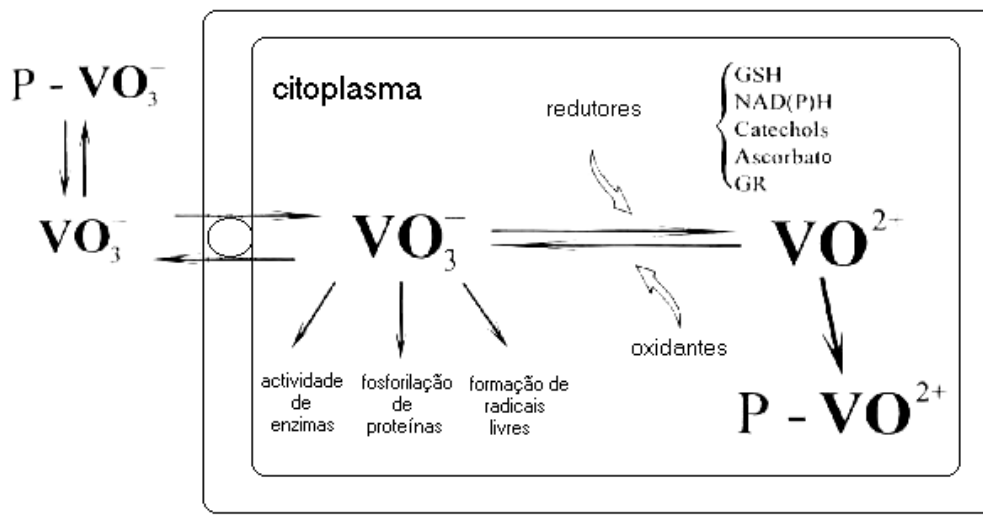
## I.3 – O vanádio em sistemas biológicos

### 1.3.1 – Acumulação e metabolismo do vanádio pelos seres vivos

Poucos organismos concentram o vanádio em quantidades apreciáveis. Excepções bem conhecidas são alguns cogumelos da espécie *Amanita* e os ascídeos (ou tunicatos). A partir do género *Amanita muscaria*, foi isolado um composto contendo vanádio no estado de oxidação (IV), designado por amavidina, cuja função não está ainda bem esclarecida, mas provavelmente fará parte de um sistema de protecção contra a danificação de tecidos (Chasteen, 1983). Os tunicatos, têm a capacidade de acumular o vanádio numa forma reduzida, V(III), em concentrações que chegam a atingir 1 M. Capturam-no nas formas  $\text{HVO}_4^{2-}$  ou  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  presentes na água do mar, e incorporam-no em vacúolos (vanadóforos) de células sanguíneas especializadas (vanadócitos). Uma vez dentro dos vacúolos, os vanadatos são reduzidos às formas  $\text{V}^{3+}$  e  $\text{VO}^{2+}$  por um pigmento designado por tunicromo, ao qual os catiões se podem associar (Fraústo da Silva e Williams Clarendon, 1997).

Também na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, usada no fabrico de cerveja, se verificou que possuía a capacidade de acumular concentrações de vanádio (IV) na ordem dos milimolar, em compartimentos específicos (Bode et al., 1990).

Nos mamíferos, nomeadamente em estudos realizados com ratos, verificou-se que independentemente do estado de oxidação administrado por via venosa, a maior parte do vanádio adopta o estado de oxidação (IV) (Chasteen, 1983). Em condições normais, a absorção do vanádio pode tomar lugar por inalação, pelo tracto intestinal e ainda pela pele (em menores quantidades). Através da comida, entram no organismo, diariamente, até 30  $\mu\text{g}$  de vanádio, e pelo ar, dependendo do grau de poluição, cerca de 1  $\mu\text{g}$ . Uma vez absorvido, pensa-se que o vanádio entra nas células através de um sistema de transporte aniónico usado pelo fosfato, sendo reduzido por agentes redutores existentes nas células (Zaporowska e Scibor, 1998) (Fig. I.4).



**Figura I.4** – Transporte de vanádio para a célula e o seus efeitos nos processos intracelulares. P, proteína; GSH, glutatona reduzida; GR, glutatona reductase (adaptado de Zaporowska e Scibor, 1998).

O vanádio (IV) é posteriormente complexado pela proteína transportadora de ferro, transferrina (Chasteen, 1981). Apesar de uma pequena parte do vanadilo (IV) ser reoxidado a vanadato (Fig. I.4), a complexação da espécie reduzida impede uma acumulação de vanádio (V) pelas células, impedindo as ações inibitórias deste elemento cujos efeitos podem causar severos danos celulares.

O vanádio é especialmente armazenado em órgãos ricos em ferritina, tais como o fígado. Outros sítios de retenção do vanádio são os ossos e o baço. Muito pouco vanádio é retido no corpo sob condições fisiológicas normais. A quantidade total de vanádio é de cerca de 100  $\mu\text{g}$ , com muitos tecidos contendo menos de 10  $\text{ng/g}$  de tecido (Etcheverry et al., 1998).

### I.3.2 – Efeitos fisiológicos do vanádio

O vanádio é um elemento vestigial, essencial para determinados animais devido às suas actividades fisiológicas e bioquímicas. A toxicologia e metabolismo do vanádio está

bem estabelecido em animais e humanos. Tem propriedades benéficas a concentrações muito baixas (1-10 nM) mas para concentrações superiores torna-se tóxico (Nechay, 1984). A suspeita de que o vanádio pudesse ser um elemento essencial, foi confirmada por volta dos anos 70, com estudos desenvolvidos em ratos e frangos (Erdmann et al., 1984). Estes animais, ao serem criados com uma alimentação contendo reduzidas quantidades de vanádio, apresentavam várias deficiências, tais como crescimento retardado, aumento dos níveis de colesterol no plasma, malformação óssea, entre outras. De facto os efeitos fisiológicos do vanádio parecem ser muito diversificados (Fig. I.5). Sabe-se que este elemento reduz a biossíntese de colesterol e os níveis de triglicéridos no plasma; estimula o consumo de glicose, bem como a síntese de glicogénio levando-o por isso a mimetizar a insulina (recentemente o vanádio tem sido usado como agente terapêutico no tratamento da diabetes) (Shechter, 1990); existem evidências de que possa induzir a mineralização dos dentes e ossos em animais; tem um efeito positivo e negativo na força de contracção do músculo cardiovascular, entre outros efeitos (Chasteen, 1983).

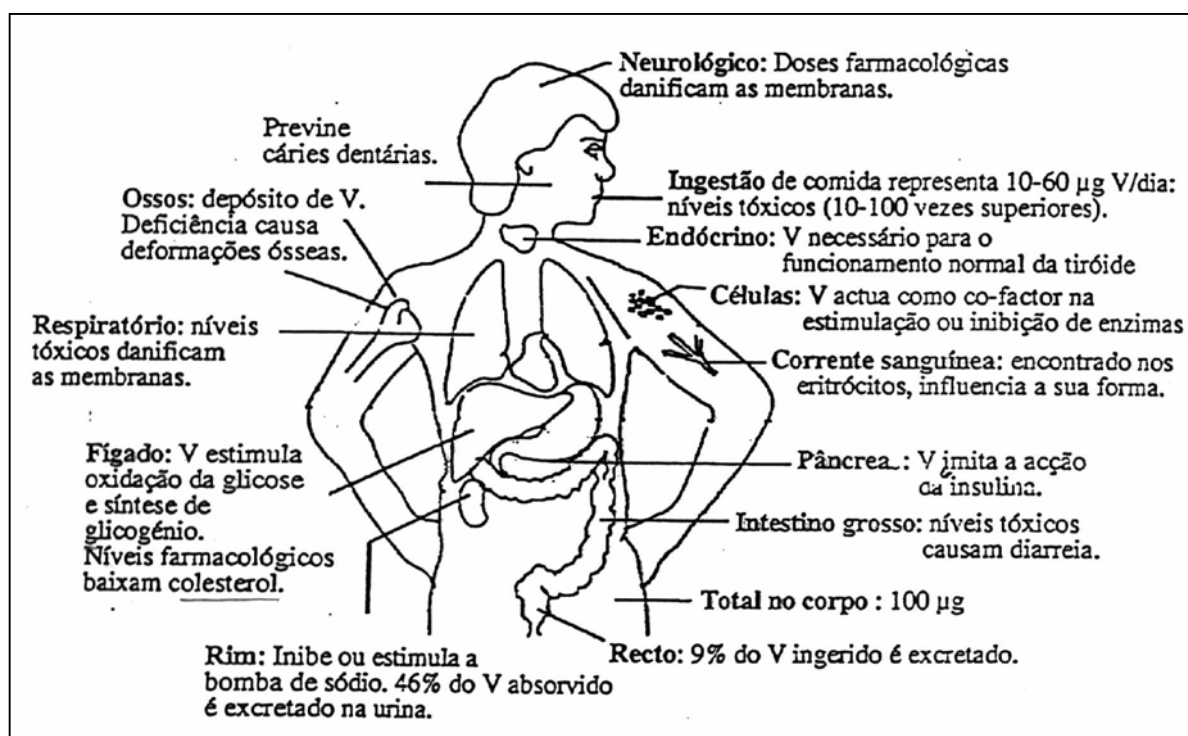


Figura I.5 – Diversos efeitos fisiológicos do vanádio (Aureliano, 1995).

Apesar dos muitos estudos desenvolvidos *in vivo* e *in vitro*, até agora não foi possível atribuir uma função específica ao vanádio em humanos e animais superiores. Contudo, o facto de certas haloperoxidases, existentes em formas de vida inferiores, requererem o vanádio para a sua actividade, sugere uma possível função dos compostos de vanádio na haloperoxidase da tiroide, em animais superiores (Etcheverry et al., 1998).

### I.3.3 – Efeito do vanádio na actividade de enzimas

A inibição da ribonuclease pelo vanádio foi a primeira referência da acção deste metal na actividade de uma enzima (Lindquist et al., 1973). Este efeito supressor da actividade da ribonuclease pelo complexo vanadilo (IV)-uridina mostrou-se útil no isolamento de RNA mensageiro de linfócitos, quando os tradicionais inibidores de RNAases se mostraram inoperantes para essa função. Posteriormente, verificou-se que as fosfatases ácidas e alcalinas, que se supõem passarem por um intermediário fosforilado, são fortemente inibidas pelo vanádio (Van Etten et al., 1974). Esta descoberta, sugeriu que este metal pudesse ser utilizado como sonda cinética de mecanismos enzimáticos que envolvessem a hidrólise de ligações éster de fosfato. Porém, estes estudos receberam pouca importância até que, em 1977, Cantley e seus colaboradores identificaram uma impureza no ATP comercial (Sigma) preparado a partir de músculo esquelético de cavalo. Essa impureza foi identificada como sendo o vanádio (V) responsável pela inibição da bomba de sódio,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (Josephson e Cantley, 1977). A partir de então, este inibidor natural foi extensamente usado para estudar o mecanismo da bomba de sódio e impulsionou os cientistas a estudar a acção do vanádio em diversas enzimas.

### I.3.3.1 – Espécie monomérica

A maioria dos efeitos biológicos do vanádio são atribuídos ao vanadato monomérico,  $\text{VO}_4^{3-}$ . Este actua como análogo do fosfato mas, tem também a capacidade de exibir actividade biológica através das espécies oligoméricas suas derivadas.

Nos processos enzimáticos que envolvem uma hidrólise de um grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ou a transferência de um grupo fosforilo ( $\text{PO}_3^-$ ), crê-se que o intermediário da reacção se encontra pentacoordenado, apresentando uma estrutura bipiramide trigonal. A espécie monomérica, ( $\text{VO}_4^{3-}$ ), nas formas livre e complexada pode formar facilmente este tipo de estrutura, formando assim um análogo do estado de transição do substrato. Apesar de muitos investigadores não especificarem as espécies activas de vanadato, os seus estudos são muitas vezes realizados a concentrações de vanadato tão baixas que a espécie maioritária em solução, é a monomérica (Chasteen, 1983). Na Tabela I.2, apresentam-se constantes de inibição do vanádio para algumas enzimas, atribuídas à forma monomérica.

**Tabela I.2** – Valores de constantes de inibição ou de  $\text{IC}_{50}$  para algumas enzimas, atribuídas à forma monomérica (adaptado de Chasteen, 1983).

Enzima	$K_i$ ou $\text{IC}_{50}$ (M)
Ribonuclease (linfócitos humanos)	$1 \times 10^{-5}$
Fosfatase ácida (fígado humano)	$2 \times 10^{-7}$
Fosfatase ácida (embrião de trigo)	$6,7 \times 10^{-7}$
Fosfatase alcalina (Escherichia coli)	$4 \times 10^{-7}$
$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase (rim de cão)	$4 \times 10^{-9}$
ATPase de miosina (músculo esquelético de coelho)	$< 10^{-6}$
$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (RS de músculo esquelético de coelho)	$50 \times 10^{-6}$
$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (glóbulo vermelho humano)	$1,5 \times 10^{-6}$

### I.3.3.2 – Espécies dimérica e tetramérica

Mesmo para concentrações de vanádio (V) muito baixas encontram-se vestígios de espécies poliméricas de vanadato que podem influenciar a actividade enzimática. Por exemplo, uma solução de vanadato de concentração 60  $\mu\text{M}$  a pH 7,0 e 1 M KCl, contém cerca de 1,2  $\mu\text{M}$  de divanadato e 0,3  $\mu\text{M}$  de tetravanadato, livres em solução.

A analogia estrutural entre o divanadato e o pirofosfato, sugerem que o  $\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$  tem o potencial de interactuar com sítios de ligação de cofactores tais como o NAD, NADP, FAD e CoA. Curiosamente, o divanadato mostrou-se um bom inibidor competitivo contra o NADP,  $K_i \sim 0,12 \text{ mM}$ , mas um fraco inibidor contra o NAD,  $K_i \sim 15 \text{ mM}$ , relativamente à enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (Crans, 1990). O divanadato, também se mostrou um inibidor competitivo da fructose-1,6-bifosfato aldolase,  $K_i \sim 0,23 \text{ mM}$  e um inibidor não-competitivo da glicerol-3-fosfato desidrogenase (Stankiewicz, 1994). Um efeito ainda mais potente, foi observado com a fosfoglicerato mutase (PGM). Esta enzima liga o  $\text{V}_2$  a cada uma das suas duas subunidades com uma constante de dissociação intrínseca de  $4 \times 10^{-6} \text{ M}$  (Crans, 1994).

Aparentemente, o vanadato tetramérico  $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ , não tem uma analogia estrutural com substratos ou cofactores e como tal, durante algum tempo acreditou-se ser uma forma inactiva de vanadato. Em 1990, estudos com a enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) indicaram, pela primeira vez, o  $\text{V}_4$  como inibidor competitivo em relação ao substrato, e não-competitivo com respeito ao cofactor. Hoje, conhecem-se outras enzimas que são inibidas pelo tetravanadato, incluindo uma desidrogenase, isomerase, aldolase e fosfolipase específica do fosfatidil inositol. Na maioria dos casos, a afinidade do  $\text{V}_4$  para as enzimas é modesta, com um  $K_i$  que varia entre concentrações de micro a milimolar (Crans, 1994). Uma excepção, é a afinidade do  $\text{V}_4$  pela enzima superóxido dismutase (SOD) com um  $K_i \sim 5 \times 10^{-5} \text{ mM}$  (Wittenkeller et al., 1991). Contudo, qualquer afinidade

destas enzimas para o  $V_4$  é surpreendente, considerando a sua estrutura, e pelo facto de, por exemplo, o vanadato pentamérico ( $V_5$ ) não interagir com nenhuma destas enzimas.

### I.3.3.3 – Espécie decamérica

De entre as formas de vanádio no estado livre ou complexado, a espécie decamérica  $V_{10}O_{28}^{6-}$  é de todos os inibidores conhecidos, um dos mais potentes. Já em 1973, foi referido que a espécie oligomérica de vanádio (V), decavanadato, inibia a adenilatocinase de músculo esquelético de coelho. Mais recentemente o decavanadato mostrou-se um bom inibidor não-competitivo da hexocinase ( $K_i = 62 \mu\text{M}$ ) e da fosfofructocinase ( $K_i = 20 \mu\text{M}$ ). Verificou-se também, que a cinase dependente de AMPc é inibida de uma forma não-competitiva em relação ao ATP ( $K_i = 0,8 \text{ mM}$ ) e de uma forma competitiva em relação ao substrato ( $K_i = 1,4 \text{ mM}$ ). De todos os exemplos conhecidos, o decavanadato liga-se a sítios específicos de ligação de polifosfatos de enzimas ou de receptores, quer no domínio do substrato, quer num sítio alostérico (Stankiewicz, 1994).

