

# Interacção do vanádio com a miosina de músculo esquelético de coelho

Joana Wilton Pereira

n.º 20201

Licenciatura em Bioquímica

Julho de 2009

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Doutor Rui O. Duarte, pela oportunidade dada para estudar este sistema tão fascinante, e pelos preciosos conselhos em relação à espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica.

À Susana Ramos, pela orientação equilibrada, paciência, dedicação, conselhos preciosos, humor e amizade, sem os quais não teria sido possível realizar este trabalho. Obrigada por me teres desafiado a ser a melhor aprendiz de cientista que conseguisse – com planeamento e determinação, tudo se consegue!

Ao Professor Doutor Manuel Aureliano (supervisor), da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, pela recepção calorosa, disponibilidade das suas instalações para a obtenção da actina e pela gentil cedência do subfragmento-1 de miosina, imprescindível para o estudo que realizei.

Ao Rui Almeida, pelos preciosos conselhos e colaboração que estimularam o meu fascínio pela ciência. A disponibilidade que mostraste para me esclarecer, sempre com clareza e simpatia tornaram o meu trabalho de todos os dias mais agradável.

Ao Américo Duarte, pela indispensável ajuda para a realização da electroforese em condições desnaturantes, e pela amizade demonstrada nos momentos em que o nervosismo tomou conta de mim.

À Dra. Maria do Rosário Caras-Altas, pela disponibilidade concedida no uso do espectrómetro de RMN, equipamento crucial na realização deste trabalho.

A todos os meus colegas dos laboratórios 407 e 613, cujo bom-humor e entreaajuda tornaram os meus dias mais agradáveis.

## Abreviaturas e Símbolos

Abs<sub>x</sub> – Absorvência ao comprimento de onda x (em nm)

ADP - Adenosina 5'-difosfato

ATP – Adenosina 5'-trifosfato

ATPase – Adenosina 5'-trifosfatase

BSA – Albumina de soro bovino

β-Me - β-Mercaptoetanol

CNT – Anião 3-carboxilato-4-nitrotiofenolato

Cys – Cisteína

DTNB – 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)

ε - Coeficiente de extinção (molar)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELC – Cadeia leve essencial de miosina

F-actina – Forma filamentosa da actina

g – Aceleração da gravidade

G-actina – Forma monomérica da actina

h – Horas

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico

HMM – Meromiosina pesada

IC50 – Concentração inibitória, 50%

LDH – Lactato desidrogenase

Miosina-II – Miosina do tipo II

Met - Metionina

NAD<sup>+</sup> – Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)

NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)

PDB – Protein Data Bank

Pi – Fosfato inorgânico

PEP – Fosfoenolpiruvato

PK – Piruvato cinase

PM – Peso Molecular

ppb – Partes por bilião (1 µg/L)

ppm – Partes por milhão (1 mg/L)

PSA – persulfato de amónio

Rf - Mobilidade relativa

RLC – Cadeia leve regulatória de miosina

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

RPE – Ressonância Paramagnética Electrónica

S1 – Subfragmento-1 da miosina II

SDS – Dodecilo sulfato de sódio

SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS (condições desnaturantes)

SH1 – Grupo tiol mais reactivo da miosina (resíduo Cys-707)

SH2 – segundo grupo tiol mais reactivo da miosina (resíduo Cys-697)

SNC – Sistema Nervoso Central

TCA – Ácido tricloroacético

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina

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

Trp – triptofano

Tyr – tirosina

UV – gama ultravioleta do espectro electromagnético

Vis – gama visível do espectro electromagnético

## Resumo

A exposição a vanádio conduz a uma diminuição na actividade ATPásica da miosina e provoca a oxidação dos grupos sulfidrilo desta proteína. No entanto, não está integralmente esclarecido quais os efeitos específicos que ocorrem na miosina quando exposta ao vanádio. Nesse sentido, interessou determinar *in vitro* quais as alterações estruturais, funcionais e moleculares ocorridas no Subfragmento-1 de miosina de músculo esquelético de coelho após a exposição crónica a soluções de metavanadato, decavanadato e vanadilo. Verificou-se que a exposição de S1 (0,05 mg/mL) a decavanadato inibe a sua actividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica, sendo o valor de  $IC_{50}$  para esta inibição de  $26,6 \pm 0,7 \mu M$  decavanadato. Na presença de actina, o valor de  $IC_{50}$  é de  $28 \pm 1 \mu M$  decavanadato. A perda de funcionalidade proteica poderá dever-se à oxidação de 2 resíduos de Cys de S1 não expostos ao solvente, após exposição a  $1000 \mu M$  de decavanadato. Verificou-se que as espécies oligoméricas de vanádio com maior afinidade para o S1 são o decavanadato e o tetravanadato. Revelaram-se os possíveis ligandos do vanádio no S1, através de espectroscopia de RPE. Globalmente, os resultados obtidos sugerem um efeito significativo do vanádio, nos estados de oxidação (IV) e (V) na estrutura e função do S1, em concentrações facilmente alcançáveis daquele metal no ambiente terrestre.

## Summary

The exposure to vanadium leads to a decrease of the myosin ATPase activity and provokes the oxidation of its sulfhydryl groups. However, the specific effects of vanadium on myosin are not yet fully understood. Consequently, the objectives of the present work were to establish the structural, functional and molecular changes suffered by rabbit myosin subfragment-1 after chronic exposure to metavanadate, decavanadate and vanadyl solutions. It was verified that the exposure of S1 (0,05 mg/mL) to decavanadate results in the inhibition of its  $Mg^{2+}$ -ATPase activity, resulting in the  $IC_{50}$  value  $26,6 \pm 0,7 \mu M$  decavanadate. In the presence of actin, the  $IC_{50}$  value was  $28 \pm 1 \mu M$  decavanadate. It is suggested that the loss of protein function may be due to the oxidation of 2 core cysteine residues, after exposure to  $1000 \mu M$  decavanadate. It was also observed that the decavanadate and tetravanadate species show the highest affinity for S1. Lastly, the possible S1 ligands to vanadium were revealed, through EPR spectroscopy. Globally, the obtained results point to significant effect of V(V) and V(IV) states on S1 structure and function, for easily reachable environmental vanadium concentrations.

## **Índice**

### **1. Introdução**

- 1.1 Músculo esquelético
  - 1.1.1 Miosina
  - 1.1.2 Actina
  - 1.1.3 Mecanismos moleculares da contracção muscular
    - 1.1.3.1 Regulação da contracção muscular
- 1.2 Vanádio
  - 1.2.1 Propriedades químicas
    - 1.2.1.1 Vanádio (IV)
    - 1.2.1.2 Vanádio (V)
  - 1.2.2 Metabolismo e efeito na actividade enzimática
- 1.3 Vanádio e músculo esquelético
- 1.4 Objectivos do projecto

### **2. Discussão de Resultados**

- 2.1 Caracterização das proteínas isoladas
  - 2.1.1 Análise do estado de pureza
  - 2.1.2 Determinação da concentração proteica
    - 2.1.2.1 Subfragmento-1 de miosina
    - 2.1.2.2 Actina
  - 2.2 Medição da actividade enzimática de S1 de miosina
    - 2.2.1 Medição das actividades de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase de S1, pelo método de Fiske-Subarow modificado
    - 2.2.2 Medição da actividade de  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase de S1 estimulada por actina, pelo método de enzimas acopladas
  - 2.3 Preparação e caracterização das soluções de vanádio
    - 2.3.1 Análise da composição das soluções de vanadato por espectroscopia de  $^{51}\text{V}$ -RMN: efeito da concentração da espécie
    - 2.3.2 Estabilidade das soluções de decavanadato: análise por espectroscopia de absorção UV/Vis
  - 2.4 Interação de S1 com vanádio(V)
    - 2.4.1 Análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
    - 2.4.2 Actividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica de S1 de miosina na presença de decanadato
    - 2.4.3 Quantificação de cisteínas reduzidas, pelo método de Ellman
  - 2.5 Interação de S1 com vanádio(IV)
    - 2.5.1 Análise por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica

### **3. Procedimento Experimental**

- 3.1 Reagentes
- 3.2 Métodos
  - 3.2.1 Isolamento e purificação das proteínas de músculo esquelético de coelho
    - 3.2.1.1 Purificação da miosina; preparação de Subfragmento 1 por digestão quimotripsica da miosina
      - 3.2.1.1.1 Purificação da miosina
      - 3.2.1.1.2 Preparação de Subfragmento-1 de miosina por digestão quimotripsica
    - 3.2.1.2 Isolamento e purificação de actina
      - 3.2.1.2.1 Obtenção do “pó de acetona”
      - 3.2.1.2.2 Purificação da actina a partir de “pó de acetona”
  - 3.3.1 Quantificação das proteínas isoladas
    - 3.3.1.1 Quantificação pelo método de Bradford

- 3.3.1.2 Quantificação pelo método directo
- 3.3.2 Electroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)
- 3.4 Medição da actividade enzimática de S1
  - 3.4.1 Medição das actividades de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase de S1, pelo método de Fiske-Subarow modificado
  - 3.4.2 Medição da actividade de  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase de S1 estimulada por actina, pelo método de enzimas acopladas
- 3.5 Preparação e caracterização das soluções de vanádio por Espectroscopia UV-Visível e Ressonância Magnética Nuclear
  - 3.5.1 Preparação das soluções de vanadato
  - 3.5.2 Análise por UV-Vis para determinação da ordem da reacção
  - 3.5.3 Análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
- 3.6 Interacção de S1 com vanádio
  - 3.6.1 Quantificação de cisteínas reduzidas
  - 3.6.2 Interacção de V(IV) com subfragmento-1 de miosina
    - 3.6.2.1 Análise por Ressonância Paramagnética Electrónica
  - 3.6.3 Interacção de S1 com V(V) por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

#### **4. Conclusões gerais**

#### **5. Estudos futuros**

#### **6. Referências bibliográficas**

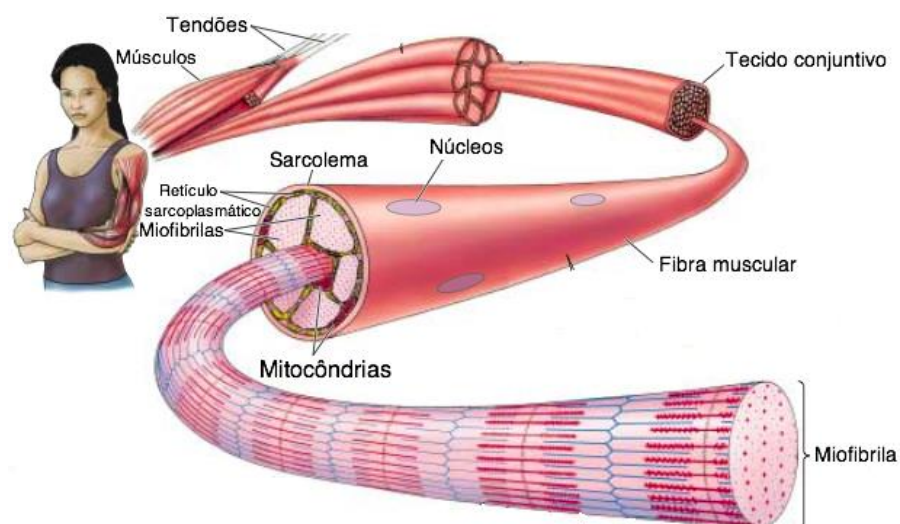
## 1. Introdução

### 1.1 Músculo esquelético

A capacidade de locomoção é uma das características fundamentais da maioria dos organismos vivos. A contração muscular, um dos fenómenos que a torna possível, apresenta grande complexidade e tem vindo a ser utilizado como modelo para a compreensão de sistemas menos especializados de mobilidade celular [1].

No que diz respeito à sua fisiologia morfológica, os músculos dos vertebrados dividem-se em lisos e estriados. Estes últimos devem o seu nome à alternância de zonas claras e escuras observáveis ao microscópio electrónico, de que resulta um aspecto estriado. Os músculos estriados podem ainda ser divididos em duas subclasses, músculos esqueléticos e cardíacos [2], consoante a forma celular (respectivamente longitudinal ou ramificada) ou tipo de contração das células que o compõem (respectivamente voluntária e involuntária) [3].

Os músculos estriados esqueléticos são assim designados devido à sua localização no organismo – ligados aos ossos da coluna vertical, braços e pernas. São constituídos por feixes de células multinucleadas (miofibras) que contêm miofibrilas paralelas de cerca de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, associadas à contração voluntária, rápida e forte em actividades de coordenação complexa [4]. Cada feixe apresenta um diâmetro compreendido entre 20 e 100  $\mu\text{m}$  e um comprimento máximo que pode atingir vários centímetros (Fig. 1.1).

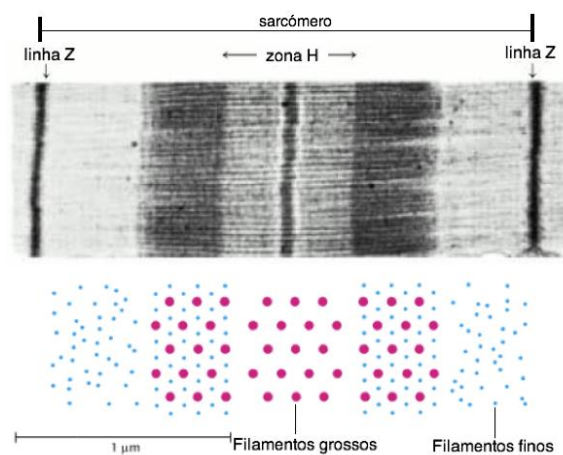


**Figura 1.1** – Organização hierárquica geral do músculo-esquelético (adaptado de Purves et al, 2003 [3]).

No músculo-esquelético, as zonas claras e escuras supramencionadas correspondem a zonas de menor e maior densidade electrónica, respectivamente. As zonas claras constituem as bandas I (de

“isotropia” – polarização uniforme em todas as direcções), enquanto as zonas escuras constituem as bandas A (de “anisotropia” – polariza a luz visível). A banda I encontra-se dividida transversalmente por uma linha escura – linha Z, de densidade electrónica e refração superiores. No interior de cada banda A existe uma zona transversal menos densa – zona H – rica em enzimas importantes para o metabolismo celular. No centro desta zona existe uma linha perpendicular mais escura – linha M [2].

A unidade fundamental da contracção muscular é designada por sarcómero (Fig. 1.2). Encontra-se repetida de forma regular ao longo das miofibrilas, apresentando um comprimento de 2,5 a 3  $\mu\text{m}$  aquando do relaxamento muscular, diminuindo aquando da contracção muscular.



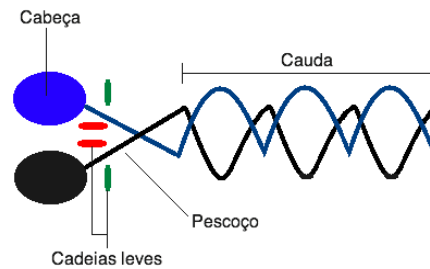
**Figura 1.2** – Representação de fotomicrografia electrónica e esquemática do sarcómero. Os filamentos grossos e finos são maioritariamente constituídos por miosina e actina, respectivamente (Adaptado de Stryer, 2002 [2]).

As secções de corte do sarcómero dão conta da presença de dois tipos de filamentos proteicos – os filamentos grossos, cujo diâmetro é de 15 nm, constituídos sobretudo por miosina, e os filamentos finos, com um diâmetro de 9 nm, constituídos sobretudo por actina, tropomiosina e pelo complexo de troponina [2].

### 1.1.1 Miosina

Actualmente, o termo "miosina" refere-se a uma superfamília diversa de motores moleculares, capazes de hidrolisar ATP e de se ligarem reversivelmente à actina. A classificação da superfamília das miosinas nas 15 classes distintas faz-se através de homologia entre as diferentes sequências [A]. É também possível a classificação por subclasses, das quais se destaca a subclasse 4, proveniente do músculo-esquelético e cardíaco de vertebrados. Este estudo focar-se-á apenas nas miosinas de classe II (miosina-II), presente nos filamentos grossos do músculo estriado esquelético [B] e em células não musculares. A função da miosina-II depende da sua localização celular e tecidual.

A miosina-II é constituída por duas cadeias polipeptídicas idênticas, denominadas cadeias pesadas de miosina (HC), enroladas entre si e cujo peso molecular (PM) está compreendido entre 171 e 241 kDa). Estruturalmente, as HC dividem-se em 3 domínios funcionais - cabeça, pescoço e cauda como se pode observar na Fig. 1.3. Às cabeças ou zonas globulares estão associados dois pares de cadeias leves (peso molecular entre 15 e 30 kDa), que se dividem em dois tipos: essencial (ELC) e regulatório (RLC).



**Figura 1.3** – Estrutura esquemática da molécula de miosina-II. Destacam-se as duas cabeças globulares e a cauda filamentososa, ligadas entre si por uma zona flexível denominada pescoço. As cadeias leves (a verde e vermelho) encontram-se associadas às cabeças globulares.

As cabeças globulares, contendo os locais de ligação à actina e aos nucleótidos, mantêm os seus elementos estruturais básicos conservados em todas as classes, sendo estes constituídos por 720-80 a.a. A região do pescoço é constituída por uma longa hélice  $\alpha$ , pertencente à cadeia pesada, que se encontra estabilizada através da ligação a subunidades de cadeia leve. A estrutura do pescoço envolvida na ligação às cadeias leves é denominada de motivo IQ, cuja estrutura consensual é IQXXXRGXXXR<sup>1</sup>. O pescoço serve como extensão do comprimento da cabeça, de modo a actuar como alavanca durante a contração muscular [A]. A região da cauda, ou âncora, apresenta bastante divergência no que respeita à sua sequência, estrutura e função. No entanto, pensa-se que a sua função centrar-se-á na autoassociação das várias moléculas de miosina-II, através da região de *coiled-coil*. Esta confere assimetria à molécula e permite a formação de filamentos grossos capazes de translocar filamentos de actina [A].

Na região da cabeça da miosina existem 2 regiões extremamente sensíveis à proteólise. A clivagem em ambos os locais resulta na produção de três fragmentos: um compreendendo o N-terminal (fragmento 25 kDa), outro a região central (50 kDa) e um terceiro o C-terminal (20 kDa) (Fig. 1.4). Estes fragmentos dissociam-se em condições desnaturantes e não constituem domínios independentes da cabeça, mas provavelmente *loops* flexíveis, uma vez que não foram observadas na estrutura cristalina. Os vários fragmentos obtidos em diferentes condições foram cruciais para a elucidação das várias funções da molécula.

A região compreendida entre os fragmentos 25 e 50 kDa (*loop 1*) localiza-se directamente por

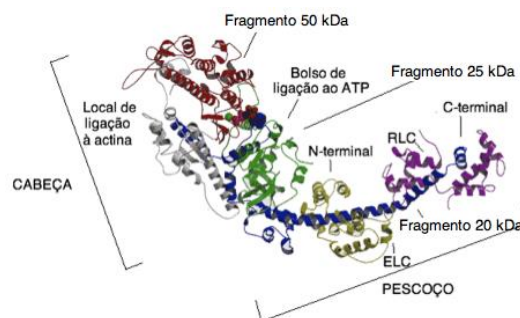
<sup>1</sup> I = Isoleucina; Q = Glutamina, X = qualquer dos 20 aminoácidos padrão; R = Arginina; G = Glicina

cima do local de ligação ao nucleótido. A região entre os fragmentos de 50 e 20 kDa (*loop 2*) encontra-se perto da intersecção entre os domínios da cabeça e do pescoço e deverá interagir com a actina, uma vez que a ligação desta a protege da proteólise. Na ausência do *loop 2*, a miosina liga mais fracamente à actina do que no caso da miosina intacta. A sequência primária de ambos os loops apresenta conservação reduzida, sendo provável que sejam responsáveis por muita da diversidade das diferentes propriedades enzimáticas presentes em diferentes isoformas.

