



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

SUSANA JORGE GUERREIRO RAMOS

**EFEITO DE VANÁDIO NA FUNÇÃO FISIOLÓGICA E NA
ESTRUTURA DE ACTINA**

LISBOA

2011

Nº DE ARQUIVO:

"COPYRIGHT":



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

SUSANA JORGE GUERREIRO RAMOS

EFEITO DE VANÁDIO NA FUNÇÃO FISIOLÓGICA E NA ESTRUTURA DE ACTINA

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia

LISBOA

2011

**“A escrita exige mais escrita. Escrever, o acto de
escrever, exige continuidade.”**

Al Berto [1948-1997]

Agradecimentos

A conclusão desta dissertação não teria sido possível sem a preciosa contribuição de algumas pessoas a quem gostaria de expressar o meu agradecimento.

Ao Professor Aureliano Alves, agradeço os ensinamentos que levarei sempre comigo e todas as conversas em que me fez crescer, científica e pessoalmente. Consigo aprendi que se pode sempre seguir em frente porque nunca é tarde para se começar de novo. Este trabalho não teria sido possível sem os seus conselhos, apoio incondicional e Amizade. Muito Obrigada por tudo!

Ao Professor José Moura, por ter aceitado orientar esta tese e por tão bem me ter recebido no seu laboratório. Por me ter mostrado tanto para lá da ciência, pela sua visão tão alargada e por todas as viagens partilhadas, um sincero obrigada!

Ao (Doutor) Rui Duarte, por ter sido o elo de ligação que me permitiu “rumar a Norte”, por ter garantido a minha total integração e pela ajuda que me prestou. *A tua ausência é um lugar estranho..*

À Professora Isabel Moura, por me ter acolhido no seu laboratório, o que me permitiu dispor das melhores condições de trabalho. Agradeço, também, a simpatia que sempre me dispensou.

Aos (Professores) Alice Pereira e Pedro Tavares, por me terem recebido tão bem no vosso grupo e por todo o material e equipamento que sempre me disponibilizaram, sem reservas. Agradeço, sobretudo, os almoços (tantos!), os conselhos, as palavras de encorajamento e o carinho com que sempre me trataram.

Ao Professor Jorge Martins (CBME/UAlg), por ter disponibilizado o espectrofluorímetro com que foram realizados os estudos de dispersão de luz e por todas as respostas que me foi dando.

Também da Universidade do Algarve, uma palavra de reconhecimento à (Doutora) Teresa Tiago, pela disponibilidade total; e ao Miguel e à Dalila, por me terem feito sentir sempre em casa e pelo vosso sentido de ajuda.

À (Dra.) M^a. do Rosário Caras Altas, por todo o apoio prestado na aquisição dos espectros de ⁵¹V-RMN. A sua disponibilidade total, simpatia contagiante e o carinho que sempre me dispensou contribuíram grandemente para tornar os meus dias mais agradáveis. Um profundo obrigada!

A todos aqueles com quem tive o prazer de partilhar o laboratório – Alexandra Serra, Ana Teresa Lopes, Carlos Martins, Célia Silveira, Cristina Timóteo, Cristiano Mota, Isabel Ribau, Márcia Guilherme, Marta Carepo, os “compadres” Pablo Gonzalez e Gabi Rivas, Patrícia Paes de Sousa, Raquel Grazina e Sofia Pauleta. Ao Simone, Jacopo, Florina, Sónia e Leonardo agradeço, também, os momentos divertidos que vivemos no 407-B.

Um agradecimento especial ao Américo, por tudo o que me ensinou sobre Biologia Molecular e aqui ficou por contar; à Cristina Cordas, pelos conselhos experientes e entreadajuda disponibilizados; ao Tiago Guerra, pela magnífica partilha de gabinete e de vida; e à Luísa Maia, por me ter aconselhado de forma tão cuidadosa e atenta, por ter ouvido os meus desabafos sempre com uma palavra de encorajamento, pelos chás e pelo *sush!*

À Diana e à Inês, por terem tornado estes quarto anos tão mais agradáveis, pela vossa companhia, pelas nossas conversas e pelo carinho. Levo-vos comigo..

Ao Filipe Folgosa e ao Rui Almeida, por todo o apoio prestado na aquisição, tratamento e interpretação dos espectros de RPE e RMN, respectivamente, e pela revisão cuidada que fizeram desta tese. Por todas as discussões científicas (e das outras!) que me permitiram ver de outra perspectiva. Pelos momentos partilhados no laboratório, e fora dele. Pelo carinho com que me trataram quando estava grávida e por se terem manifestado uns “tios” tão competentes. A ambos, à Leonor e à Sílvia agradeço, sobretudo, a Amizade!

Ao Ângelo, à Vanessa, ao Ricardo e à Lurdes, ao Luís e à Liliana, agradeço serem uma presença constante na minha vida e os melhores Amigos que alguém pode querer ter!

Aos meus sogros, Carminha e Zé, e ao meu cinhado Nuno, por terem sido um suporte fundamental nesta caminhada, por todas as vezes em que a vossa disponibilidade me permitiu não estar presente, fazendo das minhas ausências um sítio seguro para o meu filho, por todas os mimos que me deram (e dão!). Um sincero Obrigada!

Aos meus pais, por serem exemplo de coragem e determinação, por me terem ensinado que o destino somos nós que o construímos, por me terem mostrado que é possível “ser nossa a Terra inteira e tudo o que ela tem”. Por terem sempre acreditado, mesmo quando eu já tinha desistido. Um profundo Obrigada!

À mana Catarina, pela cumplicidade partilhada, preocupação constante e apoio sem reservas. Companheira de vida, para a vida, és a menina dos meus olhos.

Ao João, por me fazeres sorrir e ser uma uma pessoa melhor, pelo Amor incondicional, com tantas e variadíssimas formas de se expressar. Por todas as vezes em que foste Pai e Mãe, tão uno e consistente como se fôssemos os dois em simultâneo. Obrigada simplesmente por existires ao meu lado e tão bem me completares!

Ao Miguel, por ser a minha melhor parte, porque o seu sorriso me ajuda a colocar tudo em perspectiva. Pelas ausências indesejadas, pelas impaciências, pelas noites em que não te aconcheguei, pelo tempo que te fui roubando.. “Meu filho, meu Tesouro!”

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, através de uma Bolsa de Doutoramento com a referência SFRH/BD/2006/29716.

Publicações

Parte dos resultados descritos na presente dissertação foram publicados em revistas internacionais com arbitragem científica:

1. **Ramos, S.**, M. Manuel, T. Tiago, R. O. Duarte, J. Martins, C. Gutiérrez-Merino, J. J. G. Moura, M. Aureliano (2006) “Decavanadate interactions with actin: inhibition of G-actin polymerization and stabilization of decameric vanadate” *J. Inorg. Biochem.* 100:1734-1743.
 - Materiais e métodos: Capítulos II, III e IV;
 - Resultados: Capítulos III e IV.

2. **Ramos, S.**, R. O. Duarte, J. J. G. Moura, M. Aureliano (2009) “Decavanadate interactions with actin: cysteine oxidation and vanadyl formation” *Dalton Trans.* 7985-7994.
 - Materiais e métodos: Capítulos II, III, IV e V;
 - Resultados: Capítulos III, IV e V.

3. **Ramos S.**, J. J. G. Moura, M. (2010) “Actin as a potential target for decavanadate” *J. Inorg. Biochem.* 104:1234-1239.
 - Materiais e métodos: Capítulos II, III e V;
 - Resultados: Capítulo V;

4. **Ramos, S.**, J. J. G. Moura, M. Aureliano (2011) “Vanadyl binding to actin induces conformational changes and prevents actin polymerization: a vanadium target with many cellular implications” *J. Inorg. Biochem.* (accepted).
 - Materiais e métodos: Capítulos II, III, IV e V;
 - Resultados: Capítulos IV e V.

Resumo

Nesta dissertação, analisa-se o efeito de diferentes espécies de vanádio na estrutura e função da actina (42 kDa), isolada de músculo esquelético de coelho.

Os efeitos putativos das diferentes espécies de vanádio em solução não se encontram devidamente esclarecidos, pelo que é fundamental determinar qual a composição das soluções utilizadas (metavanadato e decavanadato, ambas com V(V)). Assim, e recorrendo a ^{51}V -RMN, verificou-se que a solução de metavanadato é constituída pelas espécies monomérica (V_1), dimérica (V_2), tetramérica (V_4) e pentamérica (V_5) de vanadato, sendo a sua concentração dependente da concentração em oxovanádio(V) total, enquanto que numa solução de decavanadato existem, fundamentalmente, as espécies decamérica, V_{10} (aprox. 10 % da concentração em oxovanádio(V) total), e V_1 . A estabilidade de V_{10} foi analisada por UV-visível, tendo-se concluído que o tempo de meia-vida para a reacção de decomposição é de cerca de 5 horas, sendo a sua energia de activação de $63,4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Estabelecidas as condições óptimas que favoreciam a interacção entre o V_{10} e a actina, da titulação por RMN de uma solução 5 mM decavanadato com G-actina, resultou um $V_{50} = 25,42 \pm 2,32 \text{ }\mu\text{M}$ G-actina. A partir da titulação de uma solução de actina com VOSO_4 , por RPE, determinaram-se os valores da constante de dissociação para a G-actina ($K_d = 7,48 \pm 1,11 \text{ }\mu\text{M VOSO}_4$) e F-actina ($43,05 \pm 5,34 \text{ }\mu\text{M VOSO}_4$).

O efeito do vanádio na função da actina foi avaliado com recurso ao método de enzimas acoplados, tendo-se verificado que o decavanadato diminui a capacidade de F-actina estimular a actividade fisiológica de subfragmento-1 de miosina em 70% ($\text{IC}_{50} = 8,04 \pm 1,49 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadato), enquanto o metavanadato e o VOSO_4 produzem uma inibição de apenas 15 %, aproximadamente. Recorrendo à técnica de dispersão de luz, observou-se, ainda, que o decavanadato inibia a polimerização da G-actina ($\text{IC}_{50} = 17 \pm 0,2$ e $370 \pm 0,72 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadato), sendo o efeito do oxovanádio(IV) muito similar, observando-se valores de $\text{IC}_{50} = 15,1 \pm 0,3$ e $335,8 \pm 6,3 \text{ }\mu\text{M VOSO}_4$). O metavanadato inibe a polimerização da actina apenas para concentrações superiores a 2 mM. O efeito na despolimerização da F-actina foi menos acentuado, com inibições de 20 e 35 % para o metavanadato ($\text{IC}_{50} = 2,7 \pm 0,3 \text{ mM}$) e o decavanadato ($\text{IC}_{50} = 1,40 \pm 0,09 \text{ mM}$ decavanadato), respectivamente, enquanto o VOSO_4 conduz a um ligeiro aumento da dispersão de luz.

Verificou-se que $1300 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadato e $500 \text{ }\mu\text{M VOSO}_4$ diminuem a fluorescência intrínseca de G-actina em 30 e 100 %, respectivamente, sendo o efeito na F-actina mais pronunciado na presença de decavanadato (100 %) e menor na presença de VOSO_4 (70 %), enquanto que para a solução de metavanadato a diminuição se observa apenas para concentrações superiores a $600 \text{ }\mu\text{M}$, tanto para a G-actina (70 %) como para a F-actina (100 %). No estudo da interacção de oxidovanádio(IV) com a actina, determinaram-se, a partir dos valores das constantes de Stern-Volmer os valores de K_d , tendo-se obtido valores semelhantes ao registados pelos estudos de RPE acima indicados. Além disso, determinou-se o valor do parâmetro A , definido como I_{320}/I_{365} , verificando-se que a actina nativa apresentava um valor de $A = 2,6$, enquanto que a presença de decavanadato e VOSO_4 deslocava o valor de A para 1,4, sugerindo que a actina se encontra inactivada. A superfície hidrofóbica da actina foi determinada com recurso à sonda ANSA, observando-se que a presença de decavanadato contribuía para o seu aumento, na G-actina (2,6 vezes) e na F-actina (1,5 vezes), enquanto que para a solução de metavanadato não se observou qualquer efeito. Por seu turno, a superfície hidrofóbica da G-actina diminui em cerca de 15 % na presença de VOSO_4 ($\text{IC}_{50} = 22,26 \pm 2,09 \text{ }\mu\text{M VOSO}_4$), não se observando qualquer efeito para a F-actina. O local de ligação de nucleótidos foi avaliado com recurso a ϵ -ATP, tendo-se verificado que a presença de decavanadato e VOSO_4 alteram o valor da constante de velocidade da reacção de troca entre o ATP e a actina ($k = 6,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $4,47 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para decavanadato e VOSO_4 , respectivamente). Além disso, avaliou-se o estado redox dos resíduos cisteína, tendo-se verificado que a presença de decavanadato conduz à oxidação de um dos resíduos localizados no interior hidrofóbico da G-actina ($\text{IC}_{50} = 7,8 \pm 0,2 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadato), enquanto que na F-actina para além deste ($\text{IC}_{50} = 20,9 \pm 0,2 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadato) se observou, também, a oxidação do resíduo Cys-374, exposto ao solvente ($\text{IC}_{50} = 11,2 \pm 0,1 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadato). A concomitante redução de vanadato, analisada por RPE, foi apenas observada para a solução de decavanadato. Finalmente, verificou-se, por ^1H -RMN, alterações na estrutura da actina após interacção com o decavanadato e o oxidovanádio(IV).

A presença de ATP no meio reaccional previne a interacção entre a actina e o vanádio, comprovada em todos os resultados acima apresentados.

Abstract

In this dissertation, the effect of different vanadium species on actin (isolated from rabbit skeletal muscle; 42 kDa) function and structure is analyzed.

The putative effects of the different vanadium species in solution are not well established. Therefore, it is crucial to determine the composition of the solutions used (metavanadate and decavanadate, both with V(V)). Thus, using ^{51}V -NMR, it was verified that metavanadate is constituted by monomeric (V_1), dimeric (V_2), tetrameric (V_4) e pentameric (V_5) vanadate species, being their concentration dependent on the total vanadate concentration, while in decavanadate there are, essentially, the decameric, V_{10} (aprox. 10 % of the total oxovanadium(V) concentration) and monomeric oxovanadium(V) species. The V_{10} stability was analyzed by UV-visible, and it was concluded that the half-life time for this species is about 5 hours, with an activation energy of $63,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ for the decomposition reaction. Established the conditions favoring the V_{10} -actin interaction, from NMR titration of a 5 mM decavanadate solution with G-actin, a $V_{50} = 25,42 \pm 2,32 \text{ }\mu\text{M}$ G-actin was obtained. Based on actin titration with VOSO_4 , followed by EPR, the dissociation constants to G-actin ($K_d = 7,48 \pm 1,11 \text{ }\mu\text{M}$ VOSO_4) and F-actin ($43,05 \pm 5,34 \text{ }\mu\text{M}$ VOSO_4) were determined.

The effect of vanadium on actin structure was evaluated by coupled enzymes assay. It was verified that decavanadate decreases in 70 % the F-actin ability to stimulate myosin-subfragment-1 physiologic activity ($\text{IC}_{50} = 8,04 \pm 1,49 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadate), while metavanadate and VOSO_4 have a minor effect, inhibiting it only in 15 %. Using the light-scattering technique, it was also observed that decavanadate inhibits G-actin polymerization ($\text{IC}_{50} = 17 \pm 0,2$ e $370 \pm 0,72 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadate), being the oxovanadium(IV) effect very similar ($\text{IC}_{50} = 15,1 \pm 0,3$ e $335,8 \pm 6,3 \text{ }\mu\text{M}$ VOSO_4). Metavanadate only inhibits actin polymerization for concentrations above 2 mM. For both metavanadate ($\text{IC}_{50} = 2,7 \pm 0,3 \text{ mM}$) and decavanadate ($\text{IC}_{50} = 1,40 \pm 0,09 \text{ mM}$ decavanadate) the effect on actin depolymerization is less pronounced, with inhibitions of 20 and 35 %, respectively, whereas VOSO_4 leads to a slight increase in light scattering.

It was observed that 1300 μM decavanadate e 500 μM VOSO_4 decrease G-actin intrinsic fluorescence by 30 and 100 %, respectively, being the effect on F-actin more pronounced in decavanadate presence (100 %) and minor with VOSO_4 (70 %), while for metavanadate solution a decreasing was observed only for concentrations above 600 μM , for both G-actin (70 %) and F-actin (100 %). In oxovanadium(IV) interaction study with actin, the K_d values were obtained based on Stern-Volmer constants, being the former very similar to those obtained by EPR. Moreover, the parameter A, defined as I_{320}/I_{365} , has a value of $A = 2,6$ for native actin, whereas decavanadate and VOSO_4 presence shifts A to 1,4, which suggests actin inactivation. Actin hydrophobic surface was determined using ANSA probe. It was observed that decavanadate increases G-actin (2.6-fold) and F-actin (1.5-fold) hydrophobic surface, while no effects were observed in metavanadate presence. On the other hand, VOSO_4 decreases G-actin hydrophobic surface by 15 % ($\text{IC}_{50} = 22,26 \pm 2,09 \text{ }\mu\text{M}$ VOSO_4), while no effects are observed for F-actin. Nucleotides binding site was evaluated using ϵ -ATP. It was verified that both decavanadate and VOSO_4 change the rate constant for the exchange reaction between ATP and actin ($k = 6,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $4,47 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ for decavanadate and VOSO_4 , respectively). Moreover, the redox state of cysteine residues was analyzed. It was verified that decavanadate leads to the oxidation of one of the core cysteine residues ($\text{IC}_{50} = 7,8 \pm 0,2 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadate), while for F-actin besides this one ($\text{IC}_{50} = 20,9 \pm 0,2 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadate) Cys-374, exposed to solvent, is also oxidized ($\text{IC}_{50} = 11,2 \pm 0,1 \text{ }\mu\text{M}$ decavanadate). The concomitant vanadate reduction, followed by EPR, was observed only for decavanadate. Finally, it was verified by ^1H -NMR actin structure alterations upon decavanadate and oxovanadium presence.

The addition of ATO to the reaction medium prevents the interaction between actin and vanadium, in all the results shown above.

Simbologia e notações

A	Actina
Abs _x	Absorvência ao comprimento de onda x
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina 5'-difosfato
Ala	Resíduo de alanina
AM	Complexo actomiosina
ANSA	ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
Asn	Resíduo de aspartato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPase	Adenosina 5'-trifosfatase
C _c	Concentração crítica
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamónio]-1-propanosulfonato
CNT	3-carboxilato-4-nitrotiofenolato
CoA	Coenzima A
CT	Cloroamina-T
C-terminal	Terminal carboxilo de uma cadeia polipeptídica
Cys	Resíduos de cisteína
$\Delta v_{1/2}$	Largura a meia altura
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
ϵ	Coefficiente de extinção molar
E _a	Energia de activação
ϵ -ATP	Eteno-ATP
EDTA	Ácido etilenediamina tetracético
ELC	Cadeias leves essenciais de miosina
F	Factor de alargamento
F _{corr}	Intensidade de fluorescência corrigida
F _{obs}	Intensidade de fluorescência observada
F-actina	Actina filamentosa
FAD	Dinucleótido de flavina-adenina
FID	<i>Free induction decay</i>
g	Aceleração da gravidade
G-actina	Actina globular (ou monomérica)
Glu	Resíduos de glutamato
GSH	Glutationa reduzida

GSSG	Glutathiona oxidada
HC	Cadeias pesadas de miosina
HMM	Meromiosina pesada
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória, 50 %
IU	Quantidade de enzima que liberta 1 μmol de produto por minuto
k	Constante de velocidade
K _d	Constante de dissociação
K _{d,app}	Constante de dissociação aparente
K _i	Constante de inibição
K _M	Constante de Michaelis Menten
k _q	Constante de <i>quenching</i> (supressão)
K _{SV}	Constante de Stern-Volmer
λ	Comprimento de onda
LB	Factor de alargamento
LC1	Cadeia leve essencial de miosina (22,5 kDa)
LC2	Cadeia leve essencial de miosina (18,5 kDa)
LC3	Cadeia leve essencial de miosina (15,5 kDa)
LDH	Desidrogenase de lactato
LMM	Meromiosina leve
Lys	Resíduo de lisina
M	Miosina
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
Met	Resíduos de metionina
MIF	Factor de inibição muscular
NAD ⁺	Diucleótido de nicotinamida-adenina (forma reduzida)
NADH	Diucleótido de nicotinamida-adenina (forma oxidada)
NADP	Fosfato de dinucleótido nicotinamida-adenina (forma reduzida)
NADPH	Fosfato de dinucleótido nicotinamida-adenina (forma oxidada)
NP40	Nonil fenoxipolietoxiletanol
N-terminal	Terminal amina de uma cadeia polipeptídica
P	Proteína
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEP	Fosfoenolpiruvato
P _i	Fosfato inorgânico (sem especificar o grau de protonação)
PK	Cinase de piruvato
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

ppb	partes por bilião
ppm	partes por milhão
PSA	Persulfato de amónia
R	Cosntante dos gases perfeitos ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
RLC	Cadeias leves regulatórias de miosina
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPE	Ressonância paramagnética electrónica
RS	Retículo sarcoplasmático
S1	Subfragmento-1 de miosina
S2	Subfragmento-2 de miosina
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
Ser	Resíduo de serina
SIN-1	Peroxinitrito sintético (hidroclorato de 3-morfolinosidnonimina)
SH1	Grupo tiol mais reactivo na miosina (Cys-707)
SH2	Segundo grupo tiol mais reactivo na miosina (Cys-697)
SNC	Sistema nervoso central
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilenodiamina
Tn	Troponina
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
Trp	Resíduo de triptofano
Túbulos T	Túbulos transversos
TX100	Octoxinol-9
u. a.	Unidades arbitrárias
UV	Gama ultravioleta do espectro electromagnético
V(II)	Vanádio no estado de oxidação +2
V(III)	Vanádio no estado de oxidação +3
V(IV)	Vanádio no estado de oxidação +4
V(V)	Vanádio no estado de oxidação +5
V_1	Vanadato monomérico
V_2	Vanadato dimérico
V_3	Vanadato trimérico
V_4	Vanadato tetramérico
V_5	Vanadato pentamérico
V_6	Vanadato hexamérico
V_{10}	Vanadato decamérico

^{50}V	Isótopo de vanádio com número atómico 50
^{51}V	Isótopo de vanádio com número atómico 51
V_i	Vanadato inorgânico (sem especificar o grau de protonação)
vis	Gama visível do espectro electromagnético
$\text{V}_{\text{máx}}$	Velocidade máxima

CAPÍTULO I.

<i>INTRODUÇÃO GERAL</i>	1
I.1 Vanádio	3
I.1.1 Ocorrência, distribuição natural e biodisponibilidade.....	3
I.1.2 Um elemento com química complexa.....	3
I.1.3 Efeitos fisiológicos e toxicológicos promovidos pelo vanádio.....	5
I.1.4 Bioquímica e metabolismo celular do vanádio.....	7
I.1.5 Interesse biológico do vanádio.....	8
I.2 Contração muscular	9
I.2.1 Músculo estriado esquelético.....	9
I.2.2 Proteínas constituintes das miofibrilas.....	11
I.2.2.1 <i>Actina</i>	11
I.2.2.2 <i>Miosina</i>	14
I.2.3 Mecanismos moleculares da contração muscular.....	17
I.2.4 Regulação da contração muscular.....	20
I.3 Vanádio e contração muscular: passado, presente e futuro	21
I.4 Referências bibliográficas	23

CAPÍTULO II.

<i>PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ACTINA E MIOSINA</i>	31
II.1 Introdução	33
II.1.1 Preparação da actina.....	33
II.1.2 Preparação de miosina e subfragmento-1 de miosina.....	34
II.1.3 Medição da actividade ATPásica da miosina e subfragmento-1 de miosina.....	35
II.2 Materiais e métodos	36
II.2.1 Purificação de actina de músculo esquelético de coelho.....	36
II.2.1.1 <i>Obtenção de “pó de acetona”</i>	36
II.2.1.2 <i>Obtenção de G- e F-actina a partir de “pó de acetona”</i>	37
II.2.2 Isolamento e purificação de miosina de músculo esquelético de coelho.....	38
II.2.2.1 <i>Preparação de subfragmento-1 de miosina por digestão quimotriptica</i>	38
II.2.3 Caracterização das proteínas isoladas: análise qualitativa e estado de pureza.....	39
II.2.4 Análise das actividades enzimáticas de miosina e S1.....	40

II.2.4.1 <i>Actividades Ca^{2+}- e K^+/EDTA-ATPásicas de subfragmento-1 de miosina: método de Fiske-Subarow modificado.....</i>	40
II.2.4.2 <i>Actividade Mg^{2+}-ATPásica de subfragmento-1 de miosina estimulada por F-actina: método de enzimas acoplados.....</i>	41
II.3 Resultados e discussão.....	43
II.3.1 Caracterização das proteínas isoladas.....	43
II.3.1.1 <i>Análise qualitativa e estado de pureza.....</i>	43
II.3.1.2 <i>Análise da actividade enzimática.....</i>	45
II.4 Referências bibliográficas.....	48

CAPÍTULO III.

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA ACTINA-VANÁDIO.....	51
III.1 Introdução.....	53
III.1.1 Química das soluções aquosas de vanádio.....	53
III.1.2 Caracterização de soluções de vanádio por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....	56
III.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear aplicada ao estudo de soluções aquosas de vanádio(V).....	57
III.1.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica aplicada ao estudo de vanádio(IV).....	59
III.2 Materiais e métodos.....	62
III.2.1 Preparação das soluções de vanádio.....	62
III.2.1.1 <i>Vanádio(V).....</i>	62
III.2.1.2 <i>Vanádio(IV).....</i>	62
III.2.2 Análise por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....	62
III.2.3 Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{51}V	63
III.2.4 Análise por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica.....	64
III.3 Resultados e discussão.....	65
III.3.1 Caracterização das soluções de vanádio	65
III.3.1.1 <i>Composição das soluções de vanadato por espectroscopia de ^{51}V-RMN.....</i>	65
III.3.1.2 <i>Estabilidade das soluções de decavanadato: análise por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível.....</i>	69
III.3.2 Caracterização do sistema actina-vanádio.....	73
III.3.2.1 <i>Efeito de actina na estabilidade da espécie decamérica de vanadato: análise por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....</i>	73

III.3.2.2 Estudo por ^{51}V -RMN da ligação de decavanadato à actina.....	74
III.3.2.2.1 Efeito da adição de diferentes sais e da força iónica.....	74
III.3.2.2.2 Efeito da adição do nucleótido ATP.....	78
III.3.2.2.3 Determinação da constante de dissociação entre a espécie decamérica de vanadato e a actina.....	79
III.3.2.2.3 Análise da competição entre as diferentes formas de vanadato para a ligação à actina.....	82
III.3.2.3 Estudo por RPE da ligação de vanadilo à actina.....	87
III.4 Conclusões.....	91
III.5 Referências Bibliográficas.....	92

CAPÍTULO IV.

<i>EFEITO DE VANÁDIO NA FUNÇÃO FISIOLÓGICA DE ACTINA</i>	97
IV.1 Introdução.....	99
IV.1.1 Vanádio como inibidor enzimático.....	99
IV.1.2 Inibição das proteínas actina e miosina por espécies de vanádio(V) e (IV).....	101
IV.1.3 Técnicas de dispersão de luz aplicadas ao estudo da polimerização/despolimerização da actina.....	102
IV.2 Materiais e métodos.....	104
IV.2.1 Efeito na actividade Mg^{2+} -ATPásica de subfragmento-1 de miosina estimulada por F-actina na presença de vanádio.....	104
IV.2.2 Medição da polimerização e despolimerização da actina por dispersão de luz.....	104
IV.3 Resultados e discussão.....	106
IV.3.1 Efeito do vanádio na actividade Mg^{2+} -ATPásica de subfragmento-1 de miosina estimulada por F-actina.....	106
IV.3.2 Efeito de vanádio na polimerização e despolimerização de actina..	108
IV.4 Conclusões.....	114
IV.5 Referências bibliográficas.....	115

CAPÍTULO V.

<i>EFEITO DE VANÁDIO NA ESTRUTURA DE ACTINA</i>	121
V.1 Introdução.....	123
V.1.1 Espectroscopia de fluorescência aplicada ao estudo da estrutura da actina e supressão de fluorescência intrínseca na presença de vanádio.....	123
V.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H aplicada ao estudo da estrutura da actina.....	124

V.2 Materiais e métodos.....	126
V.2.1 Medições da fluorescência intrínseca da actina na presença de vanádio.....	126
V.2.2 Análise da troca de ATP no local de ligação de nucleótidos da actina na presença de vanádio.....	126
V.2.3 Determinação da superfície hidrofóbica da actina na presença de vanádio.....	127
V.2.4 Efeito de filtro interno.....	128
V.2.5 Quantificação de resíduos de cisteína de actina reduzidos na presença de vanádio.....	128
V.2.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H de actina na presença de vanádio.....	129
V.3 Resultados e discussão.....	130
V.3.1 Supressão da fluorescência intrínseca da actina por vanádio.....	130
V.3.2 Análise da superfície hidrofóbica da actina na presença de vanádio.....	138
V.3.3 Alteração do local de ligação de nucleótidos da actina na presença de vanádio.....	140
V.3.4 Modificação química dos resíduos de cisteína da actina na presença de vanadatos.....	143
V.3.4.1 Redução de vanadato a vanadilo na presença de actina: análise por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica.....	146
V.3.5 Alterações estruturais da actina na presença de vanádio: análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H.....	147
V.4 Conclusões.....	152
V.5 Referências bibliográficas.....	154

CAPÍTULO VI.

CONCLUSÕES GERAIS.....	159
------------------------	-----

VI.1 Vanádio(V).....	161
VI.2 Vanádio(IV)	162
VI.3 Vanádio(V) <i>versus</i> Vanádio(IV).....	163

ANEXOS.....	165
-------------	-----

A.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	167
A.2 Ressonância Paramagnética Electrónica.....	168
A.3 Dispersão de luz: considerações gerais.....	170
A.4 Espectroscopia de fluorescência: considerações gerais.....	171
A.4.1 Supressão de fluorescência.....	172
A.5 Referências bibliográficas.....	174

CAPÍTULO I.