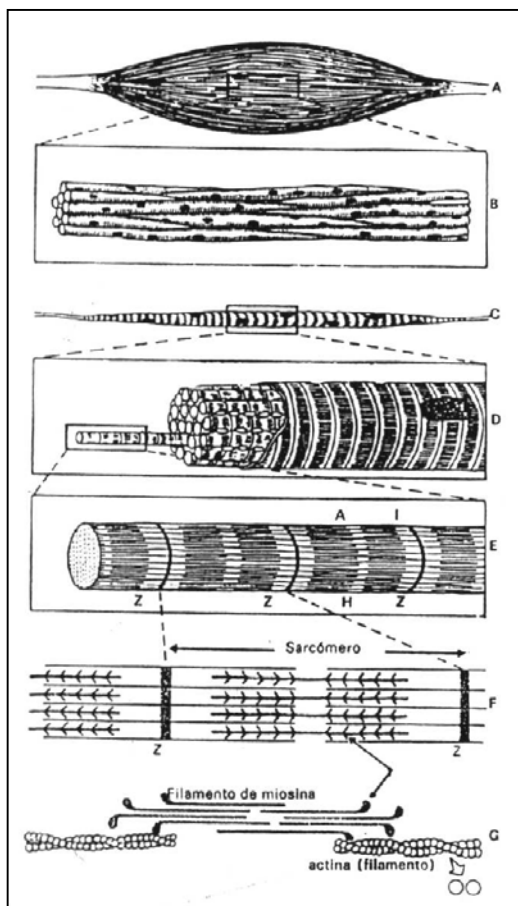
### I.3.3.4 – Activação de enzimas

Contrariando o comportamento inibidor até agora referido para o vanádio, verifica-se que algumas enzimas são estimuladas por este elemento. Temos por exemplo o caso da adenilatociclase (cataliza a formação de AMPc) que é estimulada seis vezes na presença de 3 mM de vanadato (Nechay, 1984), ou da glucose 6-fosfato desidrogenase que reduz a glicose muito mais eficientemente na presença de vanadato por formar facilmente ésteres de vanadato análogos aos ésteres de fosfato envolvidos na reacção catalítica, ou ainda o caso da fosfoglicerato mutase e da fosfoglicerato fosfatase cujas actividades são estimuladas na presença da espécie dimérica de vanadato (Crans, 1994).

## I.4 – Utilização do vanádio (V) como sonda cinética e espectroscópica no estudo da ATPase da miosina

### I.4.1 – Miosina: um motor celular

A contração muscular depende da interação de dois tipos de filamentos citoplasmáticos que se interpenetram: os filamentos finos (constituídos por actina) e os filamentos grossos (constituídos por miosina). Esta acção é mediada pelas “cabeças” de miosina, que têm a capacidade de ligar actina e induzir movimento utilizando energia proveniente da hidrólise de ATP. No músculo esquelético (tipo de músculo em estudo), estes dois tipos de filamentos organizam-se em unidades funcionais bem definidas designadas de sarcómeros (Fig. I.6), e a contração resulta, neste caso, num encurtamento destas unidades (Bagshaw, 1987).



**Figura I.6** – Organização geral do músculo esquelético. Um músculo esquelético (A) é constituído por feixes de miofibras (B). Cada fibra muscular (C e D) é composta por miofibrilas (E) divididas em sarcómeros (F). Os sarcómeros têm dois tipos de filamentos que se interpenetram parcialmente (F e G), contactando pelas cabeças de miosina. Os filamentos finos de actina são obtidos por polimerização de actina G e os filamentos grossos por aglomeração de moléculas de miosina.

### 1.4.1.1 – A molécula de miosina

A molécula de miosina de peso molecular 480 kDa é composta de dois pares de cadeias leves não idênticas, e um par de cadeias pesadas. Os domínios C-terminais das duas cadeias pesadas enrolam-se numa estrutura em “coiled-coil” para formar uma “cauda”, enquanto que o N-terminal de cada cadeia pesada, forma uma zona globular semelhante a uma cabeça (Fig. I.7). Grande parte do que se sabe sobre a relação estrutura/função da molécula de miosina foi conseguido por proteólise controlada desta proteína. Assim, pela acção de proteases é possível obter vários fragmentos a partir da molécula de miosina de entre os quais se destacam o fragmento HMM (meromiosina pesada) e S<sub>1</sub> (subfragmento 1), que mantêm as propriedades essenciais no que se refere à actividade ATPásica e interacção com a actina (Bagshaw, 1987) (Fig. I.7).

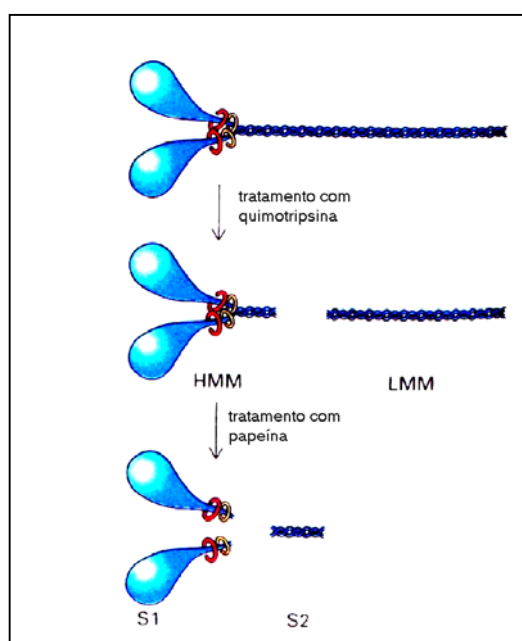
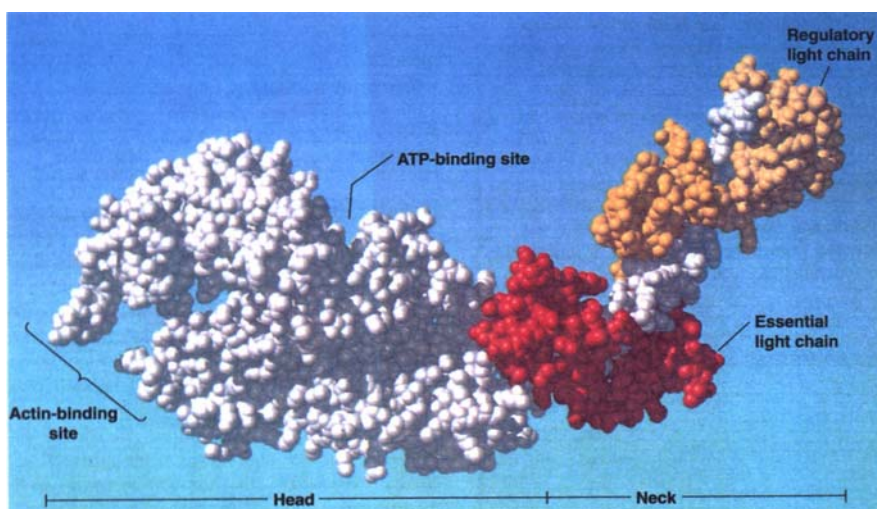


Figura I.7 – Acção de proteases para obtenção de fragmentos da molécula de miosina. A tripsina quebra a molécula na zona flexível da “cauda” em dois fragmentos designados por meromiosina pesada (HMM) e meromiosina leve (LMM). A papaína, quebra a molécula entre a zona das “cabeças” e a “cauda” formando dois fragmentos: S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> (adaptado de Lodish et al., 1998).

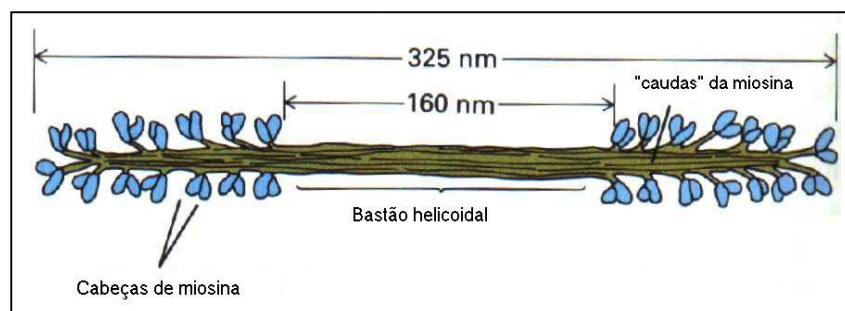
Estes estudos confirmaram que a miosina está organizada em três domínios: “cabeça”, “pescoço” e “cauda”. A região da “cabeça” (zona cinzenta à esquerda) contém um local activo (direccionado para cima) que catalisa a hidrólise de ATP, e um outro local de ligação à actina (direccionado para baixo) (Fig. I.8). Na região do pescoço, encontram-se localizados um dos pares de cadeias leves essenciais (a vermelho) com pesos

moleculares de 18 e 23 kDa e um dos pares de cadeias leves regulatórias (a amarelo) de pesos moleculares de cerca de 20 kDa (Fig. I.8). O papel destas últimas cadeias na contracção muscular não está ainda bem esclarecido. Sabe-se que a estimulação do músculo induz a um aumento na percentagem de fosforilação das cadeias leves e que a fosforilação afecta a actividade ATPásica da miosina (Barany, 1982; Stepkowski et al., 1985).



**Figura I.8** – Estrutura tridimensional da “cabeça” de miosina revelada por cristalografia de raios-X (Lodish et al., 1998).

A região da cauda, contém os sítios de ligação que a permitem agregar-se a outras caudas, formando o filamento grosso. A agregação é em regra simétrica, com as “cabeças” em ambos os lados do filamento e no meio, uma zona distinta que contém apenas as “caudas” entrelaçadas (Fig. I.9).



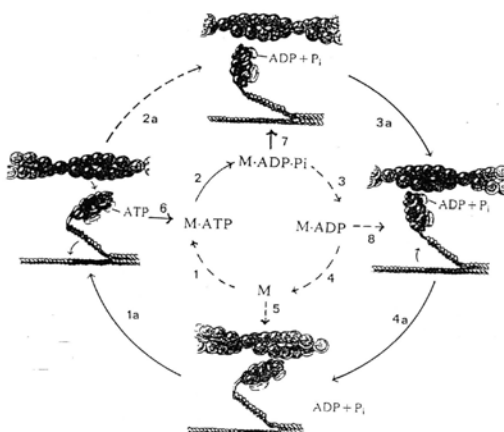
**Figura I.9** – Moléculas de miosina associadas pelas “caudas” formando um filamento com zonas distintas. Uma constituída apenas pelas “cabeças” e outra pelo bastão helicoidal (adaptado de Lodish et al., 1998).

Além de proteína estrutural, a miosina é também uma enzima especializada, uma ATPase, que tem a capacidade de acoplar a energia resultante da hidrólise de ATP a alterações conformacionais, com a concomitante produção de movimento. Esta enzima é activada pela interacção com a actina. A miosina purificada possui uma actividade baixa (2 moléculas de ATP/mole de miosina por minuto). A hidrólise de ATP é efectivamente rápida, mas a libertação dos produtos de hidrólise constitui o passo lento da reacção. Quando a miosina se liga à actina, a hidrólise de ATP aumenta significativamente (até 200 vezes) indicando que a actina estimula a libertação de Pi e ADP das “cabeças” de miosina.

#### I.4.1.2 – Mecanismo genérico da contracção

Os processos elementares da hidrólise de ATP pelo complexo actomiosina, foram primeiramente caracterizados por Lynn e Taylor, em 1971, e actualmente constituem uma referência comum na discussão de estudos sobre o mecanismo de hidrólise de ATP pela miosina ou sobre o processo da contracção muscular (Geeves e Holmes, 1999; Kitamura et al., 1999; Higshmith, 1999).

A hidrólise de ATP pela actomiosina no processo da contracção muscular, envolve quatro passos principais: ligação do ATP (1), hidrólise do ATP (2), formação de “pontes” entre as “cabeças” de miosina e o filamento de actina (3) e libertação de Pi e ADP (4) (Lynn e Taylor, 1971) (Fig. I.10).



**Figura I.10** – Modelo proposto do mecanismo de hidrólise de ATP pela actomiosina no processo da contracção muscular. O processo dominante da hidrólise de ATP observado *in vitro*, é indicado pelas setas a cheio.

Na ausência de ATP, o músculo esquelético adquire características de grande rigidez, na medida em que a miosina se encontra fortemente ligada à actina. Este estado designa-se por *rigor mortis* e é adquirido após a morte do organismo. É a ligação de uma molécula de ATP ao local activo da miosina, que enfraquece a interacção entre a actina e a miosina, porque a afinidade da M-ATP para a actina é 105 vezes menor do que a afinidade da miosina para a actina sem o substrato. Após dissociação da “cabeça” de miosina do filamento de actina, o ATP é hidrolizado, a ADP e Pi, provocando uma alteração de conformação. Na nova conformação, a “cabeça” de miosina encontra-se pronta a ligar uma nova subunidade no filamento de actina. Nesta situação, o músculo encontra-se no estado relaxado, em que não se liberta mais do que 15% da energia disponível. A energia obtida da hidrólise de ATP, fica assim armazenada na “cabeça” da miosina na forma de um intermediário relativamente estável M-ADP-Pi, e só é libertada após ligação da “cabeça” da miosina ao filamento de actina. O Pi e o ADP são então rapidamente libertados da “cabeça” de miosina, do que resulta uma alteração no ângulo formado entre as “cabeças” de miosina e o filamento de actina. Como resultado, parte da energia libertada é acoplada à produção de movimento. Todo este processo cíclico demora cerca de 1 milissegundo. Cada filamento de miosina contém centenas de “cabeças” de miosina, e em períodos de rápida contracção, cada uma dessas “cabeças” é utilizada 5 vezes por segundo (Bagshaw, 1982).

#### I.4.2 – Efeito do vanádio (V) no mecanismo da contracção

O mecanismo da hidrólise de ATP catalisado pela miosina, tem sido estudado em grande detalhe devido ao seu significado funcional. A forma ideal de o estudar, seria abrandar o processo enzimático até ao ponto em que fosse possível observar com exactidão os intermediários que ocorrem. Apesar do ideal ser inatingível, é possível obter complexos de miosina que imitem os intermediários de transição que ocorrem durante a hidrólise de

ATP pela miosina. Um desses complexos, que imita o intermediário miosina-productos é formado pela ligação do ADP e do ião vanadato ao local activo da miosina (Goodno, 1982).

No local activo da miosina, dá-se a hidrólise da molécula de ATP por um mecanismo do tipo  $SN_2$ , com formação de um intermediário pentacoordenado de fósforo, que adopta uma estrutura bipiramide trigonal, e subsequente libertação de ortofosfato (Fig. I.11) (Goody et al., 1981).

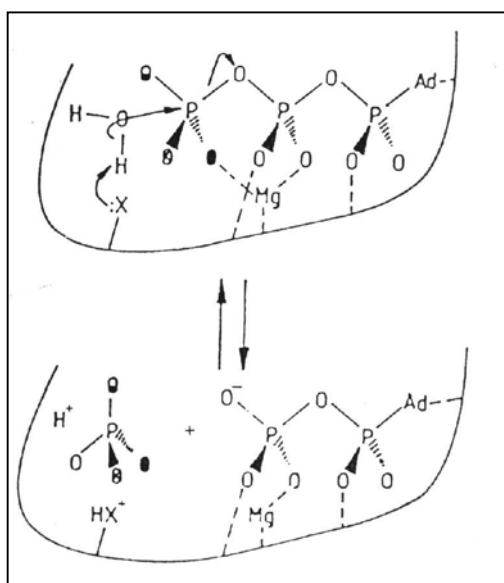
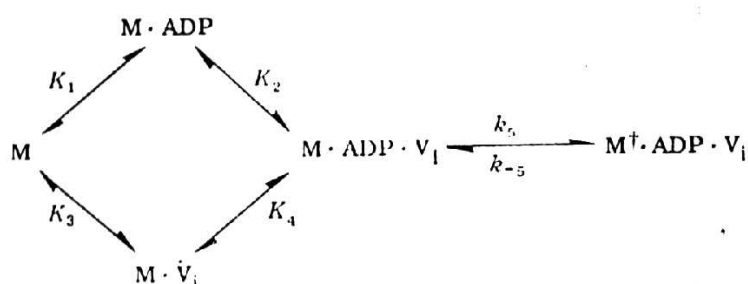


Figura I.11 – Hidrólise de ATP pela miosina. Ataque nucleofílico do tipo  $SN_2$  pela água e formação de um intermediário pentacoordenado de fósforo (Goody et al., 1981).

Como já foi referido na secção I.2, a espécie monomérica de vanádio (V),  $VO_4^{3-}$ , também pode formar facilmente este tipo de estrutura, tornando-se assim um análogo do estado de transição do substrato durante a reacção enzimática. Esta analogia estrutural com o estado intermediário, justifica assim a acção inibitória da espécie monomérica de vanádio (V) sobre a ATPase da miosina.