No fragmento de 20 kDa, existem dois grupos sulfidrilo, Cys-707 e -697, usualmente denominados de SH1 e SH2, devido à ordem da sua reactividade química. Na presença de nucleótidos, pode ocorrer o “cross-linking” entre estes dois grupos, incluindo a oxidação a uma ponte dissulfureto.

Devido à insolubilidade da miosina-II nativa, a estratégia adoptada para os estudos com esta proteína é frequentemente a sua clivagem em fragmentos funcionais separáveis. Um dos locais de clivagem ocorre tipicamente a 130 kDa do N-terminal, produzindo a meromiosina pesada (HMM) e a meromiosina leve (LMM) [C]. A HMM é formada pelas 2 cabeças e pescoço e apresenta propriedades semelhantes à miosina sem digestão (ligação e translocação de actina e hidrólise de MgATP).

A HMM pode ser novamente clivada através de uma reacção de proteólise, produzindo os subfragmentos 1 (S1) e 2 (S2). O S1 (90 kDa) é enzimaticamente activo, sendo constituído pelos domínios da cabeça e do pescoço e apresentando associação às duas cadeias leves, ou apenas à ELC (Fig. 1.4). Em alternativa, o S1 pode ser produzido por clivagem directa da miosina intacta, formando-se também um fragmento em forma de cilindro que consiste nas regiões S2 e LMM (Ref). Utiliza-se extensivamente o S1 para estudos cinéticos e de ligação à actina, uma vez que a sua solubilidade simplifica o planeamento da experiência e a subsequente interpretação dos dados [A].



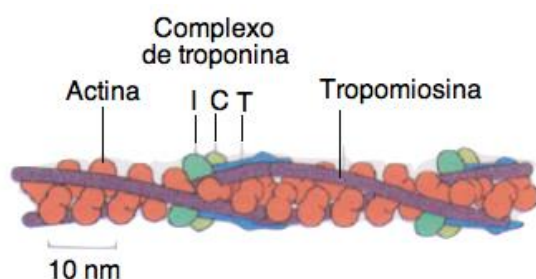
**Figura 1.4-** Estrutura do subfragmento-1 de miosina de músculo esquelético, com ênfase nos domínios de 50 kDa central (a vermelho), 25 kDa no N-terminal (a verde) e 20 kDa no C-terminal (a azul). As cadeias leves essenciais encontram-se a amarelo e as cadeias leves regulatórias, a lilás. Os locais de ligação à actina e ao ATP estão igualmente destacados. (adaptado de Holmes e Geeves, 1999 [D]).

### 1.1.2 Actina

O termo “actina” refere-se a uma família extremamente conservada de proteínas citoplasmáticas, presente em todos os eucariotas. Esta proteína não se encontra nos procariotas [E]. A maioria das actinas possui peso molecular próximo de 42 kDa, outra evidência do seu grau elevado de conservação, no que concerne à sequência e ao número de aminoácidos. Os eucariotas superiores apresentam um grande número de isoformas de actina, que por sua vez se encontram codificados por um ainda maior número de genes (Ref). A expressão das isoformas é diferencial, consoante o tecido e sua especialização, pelo que deverão possuir funções e mecanismos direccionais diferentes (Ref). Foi ainda observado que os mRNA das diferentes isoformas apresentam uma distribuição heterogénea nas células, de forma semelhante aos seus produtos proteicos [F]. Estes dados suportam a hipótese supramencionada do direccionamento das isoformas de actina para um determinado local na célula, de acordo com as suas funções.

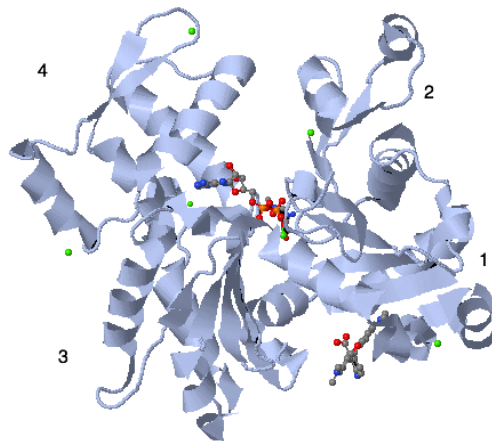
A actina presente no citoesqueleto é responsável por processos como o mecanismo contráctil, fagocitose, manutenção e alteração da estrutura celular, locomoção, transporte de organelos, regulação do transporte de solutos, entre outras. Nos eucariotas superiores, está ainda envolvida no transporte de grânulos de pigmento retinóide [G], transporte de grânulos no axoplasma [H] e secreção, entre outros [E]. Actualmente, a isoforma  $\alpha$  da actina ( $\alpha$ -actina) é a melhor estudada, encontrando-se envolvida no mecanismo contráctil [E].

Os filamentos de  $\alpha$ -actina têm cerca de  $1\mu\text{m}$  de comprimento e  $80\text{ \AA}$ . Consistem em duas cadeias de actina filamentosa (F-actina) organizados em hélice  $\alpha$ [I] (Holmes et al, 1990), sobre os quais se encontram outras proteínas – a troponina (C, I e T) e a tropomiosina (Azevedo, 1999) (Figura 1.5). A troponina é filamentosa e localiza-se nas depressões da hélice de F-actina, conferindo rigidez aos filamentos finos. Por sua vez, a tropomiosina é essencial na regulação do mecanismo contráctil .



**Figura 1.5** – Modelo estrutural dos filamentos de F-actina, contendo a tropomiosina e o complexo de troponina (I, C e T) (Adaptado de Susana Ramos, 2005 [J]).

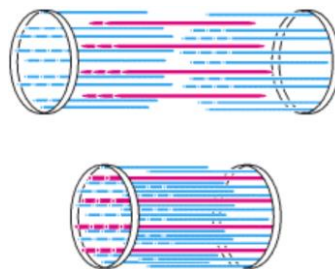
A F-actina é formada através da polimerização de subunidades globulares de actina (G-actina). A G-actina é composta por 2 domínios de tamanho semelhante, separados pelos bolsos de ligação(1) de catiões divalentes e(2) de nucleótidos [K,L,M]. Estes, por sua vez, estão subdivididos noutros dois de menores dimensões (1-4) (Fig. 1.6), cada um envolvido nas interações actina-actina ou na formação do topo de ligação do nucleótido. As regiões N-terminal e C-terminal estão próximas uma da outra, no subdomínio 1 [E].



**Figura 1.6** – Estrutura do monómero de actina. Encontram-se representados os subdomínios 1 a 4 e, a vermelho, a molécula de ATP junto do respectivo local de ligação (Protein Data Bank ID: 1j6z)

### 1.1.3 Mecanismos moleculares da contracção muscular

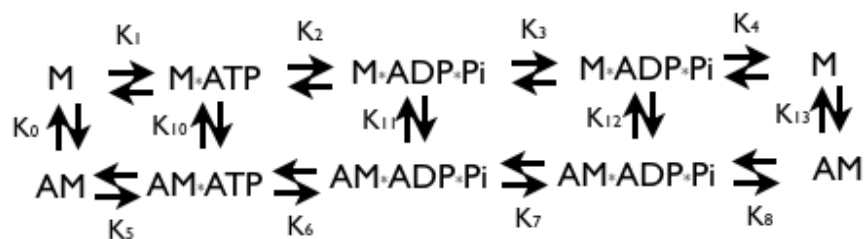
A contracção muscular ocorre através do deslizamento dos filamentos finos (de actina) por entre os filamentos grossos (de miosina), conseguida pela reacção de hidrólise de ATP e regulada pela tropomiosina e pelo complexo de troponina, em resposta a impulsos nervosos. Este mecanismo foi inicialmente proposto por Huxley-Niedergerke [N] e Huxley-Hanson [O], ambos em 1954. A base experimental de ambos os estudos foi a inexistência de variação do tamanho dos filamentos durante a contracção. A banda A apresenta sempre as mesmas dimensões; por outro lado, a banda I e a zona H diminuem consideravelmente aquando da contracção (Figs. 1.2 e 1.7).



**Figura 1.7.** – Modelo da contracção muscular – deslizamento dos filamentos finos (azuis), relativamente aos filamentos grossos (rosa) (Adaptado de Stryer, 2002 [2]).

Na ausência de ATP, e supondo a ausência de inibição da interacção actina-miosina, as proteínas encontram-se fortemente associadas, formando o complexo actomiosina (AM) (Figura 1.5). Nestas condições, as cabeças de miosina formam um ângulo de 45° com o eixo dos filamentos finos de actina [P].

Na presença de ATP, o complexo AM dissocia-se, já que a afinidade do complexo M-ATP para a actina é 105 vezes inferior à afinidade da miosina para a actina. O ATP liga-se à miosina, ocorrendo seguidamente a reacção de hidrólise de ATP. Os produtos daí resultantes – ADP e Pi – permanecem ligados à miosina, formando o complexo M-ADP-Pi. Com a ligação subsequente à actina, forma-se o complexo AM-ADP-Pi, no qual as cabeças de miosina apresentam um ângulo recto com o eixo do músculo [P]. Neste ponto, dá-se a libertação progressiva de Pi e ADP. É provável que a energia proveniente da hidrólise do ATP provoque uma alteração do ângulo de ligação das cabeças de miosina ao filamento de actina, passando novamente de 90° para 45° [P]. Esta alteração conformacional provoca o deslizamento do filamento de actina para o centro do sarcómero, cujo encurtamento promove a contracção das miofibrilas. O processo supracitado ocorre em cerca de 1ms[Q] e encontra-se resumido na Fig. 1.8.



**Figura 1.8** – Esquema cinético da hidrólise de ATP pela miosina (Adaptado de Sellers, 1999 [A]).

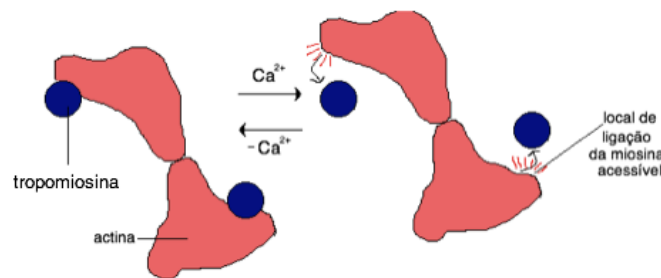
### 1.1.3.1 Regulação da contracção muscular

O mecanismo pelo qual se processa a regulação muscular foi inicialmente descrito por estudos distintos de Haselgrove, Huxley e Parrey-Squire, todos em 1973 [R,S,T]. Além da implicação directa da tropomiosina e do complexo de troponina, a concentração de  $Ca^{2+}$  no músculo em relaxamento é bastante reduzida ( $10^{-7}$  M), aumentando notavelmente aquando da contracção ( $10^{-5}$ - $10^{-3}$  M).

Resumidamente, quando ocorre a excitação do músculo esquelético, a despolarização da membrana plasmática é difundida até ao interior do tecido, através dos túbulos transversais (invaginações da membrana plasmática da fibra muscular). A despolarização provoca a abertura dos canais iónicos de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático adjacente. Como a concentração de  $Ca^{2+}$  no interior do organelo é muito elevada, o cálcio passa rápida e uniformemente para o citosol.

Assim, a regulação da contração ocorre com coordenação e rapidez na totalidade das miofibrilas do tecido muscular (Ref).

Em repouso, a troponina I encontra-se posicionada de tal forma que a proteína adjacente, troponina C, impede estruturalmente a ligação das cabeças da miosina à actina (ângulo  $\theta=50^\circ$ ). O aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca um aumento da sua disponibilidade para ligar à troponina C (Fig. 1.9).



**Figura 1.9**– Regulação do mecanismo contráctil no músculo esquelético, pelo complexo de troponina.

Como consequência, a troponina C altera a sua conformação ( $\theta=70^\circ$ ), associando-se à troponina I, que deixa de inibir a ligação das pontes transversais. A alteração anterior é transmitida à tropomiosina através da troponina T, adjacente à C, o que provoca o deslocamento da tropomiosina na direcção do interior do sulco do filamento de actina. Assim, é possível a interacção eficaz entre actina e miosina. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático provoca a reacumulação do ião cálcio no organelo, impedindo o prolongamento desnecessário da contração (Ref<sup>1</sup>).

## 1.2 Vanádio

O vanádio é um metal de transição pertencente ao grupo VB da tabela periódica. Foi primeiramente descoberto em 1801 por Andrés Manuel del Río, que concluiu erradamente que era idêntico ao crómio, e definitivamente por Nils Gabriel Svenson, em 1831. Recentemente, foram descobertas importantes funções biológicas deste elemento provavelmente essencial para os humanos, de que se destaca, no contexto do presente relatório, a possibilidade de actuar como análogo do grupo fosfato e a inibição de enzimas *in vitro*, como é o caso da actividade ATPásica da miosina.

É um metal sólido à temperatura ambiente, que se encontra amplamente distribuído nos vários ecossistemas, em dois isótopos naturais –  $^{50}\text{V}$  e  $^{51}\text{V}$  – raramente excedendo 0,1 partes por bilião

(ppb). Está associado a cerca de 70 minerais diferentes na natureza (dos quais se destacam o urânio, cobre, chumbo, zinco, fosfato e titânio ferroso), especialmente na forma de vanadato ou pentóxidos de vanádio. O vanádio é um dos principais constituintes da matéria orgânica fóssil, com especial ênfase para o carvão, óleo de crude e fósseis carbonáceos [U,V], bem como em alimentos consumidos pelo Homem (salsa, pimenta preta, cogumelos, marisco, vegetais, cereais, gorduras e óleos) [W]. Estes constituem a maior fonte de exposição ao vanádio da maioria da população humana [X].

Normalmente, a entrada do vanádio no organismo ocorre por inalação ou, em menores quantidades, por absorção pelo tracto gastrointestinal ou pela pele. O seu armazenamento centra-se no fígado, rins, cérebro, coração, músculos e ossos. No entanto, a retenção de vanádio no organismo humano é reduzida – em condições normais, cerca de 100  $\mu\text{M}$  (em muitos tecidos, a quantidade é inferior a 10 ng/g de tecido) [Y].

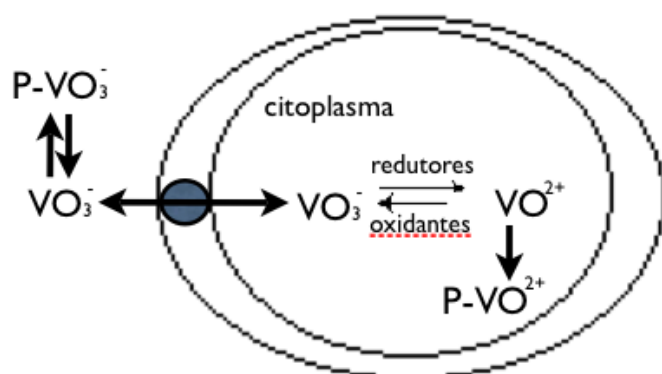
Actualmente, não existem provas de deficiência nutricional de vanádio em humanos, ou de enzimas que contenham vanádio, em animais superiores. No entanto, vários estudos relacionam a ocorrência de deficiência em galinhas e ratos, devido a uma alimentação pobre em vanádio. Os sintomas relatados incluem retardamento do crescimento, malformações ósseas, perturbações no metabolismo lipídico e estagnação reprodutiva, entre outros [Z, AA, AB]. Os efeitos fisiológicos do vanádio podem depender do tipo de composto ou de oligómero, uma vez que, consoante as suas estabilidade, labilidade e número de coordenação, as respostas serão diferenciadas ao nível dos organismos vivos .

Por outro lado, a toxicidade do vanádio encontra-se bem caracterizada, existindo sintomas descritos em vários mamíferos (*inclusive* o Homem), que incluem diarreias, câibras, irritação da pele e mucosas, palpitações cardíacas, anemia, pneumonia, bronquite, perturbações no Sistema Nervoso Central (SNC), entre outros (Ref). A toxicidade varia geralmente com a natureza do composto, com aumento proporcional à sua valência. Verificou-se que a forma de entrada do vanádio tem também efeito na sua toxicidade – os maiores níveis verificaram-se por injeção intravenosa da amostra, sendo progressivamente inferiores por inalação e, finalmente, por ingestão [X, AA]. A ampla utilização dos compostos de vanádio na indústria química, bem como as elevadas quantidades de vanádio libertadas através da combustão dos óleos de crude contribuem consideravelmente para o aumento da biodisponibilidade do vanádio. Como tal, o interesse neste elemento e nos problemas ambientais por ele causados tem vindo a aumentar significativamente [V].

### 1.2.1 Propriedades químicas

A química do vanádio é extraordinariamente complexa, pelo que originou várias interpretações incorrectas, desde a sua descoberta. No entanto, as suas propriedades dependem, em última análise, da configuração electrónica do elemento. Assim, a variabilidade encontrada no comportamento químico do vanádio pode dever-se à sua configuração –  $[Ar] 3d^2 4s^2$  – que permite a formação de vários estados de oxidação (de +2 a +5). Em solução aquosa, os estados de oxidação estáveis vão de V(V) a V(II). Destes, apenas os +3 a +5 são biologicamente importantes, já que o V(II) apresenta demasiada capacidade redutora para existir nos organismos vivos conhecidos [AC].

No fluido extracelular, os compostos de vanádio encontram-se predominantemente na forma de monovanadatos (V(V)) livres ou ligados à transferina do soro ou à hemoglobina (Ref<sup>a</sup>). Os iões de vanadato livres são transportados para o meio intracelular através de canais iónicos inespecíficos. Já no ambiente intracelular, os compostos sofrerão uma bio-redução, através da acção da glutathiona ou outros compostos com grupos –OH, como pentoses, hexoses ou etanolaminas [V]. A reoxidação de vanadilo (V(IV)) intracelular a vanadato (V(V)) provocaria a acumulação tóxica destes últimos, pelo que a complexação da espécie reduzida o impede. O transporte de vanádio para o interior da célula encontra-se na Fig. 1.10 .



**Figura 1.10** – Transporte de vanádio para a célula e seu subsequente metabolismo (P=Proteína) (Adaptado de Zaporowska e Scibor, 1998).

### 1.2.1.1 Vanádio(IV)

A espécie de vanádio (IV) mais bem conhecida é o ião vanadilo ( $VO^{2+}$ ), espécie estável a pH ácido, sendo a maioritária a pH 3[AD]. Apresenta uma cor azulada e forma complexos penta e hexacoordenados. Forma-se rapidamente a partir de V(V), na presença de um agente redutor em solução aquosa. No ambiente intracelular, a presença de glutathiona reduzida, ácido ascórbico NAD(P)H, entre outros, conduzem a que o principal estado de oxidação nos sistemas biológicos seja provavelmente o +4, encontrando-se o V(IV) fortemente complexado com proteínas ou aminoácidos livres, citrato, ATP e pirofosfato (Ref<sup>s</sup>). Em alternativa, o V(IV) pode existir

livremente em ambientes fortemente ácidos, como os lisossomas, já que, a pH superior a 3, as soluções de vanadilo tendem a ser oxidadas pelo ar, formando-se vanadato. Esta grande capacidade redutora justifica parcialmente a utilização pouco extensiva do ião  $\text{VO}^{2+}$  como inibidor [W].

