



CENTRO DE CIÊNCIAS DO MAR DO ALGARVE

LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA BIOENERGÉTICA

VANÁDIO NA CONTRACÇÃO MUSCULAR

- EFEITO DE COMPOSTOS INSULINOMIMÉTICOS DE VANÁDIO NA
ACTIVIDADE ATPÁSICA DA MIOSINA -

Cláudia Filipa Batoque Fitas

Faro, Setembro de 2010

Relatório do Projecto desenvolvido no âmbito de uma Bolsa de Integração na Investigação (BII) sob a orientação do Professor Doutor Manuel Aureliano Alves

AGRADECIMENTOS

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



Professor Doutor Manuel Aureliano Alves

Doutora Teresa Tiago

RESUMO

A diabetes *mellitus*, desordem endócrina mais comum, tem vindo a aumentar em termos epidemiológicos sendo referida como uma patologia com grandes implicações a nível de saúde pública. Prevê-se que em 2030 o número de indivíduos diabéticos atinja os 366 milhões. Esta doença é causada por uma deficiência na secreção e/ou acção da insulina, podendo ser classificada em diabetes *mellitus* tipo I ou insulino-dependente (diminuição acentuada da secreção de insulina) e diabetes *mellitus* tipo II ou não insulino-dependente (resistência aos efeitos metabólicos da insulina).

Têm sido utilizados sais de vanádio em vários ensaios clínicos contudo, a sua fraca absorção e existência de efeitos tóxicos principalmente a nível gastrointestinal, levaram ao desenvolvimento de novos compostos de vanadato e vanadilo complexados com grupos orgânicos de forma a potenciarem a eficácia insulinomimética do metal, diminuírem a toxicidade e aumentarem a absorção. O vanádio para além das suas propriedades insulinomiméticas já demonstradas, é conhecido como sendo um inibidor específico das ATPases do tipo P e da ATPase de miosina. No sentido de avaliar se os compostos insulinomiméticos de vanádio têm implicações na fisiologia da miosina e consequentemente a nível da contracção muscular foram realizados estudos da actividade da Mg^{2+} -ATPase do subfragmento-1 de miosina estimulada por F-actina e em interacção com PDC-V(V) (piridinacarboxilatodioxovanádio (V)). Verificou-se que a exposição do S1 de miosina ao PDC-V(V) resulta numa inibição enzimática, sendo o valor de IC_{50} de $0,61 \pm 0,15$ mM. Este valor é consideravelmente superior ao observado anteriormente para o mesmo composto na Ca^{2+} -ATPase em que o valor de IC_{50} é $25 \mu M$. Sugere-se então que esta inibição seja causada por espécies oligoméricas de vanádio, resultantes da decomposição do PDC-V(V), pelo que se propõe a avaliação da decomposição deste composto por RMN nas mesmas condições que as usadas nos ensaios experimentais realizados.

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Abs	Absorvência
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPase	Adenosina 5'-trifosfatase
BMOV	bis(maltolato)oxovanadium(IV)
BSA	Albumina de soro bovino
DMID	Diabetes <i>mellitus</i> insulino-dependente
DMNID	Diabetes <i>mellitus</i> não insulino-dependente
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ϵ	Coefficiente de extinção molar
F-actina	Forma polimerizada da actina
G-actina	Forma monomérica da actina
IC ₅₀	Concentração inibitória a 50%
IR	Receptor de Insulina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
PDC-V(V)	Piridinacarboxilatodioxovanádio (V)
Pi	Ortofosfato
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfunil
PK	Piruvato cinase
S1	Subfragmento-1 de miosina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	(N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina)
TRIS	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UV	Gama ultravioleta do espectro electromagnético
VIS	Gama visível do espectro electromagnético

ÍNDICE

Página

Resumoi

Símbolos e Abreviaturasii

I – INTRODUÇÃO

I.1 - Vanádio e Diabetes1

I.1.1 – Diabetes *mellitus*1

I.1.1.1 - Diabetes *mellitus* tipo I2

I.1.1.2 - Diabetes *mellitus* tipo II2

I.1.2 – Vanádio3

I.1.2.1 – Ensaio clínico3

I.1.2.2 - Mecanismo insulino-mimético4

I.2 – Vanádio na Miosina5

I.2.1 – Sistema Muscular6

I.2.1.1 – Proteínas do Sistema Contráctil – Actina e Miosina6

I.3 – Hipótese de estudo8

II – MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 – Material9

II.1.1 – Material biológico9

II.1.2 – Reagentes9

II.2 – Isolamento e purificação de miosina a partir de músculo esquelético

II.2.1 – Quantificação de proteína pelo método de Bradford	11
II.2.2 – Avaliação do estado de pureza das proteínas isoladas	12
II.3 – Obtenção de F-actina a partir de G-actina	13
II.4 – Medição das actividades enzimáticas do subfragmento-1 de miosina	
II.4.1 – Método enzimático acoplado.....	14
III – RESULTADOS E DISCUSSÃO	
III.1 – Caracterização da miosina isolada	16
III.1.1 – Quantificação pelo método de Bradford	16
III.2 – Avaliação do estado de pureza da proteína	16
III.3 – Análise das actividades enzimáticas do S1 de miosina	17
III.4 – Efeito do PDC-V(V) na actividade enzimática do S1	18
IV – NOTAS CONCLUSIVAS	22
V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

I - INTRODUÇÃO

A Diabetes *mellitus* é uma patologia relativamente frequente na sociedade actual sendo referida como uma doença com grandes implicações a nível de saúde pública [1]. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde no ano de 2002 existiam 171 milhões de pessoas com diabetes em todo o Mundo [2], embora a prevalência seja maior em populações descendentes de Países do norte da Europa (Finlândia, Escócia, Escandinavos) [3], prevendo-se que em 2030 este número aumente para cerca de 366 milhões [2]. Este aumento deve-se, em grande parte, a alterações no estilo de vida marcado sobretudo pelo sedentarismo e obesidade. Esta doença é causada, fundamentalmente, por uma deficiência na secreção e/ou acção da hormona insulina [4]. Os compostos de vanádio integram um conjunto de novas drogas que têm vindo a ser apontadas como tendo um grande potencial para o tratamento da diabetes [5,6].

I.1 - Vanádio e diabetes

A primeira vez que um composto contendo vanádio foi descrito como tendo sido utilizado no tratamento da diabetes mellitus foi no ano de 1899 [7]. Em 2003, mais de um século depois, concluía-se com resultados promissores a primeira fase de um ensaio clínico, sem efeitos adversos aparentes. A questão que tem vindo a ser posta nos últimos anos de pesquisa é a seguinte: “Poderão os compostos de vanádio, que são tomados por via oral, substituir a insulina administrada intravenosamente?” [7,8].

I.1.1 - Diabetes *mellitus*

A diabetes *mellitus*, desordem endócrina mais comum [9,10], é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia devido a uma deficiência absoluta/relativa e/ou resistência à insulina [9]. Sem insulina, o fígado tem a sua capacidade de remoção de glucose do sangue diminuída [11]. Os sintomas patológicos vão desde um aumento do volume de urina (poliúria), da sede, do consumo de alimentos e perda de peso [10]. Pessoas com diabetes têm frequentemente problemas circulatórios que aumentam a tendência para desenvolver gangrena e aterosclerose [12]. Um valor de glucose no plasma acima de 126 mg/dL (7,0 mmol/L) é normalmente usado como diagnóstico [10]. De salientar também, que em ambos os tipos de diabetes a seguir descritos se observam níveis de secreção de glucagon anormalmente altos [12]. Portanto, a diabetes *mellitus* pode ser classificada em diabetes *mellitus* tipo I ou diabetes *mellitus* insulino-

dependente (DMID) e em diabetes *mellitus* tipo II ou diabetes *mellitus* não insulino-dependente (DMNID) [4,13].