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura I.1** – À esquerda encontra-se representada uma solução de 0,5 mM decavanadato (pH 2-6), preparada pela acidificação da solução de metavanadato (pH 6,6-6,8) apresentada à direita. Adaptado de Aureliano e Crans, 2009. 5
- Figura I.2** – Esquema representativo da entrada de vanádio na célula e os seus efeitos nos processos intracelulares. P, proteína; GSH, glutationa reduzida. Adaptado de Zaporowska & Scibior, 1998. 7
- Figura I.3** – Representação gráfica do número de publicações das últimas onze décadas sobre o vanádio (barras vermelhas) e a interacção deste com proteínas (barras laranjas). Os dados foram obtidos usando as palavras *vanadium* e *vanadium AND proteins*, respectivamente, no campo de busca da base de dados PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). 8
- Figura I.4** – Representação esquemática do sarcómero, unidade funcional e estrutural do músculo estriado esquelético. Os filamentos finos e grossos são constituídos maioritariamente por F-actina e miosina, respectivamente. 11
- Figura I.5** – Modelo estrutural do filamento de F-actina contendo tropomiosina e o complexo de troponinas I, C e T (TnI, TnC e TnT). Adaptado de Hamdani *et al.*, 2008. 12
- Figura I.6** – Estrutura do monómero de actina. PDB: 1J6Z (Otterbein *et al.*, 2001). 13
- Figura I.7** – Representação gráfica do número de publicações das últimas onze décadas relacionadas com a actina. Os dados foram obtidos usando a palavra *actin* no campo de busca da base de dados PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). 14
- Figura I.8** – Estrutura esquemática da molécula de miosina II. Destacam-se as duas cabeças globulares e a cauda filamentosa, ligadas entre si por uma zona flexível denominada pescoço. As cadeias leves (a verde e vermelho) encontram-se associadas às cabeças globulares. 15
- Figura I.9** – Clivagem proteolítica da molécula de miosina II. A quimotripsina cliva a molécula na zona flexível da cauda em dois fragmentos: meromiosina leve (LMM) e meromiosina pesada (HMM). A digestão com papaína origina os subfragmentos S1 e S2. Adaptado de Lodish *et al.*, 2000. 16
- Figura I.10** – Representação em *cartoon* do subfragmento-1 de miosina de músculo esquelético de galinha mostrando a estrutura secundária dos domínios principais. Os fragmentos proteolíticos estão coloridos da seguinte forma: verde para o de 25 kDa N-terminal; vermelho para o de 50 kDa central; azul para o de 20 kDa C-terminal. O local de ligação à actina encontra-se colorido a cinzento, fazendo esta região parte do fragmento de 50 kDa. As cadeias leves essenciais (ELC) e regulatórias (RLC) estão coloridas a amarelo e rosa, respectivamente. Adaptado de Rayment, 1996. 17
- Figura I.11** – Modelo do mecanismo de hidrólise do ATP pelo complexo actomiosina no processo de contracção muscular, onde A = actina e M = miosina. Adaptado de Spudis, 1994. 18

Figura I.12 – Estrutura do complexo actomiosina. A molécula de F-actina (à direita) apresentada é constituída por 5 monómeros de G-actina. O subfragmento-1 de miosina (à esquerda) estabelece uma ponte cruzada com dois monómeros de actina subjacentes. Adaptado de Greeves & Holmes, 1999. 19

Figura I.13 – Representação esquemática da regulação da contracção em músculos estriados esqueléticos pelo complexo troponina/tropomiosina. À esquerda, estado de repouso: a tropomiosina bloqueia o local de ligação da miosina à F-actina. À direita, contracção: ocorre o deslocamento da tropomiosina e a ligação entre a miosina e a F-actina pode ocorrer. 20

CAPÍTULO II.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ACTINA E MIOSINA

Figura II.1 – Representação esquemática do método de enzimas acoplados utilizado para determinar a actividade Mg^{2+} -ATPásica do subfragmento-1 de miosina (S1). Adpatado de Bagshaw, 1982. 41

Figura II.2 – Electroforese em gel de poliacrilamida (12 % acrilamida) em condições desnaturantes (SDS) de amostras recolhidas durante o processo de purificação de actina de músculo esquelético de coelho. Poços a) e b): 10 μ l dos marcadores de elevada (36-205 kDa) e baixa (6,6-66 kDa) massa molecular (Sigma). Os poços c) a g) contêm fracções (20 μ g) recolhidas ao longo da prepração do “pó de acetona”. Nos poços h) a j) foram aplicadas amostras (20 μ g) recolhidas durante o processo de obtenção da actina a partir do “pó de acetona”. Aplicou-se uma voltagem de 120 V e a electroforese decorreu durante 2 horas e 30 minutos. 43

Figura II.3 – Electroforese em gel de poliacrilamida (12 % acrilamida) em condições desnaturantes (SDS) de amostras recolhidas durante o processo de purificação de miosina e subfragmento-1 de miosina (S1) de músculo esquelético de coelho. Poços a) e h): 10 μ l dos marcadores de elevada (36-205 kDa) e baixa (6,6-66 kDa) massa molecular (Sigma). Os poços b) a d) contêm fracções (20 μ g) recolhidas ao longo da preparação da miosina. Nos poços e) a g) foram aplicadas amostras (20 μ g) recolhidas durante o processo de obtenção do S1 por digestão quimotríptica da miosina. Aplicou-se uma voltagem de 120 V e a electroforese decorreu durante 2 horas e 30 minutos. LC1, LC2 e LC3 correspondem, respectivamente, às cadeias leves essenciais de miosina. 44

CAPÍTULO III.

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA ACTINA-VANÁDIO

Figura III.1 – Diagrama das espécies de V(IV) predominantes em solução aquosa, representado como o logaritmo da concentração molar total de vanádio(IV) em função do valor de pH. As linhas sólidas representam a condição na qual as concentrações de duas espécies solúveis é idêntica. Adaptado de Crans, 2004. 54

Figura III.2 – Estruturas esquemáticas das espécies monomérica, V_1 (H_3VO_4 , HVO_4^{2-} , $H_2VO_4^-$); dimérica, V_2 ($H_3V_2O_7$) tetramérica cíclica, V_4 ($V_4O_{12}^{4-}$) e pentamérica cíclica, V_5 ($V_5O_{15}^{5-}$) de vanádio(V). 55

Figura III.3 – Representação esquemática da espécie decamérica, V_{10} ($V_{10}O_{28}^{6-}$) de vanádio(V).	56
Figura III.4 – Espectro de EPR de vanádio V(IV) hipotético simulado com recurso ao programa informático SimFonia, da Bruker Instruments, Inc..	59
Figura III.5 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de diferentes concentrações de metavanadato (1, 2, 4 e 8 mM em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM metavanadato em solução-tampão 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $CaCl_2$. Os sinais de RMN V_1 e V_2 correspondem, respectivamente, às espécies monomérica (VO_4^{3-} , HVO_4^{2-} e $H_2VO_4^-$) e dimérica de vanadato ($HV_2O_7^{3-}$ e $H_2V_2O_7^{2-}$). Os sinais V_4 e V_5 correspondem às espécies tetramérica ($V_4O_{12}^{4-}$) e pentamérica ($V_5O_{15}^{5-}$) cíclicas de vanadato, respectivamente.	66
Figura III.6 – Distribuição das espécies oligoméricas de vanadato, em unidades de concentração (mM), em função da concentração total de metavanadato (mM). As concentrações de cada espécie foram obtidas a partir das áreas dos sinais de ^{51}V -NMR observados na Figura III.5, tal como se descreve na secção III.2.3 dos Materiais e métodos. V_1 , V_2 , V_4 e V_5 correspondem, respectivamente, às espécies monomérica, dimérica, tetramérica, pentamérica e decamérica de vanadato.	67
Figura III.7 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de diferentes concentrações de decavanadato (1, 2, 4, 8 e 10 mM em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM decavanadato em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $CaCl_2$. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($V_{10}O_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.	68
Figura III.8 – Distribuição das espécies oligoméricas de vanadato, em unidades de concentração (mM), em função da concentração total de decavanadato (mM). As concentrações de cada espécie foram obtidas a partir das áreas dos sinais de ^{51}V -RMN observados na Figura III.7, tal como se descreve na secção III.2.3 dos Materiais e métodos. V_1 , V_4 e V_{10} correspondem, respectivamente, às espécies monomérica, tetramérica e decamérica de vanadato.	69
Figura III.9 – Espectros de absorção na região do ultravioleta-visível de soluções de decavanadato com diferentes concentrações (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mM em vanadato total) após diluição de uma solução de 50 mM decavanadato (em vanadato total) numa solução tampão contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $CaCl_2 \pm 0,2$ mM ATP. Os espectros foram obtidos de acordo com o descrito na secção III.2.2.	70
Figura III.10 – Segunda derivada dos espectros de absorção apresentados na Fig. III.9. Os espectros foram obtidos para diferentes concentrações de decavanadato (0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM e 1 mM em vanadato total) após diluição de uma solução de 50 mM decavanadato (em vanadato total) numa solução tampão contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $CaCl_2 \pm 0,2$ mM ATP. Os espectros foram obtidos de acordo com o descrito na secção III.2.2.	70
Figura III.11 – Representação gráfica dos valores da segunda derivada da absorção a 358 e 400 nm (em unidades arbitrárias) em função da concentração de decavanadato (0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM e 1 mM em vanadato total). Os espectros foram obtidos após diluição de uma solução de 50 mM decavanadato (em vanadato total) numa solução tampão contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $CaCl_2 \pm 0,2$ mM ATP, de acordo com o descrito na secção III.2.2.	71

- Figura III.12** – Representação gráfica do logaritmo neperiano da absorção a um comprimento de onda de 400 nm ($\ln(Abs_{400})$) em função do tempo (segundos) para uma solução de 1 mM decavanadato (em vanadato total) após diluição da solução concentrada (50 mM decavanadato) no meio reaccional contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $CaCl_2 \pm$ 0,2 mM ATP, de acordo com o descrito na secção III.2.2. 71
- Figura III.13** – Representação gráfica do logaritmo neperiano da constante cinética k ($\ln(k)$) em função do inverso da temperatura ($1/T$) (K^{-1}) para uma solução de 1 mM decavanadato (em vanadato total) após diluição da solução concentrada (50 mM decavanadato) no tampão de reacção (2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $CaCl_2 \pm$ 0,2 mM ATP). O valor da constante de velocidade foi determinado para a reacção de desoligomerização da espécie decamérica de vanadato, a um comprimento de onda de 400 nm e diferentes temperaturas (288,15; 293,15; 298,15; 303,15; 310,15; 313,15 e 318,15 K), tal como se descreve na secção III.2.2. 72
- Figura III.14** – Tempo de meia-vida de 100 μ M decavanadato na presença de: (■) G-actina (em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM $CaCl_2$); (▲) G-actina (em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM $CaCl_2$, 0,2 mM ATP, 100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, pH 7.5); (□) G-actina (em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM $CaCl_2$, 0,2 mM ATP, pH); (●) F-actina (em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM $CaCl_2$, 0,2 mM ATP, 100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$). As cinéticas de decomposição da espécie decamérica de vanadato foram monitorizadas a um comprimento de onda de 400 nm, a 25 °C, de acordo com o descrito na secção III.2.2. 74
- Figura III.15** – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM decavanadato em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (A e D), 5 mM $MgCl_2$ (B e E) ou 0,2 mM $CaCl_2$ (C e F), na ausência (esquerda) ou na presença (direita) de 40 μ M G-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($V_{10}O_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3 do presente capítulo. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3. 75
- Figura III.16** – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM decavanadato em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $CaCl_2$ e 100 mM KCl, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μ M G-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($V_{10}O_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3. 77
- Figura III.17** – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM decavanadato em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $CaCl_2$ e 5 mM KCl, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μ M G-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($V_{10}O_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3. 79
- Figura III.18** – Titulação de uma solução 5 mM decavanadato (em vanadato total) com (A) G-actina, num meio contendo 2 mM Tris (pH 7.5), 0.2 mM $CaCl_2$; e (B) F-actina, num meio contendo 2 mM Tris (pH 7.5), 0.2 mM $CaCl_2$, 0.2 mM ATP. O factor de alargamento da largura a meia altura, F , é definido como o quociente entre os valores de $\Delta v_{1/2}$ do sinal de V_{10A} na presença e na ausência de proteína. Os dados experimentais representam a média de 3 ensaios diferentes. No caso da F-actina o erro associado a cada ponto experimental encontra-se dentro dos limites do símbolo utilizado. A titulação com G-actina foi ajustada com uma função sigmoideal de Boltzmann, com os seguintes parâmetros: $F_{\min} = 0,91 \pm 0.10$; $F_{\max} = 2,23$

$\pm 0,07$; $V_{50} = 25,42 \pm 2,32 \mu\text{M}$ G-actina.	80
Figura III.19 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM decavanadato em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μM F-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.	81
Figura III.20 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 2 mM metavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM metavanadato, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 (A) e 40 μM G-actina, na ausência (B) ou na presença (C) de 5 mM MgCl_2 . Os sinais de RMN V_1 , V_2 e V_3 correspondem, respectivamente, às espécies monomérica, dimérica e tetramérica de vanadato. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.	82
Figura III.21 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 2 mM metavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM metavanadato em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μM F-actina. Os sinais de RMN V_1 , V_2 e V_5 correspondem, respectivamente, às espécies monomérica, dimérica e tetramérica de vanadato. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.	84
Figura III.22 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato e 2 mM metavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de soluções concentradas de 50 mM decavanadato e 50 mM metavanadato, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μM F-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os sinais V_1 , V_2 e V_4 correspondem às espécies monomérica, dimérica e tetramérica de vanadato, respectivamente. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.	85
Figura III.23 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato e 2 mM metavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de soluções concentradas de 50 mM decavanadato e 50 mM metavanadato, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μM F-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os sinais V_1 , V_2 e V_4 correspondem às espécies monomérica, dimérica e tetramérica de vanadato, respectivamente. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.	86
Figura III.24 – Espectros de RPE banda-X de 250 μM VOSO_4 em (A) 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , na presença de (B) 50 μM G-actina, (C) 30 μM F-actina, (D) 0,2 mM ATP e (E) 50 μM G-actina e 0,2 mM ATP. Os espectros foram adquiridos a 77 K, nas seguintes condições: frequência de micro-onda, 9,65 GHz; potência de micro-onda, 0,63 mW; amplitude de modulação, 10 Gauss; ganho do receptor, $2,0 \times 10^5$; scans, 4, tal como descrito na secção III.2.4.	88
Figura III.25 – Espectros de RPE banda-X de 250 μM VOSO_4 , em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 (A) e 30 μM G-actina, experimental (B) ou simulação (C). Para o espectro simulado usaram-se larguras de linha de 20,0, 20,0 e 24,0 G para as direcções x, y e z, respectivamente, e uma linha de forma Lorentziana/Gaussiana. Os espectros foram adquiridos a 77 K, nas seguintes condições: frequência de micro-onda, 9,65 GHz; potência de micro-onda, 0,63 mW; amplitude de modulação, 10 Gauss; ganho do receptor, $2,0 \times 10^5$;	

scans, 4, tal como descrito na secção III.2.4.	89
Figura III.26 – Intensidades do pico correspondente à linha $m_i = -1/2$ perpendicular dos espectros de RPE (representado na Figura III.25 pelo número 1) de banda-X de (A) 50 μM G-actina e (B) 30 μM F-actina, tituladas com diferentes concentrações de VOSO_4 , em 2 mM Tris (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP. Os dados experimentais correspondem a três ensaios diferentes. Os espectros foram adquiridos a 77 K, nas seguintes condições: frequência de micro-onda, 9,65 GHz; potência de micro-onda, 0,63 mW; amplitude de modulação, 10 Gauss; ganho do receptor, $2,0 \times 10^5$; scans, 4, tal como descrito na secção III.2.4.	90

CAPÍTULO IV.

EFEITO DE VANÁDIO NA ESTRUTURA DE ACTINA

Figura IV.1 – Inibição da actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 de miosina (0,5 mg/ml) estimulada por 2 μM F-actina na presença de (A) meta- e decavanadato ou (B) VOSO_4 , em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 e 2 mM ATP, a 25 °C. Quantificação pelo método de enzimas acoplados, cinase do piruvato/desidrogenase do lactato (PK/LDH), de acordo com o descrito na secção II.2.4.2 do Capítulo II. Os valores são expressos em percentagem, considerando 100 % a actividade obtida na ausência de vanádio. Os dados experimentais foram ajustados com a equação IV.1 apresentada na secção IV.1.	107
Figura IV.2 – Cinética típica da polimerização de F-actina (8 μM) na ausência de decavanadato, obtido por dispersão de luz, monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção IV.2.2.	109
Figura IV.3 – Extensão da polimerização da G-actina (8 μM), induzida por 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , na presença de meta- (\blacktriangle) e decavanadato (\blacksquare), em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP. Os dados foram obtidos a partir da intensidade da dispersão de luz, monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção IV.2.2.	110
Figura IV.4 – Cinética típica da despolimerização da F-actina (8 μM) na presença de 8 mM, decavanadato (em vanadato total) obtido por dispersão de luz, monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção IV.2.2.	111
Figura IV.5 – Efeito de meta- (\blacktriangle) e decavanadato (\blacksquare) na despolimerização da F-actina (8 μM), em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP. Os dados foram obtidos a partir da intensidade da dispersão de luz, monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção IV.2.2.	112
Figura IV.6 – Extensão da polimerização da G- (\blacksquare) e F-actina (\blacktriangle) (8 μM), em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP, na presença de diferentes concentrações de VOSO_4 . A polimerização da G-actina foi induzida por 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 . Os dados foram obtidos a partir da intensidade da dispersão de luz, monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção IV.2.2.	113

CAPÍTULO V.

EFEITO DE VANÁDIO NA ESTRUTURA DE ACTINA

- Figura V.1** – Fluorescência intrínseca de G-actina. A actina monomérica (5 μM) foi incubada durante 20 minutos com 0-1300 μM (A) deca- ou (B) metavanadato (em vanadato total), em 2 mM Tris (pH 7.5), 0,2 mM CaCl_2 . Representação gráfica do valor máximo de intensidade do espectro de fluorescência intrínseca ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$) em função da concentração de vanadato, considerando 1,00 o valor para a G-actina nativa, de acordo com o descrito na secção V.2.1. .. 131
- Figura V.2** - Fluorescência intrínseca de F-actina. A actina filamentosa (5 μM) foi incubada durante 20 minutos com 0-1300 μM (A) deca- ou (B) metavanadato (em vanadato total), em 2 mM Tris (pH 7.5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP. Representação gráfica do valor máximo de intensidade do espectro de fluorescência intrínseca ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$) em função da concentração de vanadato, considerando 1,00 o valor para a F-actina nativa, de acordo com o descrito na secção V.2.1. 132
- Figura V.3** - Fluorescência intrínseca de (■) G- e (▲) F-actina. A actina (5 μM) foi incubada durante 20 minutos com 0-700 μM VO_2SO_4 , em 2 mM Tris (pH 7.5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2 \text{ mM}$ ATP. Representação gráfica do valor máximo de intensidade do espectro de fluorescência intrínseca ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$) em função da concentração de vanadilo, considerando 1,00 o valor para a G- e F-actina nativas, de acordo com o descrito na secção V.2.1. 133
- Figura V.4** – Gráficos de Stern-Volmer da supressão de fluorescência intrínseca de actina. Os ensaios foram realizados com 5 μM G- e F-actina, num meio contendo 2 mM Tris (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2 \text{ mM}$ ATP. A incubação com (A) metavanadato, (B) decavanadato e (C) VO_2SO_4 foi realizada a 25 °C, durante 20 minutos. Os espectros foram obtidos num espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$), de acordo com o descrito na secção V.2.1. 134
- Figura V.5** – Estrutura tridimensional da G-actina de músculo esquelético de coelho (PDB: 1J6Z) (verde), com a molécula de ATP destacada a vermelho e os resíduos de triptofano a rosa. Imagem criada com o programa Pymol. 136
- Figura V.6** – Representação gráfica do Parâmetro A (I_{320}/I_{365}), obtido a partir dos espectros de fluorescência intrínseca da G-actina (5 μM), em função da concentração de decavanadato (em vanadato total) e VO_2SO_4 137
- Figura V.7** – A alteração na intensidade de fluorescência associada à ligação de ANSA às zonas hidrofóbicas da superfície da (A) G- e (B) F-actina (9 μM) foi determinada a um comprimento de onda de 500 nm, após excitação a 370 nm. A incubação com diferentes concentrações de (▲) meta- ou (■) decavanadato, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2 \text{ mM}$ ATP, foi realizada durante 20 minutos, a 25 °C. 139
- Figura V.8** – A alteração na intensidade de fluorescência associada à ligação de ANSA às zonas hidrofóbicas da superfície da (A) G- e (B) F-actina (9 μM) foi determinada a um comprimento de onda de 500 nm, após excitação a 370 nm. A incubação com diferentes concentrações de VO_2SO_4 , em 2 mM Tris (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2 \text{ mM}$ ATP, foi realizada durante 20 minutos, a 25 °C. 140
- Figura V.9** – A troca entre ϵ -ATP e ATP no local de ligação de nucleótidos foi monitorizada através da diminuição da intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$). (A) Constante de velocidade da reacção de troca do ϵ -ATP (k), (B) constante de dissociação aparente ($K_{\text{d,app}}$) e (C) intensidade de fluorescência inicial do ϵ -ATP em função da

concentração de VO_2SO_4 . A G-actina ($5 \mu\text{M}$) foi incubada com VO_2SO_4 , em 2 mM Tris (pH 7,5), $0,2 \text{ mM}$ CaCl_2 , durante 20 minutos, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$

141

Figura V.10 – A troca entre ϵ -ATP e ATP no local de ligação de nucleótidos foi monitorizada através da diminuição da intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$). (A) Constante de velocidade da reação de troca do ϵ -ATP (k), (B) constante de dissociação aparente ($K_{\text{d,app}}$) e (C) intensidade de fluorescência inicial do ϵ -ATP em função da concentração de VO_2SO_4 . A G-actina ($5 \mu\text{M}$) foi incubada com VO_2SO_4 , em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), $0,2 \text{ mM}$ CaCl_2 , durante 20 minutos, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$

142

Figura V.11 – Coordenação do íon vanadilo a átomos de oxigênio de três moléculas de água e ao azoto equatorial do resíduo de Lys-336. Esta esfera de coordenação foi obtida com base no valor de $A_{//} = 195,6$, $G = 531,0798 \text{ MHz}$, obtido a partir da simulação do espectro de RPE resultante da adição de $250 \mu\text{M}$ VO_2SO_4 a $50 \mu\text{M}$ G-actina (em 2 mM Tris, pH 7,5, $0,2 \text{ mM}$ CaCl_2).

143

Figura V.12 – Estrutura tridimensional da G-actina de músculo esquelético de coelho (PDB: 1J6Z) (verde), com a molécula de ATP destacada a vermelho e os resíduos de cisteína a rosa. A Cys-374 não se encontra representada por se localizar na região C-terminal, não resolvida por cristalografia de raios-X. Imagem criada com o programa Pymol.

144

Figura V.13 – Oxidação dos resíduos de cisteína de G- e F-actina na presença de decavanadato. A titulação dos resíduos de cisteína foi realizada com $0,1 \text{ mM}$ DTNB, em 2 mM Tris (pH 7,5), $0,2 \text{ mM}$ $\text{CaCl}_2 \pm 0,2 \text{ mM}$ ATP. O aumento na absorvência a um comprimento de onda de 412 nm foi continuamente monitorizado durante 10 minutos (Cys “rápidas”); a determinação dos resíduos de cisteína totais foi efectuada adicionando 1% SDS. (A) O tratamento de G-actina ($2 \mu\text{M}$) com decavanadato produz uma diminuição do número de resíduos de cisteína reduzidos totais (■) permanecendo a Cys-374 na sua forma reduzida (▲). (B) O tratamento de F-actina ($2 \mu\text{M}$) com decavanadato produz a completa oxidação da Cys-374 (▲) e uma diminuição do número de resíduos de cisteína totais reduzidos (■).

145

Figura V.14 – Espectros de RPE banda-X de 25 mM decavanadato (em vanadato total) em (A) 2 mM Tris (pH 7,5), $0,2 \text{ mM}$ $\text{CaCl}_2 \pm 0,2 \text{ mM}$ ATP, na presença de (B) $100 \mu\text{M}$ G-actina ou (C) $100 \mu\text{M}$ F-actina. A adição de proteína elicitou o aparecimento dos sinais típicos de oxovanádio(IV).

147

Figura V.15 – Espectros de ^1H -RMN de $63 \mu\text{M}$ G-actina, (espectro inferior), na presença de 2 mM decavanadato (em vanadato total) (espectro intermédio), em 2 mM Tris (pH 7,5), $0,2 \text{ mM}$ CaCl_2 . O espectro intermédio resulta da diferença entre ambos. Os espectros foram adquiridos a 298 K , usando um espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado com uma crio-sonda TCI-Z e uma unidade de controlo da temperatura. Acumularam-se 256 transientes por espectro, com um tempo de espera de $1,5$ segundos entre eles, de acordo com o descrito na secção V.2.5.

149

Figura V.16 – Espectros de ^1H -RMN de $63 \mu\text{M}$ G-actina, (espectro inferior), na presença de 2 mM decavanadato (em vanadato total) (espectro intermédio), em 2 mM Tris (pH 7,5), $0,2 \text{ mM}$ CaCl_2 , $0,2 \text{ mM}$ ATP. O espectro superior resulta da diferença entre ambos. Os espectros foram adquiridos a 298 K , usando um espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado com uma crio-sonda TCI-Z e uma unidade de controlo da temperatura. Acumularam-se 256 transientes por espectro, com um tempo de espera de $1,5$ segundos entre eles, de acordo com o descrito na secção V.2.5.

150

Figura V.17 – Espectros de ^1H -RMN de $63\ \mu\text{M}$ G-actina, (espectro inferior), na presença de $250\ \mu\text{M}$ VOSO_4 (espectro intermédio), ou $500\ \mu\text{M}$ VOSO_4 (espectro superior), em $2\ \text{mM}$ Tris (pH 7,5), $0,2\ \text{mM}$ CaCl_2 . Os espectros foram adquiridos a $298\ \text{K}$, usando um espectrómetro Bruker Avance III $600\ \text{MHz}$ equipado com uma crio-sonda TCI-Z e uma unidade de control da temperatura. Acumularam-se 256 transientes por espectro, com um tempo de espera de 1,5 segundos entre eles, de acordo com o descrito na secção V.2.5. 151

CAPÍTULO II.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ACTINA E MIOSINA

- Tabela II.I** – Valores das actividades não-fisiológicas de miosina e subfragmento-1 de miosina (S1) determinadas pelo método de Fiske-Subarow modificado, de acordo com o descrito na secção II.2.4.1. Os resultados apresentados são a média de três ensaios experimentais. 45
- Tabela II.II** – Valores da actividade fisiológica de subfragmento-1 de miosina (S1), na ausência e na presença de F-actina, determinada pelo método de enzimas acoplados, de acordo com o descrito na secção II.2.4.2. Os resultados apresentados são a média de três ensaios experimentais. 46
- Tabela II.III** – Parâmetros cinéticos do subfragmento-1 de miosina de diferentes espécies e isoformas musculares. Adaptado de Sellers, 1999. 47

CAPÍTULO III.

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA ACTINA-VANÁDIO

- Tabela III.I** – Estudos por ^{51}V -RMN da interacção de vanadatos com proteínas. 58
- Tabela III.II** – Estudos por RPE da interacção de vanadilo com proteínas. 60
- Tabela III.III** – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.15. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído. O factor de alargamento da largura a meia altura, F, é definido como o quociente entre os valores de $\Delta v_{1/2}$ na presença e na ausência de 40 μM G-actina. A concentração (C) das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato foram calculadas através da equação III.7, de acordo com o descrito na secção III.2.3. 76
- Tabela III.IV** – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.16. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído. 78
- Tabela III.V** – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.17. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído. 79
- Tabela III.VI** – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.19. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído. 81

Tabela III.VII – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 2 mM metavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.20. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído.	83
Tabela III.VIII – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 2 mM metavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.21. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído.	84
Tabela III.IX – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato e 2 mM metavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.23. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído.	86
Tabela III.X – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -NMR das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato e 2 mM metavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.17. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído.	87

CAPÍTULO IV.

EFEITO DE VANÁDIO NA ESTRUTURA DE ACTINA

Tabela IV.I – Enzimas inibidos na presença das diferentes espécies de oxovanadato indicadas (V_1 , V_2 , V_4 e V_{10}).	100
Tabela IV.II – Estudos sobre o equilíbrio entre a polimerização e a despolimerização da actina, na presença de diferentes compostos, avaliado por dispersão de luz.	103
Tabela IV.III – Efeito do pH na actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 de miosina (0,05 mg ml ⁻¹) estimulada por 2 μM F-actina tratada com diferentes concentrações de decavanadato ($[\text{Decavanadato}]_{\text{stock}} = 5 \text{ mM}$), em 2 mM MES (pH 6,0) ou 2 mM Tris (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, a 25 °C, durante 20 minutos. Quantificação pelo método de enzimas acoplados (PK/LDH), de acordo com o descrito na secção IV.2.1. Os resultados apresentados são a média de três ensaios experimentais independentes.	108

CAPÍTULO V.

EFEITO DE VANÁDIO NA ESTRUTURA DE ACTINA

Tabela V.I – Espécies de vanádio responsáveis pela supressão intrínseca de diferentes proteínas.	124
Tabela V.II – Parâmetros de supressão de fluorescência intrínseca da actina obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer da Figura V.5: efeito de diferentes espécies de vanádio.	135

CAPÍTULO I.

INTRODUÇÃO GERAL

I.1 Vanádio

I.1.1 Ocorrência, distribuição natural e biodisponibilidade

O mineralogista espanhol Andrés Manuel del Rio (1764-1849) foi o primeiro a descobrir o vanádio, em 1801, tendo-lhe atribuído o nome *pancrómio*, devido às diferentes cores que apresentava de acordo com os seus estados de oxidação, de forma semelhante ao crómio. No entanto, Nils Gabriel Sefstrom (1787-1845) foi o primeiro a isolá-lo, na sua forma de óxido, em 1831, tendo o seu nome derivado da deusa nórdica da beleza e do amor, *Vanadis*, mais uma vez em alusão à extraordinária gama de cores dos derivados deste elemento.

O vanádio é um metal de transição, apresentando-se no estado sólido à temperatura ambiente, de cor clara e brilhante. Encontra-se amplamente distribuído em todos os ecossistemas, em dois isótopos naturais, ^{50}V (0,2 %), radioactivo, e ^{51}V (99,8 %). De facto, a sua abundância natural na Terra é de 136 partes por milhão (ppm), dos quais 251 ppm se encontram na crosta terrestre, o que faz dele o décimo nono elemento mais abundante, e 1,5 partes por bilião (ppb) nos oceanos. Está associado a cerca de 70 minerais diferentes na natureza (dos quais se destacam aqueles em que se encontra associado a urânio, cobre, chumbo, zinco, fosfato e titânio ferroso), especialmente na forma de vanadatos ou pentóxidos de vanádio, de onde é, normalmente, extraído. O vanádio é um dos principais constituintes da matéria orgânica fóssil, em especial do carvão, óleo de crude e fósseis carbonáceos (Greenwood & Earnshaw, 1997; Nriagu, 1998). Está presente em alimentos consumidos pelo Homem, tais como salsa, pimenta preta, cogumelos, marisco, vegetais, cereais, gorduras e óleos (Chasteen, 1983). Estes alimentos constituem a maior fonte de exposição ao vanádio da maioria da população humana (Barceloux & Barceloux, 1999).

I.1.2 Um elemento com química complexa

O vanádio possui uma massa atómica de 50,9415, pertencendo aos grupo VB e período 4 da Tabela Periódica. 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 electrónica, $[\text{Ar}] 3d^3 4s^2$, a qual permite a formação de vários estados de oxidação (de -1 a +5). Destes, apenas os compostos de V(III), V(IV) e V(V) são biologicamente relevantes, já que o V(II) apresenta demasiada capacidade redutora para existir nos organismos vivos conhecidos, enquanto o ião

vanádico, V(III), parece ocorrer apenas nos vanadócitos de tunicatos (Baes & Mesmer, 1976; Rehder, 1991; Barceloux & Barceloux, 1999; Crans *et al.*, 2004).

O vanádio, à semelhança do molibdénio, encontra-se disponível nas formas aniónica e catiónica, sendo as mais comuns, em condições fisiológicas, o vanadato (H_2VO_4^-) e o vanadilo (VO^{2+}), nos estados de oxidação V(V) e V(IV), respectivamente. O ião vanadilo é uma espécie estável a pH ácidos, sendo a maioritária a pH 3 (Crans *et al.*, 2004). 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, encontra-se fortemente complexado com proteínas ou aminoácidos livres, citrato, ATP (adenosina 5'-trifosfato) e pirofosfato, pelo que será muito improvável que exista livre nos fluidos intracelulares, excepto, possivelmente, em ambientes fortemente ácidos, como os lisossomas (Chasteen, 1983).

O vanádio V(V) é a forma mais estável num intervalo amplo de pH (Chasteen, 1983). Para valores de pH fisiológicos, ou mais elevados, os vanadatos, aniónicos, tendem a constituir complexos polinucleares, pelo que as soluções aquosas de vanadato são extremamente complexas, com ocorrência simultânea de vários equilíbrios de protonação e de oligomerização. As espécies presentes dependem do pH, força iónica e temperatura da solução e da concentração total do elemento (Heath & Howarth, 1981; Pettersson *et al.*, 1983 e 1985; Pope, 1983; Rehder, 1991; Crans, 1994).

O monómero VO_4^{3-} (ortovanadato; 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 (PO_4^{3-}). A coordenação do ortovanadato pode ser tetraédrica ou bipiramidal trigonal (Crans *et al.*, 2004).

A oligomerização do vanadato monomérico dá origem ao dímero ($\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$; 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 (Crans *et al.*, 2004). A dimerização de V_2 origina o vanadato tetramérico ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$; V_4), que constitui a espécie maioritária em soluções aquosas concentradas. As estruturas do tetravanadato e a sua espécie protonada são cíclicas (Day *et al.*, 1987). Outra espécie oligomérica importante é o vanadato pentamérico ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{3-}$; V_5), cuja estrutura presumida é, de igual modo, cíclica (Crans, 1994).