### 1.2.1.2 Vanádio (V)

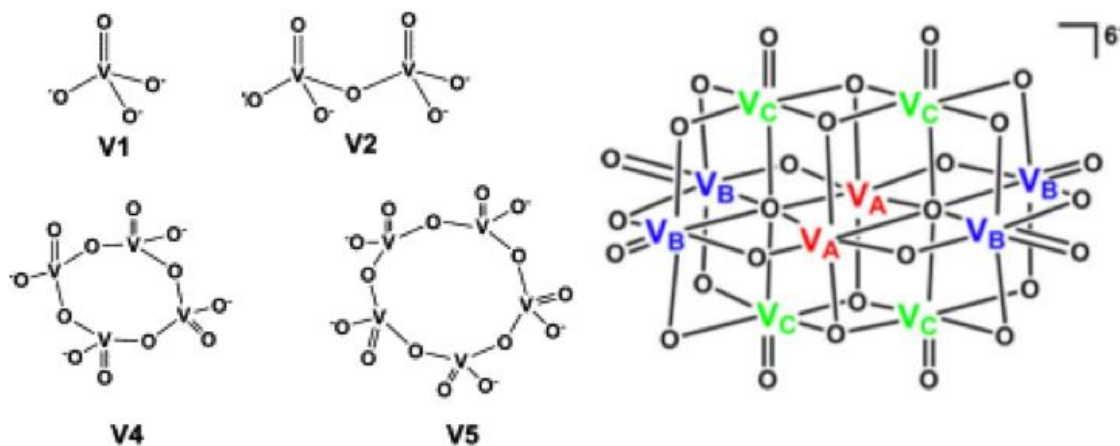
O vanádio (V) é a forma mais estável num intervalo de pH amplo [W]. O ião aniônico  $\text{VO}_3^-$  tende a constituir complexos polinucleares, pelo que as soluções aquosas de vanadato são extremamente complexas, com ocorrência simultânea de vários equilíbrios de protonação ( $\text{pKa}(\text{vanadato})= 3,5, 7,8 \text{ e } 12,5$ ) e oligomerização. As espécies presentes ( $\text{H}_3\text{VO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ,  $\text{HVO}_4^{2-}$  e  $\text{VO}_4^{3-}$ ) dependem do pH, força iónica e temperatura da solução e da concentração total do elemento [AE,AF,AG,AH,AI].

O  $\text{VO}_4^{3-}$  - monómero ortovanadato,  $\text{V}_1$  - está associado a uma grande parte da importância biológica do vanádio, uma vez que se trata de um análogo electrónico e estrutural do ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). A coordenação do ortovanadato pode ser tetraédrica ou bipiramidal trigonal (Ref<sup>ns</sup>).

A oligomerização do vanadato monomérico dá origem ao dímero ( $\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$  -  $\text{V}_2$ ), que apresenta também equilíbrios de protonação. Presume-se a existência de analogia do vanadato dimérico com o pirofosfato, embora não haja evidência estrutural (Ref<sup>ns</sup>). A dimerização do  $\text{V}_2$  origina o vanadato tetramérico, ou metavanadato ( $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$  -  $\text{V}_4$ ), que constitui a espécie maioritária em soluções aquosas concentradas (Ref<sup>ns</sup>). As estruturas do metavanadato e a sua espécie protonada são cíclicas [AJ]. Outra espécie oligomérica importante é o vanadato pentamérico ( $\text{V}_5\text{O}_{15}^{3-}$ ), cuja estrutura presumida é cíclica [AI].

O oligómero com maior importância bioquímica é o vanadato decamérico ( $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$ - $\text{V}_{10}$ )(Ref<sup>ns</sup>), a espécie predominante em soluções de pH 2-6, quando a concentração total de vanadato é superior a 100  $\mu\text{M}$  (Ref). A estrutura do  $\text{V}_{10}$  não difere em solução ou no estado sólido. Os 10 átomos de vanádio da espécie decamérica estão divididos em três grupos, identificados na figura como  $\text{V}_{A-C}$ , consoante o seu ambiente químico circundante (Ref<sup>ns</sup>) (Fig. 1.11).

A expressão “decavanadato” refere-se a uma solução aquosa na qual a espécie decamérica se encontra em equilíbrio químico com as espécies  $\text{V}_1$ ,  $\text{V}_2$ ,  $\text{V}_4$  e  $\text{V}_5$ , sendo que a oligomerização progressiva do vanádio é proporcional à sua concentração total (Ref). Nesta solução, a concentração de  $\text{V}_{10}$  corresponde a aproximadamente 10% da concentração total de vanádio [AK].



**Figura 1.11** – Estruturas esquemáticas das espécies de vanadato (espécie monomérica (V<sub>1</sub>), dimérica (V<sub>2</sub>), tetramérica (V<sub>4</sub>), pentamérica (V<sub>5</sub>) e decamérica (V<sub>10</sub>). (Adaptado de Aureliano e Crans, 2008).

### 1.2.2 Metabolismo e efeito na actividade enzimática

Apesar de não terem sido ainda encontradas as provas categóricas das suas funções nos seres vivos, sabe-se que o ião vanadato é capaz de inibir uma grande quantidade de enzimas *in vitro*, com especial ênfase na actividade ATPásica da miosina [AL, Teresa]. Como referido anteriormente, o vanadato é capaz de actuar em alternativa ao fosfato nas reacções bioquímicas, incluindo a sua preferência de ligação às enzimas [W].

É conhecido o papel do vanádio no metabolismo do cálcio, promovendo a mineralização dos dentes e ossos; na biossíntese de lípidos (triglicéridos e colesterol), com posterior inibição da acumulação destes nos vasos sanguíneos e no SNC; na reprodução e desenvolvimento, por mimetização e potenciação de factores de crescimento; na estimulação do consumo de glucose e da síntese de glicogénio, com actuação equivalente aos efeitos da insulina ao nível celular; na transdução de sinais celulares, com regulação da actividade de segundos mensageiros, no transporte de iões e aminoácidos, na transcrição genética e síntese de proteínas e DNA, entre outros [W, Y, AB].

Assim, o vanádio conseguirá provocar inúmeras mudanças bioquímicas nas células. Alguns exemplos da influência bioquímica do vanádio incluem os seus efeitos nos processos de fosforilação e desfosforilação de proteínas e na participação na formação de espécies reactivas de oxigénio, devido ao seu efeito pró-oxidante sobre agentes redutores a nível celular [AM].

Quanto ao seu efeito na actividade enzimática, pode dividir-se em dois tipos principais – inibitório e estimulante -, dependendo da enzima ou do tipo de reacção por esta catalisada. No primeiro grupo, incluem-se enzimas como as ATPases (de miosina, de canais iónicos e fosfoenzimas

transportadoras) e as fosfatases (da tirosina, ácida e alcalina), a fosfofrutocinase, adenilato ciclase e catalase, entre outras [AA]. O segundo grupo inclui a maioria das cinases, a glucose-6-fosfato desidrogenase, a fosfoglicerato mutase e a fosfoglicerato fosfatase (Ref<sup>a</sup>).

O efeito do vanádio (V) na actividade enzimática está relacionado com o seu número de coordenação, podendo actuar como estado de transição ou por mimetização de cofactores, substratos (especialmente o fosfato) e interacções proteína-proteína (como no caso das polimerases e transcriptases). Pode ainda estar envolvido na formação de ligações de hidrogénio, interacções electrostáticas, estéreas e de oxidação-redução. Uma evidência desta última é a sua capacidade de alternância entre os estados de oxidação +5 a +3, o que torna fácil a sua interacção redox com enzimas contendo resíduos de cisteínas (Cys) ou qualquer outro composto orgânico com actividade redox [AN].

### 1.3 Vanádio e músculo esquelético

A primeira evidência da presença de vanádio no músculo esquelético proveio de uma amostra de ATP isolado de músculo de cavalo, que continha uma impureza – vanádio – cuja presença provocou a inibição da actividade da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase [AO]. Desde então, vários estudos têm sido realizados com ênfase na interacção das várias espécies de vanadato com o tecido muscular. Destes, destaca-se a descoberta da interacção forte da espécie V<sub>10</sub> com a miosina fosforilada [AP] e à sua inibição da actividade ATPásica da miosina[AQ, AR].

No quedi respeito ao ião monovanadato, destaca-se a sua inibiçãoda actividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica da miosina [AS], que ocorre de duas formas distintas: (1) na presença de concentrações reduzidas de V<sub>1</sub>, a inibição ocorre a velocidade reduzida, dependente da concentração da espécie monomérica; (2) na presença de concentrações elevadas de V<sub>1</sub>, o nível de inibição aproxima-se de 100%, desde que [V<sub>1</sub>] seja superior à concentração total de locais com actividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica no ensaio. Esta inibição é irreversível, tanto por diálise ou adição de agentes redutores do vanadato [AL]. Segundo Pate *et al.*(1994)[AT], a espécie monomérica pode inibir a velocidade de contracção a temperatura inferior a 20°C, perdendo gradual e rapidamente essa capacidade até os 50°C, temperatura à qual cessa a capacidade inibitória. Os resultados obtidos sugerem ainda uma interacção altamente cooperativa entre o ião vanadato e as proteínas componentes do músculo esquelético. Destaca-se também a descoberta da inibição da geração de força contráctil nas fibras musculares por parte da espécie monomérica[AT]. Wilson *et al.*(1995) [AU ]determinaram que a afinidade da espécie V<sub>1</sub> para o S1 de miosina é significativamente mais elevada do que a do ião Pi, seu análogo. Descobriram ainda que a ligação do vanadato poderá envolver transições entre estados energéticos com energia livre independente dos impedimentos estéreas impostos

pela estrutura das miofibrilas. Os estudos desenvolvidos por Smith *et al.* (1990)[AV] determinaram que o ião monovanadato não apresenta um efeito pronunciado na inibição da actividade acto-S1-miosina-ATPásica, excepto em concentrações superiores a  $900\mu\text{M}$ , a partir das quais existe produção de espécies oligoméricas, para as quais o efeito inibitório será mais elevado. A espécie monomérica de vanadato consegue adoptar facilmente uma geometria do tipo bipiramidal trigonal, que mimetiza o intermediário formado ( $\text{Mg}\cdot\text{ADP}\cdot\text{Pi}$ ) quando da reacção de hidrólise de ATP no local activo da miosina [AW]. De facto, a interacção do vanádio com a miosina é inesperadamente estável, na presença de ADP. Esta interacção resulta na formação de um complexo enzimático inactivo e estável, com estequiometria de 1:1 ADP:vanadato por sítio activo da proteína. A formação do complexo estável miosina-vanadato foi proposta por Goodnoet *al.* (1982) [AS]. Nesta, ocorre um pré-equilíbrio rápido que induz a formação de um complexo ternário reversível ( $\text{M}\cdot\text{ADP}\cdot\text{V}$ ), com formação lenta do isómero  $\text{M}^{\text{m}}\text{ADP}\cdot\text{V}$ . A diferença entre os compostos de vanádio e de fosfato centra-se no tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) do Pi ou do V (no primeiro,  $t_{1/2}=12$  s, enquanto no segundo  $t_{1/2}=24$  h) (Ref<sup>a</sup>). A diferença dever-se-á à possível complexação do vanádio com grupos nucleofílicos no sítio activo, o que provocaria uma estabilização da miosina na conformação  $\text{M}^{\text{m}}\text{ADP}\cdot\text{V}$ .

No que respeita aos estudos realizados com a espécie tetramérica, Cremonesi *et al.* determinou que a cadeia pesada do S1 de miosina pode ser clivada em dois locais distintos (designados V1 e V2) pela espécie  $\text{V}_4$ , após irradiação com luz UV na presença de concentrações de vanadato na ordem dos milimolar e na ausência de nucleótidos ou metais divalentes.

Já no que concerne aos estudos realizados com ênfase na espécie decamérica, foi sugerido por Ramos *et al.* (2006) [AK] que a interacção do decavanadato com a G-actina, favorecida pela polimerização desta última, estabiliza a espécie  $\text{V}_{10}$  e induz a inibição da formação de F-actina. A estabilização da espécie  $\text{V}_{10}$  por proteínas transmembranares e do citoesqueleto pode ser a razão pela qual ocorre a toxicidade do decavanadato, reportada na avaliação dos efeitos do  $\text{V}(\text{V})$  nos sistemas biológicos. Tiago *et al.* (2007) [AR] concluíram que o  $\text{V}_{10}$  apresenta uma clara preferência de ligação ao “back-door” da S1-miosina-ATPase, o que se verifica apenas na estrutura conformacional desimpedida, com acesso facilitado ao local de ligação do Pi. Sugere também que o  $\text{V}_{10}$  actua como um “back-door stop”, bloqueando esta abertura do fragmento de 50-kDa, necessária para a hidrólise do ATP- $\gamma$ -fosfato, o que constitui uma explicação simples do comportamento não competitivo da espécie decamérica, estimulando a utilização deste oligómero como uma ferramenta na elucidação das mudanças conformacionais “back-door” da miosina, no

processo da contracção muscular (ref). Destaca-se ainda a descoberta da capacidade inibitória do  $V_{10}$  em relação à fosforilação oxidativa mitocondrial [AX].

Finalmente, no que concerne aos estudos realizados com a presença de várias espécies oligoméricas, Aureliano e Madeira (1994) [AY] observaram que, na presença de  $Ca^{2+}$ , as espécies  $V_4$  e  $V_{10}$  se ligam à  $Ca^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático, enquanto a espécie  $V_1$  se liga apenas na presença de ATP. Aparentemente, o aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  tem o efeito contrário da inibição da ATPase do retículo sarcoplasmático pelo  $V_1$ , não tendo no entanto efeito significativo sobre a inibição por parte da espécie  $V_{10}$ . Tiago et al (2002) [AP] concluíram que, em condições próximas às fisiológicas, a espécie  $V_{10}$  difere das espécies presentes na solução de metavanadato devido à sua forte interacção com a miosina fosforilada e à sua inibição da actividade ATPásica da miosina. Para além disso, o ATP diminui a afinidade da miosina para o  $V_4$ , induzindo a interacção com  $V_1$  e não tendo qualquer efeito no que diz respeito ao  $V_{10}$ . Foi também proposto [AQ] que a ligação das espécies oligoméricas de vanadato ao S1 de miosina nos locais onde o fosfato coordena é provavelmente a causa da inibição da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina, através da prevenção da troca entre ATP/ADP, sendo esta favorecida para aniões de vanadato com valências superiores, como é o caso do  $V_{10}$ .

Na presença de actina, as velocidades de dissociação do Pi e do V aumentam consideravelmente, este último em menor quantidade. Assim, a ligação da actina ao complexo M·ADP·V e Pi é bastante fraca, pelo que se sugere que o ADP·V teria um efeito de relaxamento semelhante ao ATP. No entanto, a capacidade do vanádio em inibir a actividade ATPásica da miosina e da actomiosina é diferenciada, uma vez que, na ausência de actina, a inibição é total para concentrações na gama dos  $\mu M$ , mas na sua presença, a inibição é totalmente conseguida apenas em concentrações na gama dos mM (Ref). No entanto, é necessário considerar a possível formação de espécies oligoméricas de vanadato, cuja afinidade e efeito na enzima serão diferentes. Assim, pode concluir-se que o efeito de inibição observado para a actividade ATPásica de miosina estimulada por actina se pode dever à presença das diferentes espécies oligoméricas, o que foi já sugerido por Aureliano (2000) [AZ] – as espécies tetramérica e decamérica de vanadato interactuariam com a miosina, com alteração da sua interacção com a actina. No entanto, não é conhecida a contribuição absoluta das restantes espécies oligoméricas para a inibição da ATPase da miosina estimulada por actina (Refs).

#### 1.4 Objectivos do projecto

Pretende-se com este projecto o isolamento, purificação e caracterização da actina do músculo

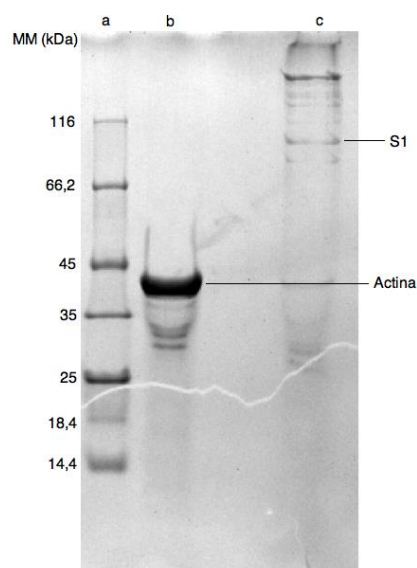
esquelético de coelho, sendo esta última também realizada para o sufragmento-1 de miosina. Seguidamente, realizar-se-á a quantificação e caracterização das proteínas por espectroscopia UV-Vis e SDS-PAGE e a caracterização das soluções de vanádio por UV-Vis e ressonância magnética nuclear (RMN). Por último, a interacção do S1 de miosina com o vanádio será avaliada através das técnicas de UV/Vis, RMN e ressonância paramagnética electrónica (RPE).

## 2. Discussão de Resultados

### 2.1 Caracterização das proteínas isoladas

#### 2.1.1 Análise do estado de pureza

O estado de pureza das soluções de actina e de S1 foi analisado por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (Fig. 2.2), que separa as moléculas de acordo com o seu peso molecular (PM). A concentração de acrilamida escolhida (10%) permite a detecção simultânea de componentes com peso molecular inferior a 20 kDa e outros com elevado peso molecular.



**Figura 2.1** – Fotografia de gel de SDS-PAGE (10% acrilamida). Poço (a): 10  $\mu$ L do marcador de elevado peso molecular (?). Poço (b): 20  $\mu$ L de [G-actina]=1 mg/mL. Poço (c): 20  $\mu$ L de [S1]=1 mg/mL. Aplicou-se uma voltagem de V durante h e min.

A partir da recta de calibração obtida,  $\log PM = -1,177 Rf + 2,247$  (ver ponto 2 da secção Anexos), pode verificar-se a presença de actina na amostra do poço (b), presente numa banda bastante intensa ( $PM_{\text{aparente}}=40$  kDa), bem como a presença minoritária de outros componentes desconhecidos, que não terão sido eliminados durante o processo de extracção e purificação e não são relevantes para o estudo em questão. Na amostra do poço (c) nota-se a presença de S1 ( $PM_{\text{aparente}}=92$  kDa), bem como a de outros componentes cuja banda é ligeiramente menos intensa. Estes poderão ser fragmentos proteolíticos de miosina e de S1. Está ainda presente uma bada de

maior intensidade, que poderá ser a proteína-C (PM=135 kDa), uma vez que a sua remoção completa da amostra necessitaria de um passo adicional de cromatografia de troca iónica [BA]. No entanto, não podemos confirmar que se trata desta proteína ou de qualquer outra, uma vez que se encontra fora do intervalo de migração dos marcadores de peso molecular.

## **2.1.2 Determinação da concentração proteica**

### **2.1.2.1 Subfragmento-1 de miosina**

A partir da recta de calibração obtida pelo método de Bradford [BB](ver secção 3.3.1.1 do Procedimento Experimental),  $A_{595\text{nm}} = 0,0546[\text{BSA}] + 0,0209$  (ver secção de Anexos), foi possível determinar um intervalo de concentração de S1 de miosina compreendido entre 22,6 e 117 ( $\pm 42,3\mu\text{M}$ ) (2,03 e 10,56 ( $\pm 3,81$  mg/mL)) (n=8). A concentração média de S1 de miosina após diálise, contra a solução tampão 10 mM HEPES, pH 7,5, 25 mM KCl, determinada pela leitura da  $A_{280\text{nm}}$ , foi de  $20,4\pm 3,0\mu\text{M}$  ( $1,8\pm 0,3$  mg/mL)(n=7).

As amostras a quantificar através do método de Bradford não sofreram diálise, o que permite explicar a concentração superior de S1 de miosina, em comparação com o valor obtido através do método directo. Esta razão, aliada à sensibilidade e rapidez superiores deste último, fez com que se optasse pelo método directo para a quantificação da grande maioria dos ensaios.

### **2.1.2.2 Actina**

A concentração de actina foi determinada quando esta se encontrava na forma monomérica (G-actina), por medição da leitura directa da  $A_{290\text{nm}}$ , tendo-se obtido uma concentração média de  $69,1\pm 48,1\mu\text{M}$  ( $2,90\pm 2,02$  mg/mL) (n=3), em 2 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,2 mM Na-ATP. Ao comprimento de onda utilizado (290 nm), absorvem fortemente apenas os resíduos de Trp, pelo que a medição efectuada tem menor sensibilidade do que se tivesse sido efectuada a 280 nm, uma vez que a actina apresenta apenas 4 resíduos deste aminoácido, embora tenha 16 resíduos de Tyr.