I.1.1.1 - Diabetes *mellitus* tipo I

A diabetes *mellitus* tipo I ou diabetes *mellitus* insulino-dependente (DMID) afecta cerca de 3% dos indivíduos diabéticos e desenvolve-se precocemente, na maioria das vezes por volta dos 14 anos de idade sendo causada por uma diminuição acentuada da secreção da insulina [4,13]. Acredita-se que a destruição das células β pancreáticas responsáveis pela produção de insulina possa ser causada por infecções virais ou doenças auto-ímmunes, no entanto, a predisposição genética parece ser de grande importância no que diz respeito à determinação da susceptibilidade destas células à destruição [13]. Em alguns casos, essa incapacidade de produzir os níveis adequados de insulina pode também dever-se a uma mutação no gene da preproinsulina. Quanto ao tratamento deste tipo de diabetes, uma vez que as células β são incapazes de produzir uma quantidade adequada de insulina, esta tem de ser administrada intravenosamente [10].

I.1.1.2 - Diabetes *mellitus* tipo II

A diabetes *mellitus* tipo II ou diabetes *mellitus* não insulino-dependente (DMNID) é uma doença multifactorial já que o agente etiológico pode ser a dieta, factores ambientais ou factores genéticos [9]. Deve-se predominantemente a um estado de resistência aos efeitos metabólicos da insulina [4], sendo que se observam desordens no metabolismo proteico, lipídico e dos hidratos de carbono [9]. Afecta cerca de 97% dos indivíduos diabéticos, sendo portanto muito mais comum do que a DMID [4]. O seu início é mais tardio, desenvolvendo-se normalmente depois dos 45 anos de idade, no entanto esta tendência tem vindo a sofrer algumas alterações, verificando-se o aparecimento da patologia cada vez mais cedo [4,13]. Isto pode dever-se a alterações no estilo de vida e comportamento alimentar dos indivíduos uma vez que a obesidade constitui um dos principais factores de risco para a diabetes *mellitus* tipo II [13]. Neste tipo de diabetes os níveis de insulina no plasma são normais ou até mesmo mais elevados que o normal. O problema prende-se com o facto de os tecidos-alvo não responderem à hormona, frequentemente devido a defeitos no receptor da insulina [10]. Embora não seja claro, pensa-se que a produção excessiva de substâncias como a leptina diminua a resposta dos tecidos-alvo à insulina e seja, em parte, responsável pela

DMNID [4]. No que diz respeito ao tipo de tratamento deste tipo de diabetes, baseia-se sobretudo na prática de exercício físico, em restrições alimentares e administração de fármacos por via oral [10].

I.1.2 – Vanádio

O Vanádio está normalmente presente em concentrações muito baixas em todas as células de animais e plantas. Este composto pode ou não desempenhar um papel essencial no metabolismo normal dos mamíferos contudo, tem vindo cada vez mais a despertar atenções como potencial agente terapêutico [16].

O vanádio é um elemento químico (símbolo V) descoberto no México em 1801 por Andrés Manuel del Rio num mineral de chumbo. Em 1831, o sueco Nils Gabriel Sefstrom, durante as suas pesquisas numa mina de ferro, descobriu o elemento que del Rio inicialmente chamou de “pancrómio”, devido á sua alteração de cor consoante o estado de oxidação, e deu-lhe o nome de Vanádio (da Deusa Nórdica da Beleza *Vanadis*), pelo qual é conhecido actualmente [8]. Em 1867, Henry Enfield Roscoe, obteve pela primeira vez vanádio metálico através da redução de tricloreto de vanádio (VCl_3) com hidrogénio.

O vanádio é um metal de transição do grupo 5 e tem os seus complexos bem caracterizados, existindo nos estados de oxidação -3, -1, 0, +1, +2, +3, +4 e +5. Contudo, sob condições fisiológicas, apenas os estados de oxidação +5, +4 e +3 são termodinamicamente e cineticamente possíveis [8,16].

I.1.3.1 – Ensaio Clínico com compostos de vanádio

A insulina é uma hormona sinalizadora indispensável tanto para o metabolismo dos lípidos como para o dos hidratos de carbono. É secretada pelo pâncreas em resposta a altos níveis de glucose na circulação sanguínea aumentando a captação desta pelo fígado e intestinos, que resulta em produção e armazenamento de energia necessária ao funcionamento do organismo. Esta captação de glucose de uma forma específica para cada tipo de tecido pode ser duplicada por compostos de vanádio [16]. A insulina não pode ser administrada por via oral uma vez que, sendo uma proteína, a sua ingestão exógena não produz uma hormona biologicamente activa. Pelo contrário, os compostos

de vanádio (Fig. 3) podem ser tomados oralmente, potenciando desta forma a redução ou mesmo supressão da necessidade da injeção diária de insulina por parte de indivíduos diabéticos [16]. O uso de compostos de vanádio para o tratamento da diabetes mellitus estão no limiar de se tornar uma alternativa prática à insulina. O seu potencial terapêutico tem sido repetidamente demonstrado [17]. Ambos os sais inorgânicos V(V) e V(IV) têm sido consideravelmente testados como insulino-miméticos, inicialmente *in vitro* e posteriormente *in vivo*, numa variedade considerável de modelos experimentais de diabetes. O efeito insulino-mimético mais notável destes sais parece ser a redução dos níveis de glucose no sangue em pacientes com diabetes *mellitus* tipo I e tipo II [16].

Têm vindo a ser realizados vários ensaios clínicos do uso de vanádio na diabetes *mellitus* humana tipo I (DMID) e tipo II (DMNID), sendo sumarizados alguns resultados na tabela I.

Tabela I – Sumário dos principais efeitos verificados após o tratamento de pacientes diabéticos com vários sais de vanádio (adaptado de [7]).

Composto	Duração	Dose	Efeitos Verificados	
Ortovanadato de Sódio	2 semanas	125mg/dia	DMID	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da taxa média do metabolismo da glucose em 2 dos 5 indivíduos tratados
			DMNID	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da taxa média do metabolismo da glucose em 5 dos 5 indivíduos tratados
Sulfato de Vanadilo	3 semanas	100mg/dia	DMNID	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da sensibilidade à insulina • Diminuição da produção hepática de glucose • Aumento da taxa de eliminação da glucose
Vanadil	6 semanas	100mg/dia	DMNID	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da sensibilidade à insulina em 3 dos 5 indivíduos tratados • Produção basal de glucose hepática manteve-se inalterada

Dado o comportamento químico complexo do metal, trata-se de um elemento com toxicidade associada. Para além disso, tem uma fraca absorção gastro-intestinal comprometendo a entrada e eficácia do metal nos tecidos-alvo. Desta forma, em alternativa aos sais de vanádio, têm-se desenvolvido novos compostos de vanádio, vanadato e vanadilo, complexados com grupos orgânicos que

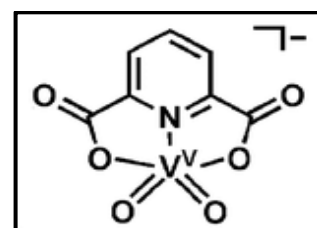


Figura 1 – Estrutura do PDC-V(V) (adaptado de [27])

potenciam a eficácia

insulinomimética do metal, aumentam a absorção e diminuem a toxicidade. O PDC-V(V) (Fig.1) foi o primeiro composto de vanádio que demonstrou ser capaz de ter uma acção anti-hiperglicemiante e de reversão da resistência à insulina com o metal na forma pentavalente [Crans et al, 2000].

I.1.4 - Mecanismo insulinomimético de compostos de Vanádio

O mecanismo de acção dos compostos de vanádio ainda não foi totalmente esclarecido. Embora alguns estudos sugiram a acção de sais de vanádio via activação do receptor tirosina cinase [8], outros demonstram que a sua acção não está envolvida com o receptor de insulina mas sim com a inibição de proteínas tirosina fosfatases (PTPs) [18]. Como um dos efeitos de maior importância dos sais de vanádio, demonstrou-se a indução do transportador de glucose GLUT 4 do seu compartimento intracelular para a superfície do adipócito, promovendo assim o aumento da captação de glicose [20]. Dados resultantes de estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o vanádio não afecta apenas um, mas sim vários aspectos na via de sinalização da insulina (tabela II) [8].