Contrariamente à sua interacção reversível com outras enzimas, o Vi forma um complexo com a miosina que parece ser inigualavelmente estável. O Vi sózinho forma um complexo com a miosina reversível e fraco, tal como o fosfato, mas, quando é adicionado ADP é formado um complexo enzimático inactivo e estável. Este complexo tem uma estequiometria de 1 ADP e 1 Vi por sítio activo, e a incorporação do Vi é altamente

específica pois quaisquer dos compostos AMP, ATP, AMPPNP ou PPi não substituem o ADP. Na figura I.12, é proposto o mecanismo de formação do complexo vanadato estável, proposto por Goodno (1982). Um rápido pré-equilíbrio induz a formação de um complexo ternário reversível (M-ADP-Vi) que isomeriza lentamente para o complexo estável  $M^{\dagger}$ -ADP-Vi.



**Figura I.12** – Mecanismo de formação do complexo estável de vanadato. A formação de M-ADP-Vi é rápida e reversível mas a isomerização é essencialmente irreversível, formando um complexo estável  $M^{\dagger}$ -ADP-Vi (Goodno, 1982).

Uma notável diferença entre os complexos M-ADP-Vi e M-ADP-Pi é que neste último, o Pi dissocia-se com um tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) de cerca de 12 segundos, enquanto que no primeiro o Vi dissocia-se com um  $t_{1/2}$  maior do que 24 horas, a 25 °C. Esta diferença pode ser explicada pela possível complexação do vanádio com grupos nucleofílicos no local activo, estabilizando a miosina na conformação  $M^{\dagger}$ -ADP-Vi.

Com base na cinética de inibição da ATPase da miosina, pelo vanadato, têm sido publicadas importantes contribuições para a caracterização do local activo da miosina (Emoto et al., 1985; Munson et al., 1986; Golitsina et al., 1996), para a detecção de alterações conformacionais da miosina provocadas pela hidrólise de ATP (Hiratsuka, 1990; Highsmith, 1999) e para a caracterização da interface actina-miosina (Kawamura e Tawada, 1981; Dijk et al., 1998).

A miosina é a única enzima descrita até à data, como sendo inibida via formação de um complexo proteína-ADP-Vi. No entanto, para além da espécie monomérica pouco se sabe à cerca da contribuição das outras espécies oligoméricas de vanádio (V) na inibição da ATPase da miosina. Foi sugerido que a espécie tetramérica é responsável pela clivagem fotolítica da miosina induzida por vanadato. A fotólise, resulta na clivagem da proteína num resíduo de serina específico do local activo (Ringel et al., 1990). Para além disso, a espécie decamérica de vanádio (V) também inibe a ATPase da miosina, envolvendo no entanto outros locais de interacção com a miosina (Aureliano, 2000).

### I.4.3 –Estudo da ligação de vanadato à miosina por $^{51}\text{V}$ -RMN

#### I.4.3.1 – Aspectos gerais da espectroscopia de RMN

A ressonância magnética nuclear, é uma técnica espectroscópica que monitoriza a absorção de energia associada a transições de núcleos entre níveis de energia magnética nuclear adjacentes. A energia é medida como uma função da força do campo magnético externo aplicado, e o resultado é um espectro de absorção em função da força do campo (Cantor e Schimmel, 1997). O espectro de RMN, apresenta bandas de ressonância de forma lorentziana, na região das radiofrequências do espectro electromagnético, com os seguintes parâmetros espectrais (Fig.I.13):

- 1) desvio químico,  $\delta$  - refere-se à posição de cada banda em relação ao desvio químico de referência,  $\delta_0$ ;
- 2) amplitude – altura da banda em unidades arbitrárias;
- 3) intensidade – área da banda;
- 4) largura a meia altura,  $\Delta\nu_{1/2}$  – medida da largura da banda a metade da amplitude máxima (em Hz);

- 5) constante de acoplamento de spin,  $J$  – separação (em Hz) entre as bandas de um multipletto;
- 6) tempos de relaxação de spin nuclear longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ).

Todos estes parâmetros podem ser usados para obter informações sobre a estrutura, ambiente químico, mobilidade, concentração, interação entre moléculas, ou ainda sobre processos cinéticos.

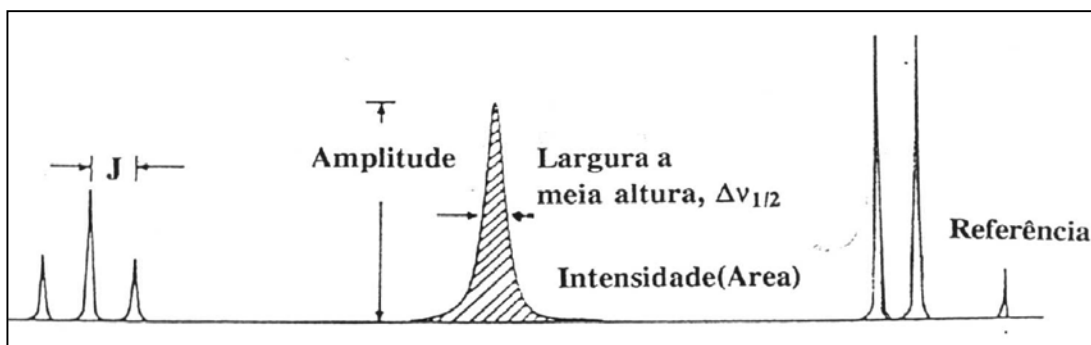


Figura I.13 – Parâmetros espectrais de RMN (adaptado de James, 1975).

#### I.4.3.2 – Características espectroscópicas do núcleo de $^{51}\text{V}$

As propriedades magnéticas do vanádio adequam-se bem a estudos espectroscópicos. O isótopo 51 de vanádio, tem uma abundância natural perto de 100 %, um spin nuclear de  $7/2$  e uma sensibilidade de 39 % relativamente à do protão. Apesar do  $^{51}\text{V}$  possuir um momento quadrupolar, as bandas dos vanadatos tetraédricos ou aproximadamente tetraédricos, não são excessivamente largas, 60 – 100 Hz (largura a meia altura). Estas características, tornam o núcleo de  $^{51}\text{V}$  um dos mais bem sucedidos em estudos de RMN, particularmente em estudos que envolvam as espécies diamagnéticas de vanádio (V), já que as bandas das espécies paramagnéticas (como as do vanádio (IV)) alargam-se tanto que deixam de se observar (Chasteen, 1983).

De uma maneira geral, obtém-se uma boa correlação entre as simetrias do centro de coordenação (tetraédrica, octaédrica, bipiramidal trigonal) e os desvios químicos (que

variam entre  $-480$  e  $-600$  ppm relativamente à referência  $\text{VOCl}_3$ ) ou as larguras a meia altura dos sinais de  $^{51}\text{V}$ -RMN (Redher, 1982).

Como seria de esperar, em núcleos que possuem momentos quadrupolares, os valores de  $\Delta\nu_{1/2}$  dependem da simetria de coordenação, e por isso a formação de compostos com simetrias distorcidas contribui para o aumento desse valor, como é o caso do complexo  $\text{VO}_2(\text{EDTA})^{3-}$  (Redher, 1982) (Tabela I.3).

**Tabela I.3** – Valores de largura a meia altura,  $\Delta\nu_{1/2}$ , observados em vários tipos de coordenação de átomos de vanádio (adaptado de Redher, 1982).

Simetria do vanádio	Complexo ou espécie	$\Delta\nu_{1/2}$
Tetraédrico	$\text{VOCl}_3$ ; $\text{VO}_4^{3-}$	$< 10 - 60$
Quase tetraédrico	$\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ; ${}^{\text{cc}}\text{VO}_4^{3-}$	80
Tetragonal	$\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ ; $\text{V}_3\text{O}_9^{3-}$	150 – 180
Tetragonal	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	150 (10A) <sup>a</sup>
(com átomos de V vizinhos)	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	150 (10B) <sup>a</sup>
	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	350 (10C) <sup>a</sup>
Rômbico	$\text{VO}_2(\text{EDTA})^{3-}$	800

<sup>a</sup> 10A, 10B e 10C, referem-se às três bandas que se observam no espectro de  $^{51}\text{V}$ -RMN correspondentes à espécie decamérica.

Assim, se uma determinada espécie de  $^{51}\text{V}$  na presença de uma enzima, como por exemplo a miosina, sofrer um alargamento acentuado do seu respectivo sinal, é possível que esse alargamento resulte de uma interacção (covalente ou não) dessa espécie com a enzima (Ringel, 1990; Wittenkeller, 1991; Crans, 1994).

Por outro lado, como cada espécie de vanadato origina uma ressonância bem resolvida no espectro de  $^{51}\text{V}$ -RMN, a distribuição das espécies pode ser calculada a partir da integração dos sinais correspondentes. Isto torna possível correlacionar a actividade enzimática da enzima, com a concentração das diferentes espécies de vanadato em solução e conseqüentemente, identificar a espécie responsável pela inibição observada (Crans e Schelble, 1990).

## I.5 - Objectivo

O presente estudo tem por objectivo avaliar a interacção das diferentes espécies oligoméricas de vanadato com a miosina de músculo esquelético de coelho. Nesse sentido, combinando-se estudos de espectroscopia de  $^{51}\text{V}$ -RMN com estudos de cinética enzimática, procurou-se correlacionar os efeitos inibitórios provocados por duas soluções de vanadato na ATPase da miosina, com as diferentes espécies presentes nessas soluções.

Este estudo foi realizado num sistema de miosina contendo cinases e fosfatases de forma a que a enzima se encontrasse próxima das condições fisiológicas.

## II - Procedimento experimental

### II.1 - Material

#### II.1.1 - Material biológico

A miosina em estudo foi obtida a partir de músculo esquelético de coelho. Foram utilizados coelhos domésticos jovens entre dois a três Kg.

#### II.1.2 - Equipamento

Todo o equipamento utilizado na realização do trabalho experimental, com exceção daquele mais correntemente usado em laboratório encontra-se no Quadro II.1.

Quadro II.1 - Equipamento utilizado na realização do trabalho experimental

<i>Equipamento</i>	<i>Marca / Modelo</i>
Agitador (vortex)	Labinco L 46
Balança analítica	Oertling
Banho termostatzado	J. P. Selecta, sa
Centrífuga de bancada	MLW T 52
Centrífuga refrigerada	Beckman J2-MC
Espectrómetro (RMN)	Bruker (400 MHz)
Espectrofotómetro (UV/Vis)	Milton Roy 1201
Medidor de pH	Grison GLP 21
Pipetas automáticas	Gilson
Placa de agitação	J. P. Selecta, sa
Tina de electroforese	Hoefer SE 600

#### II.1.3 - Reagentes

Os reagentes utilizados ao longo do procedimento experimental bem como as respectivas fórmulas químicas encontram-se referidas no Quadro II.2.

Quadro II.2 - Reagentes utilizados no trabalho experimental

<i>Reagente</i>	<i>Empresa</i>
Ácido acético glacial (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Merck
Ácido tricloro acético (CCl <sub>3</sub> COOH)	Anala R.
Ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Riedel-de Haen
Acrilamida	Koch-light, Ltd
Água deuterada (D <sub>2</sub> O)	Sigma
ATP (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> .3H <sub>2</sub> O)	Sigma
Azul de bromofenol (C <sub>19</sub> H <sub>9</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> SNa)	Sigma
Bis-acrilamida	Sigma
BSA (albumina de soro bovino)	Merck
Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	Panreac
Cloreto de potássio (KCl)	Pronalab
Comassie blue	Koch-light, Ltd
Fosfato di-potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Pronalab
Glicerol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma
Glicina (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Pronalab
HEPES (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	Sigma
Hidróxido de sódio (NaOH)	José M. Vaz Pereira
Iodeto de potássio (KI)	Pronalab
Kit de proteínas padrão para a electroforese	Sigma
Mercaptoetanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Riedel-de Haen
Metanol (CH <sub>4</sub> O)	Riedel-de Haen
Metavanadato de amónio (NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> )	Riedel-de Haen
Molibdato de amónio ( (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O)	Pronalab
Persulfato de amónio((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Anala R.
PMSF	Sigma
SDS (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup> Na <sup>+</sup> )	Sigma
Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	Merck
Sulfato de ferro (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Riedel-de Haen
Tartarato de sódio/potássio (NaK(C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ).4H <sub>2</sub> O)	José M. Vaz Pereira
TEMED	Sigma
Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Pronalab

## II.2 - Isolamento e caracterização da miosina

### II.2.1 - Isolamento

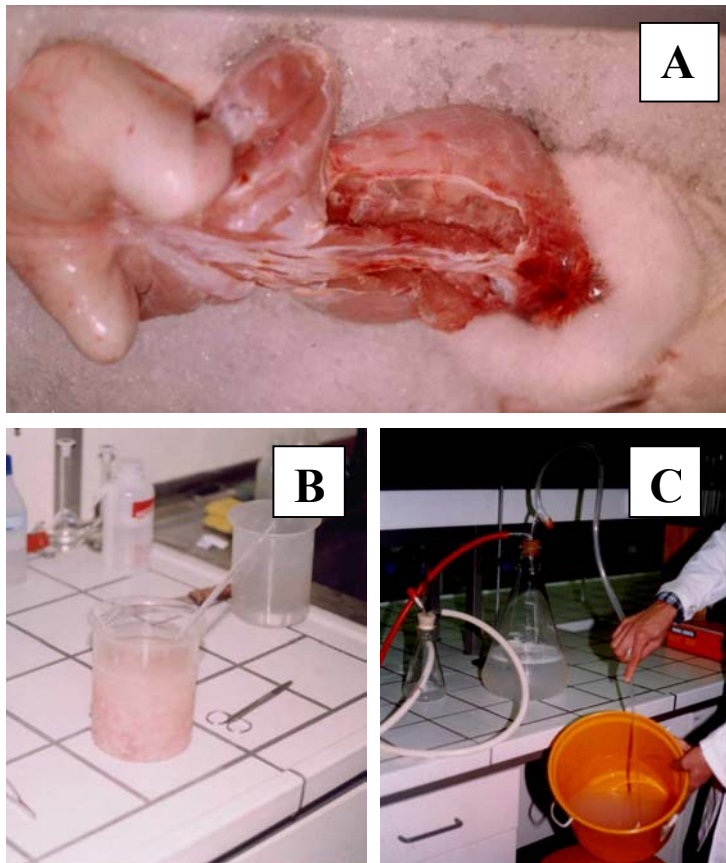
O método que serviu de base para o isolamento da miosina foi anteriormente descrito (Perrie e Perry, 1970). Este método consiste essencialmente na separação da miosina através de processos de “salting-in” e “salting-out” por elevação e diminuição da força iónica, respectivamente. Uma vez que a solubilidade da proteína a uma força iónica elevada, e a pH fisiológico, resulta de interações polares com o solvente aquoso, de interações iónicas com os sais presentes em solução e, em última análise, de forças electrostáticas repulsivas entre moléculas igualmente carregadas, quando a força iónica é diminuída, por adição de água, as forças repulsivas tornam-se insuficientes provocando a precipitação da proteína (Scopes, 1982). No presente trabalho, pretende-se obter a miosina parcialmente purificada, de modo que a proteína foi precipitada uma única vez.

Todo o isolamento foi realizado a 4 °C, tendo-se o cuidado de refrigerar previamente todos as soluções e materiais utilizados, seguindo-se o seguinte procedimento:

1. O animal foi sacrificado através do corte da artéria jugular, esfolado e colocado num recipiente com gelo.
2. Depois de ser removido o tecido conjuntivo que envolve o tecido muscular, foram retirados cerca de 250 g dos músculos dorsais e músculos brancos das pernas (Fig. II.1 A).
3. O músculo foi triturado e extraído em três volumes de uma solução de elevada força iónica constituída por 0,6 M KCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 6,5. Mexeu-se lentamente esta suspensão durante 15 minutos (Fig. II.1 B).
4. Centrifugou-se a mesma suspensão a 2000 x g durante 15 minutos e filtrou-se o sobrenadante em lâ de vidro.

5. Diluiu-se esta solução em 14 volumes de água destilada fria e após ter-se esperado aproximadamente 7 horas para que se concluísse a precipitação da proteína, removeu-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta dobrada na extremidade em forma de “U” e de uma bomba de vácuo (Fig. II.1 C).
6. O precipitado que se formou foi concentrado através de uma centrifugação a 2000 x g durante 15 minutos, ressuspensão em cerca de 50 ml de uma solução tampão constituída por 0,3 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES, pH 7,6.
7. A solução de miosina assim obtida, foi homogenizada num potter, medido o volume de extracção, adicionado cerca de 2,5 µM de PMSF e armazenada a 4 °C num frasco de plástico.

Para uma posterior análise do material isolado foram retiradas amostras nas fases de isolamento 3), 4), 5) e 6).



**Figura II.1** – A miosina foi isolada a partir de músculos dorsais e músculos brancos das pernas de coelho (A), após ressuspensão em meio de força iónica elevada (B) e precipitação a baixa força iónica (C).