## **2.2 Medição da actividade enzimática de S1 de miosina**

### **2.2.1 Medição das actividades de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase de S1, pelo método de Fiske-Subarow modificado**

As actividades ATPásicas de S1 de miosina dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  foram analisadas pelo cálculo das velocidades de consumo inicial do fosfato inorgânico (Pi). Definiu-se os tempos de 5 e 3 minutos para a medição da  $\text{Ca}^{2+}$  e da  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase, respectivamente. Os valores obtidos

a partir do protocolo presente no ponto 3.4.1 da secção Procedimento experimental encontram-se descritos na Tabela 2.I.

**Tabela 2.I** – Actividades não-fisiológicas de subfragmento-1 determinadas pelo método de Fiske-Subarow modificado (n=2).

Proteína	Actividade ATPásica não fisiológica	Actividade (nmol Pi/min.mg proteína)	Actividade (s-1)
	Ca <sup>2+</sup> -ATPase	1400 ± 30	2,100 ± 0,045
S1	K <sup>+</sup> /EDTA-ATPase	2334 ± 50	3,500 ± 0,075

As actividades não-fisiológicas reflectem o estado de oxidação dos resíduos expostos de Cys, 707 (SH1) e 697 (SH2). Se o grupo SH1 sofrer oxidação, a actividade ATPásica dependente de Ca<sup>2+</sup> aumenta e a actividade dependente de K<sup>+</sup> diminui. Por outro lado, se o grupo SH2 sofrer oxidação, regista-se a perda completa destas actividades.

De acordo com Margossian e Lowey (1982) [BA], as actividades ATPásica de S1 de miosina dependente de Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>/EDTA da miosina são, respectivamente, de 2,4 e 11,2 s<sup>-1</sup>. Está também descrito que a actividade ATPásica dependente de K<sup>+</sup> é, em média, cerca de 3 vezes superior à dependente de Ca<sup>2+</sup>, reflectindo a quantidade das preparações. A razão obtida entre os valores das actividades ATPásicas dependentes de K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> é de 1,66. Os valores obtidos para as actividades (Ca<sup>2+</sup>-ATPase=2,1 s<sup>-1</sup>; K<sup>+</sup>/EDTA-ATPase= 3,5 s<sup>-1</sup>) são inferiores à valores obtidos por Margossian e Lowey [BA] e Tiago [BC], com força iónica inferior. O valor obtido para a actividade ATPásica dependente de Ca<sup>2+</sup> é superior ao obtido por Polosukhina et al. (2000) [BD], cujo meio de reacção continha MOPS e apresentava força iónica inferior. Os dados supramencionados comprovam a variação da actividade a ATPásica não fisiológica em relação à força iónica, temperatura e pH.

### 2.2.2 Medição da actividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica de S1, pelo método de enzimas acopladas

A actividade de Mg<sup>2+</sup>-ATPase é a única que possui significado fisiológico, sendo as restantes bastante úteis apenas para indicação da qualidade de preparação do S1 [BA]. A 0,575 M KCl, a actina e o S1 formam uma solução viscosa e túrbida. Após a adição de MgATP, o complexo acto-S1 dissocia-se e a turbidez da solução diminui. Se a força iónica for reduzida, a dissociação do complexo actoS1, que se encontra na forma de suspensão, é induzida. O MgATP é rapidamente hidrolisado, diminuindo a sua concentração no meio reaccional. Nestas condições, há reassociação e subsequente contracção dos filamentos de actina e de S1, com formação de

precipitado. O método descrito traduz de forma bastante elementar o fenómeno da contracção *in vivo* e elimina o problema anterior da solubilização ineficiente da miosina, de modo a obter uma medição exacta da actividade [A]. A utilização de forças iónicas reduzidas aumenta a afinidade da actina para o S1, permitindo contornar a extrema dificuldade em obter a concentração proteica dos músculos (cerca de 100 mg/mL do complexo actomiosina). As actividades  $Mg^{2+}$ -ATPásicas de S1 de miosina foram determinadas a partir do declive da variação da  $Abs_{340}$ , relativo à oxidação de NADH, em função do tempo, como é descrito no ponto 3.4.2 do Procedimento Experimental. Os valores obtidos para a actividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica encontram-se apresentados na Tabela 2.II:

**Tabela 2.II** – Actividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica de subfragmento-1 de miosina determinadas pelo método das enzimas acopladas.

Actividade (nmol ATP/min. mg(S1))	Actividade ( $s^{-1}$ )
1097 ± 269	1,64 ± 0,4

Ramos (2005) [J] obteve o valor de  $0,1 s^{-1}$  para a actividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica de S1 de miosina, com força iónica intermédia; Tiago (2005) [BC] obteve o valor de  $0,11 s^{-1}$ , em condições de força iónica reduzida, em relação à utilizada no presente relatório.

## 2.3 Preparação e caracterização das soluções de vanádio

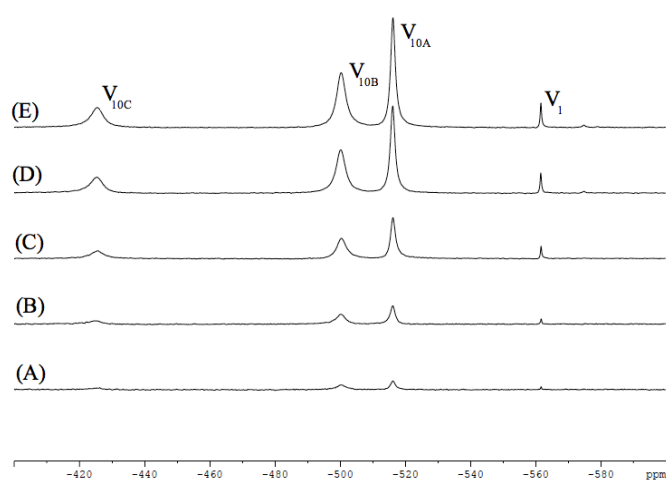
### 2.3.1 Análise da composição das soluções de vanadato por espectroscopia de $^{51}V$ -RMN: efeito da concentração da espécie

A diluição das soluções stock de meta- e decavanadato irá determinar fortemente a composição em solução dos diferentes oligómeros de vanadato (ref). No caso do decavanadato, o período de tempo após a diluição irá também ser um factor importante a considerar, devido à decomposição da espécie  $V_{10}$ (ref). Torna-se assim fundamental determinar a composição química das soluções no meio de ensaio utilizado (HEPES 10 mM, KCl 25 mM), de modo a correlacioná-la correctamente com os possíveis efeitos promovidos pelas diferentes espécies de vanadato no sistema em estudo.

Além disso, deve ser dada ênfase às importantes interacções que ocorrem entre o vanádio e os tampões escolhidos. O tampão com menor número e magnitude de interacção é o HEPES [AD], seguido do Tris, sendo este último especialmente aconselhado em concentrações baixas para casos de incompatibilidade enzimática ou química redox. No caso especial da reacção redox NAD(P)H/NAD(P), o tampão adequado é o imidazole, de modo a não haver reacção com o

vanadato. Os tampões a evitar em qualquer situação incluem a trietanolamina, fosfato, citrato e glicina, entre outros [AD], uma vez que todos interactivam fortemente com V(V), com formação de complexos estáveis.

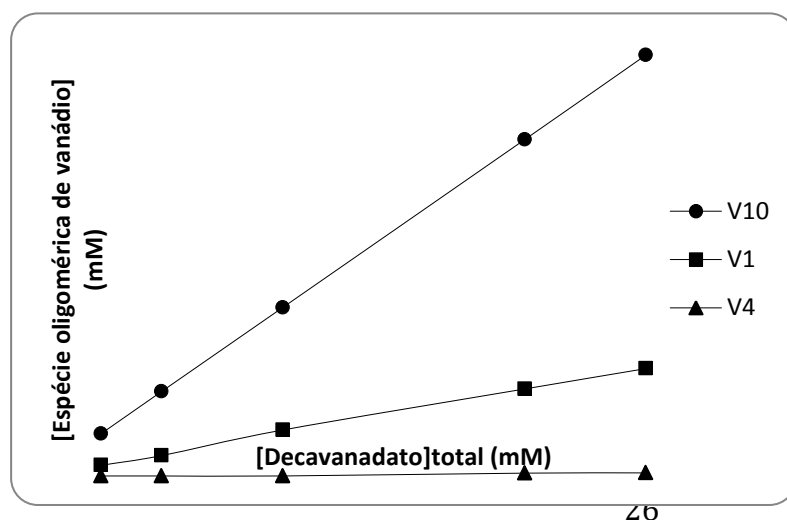
Assim, procedeu-se à análise da composição das soluções de meta- e decavanadato após diluição das soluções stock (50 mM em vanadato total) no meio de reacção (tampão D), através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^{51}\text{V}$ . Nas figuras x1 e x2 apresentam-se os espectros obtidos para as soluções de deca- e metavanadato num intervalo de concentrações de 1 a 10 mM. A Tabela seguinte resume os parâmetros espectroscópicos obtidos para cada espécie presente nas soluções analisadas.



**Figura 2.2**– Espectros de RMN de  $^{51}\text{V}$  de concentrações crescentes das espécies oligoméricas de vanadato, obtidos após diluição da solução *stock* de decavanadato em 10 mM HEPES pH 7.0, 25 mM KCl, para concentrações finais de A) 1 mM, B) 2 mM, C) 4 mM, D) 8 mM, E) 10 mM de decavanadato total.  $V_1$  refere-se às espécies monomérica de vanadato.  $V_{10A}$ ,  $V_{10B}$  e  $V_{10C}$  correspondem respectivamente aos grupos de átomos de vanádio presentes na figura 1. do capítulo 1.  $V_1$  corresponde à espécie monomérica.

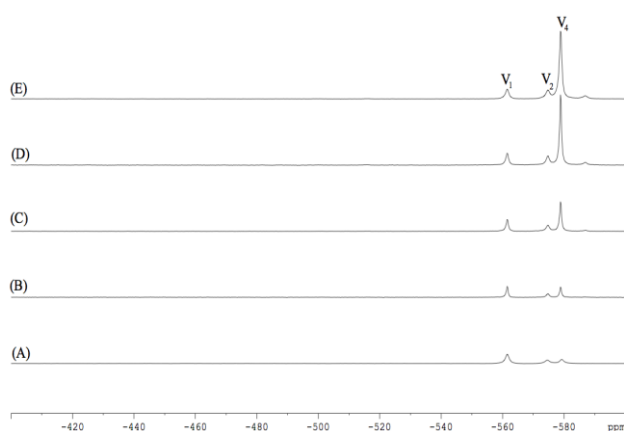
**Tabela 2.III**– Desvios químicos médios ( $\delta$ ) das ressonâncias das espécies decamérica ( $V_{10}$ ), monomérica ( $V_1$ ) e tetramérica ( $V_4$ ) presentes nos espectros da solução de decavanadato. Largura a meia altura ( $\Delta\nu_{1/2}$ ) da espécie  $V_{10A}$ .

Parâmetros	$V_{10A}$	$V_{10B}$	$V_{10C}$	$V_1$	$V_4$
$\delta$ (ppm)	-516,2	-500,3	-425,5	-561,6	-574,8
$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	175	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.



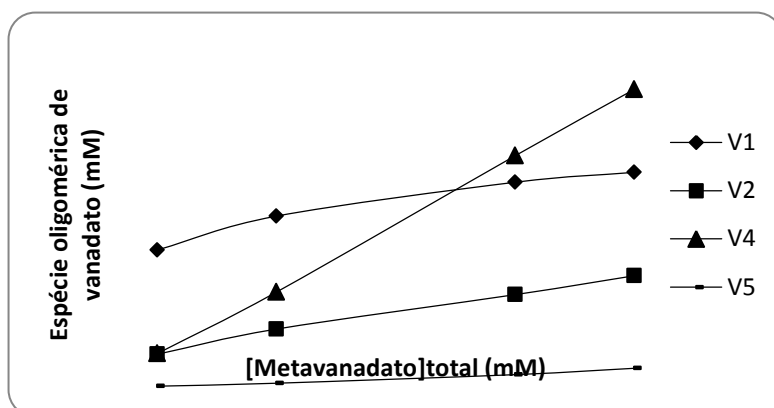
**Figura 2.3** – Distribuição gráfica das espécies oligoméricas de vanadato vs. a concentração de decavanadato total. As concentrações de cada espécie foram obtidas segundo a fórmula descrita na secção 3.5 do Procedimento Experimental (áreas dos sinais de  $^{51}\text{V}$ -RMN observadas na figura x1).  $V_{10}$ ,  $V_1$  e  $V_4$  correspondem às espécies monomérica, dimérica e tetramérica, respectivamente.

Nas soluções de decavanadato, as espécies monomérica e decamérica de vanadato são as únicas presentes, para concentrações de decavanadato inferiores a 8 mM. Ambas as espécies aumentam linearmente com o aumento da concentração total de vanadato. Tal como constatado em [AY] e em (Teresa), quando a concentração de  $V_1$  é igual ou superior a 200  $\mu\text{M}$ , inicia-se a sua oligomerização para originar a espécie tetramérica. No entanto, nas condições de realização dos ensaios descritos no presente relatório, não foi possível identificar a espécie tetramérica neste estudo em concentrações inferiores a 8 mM, tendo o mesmo sido observado por Ramos *et al.* (2006) [AK]. Os resultados obtidos mostram claramente o equilíbrio entre a espécie decamérica e a monomérica e que o aparecimento de outras espécies oligoméricas se encontra dependente da concentração desta última. Apesar de não ter sido realizado o ensaio com 5 mM de decavanadato total no presente relatório, está reportado em Ramos *et al.* (2006) [AK] que as concentrações da espécie decamérica e monomérica são respectivamente de 500  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ . Assim, pode inferir-se que, para concentrações inferiores a 5 mM e intervalos de tempo de cerca de 20 minutos (que inclui o tempo de preparação da amostra e de aquisição do espectro), existem em solução apenas as espécies decamérica e monomérica de vanadato.



**Figura 2.5** – Distribuição gráfica das espécies oligoméricas de vanadato vs. a concentração de metavanadato total. As concentrações de cada espécie foram obtidas segundo a formula descrita na secção 3.5 do Procedimento Experimental (áreas dos sinais de  $^{51}\text{V}$ -RMN observadas na figura x1).  $V_{10}$ ,  $V_1$  e  $V_4$  correspondem às espécie monomérica, dimérica e tetramérica, respectivamente.

**Figura 2.4** – Espectros de RMN de  $^{51}\text{V}$  de concentrações crescentes das espécies oligoméricas de vanadato, obtidos após diluição da solução *stock* de metavanadato em 10 mM HEPES pH 7.0, 25 mM KCl, para concentrações finais de A) 1 mM, B) 2 mM, C) 4 mM, D) 8 mM, E) 10 mM de metavanadato total.  $V_1$  refere-se às espécies monomérica de vanadato.  $V_1$  e  $V_2$  correspondem respectivamente à espécie monomérica e dimérica.



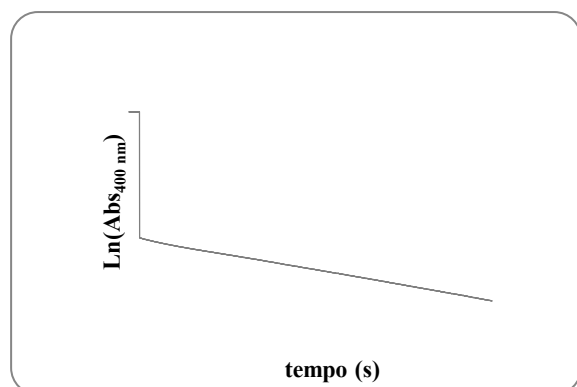
**Tabela 2.IV**– Desvios químicos médios ( $\delta$ ) das ressonâncias das espécies tetramérica ( $V_4$ ), monomérica ( $V_1$ ) e dimérica ( $V_2$ ) presentes no espectro da solução de metavanadato (total) 10 mM.

Parâmetros	$V_1$	$V_2$	$V_4$	$V_5$
$\delta$ (ppm)	-561,5	-574,8	-578,9	-586,9

Nas soluções de metavanadato, as espécies monomérica, dimérica e tetramérica de vanadato estão presentes para concentrações de metavanadato inferiores a 4 mM. Todas estas as espécies aumentam linearmente com o aumento da concentração total de vanadato. Tal como constatado em (Aureliano e Madeira, 1998) e em (Tiago et al, 2004), quando a concentração de  $V_1$  é igual ou superior a 200  $\mu$ M, inicia-se a sua oligomerização para originar a espécie tetramérica. Nas condições de realização dos ensaios descritos no presente relatório, não foi possível identificar a espécie pentamérica neste estudo em concentrações inferiores a 4 mM, tendo o mesmo sido observado por Ramos, 2006. Os resultados obtidos mostram claramente o equilíbrio entre a espécie  $V_4$  e as espécies  $V_1$  e  $V_2$ , no qual o aparecimento de outras espécies oligoméricas se encontra dependente da concentração da espécie  $V_1$ . Por último, pode inferir-se que, para concentrações inferiores a 2 mM e intervalos de tempo de cerca de 20 minutos (que inclui o tempo de preparação da amostra e de aquisição do espectro), existem em solução apenas as espécies  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_4$ , com concentrações respectivas de 0,796; 0,192 e 0,196 mM.

### 2.3.2 Estabilidade das soluções de decavanadato: análise por espectroscopia de absorção UV/Vis

Caracterizou-se a estabilidade da espécie  $V_{10}$  numa solução com 1 mM decavanadato total em tampão D, através da leitura da  $Abs_{400}$ . Obteve-se uma cinética de dissociação de 1ª ordem, tal como se pode verificar pela linearidade do gráfico de  $\ln(Abs_{400})$  vs. o tempo de aquisição espectral (segundos) (Fig.2.6).

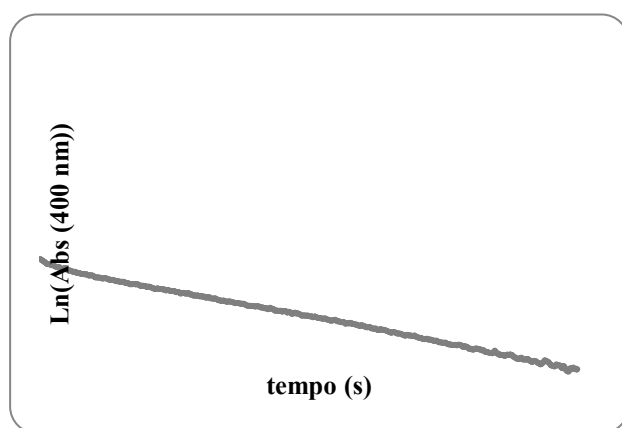


**Figura 2.6**– Gráfico de  $\ln(Abs_{400 \text{ nm}})$  em função do tempo (em segundos) para uma solução de decavanadato total de 1 mM em tampão D, a 25°C (n=2).

Sendo uma reacção de primeira ordem, pode ser descrita pela equação  $Abs_t = Abs_0 e^{-Kt}$ , cujo declive é  $-K$  (constante de dissociação) e a intersecção no eixo das ordenadas corresponde

$\ln(A_0)$ . Numa reacção de 1ª ordem, o tempo de meia-vida é independente da concentração inicial do reagente, sendo descrito pela equação  $t_{1/2} = \ln(2)/K$  [2.]. Deste modo, a partir da recta  $\ln(\text{Abs}_{400 \text{ nm}}) = -4,36E^{-5} K - 1,05$ , obteve-se um tempo de meia-vida de  $4,490 \pm 0,823$  horas, para as condições supramencionadas.

Após a adição de S1  $8 \mu\text{M}$  ao meio reaccional, verificou-se que a reacção de desoligomerização da espécie decamérica de vanadato seguia igualmente uma cinética de 1ª ordem, tal como se pode verificar pela linearidade do gráfico de  $\ln(\text{Abs}_{400})$  versus o tempo de aquisição espectral (segundos) (Fig.2.7).



**Figura 2.7**– Gráfico de  $\ln(\text{Abs}_{400 \text{ nm}})$  em função do tempo (em segundos) para uma solução de decavanadato total de 1 mM em tampão D, a 25°C, na presença de  $8 \mu\text{M}$  ( $n= 2$ )

A partir da equação da recta,  $\ln(\text{Abs}_{400 \text{ nm}}) = -7,520E^{-5}K - 0,613$ , determinou-se o valor de K para a espécie decamérica, de onde se obteve um tempo de meia-vida de  $2,430 \pm 0,191$  horas, para as condições supramencionadas.