Tabela II - Efeitos sugeridos do vanádio na via de sinalização da insulina *in vitro* (adaptado de [8])

• Estimulação da autofosforilação dos receptores de insulina (IR)
• Aumento da actividade da tirosina Cinase do receptor de insulina
• Aumento da actividade da proteína tirosina Cinase
• Inibição da actividade da fosfotirosina fosfatase
• Aumento da ligação de insulina ao receptor

I.2 – Vanádio na Miosina

O vanádio, para além das suas propriedades insulinomiméticas é conhecido como sendo um inibidor específico das ATPases do tipo P (como a Ca^{2+} -ATPase) e da ATPase de miosina [21]. No presente estudo verificou-se se um complexo de vanádio com potenciais efeitos insulinomiméticos pode afectar a actividade da miosina, apresentando assim efeitos tóxicos a nível do músculo esquelético e cardíaco.

I.2.1 – Sistema Muscular

A força contráctil do músculo é originada por duas proteínas, a actina e a miosina, que estão organizadas em filamentos que sofrem interacções transientes e deslizam uma sobre a outra, originando desta forma a contração. A soma destas duas proteínas motoras representa cerca de 80% da massa proteica do músculo [14]. Cada fibra muscular contém várias centenas de milhar de miofibras, as quais são constituídas por cerca de 1500 filamentos de miosina e 3000 filamentos de actina [13].

I.2.1.1 – Proteínas do Sistema Contráctil – Actina e Miosina

A miosina foi reconhecida em 1939 por Engelhardt e a sua mulher Ljubimova em Moscovo como sendo a principal enzima no músculo responsável pela hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) [22].

A miosina é uma proteína constituída por 6 subunidades: 2 cadeias pesadas (230 KDa cada uma) e 4 cadeias leves (cada uma com 20 KDa). As cadeias pesadas constituem a maioria da estrutura. No seu terminal carboxilo, estão organizadas como hélices α umas enroladas sobre as outras. No terminal amina cada cadeia pesada tem um domínio globular que contém um local onde o ATP é hidrolisado. As cadeias leves estão associadas com os domínios globulares (Fig. 2) [11,14].

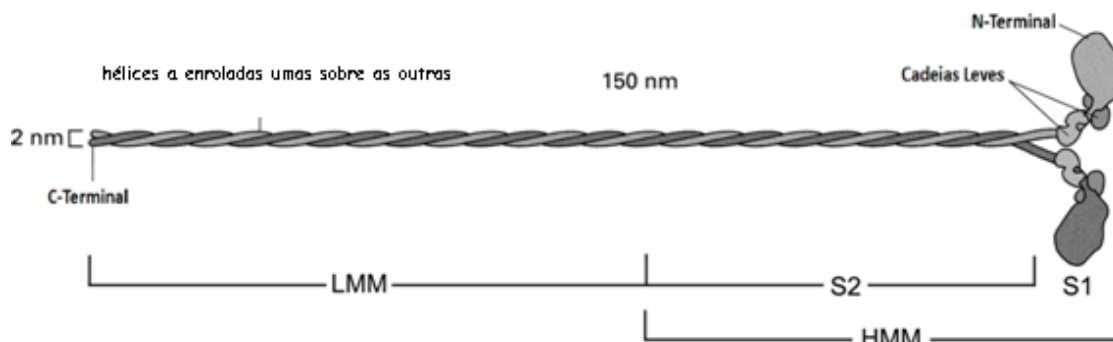


Figura 2 - Estrutura da molécula de miosina. S1 e S2 correspondem ao subfragmento-1 e 2 de miosina respectivamente. (adaptado de [23])

Esta proteína tem diversas funções tais como a formação do filamento, actividade ATPásica e combinação reversível com a actina. O uso de enzimas proteolíticas revela quais as regiões da molécula de miosina responsáveis por cada uma das diferentes funções [23]. Quando a miosina é tratada com a protease tripsina, a cauda fibrosa é clivada, dividindo a proteína em regiões chamados meromiosina leve (LMM) e

meromiosina pesada (HMM). O domínio globular chamado sub-fragmento 1 ou S1 é libertado da cabeça da meromiosina através da clivagem com papaína ou quimotripsina. O S1 é o domínio motor que torna possível a contração muscular. A meromiosina leve constitui a parte central dos filamentos enquanto o sub-fragmento 2 (S2) flexível permite que as cabeças de miosina se estendam até aos filamentos de actina [23]. Nas células musculares, as moléculas de miosina agregam-se formando uma estrutura denominada filamentos densos, que funcionam como âncora da unidade contráctil.

A segunda proteína muscular mais abundante no músculo esquelético é a actina [14]. Foi descoberta em 1942 por Straub [23]. No músculo, moléculas de actina monomérica, chamada G-actina (actina globular de 42 KDa) associam-se para formar um polímero longo denominado F-actina (actina filamentosa) [14]. Essa polimerização ocorre apenas na presença de sais, especialmente catiões divalentes [23]. Cada monómero de actina-G possui um local específico a que se podem ligar moléculas de miosina durante a contração muscular.

Quando a miosina interage com a actina, formam-se pontes cruzadas que fazem com que os filamentos finos deslizem sobre os filamentos grossos e induzam o movimento através da energia resultante da hidrólise de ATP - mecanismo de contração muscular. A

formação do complexo actomiosina origina uma ponte cruzada entre o filamento grosso e o fino. O ATP liga-se ao S1 de miosina (cabeça) e provoca a libertação da actina ligada. De seguida o centro activo da miosina fecha-se e ocorre a hidrólise do ATP fazendo com que a cabeça de miosina se mova e altere a sua orientação em relação

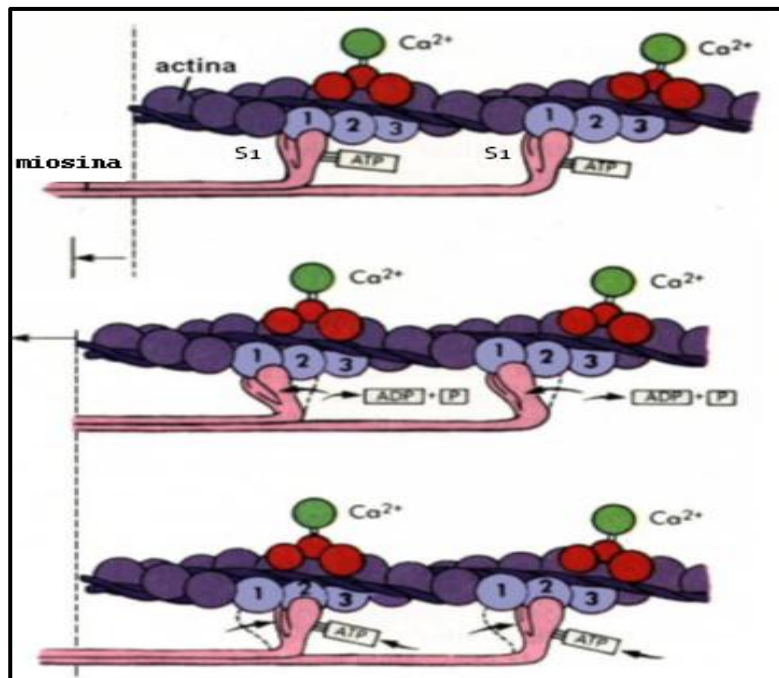


Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de contração muscular realizado pelo complexo actomiosina, processo auxiliado pela hidrólise do ATP (adaptado de [19]).

ao filamento fino. Posteriormente o S1 forma uma ligação fraca com um monómero de

actina e o fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise do ATP é libertado, o que provoca um novo aumento na afinidade do S1 para a actina. Por fim, gera-se então uma força que é responsável pelo regresso da conformação do S1 ao estado de repouso original (Fig. 3) [4,18].