Em solução aquosa podem, ainda, formar-se outros oligómeros de vanadato, dos quais aquele que apresenta maior importância bioquímica é o vanadato decamérico ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$; V_{10}), a espécie predominante em soluções com valores de pH compreendidos entre 2-6, quando a concentração total de vanadato é superior a 100 μM . A estrutura compacta única do V_{10} não difere em solução ou no estado sólido, com dimensões de 8.3 Å x 7.7 Å x 5.4 Å. Esta espécie apresenta uma coloração alaranjada, sendo obtida experimentalmente pela acidificação de uma solução de metavanadato. Nesta última podem coexistir as espécies monomérica (V_1), dimérica

(V₂), tetramérica (V₄), pentamérica (V₅), sendo preparada a partir de metavanadato de amónia; apresenta uma coloração amarela e um pH próximo de 6,6 (Fig. I.1) (Aureliano, 2009; Aureliano & Crans, 2009).

A química do vanádio em solução aquosa será discutida em maior detalhe no capítulo III.



Figura I.1 – À esquerda encontra-se representada uma solução de 0,5 mM decavanadato (pH 2-6), preparada pela acidificação da solução de metavanadato (pH 6,6-6,8) apresentada à direita. Adaptado de Aureliano e Crans, 2009.

I.1.3 Efeitos fisiológicos e toxicológicos promovidos pelo vanádio

Normalmente, a entrada do vanádio no organismo ocorre por inalação de poeiras e fumo ou, em menores quantidades, por absorção ao nível do tracto gastrointestinal (< 1-2 %) (Roshchin *et al.*, 1980) ou da pele, nesta última devido a baixa solubilidade do vanádio metálico. A taxa de absorção depende da solubilidade do composto de vanádio e do seu local de entrada. A título de exemplo, é de referir que, no tracto gastrointestinal, o V(V) é absorvido 3 vezes mais depressa que o V(IV) (Nielsen, 1995). O seu armazenamento centra-se no fígado, rins, cérebro, coração, músculos e ossos (Barceloux & Barceloux, 1999). Após a absorção, cerca de 90 % do vanádio presente no organismo encontra-se no plasma, principalmente no estado de oxidação V(IV), ligado à transferrina e albumina (Chasteen *et al.*, 1986). No entanto, a retenção de vanádio no organismo humano é reduzida, sendo a sua quantidade em muitos tecidos, em condições fisiológicas normais, inferior a 10 ng/g de tecido (Etcheverry & Cortizo, 1998), sendo a sua concentração nos músculos de 10 µg/g tecido ou 180 nM (Chasteen, 1983). A via principal de eliminação do vanádio é através dos rins (90 %), sendo apenas uma pequena parte excretada pelas fezes. A excreção do vanádio é relativamente rápida, tendo sido verificado que os rins eliminam 40 a 60 % deste metal cerca de 1 a 3 dias após a absorção (Talvitie & Wagner, 1954).

Os efeitos fisiológicos do vanádio são bastante diversificados, o que se pode explicar, em parte, pela sua grande variedade de compostos, cujo número de coordenação, estabilidade e labilidade específicas variam de acordo com as condições do meio em que se encontram. No entanto, sabe-se que possui um papel (i) no metabolismo do cálcio, ajudando na formação dos

dentos e ossos, induzindo a sua mineralização; (ii) na reprodução e desenvolvimento, mimetizando e potenciando factores de crescimento; (iii) na biossíntese de lípidos, inibindo, posteriormente, a sua acumulação nos vasos sanguíneos e no sistema nervoso central (SNC); (iv) no metabolismo da glicose, estimulando o consumo desta, bem como a síntese de glicogénio, pelo que possui capacidade para mimetizar e potenciar os efeitos celulares da insulina; (v) na transdução de sinais celulares, regulando a actividade de segundos mensageiros; (vi) no transporte de iões e aminoácidos; (vii) na transcrição genética e (viii) síntese de proteínas e ADN (ácido desoxirribonucleico), entre outros (Chasteen, 1983; Etcheverry & Cortizo, 1998).

No entanto, não são conhecidas, ainda, evidências de deficiência nutricional causada por vanádio em humanos, nem de proteínas que contenham vanádio, em animais superiores e humanos, apesar de estudos realizados na década de 1970 indicarem que a sua carência provocaria infertilidade, anomalias musculares e alterações no metabolismo do colesterol (Barceloux & Barceloux, 1999). Em galos e ratos, a deficiência em vanádio provoca anormalidades no crescimento, reprodução e metabolismo de estruturas lipídicas e ósseas, entre outras (Ulmer, 1977; Nechay, 1984; Chasteen, 1983; French & Jones, 1993).

A toxicidade dos compostos de vanádio depende de uma grande variedade de factores, tais como a via de administração e da espécie administrada. De uma forma geral, a ingestão de vanádio é menos tóxica que a sua passagem da mãe para o filho, no útero, constituindo a inalação uma via de toxicidade intermédia. Por seu turno, compostos com uma maior valência são, geralmente, mais tóxicos (Barceloux & Barceloux, 1999), enquanto a administração de decavanadato induz alterações nos enzimas antioxidantes diferentes daquelas observadas após administração de metavanadato (Soares *et al.*, 2007a).

Além disso, verificou-se que o decavanadato, após administração intravenosa, se acumulava maioritariamente na mitocôndria, induzindo despolarização da membrana e inibição do consumo de oxigénio, para concentrações da ordem dos nM (Soares *et al.*, 2007a e 2007b).

Em humanos, a ingestão diária de 50-100 mg de sulfato de vanadilo, usado para diminuir níveis elevados de colesterol, está associada a fadiga, letargia, câibras abdominais e uma coloração verde da língua, enquanto a ingestão de 10-15 g de metavanadato de amónio, para o tratamento de anemia, tuberculose, diabetes e sífilis, provocou sintomas gastrointestinais, língua verde e lesões neurológicas. No entanto, quantidades deste último composto de 1-8 mg não provocaram qualquer efeito secundário (Barceloux & Barceloux, 1999).

Pode assim, concluir-se, que no caso particular dos seres humanos, o vanádio pode ser considerado um elemento essencial benéfico a baixas concentrações (1-10 nM) mas tóxico para concentrações mais elevadas, em especial o vanádio(V) (Nechay, 1984).

I.1.4 Bioquímica e metabolismo celular do vanádio

A química complexa do vanádio em solução sugere que os seus efeitos fisiológicos também apresentem alguma complexidade, devendo-se esta, essencialmente, à dificuldade em determinar com exactidão qual a espécie responsável pelo efeito observado. De facto, após a entrada do vanádio no organismo, este permanecerá na forma de ortovanadato no plasma e noutros fluidos corporais. Apesar do vanádio poder, então, entrar nas células através de um receptor específico para a transferrina, será mais provável que tal ocorra sua forma de V(V), através de canais específicos para fosfato ou outros canais iónicos inespecíficos. No caso específico dos glóbulos vermelhos, a entrada do vanadato faz-se através da proteína banda 3, cuja função normal é catalizar a reacção de troca entre Cl^- e HCO_3^- (Cantley *et al.*, 1978).

No interior das células, o vanadato é lentamente mas quantitativamente reduzido a V(IV) pela glutathiona (GSH), assim como por vários outros compostos com grupos $-\text{OH}$, como pentoses, hexoses ou etanolaminas (Nriagu, 1998). Após a redução intracelular de V(V) a V(IV), o vanadilo encontra-se ligado a proteínas, como a transferrina e outros pequenos péptidos, bem como à glutathiona e a catecolaminas. Nos eritrócitos liga-se à hemoglobina (Cantley & Aisen, 1979) (Fig. I.2).

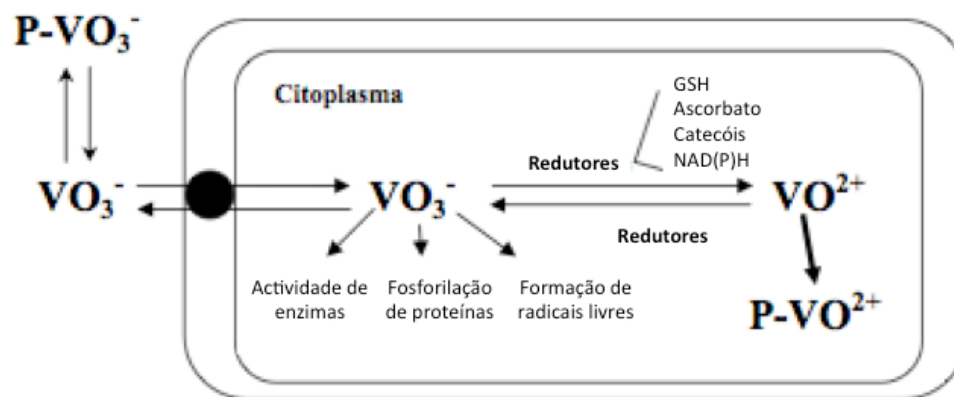


Figura I.2 – Esquema representativo da entrada de vanádio na célula e os seus efeitos nos processos intracelulares. P, proteína; GSH, glutathiona reduzida. Adaptado de Zaporowska & Scibior, 1998.

A redução da forma de vanádio mais oxidada e a subsequente complexação da espécie reduzida impede a acumulação de vanádio(V) nas células, impedindo as acções inibitórias de diferentes enzimas, cujos efeitos poderiam causar severos danos celulares. No entanto, e uma vez que a redução do vanadato a vanadilo é lenta, os efeitos fisiológicos intracelulares do vanádio dever-se-ão, principalmente, à espécie V(V), resultando estes, provavelmente, da sua capacidade oxidante. O vanadato interfere com enzimas que contêm fosfato, tais como fosfohidrolases de

ATP, cinase de adenilato, desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato, ribonucleases, entre outras, para concentrações extracelulares relativamente elevadas ($\mu\text{mol-nmol}$). Participa, ainda, na formação de radicais livres, devido ao seu efeito pró-oxidante sobre o NADPH (fosfato de dinucleótido nicotinamida-adenina) e outros agentes redutores extracelulares. Geralmente o vanádio não se associa a compostos orgânicos (Barceloux & Barceloux, 1999).

Como se pode observar pelo gráfico apresentado na Figura I.3, o número de publicações sobre o vanádio e sobre a interacção deste com proteínas tem aumentado significativamente nos últimos anos, o que comprova o elevado interesse que este tipo de estudos apresenta. Na década de 70 do século passado despoletaram os estudos sobre o vanádio e proteínas, os quais tiveram o seu auge nos anos oitenta. Grande parte destes estudos incluíram diferentes proteínas, tais como, ATPases, ribonucleases, cinases, entre outras, tal como acima descrito.

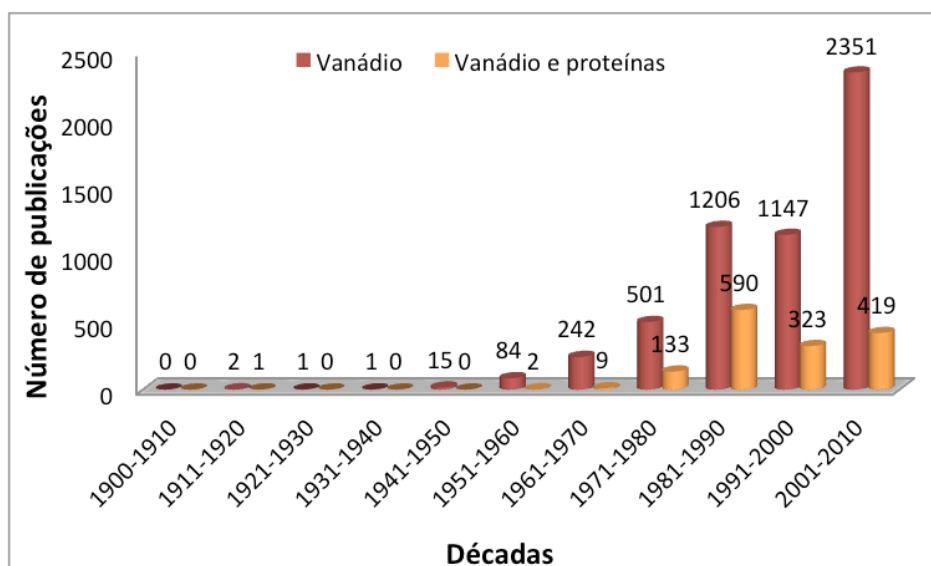


Figura I.3 – Representação gráfica do número de publicações das últimas onze décadas sobre o vanádio (barras vermelhas) e a interacção deste com proteínas (barras laranjas). Os dados foram obtidos usando as palavras *vanadium* e *vanadium AND proteins*, respectivamente, no campo de busca da base de dados PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

I.I.5 Interesse biológico do vanádio

De acordo com o conhecimento actual, o interesse biológico do vanádio deve-se, essencialmente, a (i) regulação de enzimas envolvidas no metabolismo de fosfato; (ii) acumulação em tunicatos (organismos invertebrados que vivem nos oceanos), nos quais se encontra presente em vacúolos especializados, vanadócitos, nas formas V(III) ou V(IV) (Wever & Kustin, 1990); (iii) acumulação em cogumelos da espécie *Amanita*, sob a forma de um complexo de baixa massa molecular designado por amavadina (V(IV)), cuja função não se encontra ainda estabelecida

(Fraústo da Silva, 1989); (iv) catálise da halogenação de substratos inorgânicos por haloperoxidasas dependentes de vanadato, em algas; a forma activa destas enzimas não-hémicas contém V(V), encontrando-se o ambiente de coordenação em torno do metal ainda em discussão (Butler & Carrano, 1991; Wever & Kustin, 1990); e (v) catálise da protonação redutora de N_2 a NH_4^+ por nitrogenases dependentes de vanádio em bactérias fixadoras de azoto, tais como a *Azotobacter*, pensa-se que o vanádio, provavelmente nos estados de oxidação V(II)/V(III) faz parte de um centro metálico de vanádio-enxofre (Eady, 1995).

Do ponto de vista fisiológico, a regulação de enzimas envolvidas no metabolismo do fosfato é a característica do vanádio mais importante, tornando este elemento vestigial potencialmente essencial para todos os organismos, o que se deve à analogia existente entre o vanadato e o fosfato (Rehder, 1992; Crans *et al.*, 2004; Aureliano & Gândara, 2005; Aureliano, 2009; Aureliano & Crans, 2009), discutida em maior detalhe no Capítulo IV.

I.2 Contração muscular

I.2.1 Músculo estriado esquelético

A capacidade que os organismos vivos possuem para se movimentarem constitui uma das suas características fundamentais. No entanto, os mecanismos subjacentes a esta capacidade variam de organismo para organismo, sendo a contração muscular um exemplo bastante especializado deste fenómeno, sendo bem compreendido a nível molecular, não obstante ser bastante complexo. Este conhecimento sobre a contração muscular tem sido determinante para a compreensão de outros sistemas menos complexos de mobilidade celular, o que contrasta com o sucedido noutras áreas da biologia molecular, nas quais o conhecimento sobre processos mais complexos advém da compreensão dos organismos menos evoluídos (Bagshaw, 1982).

Morfofisiologicamente, os músculos classificam-se em estriados e lisos. Os músculos estriados, assim denominados pelo facto de ao microscópio se notar uma alternância entre zonas escuras e claras, de onde resulta uma aparência estriada, podem ainda ser divididos em duas subclasses, esquelético e cardíaco.

Os músculos estriados esqueléticos são assim designados por se encontrarem ligados aos ossos das pernas, braços e coluna vertical, sendo constituídos por feixes de células longas e multinucleadas, resultantes da fusão de várias células precursoras (ou mioblastos) e encontrando-se associados à contração voluntária em actividades coordenadas complexas. A contração destes músculos é forte e rápida, da ordem dos milissegundos (Azevedo, 1999).

Estes músculos consistem em feixes paralelos de células musculares esqueléticas (ou miofibras), as quais possuem um diâmetro compreendido entre 20 e 100 μm e podem ter vários centímetros de comprimento. Cada miofibrila encontra-se delimitada pelo sarcolema (membrana plasmática) e contém até 100 núcleos localizados perifericamente, sendo estas constituídas, por sua vez, por cerca de mil feixes de miofibrilas ordenados paralelamente no seu interior e com diâmetros entre 1 e 2 μm , os quais ocupam cerca de 80 % do volume da miofibrila.

No músculo estriado esquelético, as zonas escuras e claras observadas ao microscópio polarimétrico correspondem a zonas de maior e menor densidade electrónica, sendo designadas por bandas A (de *anisotropia*, polarização da luz visível) e I (de *isotropia*; não polariza a luz visível de forma tão acentuada como a banda A), respectivamente (Fig. I.4). A banda I é dividida transversalmente por uma linha mais escura (de maior densidade, altamente refractiva), denominada linha Z. A unidade fundamental da contracção muscular, repetida regularmente ao longo das miofibrilas, designa-se por sarcómero e possui um comprimento de 2,5 a 3,0 μm quando o músculo se encontra relaxado, tornando-se mais curta aquando da contracção muscular. É de salientar, ainda, que no interior de cada banda A existe uma zona mais clara (menos densa), denominada zona H, bastante rica em enzimas importantes para o metabolismo celular, no centro da qual se localiza um alinhamento perpendicular mais escura, a linha M (Bagshaw, 1982).

Dados obtidos com recurso à microscopia electrónica mostraram que cada sarcómero é constituído, essencialmente, por dois tipos de filamentos proteicos: (i) filamentos grossos, constituídos pela miosina, e (ii) filamentos finos, que contêm a actina. A distribuição destes filamentos ao longo dos sarcómeros não é uniforme: em repouso, os filamentos de actina têm uma extremidade inserida na linha Z, enquanto a outra extremidade se prolonga em direcção ao centro de cada sarcómero, não o atingindo, contudo. A banda I é, deste modo, constituída exclusivamente pelos filamentos finos de actina. Por seu turno, os filamentos de miosina encontram-se a meio de cada sarcómero, sendo os constituintes maioritários da banda A. A banda H central é constituída unicamente pelos filamentos grossos. Na restante banda A, de um e de outro lado da banda H, coexistem os dois tipos de filamento, que se interpenetram. O contacto entre os dois filamentos é estabelecido por projecções dos filamentos grossos que formam as chamadas pontes transversais, as quais sobressaem do filamento de miosina a intervalos regulares de 143 Å, com um desfasamento angular de 120° entre duas projecções consecutivas. Cada filamento fino encontra-se rodeado por três filamentos grossos e cada um destes por seis filamentos finos (Azevedo, 1999).

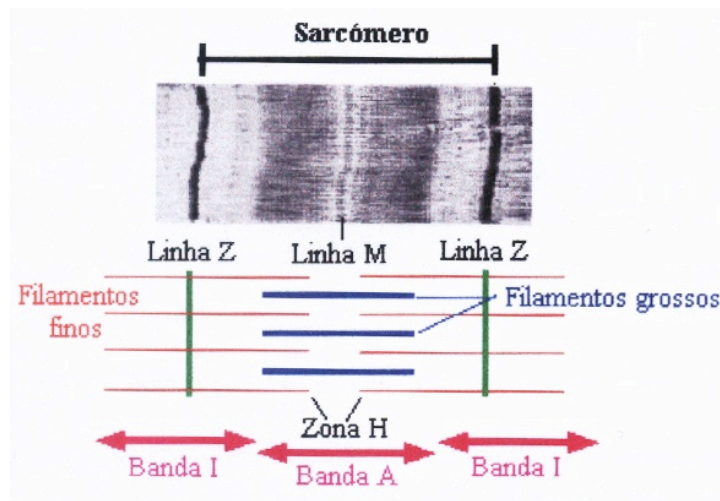


Figura I.4 – Representação esquemática do sarcômero, unidade funcional e estrutural do músculo estriado esquelético. Os filamentos finos e grossos são constituídos maioritariamente por F-actina e miosina, respectivamente.

I.2.2 Proteínas constituintes das miofibrilas

A miosina (55 %) e a actina (20 %) são os maiores constituintes das miofibrilas. A troponina e a tropomiosina, proteínas regulatórias, encontram-se associadas ao filamento de actina. O filamento de miosina contém, também, algumas proteínas associadas, entre as quais as proteínas constituintes da linha M e a proteína C, as quais se encontram, possivelmente, envolvidas no arranjo estrutural deste filamento (Bagshaw, 1982).

I.2.2.1 Actina

A actina constitui uma família altamente conservada de proteínas citoplasmáticas, encontrando-se em todos os eucariotas, existindo evidências de que não se encontrará em nenhum procarionte. Convencionalmente, as actinas possuem, na sua maioria, massas moleculares relativas próximas de 42 kDa, o que pode ser explicado pelo facto de apresentarem um elevado grau de conservação na sequência e número de aminoácidos. Nos eucariotas superiores existe um grande número de isoformas desta proteína, sendo estas codificadas por um número ainda maior de genes. As isoformas são expressas diferencialmente em diferentes tecidos especializados, o que sugere que cada uma delas possui funções distintas e que existem mecanismos que as direccionam para as suas diversas localizações. Adicionalmente, foi observado que os ARNm (ácido ribonucleico mensageiro) para as diferentes isoformas também se encontram distribuídos heterogeneamente nas células, de forma semelhante aos seus produtos

proteicos (Hill & Gunning, 1993), o que sustenta a hipótese de direcionamento das isoformas de actina para um determinado local no interior da célula, de acordo com as suas funções.

A actina está envolvida em processos de contracção muscular, fagocitose, manutenção e alteração da estrutura celular, movimento, transporte de organelos, regulação do transporte de solutos, entre outros (Korn, 1982; Kabsch & Holmes, 1995). De facto, existe um grande número de evidências de que a actina do citoesqueleto se encontra envolvida no transporte de determinados organelos numa grande variedade (e possivelmente em todas) de células eucariotas. Nas leveduras, por exemplo, a actina encontra-se envolvida no transporte de organelos no axoplasma (Bearer *et al.*, 1996) ou grânulos com o pigmento retinóide (Burnside & King-Smith, 1997), entre outros.

No entanto, até ao momento, a isoforma- α (α -actina), presente no músculo esquelético dos vertebrados, é a mais estudada, encontrando-se envolvida no processo da contracção muscular (Sheterline *et al.*, 1998).

Os filamentos de actina medem cerca de 1 μm e têm um diâmetro de 80 Å, consistindo em duas cadeias de actina filamentosa (F-actina) organizados em hélice α (Highsmith, 1999), sobre os quais se localizam ainda outras proteínas, como a troponina (I, C e T) e a tropomiosina (Fig. I.5). A troponina é uma proteína filamentosa que se localiza nas depressões da hélice de F-actina e que confere rigidez aos filamentos finos; a tropomiosina é essencial na regulação da contracção muscular, como será descrito mais detalhadamente adiante.

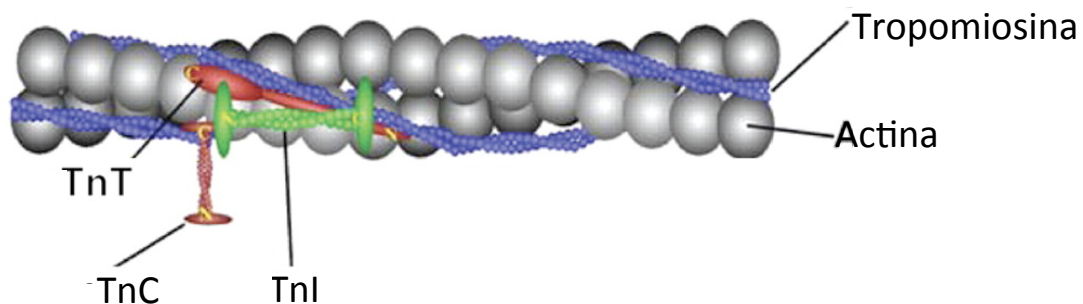


Figura I.5 – Modelo estrutural do filamento de F-actina contendo tropomiosina e o complexo de troponinas I, C e T (TnI, TnC e TnT). Adaptado de Hamdani *et al.*, 2008.

A F-actina, única forma com capacidade de estimular a actividade de ATPase de miosina, é formada pela polimerização de subunidades globulares de actina, designadas por G-actina (42 kDa). A análise de cristais de G-actina por difracção de raios-X mostrou que esta proteína é composta por dois domínios de tamanho bastante semelhante, ligados covalentemente por apenas duas fitas da cadeia polipeptídicas que se encontram na base da molécula, o que permite o seu movimento. Cada um destes é constituído por cinco folhas- β e hélices- α associadas,

encontrando-se separados pelo bolso de ligação de cátions divalentes (Mg^{2+} ou Ca^{2+}) e dos nucleótidos ADP (adenosina 5'-difosfato) ou ATP (Schutt *et al.*, 1989; Kabsch *et al.*, 1990; McLaughlin *et al.*, 1993). Estes resultados permitiram esclarecer qual o papel estrutural destes íons e dos nucleótidos na polimerização da actina e na estrutura do filamento fino (Egelman & Orlova, 1995). O modelo de resolução atómica mostrou que estes dois domínios se encontram, por sua vez, subdivididos noutros dois de menores dimensões, designados por 1, 2, 3 e 4, encontrando-se as regiões N-terminal e C-terminal próximas uma da outra, no subdomínio 1 (Sheterline *et al.*, 1998) (Fig. I.6). Cada um dos subdomínios encontra-se, por seu turno, envolvido em interacções actina-actina ou na formação do topo do local de ligação do nucleótido (Kabsch *et al.*, 1990).

Quando os monómeros de actina são incorporados no filamento a sua conformação é alterada, ocorrendo, de igual modo, um rearranjo estrutural interno aquando da ligação da F-actina à miosina (Barden & dos Remédios, 1985; Mossakowska *et al.*, 1988).

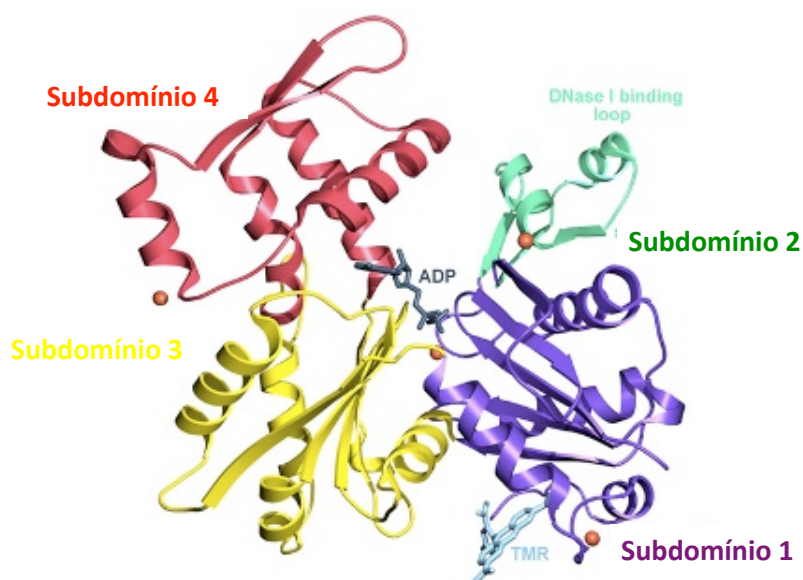


Figura I.6 – Estrutura do monómero de actina. PDB: 1J6Z (Otterbein *et al.*, 2001).

A formação do filamento de actina é acompanhado pela hidrólise estequiométrica de ATP, a qual ocorre após a incorporação de cada monómero (e não durante o processo de polimerização), formando-se ADP-F-actina. Comparando as velocidades de adição de um novo monómero ao filamento e de hidrólise de ATP numa população de filamentos em rápida formação, observa-se que a hidrólise ocorre mais lentamente que a montagem do polímero (Korn *et al.*, 1987), pelo que a reacção de hidrólise deste nucleótido não se encontra acoplada ao local de formação do polímero de F-actina. Estimou-se que a reacção de hidrólise de ATP ocorre com uma constante de velocidade de $0,02\text{ s}^{-1}$, ou seja, existe a probabilidade de 1 molécula de ATP se

hidrolisar por segundo por 50 monómeros que se associam ao filamento (Pollard & Weeds, 1984). O produto imediato da hidrólise de ATP consiste num monómero ADP.P_i.G-actina na F-actina. A libertação do fosfato inorgânico em uma menor probabilidade de ocorrer que a hidrólise, com uma constante de dissociação de 0,006 s⁻¹ (Carlier, 1987), ou seja, 1 molécula de P_i libertada por segundo por 170 monómeros associados. Assim, o filamento, que se formou no estado ATP.F-actina, torna-se ADP.F-actina, através de um intermediário ADP.P_i.F-actina. Este facto torna as extremidades do filamento de F-actina distintas entre si: se se considerar o polímero como uma seta, o lado correspondente à ponta possuirá um monómero no estado ATP.G-actina (ou ADP.P_i.G-actina), enquanto o lado oposto apresentará um monómero ADP.G-actina.

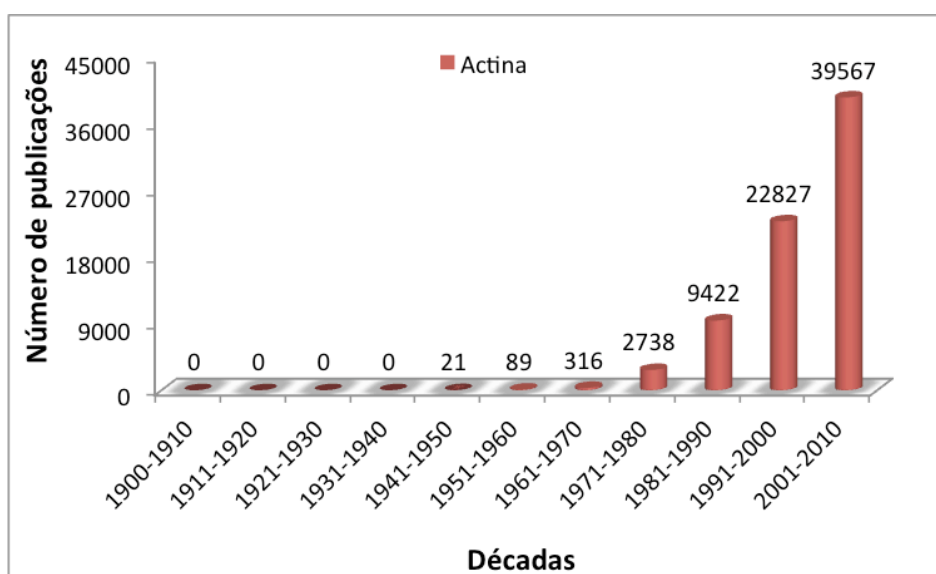


Figura I.7 – Representação gráfica do número de publicações das últimas onze décadas relacionadas com a actina. Os dados foram obtidos usando a palavra *actin* no campo de busca da base de dados PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Nas últimas décadas o número de trabalhos publicados sobre (ou relacionados com) a actina tem aumentado significativamente (Fig. I.7), o que demonstra a actualidade dos estudos que envolvam esta proteína.

I.2.2.2 Miosina

O termo *miosina* é usado actualmente para uma variada superfamília de motores moleculares cuja característica que os distingue é a capacidade que possuem para se ligarem de forma reversível à actina e hidrolisarem ATP, convertendo energia química em energia mecânica.

Esta superfamília possui, pelo menos, 15 classes distintas, baseando-se as divisões na homologia existente entre as suas diferentes sequências (Sellers, 1999).

A miosina do tipo II (miosina II) é a mais bem estudada, talvez por estar presente em células musculares e não musculares, sendo a que se encontra nos filamentos grossos do músculo estriado esquelético (Squire, 1981). É constituída por duas cadeias polipeptídicas idênticas, enroladas entre si e denominadas cadeias pesadas de miosina, HC (do inglês *heavy chains*) (200 kDa). Estas cadeias são constituídas por uma zona globular e outra filamentosa em hélice α . A zona globular, também designada por cabeça, situa-se na região N-terminal de cada cadeia pesada e tem 40 Å de diâmetro. É nesta região que se encontram os locais de ligação de actina e de ATP ou outros nucleótidos (Lowey, 1979) (Fig. I.8).

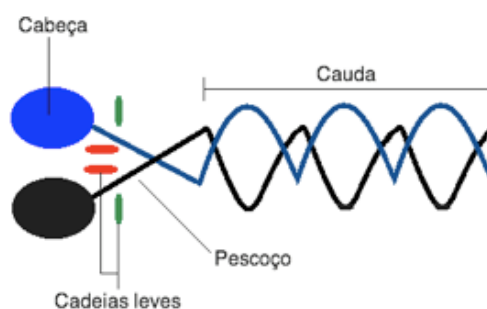


Figura I.8 – Estrutura esquemática da molécula de miosina II. Destacam-se as duas cabeças globulares e a cauda filamentosa, ligadas entre si por uma zona flexível denominada pescoço. As cadeias leves (a verde e vermelho) encontram-se associadas às cabeças globulares.