### II.2.2 – Análise quantitativa da proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Biureto (Plummer, 1987) em amostras de 1 ml, às quais foram adicionados 2 ml de reagente de Biureto. A preparação do reagente consistiu na solubilização de 3 g de sulfato de cobre hidratado e 9 g de tartarato de sódio/potássio em 500 ml de hidróxido de sódio 0,2 M, adicionando-se seguidamente 5 g de iodeto de potássio e perfazendo-se 1l com a solução de hidróxido de sódio 0,2 M. Na maioria dos casos, foi necessário proceder-se a uma diluição prévia das amostras. A concentração da solução de proteína foi estimada através da realização de uma curva padrão, onde se representaram os valores de absorvência a 540 nm de diversas soluções proteicas padrão em função das respectivas concentrações. As soluções proteicas para a curva padrão (0,5 – 5 mg/ml de concentração de proteína) foram preparadas a partir de uma solução stock de albumina de soro bovino 5 mg/ml.

### II.2.3 – Análise do estado de pureza do material isolado

O estado de pureza da miosina foi analisado por SDS-PAGE. Neste método as proteínas são separadas de acordo com o seu peso molecular. O detergente aniónico SDS, liga-se ao longo da cadeia polipeptídica “mascarando” a carga natural da proteína e originando uma razão carga/massa constante. Desta forma, a mobilidade electroforética do complexo depende do tamanho (massa molecular) da proteína, podendo-se estimar o peso molecular de uma determinada proteína.

A electroforese foi realizada num sistema contínuo em gel de poliacrilamida a 7,5 %. Foram adicionados 15 ml de uma solução de acrilamida (30 % acrilamida + 0,8 % bisacrilamida), 15 ml de uma solução tampão contendo Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) e SDS 0,4 % a 25 ml de H<sub>2</sub>O. A polimerização do gel foi iniciada pela adição de 300 µl de persulfato de amónio 10 % e catalisada pela presença de 60 µl de TEMED. Às amostras,

foi adicionado um tampão de desnaturação contendo Tris-HCl 60 mM (pH 6.8), SDS 2 %, glicerol 25 % (para dar densidade às amostras), 2-mercaptoetanol 5 % (para reduzir as pontes dissulfídicas intra e/ou inter moleculares e desta forma expor ao SDS toda a extensão do fragmento polipeptídico) e azul de bromofenol 0,1 % (para permitir a observação da frente de migração). Antes da aplicação das amostras no gel, este foi submetido a uma pré electroforese durante aproximadamente 60 minutos. Seguidamente, as amostras foram aplicadas e a corrente ajustada a 200 V. Decorrida a electroforese (cerca de 3 horas), o gel foi corado com uma solução corante contendo coomassie 0,1 %, metanol 45% e ácido acético glacial 10%. O gel foi descorado numa solução de metanol/ácido acético/água (1:1:8). O peso molecular das proteínas foi determinado por extrapolação das suas mobilidades através da realização de uma curva padrão onde se representou o log da massa molecular em função da migração relativa das bandas. As proteínas utilizadas na realização da curva padrão encontram-se indicadas no Quadro II.3.

**Quadro II.3** - Proteínas padrão e respectivos pesos moleculares usadas na electroforese

<i><b>Proteínas (Kit da SIGMA)</b></i>	<i><b>MM (kDa)</b></i>
Miosina (músculo de coelho)	205
β-Galactosidase	116
Fosforilase B (músculo de coelho)	97
Cinase fructose-6-fosfato (músculo de coelho)	84
Albumina	66
Desidrogenase glutâmica	55
Ovalbumina	45
Gliceraldeído-3-P desidrogenase	36

### II.3 - Preparação das soluções stock de vanadato

As soluções stock de vanadato foram preparadas a partir de metavanadato de amónio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) numa concentração de 50 mM (pH 6,7). A solução de “metavanadato” foi ajustada a pH 7,6 e a de “decavanadato” a pH 4,0 com NaOH e HCl, respectivamente. A solução de “metavanadato”, quando ajustada a pH 4,0 muda de cor amarelo claro para laranja, indicativo da presença de espécies decaméricas que permanecem estáveis a este pH. Ambas as soluções foram armazenadas a 4 °C. O valor de pH da solução de “decavanadato”, imediatamente antes da sua utilização nos ensaios, foi sempre ajustada ao pH do ensaio (7,6).

### II.4 - Ensaio enzimáticos

A hidrólise de ATP pela miosina foi medida através da libertação do Pi, segundo o método colorimétrico descrito por Taussky e Shorr (1953). Este método consiste na reacção do fosfato inorgânico com o molibdato de amónio numa solução ácida para formar o ácido fosfomolibdico. A adição de um agente redutor, reduz o molibdénio a fosfomolibdato que forma um complexo de cor azulada que absorve a 660 nm.

Os estudos da actividade enzimática foram realizados a 25 °C num meio contendo KCl 0,3 M,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, HEPES 25 mM e a pH 7,6. A reacção foi iniciada pela adição da enzima, para uma concentração final de 1 mg/ml, ao meio de reacção que já continha Mg-ATP ou Mg-ATP e vanadato. Ao meio de reacção foi retirado 1 ml nos tempos 0 (antes da adição da enzima), 5, 10 e 20 minutos e imediatamente adicionado a um tubo de ensaio que continha 1 ml TCA 10 % (W/V). A miosina foi assim desnaturada e conseqüentemente a reacção de hidrólise foi parada. Em seguida, a miosina foi sedimentada por centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos, numa centrífuga de bancada, e foi retirado da solução sobrenadante 1 ml para quantificação do fosfato inorgânico. Os valores de absorvência

(660 nm) foram obtidos 2 minutos após adição do reagente de molibdato. Na preparação deste reagente dissolveu-se 5 g de sulfato de ferro em 60 ml de água desionizada, adicionou-se 10 ml de uma solução de molibdato de amónio (10 % molibdato de amónio em ácido sulfúrico 10 N) e fez-se o volume de 100 ml com água desionizada. As concentrações de fosfato libertado foram estimadas através da realização de uma curva padrão onde se representou a Abs (660 nm) em função da quantidade de fosfato (0 – 500 nmol Pi). As soluções de fosfato para a curva padrão foram preparadas a partir de uma solução stock de fosfato di-potássio ( $K_2HPO_4$ ) de concentração 0,5 mM.

## II.5 – Espectroscopia de RMN de $^{51}V$

Os espectros de ressonância magnética nuclear do isótopo 51 de vanádio, foram efectuados num espectrómetro Bruker AM-400 MHz instalado no departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro, 500  $\mu$ l das amostras a analisar (em 10% v/v  $D_2O$ ) foram irradiados a uma frequência de 105.246 MHz. Os espectros foram adquiridos com uma largura espectral de 29222 Hz, um tempo de aquisição de 0,15 s, um número de transientes de 3584, um tempo de relaxação de 0,1 s e uma sequência de pulsos a  $90^\circ$ . As medições foram realizadas à temperatura ambiente da sonda ( $22 \pm 1$  °C) ou a 5 °C, dependendo dos estudos realizados. Foram utilizadas transformadas de Fourier com um LB de 20 Hz para o processamento dos espectros, e os desvios químicos de  $^{51}V$  foram obtidos com relação à espécie tetramérica de vanadato que apresenta um desvio de  $-578$  ppm relativamente ao  $VOCl_3$ , independentemente do pH.

Todos os estudos foram realizados num meio contendo KCl 0,3 M,  $CaCl_2$  5 mM, HEPES 25 mM, pH 7,6. Efectuaram-se análises espectrais de soluções de “metavanadato”

de 5, 10 e 15 mM na ausência e na presença de miosina 5, 10 e 15 mg/ml. Foram ainda analisadas soluções de “decavanadato” 15 mM ao fim de 10 e 70 minutos.

## II.6 – Tratamento de resultados

### II.6.1 – Cinética enzimática

As velocidades de hidrólise do ATP pela miosina foram calculadas por regressão linear considerando os valores de nmol  $\text{PO}_4^{3-}$  formados ao fim de 5 e 10 minutos. Os coeficientes de correlação foram sempre superiores a 0,98.

O valor da % de inibição para cada solução de vanadato, foi calculada do seguinte modo:

$$i (\%) = 100 \left( 1 - \frac{V_{0i}}{V_0} \right)$$

em que  $V_{0i}$  e  $V_0$  correspondem às velocidades iniciais na presença e ausência de inibidor, respectivamente.

### II.6.2 – Espectroscopia de $^{51}\text{V}$ -RMN

Como as espécies de vanadato têm valores de  $T_1$  semelhantes, a integração dos sinais de  $^{51}\text{V}$ -RMN fornece a fracção molar de cada oligómero de vanadato que por sua vez pode ser usado para quantificação (Crans, 1994). Desta forma, as concentrações relativas das espécies de vanádio, com número de agregação  $n$ , foram obtidas usando a expressão II.1, em que  $A$  corresponde à área medida (calculada por integração dos sinais) e  $n$  ao nº de átomos de vanádio:

$$[V_i] = \frac{A(V_i)}{A(V_{\text{Total}})} \times \frac{1}{nV_i} [V]_{\text{Total}} \quad (\text{II.1})$$

Os valores de  $\Delta\nu_{1/2}$  determinados, representam as larguras das ressonâncias a meia altura (em Hz) após subtração de 20 Hz usados no processamento dos espectros.



## III – Resultados e Discussão

### III.1 – Isolamento e caracterização da miosina

#### III.1.1 – Isolamento: considerações gerais

O procedimento adoptado para o isolamento da miosina teve como objectivo obter a enzima parcialmente purificada, compreendendo as seguintes etapas principais:

- i) Extracção da miosina do músculo esquelético de coelho (após destruição das células musculares por trituração moderada), com uma solução de elevada força iónica, a pH neutro, durante 15 minutos. Extracções mais longas resultariam na remoção de uma grande quantidade de actomiosina, o que iria contaminar a preparação.
- ii) Remoção do material celular insolúvel por centrifugação, e das partículas lipídicas eventualmente presentes em suspensão, por filtração através de lã de vidro.
- iii) Remoção do complexo actomiosina e de algumas proteínas sarcoplasmáticas solúveis a baixas concentrações salinas, por precipitação da miosina num meio de baixa força iónica.

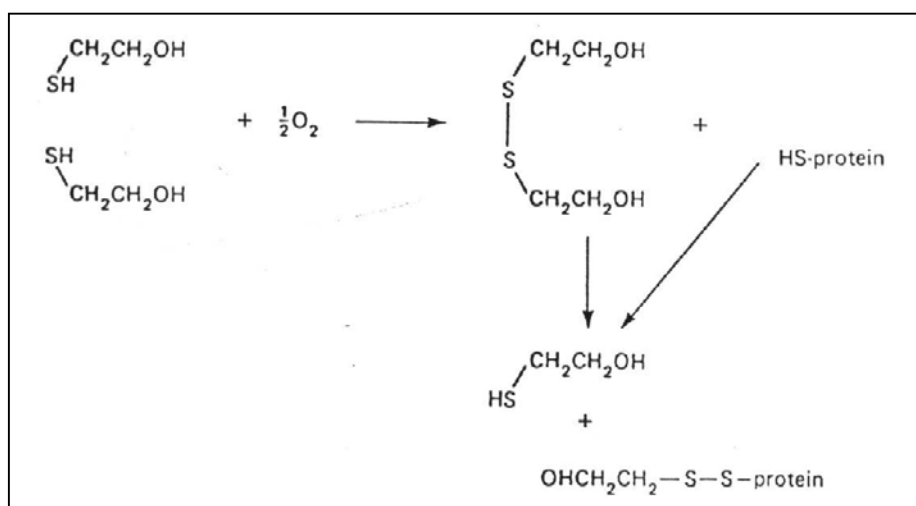
O problema fundamental com que geralmente se depara na extracção e/ou purificação de uma enzima, é a sua possível perda de actividade, que poderá ser atribuída a três factores principais:

- i) Desnaturação
- ii) Inactivação do sítio catalítico
- iii) Proteólise

De modo a minimizar-se a desnaturação foram evitados extremos de pH e temperatura. O pH natural dentro da célula encontra-se normalmente entre 6 e 8, pelo que

se utilizou um tampão dentro desta gama de pH. Devido à elevada labilidade das enzimas, é conveniente reduzir-se a temperatura em 20 °C, diminuindo-se a velocidade da maioria dos processos por um factor de 3 a 5. Por este motivo todo o isolamento foi realizado a 4 °C.

A inactivação do local activo de uma enzima ocorre mediante a modificação de resíduos de reactividade elevada, tais como a cisteína, cujo grupo sulfidrilo é susceptível de sofrer oxidação quando fora do ambiente redutor intracelular. Para evitar este processo de oxidação, foi usado um agente redutor, o β-mercaptoetanol numa concentração suficientemente elevada para que não ocorresse formação da forma dissulfídica (Fig. III.1).



**Figura III.1** – Inactivação de um grupo sulfidrilo activo numa enzima pelo β-mercaptoetanol ( Scopes, 1982).

A degradação proteolítica da enzima foi evitada utilizando-se um inibidor específico de proteases, (PMSF). Porém, devido à grande diversidade de proteases existentes, torna-se difícil escolher o inibidor mais adequado, pelo que a preparação não pôde ser mantida durante muito tempo. Por este motivo, as experiências foram sempre realizadas até um mês após o isolamento da miosina.

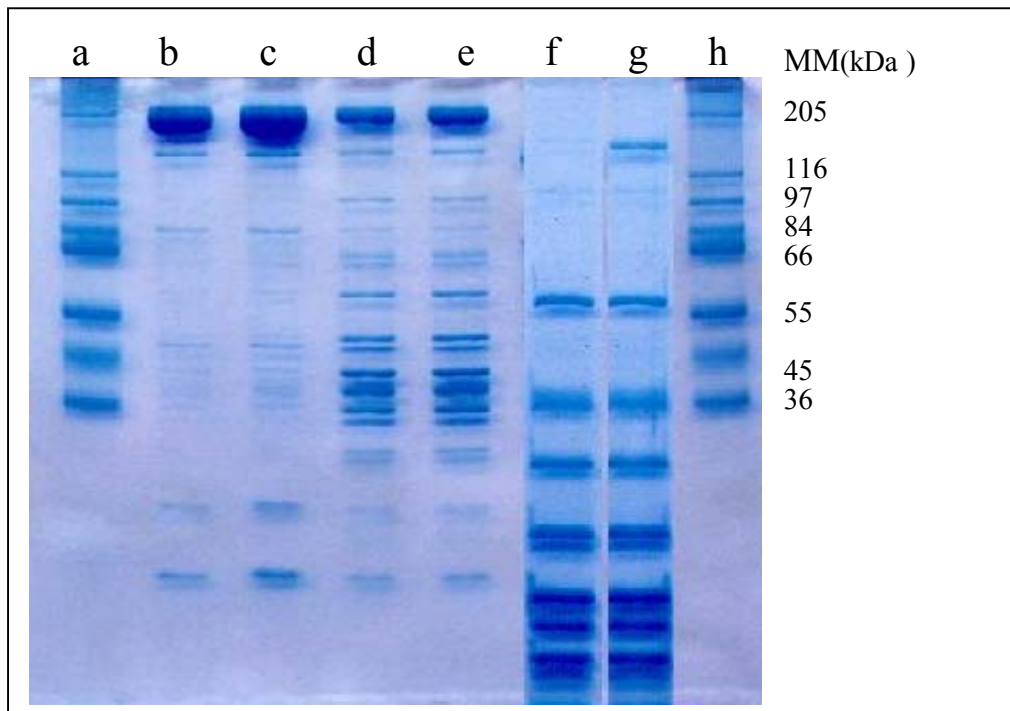
### III.1.2 – Caracterização

#### III.1.2.1 – Análise quantitativa da proteína

Por quantificação das soluções de miosina provenientes de quatro isolamentos efectuados, obteve-se uma concentração de proteína, em média, de 25 mg/ml e um rendimento médio de cerca de 1,2 % p/p, (1,2 g miosina/100 g músculo). É importante salientar que, apesar da miosina se encontrar em grande maioria, a concentração estimada deve ter em conta outras proteínas existentes em menor quantidade, já que se trata de uma miosina parcialmente purificada, tal como se demonstrará na secção seguinte.

#### III.1.2.2 – Análise do estado de pureza do material isolado

O estado de pureza do material isolado, foi analisado por SDS-PAGE da solução de miosina e das fracções extraídas ao longo do isolamento, tal como se descreve na secção II.2.3 do Procedimento Experimental. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na figura III.2. Nos poços (b) e (c), referentes à solução de miosina, é visível uma banda larga correspondente ao monómero de miosina de aproximadamente 200 kDa. Para além desta banda de maior intensidade, podem observar-se outras menos intensas. Nestas, incluem-se uma banda correspondente às cinases das cadeias leves de miosina, de ~ 80 kDa (Perry et al., 1984), e outras duas de pesos moleculares 18 e 20 kDa, identificadas como sendo as cadeias leves da miosina. Nos poços (d) a (g) encontram-se as quatro fracções extraídas durante o processo de isolamento, mostrando os componentes que não foram isolados, como por exemplo, fosforilases (~ 97 kDa), actina (~ 40 kDa) e proteínas associadas como troponinas e a tropomiosina (Bagshaw, 1987).