I.3 – Hipótese de estudo

O estudo tem como principal objectivo avaliar se a miosina (isoforma tipo 2) de músculo esquelético pode ser considerada um potencial alvo celular de compostos de vanádio com acção insulínomimética. Para tal, determinou-se a acção do composto piridinocarboxilatodioxovanádio(V) na actividade ATPásica da miosina estimulada por actina.

II – MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 – Material

II.1.1 – Material biológico

De forma a extrair a proteína do músculo esquelético utilizou-se um coelho doméstico (Fig. 4).



Figura 4 - Coelho utilizado para obtenção da miosina

II.1.2 – Reagentes

Todos os reagentes utilizados ao longo da actividade experimental apresentam graus de pureza adequados aos ensaios realizados. O ATP, kit de marcadores padrão para electroforese, PMSF, quimotripsina, fosfoenolpiruvato e reagente de Bradford foram adquiridos à empresa SIGMA (St. Lours, MO). Já as enzimas lactato desidrogenase (LDH) e Piruvato Cinase (PK) foram adquiridas à empresa Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany).

II.2 – Isolamento e purificação de miosina a partir de músculo esquelético

Sacrificou-se um coelho doméstico com uma pancada forte e rápida na nuca, procedendo-se de imediato ao sangramento através de um golpe na artéria jugular e de seguida retirou-se a pele e colocou-se o animal numa tina com gelo. Posteriormente retirou-se o tecido conjuntivo (Fig. 5) e recolheu-se aproximadamente 270g de tecido muscular das partes dorsais e das pernas do animal. De seguida triturou-se o tecido e juntou-se num copo o triturado a 600 ml de solução Edsall-Weber (solução 0,02 M K_2CO_3 ; 0,04 M $KHCO_3$; 0,06 M KCl, pH 6.5 e 10 mM β -mercaptoetanol), homogeneizando-se durante 15 minutos. Centrifugou-se o preparado a 2000 g durante 20 minutos a 4 °C. Após a centrifugação recolheu-se o sobrenadante e filtrou-se o mesmo com lã de vidro de forma



Figura 5 – O animal foi colocado numa tina com gelo onde primeiramente se retirou o tecido conjuntivo como indicado pela seta.

a retirar os lípidos presentes (Fig. 6). Ao filtrado adicionou-se 14 volumes de H₂O destilada anteriormente refrigerada de forma a reduzir a força iónica da solução (salting out) e deixou-se repousar durante 4 horas (Fig. 7).



Figura 6 - Filtração em lã de vidro do sobrenadante resultante de centrifugação.



Figura 7 – Processo de salting out que resulta na precipitação da proteína (seta).

Ao fim das 4 horas retirou-se o sobrenadante com a ajuda de uma bomba de vácuo, homogeneizou-se e centrifugou-se o precipitado a 2000 g durante 20 minutos. Posteriormente recolheu-se o pellet, determinou-se o seu volume e elevou-se a força iónica a 0,6 M com solução B (100 mM Tris; 2 M KCl, pH 7.0) – salting in - sendo depois a solução homogeneizada com recurso a um potter. Por fim, reduziu-se novamente a força iónica para 0,04 M através da adição de água destilada, confirmou-se se o pH se encontrava entre 6-7 e adicionou-se 10 mM de β -mercaptoetanol, deixando-se precipitar durante a noite.

No dia seguinte, com a proteína já precipitada, removeu-se novamente o sobrenadante com o auxílio de uma bomba de vácuo e realizou-se nova centrifugação a 2000 g durante 20 minutos de forma a concentrar o precipitado. Posteriormente, recolheu-se o sedimento e ressuspendeu-se o mesmo em solução B para elevar novamente a força iónica a 0,6 M e realizou-se uma ultracentrifugação a 110000 g durante 60 minutos. Uma vez que os ensaios realizados requeriam apenas o subfragmento-1 de miosina preparou-se o mesmo por digestão quimotríptica. Terminada a centrifugação, filtrou-se o sobrenadante com lã de vidro e dialisou-se overnight o filtrado contra solução C (25



Figura 8 – A proteína foi dialisada de forma a precipitar por redução da força iónica.

mM Tris; 0,12 M KCl; 1 mM EDTA, pH 7.0). A inclusão de EDTA é essencial, uma vez que a substituição de EDTA por $MgCl_2$ resulta na produção de HMM em vez de S1. Quantificou-se a miosina após diálise pelo método de Bradford. Posteriormente equilibrou-se a suspensão de miosina à temperatura ambiente e digeriu-se a miosina com α -quimotripsina (0,1 mg/ml α -quimotripsina para 20 mg/ml miosina) durante 30 minutos. A adição de α -quimotripsina fez-se de forma cuidadosa, acompanhada de agitação da solução de miosina de forma a evitar a precipitação local e desnaturação da miosina pela solução ácida. A digestão foi depois parada por adição de 0,2 mM PMSF. De forma a separa produtos de digestão insolúveis do S1, ultracentrifugou-se durante 1 hora a 110000 g. Finalmente quantificou-se o sobrenadante pelo método de Bradford e armazenou-se em 10% sacarose e 2 mM β -mercaptoetanol a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

II.2.1 – Quantificação de proteína pelo método de Bradford

A concentração da proteína isolada foi determinada pelo método de Bradford. Este é um método colorimétrico que se baseia na formação de um complexo entre o corante Comassie Brilliant Blue (CBB) contido no reagente de Bradford e as proteínas em solução, o que provoca uma alteração no máximo de absorção do corante de 465nm para 595nm [17]. Apesar de ser um método rápido e sensível pode estar sujeito a alguns interferentes que reagem com o corante e aumentam a absorvência ou reagem com as proteínas impossibilitando a sua ligação ao corante, como é o caso dos polifenóis ou de reagentes como o SDS ou o Tween-20 [24].

Inicialmente prepararam-se 6 amostras de 600 μL de albumina de soro bovino (de 0 a 10 μg) de concentração conhecida ($[\text{BSA}]_{\text{stock}} = 1\text{ mg/mL}$) e adicionou-se 600 μL de Reagente de Bradford. Após a adição do Reagente de Bradford homogeneizaram-se as amostras no vórtex e deixou-se reagir durante 5 minutos à temperatura ambiente (Fig.9). Seguidamente mediu-se espectrofotometricamente a absorvência das amostras a 595 nm e construiu-se uma recta de calibração da $Ab_{595\text{nm}}$ em função da quantidade (μg) de BSA.



Figura 9 – Amostras de BSA após adição do reagente de Bradford.

A concentração da proteína isolada foi determinada em amostras de 600 μL , às quais foram adicionados 600 μL de reagente de Bradford. Previamente foi necessário recorrer a uma diluição das amostras. Após a medição da absorvência da amostra a 595 nm, a sua concentração foi estimada por interpolação a partir da recta de calibração anteriormente obtida.

II.2 - Avaliação do estado de pureza das proteínas isoladas

Após o isolamento e quantificação das proteínas é necessário avaliar se estas apresentam um estado de pureza adequado à realização dos ensaios experimentais.

O estado de pureza das proteínas isoladas foi verificado por SDS-PAGE. Este método consiste numa electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença do detergente aniónico dodecil sulfato de sódio (SDS). Em média, uma molécula de SDS liga-se a cada 2 resíduos de aminoácidos da proteína através do seu grupo alquilo, conferindo uma carga total negativa à proteína desnaturada proporcional à sua massa molecular (Fig. 10). Assim, as proteínas são separadas na electroforese quase exclusivamente com base no seu peso molecular podendo este ser posteriormente estimado [25].