Cada molécula de miosina possui, assim, duas cabeças globulares, às quais se encontram associadas dois pares de cadeias leves, (i) essenciais (ELC, do inglês *essential light chains*) ou (ii) regulatórias (RLC, do inglês *regulatory light chains*), com massas moleculares de 15 e 22 kDa, respectivamente. As cadeias leves, de acordo com o seu grau de fosforilação, possuem capacidade regulatória da actividade ATPásica das cadeias pesadas a que se encontram associadas. As zonas filamentosas das cadeias pesadas de miosina, localizadas na extremidade C-terminal, encontram-se enroladas, formando uma cauda relativamente rígida. Entre a cauda e a cabeça existe uma zona flexível, denominada pescoço (Azevedo, 1999) (Fig. I.8).

A miosina II existe apenas na forma de molécula simples para forças iónicas elevadas. Contudo, nas condições fisiológicas, forma agregados. Deste modo, estes últimos serão uma entidade bipolar na qual as cabeças globulares de miosina, carregadas positivamente, se encontram localizadas nas extremidades, encontrando-se separadas pelas respectivas caudas, carregadas negativamente.

Szent-György (1953) demonstrou que a miosina II pode ser clivada em dois fragmentos por acção da tripsina: (i) meromiosina leve (LMM, do inglês *light meromyosin*), constituída pela

cauda e que não possui actividade ATPásica nem capacidade para se associar às cadeias leves, e (ii) meromiosina pesada (HMM, do inglês *heavy meromyosin*), formada pelas duas zonas globulares e pelo pescoço, não formando agregados e ligando-se às cadeias leves, possuindo actividade catalítica. Uma subsequente clivagem enzimática de HMM origina os subfragmentos-1 (S1) e 2 (S2) (Fig. I.9).

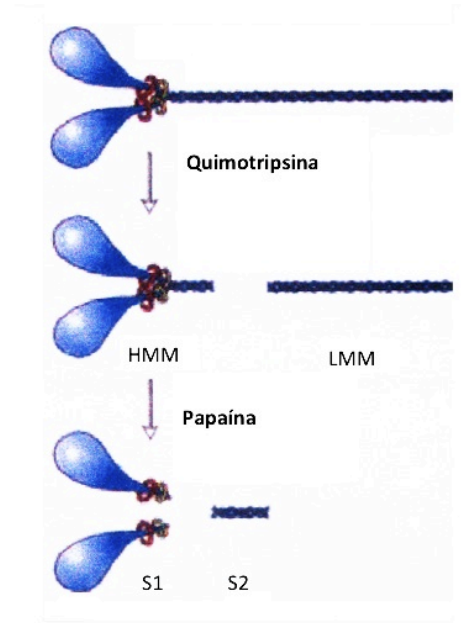


Figura I.9 – Clivagem proteolítica da molécula de miosina II. A quimotripsina cliva a molécula na zona flexível da cauda em dois fragmentos: meromiosina leve (LMM) e meromiosina pesada (HMM). A digestão com papaína origina os subfragmentos S1 e S2. Adaptado de Lodish *et al.*, 2000.

O subfragmento-1 possui 165 Å de comprimento, 65 Å de largura e 40 Å de espessura. É constituído pelo domínio da cabeça, encontrando-se associado a ambos os pares de cadeias leves ou apenas às essenciais, dependendo das condições em que a clivagem foi efectuada (Fig. I.10). O subfragmento-1 possui actividade ATPásica e o local de ligação à actina (Rayment *et al.*, 1993a). Além disso, possui dois locais sensíveis à proteólise, donde resulta a formação de outros três fragmentos: (i) segmento N-terminal de 25 kDa com capacidade para ligar os nucleótidos ADP ou ATP, (ii) outro central de 50 kDa onde se liga a actina e (iii) a região C-terminal, de 20 kDa (Mornet & Ue, 1984).

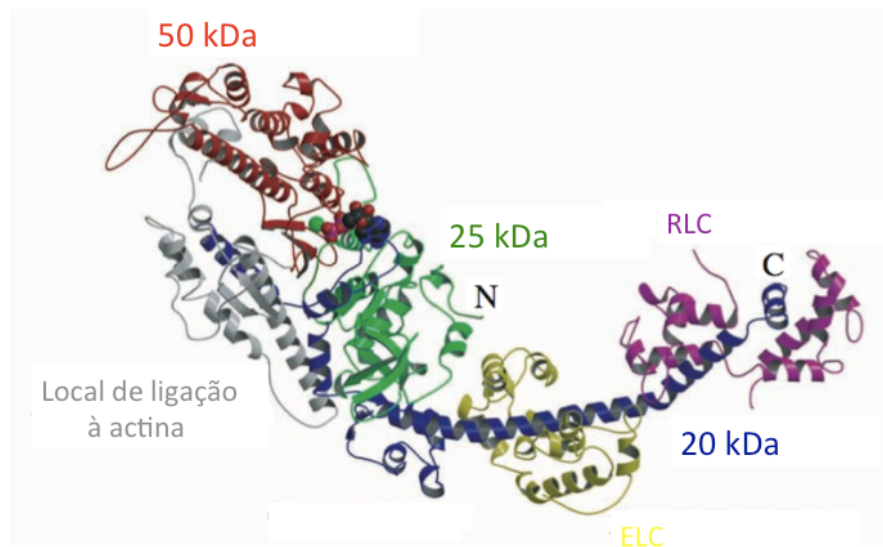


Figura I.10 – Representação em *cartoon* do subfragmento-1 de miosina de músculo esquelético de galinha mostrando a estrutura secundária dos domínios principais. Os fragmentos proteolíticos estão coloridos da seguinte forma: verde para o de 25 kDa N-terminal; vermelho para o de 50 kDa central; azul para o de 20 kDa C-terminal. O local de ligação à actina encontra-se colorido a cinzento, fazendo esta região parte do fragmento de 50 kDa. As cadeias leves essenciais (ELC) e regulatórias (RLC) estão coloridas a amarelo e rosa, respectivamente. Adaptado de Rayment, 1996.

I.2.3 Mecanismos moleculares da contracção muscular

A contracção ocorre, essencialmente, quando os filamentos de actina deslizam sobre os de miosina, o que foi proposto simultaneamente por Huxley & Niedergerke (1954) e Huxley & Hanson (1954). Este modelo tem como bases experimentais o facto do tamanho dos filamentos não se alterar durante todo o processo da contracção muscular e a banda A apresentar sempre as mesmas dimensões, enquanto a banda I e a zona H diminuem consideravelmente o seu comprimento aquando da contracção.

Assumindo que a interacção entre a miosina e a actina não se encontra inibida, na ausência de ATP estas duas proteínas encontram-se fortemente associadas (complexo actomiosina, AM) (Fig. I.11). Nesta conformação, as cabeças de miosina formam um ângulo de 45° com o eixo do filamento fino (Reedy *et al.*, 1965). Na presença de ATP o complexo AM dissocia-se (a afinidade do complexo miosina-ATP para a actina é 105 vezes menor do que a afinidade da miosina para a actina sem o substrato), ligando-se o nucleótido à miosina (M-ATP + A).

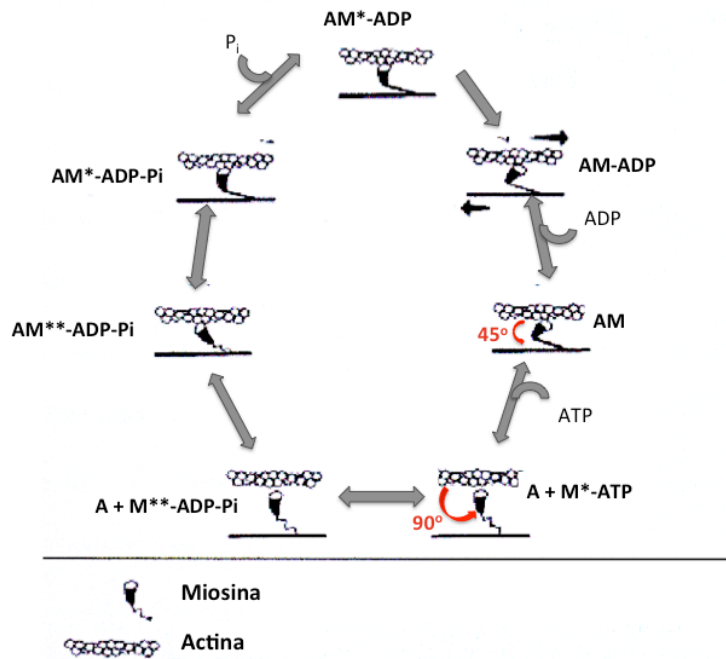
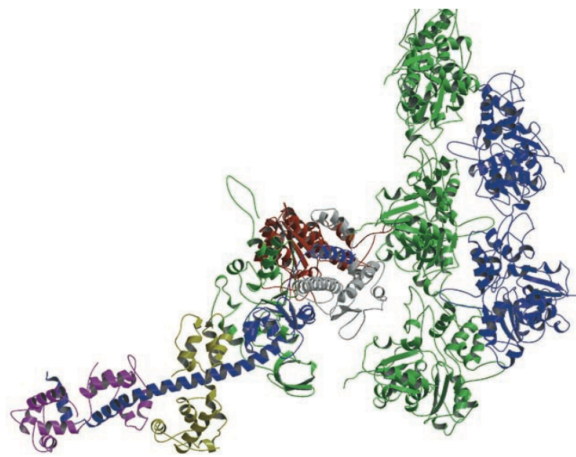


Figura I.11 – Modelo do mecanismo de hidrólise do ATP pelo complexo actomiosina no processo de contracção muscular, onde A = actina e M = miosina. Adaptado de Spudish, 1994.

De seguida, ocorre hidrólise de ATP, permanecendo o ADP e o fosfato inorgânico (P_i) ligados à molécula de miosina ($M-ADP-P_i + A$). Este complexo pode, então, ligar-se à actina, formando-se $AM-ADP-P_i$, no qual as cabeças de miosina fazem um ângulo de 90° com o eixo do músculo (Reedy *et al.*, 1965). A libertação de P_i e ADP, por esta ordem, e, possivelmente, a energia proveniente da hidrólise de ATP provocarão uma alteração no ângulo de ligação das cabeças de miosina ao filamento de actina, o qual passará de 90° novamente para 45° . Esta alteração conformacional promove um deslizamento do filamento de actina para o centro do sarcómero e o encurtamento deste promove, por seu turno, a contracção das miofibrilas (Hibberd *et al.*, 1985). Todo este processo demora cerca de 1 milissegundo (Lymn & Taylor, 1971).

A estequiometria do complexo actomiosina tem sido amplamente estudada e motivo de forte debate. Existem evidências experimentais que uma molécula de subfragmento-1 se liga a uma molécula de actina monomérica ou que uma moléculas de S1 se ligará a duas de G-actina. Dados obtidos com recurso à difracção de raios-X (Amos *et al.*, 1982; Holmes, 1997) e à microscopia electrónica (Milligan, 1996) sugerem que cada S1 interactue com dois monómeros de actina subjacentes, ocorrendo os contactos entre ambos essencialmente em quatro áreas: (i) contacto entre o *loop-2* (liga os segmentos de 50 e 20 kDa da molécula da miosina) rico em glicinas e lisinas com aminoácidos carregados negativamente no primeiro monómero de actina;

(ii) contacto estereoespecífico e hidrofóbico entre o domínio inferior do segmento de 50 kDa e os dois monómeros de actina; (iii) contacto entre o loop exposto na ponta do domínio superior do segmento de 50 kDa e o primeiro monómero de actina; e (iv) interacção electrostática entre o domínio inferior do segmento de 50 kDa e o segundo monómero de actina (Rayment *et al.*, 1993b; Holmes, 1997) (Fig. I.12).



← Subfragmento-1 → ← F-actina →

Figura I.12 – Estrutura do complexo actomiosina. A molécula de F-actina (à direita) apresentada é constituída por 5 monómeros de G-actina. O subfragmento-1 de miosina (à esquerda) estabelece uma ponte cruzada com dois monómeros de actina subjacentes. Adaptado de Greeves & Holmes, 1999.

Experiências de *cross-linking* efectuadas em solução ou com as miofibrilas directamente confirmaram a interacção de um S1 com dois monómeros de actina, quando a actina se encontra em excesso relativamente ao subfragmento-1 de miosina (Bonafé & Chaussepied, 1995; Van Dijk *et al.*, 2000). Os locais envolvidos na reacção de *cross-linking* englobam (i) o segmento compreendido pelos aminoácidos 1-12 localizados na região N-terminal do S1 e dois monómeros de actina adjacentes, e (ii) os *loops* 2 e 3, formados, respectivamente, pelos resíduos 626-647 e 565-579 da miosina (Rayment *et al.*, 1993b; Bonafé & Chaussepied, 1995; Andreev & Borejdo, 1991; Holmes, 1997; Chaussepied & Van Dijk, 1999). Além disso, verificou-se que o grau de saturação do filamento fino pelo S1 altera a protecção pela actina da degradação proteolítica da miosina (Mornet *et al.*, 1981; Yamamoto, 1990), os parâmetros cinéticos da ligação do ATP ao complexo actomiosina (Tesi *et al.*, 1990), bem como a ligação de S1 ao segundo monómero de actina (Andreev & Borejdo, 1991). Estudos realizados por Van Dijk *et al.* (2000) demonstraram, no entanto, que a ligação de subfragmento-1 de miosina aos dois monómeros de actina adjacentes ocorre para tempos de reacção idênticos, não sendo dependentes da razão actina/S1 para intervalos de tempo compreendidos entre 0,3 e 20 segundos. Os dados obtidos por estes autores excluíram um mecanismo pelo qual a miosina desliza de um para outro monómero de

actina, na escala de tempo dos segundos ou minutos, sugerindo a ocorrência de alterações mais subtis na interface do complexo actomiosina durante o ciclo de hidrólise de ATP.

1.2.4 Regulação da contracção muscular

O mecanismo de regulação da contracção muscular foi inicialmente descrito por Haselgrove (1973), Huxley (1973) e Parry & Squire (1973), encontrando-se as proteínas associadas ao filamento fino (tropomiosina e troponina) directamente implicadas. Além disso, no músculo relaxado a concentração de iões Ca^{2+} é bastante baixa (10^{-7} M), aumentando consideravelmente aquando da contracção (10^{-5} - 10^{-3} M), o que levou a sugerir que o cálcio possui, também, um papel importante na regulação deste processo.

De uma forma bastante simplificada, quando o músculo esquelético é excitado, a despolarização da membrana plasmática é transmitida ao interior do tecido através dos túbulos transversais (ou túbulos T; consistem em invaginações da membrana plasmática da fibra muscular), provocando a abertura de canais iónicos específicos para o Ca^{2+} existentes no retículo sarcoplasmático (RS) adjacente. Uma vez que a concentração deste ião no interior do organelos é muito elevada, este passa rapidamente para o citoplasma da célula, distribuindo-se de forma uniforme. Deste modo, a regulação da contracção no músculo esquelético pode ocorrer de forma rápida e coordenada em todas as miofibrilas que compõem o tecido.

Em repouso, a troponina I dispõe-se de tal modo que obriga a troponina C a encontrar-se numa posição que impede a ligação das cabeças de miosina à actina ($\Theta = 50^\circ$). O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular conduz a uma maior disponibilidade deste pra se ligar a troponina C (Fig. I.13).

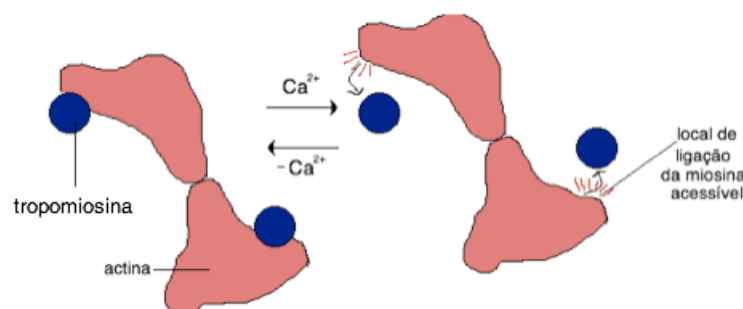


Figura I.13 – Representação esquemática da regulação da contracção em músculos estriados esqueléticos pelo complexo troponina/tropomiosina. À esquerda, estado de repouso: a tropomiosina bloqueia o local de ligação da miosina à F-actina. À direita, contracção: ocorre o deslocamento da tropomiosina e a ligação entre a miosina e a F-actina pode ocorrer.

Quando tal se verifica, a troponina C altera a sua conformação ($\Theta = 70^\circ$), associando-se fortemente à troponina I, que deixa de inibir a ligação das pontes transversais. Esta alteração conformacional é transmitida à tropomiosina através da troponina T e, como resultado final, a tropomiosina desloca-se em direcção ao interior do sulco do filamento de actina, permitindo uma interacção eficaz entre a F-actina e a miosina. De modo a cessar a actividade contráctil, a bomba de Ca^{2+} existente no retículo sarcoplasmático (Ca^{2+} -ATPase de RS) reacumula o ião cálcio neste organelos, impedindo que a contracção se prolongue demasiado.

I.3 Vanádio e contracção muscular: passado, presente e futuro

O interesse do estudo do vanádio associado a proteínas do sistema contráctil, e de modo geral à biologia, iniciou-se em 1977, quando a impureza contida no ATP comercial preparado a partir de músculo de cavalo, responsável pela inibição de Na^+, K^+ -ATPase, foi identificada como sendo o ortovanadato (VO_4^{3-}), tendo este sido inicialmente identificado como um factor de inibição muscular (MIF, do inglês *muscle inhibitory factor*) (Josephson & Cantley Jr., 1977). No entanto, o enzima cinase do adenilato, isolado a partir de músculo esquelético de coelho, foi o primeiro cuja inibição pelo decavanadato foi reportada (DeMaster & Mitchell, 1973).

Os primeiros estudos sobre a interacção entre o vanadato e a miosina foram realizados por Gibbons *et al.* (1978), tendo estes autores verificado que concentrações deste metal inferiores a 0,5 mM não inibiam a sua actividade enzimática. No entanto, tal não se veio a confirmar, uma vez que foi demonstrado que nesta gama de concentrações o vanadato monomérico inibia a miosina através da formação de um complexo miosina-ADP-vanadato (M.ADP.V_i^\dagger) bastante estável, o qual funciona como um análogo do intermediário miosina-ADP-fosfato (M.ADP.P_i^*) (Johnson & Taylor, 1978; Goodno, 1979).

Desde então foram publicadas importantes contribuições para a caracterização do local activo e para a detecção de alterações conformacionais da miosina provocadas pela hidrólise do ATP, com base na cinética de inibição do ATPase de miosina por diferentes espécies de vanadato, nomeadamente as espécies monomérica, dimérica, tetramérica, hexamérica e decamérica (Goodno & Taylor, 1982; Ringel *et al.*, 1990; Aureliano, 2000; Aureliano & Gândara, 2005; Aureliano, 2009; Aureliano & Crans, 2009). A interacção das espécies oligoméricas, contrariamente à monomérica, não depende da formação de um complexo ternário com o nucleótido no local activo. De facto, a espécie decamérica de vanadato inibe a ATPase de miosina através da ligação à *backdoor* deste enzima (Tiago *et al.*, 2004).

Estudos sobre o efeito do vanadato em fibras de músculo esquelético de coelho foram conduzidos por Dantzig & Goldman (1985), tendo sido concluído, de forma surpreendente, que a presença de V_i inibia a produção de força com uma ordem de grandeza superior à inibição observada para a actividade do ATPase de subfragmento-1 de miosina estimulada por F-actina, em solução.

Se o sistema miosina-vanádio se encontra amplamente caracterizado, no que à actina diz respeito existem poucos estudos sobre o efeito de compostos de vanádio no equilíbrio entre as formas monomérica (G-actina) e filamentosa (F-actina), bem como no efeito que a presença deste metal provoca na sua capacidade de estimular a actividade ATPásica de miosina. Combeau & Carlier (1988) demonstraram que concentrações de ortovanadato até 2 mM promovem o aumento das interacções actina-actina, de modo semelhante ao fosfato inorgânico. Contudo, o aumento da concentração de vanadato (2-20 mM) provocará alguma deformação na molécula de actina, resultando o acumular destas na destabilização da estrutura do filamento.

No entanto, e uma vez que o vanádio apresenta uma química extremamente complexa em solução aquosa, os efeitos promovidos pelas diferentes espécies podem ter sido putativamente atribuídos. Torna-se, assim, de todo o interesse determinar quais as alterações funcionais e estruturais sofridas pela actina, na presença de diferentes espécies de vanádio, tais como vanadato monomérico e oligovanadatos, e o vanadilo.

I.4 Referências bibliográficas

- Amos, L. A., H. E. Huxley, K. C. Holmes, R. S. Goody, K. A. Taylor (1982) “*Structural evidence that myosin heads may interact with two sites on F-actin*”, **Nature** 299:467-469;
- Andreev, O. A. & J. Borejdo (1991) “*Two different rigor complexes of myosin subfragment 1 and actin*”, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 177:350-356;
- Aureliano, M. (2000) “*Vanadate oligomer interactions with myosin*”, **J. Inorg. Biochem.** 80:141-143;
- Aureliano, M, R. M. C. Gândara (2005) “*Decavanadate effects in biological systems*”, **J. Inorg. Biochem.** 99:979–985;
- Aureliano, M. (2009) “*Decavanadate: a journey in a search of a role*”, **Dalton Trans.** 9093-9100;
- Aureliano, M., Crans, D. C. (2009) “*Decavanadate ($V_{10}O_{28}^{6-}$) and oxovanadates: oxometalates with many biological activities*”, **J. Inorg. Biochem.** 103:536-546;
- Azevedo, C. (1999) “*Biologia Celular e Molecular*”, 3ª edição, Lidel;
- Baes, C. F. & R. E. Mesmer (1976) “*The hydrolysis of cations*”, John Wiley & Sons, New York;
- Bagshaw, C. R. (1982) “*Outline Studies in Biology - Muscle Contraction*”, 2nd edition, Chapman and Hall Editions, New York;
- Barceloux, D. G. & D. Barceloux (1999) “*Vanadium*”, **J. Toxicol. Clin. Toxicol.** 37:265-278;
- Barden, J. A. & C. G. dos Remédios (1985) “*Conformational changes in actin resulting from Ca^{2+}/Mg^{2+} exchange as detected by proton NMR spectroscopy*”, **Eur. J. Biochem.** 146:5-8;
- Bearer, E. L., J. A. DeGiorgis, N. A. Medeiros, T. S. Reese (1996) “*Actin-based motility of isolated axoplasmic organelles*”, **Cell Motil. Cytoskeleton** 33:106-114;
- Bonafé, N. & P. Chaussepied (1995) “*A single myosin head can be cross-linked to the N termini of two adjacent actin monomers*”, **Biophys. J.** 68:35S-43S;
- Burnside, B. & C. L. King-Smith (1997) “*Actin dependent pigment granule transport in retinal pigment epithelial cells*”, **Biol. Bull.** 192:181-182;
- Butler, A. & C. J. Carrano (1991) “*Coordination Chemistry of Vanadium in Biological Systems*”, **Coord. Chem. Rev.** 109:61-105;
- Cantley Jr., L. C. & P. Aisen (1979) “*The fate of cytoplasmic vanadium: implications of (Na,K)-ATPase inhibition*”, **J. Biol. Chem.** 254:1781-1784;

- Cantley Jr., L. C., M. Resh, G. Guidotti (1978) "*Vanadate inhibits the red cell (Na⁺, K⁺) ATPase from the cytoplasmic side*", **Nature** 272:552-554;
- Carlier, M.-F. (1987) "*Measurement of P_i dissociation from actin filaments following ATP hydrolysis using a linked enzyme assay*", **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 143:1069-1075;
- Chasteen, N. D. (1983) "*The biochemistry of vanadium*", **Structure and Bonding** 53:105-138;
- Chasteen, N. D., E. M. Lord, H. J. Thompson, J. K. Grady (1986) "*Vanadium complexes of transferrin and ferritin in the rat*", **Biochim. Biophys. Acta** 884:84-92;
- Chaussepied, P. & J. Van Dijk (1999) "*Role of charges in actomyosin interactions*" In: **Molecular Interactions of Actin**, Springer-Verlag, Berlin & New York;
- Combeau, C. & M.-F. Carlier (1988) "*Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF₃⁻ and AlF₄⁻*", **J. Biol. Chem.** 263:17429–17436;
- Crans, D. C. (1994) "*Enzyme interactions with labile oxovanadates and other oxometalates*", **Comments Inorg. Chem.** 16:1-33;
- Crans, D. C., J. J. Smee, E. Gaidamauskas, L. Yang (2004) "*The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds*", **Chem. Rev.** 104:849-902;
- Dantzig, J. A. & Y. E. Goldman (1985) "*Suppression of muscle contraction by vanadate*", **J. Gen. Physiol.** 86:305-327;
- Day, V. W., W. G. Klemperer, D. J. Maltbie (1987) "*Where are the protons in H₃V₁₀O₂₈³⁻*", **J. Am. Chem. Soc.** 109:2991-3002;
- DeMaster, E. G. & R. A. Mitchell (1973) "*A comparison of arsenate and vanadate as inhibitors or uncouplers of mitochondrial and glycolytic energy metabolism*", **Biochemistry** 12:3616-3621;
- Eady, R. R. (1995) "*Vanadium nitrogenases of Azotobacter*" In: **Metal ions in biological systems**, H. Siegel & A. Siegel eds., vol. 31, Marcel Dekker, New York;
- Egelman, E. H. & A. Orlova (1995) "*New Insights Into Actin Filament Dynamics*", **Curr. Opin. Struct. Biol.** 5:172-180;
- Etcheverry, S. B. & A. M. Cortizo (1998) "*Bioactivity of vanadium compounds on cells in culture*" In: **Vanadium in the environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry**, J. O. Nriagu Ed., John Wiley & Sons, New York;

- Fraústo da Silva, J. J. R. (1989) “*Vanadium in biology - the case of the Amanita toadstools*”, **Chem. Spec. Bioavail.** 1:139-150;
- French, R. J. & P. J. H. Jones (1993) “*Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations*”, **Life Sci.** 52:339-346;
- Gibbons, I. R., M. P. Cosson, J. A. Evans, B. H. Gibbons, B. Houck, K. H. Martinson, W. S. Sale. W.-J. Tang (1978) “*Potent inhibition of dynein adenosinetriphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate*”, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75:2220-2224;
- Goodno, C. C. (1979) “*Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion*”, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76:2620-2624;
- Goodno, C. C. & E. W. Taylor (1982) “*Inhibition of actomyosin ATPase by vanadate*”, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79:21-25;
- Greenwood, N. N. & A. Earnshaw (1997) “*Chemistry of the elements*”, 2nd Ed., Butterworth-Heinemann;
- Hamdani, H., V. Kooij, S. van Dijk, D. Merkus, W. J. Paulus, C. dos Remedios, D. J. Duncker, G. J.M. Stienen, J. van der Velden (2008) “*Sarcomeric dysfunction in heart failure*”, **Cardiovasc. Res.** 77:649-658;
- Haselgrove, J. C. (1973) “*X-ray evidence for the conformational changes in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle*”, **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** 37:341-352;
- Heath, E., O. W. Howarth (1981) “*Vanadium-51 and oxygen-17 nuclear magnetic resonance study of vanadate(V) equilibria and kinetics*”, **J. Chem. Soc. Dalton Trans.** 1105-1110;
- Hibberd, M. G., M. R. Webb, Y. E. Goldman, D. R. Trentham (1985) “*Oxygen exchange between phosphate and water accompanies calcium-regulated ATPase activity of skinned fibers from rabbit skeletal muscle*”, **J. Biol. Chem.** 260:3496-3500;
- Highsmith, S. (1999) “*Lever Arm Model of Force Generation by Actin-Myosin-ATP*”, **Biochemistry** 38:9791-9797;
- Hill, M. A. & P. Gunning (1993) “*Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts*”, **J. Cell Biol.** 122:825-832;
- Holmes, K. C. (1997) “*The swinging lever arm hypothesis of muscle contraction*”, **Curr. Biol.** 7:R112-118;
- Huxley, A. F. & R. M. Niedergerke (1954) “*Structural changes in muscle during contraction*”, **Nature** 173:971-973;

- Huxley, H. E. & J. Hanson (1954) "*The cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation*", **Nature** 173:973-976;
- Huxley, H. E. (1973) "*Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction*", **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** 37:361-376;
- Johnson, K. A. & E. W. Taylor (1978) "*Intermediate states of subfragment 1 and actosubfragment 1 ATPase: reevaluation of the mechanism*", **Biochemistry** 17:3432-3442;
- Josephson, L. & L. C. Cantley Jr. (1977) "*Isolation of a potent (Na⁺-K⁺) stimulated ATPase inhibitor from striated muscle*", **Biochemistry** 16:4572-4578;
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, K. C. Holmes (1990) "*Atomic structure of the actin: DNase I complex*", **Nature** 347:37-44;
- Kabsch, W. & K. C. Holmes (1995) "*The actin fold*", **FASEB J.** 9:167-174;
- Korn, E. D. (1982) "*Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells*", **Physiol. Rev.** 62:672-737;
- Korn, E. D., M.-F. Carlier, D. Pantaloni (1987) "*Actin polymerization and ATP hydrolysis*", **Science** 238:638-644;
- Lodish, H., A. Berck, S. L. Zipurskt, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell (2000) "*Molecular Cell Biology*" 4th Edition, W. H. Freeman and Company;
- Lowey, S. (1979) **In: Fibrous Proteins: scientific, industrial and medical aspects**, Vol. 1, D. A. D. Parry & L. K. Creamer Eds., Academic Press;
- Lymn, R. W. & E. W. Taylor (1971) "*Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin*", **Biochemistry** 10:4617-4624;
- McLaughlin, P. J., J. T. Gooch, H.-G. Mannherz, A. G. Weeds (1993) "*Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing*", **Nature** 364:685-692;
- Milligan, R. A. (1996) "*Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex*", **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93:21-26;
- Mornet, D. R. Bertrand, P. Pantel, E. Audemard, R. Kassab (1981) "*Structure of the actin-myosin interface*", **Nature** 292:301-306;
- Mornet, D. & K. Ue (1984) "*Proteolysis and structure of skeletal muscle actin*", **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81:736-739;

- Mossakowska, M., J. Belagyi, H. Strzelecka-Golaszewska (1988) “An EPR study of the rotational dynamics of actins from striated and smooth muscle and their complexes with heavy meromyosin”, **Eur. J. Biochem.** 175:557-564;
- Nechay, B. R. (1984) “Mechanisms of action of vanadium”, **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 24:501-524;
- Nielsen, F. H. (1995) “Vanadium in mammalian physiology and nutrition”, **Met. Ions Biol. Syst.** 31:543-573;
- Nriagu, J. O. (1998) “History, occurrence and uses of vanadium”, **In: Vanadium in the environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry**, J. O. Nriagu eds., John Wiley & Sons, New York;
- Otterbein, L. R., P. Graceffa, R. Dominguez (2001) “The Crystal Structure of Uncomplexed Actin in the ADP State”, **Science** 293:708-711;
- Parry, D. A. D. & J. M. Squire (1973) “Structural role of tropomyosin in muscle regulation. Analysis of the X-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles”, **J. Mol. Biol.** 75:33-35;
- Pettersson, L., B. Hedman, I. Andersson, N. Ingri (1983) “Multicomponent polyanions. 34. A potentiometric and ^{51}V NMR study of equilibria in the H^+ - HVO_4^{2-} system in 0.6 M Na(Cl) medium covering the range $1 < \approx -\lg[\text{H}^+] < \approx 10$ ”, **Chem. Scr.** 22:254-264;
- Pettersson, L., I. Andersson, B. Hedman (1985) “Multicomponent polyanions. 37. A potentiometric and ^{51}V NMR study of equilibria in the H^+ - HVO_4^{2-} system in 3.0 M Na(ClO₄) medium covering the range $1 < \approx -\lg[\text{H}^+] < \approx 10$ ”, **Chem. Scr.** 25:309-317;
- Pollard, T. D. & A. G. Weeds (1984) “The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin” **FEBS Let.** 170:94-98;
- Pope, M. T. (1983) “Heteropoly and Isopoly Oxometalates”, Springer-Verlag, New York;
- Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg, H. M. Holden (1993a) “Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor”, **Science** 262:50-58;
- Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Holmes, R. A. Milligan (1993b) “Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction”, **Science** 261:58-65;
- Rayment, I. (1996) “The Structural Basis of the Myosin ATPase Activity”, **J. Biol. Chem.** 271:15850-15853;

- Reedy, M. K., K. C. Holmes, R. T. Tregear (1965) "Induced changes in orientation of the cross-bridges of glycerinated insect flight muscle", **Nature** 207:1276-1280;
- Rehder, D. (1991) "The bioinorganic chemistry of vanadium", **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 30:148-167;
- Rehder, D. (1992) "Structure and function of vanadium compounds in living organisms", **BioMetals** 5:3-12;
- Ringel, I., Y. M. Peyser, A. Muhlrads (1990) "Vanadium-51 NMR study of vanadate binding to myosin and its subfragment 1", **Biochemistry** 29:9091-9096;
- Roshchin, A. V., E. K. Ordzhonikidze, I. V. Shalganova (1980) "Vanadium - toxicity, metabolism, carrier state", **J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.** 24:377-383;
- Schutt, C. E., U. Lindberg, J. Myslik, N. Strauss (1989) "Molecular packing in profilin: Actin crystals and its implications", **J. Mol. Biol.** 209:735-746;
- Sellers, J. R. (1999) "Myosins", 2nd Ed., Oxford University Press, Inc., New York;
- Sheterline, P., J. Clayton, J. C. Sparrow (1998) "Actin", 4th Ed., Oxford University Press, Inc., New York;
- Squire, J. M. (1981) "The structural basis of muscular contraction", Plenum Press;
- Soares S. S., H. Martins, R. O. Duarte, J. J. Moura, J. Coucelo, C. Gutiérrez-Merino, M. Aureliano (2007a) "Vanadium distribution, lipid peroxidation and oxidative stress markers upon decavanadate in vivo administration", **J. Inorg. Biochem.** 101:80-88;
- Soares, S. S., C. Gutiérrez-Merino, M. Aureliano (2007b) "Decavanadate induces mitochondrial membrane depolarization and inhibits oxygen consumption", **J. Inorg. Biochem.** 101:789-796;
- Spudis, J. (1994) "How molecular motors work", **Nature** 372:515-518;
- Szent-György, A. G. (1953) "Calcium regulation of muscle contraction", **Biophys. J.** 15:707-723;
- Talvitie, N. A. & W. D. Wagner (1954) "Vanadium toxicology. II. Distribution and excretion of vanadium in animals", **AMA Arch. Indust. Hyg. Occup. Med.** 9:414-422;
- Tesi, C., T. Barman, F. Travers (1990) "Is a four-state model sufficient to describe actomyosin ATPase?", **FEBS Lett.** 260:229-232;
- Tiago, T., M. Aureliano, C. Gutiérrez-Merino (2004) "Decavanadate Binding to a High Affinity Site near the Myosin Catalytic Centre Inhibits F-Actin-Stimulated Myosin ATPase Activity", **Biochemistry** 43:5551-5561;

- Ulmer, D. D. (1977) "*Trace elements*", N. Engl. J. Med. 297:318-321;
- Van Dijk, J., F. Céline, T. Barman, P. Chaussepied (2000) "*Interaction of Myosin with F-Actin: Time-Dependent Changes at the Interface Are Not Slow*", **Biophys. J.** 78:3093-3102;
- Wever, R. & K. Kustin (1990) "*Vanadium: a biologically relevant element*", **Adv. Inorg. Chem.** 35:81-115;
- Yamamoto, K. (1990) "*Shift of binding site at the interface between actin and myosin*", **Biochemistry** 29:844-848;
- Zaporowska, H. & A. Scibior (1998) "*Vanadium and its significance in animal cell metabolism*" In: **Vanadium in the environment. Part 2: Health effects**, J. O. Nriagu Ed., pp. 121-133.