**Figura III.2** – Electroforese em gel de poliacrilamida (7,5 %) na presença de SDS (condições desnaturantes). Os poços (a) e (h) contêm as proteínas padrão de pesos moleculares entre 36 e 205 kDa; (b) e (c) contêm 25 e 40  $\mu$ g da miosina isolada, respectivamente; (d), (e), (f) e (g) contêm os componentes extraídos nos passos 3), 4), 5) e 6) descritos na secção II.2.1 da Procedimento experimental.

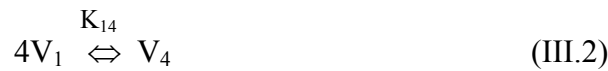
Pela análise dos resultados da electroforese, verifica-se que a miosina se encontra sem contaminações significativas, nomeadamente não se observa a presença de actina. Contem adicionalmente as cinases das cadeias leves da miosina, cujo objectivo principal consiste em obter um sistema próximo do fisiológico, com possibilidade de as cadeias leves da miosina se encontrarem ou não no estado fosforilado, dependendo das condições experimentais (Aureliano et al., 1995).

### III.1.2.3 – Análise da actividade enzimática

Uma vez isolada, a proteína manteve a actividade de hidrólise de ATP elevada, durante aproximadamente um mês. Os valores de actividade obtidos, como se verá adiante, estão de acordo com os apresentados em trabalhos anteriores (Aureliano, 2000).

### III.2 – Caracterização das soluções de vanadato

Neste trabalho, foram preparadas soluções de “metavanadato” e “decavanadato” que se supõem conter essencialmente espécies meta e a espécie decamérica, respectivamente. Contudo, a química aquosa do vanádio (V) é extremamente complexa contendo misturas de mono e oligovanadatos que se encontram num equilíbrio químico dependente da força iónica, pH, concentração e temperatura (Amado, 1993), e que se relacionam tal como se descreve nas equações (III.1) a (III.5):



$$[V_2] = K_{12} [V_1]^2 \quad (\text{III.6})$$

$$[V_4] = K_{14} [V_1]^4 \quad (\text{III.7})$$

etc....

em que  $K_{ij}$  são as constantes condicionais de equilíbrio, ao valor de pH utilizado, entre os oligómeros  $V_i$  e  $V_j$  (Crans, 1994). Para quaisquer concentrações de vanádio, por exemplo as concentrações esperadas de  $V_2$  e  $V_4$ , ao valor de pH utilizado, podem ser calculadas a partir das concentrações de monómeros observadas utilizando as equações (III.6) e (III.7).

Foram calculadas as constantes de estabilidade  $K_{ij}$  (a pH 7,6) obtidas a partir das concentrações, para a solução de “metavanadato” de concentração 5 mM (Tabela III.2). Os valores obtidos estão de acordo com os presentes na literatura (Crans, 1994).

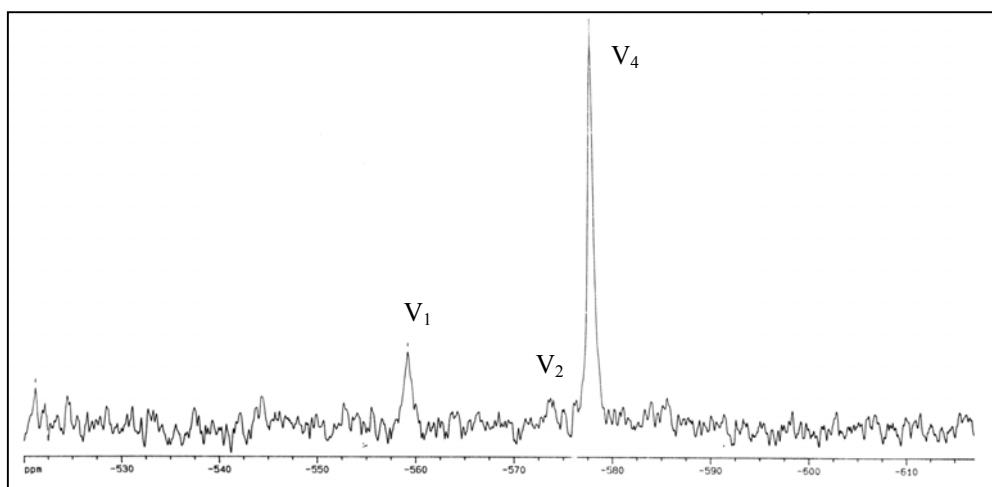
**Tabela III.2** – Constantes de estabilidade condicionais (pH 7,6) para oligómeros de vanadato no meio de reacção utilizado neste trabalho para os ensaios enzimáticos.

$[V]_{TOTAL} (M)$	$K_{12} (M^{-1})$	$K_{14} (M^{-3})$	$K_{24} (M^{-1})$
$5 \times 10^{-3}$	278	$1.2 \times 10^9$	$1.5 \times 10^4$

Conclui-se portanto que, uma vez que as várias espécies se encontram em equilíbrio, não é possível obtê-las isoladamente. Para se proceder a uma análise da interacção das diversas espécies de vanadato com a miosina, torna-se então conveniente obter informação respeitante à composição e estabilidade destas soluções (“metavanadato” e “decavanadato”) no meio de reacção utilizado.

### III.2.1 – Identificação das espécies

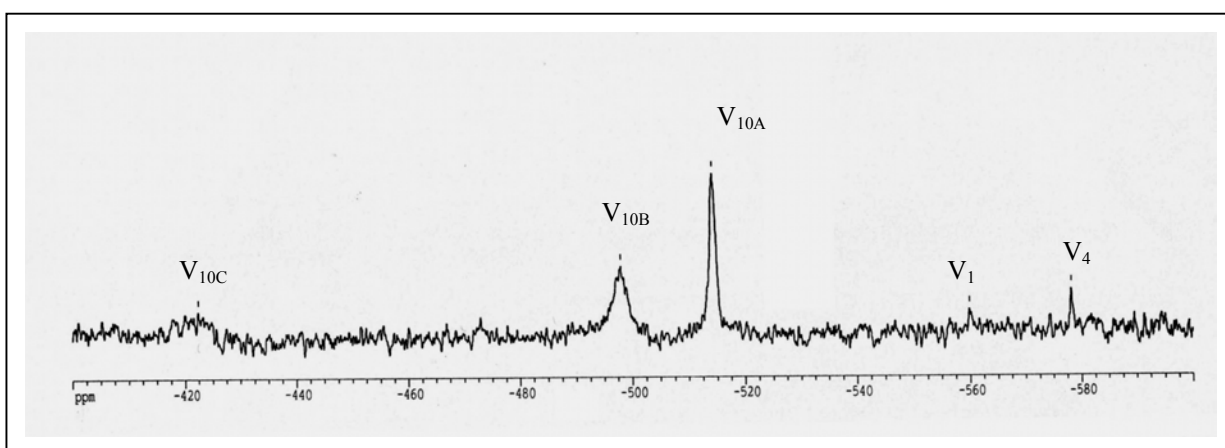
O espectro de  $^{51}V$ -RMN da solução de “metavanadato” de concentração 5 mM, num meio de reacção contendo KCl 0,3 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, HEPES 25 mM, pH 7,6 (condições usadas nos ensaios enzimáticos), revela pelo menos três espécies de vanadato distintas: monomérica (V<sub>1</sub>) a -559 ppm, dimérica (V<sub>2</sub>) a -574 ppm e tetramérica (V<sub>4</sub>) a -578 ppm (Fig. III.3).



**Figura III.3** – Espectro de  $^{51}V$ -RMN a 105.2 MHz de uma solução de “metavanadato” 5 mM num meio contendo 0,3 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES a pH 7,6. V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub> e V<sub>4</sub> correspondem a espécies monomérica, dimérica e tetramérica, respectivamente.

Segundo os desvios químicos que apresentam, as espécies monomérica e dimérica encontram-se na forma protonada  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  e  $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$  respectivamente, enquanto que a espécie tetramérica se encontra na forma cíclica  $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ . De acordo com estudos anteriormente efectuados (Aureliano, 2000), a solução de “metavanadato” numa concentração de 5 mM deveria apresentar a espécie pentamérica ( $\text{V}_5$ ), de formula  $\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$ . No entanto, devido à baixa razão sinal/ruído só se identificou o sinal correspondente a  $\text{V}_5$  para concentrações de vanadato mais elevadas.

No mesmo meio de reacção, a solução de “decavanadato” de concentração 15 mM, contém, para além da espécie decamérica, cujas ressonâncias características se encontram a  $-514$  ppm ( $\text{V}_{10\text{A}}$ ), a  $-500$  ppm ( $\text{V}_{10\text{B}}$ ) e a  $-424$  ppm ( $\text{V}_{10\text{C}}$ ), outras espécies como a monomérica ( $\text{V}_1$ ) e tetramérica ( $\text{V}_4$ ) (Fig. III.4).



**Figura III.4** – Espectro de  $^{51}\text{V}$ -RMN a 105.2 MHz de uma solução de “decavanadato” 5 mM num meio contendo 0.3 M KCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM HEPES a pH 7.6.  $\text{V}_{10\text{A}}$ ,  $\text{V}_{10\text{B}}$  e  $\text{V}_{10\text{C}}$  correspondem a sinais de RMN de átomos de vanádio da espécie decamérica ( $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$ ).  $\text{V}_1$  e  $\text{V}_4$  são sinais de RMN correspondentes às espécies monomérica ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ) e tetramérica ( $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ ), respectivamente.

Os desvios obtidos estão em bom acordo com os descritos na literatura (Crans, 1998), onde a atribuição das diferentes espécies aos respectivos desvios químicos se encontra bem resolvida, tal como se pode verificar pela Tabela III.1.

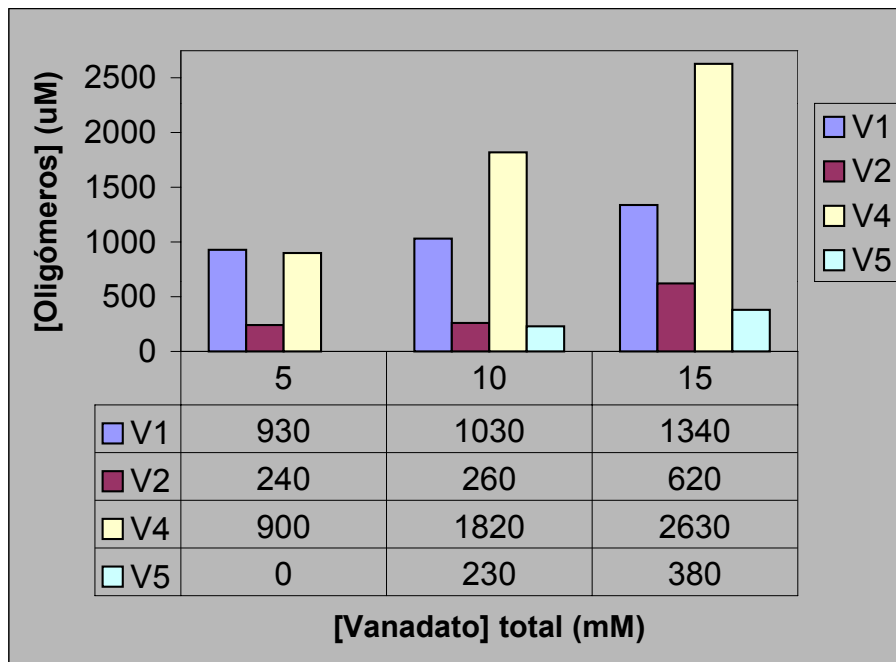
**Tabela III.1** – Fórmulas, valores de pKa, desvios químicos, cor e estrutura das espécies maioritárias de vanadato em solução aquosa (Adaptado de Crans et al., 1998).

Formula	pKa	Desvio químico (ppm)	Cor e estrutura
$\text{VO}_4^{3-}$	-	-541.2	Incolor; linear
$\text{HVO}_4^{2-}$	~12	-538.8	Incolor; linear
$\text{H}_2\text{VO}_4^-$	7.1	-560.4	Incolor; linear
$\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$	-	-561.0	Incolor; linear
$\text{HV}_2\text{O}_7^{3-}$	8.9	-563.5	Incolor; linear
$\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$	7.2	-572.7	Incolor; linear
$\text{V}_4\text{O}_{13}^{6-}$	-	-564 a -572	Incolor; linear
$\text{HV}_4\text{O}_{13}^{5-}$	8.3		
$\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$	-	-574.9	Incolor; cíclica
$\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$	-	-582.7	Incolor; cíclica
$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	-	-423, -497, -514	Amarelo/laranja; “cluster” *
$\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$	5.7	-424, -500, -516	Amarelo/laranja; “cluster”
$\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{4-}$	3.6	-425, -506, -524	Amarelo/laranja; “cluster”
$\text{H}_3\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{3-}$	1.6	-427, -515, -534	Amarelo/laranja; “cluster”

\* Estrutura em “cluster” (ver fig. I.3)

### III.2.2 – Efeito da concentração

Verificou-se que a área total dos sinais de RMN é proporcional à concentração total de vanadato, contudo a concentração de cada espécie nas soluções de vanadato não varia linearmente com a concentração total de vanadato. Como se pode observar na Figura III.5 a solução de “metavanadato” 5 mM nas condições já referidas, contém cerca de 930  $\mu\text{M}$  do monómero, 240  $\mu\text{M}$  do dímero e 900  $\mu\text{M}$  do tetrâmero. Quando a concentração de vanadato total desta solução é aumentada para 10 e 15 mM, está-se a favorecer o tetrâmero que aumenta aproximadamente para o dobro e triplo respectivamente, em detrimento do monómero que quase não varia.

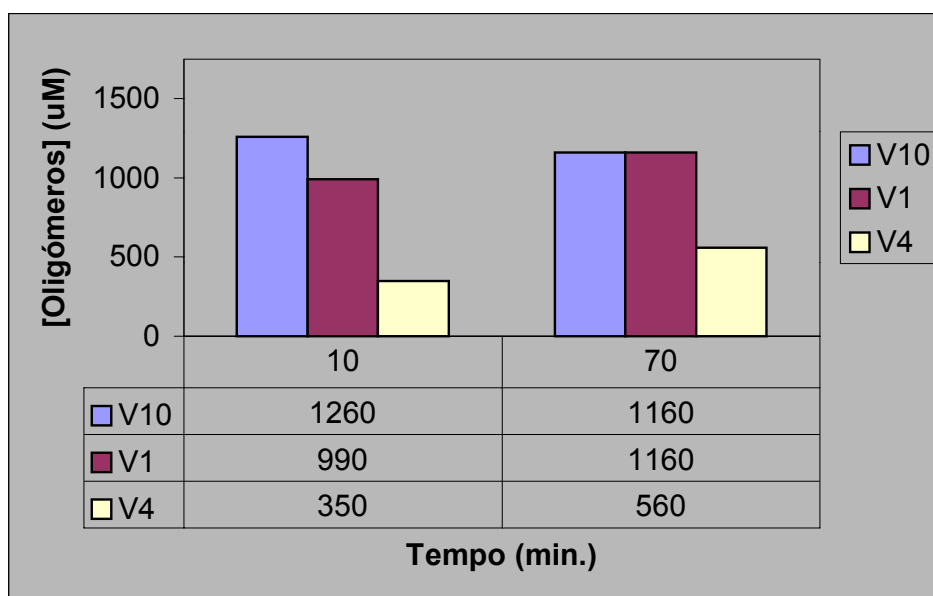


**Figura III.5** – Variação da concentração dos diferentes oligómeros de vanadato com a concentração total de vanadato. As experiências foram realizadas num meio contendo 0,3 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES a pH 7,6. As concentrações foram calculadas utilizando a equação descrita na secção II.6.2 do Procedimento Experimental.

Como se observará adiante, este tipo de comportamento poderá contribuir para a identificação da espécie inibidora aquando da realização dos estudos cinéticos, se correlacionarmos a % de inibição com o aumento da concentração em vanadato total.

### III.2.3 – Estabilidade das soluções de vanadato

A solução stock de “metavanadato” (50 mM), contém uma mistura de oxovanadatos numa composição dependente do pH, temperatura e força iónica (Amado, et al., 1993). Conhecer a concentração original de cada oligómero nesta solução stock é irrelevante porque é estabelecido um novo equilíbrio num espaço de milisegundos após diluição no meio de reacção. Contudo, uma vez atingido o equilíbrio, esta solução mantém-se estável ao longo do tempo. O mesmo não se observa com a solução de “decavanadato”. Após diluição da solução de “decavanadato” (50 mM) no meio de reacção (pH 7,6) para a concentração final de 15 mM, ocorre desoligomerização da espécie decamérica. De facto, pela Figura III.6 pode-se verificar que após 60 minutos, na solução de “decavanadato” 15 mM a concentração de  $V_{10}$  diminui ligeiramente (cerca de 8%) e as concentrações de  $V_1$  e  $V_4$  aumentam significativamente (~17% e ~60%, respectivamente).