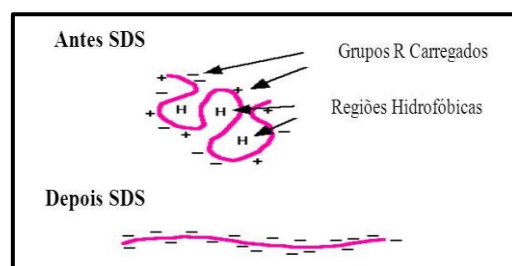


Figura 10 - Esquema ilustrativo do processo de desnaturação quando a proteína (linha rosa) é exposta ao detergente SDS (adaptado de [29])

Inicialmente ajustaram-se os vidros da cassette de polimerização de forma a evitar fugas de gel e colocou-se os mesmos no suporte. Preparou-se um gel Resolvente (12% acrilamida; Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; 0,1% (m/v) SDS; 0,05% (m/v) PSA; 0,033% (v/v) TEMED) e um Gel Concentrador (4% acrilamida; Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; 0,01% (m/v) SDS; 0,05% (m/v) PSA; 0,055% (v/v) TEMED). Sendo o PSA o catalisador da reacção de polimerização e o TEMED o iniciador da mesma, estes foram os últimos reagentes adicionados. Colocou-se o gel resolvente na cassette, cobriu-se o mesmo com H_2O destilada de forma a conferir uma superfície regular ao gel e a evitar a sua desidratação e deixou-se polimerizar durante aproximadamente 1 hora. Uma vez polimerizado, retirou-se a água superficial e adicionou-se o gel concentrador colocando-se o pente sobre o mesmo. Deixou-se novamente polimerizar cerca de 45 minutos à temperatura ambiente. Entretanto prepararam-se as amostras adicionando-se 25 μL de

proteína para um volume final de 100 μL , correspondendo a uma concentração proteica final de 1mg/mL, 25 μL de tampão de amostra (0,32 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 M β -mercaptoetanol; 18% SDS (m/v), 15% (v/v) glicerol e 0,1% azul bromofenol) e 50 μL de H_2O destilada sendo estas posteriormente homogeneizadas e fervidas durante 5 minutos. Uma vez concluída a polimerização do gel de concentração, removeu-se cuidadosamente o pente e colocou-se a cassette de polimerização na tina de electroforese, à qual se juntou a solução tampão da tina inferior (25 mM Tris; 192 mM glicina; 0,1% (m/v) SDS; 0,1 M acetato de sódio, pH 8,3) e a solução tampão da tina superior (25 mM Tris; 192 mM glicina e 0,1% (m/v) SDS, pH 8,3). De seguida carregou-se nos poços os marcadores de alta e baixa massa molecular bem como as amostras proteicas e deu-se início à electroforese com uma voltagem de 90V (Fig. 11).



Figura 11 – As amostras foram colocadas nos poços bem como as proteínas padrão (B) e a electroforese correu a 90 volts (A)

Após terminada a electroforese colocou-se o gel numa tina contendo solução corante (“Coomassie Brilliant Blue” com 45% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético glacial) e deixou-se corar durante aproximadamente 1 hora. Posteriormente colocou-se o gel numa tina com solução descorante (10% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético glacial), deixando-se descorar overnight.

Com os resultados obtidos construiu-se um gráfico do logaritmo da massa molecular dos marcadores de alto e baixo peso molecular em função das suas mobilidades relativas, obtendo-se uma recta de calibração. A massa molecular das proteínas isoladas foi determinada por interpolação das suas mobilidades relativas na recta de calibração.

II.3 – Obtenção de F-actina a partir de G-actina

A G-actina foi previamente obtida no laboratório como descrito em [26] e quantificada por absorvência directa a 290 nm. Para se conseguir F-actina recorreu-se à polimerização de G-actina através da adição da uma solução de 50 mM KCl, 1 mM

MgCl₂ e 1 mM ATP. Após a adição da solução homogeneizou-se e deixou-se polimerizar durante 4 horas à temperatura ambiente ou overnight a 4°C. A F-actina obtida foi armazenada a 4°C.

II.4 – Medição das actividades enzimáticas de S1

Utilizou-se o método de enzimas acopladas para se determinar as actividades Mg²⁺-ATPase basal e estimulada por F-actina. Este é um método contínuo e indirecto que se baseia na interconversão de NADH a NAD⁺. É possível monitorizar esta interconversão uma vez que ambas as formas oxidada e reduzida absorvem a um comprimento de onda de 260 nm mas apenas a forma reduzida absorve a 340 nm. Assim, nestas reacções, a enzima a ser analisada encontra-se acoplada a outra que envolve directamente o sistema NAD⁺/NADH por meio de um intermediário comum [25]. O ensaio realizou-se com base no método de enzimas acopladas piruvato cinase (PK)/lactato desidrogenase (LDH). Inicialmente, a enzima PK converte o fosfoenolpiruvato (PEP) e o ADP em piruvato e ATP. De seguida, a enzima LDH catalisa a reacção de conversão do piruvato em lactato, ocorrendo simultaneamente a oxidação do NADH a NAD⁺. O ATP anteriormente formado é hidrolisado em ADP+Pi pelo subfragmento-1 de miosina o que gera a formação de um ciclo como representado na figura 12.

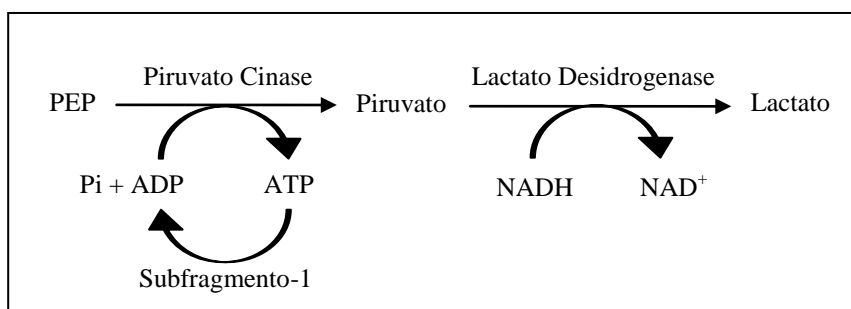


Figura 12 – Esquema representativo do ciclo de reacções do método enzimático acoplado utilizado para determinação da actividade da Mg²⁺-ATPase do S1. (Adaptado de [30])

De forma a determinar a actividade da Mg²⁺-ATPase do S1 adicionou-se numa cuvete de 1 mL 800µL de meio de reacção (25 mM Tris-HCl e 3,125 mM MgCl, pH 7.0), 10 µL de PEP ([fosfoenolpiruvato]_{stock} = 42 mM em 100 mM Tes/Tris), 10 µL de PK+LDH (1 mg/mL (1:1)), 15 µL de NADH ([NADH]_{stock} = 25 mM em 100 mM Tes/Tris), 0,05 mg/mL de S1 e juntou-se H₂O miliQ até perfazer o volume final de 1 mL. Registou-se a auto-oxidação do NADH e deu-se início à cinética através da adição

de 10 μL de ATP ($[\text{ATP}]_{\text{stock}} = 250\text{mM}$ em 1 M Tes/Tris). Registaram-se os valores de $\text{Abs}_{340\text{nm}}$ ao longo do tempo. Para a determinação da actividade da Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina adicionou-se à mistura anterior F-actina na proporção de 5:1 relativamente a S1 e registaram-se novamente os valores de $\text{Abs}_{340\text{nm}}$ ao longo do tempo. Os valores de absorvência a 340 nm foram convertidos para nmol de NADH oxidado utilizando a lei de Lambert-Beer ($\text{Abs} = \epsilon \cdot c \cdot l$), considerando o valor de extinção molar (ϵ) do NADH a 340nm igual a $6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Sabendo-se que cada mole de NADH oxidado corresponde a uma mole de ATP hidrolisado, e considerando a equação $\Delta\text{Abs}_{340\text{nm}} = 6,2 \text{ mDO} / \text{nmol NADH}$ obtiveram-se os valores de actividade na unidade pretendida.

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1 – Caracterização da miosina isolada

A proteína isolada foi quantificada e avaliada quanto ao seu estado de pureza de forma a verificar se apresenta qualidade adequada à realização dos ensaios experimentais.

III.1.1 - Quantificação pelo método de Bradford

Durante a purificação da proteína quantificou-se a mesma pelo método de Bradford, onde da interação da solução proteica com o reagente de Bradford resultou um produto com cor. Este produto foi posteriormente quantificado espectrofotometricamente sendo a quantidade de cor relacionada com a quantidade de proteína presente através da comparação com uma curva de calibração [24]. Obteve-se uma concentração de S1 de miosina de 4 mg/mL.