CAPÍTULO II.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ACTINA E MIOSINA

No presente capítulo demonstra-se que os métodos utilizados para o isolamento e purificação das proteínas actina e miosina de músculo esquelético de coelho, resultam na obtenção de fracções com elevado grau de pureza, encontrando-se estas em perfeitas condições para serem utilizadas nos estudos subsequentes. Esta caracterização foi realizada recorrendo à análise qualitativa e estado de pureza, por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), bem como através da análise das actividades enzimáticas de subfragmento-1 de miosina, em condições fisiológicas e não-fisiológicas.

II.1 Introdução

Os procedimentos utilizados no isolamento e purificação das proteínas actina e miosina têm em consideração as solubilidades destas consoante a força iónica do meio em que se encontram. Para forças iónicas elevadas, a solubilidade destas diminui, o que resulta da competição existente para as moléculas de solvatação entre os iões do sal adicionado e os outros solutos dissolvidos – as interacções soluto-soluto tornam-se mais fortes que as interacções soluto-solvente e o soluto precipita. Contrariamente, para forças iónicas baixas, a solubilidade das proteínas aumenta com a concentração de sais em solução, o que se designa por *salting in*, resultado da ligação existente entre determinada proteína e um contra-íão presente em solução e os consequentes aumentos da carga da proteína e da sua solvatação (Collins, 2004 e 2006). Assim, ajustando a concentração de sais numa solução que contenha uma mistura de proteínas para um valor imediatamente abaixo do ponto de precipitação da proteína a ser purificada, conseguem eliminar-se muitas das não desejáveis, uma vez que a solubilidade proteica difere em função da concentração do sal e todas as proteínas possuem um ponto de *salting out* característico; este fenómeno resulta da presença de aniões fortemente hidratados na vizinhança da superfície proteica, removendo moléculas de água necessárias à solvatação da proteína e desidratando a sua superfície. Após remoção do precipitado, a concentração da solução restante pode ser aumentada, o que permitirá a precipitação da proteína que se pretende isolar.

II.1.1 Preparação da actina

A grande maioria dos estudos sobre a estrutura e a função da actina têm sido realizados usando a isoforma de músculo esquelético de coelho, bastante semelhante à de outros mamíferos e alguns vertebrados. A actina corresponde a cerca de 20 % do peso total das proteínas do

músculo esquelético, sendo possível obter 0,4-0,5 g de proteína altamente purificada a partir do músculo de um único coelho (aproximadamente 200 g de músculo).

O método mais amplamente utilizado na purificação de actina foi inicialmente descrito por Feuer (1948), resultando todos os outros de pequenas variações deste. A maioria das proteínas solúveis é removida após extensas extracções do músculo com soluções tampão de força iónica baixa e elevada. A massa proteica que resulta destas extracções sucessivas é constituída, essencialmente, por proteínas miofibrilares, sendo posteriormente desidratada com acetona, formando-se o “pó de acetona”. O passo de desidratação serve para desnaturar muitas das outras proteínas, que não a actina, bem como permitir o armazenamento do “pó de acetona” por períodos de tempo praticamente indefinidos. De modo a remover a miosina restante e a conservar a ligação do nucleótido à actina, sendo que esta desnatura na sua ausência, o “pó de acetona” é extraído com soluções tampão de baixa força iónica contendo ATP, bem como iões Ca^{2+} , de modo a substituir o magnésio ligado. O monómero assim extraído é, então, polimerizado através da adição de KCl e MgCl_2 , de modo a remover o cálcio. O aumento da concentração de KCl e a posterior centrifugação provocam a separação de tropomiosina do filamento de actina, devido à diferença de massas moleculares existente entre ambas. Dialisando a F-actina contra uma solução tampão de baixa força iónica contendo cálcio, desloca-se o equilíbrio novamente na direcção da formação da actina monomérica. *In vitro*, a F-actina polimeriza espontaneamente na presença de 50-100 mM KCl, pH 7,0-7,1 e 1 mM Mg, sendo estas as condições iónicas que se crê existirem nas células. Nestas condições experimentais e na presença de Ca, em soluções tampão de baixa força iónica, a actina filamentosa possui uma concentração crítica (C_c , concentração acima da qual a actina se associa em filamentos) de cerca de 0,1 mM, enquanto que nas condições fisiológicas diminui para cerca de 0,1 μM (Sheterline *et al.*, 1998).

II.1.2 Preparação de miosina e subfragmento-1 de miosina

Nos estudos sobre contracção muscular, a miosina mais amplamente usada tem sido aquela extraída de músculo esquelético de coelho. A maioria dos procedimentos experimentais tira partido da capacidade que a miosina tem para formar filamentos a baixa força iónica, sendo solúvel para forças iónicas elevadas. A insolubilidade da miosina é conferida pela região da “cauda”, sendo esta insolúvel para concentrações salinas próximas das fisiológicas. Contrariamente, a “cabeça” da miosina ou subfragmento-1 é solúvel em água. A relativa insolubilidade da molécula de miosina, bem como o seu elevado tamanho (470 kDa), faz com que, na maioria dos casos, se opte pelo recurso a fragmentos resultantes da digestão proteolítica

da miosina, os quais retêm as propriedades da molécula de miosina e são mais fáceis de analisar enzimática e físico-quimicamente. Um destes fragmentos é o subfragmento-1 de miosina, solúvel a forças iónicas baixas e obtido por proteólise da cadeia pesada, utilizando a quimotripsina, como anteriormente referido.

II.1.3 Medição da actividade ATPásica da miosina e subfragmento-1 de miosina

Em 0,5 M KCl, a actina e a miosina formam uma solução viscosa e túrbida, o que se deve, em parte, à formação de complexos de actomiosina. Após adição de MgATP, o complexo actomiosina dissocia-se e a solução apresenta-se menos turva. Para forças iónicas baixas, o complexo actomiosina existe na forma de suspensão, sendo a sua dissociação induzida por MgATP, o qual é rapidamente hidrolisado, o que faz com que a sua concentração no meio reaccional diminua substancialmente. Nestas condições, os filamentos de actina reassociam-se e contraem, formando um precipitado (superprecipitação). Apesar de este fenómeno representar de forma bastante simplificada o processo da contracção muscular *in vivo*, os impedimentos estéreos envolvidos na ligação entre a miosina e a actina tornam difícil a análise quantitativa da actividade MgATPásica. Para que tal fosse possível, seria necessário utilizar uma solução de força iónica mais elevada, de modo a que toda a miosina se encontrasse solubilizada. No entanto, nestas condições a actina não é estável, o que afectaria, de igual modo, a medição da actividade ATPásica de miosina estimulada por F-actina (Bagshaw, 1982). Assim, estudos cinéticos mais detalhados devem ser realizados com o subfragmento-1 de miosina, uma vez que este permanece solúvel a forças iónicas baixas, possuindo actividade catalítica por si só (Sellers, 1999). A utilização de forças iónicas baixas (0,05 M) aumenta também a afinidade da actina para o S1, o que permite contornar o facto de, em solução aquosa, ser bastante difícil alcançar a concentração proteica existente nos músculos (cerca de 100 mg ml⁻¹ do complexo actomiosina) (Bagshaw, 1982).

II.2 Materiais e métodos

II.2.1 Purificação de actina de músculo esquelético de coelho

A actina foi purificada segundo o método descrito por Pardee & Spudis (1982), sendo este um procedimento realizado em dois passos, uma vez que, primeiramente, se obtém um resíduo seco designado por “pó de acetona” e, em seguida, a actina é extraída a partir deste na forma de monómeros de actina (G-actina), promovendo-se, posteriormente, a polimerização a actina filamentosa (F-actina).

II.2.1.1 Obtenção de “pó de acetona”

Todo o isolamento foi realizado a 4 °C (salvo indicação em contrário), tendo-se refrigerado previamente todas as soluções e materiais utilizados. O animal foi sacrificado através do corte da artéria jugular, esfolado e colocado numa tina com gelo. Após ter-se extraído as partes de tecido conjuntivo que envolvem os tecidos musculares, retiraram-se os músculos dorsais e os músculos brancos das pernas. Trituraram-se os músculos e extraiu-se em três volumes de uma solução tampão constituída por 0,1 M KCl, 0,15 M K₂HPO₄, pH 6,5, com agitação suave durante 10 minutos. Centrifugou-se a suspensão a 4 000 x g durante 10 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento em seis volumes de uma solução de 0,05 M NaHCO₃, pH 8,2 durante 10 minutos. Verificou-se se o valor de pH se encontrava compreendido entre 8,2 e 8,5, acertando-se, caso necessário, com 1 M Na₂CO₃. Centrifugou-se a 4 000 x g durante 10 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em três volumes de uma solução de 1 mM EDTA (etilenodiaminotetracetato), pH 7,0 durante 10 minutos e centrifugou-se, novamente, a 4 000 x g durante 10 minutos, tendo-se desprezado o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensão duas vezes consecutivas em seis volumes de água destilada, durante 5 minutos, tendo-se efectuado as duas centrifugações a 4 000 x g durante 10 minutos. Após estas lavagens, efectuam-se 5 ressuspensões consecutivas em três volumes de uma solução de acetona, agitando suavemente durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O resíduo de músculo assim obtido, é deixado a evaporar durante a noite. O “pó de acetona” é armazenado a uma temperatura de -20 °C.

II.2.1.2 Obtenção de G- e F-actina a partir de “pó de acetona”

Após obtenção do “pó de acetona” como indicado anteriormente, efectuou-se o procedimento experimental que a seguir se descreve, de modo a obter monómeros de actina (G-actina) e actina na sua forma polimerizada (F-actina).

Por cada grama de “pó de acetona” adicionaram-se 15 ml de uma solução tampão constituída por 2 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM Na_2ATP , 0,5 mM β -mercaptoetanol, 0,005 % (m/v) NaN_3 (solução A), sendo a extracção efectuada com agitação suave durante 30 minutos (sempre a 4 °C). Separou-se o extracto do “pó de acetona” hidratado filtrando a suspensão com gaze esterilizada, tendo o cuidado de não espremer o resíduo. Voltou a extrair-se em igual volume da solução tampão acima mencionada, durante 30 minutos, adicionou-se ao extracto obtido anteriormente e centrifugou-se o extrato total a 16 000 x g durante 30 minutos, a 4 °C. Decantou-se o sobrenadante e, com agitação contínua e de forma lenta, adicionou-se KCl sólido até uma concentração final de 50 mM, MgCl_2 até 2 mM e Na_2ATP até 1 mM, de modo a promover-se a polimerização dos monómeros de actina. Deixou-se polimerizar durante 2 horas à temperatura ambiente, observando-se a presença de pequenas bolhas de ar, indicativo de um aumento de viscosidade da solução. Arrefeceu-se em gelo durante 15 minutos e adicionou-se KCl sólido até uma concentração final de 0,6 M com agitação contínua durante 30 minutos, após os quais se centrifugou a 110 000 x g durante 1 hora, a 4 °C; desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento transparente e gelatinoso num homogeneizador com 3 volumes de solução A por cada grama de “pó de acetona” inicialmente extraído. Esta suspensão foi dialisada durante 12 horas contra 1 litro de solução tampão A a uma temperatura de 4 °C, com rotação contínua e mudança de solução 2 a 3 vezes. A actina dialisada é centrifugada a 110 000 x g durante 1 hora, a 4 °C. Decantou-se a solução de G-actina (sobrenadante) e desprezou-se o sedimento. A concentração de proteína na forma de G-actina é obtida por medição do valor de absorvência a um comprimento de onda de 290 nm ($\epsilon = 0,62 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ou $26\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Pardee & Spudich, 1982), considerando-se uma massa molecular de 42 kDa. A polimerização da G-actina (estável durante cerca de uma semana a 4 °C) foi conseguida por adição de KCl sólido até uma concentração final de 50 mM, MgCl_2 até 1 mM e Na_2ATP até 1 mM. A F-actina é armazenada com 0,02 % (m/v) NaN_3 , a 4 °C, podendo ser utilizada durante aproximadamente um mês desde a sua preparação.

II.2.2 Isolamento e purificação de miosina de músculo esquelético de coelho

O isolamento de miosina de músculo esquelético de coelho foi efectuado de acordo com o método previamente descrito por Margossian & Lowey (1982), tendo-se introduzido algumas alterações de acordo com as experiências a realizar.

Após a obtenção do músculo tal como anteriormente descrito para a actina, este foi pesado, triturado e extraído com 3 volumes de uma solução de extracção de elevada força iónica (0,6 M KCl, 0,012 M K₂CO₃/0,04 M KHCO₃, 10 mM β-mercaptoetanol (pH 6,5), durante 15 minutos. Centrifugou-se a suspensão de músculo a 2 000 x g durante 20 minutos, a 4 °C, e filtrou-se o sobrenadante em lâ de vidro, de modo a remover agregados lipídicos que se encontrem em suspensão. Diluiu-se esta solução em 14 volumes de água destilada, de modo a baixar a força iónica para 0,04 M. Certificou-se que o valor de pH se encontrava compreendido entre 6 e 7 e adicionou-se 10 mM β-mercaptoetanol. Deixou-se precipitar durante cerca de 4 horas, a 4 °C, e removeu-se o sobrenadante. Após centrifugação do precipitado a 2 000 x g durante 15 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento na solução de extracção. De seguida, adicionou-se 100 mM Tris-HCl (pH 7,0), 2 M KCl até a força iónica ser igual a 0,6 M; homogeneizou-se, deixou-se repousar durante cerca de 2 horas e voltou a homogeneizar-se. De seguida, ultracentrifugou-se a suspensão a 110 000 x g, durante 1 hora, de modo a remover agregados de actomiosina e proteína desnaturada. Após filtração do sobrenadante em lâ de vidro, quantificou-se a solução de miosina resultante pelo método de Bradford (1976), usando-se albumina de soro bovino como padrão e uma massa molecular de 500 kDa. A solução de miosina pode ser armazenada a -20 °C, em 50 % (v/v) glicerol e 2,5 μM PMSF (do inglês, *phenylmethylsulfonyl fluoride*; fluoreto de fenilmetilsulfonilo) por um período superior a 1 ano.

II.2.2.1 Preparação de subfragmento-1 de miosina por digestão quimotriptica

A miosina, preferencialmente acabada de isolar e na ausência de glicerol, é dialisada contra 1 litro de uma solução tampão contendo 25 mM Tris-HCl (pH 7,0), 0,12 M KCl, 1 mM EDTA. A inclusão de EDTA é essencial, uma vez que a substituição de EDTA por MgCl₂ resulta na produção de meromiosina pesada (HMM) em vez de subfragmento-1 (S1). A suspensão de miosina é, então, equilibrada à temperatura ambiente e digerida por adição de α-quimotripsina (0,3 mg ml⁻¹ α-quimotripsina por 20 mg ml⁻¹ miosina) durante 45 minutos, à temperatura ambiente, tendo-se o cuidado de agitar a solução de miosina enquanto se adiciona o enzima, de forma a evitar que ocorra precipitação local e desnaturação da proteína pela solução

ácida. A digestão é interrompida pela adição de 0,2 mM PMSF, em 70 % (v/v) etanol. De seguida, separaram-se os produtos insolúveis resultantes da digestão do S1, ultracentrifugando a 110 000 x g durante 1 hora, a 4 °C, desprezando-se o sedimento. A concentração de proteína no sobrenadante, maioritariamente S1, foi determinada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 280 nm ($\epsilon_{280}^{1\%} = 7,5 \text{ cm}^{-1}$), usando uma massa molecular de 115 kDa. O subfragmento-1 de miosina foi armazenado em 10 % (m/v) sacarose e 2 mM β -mercaptoetanol, a -80 °C, após rápida congelação em azoto líquido.

II.2.3 Caracterização das proteínas isoladas: análise qualitativa e estado de pureza

O grau de pureza das preparações proteicas e a análise dos componentes do material isolado foram determinados por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE, do inglês *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*).

As electroforeses foram realizadas de acordo com o previamente descrito (Laemmli, 1970), num gel de poliacrilamida a 12,5 % (v/v) em 2,5 M Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1 % SDS (m/v) (gel de resolução). O gel de concentração possuía uma concentração de poliacrilamida de 5 % (m/v) em 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8. A polimerização de ambos foi iniciada pela adição de PSA (persulfato de amónia) e catalisada pela presença de TEMED (do inglês, *N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*) (Blackshear, 1984). A solução de desnaturação das proteínas contém 125 mM Tris-HCl, 4 % SDS (m/v), 5 % β -mercaptoetanol (v/v) e 0,02 % (m/v) azul bromofenol. Usaram-se padrões de proteínas de alto e baixo peso molecular, contendo por Aprotinina (6,6 kDa), α -Lactalbumina (14,2 kDa), Inibidor da Tripsina (20 kDa), Tripsinogénio (24 kDa), Anidrase carbónica (29 kDa), Desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (36 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Desidrogenase de glutamato (55 kDa), Albumina (66 kDa), Fosforilase B (97 kDa), β -Galactosidase (116 kDa) e Miosina (205 kDa) (Sigma). As amostras proteicas foram fervidas durante 5 minutos. Decorrida a electroforese (aplicando uma diferença de potencial de 120 V), coraram-se os géis com uma solução corante, constituída por 0,1 % (v/v) azul de Coomassie, 45 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) ácido acético glacial, durante aproximadamente 30 minutos, tendo-se descorado numa solução de metanol:ácido acético: H₂O numa proporção de 1:1:8, renovando esta solução até que as bandas se encontrassem bem definidas.

II.2.4 Análise das actividades enzimáticas de miosina e S1

Os métodos de isolamento e purificação de miosina e S1 acima descritos devem ser utilizados apenas se as suas propriedades enzimáticas e estruturais se encontrarem preservadas. A actividade fisiológica (Mg^{2+} -ATPase de miosina estimulada por actina) assim como as actividades não fisiológicas dependentes de Ca^{2+} e de K^+ /EDTA são bons indicadores da qualidade destas preparações proteicas (Sekine & Kielley, 1964; Yamaguchi & Sekine, 1966; Margossian & Lowey, 1982; Sellers, 1999). Além disso, a F-actina presente nas células musculares tem como função estimular a actividade fisiológica da miosina.

Por conseguinte, foram determinadas as actividades enzimáticas Ca^{2+} - e K^+ /EDTA-ATPásicas (não fisiológicas) e Mg^{2+} -ATPásica estimulada por F-actina (fisiológica) da miosina e do seu fragmento S1, de modo a poder avaliar-se acerca da qualidade das preparações proteicas obtidas.

II.2.4.1 Actividades Ca^{2+} - e K^+ /EDTA-ATPásicas de subfragmento-1 de miosina: método de Fiske-Subarow modificado

De modo a determinar as actividades Ca^{2+} - e K^+ /EDTA-ATPásicas do S1 de miosina utilizou-se o método de Fiske-Subarow modificado, de acordo com o descrito por Taussky e Shorr (1953). Este consiste na reacção do fosfato inorgânico (P_i) com o molibdato de amónio, em solução ácida, formando-se o ácido fosfomolibdico. Na presença de um agente redutor, o molibdénio reduz-se a molibdato, o qual forma um complexo de cor azulada que absorve a um comprimento de onda de 660 nm, permitindo, assim, a sua detecção espectrofotométrica.

As actividades não fisiológicas dependentes de cálcio e de magnésio foram determinadas num meio contendo 125 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,575 M KCl, tendo-se suplementado o meio com 2,5 mM $CaCl_2$ ou 0,6 M KCl e 1 mM EDTA, caso se tratasse da Ca^{2+} -ATPase ou K^+ /EDTA-ATPase, respectivamente. Em ambos os ensaios utilizou-se uma concentração de S1 de 0,1 mg ml^{-1} . As reacções de hidrólise foram iniciadas pela adição de 2,5 mM ATP ao meio reaccional, uma vez que este é o substrato da reacção. A intervalos de tempo constantes fizeram-se reagir alíquotas do meio reaccional com 10 % TCA (m/v) (do inglês, *trichloroacetic acid*; ácido tricloroacético), com uma estequiometria de 1:1 (v/v). A proteína assim desnaturada foi sedimentada por centrifugação a 1 500 x g durante 10 minutos, tendo-se retirado 0,2 ml de sobrenadante para um tubo de Eppendorf, os quais se fizeram reagir com 0,2 ml de uma solução contendo 2,5 M H_2SO_4 , 2,5 % (v/v) molibdato de amónio e 20 μ l de agente redutor (5 mg ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, 30 mg bissulfito de sódio e 30 mg sulfito de sódio em 2,6 ml H_2O).

Deixou-se reagir durante 10 minutos e mediram-se os valores de absorvência a um comprimento de onda de 660 nm. Por intrapolação a partir da recta padrão (usando uma solução de KH_2PO_4 como padrão e uma quantidade de P_i compreendida entre 25 e 500 nmoles nos ensaios), determinou-se a quantidade de P_i libertado em cada ensaio, e a partir desta as actividades Ca^{2+} - e K^+ /EDTA-ATPásicas em $\text{nmol P}_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ S1}$ e s^{-1} .

II.2.4.2 Actividade Mg^{2+} -ATPásica de subfragmento-1 de miosina estimulada por F-actina: método de enzimas acoplados

A actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 de miosina, estimulada ou não pela F-actina, foi determinada usando um sistema de enzimas acopladas baseado na conversão de NADH a NAD^+ , uma vez que ambas as formas reduzida e oxidada deste nucleótido absorvem a um comprimento de onda de 260 nm, mas apenas a forma reduzida absorve a um comprimento de onda de 340 nm, o que torna possível a sua monitorização espectrofotométrica.

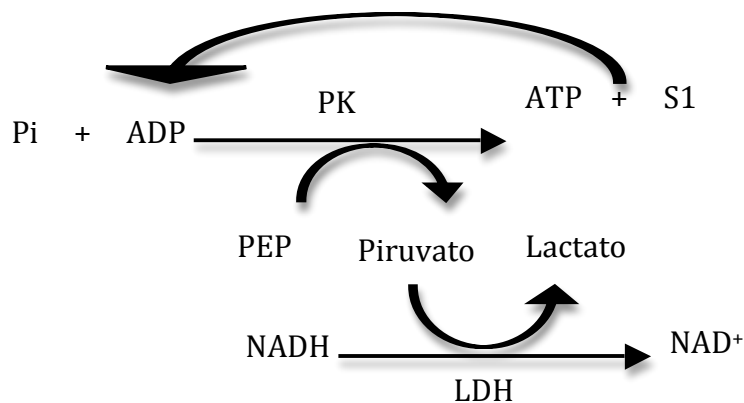


Figura II.1 – Representação esquemática do método de enzimas acoplados utilizado para determinar a actividade Mg^{2+} -ATPásica do subfragmento-1 de miosina (S1). Adaptado de Bagshaw, 1982.

O enzima cinase do piruvato (PK, do inglês *pyruvate kinase*) catalisa a reacção de formação de piruvato a partir do fosfoenolpiruvato (PEP, do inglês *phosphoenolpyruvate*), na presença de ADP, libertando-se concomitantemente ATP. O piruvato, por acção do enzima desidrogenase do lactato (LDH, do inglês *lactate dehydrogenase*), é convertido em lactato, ocorrendo simultaneamente a oxidação do NADH a NAD^+ . Quando o S1 de miosina se encontram no meio reaccional, o ATP formado é hidrolisado, formando-se novamente ADP (e P_i), o que permite a formação de um ciclo (Fig. II.1). Se os enzimas se encontrarem em excesso, a velocidade de conversão de NADH, monitorizada pela variação da absorvência a um comprimento de onda de 340 nm, é limitada pela produção de ADP e P_i pelo S1. Como o ATP é

regenerado em cada ciclo, a sua concentração inicial mantém-se constante (Bagshaw, 1982; Cuenda *et al.*, 1990).

Os ensaios foram realizados num meio contendo 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM CaCl₂, 2, 5 mM MgCl₂, 0,42 mM PEP, 0,375 mM NADH, 18 IU LDH, 18 IU PK e 0,05 mg ml⁻¹ S1, sendo a reacção iniciada pela adição de 2 mM ATP ao meio reaccional. A actividade fisiológica dependente de magnésio, em nmol P_i min⁻¹ mg⁻¹ S1 e em s⁻¹, foi obtida através do declive após subtracção da linha de base correspondente à auto-oxidação do NADH, sabendo que o coeficiente de extinção molar do NADH a um comprimento de onda de 340 nm é de 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹. Para a medição da Mg²⁺-ATPase do S1 de miosina estimulada por actina, adicionou-se posteriormente 2 μM F-actina, sendo a actividade novamente obtida por subtracção da linha de base.

II.3 Resultados e discussão

II.3.1 Caracterização das proteínas isoladas

II.3.1.1 *Análise qualitativa e estado de pureza*

A constituição e o grau de pureza do material isolado foram analisados por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de amostras recolhidas durante todo o processo de obtenção das proteínas actina, miosina e S1.

Na Figura II.2 encontra-se o gel obtido por SDS-PAGE das amostras recolhidas ao longo do processo de isolamento e purificação da actina, encontrando-se a G-actina no poço j. Da observação directa do gel pode concluir-se que foram sendo sucessivamente eliminadas de forma eficaz outras proteínas, visíveis nos poços c a i, como a miosina, α -actinina (95 kDa), troponinas C (18 kDa), I (21 kDa) e T (31 kDa) ou tropomiosina (33 kDa).

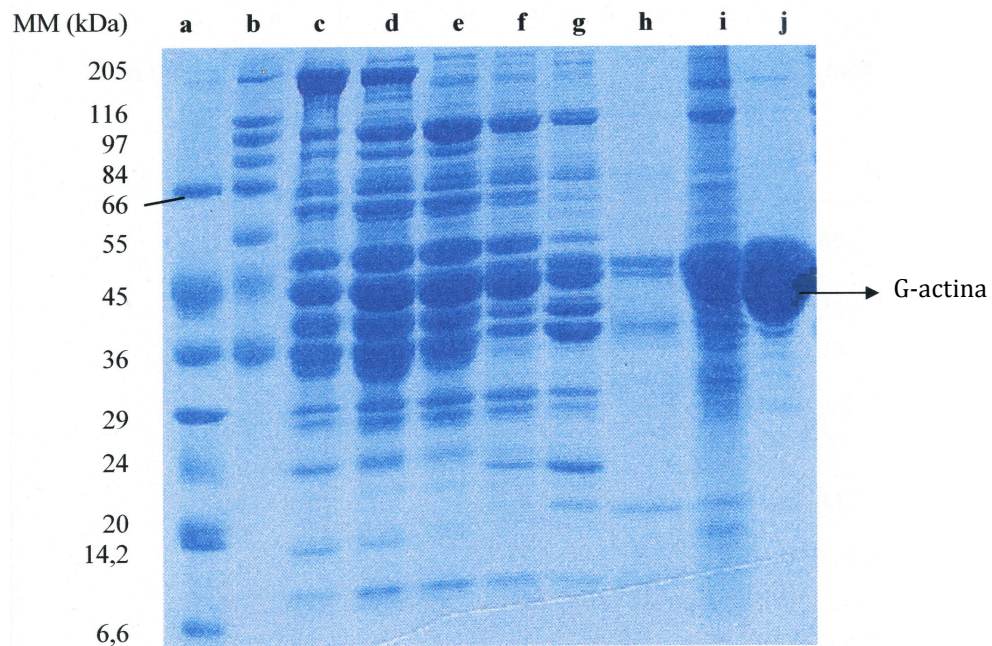


Figura II.2 – Electroforese em gel de poliacrilamida (12 % acrilamida) em condições desnaturantes (SDS) de amostras recolhidas durante o processo de purificação de actina de músculo esquelético de coelho. Poços a) e b): 10 μ l dos marcadores de elevada (36-205 kDa) e baixa (6,6-66 kDa) massa molecular (Sigma). Os poços c) a g) contêm fracções (20 μ g) recolhidas ao longo da preparação do “pó de acetona”. Nos poços h) a j) foram aplicadas amostras (20 μ g) recolhidas durante o processo de obtenção da actina a partir do “pó de acetona”. Aplicou-se uma voltagem de 120 V e a electroforese decorreu durante 2 horas e 30 minutos.

No que ao isolamento e purificação da miosina e do seu subfragmento-1 diz respeito, nos poços b, d e f da Figura II.3, pode observar-se uma banda de grande intensidade com cerca de 200 kDa, correspondente às cadeias pesadas da miosina. Nos poços b a f são, também, visíveis componentes que não foram isolados, como fosforilases (~97 kDa), cinases (~80 kDa), actina (~40 kDa) e proteínas associadas ao filamento de actina, tais como troponinas e tropomiosina.