**Figura III.6** – Concentração de diferentes espécies de vanadato numa solução de “decavanadato” 15 mM ao fim de 10 e 70 minutos, num meio contendo 0,3 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES a pH 7,6. As concentrações foram calculadas utilizando a equação descrita na secção II.6.2 do Procedimento Experimental.

Conclui-se portanto que, pelo menos a valores de pH próximos do fisiológico, a solução de “decavanadato” é instável no sentido em que, apesar da concentração de  $V_{10}$  se manter quase intacta, outras espécies aumentam a sua concentração significativamente ao longo do tempo devido à desoligomerização de  $V_{10}$ . É importante notar que uma desoligomerização de  $V_{10}$  de  $x$ , equivale a um aumento de  $V_1$  de  $10x$ .

#### III.2.4 – Complexos de vanadato

Os estudos de vanadatos com sistemas enzimáticos podem ser problemáticos, porque os meios de estudo, contêm muitas vezes compostos que “mascaram” o efeito dos vanadatos. Um exemplo disso é a utilização de soluções tampão, pois os vanadatos interagem facilmente com diversos tampões. É por isso muito importante definir as condições para medir os efeitos dos vanadatos de modo a assegurar que os mesmos se encontrem livres para interagir com a enzima em estudo. Atendendo a este problema, foi escolhido o tampão HEPES, porque para além de actuar no intervalo de pH desejado, não interage significativamente com vanadatos (Crans, 1993).

### III.3 – Inibição da ATPase da miosina por espécies de vanadato

#### III.3.1 – Cinética enzimática

##### III.3.1.1 – Efeito do ATP

No intuito de correlacionar a inibição promovida, na hidrólise de ATP pela miosina, por soluções de vanadato com as diversas espécies de vanadato, estudou-se a actividade ATPásica da miosina na presença e ausência de soluções “meta” e “decavanadato” de concentração 2, 5, 10 e 15 mM e para duas concentrações de ATP distintas (0,2 e 2 mM). Como se pretendia medir a actividade de hidrólise de ATP dependente de  $Mg^{2+}$ , isto é, da  $Mg^{2+}$ -ATPase, manteve-se a concentração de  $Mg^{2+}$  (2 mM) constante em todos os ensaios realizados. Tal como foi referido na secção II.4 do Procedimento Experimental, esta actividade foi analisada pela medida do fosfato inorgânico (Pi) libertado. Os valores podem ser observados na Tabela III.3.

As velocidades de hidrólise foram determinadas considerando-se a média das velocidades dos diversos ensaios e encontram-se indicadas na Tabela III.4. Para uma melhor visualização e compreensão dos resultados apresentados, foram ainda calculadas as percentagens de inibição para as diferentes concentrações das soluções de “metavanadato” (Fig. III.7) e “decavanadato” (Fig. III.8). A todos os valores apresentados encontra-se um erro associado até 10 %.

Tabela III.2 – Valores de nmol Pi/mg miosina formados ao longo do tempo, na ausência e na presença de soluções de vanadato de concentrações 2, 5, 10 e 15 mM, para duas concentrações de ATP (0,2 e 2 mM) (n = 2-5).

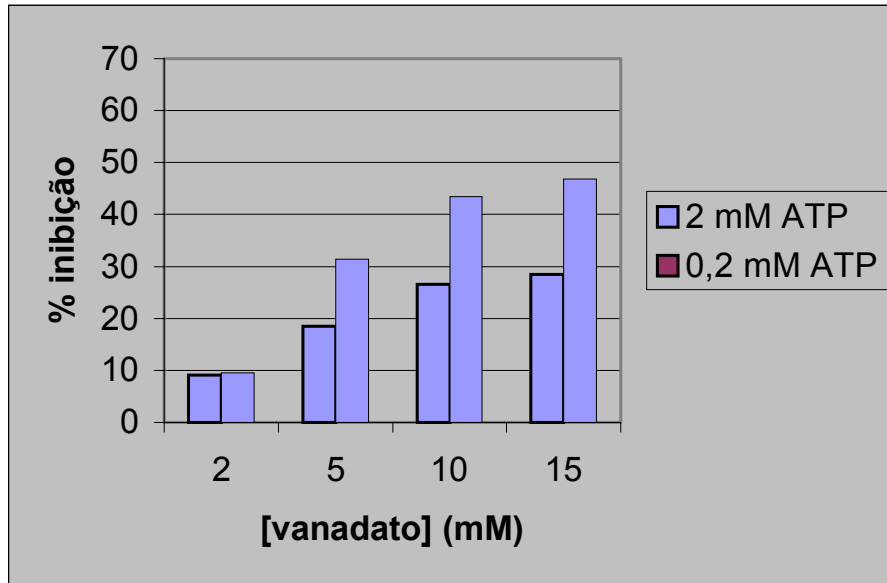
Vanadato	nmol PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		Tempo (minutos)
	0,2 mM ATP	2 mM ATP	
0 mM (Controlo)	101,3	141,4	5
	166,0	264,3	10
	181,1	501,1	20
“Metavanadato” (2 mM)	86,6	139,8	5
	138,3	234,2	10
	196,6	363,2	20
“Decavanadato” (2 mM)	19,3	130,0	5
	116,9	223,1	10
	202,3	410,5	20
“Metavanadato” (5 mM)	60,6	124,1	5
	100,9	211,6	10
	141,1	380,0	20
“Decavanadato” (5 mM)	53,8	113,9	5
	84,8	188,8	10
	135,0	331,2	20
“Metavanadato” (10 mM)	66,8	105,2	5
	102,4	177,6	10
	137,9	290,8	20
“Decavanadato” (10 mM)	25,9	86,5	5
	73,5	123,7	10
	58,6	237,4	20
“Metavanadato” (15 mM)	68,9	111,6	5
	68,9	165,0	10
	134,6	272,0	20
“Decavanadato” (15 mM)	26,0	64,8	5
	72,3	89,6	10
	108,7	209,1	20

**Tabela III.4** - Valores de nmol Pi/mg.proteína.minuto ( $v_{\text{reacção}}$ ), na ausência e na presença de soluções de vanadato de concentração 2, 5, 10 e 15 mM, para 2 concentrações de ATP (0,2 e 2 mM).

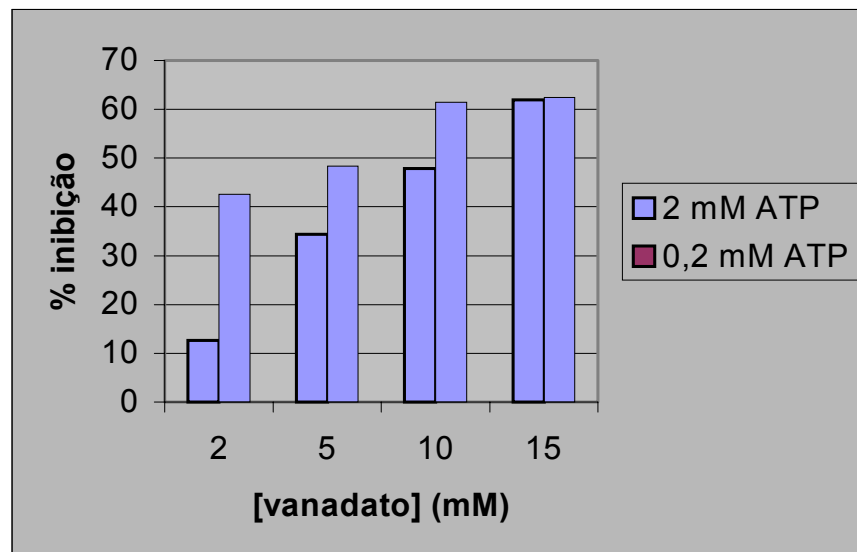
Vanadato	nmol Pi/mg.proteína.minuto	
	0,2 mM ATP	2 mM ATP
0 mM (controlo)	17,8	27,0
2 mM “Meta”	15,0	24,9
2 mM “Deca”	10,1	12,6
5 mM “Meta”	10,8	17,5
5 mM “Deca”	9,2	20,2
10 mM “Meta”	11,3	18,9
10 mM “Deca”	6,6	14,0
15 mM “Meta”	9,2	18,4
15 mM “Deca”	6,5	10,3

Como se observou na secção anterior, estas soluções apresentam uma mistura de oligómeros de vanadato e por isso, atendendo apenas às suas composições não é possível dizer qual ou quais dos oligómeros serão responsáveis pela inibição. Contudo, podemos correlacionar o efeito inibitório com o aumento de concentração das soluções de vanadato, que como se sabe, condiciona a concentração de cada espécie presente nas soluções (Fig. III.5).

Comparando-se os gráficos das figuras III.7 e III.8, verifica-se de imediato que, para qualquer concentração de vanadato e para ambas as concentrações de ATP, a solução de “decavanadato” tem um poder inibitório superior à solução de “metavanadato”.



**Figura III.7** – Efeito do ATP (0,2 e 2 mM) na inibição da actividade ATPásica da miosina (1mg/ml) por soluções de “metavanadato” de concentrações 2, 5, 10 e 15 mM. A reacção foi iniciada após adição de ATP ao meio de reacção contendo 0,3 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES a pH 7,6.



**Figura III.8** - Efeito do ATP (0,2 e 2 mM) na inibição da actividade ATPásica da miosina (1mg/ml) por soluções de “decavanadato” de concentrações 2, 5, 10 e 15 mM. A reacção foi iniciada após adição de ATP ao meio de reacção contendo 0,3 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES a pH 7,6.

Relativamente à solução de “metavanadato”, observa-se que para ambas as concentrações de ATP a inibição aumenta à medida que a concentração de vanadato aumenta (Fig. III.7). Este efeito é no entanto muito mais favorecido para uma baixa concentração do substrato. Por exemplo, para uma concentração de ATP de 0,2 mM, a % de inibição passa de 10 para 47 % quando a concentração de vanadato total aumenta de 2 para 15 mM; enquanto que, para uma concentração de ATP de 2 mM, a % de inibição passa de 10 para 28 %, quando a concentração de vanadato total aumenta de 2 para 15 mM (Fig. III.7). Como sabemos à partida, que com o aumento da concentração de vanadato estamos a aumentar essencialmente a espécie tetramérica (Fig. III.5), sugere-se que o efeito inibitório seja diminuído devido a esta espécie, ou seja, independentemente da participação das outras espécies na inibição, estes resultados levam-nos a supor que o efeito inibitório por parte da espécie tetramérica seja diminuído na presença de ATP.

No sentido de se avaliar a eventual participação da espécie decamérica no efeito inibitório por parte da solução de “decavanadato”, podemos comparar os resultados obtidos nas duas soluções (“meta” e “decavanadato”), por exemplo, para a situação de 2 mM de ATP e 15 mM de vanadato total (Figs. III.7 e III.8). Nestas condições, a % de inibição foi de 28 % para a solução de “metavanadato” (Fig. III.7), cuja composição é de 1340  $\mu\text{M}$   $V_1$ , 620  $\mu\text{M}$   $V_2$ , 2630  $\mu\text{M}$   $V_4$  e 380  $\mu\text{M}$   $V_5$  (Fig. III.5), e 62 % para a solução de “decavanadato” (Fig. III.8) que contem 1260  $\mu\text{M}$   $V_{10}$ , 990  $\mu\text{M}$   $V_1$  e 350  $\mu\text{M}$   $V_4$  (Fig. III.6). Visto que a composição em  $V_1$  e  $V_4$  é muito inferior na solução de “decavanadato” e que o  $V_{10}$  é a espécie maioritária, pode-se concluir que, efectivamente, esta espécie contribui para a inibição da actividade ATPásica da miosina. Constata-se também, que esta espécie parece assumir uma interacção muito idêntica à da espécie tetramérica, na medida em que o efeito inibitório é significativamente afectado pela concentração de ATP para uma baixa concentração de vanadato. Por exemplo, para 2 mM desta solução a % de inibição passa de

10 a 40 %, quando se baixa a concentração de ATP de 2 mM para 0,2 mM (Fig. III.8).

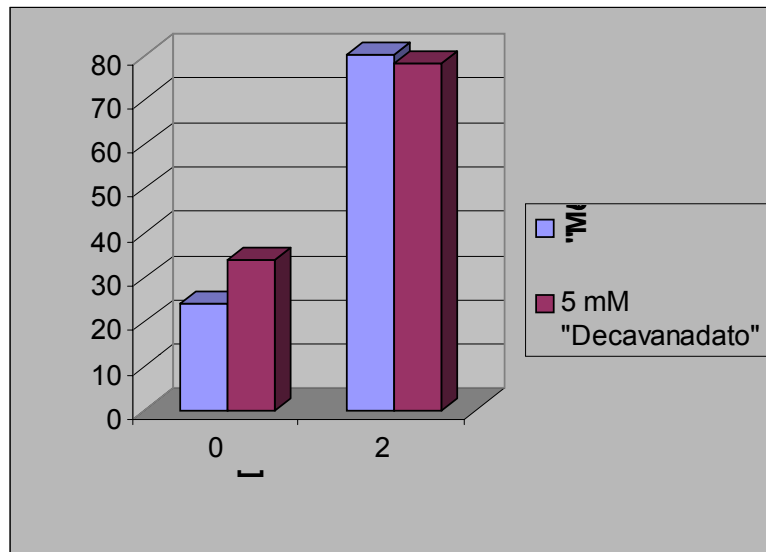
Resultados preliminares sugeriram que, para concentrações de ATP inferiores a 0,2 mM a solução de “decavanadato” apresenta uma inibição do tipo competitivo (ver Fig. 3 do Anexo I).

### III.3.1.2 – Efeito da incubação

Tendo por base os estudos realizados por Goodno (1979), analisou-se o efeito da incubação de 1 mg/ml de miosina com soluções de “metavanadato” e “decavanadato” de concentração 5 mM, na presença e ausência de 2 mM de ADP. A actividade enzimática da miosina foi medida para uma concentração de 2 mM de ATP. As velocidades de hidrólise encontram-se na Tabela III.6 enquanto que as percentagens de inibição estão representadas em gráfico na Figura III.9.

**Tabela III.6** – Valores de nmol Pi/mg.proteína.minuto ( $v_{\text{reacção}}$ ) para a incubação da miosina (1mg/ml) com e sem soluções de vanadato (“meta” e “decavanadato”) 5 mM, na presença e ausência de ADP (0,2 mM) (n=2).

Vanadato	nmol Pi/mg.proteína.minuto	
	0 mM ADP	2 mM ADP
0 mM	26,9	26,9
5 mM “Meta”	20,3	5,3
5 mM “Deca”	17,7	5,9



**Figura III.9** – Efeito da incubação de 1 mg/ml de miosina com “metavanadato” e “decavanadato” (5 mM) na presença e ausência de ADP (2 mM). A reação foi iniciada após adição de ATP ao meio de reação contendo 0,3 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES a pH 7,6.