III.2 – Avaliação do estado de pureza das proteínas isoladas

O estado de pureza das proteínas isoladas foi analisado por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS) tal como descrito no ponto II.2 dos Materiais e Métodos, estando os resultados obtidos ilustrados na figura 13. Nos poços M1 e M2 encontram-se os marcadores de alto (36 – 205 kDa) e baixo (6,5 – 66 kDa) peso molecular, respectivamente. Nos poços 1 e 2 (contendo 120 µg e 60 µg de amostra de miosina isolada, respectivamente) é bem visível uma banda larga de aproximadamente 91 kDa, que corresponde ao Subfragmento-1 de miosina e outras duas, de menor intensidade correspondendo às cadeias leves essenciais da miosina LC1 (22,5 kDa) e LC3 (15,5 kDa) [15]. A cadeia regulatória de miosina, LC2, é eliminada durante o processo quimotriptico.

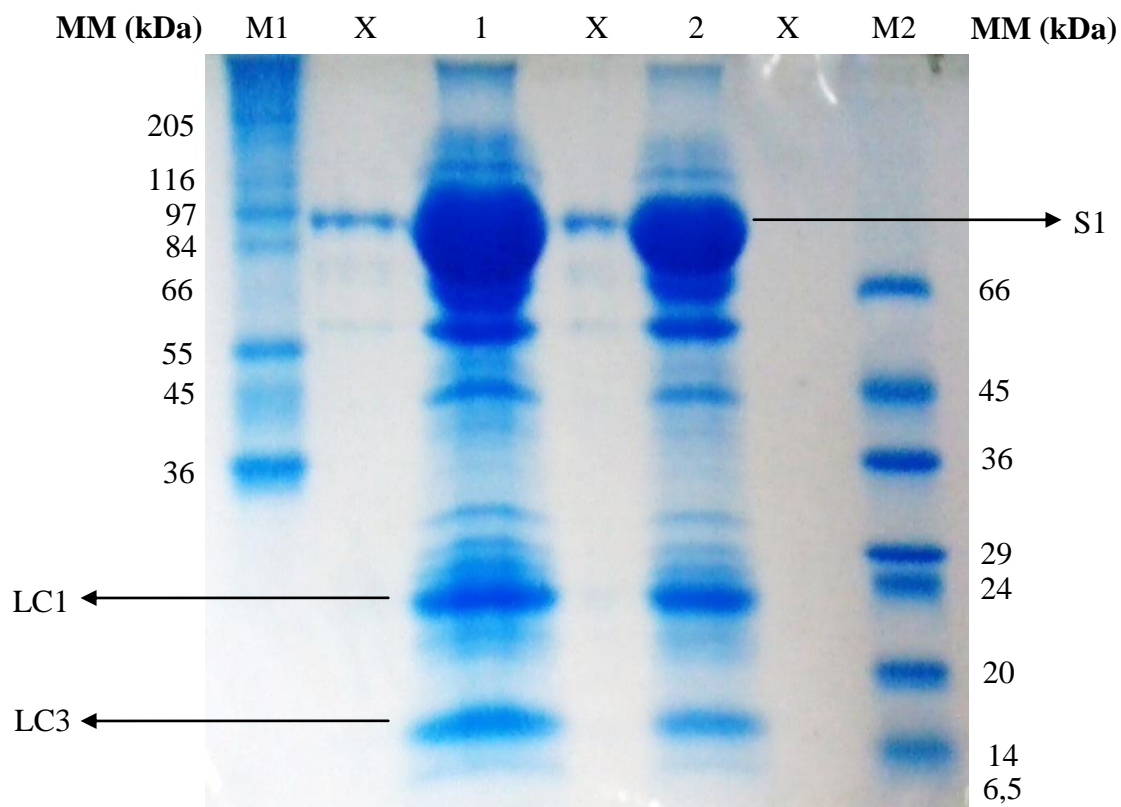


Figura 13 – Electroforese em gel de acrilamida (12%) em condições desnaturantes. Os poços M1 e M2 correspondem a 10 μ L dos marcadores de alto (36 – 205 kDa) e baixo (6,5 – 66 kDa) peso molecular respectivamente. O poço 1 e 2 contêm 120 μ g (30 μ L) e 60 μ g (15 μ L) da amostra de miosina isolada. Os poços X não contêm amostra.

Verifica-se que o isolamento foi eficaz uma vez que foram eliminadas com eficiência outras proteínas presentes no músculo esquelético, podendo então afirmar-se que o S1 de miosina muscular isolado apresenta elevado grau de pureza.

III.3 – Análise das actividades enzimáticas do S1 de miosina

A actividade da Mg^{2+} -ATPase do S1 foi medida espectrofotometricamente utilizando o ensaio enzimático acoplado Piruvato Cinase/Lactato Desidrogenase. Calcularam-se os valores da actividade basal da Mg^{2+} -ATPase como descrito na secção II.4 dos Materiais e Métodos, bem como os valores da actividade estimulada por F-actina (tabela III).

Tabela III – Valores de actividade da Mg^{2+} -ATPase do S1 de miosina basal e estimulada por F-actina. (n=6)

Actividade da Mg^{2+} -ATPase	nmol ATP/min.mgS1
Basal	84,94 \pm 17,49
Estimulada por F-actina	1073,9 \pm 412,18

Pode observar-se que a actividade da Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina é cerca de 13 vezes superior a actividade sua actividade basal. Ao analisar estas actividades comparativamente a estudos anteriores [27], verifica-se que ambas são muito semelhantes o que comprova a qualidade da preparação.

III.4 – Efeito do composto PDC-V(V) na actividade enzimática de S1 de miosina

A miosina (isoforma tipo 2) foi escolhida como modelo de estudo uma vez que esta é uma proteína bem caracterizada e cujo mecanismo enzimático já está bem definido. Para além disso, esta proteína já foi alvo de estudos com espécies mono e oligoméricas de vanádio. De forma a avaliar o efeito do composto de vanádio em estudo procedeu-se a uma titulação da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina com quatro adições sucessivas de PDC-V(V) até 2mM. Uma vez que existem indicações de que a espécie monomérica de vanádio interfere por clivagem do fosfoenolpiruvato com o método acoplado de enzimas utilizado, o composto em estudo foi previamente testado para garantir que não comprometia a funcionalidade do método (Fig.14).

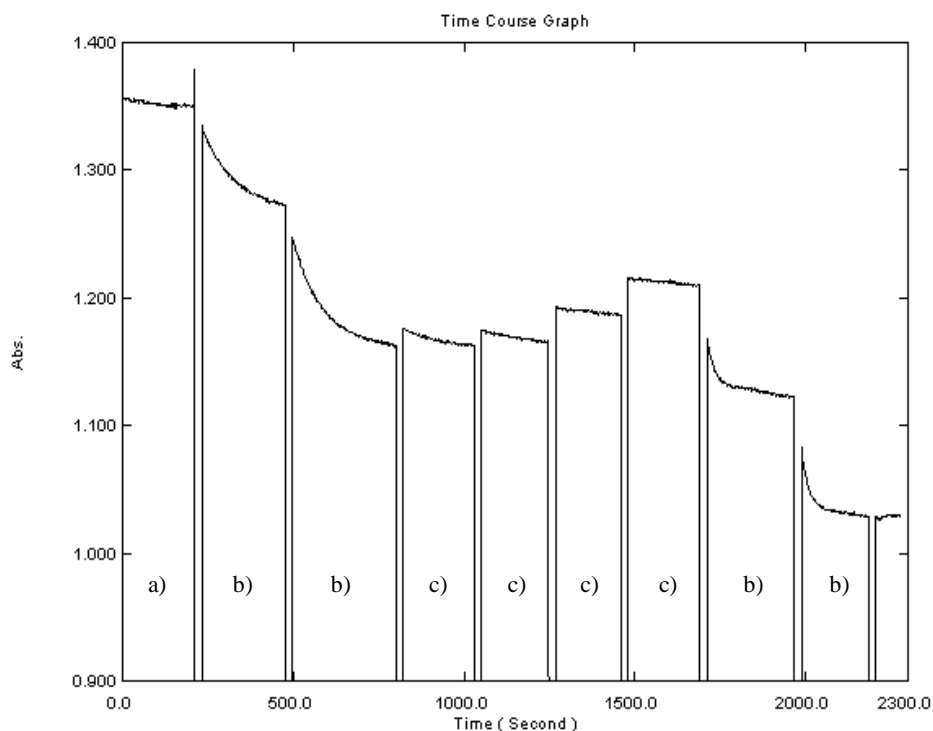


Figura 14 – Gráfico observado durante a verificação da funcionalidade do método enzimático acoplado. a) corresponde à auto-oxidação do NADH; b) corresponde ao salto observado aquando da adição de ADP; c) corresponde à titulação com várias concentrações de PDC-V(V) (0,5; 1; 1,5; 2 mM)