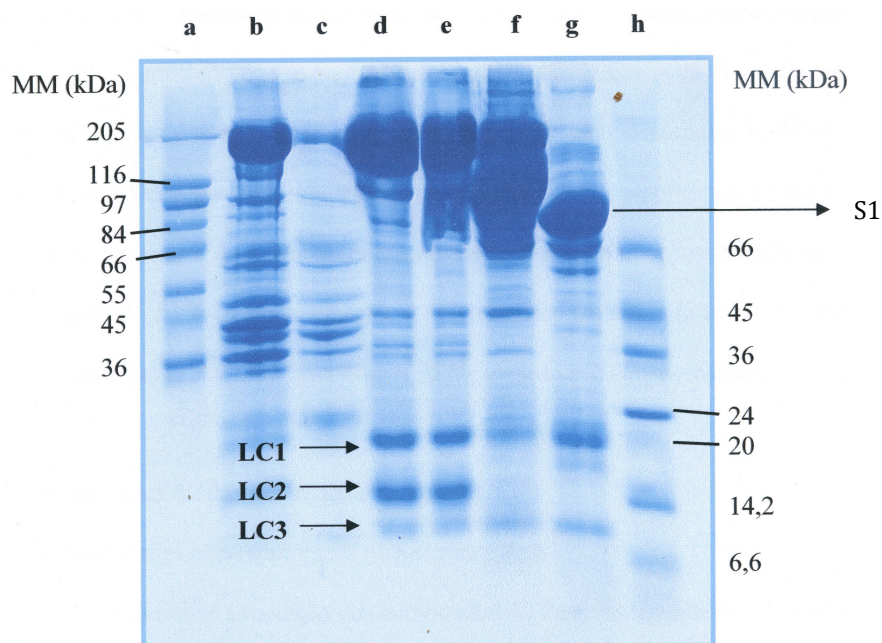


Figura II.3 – Electroforese em gel de poliacrilamida (12 % (v/v) acrilamida) em condições desnaturantes (SDS) de amostras recolhidas durante o processo de purificação de miosina e subfragmento-1 de miosina (S1) de músculo esquelético de coelho. Poços a) e h): 10 µl dos marcadores de elevada (36-205 kDa) e baixa (6,6-66 kDa) massa molecular (Sigma). Os poços b) a d) contêm fracções (20 µg) recolhidas ao longo da preparação da miosina. Nos poços e) a g) foram aplicadas amostras (20 µg) recolhidas durante o processo de obtenção do S1 por digestão quimotríptica da miosina. Aplicou-se uma voltagem de 120 V e a electroforese decorreu durante 2 horas e 30 minutos. LC1, LC2 e LC3 correspondem, respectivamente, às cadeias leves essenciais de miosina.

No poço g é visível uma banda de maior intensidade, com cerca de 92 kDa, correspondente ao subfragmento-1 de miosina, tendo esta amostra sido recolhida após a digestão quimotríptica da miosina. Observam-se, ainda, duas outras bandas menos intensas identificadas como sendo as cadeias leves essenciais de miosina, LC1 e LC3 (22,5 e 15,5 kDa, respectivamente). Neste mesmo poço, e ao contrário do que sucede nos poços b, d e e, não se observa a banda típica das cadeias leves regulatórias, LC2, com uma massa molecular de 18,5 kDa, uma vez que a digestão enzimática da miosina ocorreu na presença de EDTA.

É de referir, ainda, que apesar de se encontrarem outras bandas de menor intensidade no poço g, a percentagem de S1 é bastante superior à das restantes proteínas (> 95 %, determinado por densitometria). Estas bandas de menor intensidade poderão dever-se a fragmentos

proteolíticos de miosina e S1 ou a contaminações menores, tais como a proteína-C (135 kDa), que para serem removidos necessitam de um passo extra de purificação por cromatografia de troca iónica (Margossian & Lowey, 1982).

II.3.1.2 *Análise da actividade enzimática*

Os resultados referentes à medição das actividades ATPásicas dependentes de Ca^{2+} e K^{+} de miosina e de S1, determinadas pelo método de Fiske-Subarow modificado, encontram-se descritos na Tabela II.1.

Tabela II.1 – Valores das actividades não-fisiológicas de miosina e subfragmento-1 de miosina (S1) determinadas pelo método de Fiske-Subarow modificado, de acordo com o descrito na secção II.2.4.1. Os resultados apresentados são a média de três ensaios experimentais.

Proteína	Actividade ATPásica não-fisiológica	Actividade (nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)	Actividade (s ⁻¹)
Miosina	Ca ²⁺ -ATPase	564,8 ± 28,4	3,8 ± 0,2
	K ⁺ /EDTA-ATPase	2113,0 ± 455,8	14,1 ± 3,1
S1	Ca ²⁺ -ATPase	1333,3 ± 104,9	2,6 ± 0,2
	K ⁺ /EDTA-ATPase	3446,7 ± 857,0	6,6 ± 1,6

De acordo com o previamente descrito por Margossian & Lowey (1982), uma preparação adequada de miosina deve resultar numa actividade ATPásica dependente de Ca^{2+} e de K^{+} /EDTA de 4,2 e 20,3 s⁻¹, respectivamente. Estes valores estão em concordância com os obtidos no presente estudo (3,8 e 14,1 s⁻¹, respectivamente; Tab. II.1), considerando o erro experimental associado. Pode, assim, concluir-se que as preparações de miosina apresentam uma qualidade adequada à sua subsequente utilização.

Por seu turno, encontra-se descrito que nas preparações de S1 a actividade ATPásica dependente de potássio é, em média, cerca de três vezes superior à dependente de cálcio, o que reflecte, também, a qualidade destas preparações (Sellers, 1999) e está de acordo com o obtido, uma vez que a actividade não-fisiológica dependente de K^{+} é cerca de 2,5 vezes superior à de Ca^{2+} (2,6 e 6,6 s⁻¹, respectivamente; Tab. II.1). No entanto, as actividades Ca²⁺- K⁺/EDTA-ATPásicas de S1 devem, também, apresentar valores iguais a 2,4 e 11,2 s⁻¹ (Margossian & Lowey, 1982). As diferenças obtidas podem resultar da introdução de pequenas diferenças nas condições da reacção enzimática, uma vez que as actividades ATPásicas variam consoante a temperatura, pH e força iónica do meio em que ocorrem.

Além disso, as actividades não-fisiológicas reflectem o estado de oxidação dos resíduos de cisteína nas posições 707 (SH1) e 697 (SH2), o que permite concluir que estes se encontram no seu estado reduzido, tanto nas preparações de miosina como nas de S1 (Sekine & Kielley, 1964; Yamaguchi & Sekine, 1966). De facto, se tal não se verificasse, observar-se-ia um aumento na actividade Ca^{2+} -ATPásica e uma diminuição na actividade K^{+} /EDTA-ATPásica, caso o grupo SH1 estivesse oxidado, ou a perda completa destas actividades, caso fosse o grupo SH2 a sofrer oxidação (Reisler, 1980; Margossian & Lowey, 1982).

Apesar das actividades dependentes de cálcio e de potássio acima mencionadas serem indicadores úteis da qualidade de preparação da miosina e do S1, apenas a actividade Mg^{2+} -ATPásica estimulada por F-actina tem significado fisiológico.

Através do método de enzimas acoplados (ver secção II.2.4.2) determinou-se a actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1, na ausência e na presença de F-actina.

Tabela II.2 – Valores da actividade fisiológica de subfragmento-1 de miosina (S1), na ausência e na presença de F-actina, determinada pelo método de enzimas acoplados, de acordo com o descrito na secção II.2.4.2. Os resultados apresentados são a média de três ensaios experimentais.

Actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1	Actividade ($\text{nmol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{S1}$)	Actividade (s^{-1})
Não estimulada por F-actina	$66,89 \pm 6,69$	$0,11 \pm 0,01$
Estimulada por $2 \mu\text{M}$ F-actina	$1097,26 \pm 267,6$	$1,64 \pm 0,4$

De acordo com os valores apresentados na Tabela II.2, a actina possui um efeito acentuado na actividade basal da actividade Mg^{2+} -ATPase do subfragmento-1 de miosina ($0,11 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$), estimulando-a cerca de 16 vezes para a concentração de F-actina utilizada ($2 \mu\text{M}$), o que está de acordo com estudos anteriores (Tiago *et al.*, 2002). No entanto, encontra-se descrito que a actividade fisiológica de S1 estimulada por F-actina é aumentada entre 50 e 100 vezes (Sellers, 1999). Esta discrepância pode ser explicada considerando que não se usaram concentrações de actina que permitissem atingir o valor da velocidade máxima para esta reacção enzimática.

Além disso, verificam-se grandes variações nos parâmetros cinéticos, determinados para outras espécies e isoformas musculares (Tabela II.3), o que pode ser explicado não só pela variabilidade entre espécies mas também pela introdução de variações nas condições em que estes estudos foram realizados, uma vez que a força iónica, o valor de pH e a temperatura influenciam a velocidade de hidrólise de ATP pela miosina (Margossian & Lowey, 1982).

Tabela II.3 – Parâmetros cinéticos do subfragmento-1 de miosina de diferentes espécies e isoformas musculares. Adaptado de Sellers, 1999.

Espécie/Isoforma	$V_{m\acute{a}x}$ (s^{-1})	K_M (μM)	Força iônica, temperatura	Referência bibliográfica
<i>Oryctolagus cuniculus</i> / Esquelético	29	18	30 μM , 25 °C	Wagner, 1981
<i>Gallus gallus domesticus</i> / Esquelético	30	32	25 μM , 25 °C	Martson & Taylor, 1980
<i>Oryctolagus cuniculus</i> / Cardíaco	3,6	41	30 μM , 25 °C	Wagner, 1981
<i>Gallus gallus domesticus</i> / Cardíaco	4,2	58	25 μM , 25 °C	Martson & Taylor, 1980
<i>Homo sapiens sapiens</i> / Não muscular IIA	0,7	17	12 μM , 25 °C	Sellers <i>et al.</i> , 1988
<i>Lethocerus</i>	2	180	120 μM , 20 °C	White <i>et al.</i> , 1986
<i>Dicytostelium</i>	0,78	8,2	30 μM , ? °C	Peltz <i>et al.</i> , 1981

II.4 Referências bibliográficas

- Bagshaw, C. R. (1982) “*Outline Studies in Biology - Muscle Contraction*”, 2nd edition, Chapman and Hall Editions, New York;
- Blackshear, P. J. (1984) “[12] *Systems for polyacrylamide gel electrophoresis*”, **Meth. Enzymol.** 104:237-250;
- Bradford, M. M. (1976) “*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*”, **Anal. Biochem.** 72:248-254;
- Collins, K. D. (2004) “*Tons from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process*”, **Methods** 34:300-311;
- Collins, K. D. (2006) “*Ton hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization*”, **Biophys. Chem.** 119:271-281;
- Cuenda, A. F., F. Henao, C. Gutiérrez-Merino (1990) “*Distances between functional sites of the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum using Ca^{2+} as a spectroscopic ruler*”, **Eur. J. Biochem.** 194:663-670;
- Feuer, G., F. Molnar, E. Pettko, F. B. Straub (1948) “*Studies on the composition and polymerization of actin*”, **Hung. Acta Physiol.** 1:150-163;
- Laemmli, U. K. (1970) “*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*”, **Nature** 227:680-685;
- Margossian, S. S. & S. Lowey (1982) “*Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle*”, **Meth. Enzymol.** 85:55-71;
- Martson, S. B. & E. W. Taylor (1980) “*Comparison of the myosin and actomyosin ATPase mechanisms of the 4 types of vertebrate muscles*”, **J. Mol. Biol.** 139:573-600;
- Pardee, J.D & J. A. Spudis (1982) “*Purification of muscle actin*”, **Meth. Enzymol.** 85:164-181;
- Petz, G., E. R. Kuczmarski, J. A. Spudis (1981) “*Dictyostelium myosin: characterization of chymotryptic fragments and localization of the heavy-chain phosphorylation site*”, **J. Cell Biol.** 89:104-108;
- Reisler, E. (1980) “*Kinetic studies with synthetic myosin minifilaments show the equivalence of actomyosin and acto-HMM ATPases*”, **J. Biol. Chem.** 255:9541-9544;

- Sekine, T. & W. W. Kielley (1964) “*The enzymic properties of N-ethylmaleimide modified myosin*”, **Biochim. Biophys. Acta** 81:336-345;
- Sellers, J. R. (1999) “*Myosins*”, 2nd Ed., Oxford University Press, Inc., New York;
- Sellers, J. R., M. S. Soboeiro, K. Faust, A. R. Bengur, E. V. Harvey (1988) “*Preparation and characterization of heavy meromyosin and subfragment 1 from vertebrate cytoplasmic myosins*”, **Biochemistry** 27:6977-6982;
- Sheterline, P., J. Clayton, J. C. Sparrow (1998) “*Actin*”, 4th Ed., Oxford University Press, Inc., New York;
- Taussky, H. H. & E. Shorr (1953) “*A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorous*” **J. Biol. Chem.** 202:675-685;
- Tiago, T. M. Aureliano, R. O. Duarte, J. J. G. Moura (2002) “*Vanadate oligomers interaction with phosphorylated myosin*” **Inorg. Chim. Acta** 339C:317-321;
- Yamaguchi, M. & T. Sekine (1966) “*Sulphydryl groups involved in the active site of myosin A adenosine triphosphatase*”, **J. Biochem. (Tokyo)** 59:24-33;
- Wagner, P. D. (1981) “*Formation and characterization of myosin hybrids containing essential light chains and heavy chains from different muscle myosins*”, **J. Biol. Chem.** 256:2493-2498;
- White, D. C., R. W. Zimmerman, D. R. Trentham (1986) “*The ATPase kinetics of insect fibrillar flight muscle myosin subfragment-1*”, **J. Muscle Cell Motil.** 7:179-192.

CAPÍTULO III.
CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA
ACTINA-VANÁDIO

O presente capítulo tem por objectivo caracterizar as soluções de vanadato, em diferentes condições experimentais, e determinar a natureza da interacção entre a actina e as espécies oligoméricas de V(V), particularmente o decavanadato, bem como as de vanádio(IV). Nesse sentido, analisa-se o efeito da concentração na composição das soluções de vanadato e a estabilidade das soluções de decavanadato após diluição no meio reaccional usando as espectroscopias de ^{51}V -RMN e de UV-vis. De seguida, é feito um estudo sobre a interacção do vanadato e do vanadilo com a actina, por RMN e RPE, respectivamente, em diferentes condições experimentais.

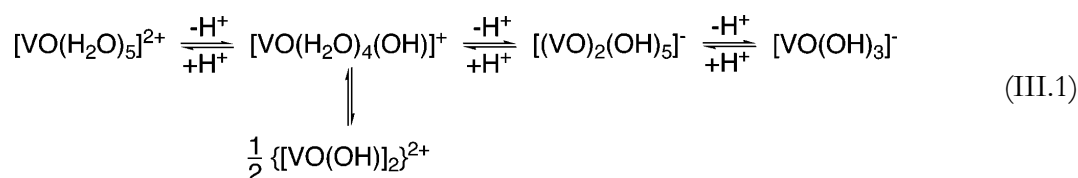
III.1 Introdução

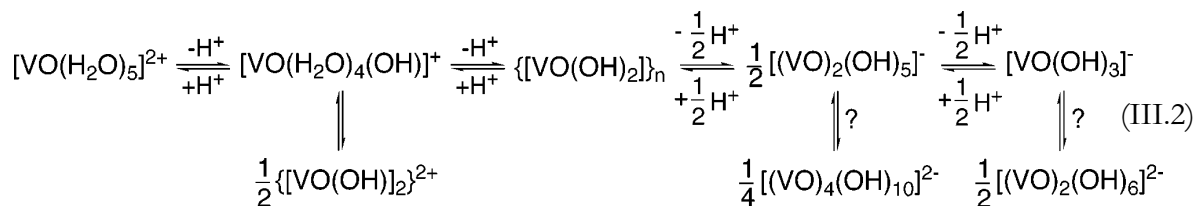
III.1.1 Química das soluções aquosas de vanádio

A química complexa do vanádio, em solução aquosa, tem contribuído para que a sua função nos sistemas biológicos se encontre, em muitos casos, ainda por esclarecer. Podem considerar-se três os factores que contribuem para a complexidade do comportamento químico que este elemento apresenta em solução: (i) múltiplos estados de oxidação; (ii) susceptibilidade à hidrólise; (iii) capacidade de polimerização (Chasteen, 1983).

Dos quatros estados de oxidação mais comuns, apenas o V(II) não foi encontrado em qualquer organismo vivo, nos quais o vanádio se encontra, maioritariamente, nos estados de oxidação V(IV) e V(V); o estado V(III) raramente ocorre.

Em solução aquosa, a espécie paramagnética V(IV) encontra-se bem caracterizada numa larga escala de valores de pH. A valores de pH inferiores a 3 o ião vanadilo, VO^{2+} , é a espécie maioritária, encontrando-se coordenado com cinco moléculas de água numa estrutura bipyramidal tetragonal ($[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$) (Crans *et al.*, 2004). Para valores de pH compreendidos entre 3 e 5, na ausência de agentes complexantes, o vanadilo sofre hidrólise, de acordo com os equilíbrios abaixo representados (eqs. III.1 e III.2). A equação III.1 mostra a especiação relativamente simples existente para concentrações de V(IV) da ordem de 10^{-6} - 10^{-9} M), enquanto na equação III.2 se encontra a especiação para concentrações de V(IV) na escala dos milimolar (10^{-3} M) (Crans *et al.*, 2004):





Como se pode verificar pelos equilíbrios acima e pela Figura III.1, à medida que se forma a espécie $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})]^+$, ocorre a formação de um dímero, $\{[\text{VO}(\text{OH})_2]_2\}^{2+}$, o qual não apresenta sinal de RPE. O aumento do pH para valores acima de 5 resulta numa diminuição significativa da intensidade do sinal de RPE, devido à formação da espécie $\{\text{VO}(\text{OH})_2\}_n$, insolúvel. Se se continuar a aumentar o valor de pH da solução, esta última espécie dissolve-se, formando-se $[(\text{VO})_2(\text{OH})_5]^-$ e, subseqüentemente, $[\text{VO}(\text{OH})_3]^-$. Apenas esta última espécie se encontra bem caracterizada por espectroscopias de absorção na região do ultravioleta-visível e de ressonância paramagnética electrónica (Ianuzzi & Rieger, 1975).

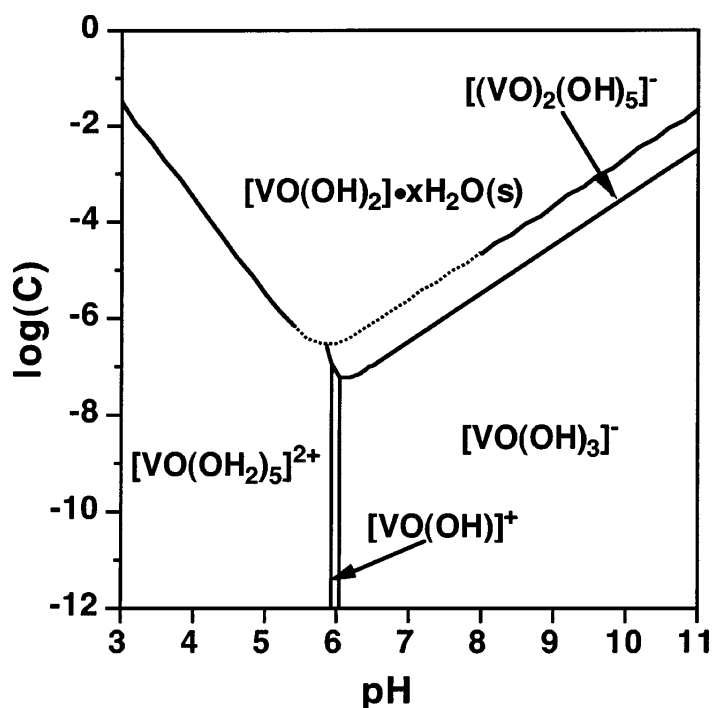
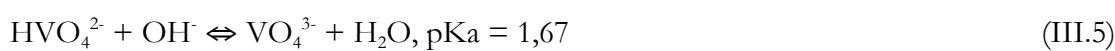
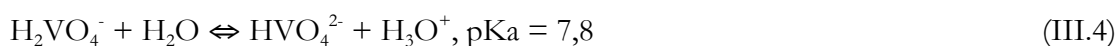
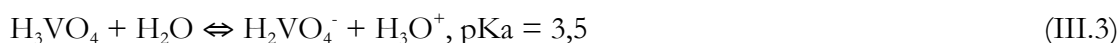


Figura III.1 – Diagrama das espécies de V(IV) predominantes em solução aquosa, representado como o logaritmo da concentração molar total de vanádio(IV) em função do valor de pH. As linhas sólidas representam a condição na qual as concentrações de duas espécies solúveis é idêntica. Adaptado de Crans, 2004.

Apesar das soluções ácidas de vanadilo serem estáveis, em contacto com o oxigénio atmosférico e para pH neutro ou alcalino ocorre oxidação a V(V) (Kustin & Macara, 1982), a

qual é retardada quando este se encontra complexado. De facto, a pH fisiológico e na ausência de agentes complexantes em solução, não se observa qualquer sinal de EPR (Francavilla & Chasteen, 1975; Chasteen, 1983). A presença de soluções tampão e a formação de complexos entre os seus componentes e o V(IV) têm sido amplamente usadas com sucesso na investigação da complexação de V(IV) com proteínas a pH neutro (Chasteen, 1983; Chasteen *et al.*, 1986; Chasteen, 1995; Butler, 1998; Crans *et al.*, 2004).

O vanádio pentavalente V(V) é a forma redox mais estável na presença de oxigénio. No entanto, a sua química em solução aquosa é ainda mais complexa do que a do V(IV). De facto, a abundância relativa das espécies de oxovanádio(V) em solução aquosa depende da sua concentração, pH, força iónica e temperatura (Heath e Howarth, 1981; Pope, 1983; Rehder, 1991). Abaixo de pH 2 predomina o catião pervanadilo, VO_2^+ . Para valores de pH próximos de 7, o vanadato monomérico (V_1) existe, essencialmente, como um anião monovalente (H_2VO_4^-), variando o seu estado de protonação de acordo com o valor de pH da solução, de acordo com as equações III.3-III.5 (Cruywagen *et al.*, 1996; Crans *et al.*, 2004):



Para valores de pH próximos do fisiológico (pH $\sim 7,4$), as espécies H_2VO_4^- e HVO_4^{2-} oligomerizam, formando as espécies dimérica, V_2 ($\text{H}_3\text{V}_2\text{O}_7$), tetramérica cíclica, V_4 ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$) e pentamérica cíclica, V_5 ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$) de vanadato (Pettersson *et al.*, 1983 e 1985) (Figura III.2).

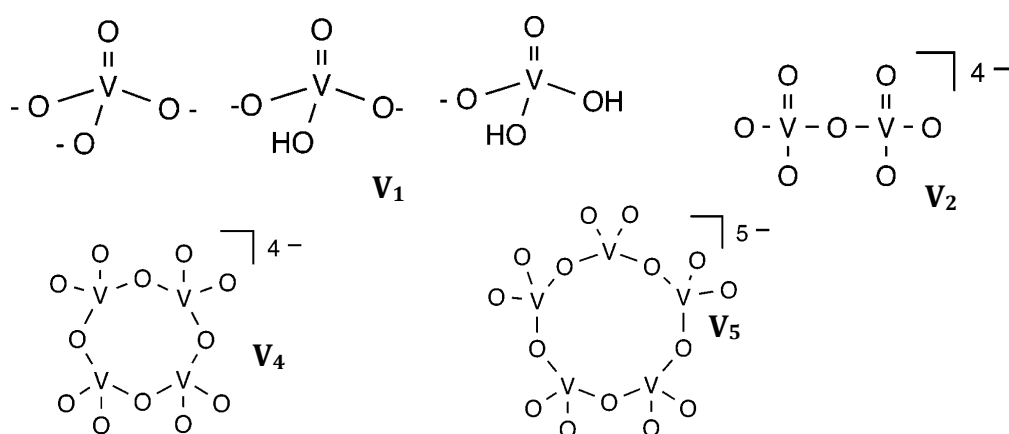


Figura III.2 – Estruturas esquemáticas das espécies monomérica, V_1 (H_3VO_4 , HVO_4^{2-} , H_2VO_4^-); dimérica, V_2 ($\text{H}_3\text{V}_2\text{O}_7$) tetramérica cíclica, V_4 ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$) e pentamérica cíclica, V_5 ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$) de vanádio(V).

O termo “metavanadato” é usado para descrever a mistura incolor de oxovanadatos em solução aquosa, com a fórmula empírica VO_3^- , designados por metavanadatos (Pope, 1983). Para

além dos metavanadatos, outros oxovanadatos podem ser formados, alguns dos quais estão limitados a concentrações e condições de pH muito específicas. Alguns derivados que se formam em concentrações muito baixas incluem o trímero (V_3) e o tetrâmero lineares, observados a valores de pH ligeiramente alcalinos, ou o hexâmero (V_6), observado para concentrações mais elevadas de vanadato (Howarth, 1990). A acidificação de uma solução de metavanadato ($2 < \text{pH} < 6$) origina o “decavanadato”, solução esta constituída pelos vanadatos monomérico e decamérico, V_{10} ($V_{10}O_{28}^{6-}$), cuja cor pode variar entre o amarelo, o laranja e o vermelho, consoante a concentração da espécie V_{10} (Fig. III.3).

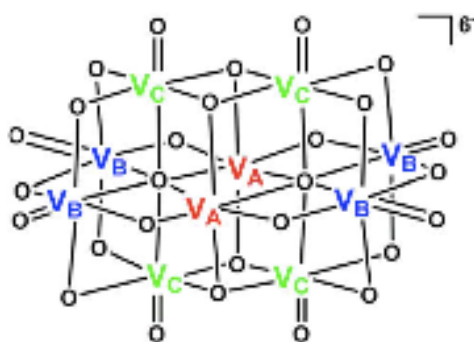


Figura III.3 – Representação esquemática da espécie decamérica, V_{10} ($V_{10}O_{28}^{6-}$) de vanádio(V).

A valores de pH fisiológico, a velocidade de desoligomerização da espécie decamérica de vanadato é muito lenta, contrariamente ao que se verifica para os metavanadatos lábeis, pelo que a pH superior a 7 permanece intacto durante algum tempo (até 2 dias), apesar de ser termodinamicamente instável a pH neutro ou básico (Pope, 1983).

III.1.2 Caracterização de soluções de vanádio por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

A espectroscopia de absorção é um dos métodos mais convenientes e amplamente utilizado para descrever a estrutura electrónica, baseando-se na possibilidade de ocorrência de transições entre os diferentes níveis de energia de uma molécula, induzidas pela absorção de um fóton.

A química aquosa das soluções de vanádio(V) suscitou bastante controvérsia devido à sua enorme complexidade, tendo sido consideradas diferentes espécies em solução, consoante as técnicas e métodos utilizados nos diferentes estudos. A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis) foi uma das primeiras técnicas utilizadas na caracterização de soluções aquosas de vanádio, contribuindo de forma decisiva na elucidação da sua especiação, bem como

na caracterização dos diferentes equilíbrios existentes entre as espécies de vanadato (Rossoti & Rossoti, 1956; Newman & Quinlan, 1959; Borgen *et al.*, 1977).

Relativamente à espécie decamérica de vanadato, esta foi primeiramente caracterizada por espectroscopia UV-vis em 1959 (Newman & Quinlan, 1959) e, posteriormente, por Borgen *et al.* (1977). Uma vez que o vanádio(V) é um ião metálico com uma configuração electrónica d^0 , não apresenta transições na região visível do espectro de electromagnético. A cor amarela que se observa em algumas soluções de vanadato, nomeadamente na solução de decavanadato, deve-se a uma intensa absorção na cauda do ultravioleta (Borgen *et al.*, 1977).

Uma vez que ocorre sobreposição dos espectros de absorção para cada espécie de vanadato, torna-se difícil desconvoluir a informação resultante da espectroscopia de UV-vis para analisar eficientemente a interacção entre estas e proteínas (ou qualquer outro componente em solução), pelo que se recorre, normalmente, a outras técnicas espectroscópicas, como as Ressonâncias Magnética Nuclear e Paramagnética Electrónica.

III.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear aplicada ao estudo de soluções aquosas de vanádio(V)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta versátil para o estudo da estrutura e dinâmica moleculares, encontrando-se em *Anexo* uma breve descrição dos fundamentos teóricos desta técnica.

O vanádio foi um dos primeiros núcleos dos metais de transição a ser estudado de forma sistemática por RMN, o que reflecte o facto de as suas propriedades nucleares se adaptarem perfeitamente a esta espectroscopia: o núcleo ^{51}V tem uma abundância natural bastante elevada (99,75 %), um spin nuclear $I = 7/2$ (pertence aos núcleos quadrupolares), com um momento quadrupolar bastante baixo ($Q = -4,8 \text{ fm}^2$), o que faz com que as suas ressonâncias se apresentem aguçadas e, conseqüentemente, bastante bem resolvidas, com larguras a meia altura entre 60 e 100 Hz, no caso dos vanadatos tetraédricos ou aproximadamente tetraédricos (Heath e Howarth, 1981; Rehder, 1982; Rehder, 2008). A escala de desvios químicos abrange cerca de 5 000 ppm, o que reflecte a sensibilidade no núcleo ^{51}V ao seu ambiente de coordenação: pequenas variações deste conseguem ser detectadas através de variações distintas dos desvios químicos (Rehder, 2008).

A espectroscopia de ^{51}V -RMN tem sido amplamente usada para caracterizar as espécies de vanadato em solução, no que concerne às suas concentrações e equilíbrios químicos, em diferentes condições (Lindquist *et al.*, 1973; O'Donnell & Pope, 1976; Heath e Howarth, 1981; Rehder, 1982; Crans *et al.*, 1990; Crans, 1994; Crans & Shin, 1994; Crans *et al.*, 1995; Rehder,

2008), bem como para analisar a interacção do vanádio com proteínas, uma vez que a ligação entre ambos conduz a um alargamento do sinal devido a um aumento do tempo de correlação rotacional e/ou a redução na simetria do campo eléctrico devido a um átomo dador da proteína na esfera de coordenação do vanádio (Crans *et al.*, 1990). Alguns destes estudos encontram-se sumarizados na Tabela III.1.

Tabela III.I – Estudos por ^{51}V -RMN da interacção de vanadatos com proteínas.

Proteína	Sinais de RMN mais afectados	Referência bibliográfica
Ca ²⁺ -ATPase de Retículo Sarcoplasmático	V ₁₀ e V ₄ V ₁₀ , V ₄ e V ₁	Csermely <i>et al.</i> , 1985 Aureliano & Madeira, 1994
Ribonuclease	V ₁	Borah <i>et al.</i> , 1985
Fosfogliceratomutase	V ₂	Stakiewicz <i>et al.</i> , 1987 Liu <i>et al.</i> , 1992
Apo-transferrina	V ₁	Butler & Eckert, 1989 Rehder <i>et al.</i> , 2004
Subfragmento-1 de miosina	V ₄ V ₁₀ e V ₄ V ₁₀ e V ₄	Grammer & Yount, 1991 Aureliano, 2000 Tiago <i>et al.</i> , 2002
Desidrogenase de 6-fosfogluconato	V ₂ e V ₄	Crans & Shelble, 1990
Dismutase de superóxido	V ₄	Wittenkeller <i>et al.</i> , 1990
Tubulina	V ₄	Correia <i>et al.</i> , 1994
Banda-3	V ₁	Zhang <i>et al.</i> , 1997
Hsp90	V ₁₀	Soti <i>et al.</i> , 1998

Apesar de se terem efectuado estudos diversos sobre a interacção entre o vanádio(IV) e proteínas do sistema contráctil, de acordo com o conhecimento actual não se encontram descritos quaisquer estudos sobre a ligação entre este e a actina, analisada por ^{51}V -RMN, pelo que se torna de todo fundamental efectuar esta caracterização, de modo a melhor compreender o sistema em causa, em diferentes condições experimentais.