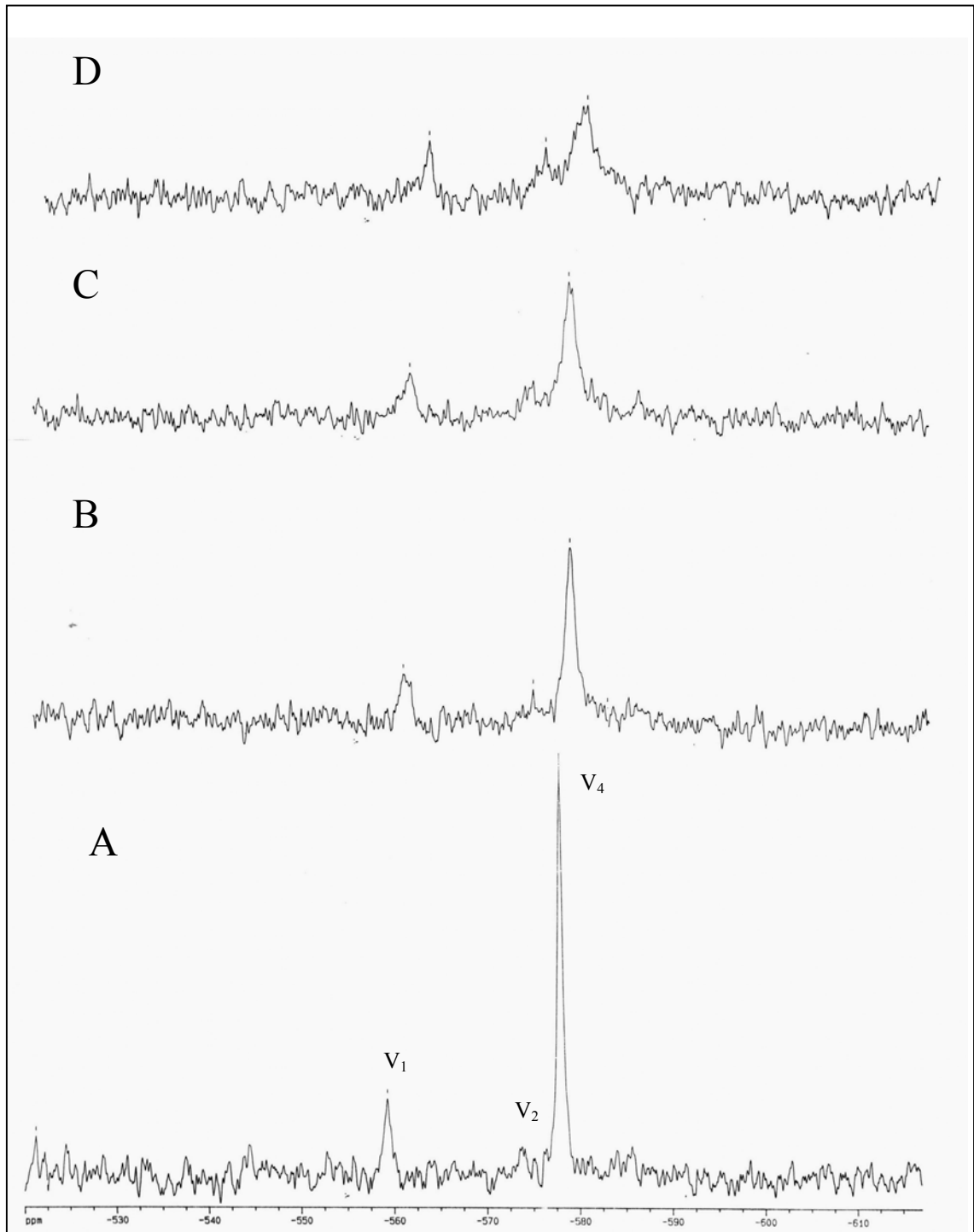
Pela análise da Figura III.9, verifica-se que a incubação da miosina com ADP favorece substancialmente o poder inibitório das soluções de “meta” e de “decavanadato”. Para além disso a espécie decamérica parece não contribuir para este aumento brusco de inibição, na medida em que a % de inibição obtida para a solução de “metavanadato” que não contem V<sub>10</sub>, foi idêntica à solução de decavanadato. É importante salientar que, a incubação da miosina com os vanadatos na ausência de ADP não altera a inibição por parte das duas soluções em relação aos ensaios realizados na ausência de incubação. Uma vez que nestes estudos de incubação, a solução de “decavanadato” vai sofrendo desoligomerização, no final do ensaio a composição de V<sub>1</sub> será superior enquanto que a de decavanadato será ligeiramente inferior (Fig. III.6). Estas observações sugerem que existe pelo menos uma espécie presente em ambas as soluções de vanadato, provavelmente a espécie monomérica, que será responsável pela formação do complexo altamente estável, M-ADP-Vi previsto por Goodno (1982).

### III.4 – Interacção das diferentes espécies de vanadato com a miosina

#### III.4.1 – Interacção $V_1$ e $V_4$

Com a finalidade de se esclarecer a participação de cada uma das espécies de vanadato na inibição da actividade ATPásica da miosina, foram realizados estudos sobre a interacção destas espécies (numa solução de “metavanadato” 5 mM) com concentrações crescentes de miosina (5, 10 e 15 mg/ml) utilizando para isso a espectroscopia de  $^{51}\text{V}$ -RMN. Verificou-se que a adição de miosina promove alterações nos sinais de  $^{51}\text{V}$ -RMN das espécies de vanadato (Fig. III.10). Estes efeitos podem ser melhor analisados na Tabela III.7 onde se apresentam os valores de largura a meia altura,  $\Delta\nu_{1/2}$ , de cada uma das ressonâncias na ausência e presença de proteína, bem como os factores de aumento,  $f$ , observados para a  $\Delta\nu_{1/2}$  devido à adição de proteína.

A solução de “metavanadato” de concentração 5 mM no meio de reacção usado nos ensaios enzimáticos contém, 930  $\mu\text{M}$   $V_1$ , 240  $\mu\text{M}$   $V_2$  e 900  $\mu\text{M}$   $V_4$  (Fig. III.5). Verificou-se que após adição de miosina, apenas os sinais de RMN correspondentes às espécies monomérica e tetramérica parecem sofrer alterações significativas. Relativamente à espécie monomérica, denota-se um desvio para campo alto de 1,0 a 3,0 ppm para as concentrações de miosina usadas e um ligeiro alargamento da banda (praticamente insignificante considerando o erro associado às medições das  $\Delta\nu_{1/2}$ ), que não se pronuncia com o aumento de concentração da miosina. Para a banda correspondente à espécie tetramérica verifica-se uma diminuição da amplitude bem como um alargamento considerável. Este efeito aumenta à medida que a concentração de miosina também aumenta.



**Figura III.10** – Espectros de RMN de  $^{51}\text{V}$  a 105.2 MHz de soluções de “metavanadato” (5 mM) num meio contendo 0,3 M KCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM HEPES, pH 7,6, na ausência (A) e na presença de 5 (B), 10 (C) e 15mg/ml (D) de miosina.  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_4$  são sinais de RMN de  $^{51}\text{V}$  correspondentes a espécies monomérica, dimérica e tetramérica, respectivamente.

**Tabela III.7** – Desvios químicos ( $\delta$ ), larguras a meia altura ( $\Delta v_{1/2}$ ) e áreas dos picos das formas monomérica ( $V_1$ ), dimérica ( $V_2$ ), e tetramérica ( $V_4$ ) presentes numa solução de metavanadato de concentração total 5 mM, num meio contendo 0.3 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Hepes, pH 7,6, na ausência e na presença de miosina 5, 10 e 15 mg/ml. Os valores dentro de parêntesis correspondem ao factor de aumento da largura a meia altura dos sinais de RMN.

	“Metavanadato” (5 mM)		
	$V_1$	$V_2$	$V_4$
<b>0 Mios</b>			
$\delta$ /ppm	-559	-574	-578
$\Delta v_{1/2}$ / Hz	93	74	55
Área	7,8	4,0	30,0
<b>Mios 5 mg/ml</b>			
$\delta$ /ppm	-560	-574	-578
$\Delta v_{1/2}$ / Hz	130	74	130
$f$	(1,4)	(1,0)	(2,4)
Área	7,5	3,2	23,0
<b>Mios 10 mg/ml</b>			
$\delta$ /ppm	-561	-574	-578
$\Delta v_{1/2}$ / Hz	130	74	168
$f$	(1,4)	(1,0)	(3,0)
Área	7,7	3,7	22,0
<b>Mios 15 mg/ml</b>			
$\delta$ /ppm	-562	-574	-578
$\Delta v_{1/2}$ / Hz	112	93	224
$f$	(1,2)	(1,3)	(4,1)
Área	7,5	5,0	19,0

É conveniente salientar que o efeito de alargamento dos sinais de  $^{51}\text{V}$ , resulta não de um aumento de viscosidade das soluções, que afectaria igualmente todos os sinais, mas sim de um processo de permuta química dos oligómeros  $V_x$  entre uma forma livre em solução e ligada (não covalentemente) à proteína (Aureliano, 1991).



Como se verifica pela Figura III.10, a diminuição de visibilidade dos sinais de  $^{51}\text{V}$  quando da adição de miosina, não é compensada pelo aparecimento de um outro sinal da espécie complexada  $nV_x.\text{miosina}$ , o que sugere um regime de permuta rápida das espécies  $V_x$  entre a forma livre e a forma complexada. O facto de não existir um sinal visível do complexo

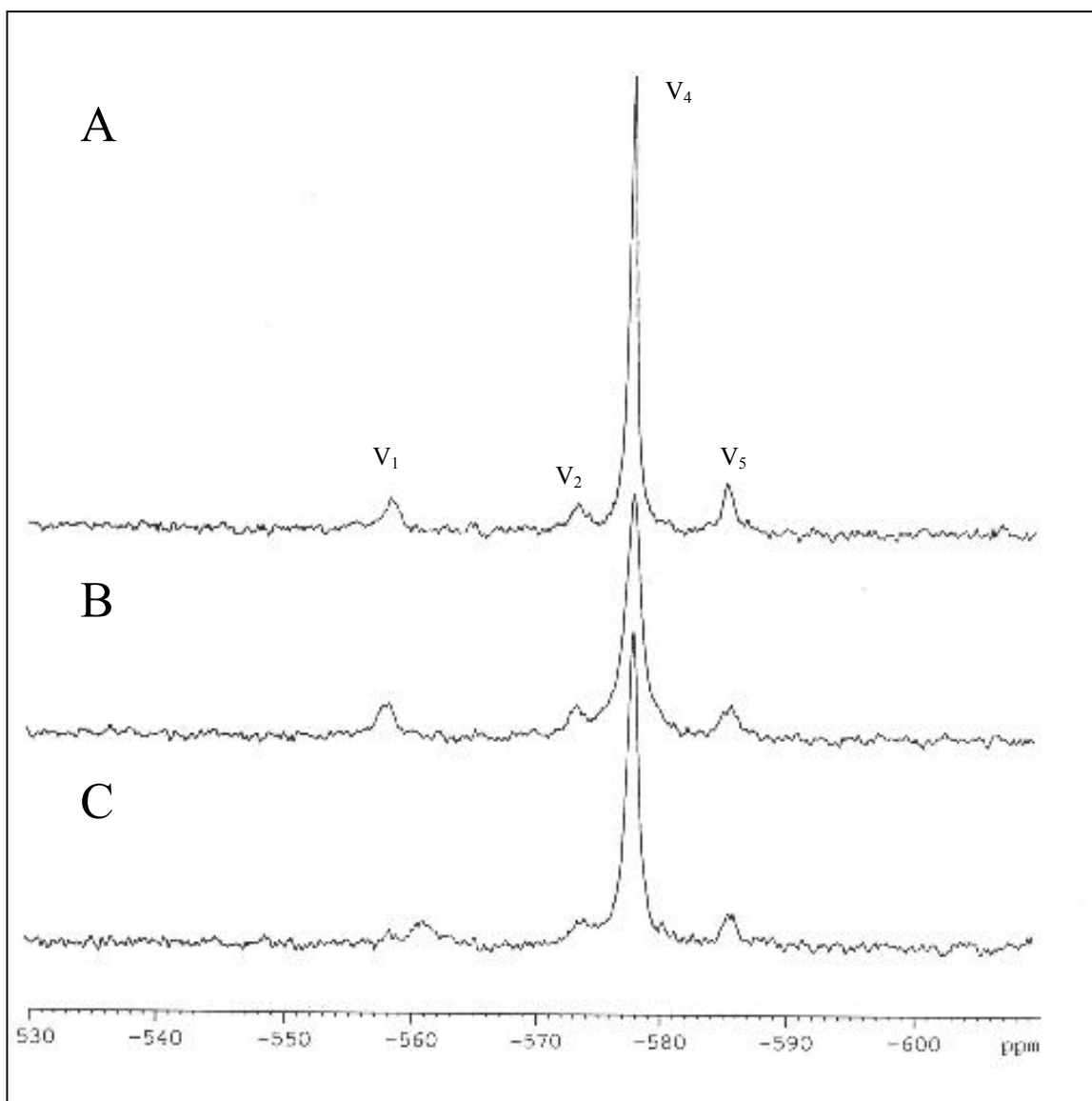
$nV_x$ .miosina, não permite o estudo quantitativo da estequiometria  $n$  e da constante de associação de  $V_x$  à miosina tal como já foi feito para a interacção com a enzima SOD (Wittenkeller, et al., 1990). No entanto, pode-se concluir qualitativamente que a espécie tetramérica interage com a miosina bastante mais fortemente que a espécie monomérica. Por outro lado, a espécie dimérica não deverá interactuar na medida em que não levou a qualquer efeito observável sobre a largura a meia altura do sinal de RMN de  $^{51}\text{V}$  correspondente.

#### III.4.2 – Efeito do ATP na interacção $V_1$ e $V_4$ com a miosina

O estudo do efeito do ATP na ligação das diferentes espécies de vanadato à miosina, foi realizado por comparação dos espectros de  $^{51}\text{V}$ -RMN de uma solução de “metavanadato” (10 mM) com a miosina (10 mg/ml) na presença e ausência de ATP (2 mM) (Fig. III.11).

A composição em vanadatos estimada para a solução de “metavanadato” (10 mM) no meio de reacção usado nos ensaios enzimáticos foi de 1340  $\mu\text{M}$   $V_1$ , 260  $\mu\text{M}$   $V_2$ , 1820  $\mu\text{M}$   $V_4$  e 230  $\mu\text{M}$   $V_5$  (Fig. III.5). Quando a esta solução é adicionado 10 mg/ml de miosina, ocorrem sensivelmente as mesmas alterações que já foram observadas na secção anterior, havendo apenas a acrescentar um pequeno alargamento da banda correspondente à espécie pentamérica, que como já foi anteriormente explicado não foi possível observar para concentrações de “metavanadato” inferiores. Na presença de ATP (2 mM), apenas as bandas correspondentes a  $V_1$  e  $V_4$  parecem sofrer alterações relativamente ao espectro anterior obtido na ausência de ATP. Como se pode verificar pela análise da Tabela III.8, enquanto que o sinal correspondente à espécie monomérica passa de um factor de aumento ( $f$ ) da largura a meia altura de 1,2 para 1,5 na ausência e presença de ATP respectivamente, a banda correspondente à espécie tetramérica sofre um aumento de

amplitude bem como uma diminuição do factor de aumento ( $f$ ) da largura a meia altura de 2,4 para 1,7. Portanto, o tetravanadato exibe uma resposta, à adição de ATP, oposta e mais profunda relativamente ao monovanadato.



**Figura III.11** - Espectros de RMN de  $^{51}\text{V}$  a 105.2 MHz de soluções de “metavanadato” (10 mM) num meio contendo 0,3 M KCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM HEPES, pH 7,6, na ausência (A) e na presença de 10 mg/ml de miosina sem (B) e com (C) ATP (2 mM).  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_4$ , e  $V_5$  são sinais de RMN de  $^{51}\text{V}$  correspondentes a espécies monomérica, dimérica, tetramérica e pentamérica, respectivamente.

**Tabela III.8** – Desvios químicos ( $\delta$ ), larguras a meia altura ( $\Delta v_{1/2}$ ) e áreas dos picos das formas monomérica ( $V_1$ ), dimérica ( $V_2$ ), e tetramérica ( $V_4$ ) presentes numa solução de metavanadato de concentração total 10 mM, num meio contendo 0,3 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Hepes, pH 7,6, na ausência e na presença de miosina 10 mg/ml sem e com Mg-ATP 2 mM. Os valores dentro de parêntesis correspondem ao factor de alargamento da largura a meia altura.

	<b>“Metavanadato” (10 mM)</b>			
	$V_1$	$V_2$	$V_4$	$V_5$
<b>0 Mios</b>				
$\delta$ /ppm	-559	-574	-578	-586
$\Delta v_{1/2}$ / Hz	112	93	55	93
Área	3,4	2,4	27,0	3,6
<b>Mios 10 mg/ml</b>				
$\delta$ /ppm	-559	-574	-578	-586
$\Delta v_{1/2}$ / Hz	130	112	130	130
$f$	(1,2)	(1,2)	(2,4)	(1,4)
Área	3,3	2,9	28,1	3,0
<b>Mios 10 mg/ml + ATP 2 mM</b>				
$\delta$ /ppm	-561	-574	-578	-586
$\Delta v_{1/2}$ / Hz	168	112	93	130
$f$	(1,5)	(1,2)	(1,7)	(1,4)
Área	2,9	2,9	27,3	3,2

É de referir que, a adição de ATP, na concentração usada, à solução de “metavanadato” não provoca nenhum efeito sistemático no equilíbrio dos vanadatos em solução (Ringel et al, 1990; Aureliano, 2000). Deste modo, considera-se que as alterações no espectro de <sup>51</sup>V-RMN após adição de ATP, na presença de miosina, se devem a alterações induzidas pelo ATP na estrutura da miosina e não à interacção do ATP com os vanadatos.

Os resultados obtidos por espectroscopia de <sup>51</sup>V-RMN sugerem que o tetravanadato na presença de ATP é dissociado da miosina, apoiando o resultado obtido por cinética enzimática de que o efeito inibitório por esta espécie é revertido pelo ATP (Fig. III.7). Pelo contrário, a ligação do monovanadato à miosina é potenciada precisamente na presença de ATP. Este efeito poderá justificar o brusco aumento de inibição, observado aquando da incubação da miosina com ADP e soluções de “metavanadato” e “decavanadato” (Fig.

III.9). De facto, nas condições usadas a espécie maioritária é sem dúvida a monomérica que poderá ter levado à formação do complexo altamente estável e inactivo M-ADP-V, tal como foi descrito anteriormente (Goodno, 1982).