Para tal, preparou-se nova cuvette de 1 mL adicionando 800 μ L de meio de reacção (25 mM Tris-HCl e 3,125 mM MgCl, pH7.0), 10 μ L de PEP ($[\text{fosfoenolpiruvato}]_{\text{stock}} = 42$ mM em 100 mM Tes/Tris), 10 μ L de PK+LDH (1 mg/mL (1:1)) e 15 μ L de NADH ($[\text{NADH}]_{\text{stock}} = 25$ mM em 100 mM Tes/Tris). Deu-se início ao teste através da adição de 1,6 μ L ADP. Tal como esperado observou-se um salto no valor de absorvência correspondente à quantidade de ADP adicionada. Procedeu-se a nova adição de ADP e visualizou-se outro salto idêntico. Iniciou-se então a titulação com PDC-V(V) utilizando concentrações de composto até 2mM. Não se verificou qualquer alteração do declive (proveniente da auto-oxidação do NADH). Após terminada a titulação voltou-se a adicionar ADP por duas vezes e verificaram-se dois novos saltos de acordo com as quantidades. Isto sugere que o método é funcional não sofrendo qualquer interferência pelo composto em estudo. Visualizou-se ainda o espectro de absorção do composto que confirma uma absorção mínima a 340 nm, não sendo portanto relevante em termos de interferência com o método (Fig. 15).

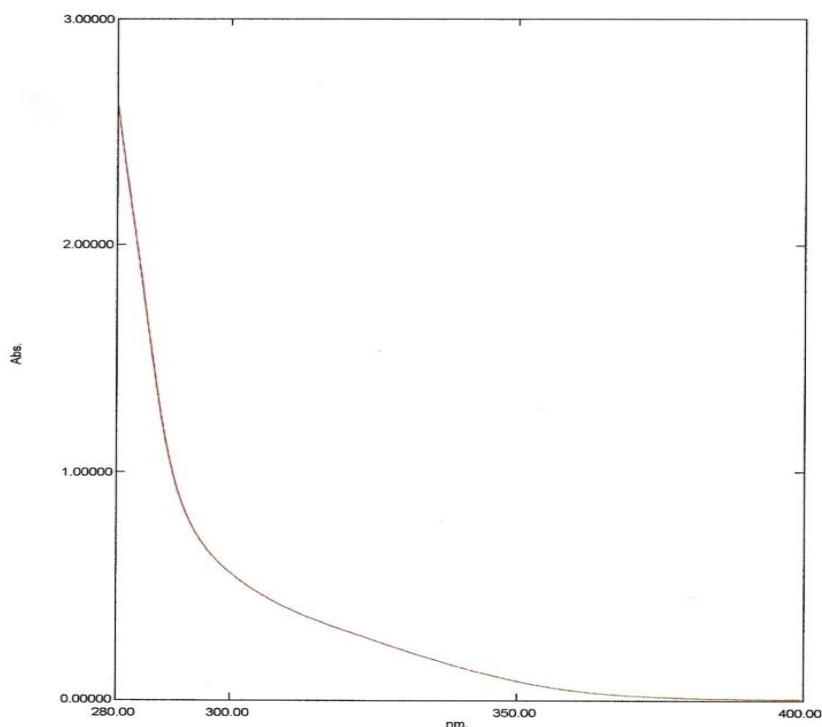


Figura 15 – Espectro de absorção do PDC-V(V)

A actividade ATPásica foi convertida em percentagem de actividade, comparando os valores obtidos com os observados na ausência do composto. Os parâmetros cinéticos (IC_{50} e I_{max}) foram determinados usando o programa Origin 6.0TM pelo ajuste

não-linear dos mínimos quadrados dos dados experimentais à equação hiperbólica do tipo Michaelis-Menten:

$$\frac{V}{V_0} = 100 - [I_{max} \cdot x / (IC_{50} + x)]$$

em que V_0 representa a actividade inicial na ausência de PDC-V(V), V representa a actividade na presença das concentrações indicadas de PDC-V(V), I_{max} corresponde ao valor máximo de inibição e IC_{50} corresponde à concentração de PDC-V(V) que reduz I_{max} a 50%. Verificou-se que o PDC-V(V) inibe a hidrólise de ATP a concentrações consideravelmente elevadas, com um valor de IC_{50} de $0,61 \pm 0,15$ mM e apresentando uma inibição máxima de $69,3 \pm 4,8\%$ (Fig. 16).

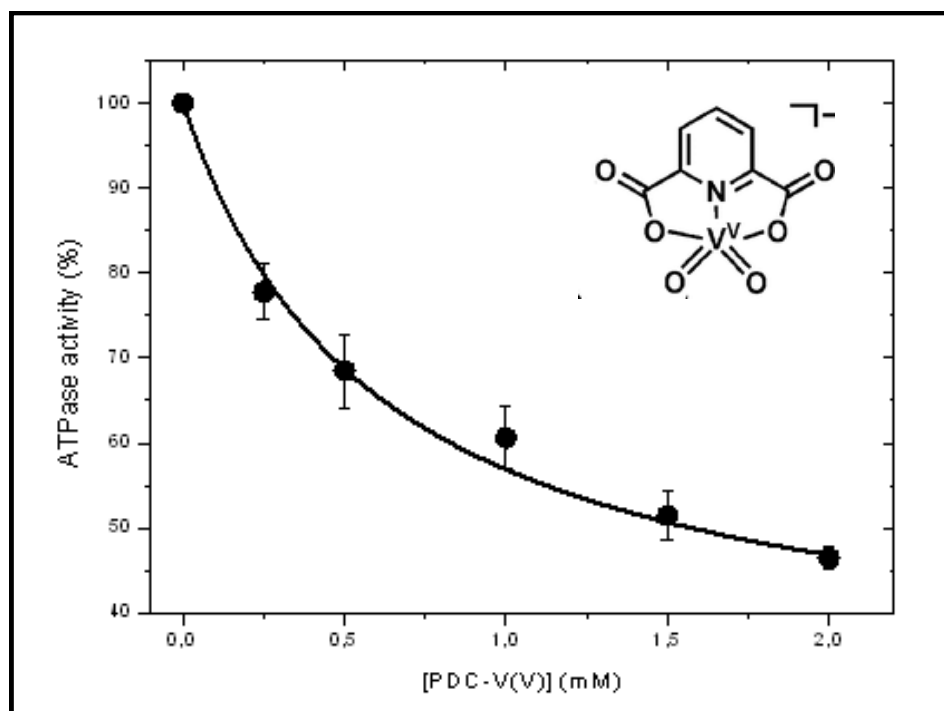


Figura 16 – Efeito de PDC na actividade da Mg^{2+} -ATPase de S1 estimulada por actina. A titulação foi realizada num meio contendo 25 mM Tris-HC, 3,125 mM $MgCl$ (pH 7,0), 0,42 mM fosfoenolpiruvato, 0,375 mM NADH, 2,5 mM ATP, PK/LDH numa proporção 1:1 e 0,05 mg/ml S1. As concentrações de PDC-V(V) variaram como indicado em abcissa.