III.1.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica aplicada ao estudo de vanádio(IV)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Electrónica (RPE) é uma técnica poderosa, capaz de descrever as propriedades e o ambiente de um centro paramagnético através da caracterização desse centro com um campo magnético externo aplicado, uma vez que o seu comportamento, na presença deste, depende da sua vizinhança molecular. Contrariamente ao que acontece na espectroscopia de RMN, no caso da espectroscopia de RPE a frequência é mantida constante, fazendo-se variar a força do campo magnético aplicado. Em *Anexo* encontra-se uma breve descrição dos princípios teóricos desta técnica espectroscópica.

No caso do vanádio no estado de oxidação V(IV), o spin nuclear do ^{51}V é $I = 7/2$, pelo que os estados são separados em $2I + 1 = 8$ diferentes estados de energia cada, separados de $A_o/g\beta$, onde A_o é a constante de interacção nuclear hiperfina, na ausência de campo magnético aplicado. As transições de RPE são de natureza electrónica, sendo as suas regras de selecção dadas por $\Delta M_s = \pm 1$, $\Delta M_I = 0$, pelo que o espectro de RPE de VO^{2+} apresenta, caracteristicamente, duas séries de oito bandas equidistantes correspondentes à fracção de moléculas com a ligação V=O alinhada paralelamente ou perpendicularmente ao campo magnético aplicado (Fig. III.4). As transições paralelas apresentam, geralmente, constantes hiperfinas superiores às correspondentes à orientação perpendicular.

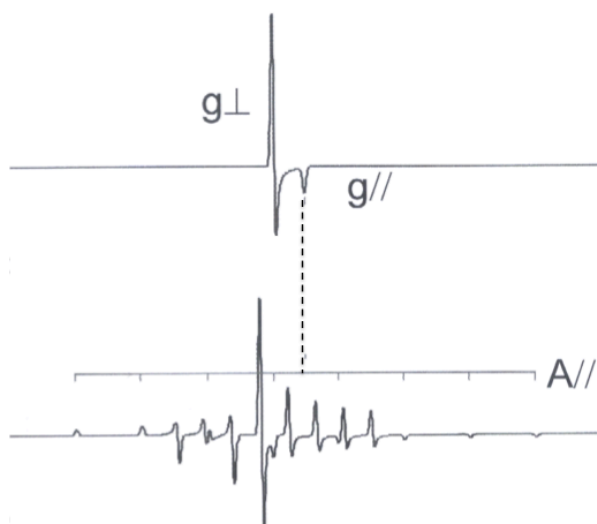


Figura III.4 – Espectro de EPR de vanádio V(IV) hipotético simulado com recurso ao programa informático SimFonia, da Bruker Instruments, Inc..

O ião vanadilo é caracterizado por quatro ligandos equatoriais e um axial correspondente ao grupo oxo na posição *trans*, assumindo assim uma configuração octaédrica. Chasteen (1981) propôs uma relação de aditividade, a qual permite correlacionar a constante de acoplamento

hiperfino, sobretudo $A_{//}$, com o número e o tipo de ligandos presentes no plano equatorial do íon vanadilo. Esta teoria evoluiu no sentido de não correlacionar apenas a constante isotrópica de acoplamento hiperfino ($A_0 = [A_{//} + 2A_{\perp}]/3$) com o número de oxigénios e nitrogénios no plano equatorial, mas também no de usar o valor de $A_{//}$, retirado do espectro de RPE, como uma sonda mais sensível do ambiente electrónico. De facto, cada ligando contribui de forma específica para $A_{//}$, pelo que a soma das contribuições dos quatro ligandos equatoriais originará o valor de $A_{//}$ observado. Com base na medição das constantes de acoplamento $A_{//}$ em estudos com complexos modelo, a constante hiperfina para um dado grupo de ligandos equatoriais pode ser calculado pela equação III.13:

$$A_{//\text{calc}} = \sum n_i A_{//i} / 4 \quad (\text{III.6})$$

onde i corresponde aos diferentes tipos de grupos de ligandos dadores equatoriais e n_i ($1 < n_i < 4$) é o número de ligando do tipo i (Chasteen, 1983). Quanto maior a capacidade de doar electrões um ligando possuir, menor a sua contribuição para o acoplamento hiperfino. Torna-se, deste modo, possível, com base num espectro de RPE, predizer quais os ligandos equatoriais e, com base neles, os locais de ligação do catião vanadilo quando incorporado em diferentes estruturas, nomeadamente proteínas. Na tabela III.2 apresentam-se alguns estudos sobre a interacção entre o vanádio(IV) e proteínas, recorrendo à espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica.

Tabela III.II – Estudos por RPE da interacção de vanadilo com proteínas.

Proteína	Referência bibliográfica
Carboxipeptidase A	DeKoch <i>et al.</i> , 1974
Bromoperoxidase	de Boer <i>et al.</i> , 1988
Carboxilase de piruvato	Werneburg & Ash, 1997
F ₁ -ATPase de cloroplasto	Hu <i>et al.</i> , 1996 Chen <i>et al.</i> , 1999
Transferrina	Ceccato <i>et al.</i> , 2000 Willsky <i>et al.</i> , 2001
Lactoferrina	Smith <i>et al.</i> , 1995
Desidratase de imidasol-glicerol-fosfato	Petersen <i>et al.</i> , 1997

Os ligandos observados em complexos de proteína-vanadilo incluem os grupos imidazol da histidina, os grupos carboxilato de ácido glutâmico e aspártico, os grupos fenolato da tirosina, água, carbonato e outros aniões, ribonucleótidos e ribonucleósidos (Chasteen, 1983).

De acordo com o conhecimento actual, não se encontram publicados quaisquer estudos sobre a interacção V(IV)-actina, caracterizada por espectroscopia de RPE, pelo que se torna de todo relevante a sua análise.

III.2 Materiais e métodos

III.2.1 Preparação das soluções de vanádio

III.2.1.1 Vanádio(V)

As soluções de vanadato foram preparadas em água *MilliQ* a partir de metavanadato de amónio (NH_4VO_3) numa concentração 50 mM, com agitação e aquecimento ($\sim 30\text{ }^\circ\text{C}$). Esta solução, com um valor de pH compreendido entre 6 e 7, designa-se por “metavanadato”. Acidificando a solução de metavanadato, por adição de HCl até um valor de pH = 4, observa-se uma mudança de cor de amarelo claro para laranja, indicativa da presença de espécies decaméricas de vanadato em solução. Esta segunda solução designa-se por “decavanadato”. Imediatamente antes da sua utilização, a solução de decavanadato foi ajustada a pH 7,5, por adição de NaOH. As soluções foram armazenadas a 4°C e mantidas em gelo aquando da sua utilização.

III.2.1.2 Vanádio(IV)

A solução de vanadilo foi preparada em condições anaeróbias, numa câmara de luvas (MBraun, modelo UniLab), sendo a concentração de O_2 no seu interior sempre inferior a 5 ppm, por diluição de sulfato de vanadilo (VOSO_4) em H_2O *MilliQ* saturada com N_2 gasoso, para uma concentração final de 50 mM.

III.2.2 Análise por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

Os espectros de absorção das soluções de vanádio, a $25\text{ }^\circ\text{C}$, foram obtidos num espectrofotómetro computadorizado Shimadzu (modelo UV-2401 PC), nas seguintes condições: fenda, 1 nm e intervalo espectral, 300 a 500 nm. Usou-se uma célula de quartzo de 1 cm de percurso óptico. Antes da aquisição do espectro realizou-se uma correcção da linha de base com os meios reaccionais onde as soluções de vanádio foram diluídas. Os espectros de 2ª. derivada foram obtidos a partir dos espectros de absorção usando uma rotina do programa instrumental.

As cinéticas de decomposição das espécies decaméricas de vanadato foram obtidas num *Diode Array* (modelo HP 8452A), a um comprimento de onda de 400 nm, durante 2 horas, e a diferentes temperaturas, usando uma concentração de 100 μM decavanadato, após diluição em

diferentes meios reaccionais (2 mM Tris-HCl, 0,2 mM CaCl₂ ± 0,2 mM ATP). Para uma temperatura de 25 °C, nas mesmas condições experimentais, foram adicionadas diferentes concentrações de G- e F-actina, de modo a avaliar qual o efeito que a presença destas proteínas provocava na cinética de decomposição da espécie V10.

III.2.3 Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ⁵¹V

Os espectros de RMN do isótopo ⁵¹V foram realizados num espectrómetro Bruker AMX-400 MHz equipado com uma sonda multinuclear inversa de 5 mm (sonda BBI). Em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro, prepararam-se soluções de 500 µL de deca- ou metavanadato com diferentes concentrações, suplementadas com 10% D₂O e em diferentes condições experimentais. As amostras foram irradiadas a uma frequência de 105,2 MHz. Os espectros foram adquiridos à temperatura ambiente, com uma largura espectral de 45 000 Hz, um tempo de aquisição de 0,086 s, número de transientes entre 15 000 e 25 000 e tempo de relaxação de 0,01 s. Para o processamento dos espectros foram utilizadas transformadas de Fourier, com alargamento das bandas (LB, do inglês *line broadening*) de 20 Hz. Os desvios químicos das ressonâncias de ⁵¹V foram obtidos em relação à espécie tetramérica de vanadato que apresenta um desvio de -578 ppm relativamente ao VOCl₃, independentemente do valor de pH (Heat e Howarth, 1981).

As áreas dos sinais do RMN correspondentes às espécies oligoméricas presentes foram obtidas por integração dos sinais usando o programa informático TOPSPIN 2.1 (Bruker). As concentrações relativas das espécies foram calculadas com recurso à equação III.7:

$$[V_n] = A(V_n) \cdot [V_t] / A_t \cdot n(V_n), \quad (\text{III.7})$$

onde A corresponde à área medida referente à ressonância da espécie de vanadato V_n com número de agregação n (número de átomos de vanádio), A_t à soma total das áreas medidas e V_t é a concentração total de vanádio.

De modo a determinar qual o efeito promovido pela actina nas ressonâncias de ⁵¹V, esta foi adicionada à mistura reaccional, tendo-se adquirido os espectros nas mesmas condições anteriormente descritas.

III.2.4 Análise por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica

Os espectros de RPE da espécie paramagnética V(IV), na ausência e na presença de actina, em diferentes situações experimentais, foram realizados a 77 K, num espectrómetro Bruker EMX-300 X-band equipado com um crióstato Oxford (ESR900), nas seguintes condições: frequência de micro-onda, 9,65 GHz; potência de micro-onda, 0,63 mW; amplitude de modulação, 10 Gauss; ganho do receptor, $2,0 \times 10^5$; scans, 4. Todas as soluções e amostras utilizadas foram preparadas em anaerobiose, numa câmara de luvas, de modo a evitar a redução de V(IV) a V(V). Após obtenção dos espectros, estes foram tratados através dos programas informáticos SimFonia e WinEPR.

III.3 Resultados e discussão

III.3.1 Caracterização das soluções de vanádio

III.3.1.1 Composição das soluções de vanadato por espectroscopia de ^{51}V -RMN

Apesar de ser possível obter exclusivamente uma única espécie de vanadato numa solução de metavanadato concentrada, soluções de metavanadato com concentrações da ordem dos milimolar contêm espécies orto- e metaméricas de vanadato. Apenas para concentrações de metavanadato da ordem dos micromolar, se encontram presentes exclusivamente as espécies de ortovanadato, como previamente observado por ^{51}V -RMN (Aureliano & Madeira, 1994 e 1998; Aureliano & Gândara, 2005). Além disso, a espécie decamérica de vanadato é termodinamicamente instável a pH neutro e alcalino, convertendo-se nos oxovanadatos lábeis, consoante as condições experimentais (Crans *et al.*, 2004).

De acordo com o anteriormente descrito, a espectroscopia de ^{51}V -RMN de soluções de meta-e decavanadato permite monitorizar a especiação de oxovanadatos em sistemas biológicos e quantificar de forma precisa a quantidade de cada espécie de vanadato no ensaio experimental (Crans *et al.*, 1990; Aureliano & Madeira, 1998; Aureliano *et al.*, 2005; Aureliano & Crans, 2009).

A partir da análise dos espectros apresentados na Figura III.5, obtidos para soluções de metavanadato num intervalo de concentrações compreendido entre 2 e 10 mM, após diluição no meio de reacção contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , verifica-se a existência de quatro ressonâncias, correspondentes às espécies monomérica, V_1 (-561 ppm), dimérica, V_2 (-567 ppm), tetramérica, V_4 (-579 ppm) e pentamérica, V_5 (-587 ppm) de vanadato. Os valores de desvio químico obtidos para as espécies V_1 , V_2 , V_4 e V_5 permite concluir que estas se encontram nos estados diprotonodado, monoprotonado e nas suas formas cíclicas, respectivamente (Heath & Howarth, 1981). As espécies V_1 , V_2 e V_4 encontram-se presentes para concentrações de metavanadato inferiores a 4 mM, enquanto a espécie V_5 só é identificável para concentrações superiores.

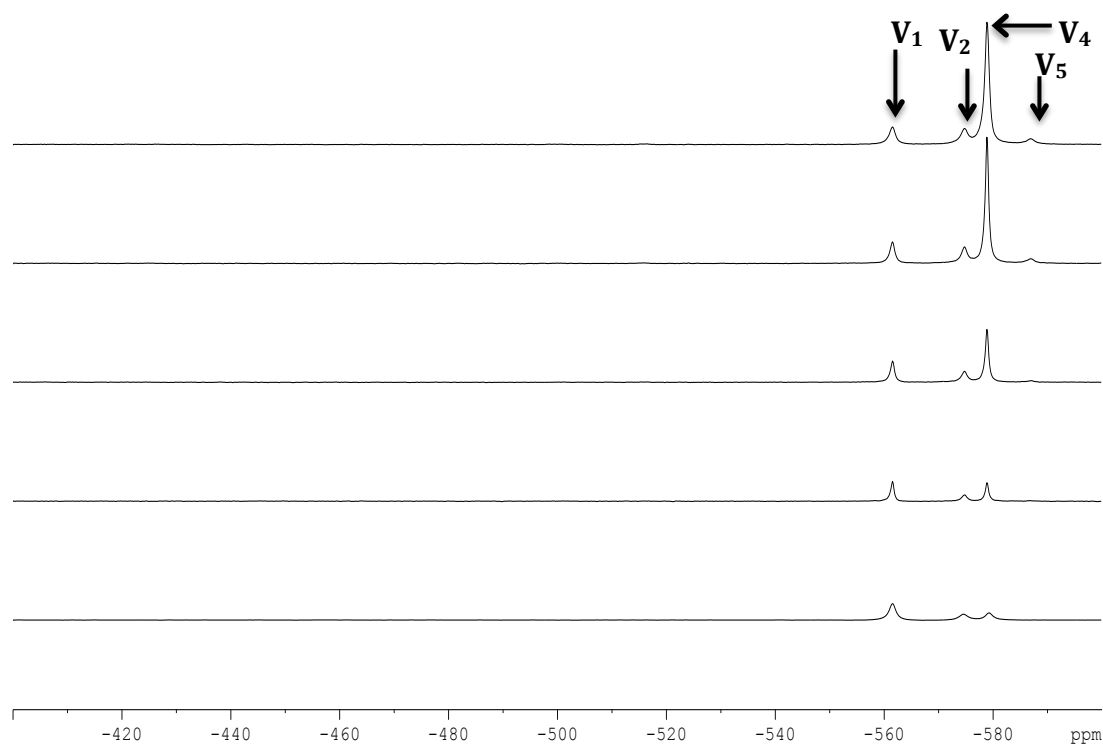


Figura III.5 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de diferentes concentrações de metavanadato (1, 2, 4, 8 e 10 mM em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM metavanadato em solução-tampão 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 . Os sinais de RMN V_1 e V_2 correspondem, respectivamente, às espécies monomérica (VO_4^{3-} , HVO_4^{2-} e H_2VO_4^-) e dimérica de vanadato ($\text{HV}_2\text{O}_7^{3-}$ e $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$). Os sinais V_4 e V_5 correspondem às espécies tetramérica ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4+}$) e pentamérica ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$) cíclicas de vanadato, respectivamente.

As concentrações das diferentes espécies que coexistem numa solução de metavanadato dependem da concentração total de vanádio, exibindo diferentes perfis (Fig. III.6). De facto, apenas a concentração da espécie V_2 exhibe uma correlação linear com a concentração de vanadato total no intervalo completo de concentrações utilizado, enquanto as espécies V_1 e V_4 apresentam linearidade apenas para concentrações de vanádio total compreendidas entre 2 e 10 mM. A espécie V_5 consegue ser detectada unicamente para concentrações de metavanadato superiores a 4 mM. A análise do gráfico permite, ainda, concluir que os oligómeros de peso molecular mais elevado são favorecidos para concentrações de vanadato mais altas: verifica-se um aumento significativo da espécie tetramérica de vanadato para concentrações de 4 mM metavanadato (em vanadato total).

Tal como constatado em Aureliano & Madeira (1998) quando a concentração de V_1 é igual a 800 μM , inicia-se a sua oligomerização para originar as espécies dimérica e tetramérica de vanadato. Os resultados obtidos mostram claramente o equilíbrio entre a espécie V_4 e as espécies V_1 e V_2 . De facto, o aparecimento de outras espécies oligoméricas encontra-se dependente da concentração da espécie monomérica de vanadato. Por último, pode inferir-se que, para

concentrações de metavanadato inferiores a 2 mM e intervalos de tempo de cerca de 20 minutos (que inclui o tempo de preparação da amostra e o tempo de aquisição do espectro) após diluição da solução de metavanadato no meio de reacção a pH fisiológico, coexistem em solução apenas as espécies monomérica (0,796 mM), dimérica (0,192 mM) e tetramérica (0,196 mM) de vanadato.

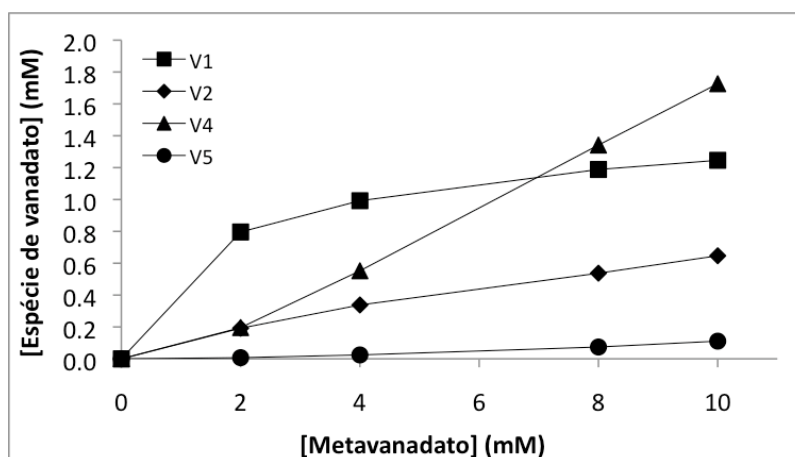


Figura III.6 – Distribuição das espécies oligoméricas de vanadato, em unidades de concentração (mM), em função da concentração total de metavanadato (mM). As concentrações de cada espécie foram obtidas a partir das áreas dos sinais de ^{51}V -RMN observados na Figura III.5, tal como se descreve na secção III.2.3. V₁, V₂, V₄ e V₅ correspondem, respectivamente, às espécies monomérica, dimérica, tetramérica, pentamérica e decamérica de vanadato.

Contrariamente às soluções de metavanadato, que contêm várias espécies de vanadato em equilíbrio rápido, as soluções de decavanadato (2 - 4 mM) contêm apenas as espécies decamérica e monomérica de vanadato (Fig. III.7). Os espectros de ^{51}V -RMN de soluções de decavanadato apresentam os sinais típicos da espécie decamérica, V_{10A} at -515 ppm, V_{10B} at -500 ppm and V_{10C} at -424 ppm, bem com um sinal atribuído à espécie monomérica a -560 ppm; a ressonância da espécie tetramérica ocorre a -575 ppm (O'Donnell & Pope, 1976; Heath & Howarth, 1981). De acordo com estes valores de desvio químico, a espécie decamérica encontra-se desprotonada (V₁₀O₂₈⁶⁻), conforme o esperado para um valor de pH superior a 5,7 (Crans & Amin, 1998).

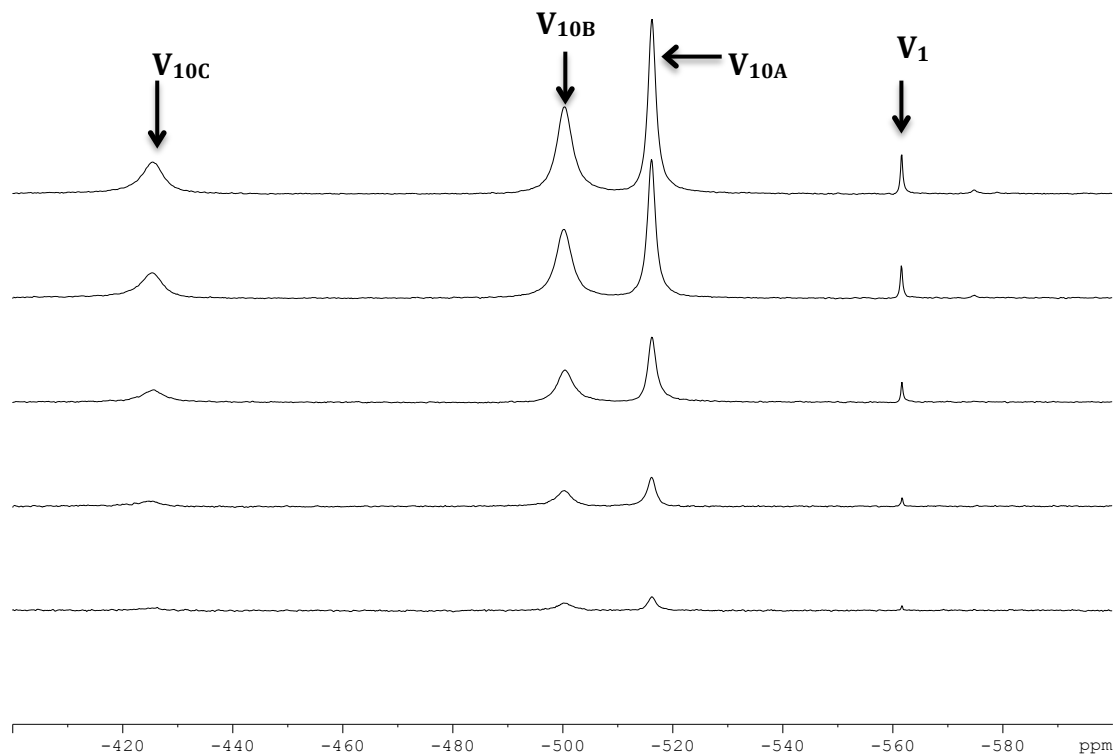


Figura III.7 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de diferentes concentrações de decavanadato (1, 2, 4, 8 e 10 mM em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM decavanadato em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 . Os sinais de RMN $\text{V}_{10\text{A}}$, $\text{V}_{10\text{B}}$ e $\text{V}_{10\text{C}}$ correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.

Além disso, a concentração da espécie V_{10} aumenta linearmente com a concentração de vanadato total, enquanto a concentração da espécie V_1 permanece praticamente constante (Fig. III.8). Tal permite concluir que numa solução de decavanadato, apenas 10 % do total de vanádio se encontra na forma decamérica, enquanto a concentração da espécie monomérica será próxima de 200 μM . Tal como se constata para as soluções de metavanadato a pH 7,5, quando a espécie monomérica atinge uma concentração igual a 200 μM , esta começa a oligomerizar, formando-se as espécies di- e tetramérica. Devido à baixa razão sinal/ruído só foi possível identificar a espécie tetramérica para concentrações de decavanadato superiores a 8 mM (em vanadato total). Não foi possível quantificar a espécie dimérica, uma vez que a sua contribuição é significativamente menor. Estes resultados indicam claramente que a espécie decamérica se encontram em equilíbrio com a espécie monomérica, estando o aparecimento de outras espécies oligoméricas dependente da formação desta última. Deste modo, para concentrações de decavanadato inferiores a 8 mM e cerca de 20 minutos (que inclui o tempo de preparação da amostra e o tempo de aquisição espectral) após a diluição da solução de decavanadato no meio de reacção a

pH fisiológico, coexistem em solução unicamente as espécies decamérica e monomérica de vanadato.

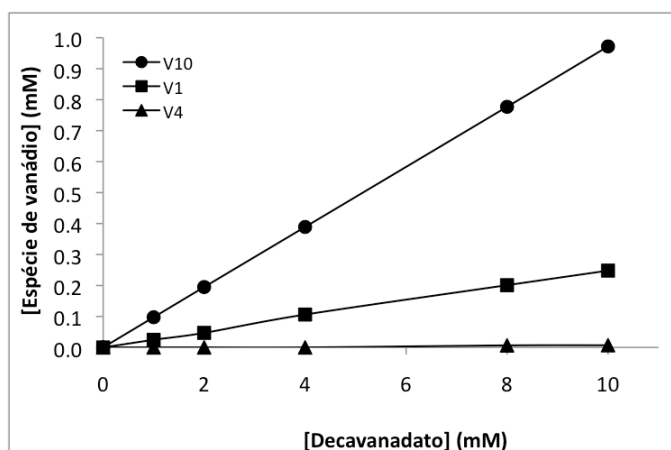


Figura III.8 – Distribuição das espécies oligoméricas de vanadato, em unidades de concentração (mM), em função da concentração total de decavanadato (mM). As concentrações de cada espécie foram obtidas a partir das áreas dos sinais de ^{51}V -RMN observados na Figura III.7, tal como se descreve na secção III.2.3. V₁, V₄ e V₁₀ correspondem, respectivamente, às espécies monomérica, tetramérica e decamérica de vanadato.

III.3.1.2 Estabilidade das soluções de decavanadato: análise por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível

Tendo sido anteriormente descrito que a espécie decamérica de vanadato se decompõe ao longo do tempo, sendo esta desoligomerização influenciada pelo pH, força iónica e temperatura, bem como pelo tempo após o qual a solução é diluída no meio reaccional, torna-se fundamental determinar qual o comportamento químico deste oligoanião nas misturas reacionais utilizadas, de forma a estabelecer uma correcta correlação com os efeitos induzidos pelas diferentes espécies de vanadato no sistema biológico em estudo. A velocidade de hidrólise da espécie decamérica pode ser facilmente determinada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível. De facto, a partir dos espectros UV-vis obtidos para diferentes concentrações de decavanadato (Fig. III.9), verifica-se a existência de uma banda característica na região do visível, a qual que não se observa para qualquer outra espécie oligomérica de vanadato, nomeadamente as espécies dimérica e tetramérica presentes na solução de metavanadato.

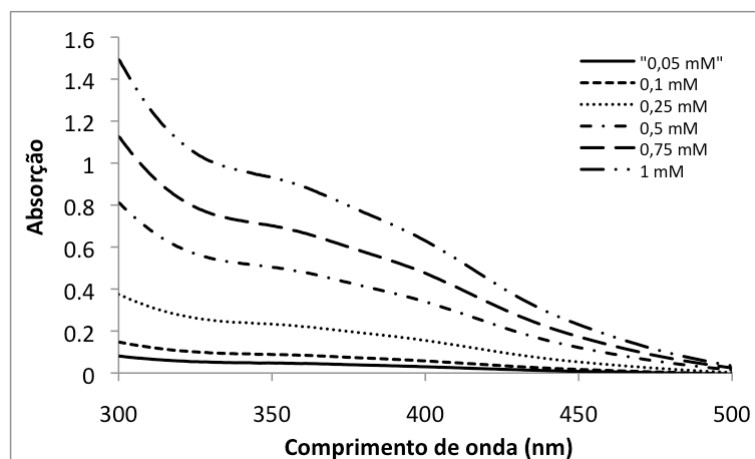


Figura III.9 – Espectros de absorção na região do ultravioleta-visível de soluções de decavanadato com diferentes concentrações (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mM em vanadato total) após diluição de uma solução de 50 mM decavanadato (em vanadato total) numa solução tampão contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP. Os espectros foram obtidos de acordo com o descrito na secção III.2.2.

Esta banda de absorção é bem resolvida através da derivada de 2ª. ordem dos espectros de absorção, apresentando a forma de dois vales com mínimos centrados a 358 e 400 nm (Fig. III.10). Uma vez que a intensidade das bandas a estes dois comprimentos de onda é proporcional à concentração de decavanadato (Fig. III.11), pode concluir-se que, efectivamente, as absorções electrónicas que ocorrem a 358 e 400 nm se relacionam com a espécie decamérica de vanadato, sendo obtida uma correlação linear entre 0,05 e 1 mM decavanadato (em vanadato total). Determinou-se um coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{400} = 645 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a espécie decamérica de vanadato.

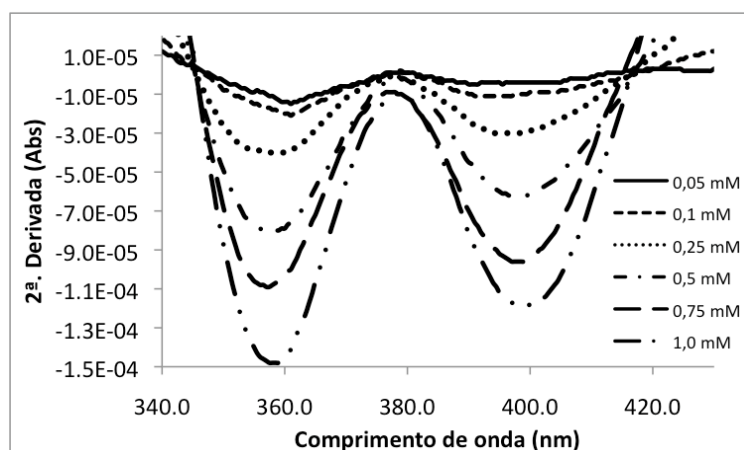


Figura III.10 – Segunda derivada dos espectros de absorção apresentados na Fig. III.9. Os espectros foram obtidos para diferentes concentrações de decavanadato (0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM e 1 mM em vanadato total) após diluição de uma solução de 50 mM decavanadato (em vanadato total) numa solução tampão contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP. Os espectros foram obtidos de acordo com o descrito na secção III.2.2.

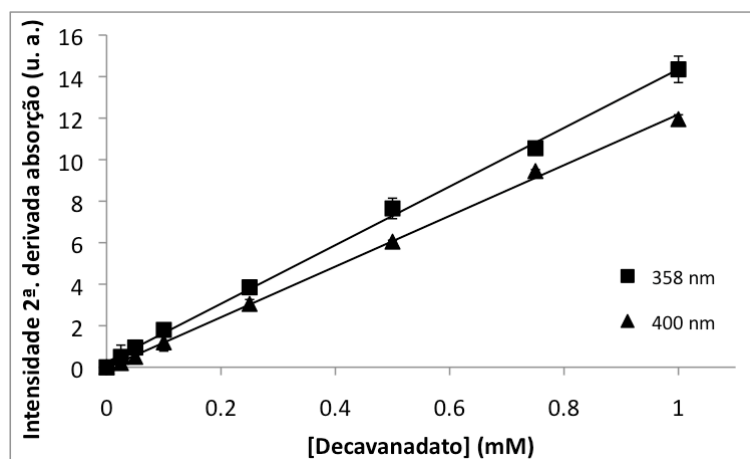


Figura III.11 – Representação gráfica dos valores da segunda derivada da absorção a 358 e 400 nm (em unidades arbitrárias) em função da concentração de decavanadato (0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM e 1 mM em vanadato total). Os espectros foram obtidos após diluição de uma solução de 50 mM decavanadato (em vanadato total) numa solução tampão contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP, de acordo com o descrito na secção III.2.2.

Assim, a estabilidade da espécie decamérica após diluição da solução de decavanadato no meio reaccional dos ensaios experimentais (2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2), para uma concentração final de 1 mM (em vanadato total), foi determinada através da leitura da absorvência a um comprimento de onda de 400 nm, a diferentes temperaturas. Verificou-se tratar-se de uma cinética de 1ª ordem, uma vez que o logaritmo neperiano da Abs_{400} em função do tempo de aquisição espectral apresenta linearidade para o conjunto de temperaturas estudadas. A título de exemplo, apresenta-se o gráfico para uma temperatura de 25 °C (Fig. III.12).