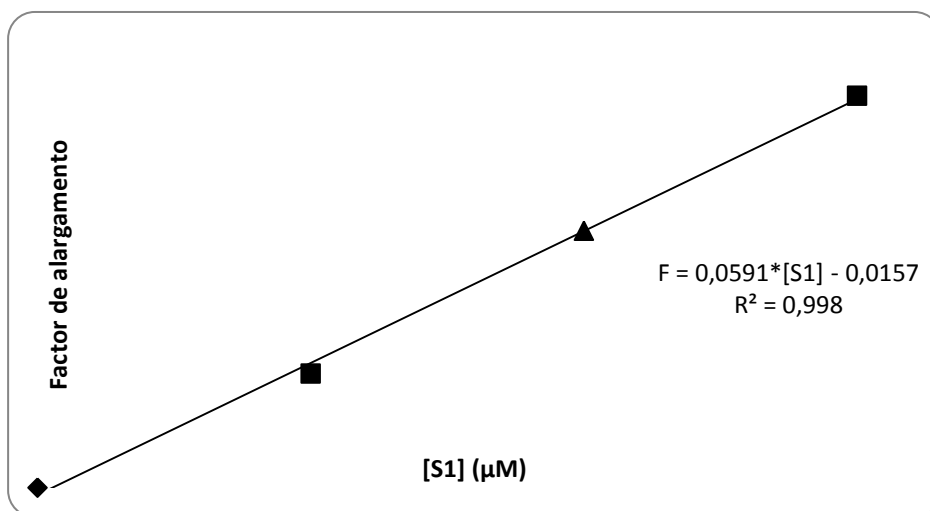
Tanto este valor como o valor registado na ausência de S1 são substancialmente superiores à duração dos ensaios de interacção entre a espécie  $V_{10}$  e o S1 de miosina descritos no presente relatório.

## 2.4 Interacção de S1 com vanádio(V)

### 2.4.1 Análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

De modo a analisar qual o efeito da adição de S1 de miosina (tampão D) produzia nos sinais de  $^{51}\text{V}$ -NMR, titulou-se uma solução de 5mM de decavanadato total, com concentrações crescentes de S1 (5, 10, 15 e 20  $\mu\text{M}$ ). Os espectros de  $^{51}\text{V}$ -RMN encontram-se apresentados na Fig. 2.

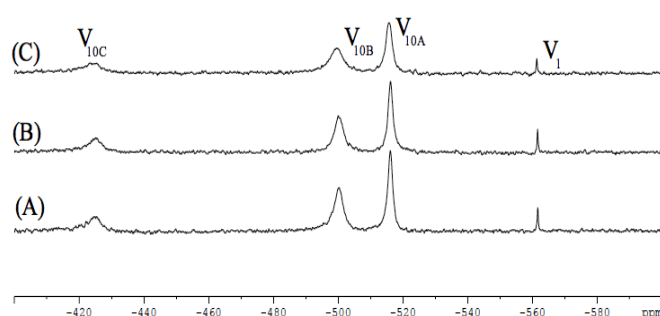
No gráfico da figura 2. Apresenta-se a concentração de S1 em função do factor de alargamento corrigido,  $F = \left( t_{1/2}([S1] - x) / t_{1/2}([S1] - x) \right) - 1$ , dos espectros acima referidos.



**Figura 2.8** – Gráfico de representação da concentração de S1 em função do factor de alargamento. A concentração de decavanadato total foi de 5 mM e as concentrações utilizadas de S1 foram de 0; 5; 10 e 15 µM.

Verifica-se que o factor de alargamento aumenta linearmente em função da concentração de S1 no ensaio, o que indica a existência de interacção entre a espécie V10 e o S1 de miosina. Observou-se ainda que a adição de S1 ao meio reaccional não provocou qualquer alteração dos desvios químicos dos sinais de  $^{51}\text{V}$ -RMN.

Realizaram-se ensaios na presença de ATP e de S1, com intuito de verificar o efeito do ATP na interacção do S1 de miosina com o decavanadato.



**Figura 2.9** - Espectros de RMN de  $^{51}\text{V}$  contendo 2 mM Decavanadato: (A) (controlo); (B) na presença de 2 mM de ATP; (C) na presença de 2 mM de ATP e 8 µM de S1 de miosina.  $V_{10A}$ ,  $V_{10B}$  e  $V_{10C}$  correspondem respectivamente aos grupos de átomos de vanádio presentes na figura 1. do capítulo 1.  $V_1$  corresponde à espécie monomérica.

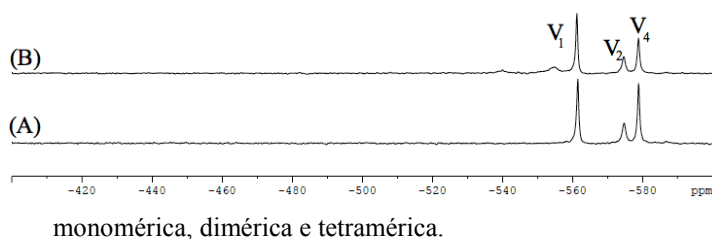
**Tabela 2.V**– Desvios químicos( $\delta$ ) das ressonâncias das espécies decamérica ( $V_{10}$ ) e monomérica ( $V_1$ ) presentes nos espectros da solução de decavanadato, na presença de 8 µM de S1 de miosina.

Parâmetros	$V_{10A}$	$V_{10B}$	$V_{10C}$	$V_1$
$\delta$ (ppm)	-516,1	-500,2	-425,4	-561,4

Observa-se que a presença de ATP (espectro B) não provoca qualquer alteração visível em relação ao espectro que contém apenas solução de decavanadato. Já a presença simultânea de ATP e S1 provoca um alargamento da  $\Delta\nu_{1/2}$  do sinal do  $V_{10A}$  de 173,6 Hz (espectro (A)) para 236,6 Hz (espectro (C), Fig. 2.9). Tendo em conta que a concentração de S1 apresenta uma relação linear com o factor de alargamento, converteu-se o valor da  $\Delta\nu_{1/2}$  e comparou-se com o valor esperado à

concentração de S1 utilizada. O factor de alargamento obtido para  $8 \mu\text{M} - 0,376 -$  é inferior ao valor esperado à mesma concentração de S1, obtido através da equação da recta apresentada na Fig. 2.8  $- 0,457 -$ , o que indica que o ATP poderá exercer um efeito de protecção do S1, diminuindo a sua interacção com a espécie  $V_{10}$ .

Por último, realizaram-se ensaios com metavanadato na presença de  $8 \mu\text{M}$  S1, de modo a verificar se as espécies oligoméricas contidas nesta solução interagem com a proteína em estudo.



**Figura 2.10** - Espectros de RMN de  $^{51}\text{V}$  contendo 2 mM metavanadato: (A) (controlo); (B) na presença de  $8 \mu\text{M}$  de S1 de miosina.  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_4$  correspondem respectivamente às espécies

monomérica, dimérica e tetramérica.

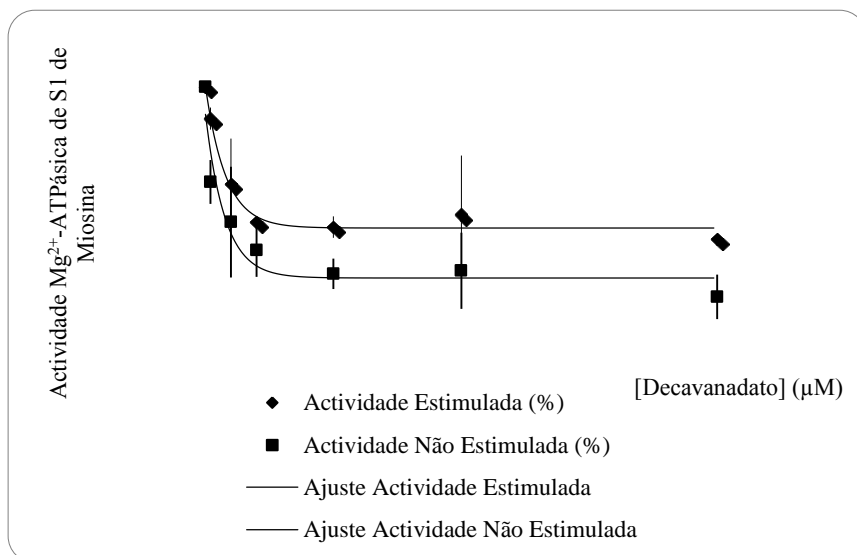
**Tabela 2.VI**– Desvios químicos ( $\delta$ ) das ressonâncias das espécies monomérica ( $V_1$ ), dimérica ( $V_2$ ) e tetramérica ( $V_4$ ) presentes nos espectros da solução de metavanadato, na presença de  $8 \mu\text{M}$  de S1 de miosina.

Parâmetros	$V_1$	$V_2$	$V_4$
$\delta$ (ppm)	-561,3	-574,7	-578,9

Como é possível observar na Fig. 2.10,, ocorre uma ligeiro alargamento dos sinal de  $V_4$ , bem como uma perda da intensidade, pelo que se conclui que, das espécies presentes na solução de metavanadato ( $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_4$ ), apenas a espécie tetramérica interage com o S1 de miosina, o que está de acordo com o reportado por Tiago et al 2002.

#### 2.4.2 Actividade $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica de S1 de miosina na presença de decanadato

Com o intuito de avaliar o efeito do decavanadato na actividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica do S1 de miosina, monitorizou-se a reacção de oxidação do NADH através da leitura de Abs340, na presença de 0,05 mg/mL de S1 de miosina e, no caso da actividade estimulada,  $2 \mu\text{M}$  de actina, em 31,25 mM Tris-HCl pH 7,1 e 3,75 mM  $\text{MgCl}_2$ , pelo método de enzimas acopladas (ver seccção xx dos MM). Para tal, realizaram-se ensaios com várias concentrações de decavanadato total (10; 50; 100; 250; 500 e 1000), de modo a determinar qual o seu efeito na actividade  $\text{MgATPásica}$  de S1 de miosina, na ausência e na presença de um dos seus ligandos naturais. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, com incubação prévia a  $25^\circ\text{C}$  durante 20 minutos.



**Figura 2.11** – Representação gráfica da Actividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica de S1 (%) (os ajustes teóricos estão representado a por uma linha; os resultados experimentais estão representados por triângulos (Actividade estimulada) e cruzes (Actividade não estimulada)) vs.  $[Decavanadato]_{total}$ , medidas pelo método das enzimas acopladas

( $n=3$ ). Os dados foram ajustados ao modelo de decaimento exponencial usando o programa GraphPad Prism, para a determinação dos valores de  $IC_{50}$ . (na ausência de actina,  $IC_{50}= 26,6 \pm 0,7 \mu M$  decavanadato.; na presença de actina  $IC_{50}= 28 \pm 1 \mu M$  decavanadato.

A partir do gráfico presente na Fig. 2.9, verifica-se que o ajuste dos dados experimentais foi bem sucedido. A inibição da actividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica do S1 de miosina é afectada em menor amplitude na presença de actina (60% de inibição da actividade) do que na sua ausência (aproximadamente 80% de inibição de actividade). Devido a esta diferença, pode sugerir-se que a actina irá impedir parcialmente a ligação do decavanadato ao S1 de miosina, através de impedimentos estéreos ou interacções electrostáticas, por exemplo. A técnica utilizada não nos permite concluir acerca de que região(ões) ou resíduo(s) da actina participarão na preservação parcial da actividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica.

Por outro lado, os valores de  $IC_{50}$  dos dois tipos de actividades não apresentam diferenças significativas, tendo-se obtido  $26,6 \pm 0,7$  e  $28 \pm 1 \mu M$  decavanadato, na ausência e na presença de actina, respectivamente, o que corresponde a uma concentração de cerca de  $2,7 \mu M$  de  $V_{10}$ . O meio de reacção utilizado nestes ensaios foi 10 mM HEPES e 25 mM KCl, com 2 mM ATP. Em (Tiago et al, 2004), o valor de  $IC_{50}$  para a actividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica na ausência de actina foi de  $12,5 \pm 0,25 \mu M$ , enquanto o valor da actividade estimulada por actina foi de  $13,6 \pm 1,4 \mu M$ . O meio de reacção utilizado nos ensaios foi 20 mM HEPES, 50 mM KCl e 2 mM ATP, o que resulta precisamente no dobro da força iónica a que foi realizado o ensaio do presente relatório (exceptuando a contribuição dos produtos da hidrólise de ATP, uma vez que este método pressupõe a ocorrência de um ciclo de reacções de hidrólise e síntese deste composto). Ora, tendo sido anteriormente referido que a afinidade do S1 de miosina para com a espécie  $V_{10}$  diminui com

o aumento da força iónica (Tiago *et al.* 2004, tal poderá explicar a diferença obtida entre estes dois conjuntos de valores.

### 2.4.3 Quantificação de cisteínas reduzidas, pelo método de Ellman

A interacção do vanádio com alguns tipos de aminoácidos sensíveis à oxidação pode fornecer-nos informação bastante útil em relação às alterações estruturais que conduzem a uma diminuição da actividade fisiológica do S1 de miosina. Os estudos realizados por Chasteen, 1983, concluíram que a redução de vanadato (V) a vanadilo (IV) ocorre na presença de agentes redutores comuns no ambiente celular, de que se destaca o aminoácido cisteína. Esta é também um alvo de complexação por parte do ião  $VO^{2+}$ . Já Ramos *et al.* (2009), demonstrou que a incubação de actina com a solução de decavanadato induz a oxidação de resíduos de cisteína e à formação do oxidovanádio (IV). Este grupo de investigadores descobriu ainda que apenas a espécie  $V_{10}$  induz a oxidação das cisteínas “rápidas” da actina, através do processo proposto, que é parcialmente responsável pela inibição já descrita da actividade de ATPase do S1 de miosina estimulada por actina, quando exposta à solução de decavanadato. Esta inibição apresenta-se afectada com a presença de ATP, uma vez que os resíduos de cisteína permaneceram intactos nos ensaios realizados com este ligando. Já Crans *et al.* (2004) concluiu que o sítio activo de muitas fosfatases (que contém grupos tiol) pode formar um equilíbrio redox com o ião vanadato (V) de forma não reversível.

Os resultados obtidos por Sakurai e Shiromura (1980) sugeriram que o vanádio (V) sofre redução a vanádio (IV), sem dependência do valor de pH do ensaio. Registaram ainda uma estequiometria de 3:1 na reacção do vanadato (V) com os resíduos de Cys, enquanto a estequiometria dos ensaios com o vanadilo (IV) foi de 2:1.

Berlett e Stadtman (1997) observaram que os tipos de aminoácidos mais facilmente oxidáveis, englobam, entre outros, os resíduos de Cys, Trp e Met. Assim, analisou-se o estado redox dos grupos tiol dos resíduos de Cys do S1 na presença do decavanadato, através da monitorização da  $Abs_{412\text{ nm}}$ , na presença de 1 mg/mL de S1 de miosina em tampão 10 mM HEPES, 25 mM KCl, variando a concentração da solução de decavanadato, de modo a determinar que tipo de alterações estruturais ocorrem na sua presença, no que diz respeito à diminuição da actividade ATPásica de S1 na presença de decavanadato.

Os resultados referentes à quantificação das cisteínas reduzidas após o tratamento de S1 com diferentes concentrações de decavanadato, em tampão 10 mM HEPES pH 7,5 e 25 mM KCl, a 25°C durante 20 minutos, encontram-se descritos na Tabela 2.VII.

**Tabela 2.VII** – Cisteínas reduzidas totais e “rápidas de S1 (1 mg/mL) após tratamento com decavanadato

(0,10,50,100,250,500,1000 uM) em 10 mM HEPES, 25 mM KCl, pH 7, a 25°C durante 20 minutos. A detecção espectrofotométrica foi feita com DTNB (ε 412=8400 uM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (n variável entre 1 e 8).

Amostras	Cys "rápidas"	Cys totais
11 μM S1 (controlo)	2,2 ± 0,4	10,6 ± 1,4
11 μM S1 + 10 μM Decavanadato	2,2 ± 0,5	9,5 ± 0,8
11 μM S1 + 50 uM Decavanadato	2,0 ± 0,2	9,8 ± 1,4
11 μM S1 + 100 uM Decavanadato	1,7 ± 0,3	9,7 ± 1,4
11 μM S1 + 250 uM Decavanadato	2,6 ± 0,2	9,8 ± 0,8
11 μM S1 + 500 uM Decavanadato	2,1 ± 0,4	9,0 ± 0,6
11 μM S1 + 1000 uM Decavanadato	2,4 ± 0	8,6 ± 0,8

A partir dos resultados obtidos, pode sugerir-se que o S1 possui 11 resíduos de Cys (controlo), o que está de acordo com o anteriormente descrito. Verifica-se que o tratamento da proteína com concentrações crescentes de decavanadato provoca a oxidação de dois resíduos de Cys do S1 de miosina não expostos ao solvente. No entanto, a técnica utilizada não nos permite identificar quais.

Tendo em consideração que o valor de IC<sub>50</sub> obtido para a reacção de inibição da actividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica de S1 na presença de decavanadato é de cerca de 27 μM, pode sugerir-se que este será o valor ao qual ocorrerá a oxidação do primeiro resíduo de Cys, o que poderá contribuir para a diminuição da actividade de S1 observada.

## 2.5 Interacção de S1 com vanádio(IV)

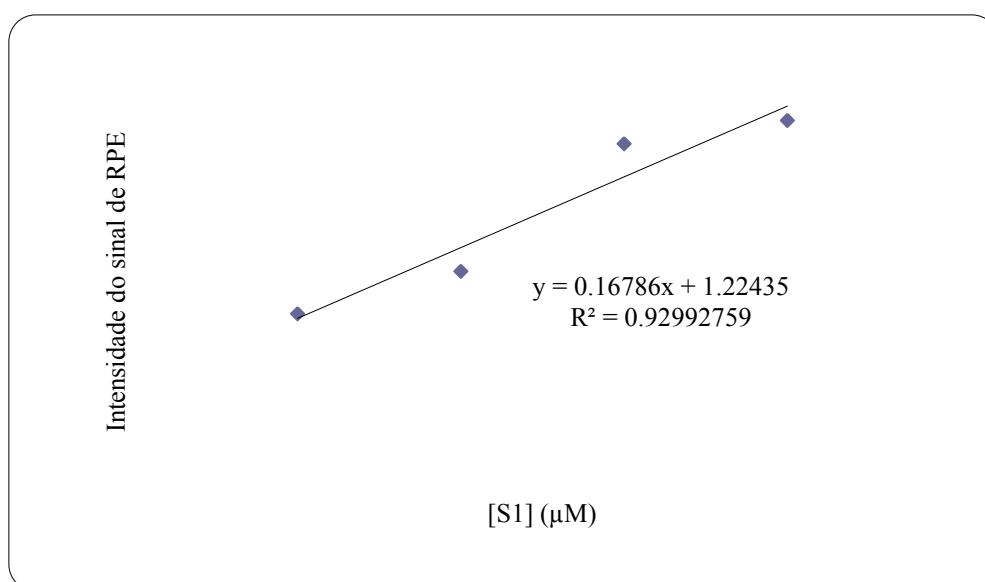
### 2.5.1 Análise por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica

A acumulação intracelular de oxovanádio (IV) *in vivo* constitui uma das principais formas de apresentação de vanádio no organismo. Deste modo, torna-se bastante interessante analisar a interacção entre este ião e o S1 de miosina através da técnica de espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica, o método de eleição do estudo do ião vanadilo e dos complexos por si formados. O electrão desemparelhado encontra-se fortemente acoplado ao núcleo <sup>51</sup>V, o que

resulta num espectro de RPE consistindo de 8 desdobramentos na direcção paralela e outros tantos na direcção perpendicular (Chasteen, 1983).