Os presentes resultados estão em sintonia com os resultados apresentados por outros autores (Ringel et al., 1990) que estudaram a ligação de  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_4$  e  $V_5$  à miosina e ao seu subfragmento  $S_1$  por RMN de  $^{51}\text{V}$ . Os efeitos de alargamento dos sinais de  $^{51}\text{V}$ , observados em soluções de vanadato de concentração total 60 a 1000  $\mu\text{M}$ , após adição de miosina (50  $\mu\text{M}$ ) ou de  $S_1$  (95  $\mu\text{M}$ ), levaram à conclusão de que o  $V_4$  se liga, quer à miosina quer a  $S_1$  mais fortemente que  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_5$ . Estes autores, verificaram também, que a adição de ATP (1 mM) provoca um alargamento suplementar e um desvio considerável do sinal de  $^{51}\text{V}$  de  $V_1$  e um estreitamento do sinal de  $V_4$ , não se observando alterações nos outros sinais. Nesse estudo, concluíram assim que, o ATP aumenta a afinidade de  $V_1$  para a miosina, diminuindo a de  $V_4$ , talvez competindo com os mesmos locais, carregados positivamente, situados à superfície da proteína.

No presente estudo, é curioso o facto de termos registado um desvio para campo alto do sinal de  $^{51}\text{V}$  relativo à espécie monomérica, após adição de miosina, quer na presença (Fig. III.11 C), quer na ausência (Fig. III.10) de ATP. Supõe-se que nas condições experimentais usadas, a miosina se encontra parcialmente fosforilada (Barany, 1982). A fosforilação das cadeias leves da miosina poderá afectar em particular a interacção da espécie monomérica com a miosina provocando o desvio para campo alto. Este desvio é característico de uma interacção fosfato-vanadato (Aureliano et al., 1994).

Relativamente à espécie decamérica,  $V_{10}$ , estudos realizados com miosina totalmente purificada mostraram que os sinais correspondentes a esta espécie sofrem um alargamento muito mais acentuado do que os sinais correspondentes às espécies  $V_1$  ou  $V_4$  (Aureliano, 2000), o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho em que se

observa que a espécie decamérica é um potente inibidor da hidrólise de ATP pela miosina. A interação da espécie decamérica com a miosina será melhor esclarecida quando forem realizados estudos, por espectroscopia de  $^{51}\text{V}$ -RMN, de interação de  $\text{V}_{10}$  com a miosina, na ausência e presença de ATP.

## IV – Conclusões

☞ A combinação de estudos de cinética enzimática com espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^{51}\text{V}$ , revelou-se muito útil no cumprimento do objectivo proposto, isto é, no estudo da interacção de oligómeros de vanadato com a miosina.

☞ Os estudos por  $^{51}\text{V}$ -RMN indicaram que, pelo menos nas condições experimentais usadas, não é possível isolar cada uma das espécies oligoméricas de vanadato em solução. O efeito dessas espécies na actividade ATPásica da miosina tem de ser levado a cabo numa solução de “metavanadato” contendo uma mistura de pelo menos quatro espécies de vanadato diferentes ( $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_4$  e  $V_5$ ) e numa solução de “decavanadato” contendo essencialmente  $V_1$  e  $V_{10}$ .

☞ O alargamento selectivo das ressonâncias de  $^{51}\text{V}$ -RMN após adição de miosina indicam que, o  $V_4$  interage mais fortemente com a enzima do que o  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_5$ .

☞ O alargamento do sinal de  $^{51}\text{V}$ -RMN da espécie monomérica após adição de ATP, na presença de miosina, indica que a interacção desta espécie com a enzima é favorecida pelo substrato, assumindo provavelmente um tipo de inibição incompetitivo.

☞ O estreitamento do sinal de  $^{51}\text{V}$ -RMN da espécie tetramérica, após adição de ATP, na presença de miosina, bem como a diminuição do efeito inibitório por parte desta espécie para uma maior concentração de ATP, sugere que  $V_4$  compete directamente com o

substrato pelo local activo da miosina e/ou que a ligação do substrato conduz a alterações conformacionais da miosina desfavorecendo a interacção de  $V_4$  com a enzima.

☞ De entre as diversas espécies de vanadato presentes nas soluções usadas, a espécie decamérica demonstrou ser o inibidor mais potente. Tal com o  $V_4$ , o efeito inibitório desta espécie também é revertido pelo ATP.

☞ Com este estudo conclui-se que, para além da espécie monomérica, também as espécies tetramérica e decamérica participam na inibição da hidrólise de ATP pela miosina, e como tal, podem ser usadas com grande vantagem na sondagem do mecanismo de hidrólise de ATP pela miosina, no processo da contracção muscular.

## V – Estudos futuros

No sentido de se esclarecer melhor a contribuição das diferentes espécies oligoméricas de vanadato na inibição da actividade ATPásica da miosina, sugerem-se os seguintes estudos:

- A) Estudos de  $^{51}\text{V}$ -RMN a baixas temperaturas de forma a esclarecer o regime de troca química entre o metal livre e o metal complexado com a proteína. Foram já realizados estudos preliminares, no entanto não conclusivos.
- B) Estudos de interacção da espécie decamérica,  $V_{10}$ , com a miosina, na presença e ausência de ATP, por espectroscopia de  $^{51}\text{V}$ -RMN.
- C) Comparação de estudos com miosina parcialmente purificada na presença e ausência de EGTA, para se determinar o efeito da fosforilação das cadeias leves na interacção dos vanadatos com a miosina.
- D) Estudos de fotoclivagem de forma a localizar-se os sítios de interacção das diferentes espécies de vanadato com a miosina.
- E) Estudos espectroscópicos por EPR de forma a analisar a possível redução do vanadato (V) a vanadilo (IV), aquando da sua interacção com a miosina.
- F) Utilização de miosina isolada a partir de músculo esquelético de peixe. Resultados preliminares sugerem que existem diferentes inibições do vanadato na mesma enzima, isolada a partir de dois organismos diferentes.

## VI – Referências bibliográficas

- ❖ AMADO, A. M.; AURELIANO, M.; RIBEIRO-CLARO, P. J.; TEIXEIRA-DIAS, J. J. C. (1993). Combined Raman and  $^{51}\text{V}$  NMR spectroscopy study of vanadium (V) oligomerization in aqueous alkaline solutions. *J. Raman Spec.* **24**: 699-703.
- ❖ AURELIANO, M. (1991). Efeito da fosforilação das cadeias leves da miosina e de oligómeros de vanádio (V) na ATPase da miosina e da actomiosina. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- ❖ AURELIANO, M. (1995). Transdução e conjugação energética na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático: interacção de vanadatos. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- ❖ AURELIANO, M. (2000). Vanadate oligomers interactions with myosin. *J. Inorg. Biochem.* **80**: 141-143.
- ❖ AURELIANO, M.; LETA, J.; MADEIRA, V. M. C.; MEIS, L. (1994). The cleavage of phosphoenolpyruvate by vanadate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**: 155-159.
- ❖ AURELIANO, M.; MADEIRA, V. M. C. (1998). Energy transduction mechanisms as affected by vanadium (V) species:  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping in sarcoplasmic reticulum. In: Vanadium in the Environment (J. O. Nriagu, ed.), p. 333-357.
- ❖ AURELIANO, M.; PEDROSO DE LIMA, M. C.; CARVALHO, A. P.; PIRES, E. M. V. (1995). Effect of myosin phosphorylation on actomyosin ATPase activity: a flow microcalorimetric study. *Therm. Acta* **258**: 59-66.
- ❖ AZEVEDO, C. (1999). *Biologia Celular e Molecular*. 3ª ed., Lidel-edições técnicas.
- ❖ BAGSHAW, C. R. (1982). Muscle Contraction. In: *Outlines studies in biology* (Edit. Chapman and Hall, London).

- ❖ BARANY, K.; MEULEN, D. L.; LEDVORA, R. F.; BARANY, M. (1982). Selective phosphorylation of myosin light chain in intact skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**: 392-396.
- ❖ BODE, H. P.; FRIEBEL, C and FUHRMAN, G. F. (1990). Vanadium uptake by yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta* **1022**: 163-170.
- ❖ CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. (1997). BIOPHYSICAL CHEMISTRY. Part II: Techniques for the study of biological structure and function. W. H. FREEMAN AND COMPANY, New York.
- ❖ CHASTEEN, N. D. (1983). The biochemistry of vanadium. *Structure and bonding* **53**: 105-138.
- ❖ CRANS, D. C. (1994). Aqueous Chemistry of labile oxovanadates: relevance to biological studies. *Comments Inorg. Chem.* **16**: 1-33.
- ❖ CRANS, D. C. (1994). Enzyme interactions with labile oxovanadates and other polyoxometalates. *Comments Inorg. Chem.* **16**: 35-76.
- ❖ CRANS, D. C.; AMIN, S. S.; KERAMIDAS, A. D. (1998). Chemistry of relevance to vanadium in the environment. In: Vanadium in the Environment (J. O. Nriagu, ed.), p. 73-95.
- ❖ CRANS, D. C.; SCHELBLE, S. M. (1990). Vanadate dimer and tetramer both inhibit glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochemistry* **29**: 6698-6706.
- ❖ CRANS, D. C; TAHIR, M. M.; KERAMIDAS, A. D. (1995). Vanadium Chemistry and Biochemistry of relevance for use of vanadium compounds as antidiabetic agents. *Mol. Cell. Biochem.* **153**: 17-24.
- ❖ DIJK, J. V.; FERNANDEZ, C.; CHAUSSEPIED, P. (1998). Effect of ATP analogues in the actin-myosin interface. *Biochem.* **37**: 8385-8394.

- ❖ EMOTO, Y.; KAWAMURA, T.; TAWADA, K. (1985). Characterization of the ATPase active site in myosin subfragment-1 with the use of vanadate *plus* ADP as a reversible “affinity-labeling” reagent: evidence for heterogeneity in the active sites. *J. Biochem.* **98**: 735-745.
- ❖ ERDMAN, E.; WERDN, K.; KRAWIETZ, W.; SCMITZ, W.; SHOLZ, H. (1984). Vanadate and its significance in biochemistry and pharmacology. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 945-950.
- ❖ ETCHEVERRY, S.; CORTIZO, A. M. (1998). Bioactivity of vanadium compounds on cells in culture. In: Vanadium in the Environment (J. O. Nriagu, ed.), p. 359-394.
- ❖ FURCH, M.; GEEVES, M. A.; MANSTEIN, D. J. (1998). Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain. *Biochem.* **37**: 6317-6326.
- ❖ GEEVES, M. A.; HOLMES, K. C. (1999). Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 687-728.
- ❖ GOODNO, C. C. (1979). Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **49**: 637-654.
- ❖ GOODNO, C. C. (1982). Myosin active-site trapping with vanadate ion. *Meth. Enzym.* **85**: 116-123.
- ❖ GOLITSINA, N. L.; BORKOV, A.; DEDOVA, I. V.; PAVLOV, D. A.; NIKOLAEVA, O. P.; ORLOV, V. N.; DIMITRII, I. (1996). Differential scanning calorimetric study of the complexes of modified myosin subfragment 1 with ADP and vanadate or beryllium fluoride. *J. of Muscle and Cell Motility* **17**: 475-485.
- ❖ GOODY, R. S.; HOFMAN, W.; KONRAD, M. (1981). On the structure of the myosin-ADP-Mg complex. *Febs Letters* **129**: 169-172.

- ❖ GREENWOOD, N. N. and EARNSHAW, A. (1997). Chemistry of the elements. Second edition, Butterworth-Heinemann, p. 976-1001.
- ❖ HESLOP, R. B.; JONES, K. (1987). Química Inorgânica, 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian.
- ❖ HIGHSMITH, S. (1999). Lever arm model of force generation by actin-myosin-ATP. *Biochemistry* **38**: 9791-9797.
- ❖ HIRATSUKA, T. (1990). Transmition of ADP.vanadate induced conformational changes to three peptide segments of myosin subfragment-1. *J. Biol. Chem.* **265**: 18791-18796.
- ❖ JAMES, T. L. (1975). Nuclear Magnetic Resonance in biochemistry. Principles and applications. Academic Press, Inc.
- ❖ JOSEPHSON, L.; CANTLEY Jr., L. C. (1977). Isolation of a potent (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase inhibitor from striated muscle. *Biochemistry* **16**: 4572-4578.
- ❖ KAWAMURA, T.; TAWADA, K. (1982). Dissociation of actomyosin by vanadate plus ADP, and decomposition of the myosin-ADP-vanadate complex by actin. *J. Biochem.* **91**: 1293-1298.
- ❖ KITAMURA, K.; TOKUNAGA, M.; IWANE, A. H.; YANAGIDA, T. (1999). A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometers. *Nature* **397**: 129-134.
- ❖ LINDQUIST, R. N.; LYNN, J. L.; LIENHARD, G. E. (1973). Possible transition state analogs for ribonuclease complexes of uridine with oxovanadium (IV) ion and vanadium (V) ion. *J. Am. Chem. Soc.* **95**: 8762-8768.
- ❖ LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; DARNELL, J. (1998). Molecular Cell Biology. Scientific American Books, Inc.

- 
- ❖ MICERA, G.; SANNA, D. (1998). Spectroscopic methods for the characterization of vanadium complexes. In: *Vanadium in the Environment* (J. O. Nriagu, ed.), p. 131-166.
  - ❖ MUNSON, K. B.; SMERDON, M. J.; YOUNT, R. G. (1986). Cross-linking of myosin subfragment-1 and heavy meromyosin by use of vanadate and Bis (adenosine 5'-triphosphate) analogue. *Biochemistry* **25**: 7640-7650.
  - ❖ NECHAY, B. R. (1984). Mechanism of action of vanadium. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **24**: 501-524.
  - ❖ NRIAGU, J. O. (1998). History, occurrence, and uses of vanadium. In: *Vanadium in the Environment* (J. O. Nriagu, ed.), p. 1-24.
  - ❖ PERRY, S. V.; COLE, H. A.; HUDLICKA, O.; PATCHED, V. B.; WESTOOD, S. A. (1984). Role of myosin light chain kinase in muscle contraction. *Federation Proc.* **43**: 3015-3020.
  - ❖ PERRIE, W. T.; PERRY, S. V. (1970). An electrophoretic study of the low molecular weight components of myosin. *Biochem. J.* **119**: 31-38.
  - ❖ PLASS, W. (1999). Phosphate and vanadate in biological systems: chemical relatives or more? *Angew. Chem.* **38**: 909-912.
  - ❖ PLUMMER, D. T. (1987). *An introduction to Practical Biochemistry*. 3<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Book Company.
  - ❖ REHDER, D. (1982). A survey of <sup>51</sup>V NMR spectroscopy. *Bull Magnetic Resonance* **4**: 33-83.
  - ❖ RINGEL, I.; PEYSER, Y. M.; MULHRAD, A. (1990). <sup>51</sup>V NMR study of vanadate binding to myosin and its subfragment 1. *Biochemistry* **29**: 9091-9096.
  - ❖ SCOPES, R. (1982). *Protein purification: principles and practice*. Springer-Verlag New York Inc.

- ❖ SHECHTER, Y. (1990). Perspective in diabetes: insuli-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes. *Diabetes* **39**: 1-5.
- ❖ STANKIEWICZ, P. J.; GRESSER, M. J.; TRACEY, A. S.; HASS, L. F. (1987). 2,3-Diphosphoglycerate mutase stimulation by vanadate and phosphate. *Biochemistry* **26**: 1264-1269.
- ❖ STANKIEWICZ, P. J.; TRACEY, A. S.; CRANS, D. C. (1994). Inhibition of phosphate-metabolizing enzymes by oxovanadium (V) complexes. In: Metal ions in Biological systems **31**: 287-323. Sigel & Sigel Ed., Marcel Dekker.
- ❖ STEPKOWSKI, D.; SZCZESNA, D.; WROTEK, M.; KAKOL, I. (1985). Factors influencing interaction of phosphorylated and dephosphorylated myosin with actin. *Biochem. et Biophys. Acta* **831**: 321-329.
- ❖ TAUSSKY, H. H. and SHORR, E. (1953). A microcalorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* **202**: 675-685.
- ❖ TAYLOR, E. W.; LYMN, R. W. (1971). Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**: 4617-4624.
- ❖ VAN ETTEN, R. L.; WAYMACK, P. P.; REHKOP, D. M. (1974). Transition metal ion inhibition of enzyme-catalyzed phosphate ester displacement reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **96**: 6782-6785.
- ❖ WITTENKELLER, L.; ABRAHA, A.; RAMASAMY, R.; FREITAS, D. M.; THEISEN, L. A.; CRANS, D. C. (1991). Vanadate interactions with bovine Cu, Zn-Superoxid Dismutase as probed by  $^{51}\text{V}$  NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 7872-7881.
- ❖ ZAPOROWSKA, H.; SCIBIOR, A. (1998). Vanadium and its significance in animal cell metabolism. In: Vanadium in the Environment (J. O. Nriagu, ed.), p. 121-133.