A inibição é observada em concentrações de composto muito superiores aos que se observou para o mesmo composto na actividade da cálcio ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de coelho, em que o valor de IC_{50} é de 25 μM

[28]. Neste caso, um valor de IC_{50} na ordem dos 600 μM é um valor bastante elevado o que pode sugerir que o composto se esteja a decompor em espécies oligoméricas previamente descritas como potentes inibidores da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina. O PDC-V(V) utilizado foi preparado a temperatura ambiente e armazenado a 4°C pelo que pode também ter sofrido algum tipo de decomposição causado por variações térmicas, uma vez que a solução é muito sensível à temperatura [28]. Assim, o que se pode estar a observar é o efeito de espécies oligoméricas de vanádio, como vanádio tetramérico (V₄) e não o do composto PDC-V(V).

Sugere-se como possíveis estudos futuros a caracterização do composto por espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear), primeiramente ao longo do tempo nas mesmas condições em que foi utilizado para avaliar a estabilidade de composto e, de seguida, na presença e ausência de proteína para avaliar a interacção PDC-V(V)/Proteína. Para que haja inibição enzimática é necessário que o composto apresente especificidade para locais críticos de forma a interferir com a função e estrutura da proteína.

Se se vier a demonstrar que esta inibição se deve realmente ao PDC-V(V), pode então afirmar-se que a utilização deste composto no tratamento da diabetes *mellitus* não afecta de forma relevante a actividade da Mg^{2+} -ATP do S1 de miosina, não constituindo esta um potencial alvo celular destes compostos.

IV – NOTAS CONCLUSIVAS

A diabetes mellitus é uma patologia cuja frequência tem vindo a aumentar significativamente ao longo dos tempos. Assim, cada vez mais se reúnem esforços para tentar encontrar alternativas terapêuticas para esta doença. A insulina é vulgarmente utilizada como terapia para a diabetes mellitus no entanto, esta não pode ser administrada por via oral. De forma a minimizar ou mesmo suprimir a necessidade de administração intravenosa diária desta hormona por parte de indivíduos diabéticos, têm vindo a ser desenvolvidos compostos que, uma vez tomados oralmente, possam combater a falha na secreção e/ou acção de insulina, característica desta patologia. Para terem uma utilidade biológica apreciável, os compostos propostos em substituição à insulina devem reunir algumas características, tais como: possuírem uma actividade oral, uma janela óptima de efeito farmacológico, captação tecidual e um padrão consistente de absorção/retenção a baixa dose. Diversos compostos de vanádio têm vindo a ser testados, com resultados positivos, como insulínomiméticos, nomeadamente o PDC-V(V). No entanto para além da sua acção como insulínomiméticos estes são também fortes inibidores enzimáticos. Com base nos estudos efectuados verificou-se que a concentração de PDC-V(V) necessário para inibir 50% da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina é cerca de 30 vezes superior à necessária para realizar o mesmo efeito na cálcio ATPase de retículo sarcoplasmático. Assim, pode concluir-se que a miosina de músculo esquelético não será um alvo celular preferencial do PDC-V(V).

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Keller, U.; *From obesity to diabetes*. Int J Vitam Nutr Res. (2006) 76(4):172-7
- [2] World Health Organization (2006). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. Geneva: World Health Organization
- [3] Jacqueline, J.L.; Blanchfield, D.S. (2002). *The Gale Encyclopedia of Medicine*. Second Edition, Gale Group.
- [4] Tate, P.; Seeley, R.; Stephens, T. (2005). *Anatomia e Fisiologia*. Sexta Edição. Lusodidacta
- [5] Moller, D.; *New drug targets for type 2 and the metabolic syndrome*. Nature. (2001) 414:821-827
- [6] Bailey, C.; *Potential new treatments for type 2 diabetes*. Trends in Pharmacological Sciences. (2000) 21:259-265.
- [7] Thompson, K.; Orvig, C.; *Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I*; Journal of Inorganic Biochemistry. (2006) 100:1925-1935.
- [8] Poucheret, P. *et al.*; *Vanadium and diabetes*; Molecular and Cellular Biochemistry. (1998) 188:73-80.
- [9] Ahmed, N.; Dawson, M.; Smith, C. and Wood, E. (2007). *Biology of Disease*. First Edition. Taylor & Francis.
- [10] Porth, C.M. (2006). *Essentials of Pathophysiology Concept Of Altered Health States*. Second Edition, Lippincott Williams & Wilkins.
- [11] Devlin, T. (2006). *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. Sixth Edition. Wiley-Liss
- [12] Fox, S. (2003). *Fox Human Physiology*, Eighth Edition. The McGraw–Hill Companies

[13] Guyton & Hall (2000) *Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças*. 6ª Edição, Nova Guanabara.

[14] Nelson, D.; Cox, M.(2008) *Lehninger Principles Of Biochemistry*. Fifth Edition; W.H.FREEMAN & CO LTD

[15] Voet, J.; Voet, D. (2004) *Biochemistry*. Third Edition, John Wiley and Son s LTD

[16] Orvig, C; Thompson, KH.; Battell, M.; McNeill, JH.; *Vanadium Compounds as Insulin Mimics*; Met Ions Biol Syst. (1995) 31:575-94.

[17] Thompson, KH.; Lichter, J.; LeBel, C.; Scaife, MC.; McNeill, JH.; Orvig, C.; *Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future*; Journal of Inorganic Biochemistry; (2009) 103(4):554-8.

[18] D'Onofrio, F.; Le MQ; Chiasson, JL.; Srivastava, AK.; *Activation of mitogen activated protein (MAP) kinases by vanadate is independent of insulin receptor autophosphorylation*: FEBS Lett; (1994) 340(3):269-75

[19] <http://www.ibb.unesp.br/> , Consultado em 30/06/2010

[20] Pâquet, MR.; Romanek, RJ.; Sargeant, RJ.; *Vanadate induces the recruitment of GLUT-4 glucose transporter to the plasma membrane of rat adipocytes*. Molecular and Cellular Biochemistry. (1992) 109(2):149-55.

[21] Aureliano, M.; Crans, DC.; *Decavanadate (V10 O28 6-) and oxovanadates: oxometalates with many biological activities*. Journal of Inorganic Biochemistry. (2009) 103(4):536-46.

[22] Ebashi, S.; Ohtsuki, I. (2007) *Regulatory mechanisms of striated muscle contraction – Advances in experimental medicine and biology*. First Edition, Springer.

[23] Szent-Györgyi, A.; *The Early History of the Biochemistry of Muscle Contraction*. J. Gen. Physiol. (2004) 123: 631–641.

[24] Zaia,D.; Zaia, C.; Lichtig, J.; *Determination of total protein by spectrophotometry: advantage and disadvantages of proposed methods*. Quimica Nova (1998) 21(6):787-793

[25] Wilson, K.; Walker, J. (2000) *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Fifth edition; Cambridge University Press.

[26] Ramos, S.; Manuel, M.; Tiago, T.; Duarte, R.; Martins, J.; Gutiérrez-Merino, C.; Moura, JJ.; Aureliano, M. *Decavanadate interactions with actin: Inhibition of G-actin polymerization and stabilization of decameric vanadate*. *Journal of Inorganic Biochemistry*. (2006) 100(11):1734-43

[27] Tiago, T. *et al.*; *Inhibition of skeletal muscle S1-myosin ATPase by peroxynitrite*; *Journal of Inorganic Biochemistry*; (2006) 45(11):3794-804

[28] Aureliano, M. *et al.*; *Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase is Inhibited by Organic Vanadium Coordination Compound: Pyridine-2,6-dicarboxylatodioxovanadium(V), BMOV, and an Amavadine Analogue*; *Journal of Inorganic Biochemistry*; (2008) 47(13):5677-84.

[29] www.bio.davidson.edu, consultado em 01/07/2010

[30] Bagshaw, R. (1982) *Muscle Contraction*. In: *Outlines studies in biology*. Edit. Chapman and Hall, London.