Os estudos realizados por Ahmed et al. (1987) centraram-se na interacção do vanadilo com proteínas, como é o caso da insulina, transferrina, entre outros, obtendo um espectro caracterizado por 8 linhas amplamente espaçadas (na direcção paralela). Já Ramos et al. 2009 concluiu que a exposição da solução de decavanadato às formas globular e filamentosa de actina produz um espectro típico do ião oxidovanádio (IV), indicando a redução do vanadato.

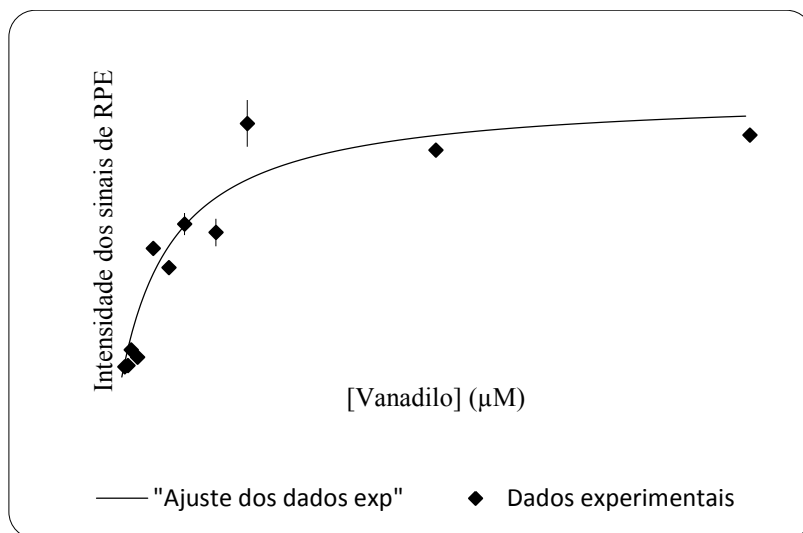
Para aferir qual a concentração de S1 que permitia obter uma boa razão sinal/ruído, titulou-se uma solução de sulfato de vanadilo 15  $\mu\text{M}$  ( $[\text{VOSO}_4]_{\text{stock}} = 5 \text{ mM}$ ) com concentrações crescentes de proteína (0; 5; 10; 15 e 20  $\mu\text{M}$ ) em 10 mM HEPES, 25 mM KCl. A existência de uma correlação linear entre a concentração de proteína e a intensidade dos sinais de RPE, correspondente à banda -1/2 perpendicular encontra-se representada na Fig. 2.10.



**Figura 2. 12**– Representação gráfica da variação da intensidade do sinal de RPE vs. a concentração de S1 utilizada.

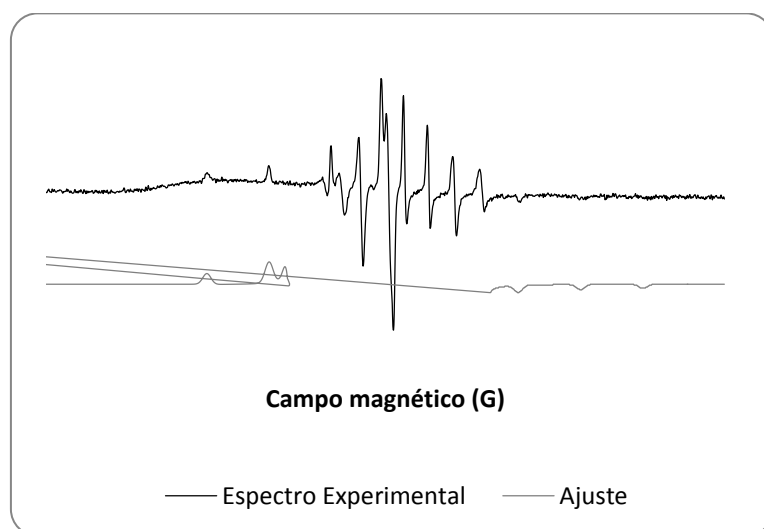
Após verificar que com uma concentração de S1 igual a 20  $\mu\text{M}$  se obtinham sinais com uma razão sinal/ruído adequada ao prosseguimento dos estudos sobre a interacção V(IV)-S1 de miosina, titulou-se uma solução de 20  $\mu\text{M}$  S1 com 0, 2,5, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500 e 1000  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ .

Traçou-se o gráfico da intensidade da banda -1/2 perpendicular do sinal de EPR em função da concentração de  $\text{VOSO}_4$ , tendo-se determinado uma constante de dissociação ( $K_D$ ) do complexo S1-vanadilo de  $87,48 \pm 26,21 \mu\text{M}$  V(IV).



**Figura 2.13** – Representação gráfica da variação do sinal de RPE vs. a concentração de vanadilo utilizada (os valores experimentais estão representados por losangos; o seu ajuste está representado pela linha).

A simulação do espectro de EPR foi efectuada a partir do espectro obtido para uma concentração de 1 mM  $\text{VOSO}_4$  após adição de 20  $\mu\text{M}$  S1 de miosina, tendo-se obtido os valores da constante de acoplamento hiperfina ( $A_{\parallel}=501,6$ ) e do factor  $g$  ( $g_0=1,95$ ).



**Figura 2.14** – Representação gráfica do espectro de EPR obtido com 1000  $\mu\text{M}$  de vanadilo e 20  $\mu\text{M}$  de S1 (a cinzento escuro). A simulação do espectro encontra-se a cinzento claro.

Por comparação destes com os valores presentes na tabela de correspondência xxx, é possível prever quais os ligandos prováveis do vanadilo na presença de proteína. Assim, concluiu-se que o vanadilo está coordenado com duas moléculas de água, um grupo hidroxilo e um grupo  $\text{R}=\text{NR}$ . O grupo hidroxilo pode indicar os resíduos de aminoácidos Tyr, Treonina e Serina, enquanto o grupo  $\text{R}=\text{NR}$  poderá indicar a presença de Arginina e Histidina como ligandos do vanadilo.

### 3. Procedimento Experimental

#### 3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de elevado grau de pureza (analítico). Apresentam-se as suas fórmulas químicas ou abreviaturas; quando necessário, acrescentou-se a sua descrição. Entre parêntesis, colocou-se as empresas que os comercializam.

Ácido acético glacial 100% (Riedel); Acrilamida 99% (Merck); Azul de bromofenol (Riedel-de-Häen);  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma); Bissulfito de sódio (Sigma); Bradford (reagente de) (BioRad); BSA (albumina de soro bovino; Sigma-Aldrich);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (cloreto de cálcio dihidratado; Fluka);  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  96% (etanol; Panreac); Coomassie Blue R250 (Merck);  $\text{D}_2\text{O}$  (óxido de deutério; S.D.S.); DTNB (5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico); Aldrich); EDTA (ácido etilenodiaminatetraacético; Merck); Fosfoenolpiruvato 98% (Fluka); Glicerol (Sigma); Glicina 98,5% (Panreac); HCl 37% (Riedel-de Häen);  $\text{H}_2\text{SO}_4$  96% (Pronalab); HEPES 99% (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanossulfónico; Sigma);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  99% (hidrogenofosfato de potássio); Mg-ATP (Sigma); Na-ATP (Sigma);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  99% (hidrogenofosfato de sódio; Riedel-de Häen);  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (fosfato de sódio; ); NaOH 98,6% (hidróxido de sódio; Pronalab); KCl 99% (Cloreto de potássio; Panreac); L-Cys 99,5% (enantiómero levógiro do resíduo de Cisteína; Fluka); Metanol 99% (Merck); Molibdato de amónio (Sigma); N,N'-metil-bis-acrilamida 98% (Merck);  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  99% (metavanadato de amónia; Sigma); PSA 10% (persulfato de amónio; Merck); SDS (dodecilo sulfato de sódio; Sigma); Sulfito de sódio (Sigma);  $\text{VOSO}_4$  (sulfato de vanadilo; Aldrich); TEMED 99% (Tetrametiletenodiamina; Merck); Tris (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol; Sigma).

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Isolamento e purificação das proteínas de músculo esquelético de coelho

###### 3.2.1.1 Purificação da miosina; preparação de Subfragmento 1 por digestão quimotripsica da miosina

O subfragmento-1 de miosina-II (S1) foi gentilmente cedido pelo Prof. Doutor Manuel Aureliano, do Departamento de Química, Bioquímica e Farmácia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve.

No entanto, descreve-se abaixo, de forma resumida, o procedimento efectuado.

### 3.2.1.1.1 Purificação da miosina

O protocolo de isolamento foi adaptado do método previamente descrito por Margossian e Lowey (1982), apresentando-se de forma esquemática na Fig 3.1.

Sucintamente, os tecidos musculares dorsais e das pernas foram extraídos após o sacrifício do animal (Fig.3.1). De seguida, foram adicionados 3 volumes da solução de extracção A<sup>2</sup>. Centrifugou-se a solução e filtrou-se o sobrenadante. O sedimento foi então diluído em 14 volumes de água destilada, de modo a que a força iónica atingisse 0,04 M. Após adição de β-mercaptoetanol (β-me), deixou-se a precipitar a 4°C, removendo o sobrenadante. Centrifugou-se novamente e ressuspendeu-se o sedimento na solução de extracção A. Adicionou-se a solução tampão B<sup>3</sup>, para que a força iónica atingisse 0,5 M. Homogeneizou-se e deixou-se repousar durante 2h. Homogeneizou-se novamente e centrifugou-se, de modo a ocorrer precipitação dos complexos de actomiosina e proteína desnaturada. Após filtração do sobrenadante em lã de vidro, quantificou-se a solução de miosina resultante pelo método directo (ver secção 3.3.1.2 do Procedimento Experimental).

---

<sup>2</sup> Solução de extracção A: 0,012M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,04M KHCO<sub>3</sub>; 0,6M KCl, pH 6,5

<sup>3</sup> Solução-tampão B: Tris 100 mM pH 7; KCl 2M

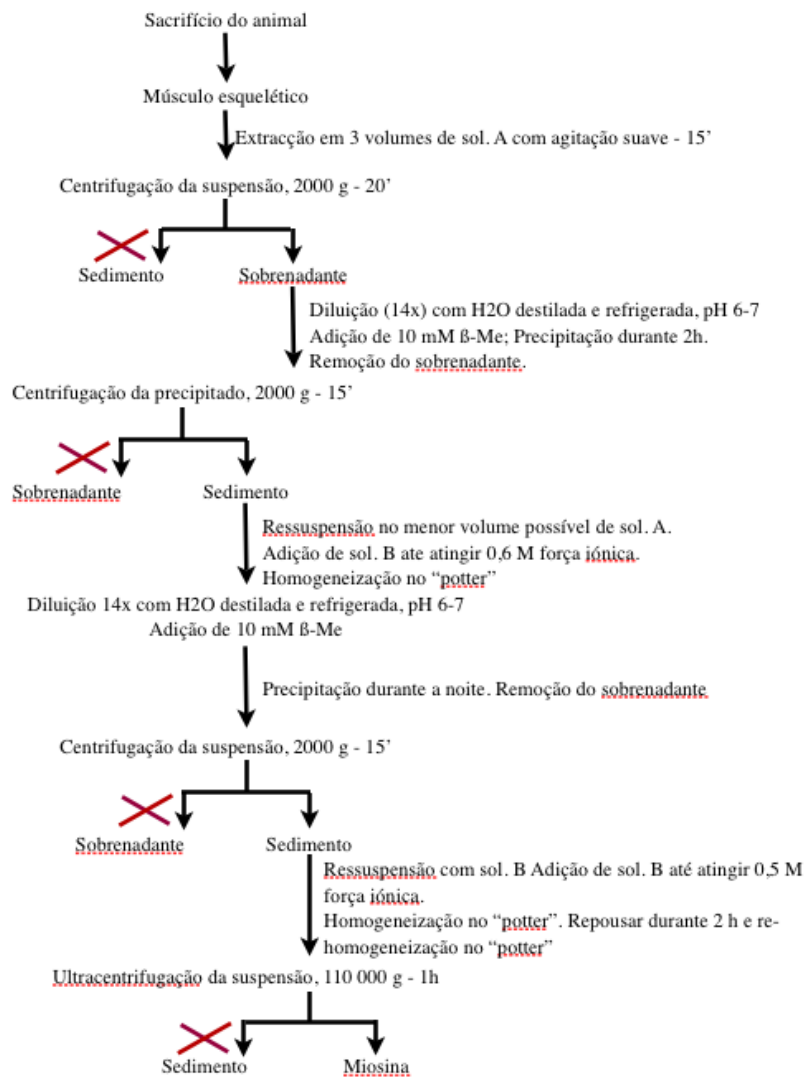


Figura 3.1 – Representação esquemática do protocolo de isolamento de miosina (Margossian e Lowey, 1982). Todo o procedimento foi realizado a 4°C. (Adaptado de Susana Ramos, Relatório de Estágio, 2005).

### 3.2.1.1.2 Preparação de Subfragmento-1 de miosina por digestão com quimiotripsina

O S1 de miosina foi isolado após diálise da miosina durante a noite contra a solução C<sup>4</sup>. A presença do EDTA é essencial, uma vez que a sua substituição por MgCl<sub>2</sub> resulta na produção de HMM em vez de S1. A suspensão de miosina foi equilibrada e digerida com α-quimiotripsina.

A digestão foi interrompida pela adição de PMSF. Seguidamente, ultracentrifugou-se o produto da digestão, desprezando-se o sedimento (Fig. 3.2). A solução de sobrenadante, maioritariamente S1, foi quantificada pela leitura directa da Abs<sub>280</sub> ou pelo método de Bradford (ver as secções 3.3.1.1 e 3.3.1.2 do Procedimento Experimental, respectivamente) e armazenada em 10% sacarose e 2 mM β-Me, a -80°C.

<sup>4</sup> Solução C: 25mM Tris pH 7,0; 0,12M KCl; 1mM EDTA

Antes da realização dos ensaios descritos no presente relatório, o S1 de miosina foi dialisado contra a solução D<sup>5</sup>, de modo a remover qualquer composto que pudesse complexar como vanádio. Seguidamente, quantificou-se a proteína pelo método de Bradford ou pelo método directo (ver secções 3.3.1.1 e 3.3.1.2 do Procedimento Experimental).

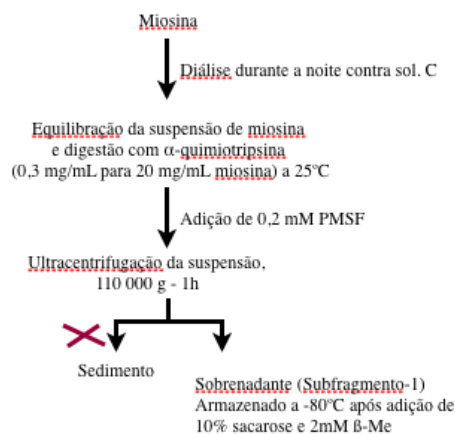


Figura 3. 2– Representação esquemática do protocolo de preparação do S1 de miosina por digestão quimiotripsina, de acordo com o previamente descrito por Margossian e Lowey (1982). Todo o procedimento foi realizado a 4° C, excepto quando indicação do contrário (Adaptado de Susana Ramos, Relatório de Estágio, 2005).

### 3.2.1.2 Isolamento e purificação de actina

Isolou-se e purificou-se a actina segundo o método descrito por Pardee e Spudish, que compreende dois passos – a obtenção de um resíduo seco denominado “pó de acetona” e a extracção subsequente da actina a partir do “pó de acetona”, na forma de G-Actina, com a posterior polimerização a F-Actina.

#### 3.2.1.2.1 Obtenção do “pó de acetona”

Sacrificou-se o coelho com uma pancada atrás do pescoço e sangrou-se o animal, após o corte da artéria jugular. Esfolou-se e colocou-se numa tina com gelo. Retiraram-se as partes de tecido conjuntivo que envolvem o tecido muscular, com auxílio de uma pinça e bisturi. Seguidamente, retirou-se os músculos dorsais e os músculos brancos das pernas. Passou-se os músculos por água destilada, de modo a remover as impurezas, e pesou-se num copo. Trituraram-se os músculos numa máquina de triturar carne e extraiu-se o resultante com 3 volumes da solução E<sup>6</sup> durante 10 minutos, com agitação suave. Centrifugou-se a suspensão a 4000 g durante 10

<sup>5</sup> Solução D: HEPES 10 mM pH 7,0; KCl 25 mM

<sup>6</sup> Solução E: 0,1 M KCl, 0,15 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6,5

minutos, desprezando-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento em 6 volumes de solução F<sup>7</sup> durante 10 minutos, com agitação suave. Verificou-se se o pH da solução estava compreendido entre 8,2 e 8,5, acertando-se este com solução G<sup>8</sup>, se necessário. Centrifugou-se durante 10 minutos a 4000 g. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 3 volumes de solução H<sup>9</sup>, durante 10 minutos. Centrifugou-se novamente a 4000 g durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento duas vezes consecutivas em 6 volumes de água destilada, durante 5 minutos. Centrifugou-se a 4000 g durante 10 minutos, após cada adição de H<sub>2</sub>O.

Seguidamente, ressuspendeu-se o sedimento 5 vezes consecutivas, utilizando 3 volumes de acetona de cada vez, agitando suavemente durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Colocou-se o resíduo filtrado numa tina de vidro, sobre papel de filtro, deixando-se evaporar o solvente durante a noite, num nicho. Triturou-se o resíduo seco numa máquina de triturar carne e deixou-se novamente evaporar o solvente. O “pó de acetona” obtido foi armazenado a -20 °C.

### 3.2.1.2.2 Purificação da actina a partir de “pó de acetona”

Após a obtenção do "pó de acetona" como acima indicado, efectuou-se o protocolo seguidamente descrito, de modo a obter monómeros de actina (G-Actina) e actina filamentosa (F-Actina).

Pesou-se 3,5 g de "pó de acetona" e adicionaram-se 50 mL de solução-tampão I<sup>10</sup>, sendo a extracção feita com agitação suave durante 30 minutos. Separou-se o extracto do "pó de acetona" hidratado, filtrando a suspensão com 4 camadas de gaze esterilizada, tendo o cuidado de não espremer o resíduo. Voltou a extrair-se com 50 mL de solução I, durante 30 minutos, mexendo lentamente. Adicionou-se este ao extracto obtido anteriormente. Centrifugou-se o extracto total a 16 000 g durante 30 minutos. Decantou-se para uma proveta, sobre a qual se colocou gaze, para que o sedimento solto não se juntasse ao sobrenadante e leu-se o volume. De seguida, adicionou-se KCl até uma concentração final de 50 mM, MgCl<sub>2</sub> até 2mM e ATP até 1mM, lentamente e com agitação contínua, de modo a promover a polimerização dos monómeros de actina.

Deixou-se polimerizar durante 2h a 25°C, observando-se a presença de pequenas bolhas de ar, indicativas de um aumento de viscosidade da solução. Arrefeceu-se em gelo durante 15 minutos e adicionou-se KCl até uma concentração final de 0,6M. Mexeu-se lentamente durante 30 minutos, após os quais se ultracentrifugou a 110 000g durante 1hora. Desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento com solução tampão E e transferiu-se para um "potter".

Dialisou-se durante a noite contra 1L de solução-tampão I a uma temperatura de 4°C, com rotação

---

<sup>7</sup> Solução F: 0,05 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2-8,5

<sup>8</sup> Solução G: 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

<sup>9</sup> Solução H: 1 mM EDTA, pH 7,0

<sup>10</sup> Solução I: 2 mM Tris-HCl pH 8; 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,2 mM Na<sub>2</sub>ATP; 0,5 mM β-Me; 0,005% NaN<sub>3</sub>

contínua e mudança de tampão 2 a 3 vezes. De seguida, a actina foi centrifugada a 110 000g durante 1 hora. Decantou-se a solução de G-Actina (sobrenadante) e desprezou-se o sedimento. Determinou-se a concentração de G-Actina pelo método directo (ver secção 3.3.1.2 do Procedimento Experimental). A solução de G-actina foi armazenada a uma temperatura de 4°C, após adição de 0,02%NaN<sub>3</sub>, mantendo-se estável durante 3 a 5 dias.

### 3.3.1 Quantificação das proteínas isoladas

#### 3.3.1.1 Quantificação pelo método de Bradford

O método de Bradford (Bradford, 1976), baseia-se na utilização do reagente de Bradford, composto por, entre outros, ácido fosfórico e o corante “Coomassie”. Este corante possui carga negativa e a sua coloração varia entre a vermelha ( $Abs_{max}=465$  nm), predominante em solução, e a azul ( $Abs_{max}=595$  nm), presente aquando da ligação aos grupos amina das proteínas. Em soluções ácidas diluídas, a coloração varia proporcionalmente com a quantidade do corante ligado à proteína, que, por sua vez, é directamente proporcional à concentração da proteína, permitindo a sua quantificação até a um limite de detecção de 20 µg/mL (Bradford, 1976).

Deste modo, prepararam-se amostras de BSA ( $[BSA]_{stock}=1$  mg/mL) utilizando um intervalo de concentrações compreendido entre 0 e 15 µg/mL, de acordo com a tabela 3.I. Após a adição da H<sub>2</sub>O MilliQ e do reagente de Bradford, as soluções foram sucessivamente homogeneizadas no vórtex.

**Tabela 3.I**– Amostras utilizadas para a obtenção da recta de calibração, no método de Bradford.

BSA (µL)	BSA (µg)	H2O MilliQ (µL)	Reagente de Bradford (µL)
0	0	800	200
1,25	1,25	798,75	200
2,5	2,5	797,5	200
5	5	795	200
10	10	790	200
15	15	785	200

Após incubação a 25°C por 5 minutos, leram-se os valores de  $Abs_{595}$  num espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) para todas as amostras. Seguidamente, traçou-se a recta de calibração ( $Abs_{595}$  vs. quantidade de BSA (µg)).

Para determinar a concentração de proteína após o processo de isolamento, purificação e diálise, quando necessário, colocou-se 5  $\mu\text{L}$  da amostra num tubo de Eppendorf e adicionou-se 795  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ, homogeneizando a solução no vórtex. Adicionou-se posteriormente 200  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford e repetiu-se a homogeneização. Incubou-se a mistura a  $25^\circ\text{C}$  por 5 minutos, após os quais se leu os valores de  $\text{Abs}_{595\text{ nm}}$  no espectrofotómetro. Por interpolação deste valor a partir da recta de calibração, determinou-se a concentração de proteína na amostra.

### 3.3.1.2 Quantificação pelo método directo

A quantificação das amostras proteicas pode também ser efectuada através da leitura directa da absorvância, tendo por base a lei de Beer-Lambert,  $\text{Abs} = \epsilon bc$ , onde  $\text{Abs}$  corresponde à absorvância ao comprimento de onda ao qual o ensaio foi realizado,  $\epsilon$  corresponde ao coeficiente de extinção (substituído pela letra  $a$  se as unidades forem distintas da molaridade),  $b$  corresponde ao percurso óptico da radiação na célula amostral e  $c$  corresponde à concentração amostral.

Assim, no caso de S1 de miosina, mediu-se a  $\text{Abs}_{280}$  e calculou-se a concentração da proteína, sabendo que o coeficiente de extinção de S1 é  $\epsilon_{280}^{1\%} = 7,5\text{cm}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mL}$  (Ref).

No caso da actina, mediu-se a  $\text{Abs}_{290}$  e calculou-se a concentração da proteína, sabendo que o coeficiente de extinção da actina é  $\epsilon_{290} = 0,62\text{cm}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mL}$  (Ref).

### 3.3.2 Electroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

De modo a melhor caracterizar as proteínas isoladas, foi realizada uma electroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). O SDS (dodecilo sulfato de sódio) é um detergente aniónico utilizado neste método para desnaturar as proteínas, que se ligam ao SDS na proporção 1,4 g SDS/ g proteína (aproximadamente 1 molécula de SDS por cada 2 resíduos de aminoácidos) (Stryer). O SDS induz uma densidade de carga negativa significativa nas proteínas a que se liga, mascarando a sua carga intrínseca, pelo que as razões carga:massa são tendencialmente idênticas. Assim, a SDS-PAGE separa as proteínas, quando sujeitas a um campo eléctrico, de acordo com o seu peso molecular, sendo a sua migração directamente proporcional ao logaritmo deste último (Stryer).

O gel de resolução com 10% de acrilamida foi obtido através da adição de 1,67 mL de solução stock de acrilamida<sup>11</sup>, 0,75 mL de tampão de resolução<sup>12</sup>, 2,51 mL de água destilada e 50  $\mu\text{L}$  de SDS 10%. Para promover a polimerização, adicionou-se em seguida 38  $\mu\text{L}$  de PSA 10%

<sup>11</sup> solução stock de acrilamida: solução de 30% (m/v) de acrilamida e 0,8% (m/v) de N,N'-metil-bis-acrilamida

<sup>12</sup> tampão de resolução: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

(persulfato de amónia) 10% e 2,5  $\mu\text{L}$  de TEMED 99% (tetrametiletilenodiamina). Agitou-se cuidadosamente, de modo a não formar bolhas, e pipetou-se a solução para a cassette de vidro, previamente montada no suporte. De seguida, adicionou-se uma película de cerca de 2 mm de 2-metil-2-butanol, para verificar posteriormente a polimerização. Após a polimerização, que demora cerca de 45 minutos, verteu-se a à superfície e adicionou-se o gel de concentração, com 5% de acrilamida, constituído por 0,3 mL de solução de stock acrilamida, 0,45 mL de tampão de concentração<sup>13</sup>, 0,94 mL de água destilada, 18  $\mu\text{L}$  de SDS 10%, 13,5  $\mu\text{L}$  de PSA 10% e 2  $\mu\text{L}$  de TEMED 99%. Colocou-se o pente sobre o gel e deixou-se polimerizar durante cerca de 45 minutos.

As amostras para aplicação no gel de electroforese foram preparadas para uma concentração de proteína de 1 mg/mL, num volume final de 100  $\mu\text{L}$ , dos quais 25  $\mu\text{L}$  correspondem ao tampão da amostra<sup>14</sup>. As amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos. Antes da aplicação das amostras, transferiu-se a cassette para a tina de electroforese, à qual se adicionou a solução tampão de electroforese da tina superior<sup>15</sup> e tampão de electroforese da tina inferior<sup>16</sup>. Aplicaram-se 10  $\mu\text{L}$  das soluções de marcadores de peso molecular e 20  $\mu\text{L}$  das amostras proteicas preparadas anteriormente. A electroforese decorreu durante cerca de 3h30 min, a uma voltagem de 80 V. De seguida, transferiu-se o gel para uma tina, corando as proteínas durante 1h com solução corante<sup>17</sup>. Descorou-se o gel com solução descorante<sup>18</sup>, tendo-se mudado esta solução até as bandas se encontrarem bem definidas.

Determinou-se a mobilidade relativa das bandas correspondentes aos marcadores de elevado peso molecular e traçou-se a recta de calibração –  $\log(\text{PM})$  vs.  $\log(Rf)$ , onde  $Rf$  corresponde à mobilidade relativa. Por interpolação, determina-se o PM das proteínas isoladas, sabendo a sua mobilidade relativa. Por comparação com os valores descritos na literatura, pode concluir-se acerca do grau de purificação.

### 3.4 Medição da actividade enzimática de S1

#### 3.4.1 Medição das actividades de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase de S1, pelo método de Fiske-Subarow modificado

---

<sup>13</sup> tampão de concentração: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8.

<sup>14</sup> tampão de amostra: 320 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 M  $\beta$ -mercaptoetanol, SDS 8%, glicerol 15% (v/v) e roxo de m-cresol 0,024%.

<sup>15</sup> tampão de electroforese da tina superior: 25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glicina, 0,1% (m/v) SDS.

<sup>16</sup> tampão de electroforese da tina inferior: 25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glicina, 0,1% (m/v) SDS, acetato de sódio 0,1 M.

<sup>17</sup> solução corante: “Coomassie Blue R-250”, contendo metanol 45% (v/v) e ácido acético glacial 10% (v/v).

<sup>18</sup> solução descorante: metanol 10% (v/v) e ácido acético glacial 10% (v/v).

O método de Fiske-Subarow modificado consiste na reacção do molibdato de amónio com o fosfato inorgânico, em solução ácida, com formação do ácido fosfomolibdico. Seguidamente, dá-se a adição de um agente redutor que provoca a redução do composto a fosfomolibdato, que forma um complexo de cor azulada cuja absorvância máxima ocorre para um comprimento de onda de 660 nm, tornando possível a sua detecção por métodos espectrofotométricos. As actividades  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica e  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPásica de S1 foram determinadas através deste método, de acordo com o descrito por Taussky e Shorr (1953), com medição da quantidade de fosfato (Pi) libertado através da hidrólise de ATP.

Para tal, obteve-se primeiramente a recta de calibração com as amostras presentes na Tabela 3.II, utilizando uma solução stock de 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

**Tabela 3.II** – Composição das diferentes amostras utilizadas para determinar a recta de calibração através do método de Fiske-Subbarow modificado.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $\mu\text{L}$ ) ( $[\text{KH}_2\text{PO}_4]_{\text{stock}} = 5\text{mM}$ )	$\text{PO}_4^{3-}$ (nmole)	$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )
0	0	1780
5	25	1775
10	50	1770
20	100	1760
40	200	1740
100	500	1680

A cada tubo de Eppendorf adicionaram-se seguidamente 200  $\mu\text{L}$  de solução J<sup>19</sup> e 20  $\mu\text{L}$  de agente redutor<sup>20</sup>, homogeneizando no vórtex após cada adição. Incubou-se durante 10 minutos e mediu-se a  $\text{Abs}_{660\text{ nm}}$  num espectrofotómetro, com intervalos de tempo iguais entre cada amostra. Traçou-se a recta de calibração ( $\text{Abs}_{660\text{ nm}}$  vs. nmol  $\text{PO}_4^{3-}$ ) a partir dos valores obtidos.

Para determinar a actividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica de S1, prepararam-se tubos de Eppendorf com 400  $\mu\text{L}$  de meio de reacção<sup>21</sup>, 25  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  ( $[\text{CaCl}_2]_{\text{stock}} = 100\text{ mM}$ ), 25  $\mu\text{L}$  ATP ( $[\text{ATP}]_{\text{stock}} = 100\text{ mM}$ ), com  $[\text{S1}]_{\text{ensaio}} = 0,1\text{ mg/mL}$ . Perfez-se se necessário com  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ, até perfazer um volume de 1 mL. Para determinar a actividade  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPásica, utilizou-se uma concentração idêntica de

<sup>19</sup> Solução J: 5 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2,5% molibdato de amónio

<sup>20</sup> Agente redutor: 5 mg ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, 30 mg bissulfito de sódio, 30 mg sulfito de sódio em 2,6 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

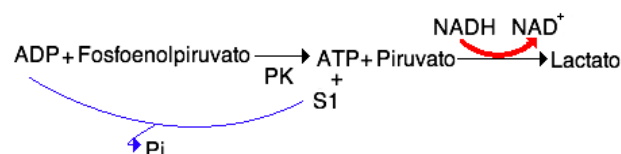
<sup>21</sup> meio de reacção: 125 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0,575 M KCl

proteína nos ensaios (0,1 mg/mL) e o mesmo meio de reacção. Aos tubos de Eppendorf adicionou-se ainda 123  $\mu\text{L}$  de KCl ( $[\text{KCl}]_{\text{stock}} = 3\text{M}$ ), 25  $\mu\text{L}$  de ATP, 10  $\mu\text{L}$  de EDTA ( $[\text{EDTA}]_{\text{stock}} = 100\text{ mM}$ ) e o volume de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ necessário para perfazer 1 mL. Em ambas as situações, o último reagente adicionado foi o ATP, uma vez que se trata do substrato da reacção enzimática.

A cinética decorreu a  $25^\circ\text{C}$  durante 5 minutos para a actividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica e durante 3 minutos para a actividade  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPásica. Após o período de incubação, transferiu-se 150  $\mu\text{L}$  de amostra para tubos de Eppendorf contendo igual volume de TCA 10%. Colocou-se no gelo e homogeneizou-se no vórtex. Seguidamente, centrifugou-se a 1500 g durante 10 minutos e recolheu-se 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante para novos tubos de Eppendorf. Adicionou-se a estes 1,58 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ e 200  $\mu\text{L}$  de solução J. Homogeneizou-se no vórtex e adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de reagente redutor, repetindo-se a homogeneização. Incubou-se durante 10 minutos e mediu-se a  $\text{Abs}_{660\text{ nm}}$ , com o mesmo intervalo de tempo de leitura para cada amostra. Por intrapolação a partir da recta de calibração obtida anteriormente, determinou-se a quantidade de Pi libertado em cada ensaio. A partir destes resultados, determinaram-se as actividades  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica e  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPásica do S1 em  $\text{nmol PO}_4^{3-}/\text{min.mg}$  proteína e em  $\text{s}^{-1}$ .

### 3.4.2 Medição da actividade de $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase de S1 estimulada por actina, pelo método de enzimas acopladas

Da actividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica de S1, resulta a formação dos produtos da reacção de hidrólise do ATP - ADP e Pi. Na presença de ADP, fosfoenolpiruvato (PEP) e da enzima piruvato cinase (PK), os produtos resultantes são ATP e piruvato. Por acção da enzima lactato desidrogenase (LDH), este último é convertido em lactato, ocorrendo simultaneamente a oxidação do NADH a  $\text{NAD}^+$ , monitorizada através da  $\text{Abs}_{340\text{ nm}}$ . Quando o S1 de miosina se encontra no meio reaccional, o ATP é hidrolisado, formando-se novamente ADP e Pi, o que permite a formação de um ciclo (fig. 2.1). Se as enzimas se encontrarem em excesso, a velocidade de conversão do NADH é limitada pela produção de ADP e Pi. Como o ATP é regenerado em cada ciclo, a sua concentração inicial é sempre mantida (Bagshaw, 1982).



**Figura 3.3**– Representação esquemática do método de enzimas acopladas.

O protocolo utilizado e seguidamente descrito foi adaptado de Cuenda et al. (1990 – Ver Ref<sup>a</sup>). A uma cuvette de 1 mL adicionou-se S1 para uma concentração final de 0,05 mg/mL, 800  $\mu$ L de meio de reacção<sup>22</sup>, 10  $\mu$ L de PEP ( $[PEP]_{stock} = 42$  mM), 10  $\mu$ L de PK+LDH 1:1 ( $[PK+LDH]_{stock} = 1$  mg/mL) e 15  $\mu$ L de NADH ( $[NADH]_{stock}=25$  mM). Iniciou-se a monitorização da reacção através da leitura de Abs<sub>340 nm</sub>, após a adição de 20  $\mu$ L de ATP ( $[ATP]_{stock}=100$  mM). A actividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica é obtida através do declive correspondente à oxidação do NADH. Para a medição da Mg<sup>2+</sup>-ATPase de S1 estimulada por actina, adicionou-se F-actina para uma concentração final de 2  $\mu$ M, sendo a actividade obtida também através do declive correspondente à oxidação do NADH, após a adição da proteína.

### 3.5 Interação entre vanádio e subfragmento-1 de miosina

#### 3.5.1 Preparação das soluções de vanádio

As soluções de vanadato foram preparadas em água MilliQ a partir de metavanadato de amónio (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>) numa concentração *stock* de 50 mM, com agitação magnética e aquecimento (~30 °C). Esta solução, com um valor compreendido entre 6 e 7, designa-se por “metavanadato” e é constituída pelas espécies V1, V2, V4 e V5 (Ref). Acidificando a solução de metavanadato, por adição de HCl até um valor de pH próximo de 4, observa-se uma mudança de cor de amarelo claro para laranja, indicativa da formação da espécie decamérica de vanadato. De seguida, e imediatamente antes da realização dos ensaios descritos, o valor do pH da solução de decavanadato foi aumentado para cerca de 7,5, por adição de NaOH.. A solução (2), designada por “metavanadato” não foi posteriormente alterada até à sua adição para a realização dos ensaios. As soluções foram armazenadas a 4°C e mantidas em gelo aquando da sua utilização.

A solução de V(IV) foi preparada em condições anaeróbias, por diluição de sulfato de vanadil (VOSO<sub>4</sub>) para uma concentração final de 5 mM, em H<sub>2</sub>O MilliQ saturada com N<sub>2</sub> gasoso.

#### 3.5.2 Análise por espectroscopia de UV-Vis

A concentração da espécie decamérica em solução depende do período de tempo após a diluição no meio de reacção apropriado (Ref). A velocidade de desoligomerização da espécie decamérica pode ser analisada por espectroscopia de absorção na região UV/Vis, uma vez que esta espécie apresenta duas bandas características na região do visível, (a 358 e 400 nm), que não se verifica em quaisquer outras espécies oligoméricas. As bandas supramencionada sapresentam-se bem

---

<sup>22</sup> Meio de reacção: 31,25 mM Tris-HCl pH 7,1; 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>

resolvidas através da obtenção da derivada de 2ª ordem do espectro, apresentando a forma de 2 vales com mínimos centrados nos comprimentos de onda supracitados, com dependência linear relativamente à concentração de decavanadato total (Ramos et al, 2006).

Assim, a estabilidade da espécie decamérica após diluição da solução de decavanadato no meio de reacção dos ensaios (tampão D), para uma concentração final de 1 mM em vanadato total, foi caracterizada através da leitura da Abs<sub>400</sub> em função do tempo, tendo-se determinado qual a ordem de reacção e o tempo de meia-vida da mesma. Com base em estudos anteriores acerca da estabilidade do V<sub>10</sub> na presença de diferentes proteínas (Ramos et al, 2006), determinou-se igualmente o tempo de meia vida após a adição de 20 µM de S1 de miosina ao meio reaccional.

### 3.5.3 Análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN do isótopo <sup>51</sup>V foram realizados num espectrómetro Bruker AM-400 MHz equipado com uma sonda multinuclear inversa de 5 mm. Em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro, preparou-se soluções de 500 µL de deca- ou metavanadato, correspondentes a um intervalo de concentrações de 1 a 10 mM, suplementadas com 10% D<sub>2</sub>O. Os espectros foram adquiridos à temperatura ambiente, com uma largura espectral de 23 923 Hz, um tempo de aquisição de 0,086 s, tempo de relaxação de 0,01 s e uma sequência de pulsos a 90°. Utilizou-se a transformada de Fourier, com alargamento das bandas de 20Hz para o processamento dos espectros. Os desvios químicos das ressonâncias de <sup>51</sup>V foram obtidos em relação à espécie VOCl<sub>3</sub>, cuja frequência de ressonância é considerada o padrão, sendo todas as outras referenciadas a partir desta, em ppm. As áreas dos sinais do RMN correspondentes às espécies oligoméricas presentes foram obtidas por integração dos sinais. As concentrações relativas das espécies foram calculadas com recurso à equação

$$[V_x] = \frac{A_{[V_x]} / x}{A_{[V]_{total}}} * [V]$$

onde A[V<sub>x</sub>] corresponde à área referente à ressonância da espécie V<sub>x</sub> com n.º de agregação x, A[V]<sub>total</sub> à soma total das áreas medidas e [V] a concentração total de vanádio no ensaio.

A técnica de <sup>51</sup>V-RMN foi anteriormente aplicada em estudos de ligação com S1 de miosina (Ref), tendo sido demonstrado que, entre as espécies V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>4</sub> e V<sub>5</sub>, a espécie tetramérica possui a maior afinidade para a miosina (Cremonesi et al). O desaparecimento ou alargamento dos sinais pode implicar a ligação de um dos oxovanadatos lábeis à miosina, sem indicação de qual, uma vez que

se processa um equilíbrio entre eles (Crans, 1990). Assim, e tendo em conta as indicações de que a espécie  $V_{10}$  é distinta das restantes, no que diz respeito à magnitude da interacção com a miosina e inibição da actividade ATPásica estimulada por actina (Aureliano, 2000; Tiago et al, 2002), torna-se fundamental investigar a interacção das diferentes espécies de vanadato com o S1 de miosina, através da técnica de  $^{51}\text{V}$ -RMN.

Para tal, obtiveram-se espectros de  $^{51}\text{V}$ -RMN resultantes da titulação de uma solução 5 mM de decavanadato total com concentrações crescentes de S1 de miosina (0; 5; 10; 15 e 20  $\mu\text{M}$ ) em tampão D. Realizou-se ainda ensaios na presença de 2 mM de decavanadato e 2 mM de ATP, na presença e na ausência de S1 de miosina, de modo a verificar o efeito que estes ligandos naturais da enzima teria na interacção das várias espécies de vanadato com o subfragmento-1.

### 3.6 Interacção de S1 com vanádio

#### 3.6.1 Quantificação de cisteínas reduzidas

Os grupos sulfidrilo (-SH) das cisteínas são resíduos de aminoácidos extremamente sensíveis à oxidação, resultando na sua oxidação (Dalle-Donne et al, 1999). Logo, a quantificação destes resíduos é bastante importante nos estudos de interacção com vanádio, já que os resíduos de Cys, com ênfase para o SH1 e o SH2, são bastante importantes na monitorização das modificações funcionais da região da cabeça.

O procedimento seguidamente apresentado foi originalmente descrito por Gutiérrez-Merino (1987)). Consiste na reacção entre os grupos -SH não oxidados das proteínas e o reagente de Ellman (DTNB -5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)) - formando-se o anião CNT (anião 3-carboxilato-4-nitrotiofenolato) numa estequiometria de 1:1. Este apresenta um máximo de absorvência a 412 nm, (Robyt, 1990). Assim, após a incubação da proteína na presença do metal, a quantidade de cisteínas reduzidas por proteína determina-se através dos valores de  $\text{Abs}_{412}$ .

Deste modo, colocou-se num tubo de Eppendorf o volume apropriado de S1 dialisado para que a concentração no ensaio fosse de 1 mg/mL. Adicionou-se o volume apropriado de decavanadato, para que a sua concentração fosse de 0, 10, 50, 100, 250, 500 ou 1000  $\mu\text{M}$ . Perfez-se com solução D até um volume final de 1 mL e incubou-se a 25°C por 20 minutos. Após este período, colocou-se 780  $\mu\text{L}$  da mistura reaccional numa cuvette de quartzo e adicionou-se 220  $\mu\text{L}$  de solução  $\text{K}^{23}$ .

---

<sup>23</sup> Tampão K: Tampão fosfato/hidrogenofosfato de sódio 0,25 M pH 7,2

Adicionou-se 15  $\mu\text{L}$  de DTNB (em solução K,  $[\text{DTNB}]_{\text{stock}}=100 \text{ mM}$ ) ao meio reaccional e registou-se o valor de absorvência medido, equivalente às cisteínas “rápidas” (SH1 e SH2, expostos ao solvente). Adicionou-se 0,01 g de SDS, que provoca a desnaturação da proteína e, conseqüentemente, a exposição de todos os resíduos de cisteínas que se encontravam até aí inacessíveis no interior da proteína (cisteínas totais). Estes resíduos podem, assim, reagir com o DTNB.

Estimou-se o número de resíduos de cisteínas em todas as amostras, com recurso ao coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) do DTNB (ver ponto 3. dos Anexos), que foi determinado através da titulação de L-Cisteína com intervalo de concentrações compreendidos entre 0 e 50  $\mu\text{M}$ , na presença de 25 $\mu\text{M}$  de DTNB em tampão D. Os valores de absorvência foram obtidos para um comprimento de onda de 412 nm.

### 3.6.2 Interação de V(IV) com subfragmento-1 de miosina

#### 3.6.21 Análise por Ressonância Paramagnética Electrónica

A técnica mais eficiente de análise da interação entre o ião vanadilo e proteínas, como a calmodulina e a transferrina entre outras, permite a obtenção rápida de informação, no que toca à conformação e amplitude da referida interação.

Os espectros de Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE) da espécie paramagnética V(IV) foram realizados a 70K num espectrómetro Bruker EMX-300 X-band. Todas as soluções utilizadas e amostras foram preparadas em anaerobiose, numa câmara de luvas, de modo a evitar a redução de V(IV) a V(V). Em tubos capilares com 0,2 mL de amostra, manteve-se a concentração de S1 a 20  $\mu\text{M}$  e variou-se a concentração de vanadilo (0; 2,5; 5; 10; 15; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 500 e 1000  $\mu\text{M}$ ;  $[\text{VOSO}_4]_{\text{stock}}=5 \text{ mM}$ ), em tampão D. Após obtenção dos espectros, estes foram tratados através do software SimFonia e WinEPR, tendo-se obtido um gráfico com a variação da intensidade do sinal de RPE em função da concentração de sulfato de vanadilo presente. Realizaram-se ainda simulações de espectros obtidos com 20  $\mu\text{M}$  de S1 e 1000  $\mu\text{M}$  de V(IV), com vista à obtenção dos ligandos prováveis do vanadilo, através da análise da constante de acoplamento hiperfina ( $A_{\parallel}$ ) e do factor g ( $g_{\parallel}$ ).

## 4. Conclusões gerais

Apesar de já ter sido demonstrado que o vanádio inibe a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase da miosina, a função deste elemento no tecido músculo esquelético continua largamente incompreendida. A enorme complexidade química deste metal, especialmente no que concerne à oligomerização e reacções

redox, constitui um obstáculo à compreensão do comportamento do vanádio nos organismos vivos. Assim, a caracterização da química deste elemento é de grande utilidade, antes de iniciar o estudo da sua interacção com o presente sistema.

A análise por espectroscopias de  $^{51}\text{V}$ -RMN e de UV-Vis de soluções de vanadato diluídas nos meios de reacção utilizados no presente relatório (10 mM HEPES, pH 7,0; 25 mM KCl) mostrou claramente que a espécie decamérica ( $V_{10}$ ) possui um tempo de vida suficientemente longo para a determinação do seu efeito isolado, ao contrário do que se verifica com as espécies mono-, di-, tetra- e pentaméricas ( $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_4$  e  $V_5$ ). Por outro lado, a análise verificou ainda que, após diluição das soluções de decavanadato no meio de reacção, coexistem as espécies  $V_{10}$  e  $V_1$ , pelo que os efeitos putativos desta última deverão ser subtraídos, aquando da monitorização dos efeitos da espécie decamérica.

O vanádio (V) (vanadato) inibe as enzimas que catalizam reacções de transferência de grupos fosfato, como a ATPase da miosina [Goodno, 1979], devido à sua analogia estrutural com o ião fosfato. Na sua utilização como inibidor enzimático, não é tida em conta a contribuição individual das espécies oligoméricas, considerando-se normalmente a espécie  $V_1$  como inibidora efectiva [Goodno e Taylor, 1982]. No presente relatório, verificou-se por espectroscopia de  $^{51}\text{V}$ -RMN que outros oligómeros de vanadato interagem com o S1 de miosina, tendo as espécies  $V_{10}$  e  $V_4$  os maiores níveis de afinidade. A sua interacção envolve forças electrostáticas e é afectada negativamente por ligandos naturais de enzima, como é o caso do ATP.

A exposição do S1 de miosina (0,05 mg/mL) a decavanadato conduz à inibição da capacidade da proteína de estimular a actividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica, com um valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $26,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$  decavanadato, sendo o máximo de inibição da estimulação atingido para cerca de  $250 \mu\text{M}$  decavanadato (80%). Na presença de actina, o valor de  $\text{IC}_{50}$  é de  $28 \pm 1 \mu\text{M}$  decavanadato, sendo o máximo de inibição da estimulação atingido para cerca de  $250 \mu\text{M}$  decavanadato (60%), exercendo um efeito de impedimento à ligação entre o vanádio e o S1.

A uma concentração de  $27 \mu\text{M}$  decavanadato, verifica-se a oxidação de um dos resíduos de Cys de S1 de miosina, seguida pela oxidação gradual de outro resíduo de Cys, até à concentração de  $1000 \mu\text{M}$ . Ambos os resíduos oxidados não se encontravam expostos ao solvente utilizado. A oxidação dos resíduos permite sugerir que esta modificação oxidativa sofrida pelo S1 contribui para a diminuição da sua actividade de ATPase.

Por espectroscopia de RPE, revelaram-se os possíveis ligandos equatoriais do vanádio aquando da sua interacção com o S1 de miosina, como sendo duas moléculas de água, um ligando contendo o grupo R-OH e outro contendo o grupo R=NR.

Globalmente, os resultados obtidos sugerem um efeito significativo do vanádio, nos estados de oxidação (IV) e (V), no S1 de miosina, para concentrações facilmente alcançáveis no ambiente terrestre.

## 5. Estudos futuros

No sentido do melhor esclarecimento das alterações moleculares e estruturais que ocorrem no subfragmento 1 quando exposta ao vanádio, que conduzem a uma diminuição da sua função, sugere-se:

- Quantificação das cisteínas reduzidas de S1 na presença de metavanadato;
- Determinação das actividades  $\text{Ca}^{2+}$ - e  $\text{K}^{+}$ -ATPásica do S1 de miosina na presença de decavanadato;
- Determinação da actividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica basal do S1 de miosina estimulada por actina;
- Determinação da actividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica basal do S1 de miosina na presença de metavanadato;
- Realização de RMN 2D com variação das concentrações das soluções de decavanadato e metavanadato, na presença de S1;
- Mutagénese dos resíduos de Cys do S1 de miosina, de modo a verificar quais os resíduos que sofrem oxidação na presença de decavanadato;
- Determinação por calorimetria (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) da variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e da temperatura de desnaturação do S1 de miosina na presença de vanádio, uma vez que estas propriedades, características de cada proteína, são alteradas após ocorrência de modificações estruturais;
- Análise por SDS-PAGE de S1 de miosina após tratamento com vanádio, de modo a determinar quais os polipéptidos eventualmente formados após clivagem da proteína;

## 6. Referências bibliográficas

- Sellers, J. *Myosins*, 2nd Edition, Oxford University Press, 1999

- L. Stryer in *Biochemistry* (Ed. , W.H. Freeman, **2005**, pp.

Ref<sup>as</sup> Materiais e Métodos

[A] S. S. Margossian, S.Lowey, *Methods Enzymol.*,**1982**, 85, 55-71.

[B] J.D. Pardue, J.A. Spudich, *Methods Enzymol.* , **1982**, 85: 164-181.

[C] M. Bradford, *Anal. Biochem.*,**1976**, 72: 248-254.

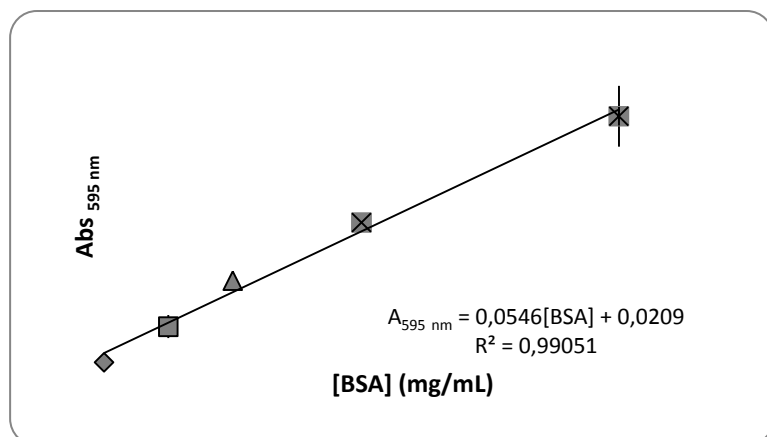
[D] H. H. Taussky, E. Shorr, *J. Biol. Chem.*, **1953**, 202: 675-685.

[E] C. R Bagshaw in *Outline Studies in Biology – Muscle Contraction*, Chapman and Hall Ed., **1982**.

[F] A. Cuenda *et al*, *Eur. J. Biochem.*,**1990**, 194: 663-670.

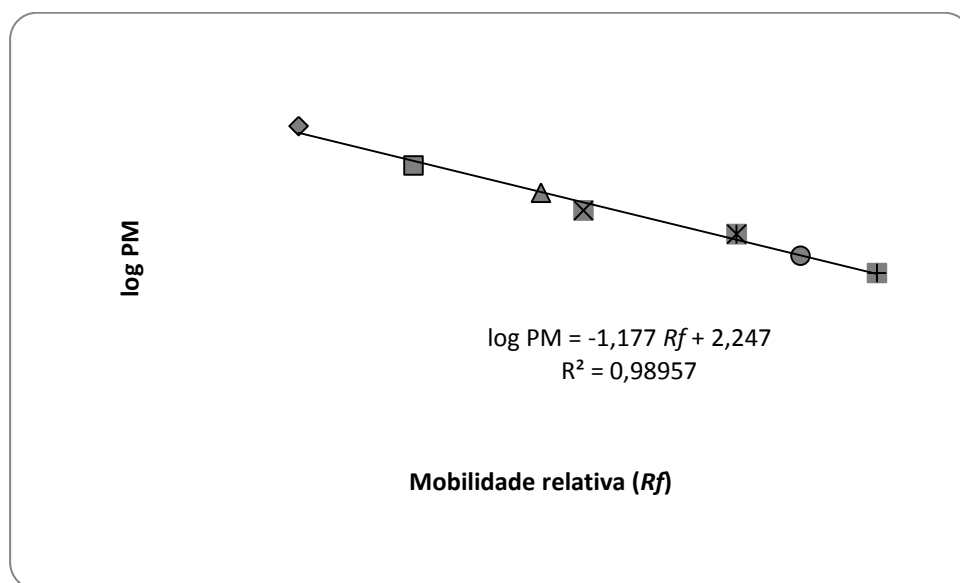
## Anexos

### 1. Determinação da recta de calibração método de Bradford



**Figura 1** – Representação gráfica da recta de calibração ( $A_{595 \text{ nm}}$  vs. [BSA]), utilizada para o método de Bradford.

### 2. Determinação da recta calibração para a electroforese em condições desnaturantes



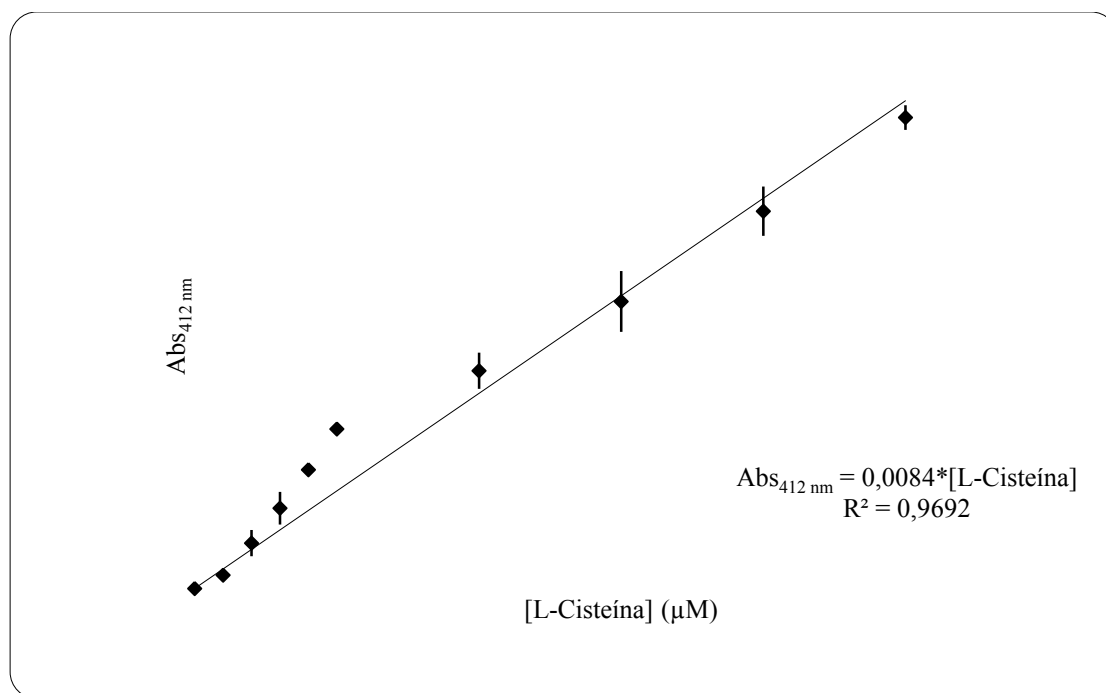
**Figura 2** – Representação gráfica da recta de calibração ( $\log(\text{Peso Molecular})$  vs.  $R_f$  dos marcadores de peso molecular), onde  $R_f$  indica  $\frac{\text{Mobilidade}_{\text{substância}}}{\text{Frente}_{\text{solvente}}}$ , determinada através do padrão de peso molecular (poço (a)).

### 3. Cálculo do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) para a quantificação de cisteínas reduzidas, através do método de Ellman

Traçou-se a recta de  $A_{412 \text{ nm}}$  média vs. [L-Cisteína], de modo a determinar o valor do coeficiente de extinção molar  $\epsilon$ , definido como o declive daquela recta. Assim,  $\epsilon = 8400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , como podemos verificar na Fig. 3.

**Tabela 3.III** – Amostras utilizadas para a obtenção da recta de determinação de  $\epsilon$ .

[L-Cisteína] ( $\mu\text{M}$ )	$A_{412}$ média
0	0
2	0,0115
4	0,039
6	0,069
8	0,102
10	0,137
20	0,187
30	0,2465
40	0,324
50	0,4045



**Figura 3** – Representação gráfica da Abs<sub>412 nm</sub> vs. a concentração de L-Cisteínas ( $\mu\text{M}$ ), utilizado na determinação de  $\epsilon$ , com vista na quantificação de cisteínas reduzidas.

#### 4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: considerações gerais

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) permite a monitorização da absorção de radiação associada a transições de núcleos atômicos entre níveis adjacentes de energia magnética. A energia da radiação é medida como função do campo magnético aplicado, obtendo-se um espectro de absorção em função da força do campo magnético.

As características do núcleo constituinte de uma determinada molécula irão influenciar os sinais obtidos no espectro de RMN, permitindo-nos a obtenção de informações de variadas amplitudes: a estrutura da molécula em análise, a sua interacção intermolecular no sistema em estudo, bem como a sua participação em processos dinâmicos em solução. O espectro de RMN é constituído por diversas bandas de ressonância.

Os parâmetros espectrais de um espectro de RMN com mais interesse para o estudo em curso são o desvio químico ( $\delta$ ), que se refere à posição de cada banda em relação a uma referência previamente escolhida ( $\delta_0$ ); a amplitude da banda, que se define como a altura relativa da banda; a intensidade, definida pela área da banda; a largura a meia altura; a constante de acoplamento de spin (J);

Todos os parâmetros anteriormente referidos podem contribuir para a obtenção de informações sobre o ambiente químico, estrutura, concentração, e interacção intermolecular, com ênfase para estudos cinéticos, entre outros.

O desvio químico evidencia as alterações do ambiente químico em redor do núcleo observado e é normalmente expresso em ppm, que o torna um valor adimensional.

O núcleo de  $^{51}\text{V}$  apresenta propriedades magnéticas que o tornam adequado para estudos através desta técnica. Este isótopo apresenta uma abundância natural de 99,75%, spin nuclear de 7/2 e sensibilidade de 39% relativamente ao protão ( $^1\text{H}$ ). As bandas dos vanadatos com configuração tetraédrica ou aproximada apresentam largura a meia altura média (60-100 MHz). Assim, a realização de estudos com espécies diamagnéticas (como é o caso do V(V)).

Cada espécie de vanadato (V(V)) está caracterizada por ressonâncias bem resolvidas no espectro de RMN. O tempo de relaxação das diversas espécies em estudo é semelhante, pelo que a integração dos seus sinais fornece-nos a fracção molar e, conseqüentemente, a concentração de cada oligómero.