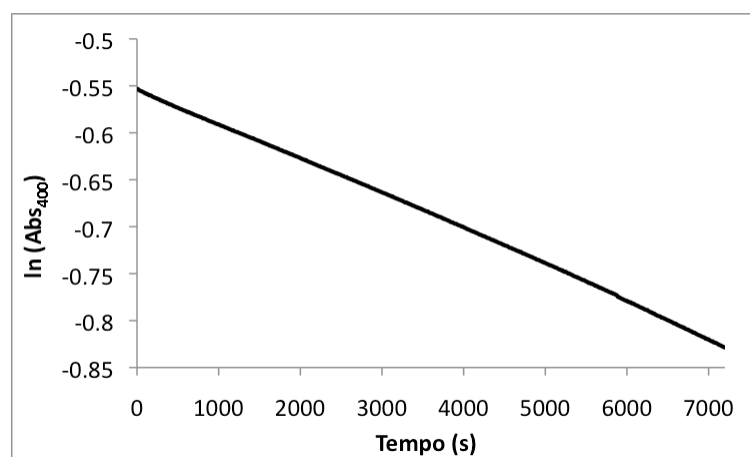


Figura III.12 – Representação gráfica do logaritmo neperiano da absorção a um comprimento de onda de 400 nm ($\ln(\text{Abs}_{400})$) em função do tempo (segundos) para uma solução de 1 mM decavanadato (em vanadato total) após diluição da solução concentrada (50 mM decavanadato) no meio reaccional contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP, de acordo com o descrito na secção III.2.2.

Uma vez que a desoligomerização da espécie decamérica segue uma cinética de 1ª ordem, é possível descrevê-la através da equação abaixo (eq. III.8):

$$A = A_0 e^{-kt} \Leftrightarrow$$

$$\ln A = \ln A_0 - kt \quad (\text{Eq. III.8})$$

onde $-k$ (constante de velocidade) corresponde ao declive da recta e $\ln A_0$ é o valor de $\ln A$ para o tempo inicial. Representando o logaritmo neperiano da constante de velocidade em função do inverso das temperaturas (em Kelvin) estudadas, obtém-se o gráfico apresentado na Figura III.13, sendo a recta descrita pela equação de Arrhenius (eq. III.9):

$$k = A e^{-E_a/RT} \Leftrightarrow$$

$$\ln k = \ln A - E_a/RT \quad (\text{Eq. III.9})$$

onde $-E_a/R$ corresponde ao declive, R é a constante dos gases perfeitos ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e A designa-se por factor pré-exponencial. Deste modo, torna-se possível determinar a energia de activação, E_a , da reacção de desoligomerização da espécie decamérica de vanadato como sendo igual a $63,4 \text{ kJ mol}^{-1}$.

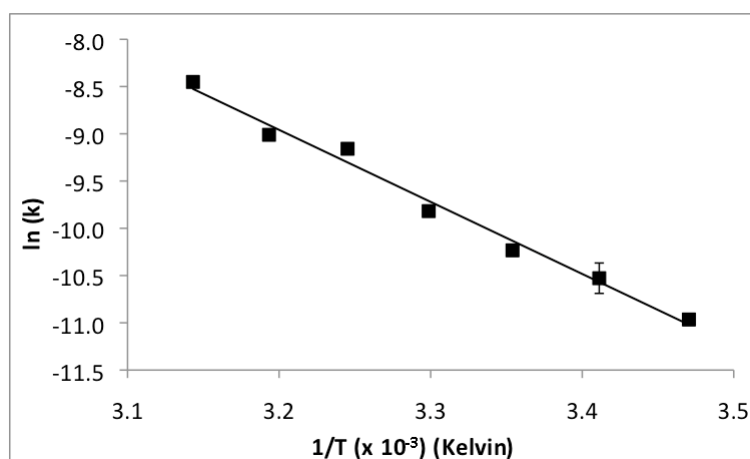


Figura III.13 – Representação gráfica do logaritmo neperiano da constante cinética k ($\ln(k)$) em função do inverso da temperatura ($1/T$) (K^{-1}) para uma solução de 1 mM decavanadato (em vanadato total) após diluição da solução concentrada (50 mM decavanadato) no tampão de reacção (2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP). O valor da constante de velocidade foi determinado para a reacção de desoligomerização da espécie decamérica de vanadato, a um comprimento de onda de 400 nm e diferentes temperaturas (288,15; 293,15; 298,15; 303,15; 310,15; 313,15 e 318,15 K), tal como se descreve na secção III.2.2.

Numa reacção de 1ª. ordem o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) é independente da concentração inicial de reagente, podendo ser descrito por $t_{1/2} = \ln 2 / k$. Assim, aplicando o valor da constante cinética determinado a partir do gráfico da Fig. III.13, pode determinar-se que o tempo de meia-vida, a 25° C, é de $5,4 \pm 0,3$ horas para as condições de reacção acima referidas. Verificou-se, ainda, que a presença de ATP até uma concentração de 1 mM não altera o tempo de meia-vida (dados não apresentados).

III.3.2 Caracterização do sistema actina-vanádio

III.3.2.1 Efeito de actina na estabilidade da espécie decamérica de vanadato: análise por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

Na presença de concentrações crescentes de G-actina, observa-se um aumento do tempo de meia-vida da espécie decamérica de vanadato (100 μ M decavanadato, i.e., 10 μ M V_{10}) (Fig. III.14). De facto, a uma temperatura de 25 °C, o V_{10} é estabilizado em cerca de 5 vezes, passando o tempo de meia-vida de 5 horas, na ausência de proteína, para 27 horas, na presença de 8 μ M G-actina, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 0,2 mM $CaCl_2$ (Fig. III.14, ■).

O aumento do tempo de meia-vida do vanadato decamérica na presença de concentrações crescentes de proteína pode ser racionalizado com base na formação de um complexo entre a espécie decamérica e a G-actina. Considerando duas reacções em equilíbrio, a primeira entre o V_{10} e o V_1 e a segunda entre o V_{10} e a proteína, e considerando que a primeira (escala de tempo de horas) é muito mais lenta que a segunda (escala de tempo de segundos ou, no máximo, minutos), pode deduzir-se que a velocidade de desoligomerização da espécie decamérica de vanadato é inversamente proporcional ao aumento da concentração de proteína (Takegami *et al.*, 2003). Além disso, pode considerar-se que entre 4 e 8 μ M G-actina o tempo de meia-vida se encontra praticamente na fase estacionária, o que sugere uma estequiometria G-actina: V_{10} igual ou superior a um. Contrariamente, não se observam alterações significativas no tempo de meia-vida da espécie V_{10} na presença de G-actina no mesmo meio reacional suplementado com 200 μ M ATP (Fig. III.14, □).

A adição de 200 μ M ATP e de uma solução que promove a formação de filamentos de actina (100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$) ao meio reacional provoca uma diminuição do tempo de meia-vida da espécie decamérica de vanadato de 27 para 10 horas (Fig. III.14, ▲), na presença de G-actina (8 μ M). Obteve-se um padrão semelhante na presença de F-actina (Fig. III.14, ●). Estes

resultados sugerem que a F-actina e a G-actina, em condições favoráveis à sua polimerização, poderão comportar-se como um alvo similar para a espécie decamérica de vanadato.

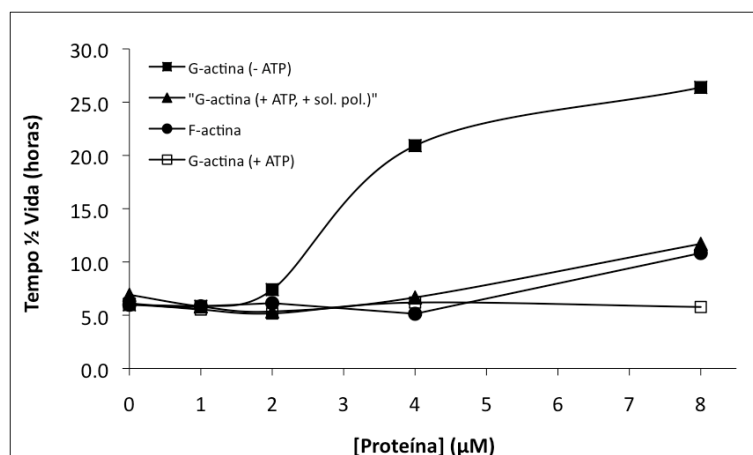


Figura III.14 – Tempo de meia-vida de 100 µM decavanadato na presença de: (■) G-actina (em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM CaCl₂); (▲) G-actina (em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM ATP, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, pH 7.5); (□) G-actina (em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM ATP, pH); (●) F-actina (em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM ATP, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂). As cinéticas de decomposição da espécie decamérica de vanadato foram monitorizadas a um comprimento de onda de 400 nm, a 25 °C, de acordo com o descrito na secção III.2.2.

O conjunto dos resultados acima apresentados sugere duas possibilidades para a interação da espécie decamérica de vanadato com a G-actina: (i) através da ligação à G-actina num sítio próximo do local de ligação de nucleótidos ou (ii) noutra local, sendo este alterado após a ligação do substrato. Uma vez que na F-actina o local de ligação de nucleótidos não se encontra acessível, será mais provável que o V₁₀ se ligue no mesmo local que o ATP, pois aparentemente este nucleótido (i) compete com o V₁₀ ou (ii) induz alterações conformacionais na proteína que previnem a interação com o oligonião.

III.3.2.2 Estudo por ⁵¹V-RMN da ligação de decavanadato à actina

III.3.2.2.1 Efeito da adição de diferentes sais e da força iónica

Tal como verificado anteriormente, uma solução de 5 mM decavanadato (em vanadato total) possui uma boa razão sinal/ruído relativamente aos sinais da espécie decamérica de vanadato, apresentando uma composição de 480 µM V₁₀ e 201 µM V₁, pelo que a concentração da espécie decamérica é, aproximadamente, 2,5 vezes superior à da espécie monomérica (Fig. III.15A).

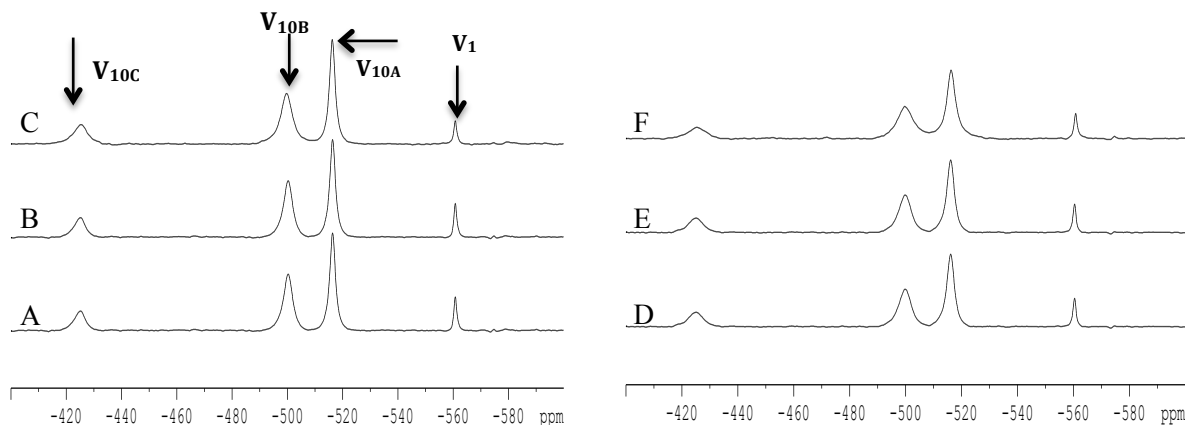


Figura III.15 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM decavanadato em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (A e D), 5 mM MgCl_2 (B e E) ou 0,2 mM CaCl_2 (C e F), na ausência (esquerda) ou na presença (direita) de 40 μM G-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($V_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.

A adição de 40 μM G-actina a uma solução de 5 mM decavanadato, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5) conduz a efeitos diferentes nas ressonâncias das espécies monomérica e decamérica, tendo-se verificado um acentuado alargamento da largura a meia-altura, $\Delta v_{1/2}$ (de 139 para 299 Hz para o sinal V_{10A}) e decréscimo da intensidade dos sinais correspondentes ao vanadato decamérico. Por seu turno, o sinal correspondente à espécie monomérica não sofre qualquer alteração significativa. Para ambas as espécies não se verificaram alterações nos valores de desvio químico (δ) das ressonâncias dos vanadatos (Fig. III.15D).

A adição de MgCl_2 (5 mM) ou CaCl_2 (0,2 mM) às soluções de 5 mM decavanadato, na ausência de G-actina, não induz alterações significativas nos valores de largura a meia altura ou nos desvios químicos das ressonâncias dos vanadatos, o que indica que estes não se associam com as formas decamérica e monomérica presentes em solução (Fig. III.15B e C, respectivamente). A adição de 40 μM G-actina conduz a um factor de alargamento, F (definido como o quociente entre os valores da largura a meia altura do sinal, na presença e ausência de proteína), do sinal correspondente à espécie V_{10} semelhante ao observado na ausência de MgCl_2 ou CaCl_2 ($F = 2,1$ em ambos os casos) (Fig. III.15E e F, respectivamente). Na Tabela III.III encontram-se sumarizados todos os parâmetros analisados, respeitantes aos espectros apresentados na Figura III.15.

Tabela III.III – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.15. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído. O factor de alargamento da largura a meia altura, F, é definido como o quociente entre os valores de $\Delta\nu_{1/2}$ na presença e na ausência de 40 μM G-actina. A concentração (C) das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato foram calculadas através da equação III.7, de acordo com o descrito na secção III.2.3.

	5 mM Decavanadato	
	V_{10}	V_1
A: 2 mM Tris-HCl		
C (mM)	0,480	0,201
δ (ppm)	-516.3611	-560.7360
l (cm)	2.2	0.7
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	139.1963	59.4642
B: (A) + 5 mM MgCl_2		
C (mM)	0,476	0.191
δ (ppm)	-516.2568	-560.7329
l (cm)	2.3	0.5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	139.1963	59.4642
F (relativo a A)	1.0	1.0
C: (A) + 0.2 mM CaCl_2		
C (mM)	0,464	0,189
δ (ppm)	-516.3611	-560.7360
l (cm)	2.2	0.7
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	139.1963	59.4642
F (relativo a A)	1.0	1.0
D: (A) + 40 μM G-actina		
C (mM)	0,465	0,203
δ (ppm)	-516.0934	-560.3961
l (cm)	1.6	0.6
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	298.6605	59.4642
F (relativo a A)	2.1	1.0
E: (B) + 40 μM G-actina		
C (mM)	0,467	0,196
δ (ppm)	-516.2416	-560.7502
l (cm)	1.5	0.5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	298.6605	59.4642
F (relativo a B)	2.1	1.0
F: (C) + 40 μM G-actina		
C (mM)	0,466	0,199
δ (ppm)	-516.2416	-560.7502
l (cm)	1.5	0.5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	298.6605	59.4642
F (relativo a C)	2.1	1.0

Uma vez que o CaCl_2 nas concentrações normalmente usadas na solução tampão habitual nos estudos com actina não altera a interacção entre a G-actina e a espécie decamérica de vanadato, prosseguiram-se os estudos num meio contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 0,2 mM CaCl_2 . De modo a melhor compreender a natureza da interacção do vanadato decamérico com a proteína, analisou-se o efeito da força iónica na ligação de decavanadato à G-actina (Fig. III.16). Verificou-se que a adição de 100 mM KCl conduz a um alargamento menos pronunciado dos sinais correspondentes à espécie decamérica (factor de alargamento de 1,5 para 100 mM KCl e de 2,1 na ausência deste sal), o que sugere que a ligação de V_{10} à G-actina é de natureza electrostática, o que está de acordo com o facto de se tratar de uma espécie polianiónica com seis cargas negativas. Adicionalmente, verifica-se uma ligeira deslocação para campo alto do desvio químico correspondente aos sinais de V_{10A} e V_{10B} , o que pode dever-se a um efeito de desblindagem causado pela presença de iões potássio que estabelecerão ligações de natureza iónica com os átomos mais exteriores da molécula de V_{10} . Relativamente ao sinal correspondente ao vanadato monomérico, não se observam alterações significativas, após adição de KCl nas condições experimentais usadas (Fig. III.16; Tab. III.IV).

Sabendo que a interacção V_{10} -actina é favorecida para forças iónicas mais baixas, prosseguiram-se os estudos no tampão óptimo para esta proteína, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM CaCl_2 .

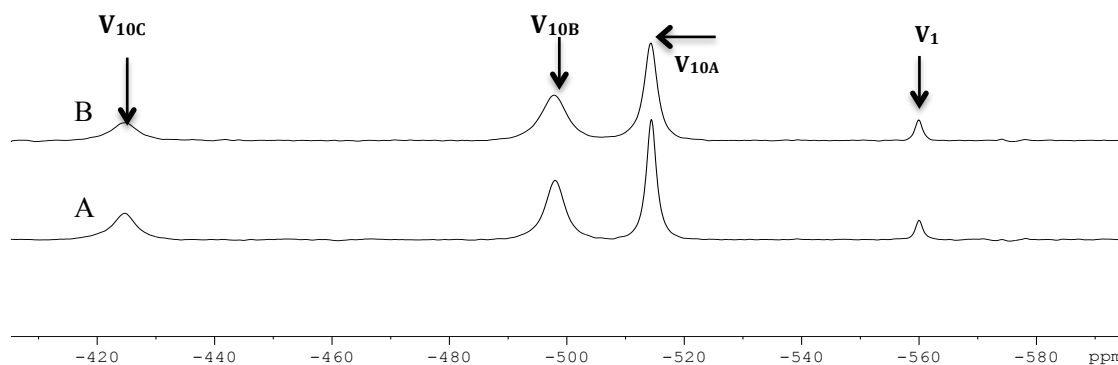


Figura III.16 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM decavanadato em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 e 100 mM KCl, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μM G-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.

Tabela III.IV – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.16. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído.

	5 mM Decavanadato	
	V10	V1
A: 100 mM KCl		
C (mM)	0,477	0,230
δ (ppm)	-514.3983	-560.0014
I (cm)	2.8	0.4
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	139.1963	59.4642
F (relativo a C da Tab. III.I)	1.0	1.0
B: (A) + 40 μM G-actina		
C (mM)	0,476	0,238
δ (ppm)	-514.3007	-559.9480
I (cm)	2.3	0.5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	218.9284	59.4642
F (relativo a A)	1.5	1.0

III.3.2.2.2 Efeito da adição do nucleótido ATP

Uma vez que a actina possui um local de ligação de nucleótidos, analisou-se qual o efeito que a adição de MgATP (5 mM) provocaria nos espectros de ^{51}V -RMN. Na ausência de proteína não são induzidas alterações significativas nas larguras a meia altura ou nos desvios químicos das ressonâncias dos vanadatos, o que indica que este nucleótido não se associará a V_{10} (Fig. III.17A; Tab. III.V). Quando a adição de G-actina (40 μM) é efectuada na presença de 5 mM ATP, verifica-se um menor alargamento do sinal correspondente ao vanadato decamérico ($F = 1,6$ na presença de nucleótido e $F = 2,1$ na ausência) (Fig. III.17B; Tab. III.V). Tal pode indicar que (i) a presença deste nucleótido compete com o V_{10} para a G-actina ou que (ii) o ATP induz alterações conformacionais que fazem diminuir a afinidade do V_{10} para a proteína.

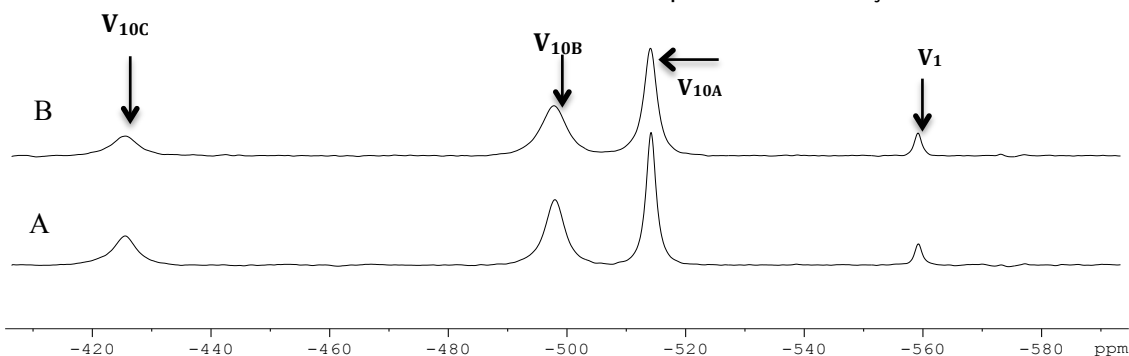


Figura III.17 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM decavanadato em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 e 5 mM KCl, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μM G-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.

Tabela III.V – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.17. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído.

	5 mM Decavanadato	
	V_{10}	V_1
A: 5 mM MgATP		
C (mM)	0.472	0.281
δ (ppm)	-515.3497	-553.7228
I (cm)	2.5	0.5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	139.1963	70.7862
F (relativo a A da Tab. III.III)	1.0	1.2
B: (A) + 40 μM G-actina		
C (mM)	0.465	0.355
δ (ppm)	-515.2840	-554.0004
I (cm)	1.8	0.7
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	218.9284	83.3838
F (relativo a A)	1.6	1.2

III.3.2.2.3 Determinação da constante de dissociação entre a espécie decamérica de vanadato e a actina

Estabelecidas as condições óptimas que favorecem a interação entre a espécie decamérica de vanadato e a G-actina, titulou-se uma solução 5 mM decavanadato (em vanadato total) com esta proteína, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 0,2 mM CaCl_2 . Os dados experimentais foram ajustados com uma função sigmoideal de Boltzmann (Fig. III.18A), com os seguintes parâmetros: $F_{\min} = 0,91 \pm 0,10$; $F_{\max} = 2,23 \pm 0,07$; $V_{50} = 25,42 \pm 2,32 \mu\text{M}$ G-actina. Observa-se,

também, que para concentrações de G-actina superiores a 50 μM o factor de alargamento, F , não sofre alterações significativas.

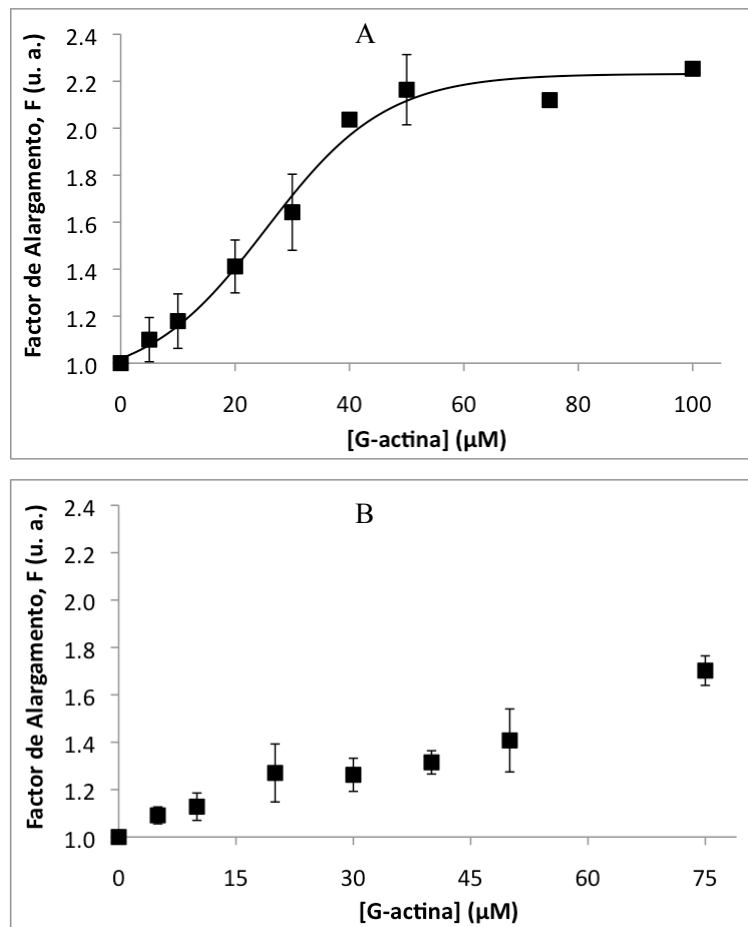


Figura III.18 – Titulação de uma solução 5 mM decavanadato (em vanadato total) com (A) G-actina, num meio contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM CaCl_2 ; e (B) F-actina, num meio contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM ATP. O factor de alargamento da largura a meia altura, F , é definido como o quociente entre os valores de $\Delta v_{1/2}$ do sinal de V_{10A} na presença e na ausência de proteína. Os dados experimentais representam a media de 3 ensaios diferentes. No caso da F-actina o erro associado a cada ponto experimental encontra-se dentro dos limites do símbolo utilizado. A titulação com G-actina foi ajustada com uma função sigmoide de Boltzmann, com os seguintes parâmetros: $F_{\text{mín}} = 0,91 \pm 0,10$; $F_{\text{máx}} = 2,23 \pm 0,07$; $V_{50} = 25,42 \pm 2,32 \mu\text{M}$ G-actina.

Uma experiência similar foi realizada com a forma polimerizada da actina, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP. No entanto, o conjunto de pontos não é correctamente ajustado com uma função matemática, pelo que não se podem calcular quaisquer parâmetros matemáticos (Fig. III.18B). Tal pode dever-se à elevada viscosidade da solução de F-actina, a qual provoca um aumento significativo do tempo de rotação da espécie decamérica de vanadato com concomitante variação dos tempos de relaxação que deixam de depender exclusivamente da associação entre a proteína e o vanadato. Este aumento da viscosidade pode, de igual modo, explicar o menor erro experimental associado à titulação da solução de

decanadato com a F-actina, por comparação com a G-actina. De facto, no caso da actina filamentosa o erro encontra-se no interior dos pontos experimentais, o que não se verifica para a actina monomérica. Adicionalmente, não pode ser excluída a hipótese de que a razão entre as formas polimerizada/despolimerizada da actina possa ser afectada pela concentração da G-actina, o que contribuiria para um maior erro associado à medição do alargamento do sinal de RMN.

No entanto, consistente com estudos anteriores (Tiago *et al.*, 2002), a adição de 40 μM F-actina à solução de 5 mM decavanadato produz um alargamento de 165 para 207 Hz (1,3 vezes) na ressonância de V_{10A} (Fig. III.19; Tab. III.VI).

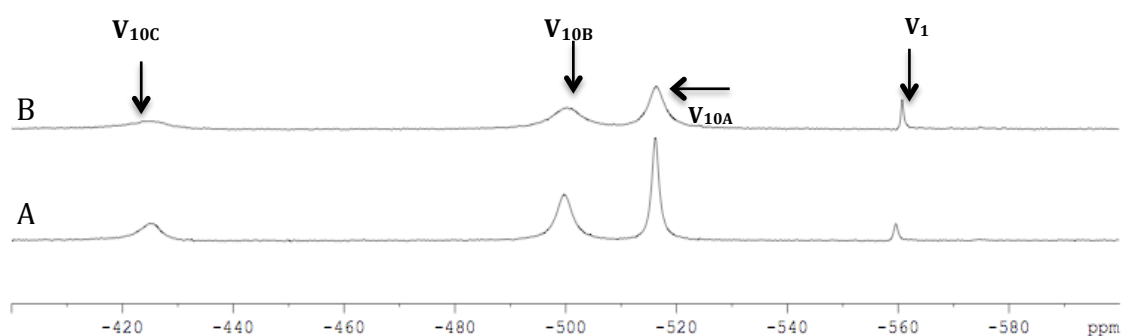


Figura III.19 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM decavanadato em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μM F-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($V_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.

Tabela III.VI – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.19. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído.

	5 mM Decavanadato	
	V_{10}	V_1
A: 5 mM Decavanadato		
C (mM)	0.472	0.281
δ (ppm)	-515.3497	-553.7228
I (cm)	2.5	0.7
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	165.1963	59.4642
F (relativo a A da Tab. III.III)	1.0	1.0
B: (A) + 40 μM F-actina		
C (mM)	0.465	0.255
δ (ppm)	-515.2840	-554.0004
I (cm)	1.8	0.7
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	207.9284	59.4642
F (relativo a A)	1.3	1.0

III.3.2.2.3 *Análise da competição entre as diferentes formas de vanadato para a ligação à actina*

A competição entre as diferentes formas de vanadato para a ligação à actina foi avaliada, primeiramente, entre as espécies monomérica, dimérica e tetramérica presentes numa solução 2 mM metavanadato (em vanadato total) e, em seguida, entre estas e a espécie decamérica, usando uma solução mista constituída por 5 mM decavanadato e 2 mM metavanadato (em vanadato total).

Verificou-se que a adição de G-actina (40 μ M) a uma solução de metavanadato (2 mM) não altera os parâmetros espectrais dos sinais correspondentes às ressonâncias dos vanadatos monomérico, dimérico e tetramérico, na ausência ou na presença de 5 mM $MgCl_2$ (Fig. III.20; Tab. III.VII).

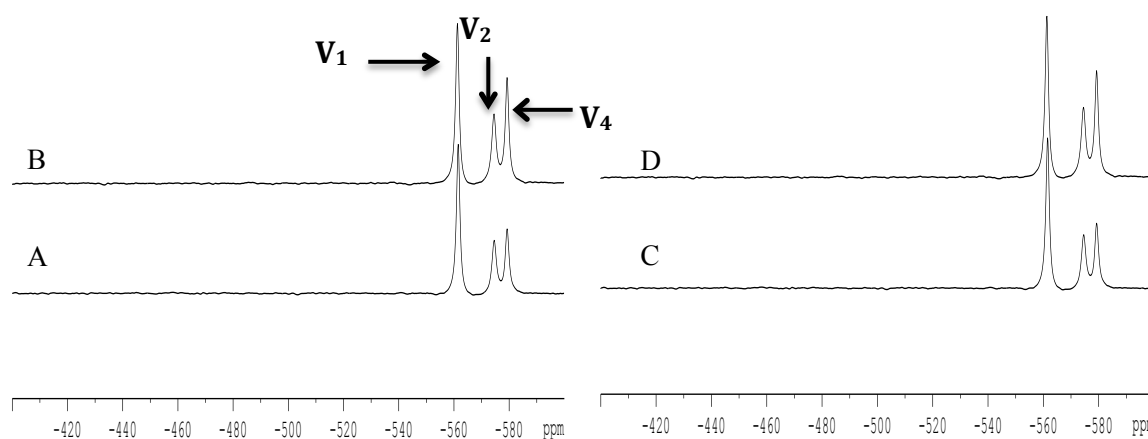


Figura III.20 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 2 mM metavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM metavanadato, em (A) 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $CaCl_2$ (B) e 40 μ M G-actina, na (B) ausência (D) ou na presença de 5 mM $MgCl_2$. Os sinais de RMN V_1 , V_2 e V_4 correspondem, respectivamente, às espécies monomérica, dimérica e tetramérica de vanadato. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.

Tabela III.VII – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 2 mM metavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.20. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal $\text{V}_{10\text{A}}$, devido à melhor razão sinal/ruído.

	2 mM Metavanadato		
	V_1	V_2	V_4
A: Controlo			
C (mM)	1.040	0.222	0.129
δ (ppm)	-561.5302	-574.5741	-579.2508
I (cm)	3.4	1.2	1.5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	59.4642	139.1963	59.4642
B: (A) + 5 mM MgCl_2			
C (mM)	1.087	0.219	0.134
δ (ppm)	-561.7278	-575.2467	-579.6509
I (cm)	3.4	1.3	1.8
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	59.46	139.20	59.4642
F (relativo a B)	1.0	1.0	1.0
C: (A) + 40 M $\mu\text{G-actina}$			
C (mM)	0.995	0.229	0.158
δ (ppm)	-561.2552	-575.4998	-579.2415
I (cm)	3.6	1.5	2.2
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	59.4642	139.1963	59.4642
F (relativo a B)	1.0	1.0	1.0
D: (B) + 40 M $\mu\text{G-actina}$			
C (mM)	1.039	0.224	0.147
δ (ppm)	-561.4404	-574.7727	-579.4260
I (cm)	3.5	1.2	1.5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	59.4642	139.20	59.46
F (relativo a B)	1.0	1.0	1.0

Por seu turno, a adição de MgATP (5 mM) provoca um o alargamento da largura a meia altura do sinal correspondente à espécie monomérica de vanadato ($F = 1,2$), o que sugere que a presença deste nucleótido aumenta ligeiramente a afinidade da espécie monomérica para a G-actina, o que está de acordo com o descrito para a miosina (Tiago *et al.*, 2002). Os sinais dos vanadatos dimérico e tetramérico não sofrem alterações significativas (Fig. III.21; Tab. III.VIII).

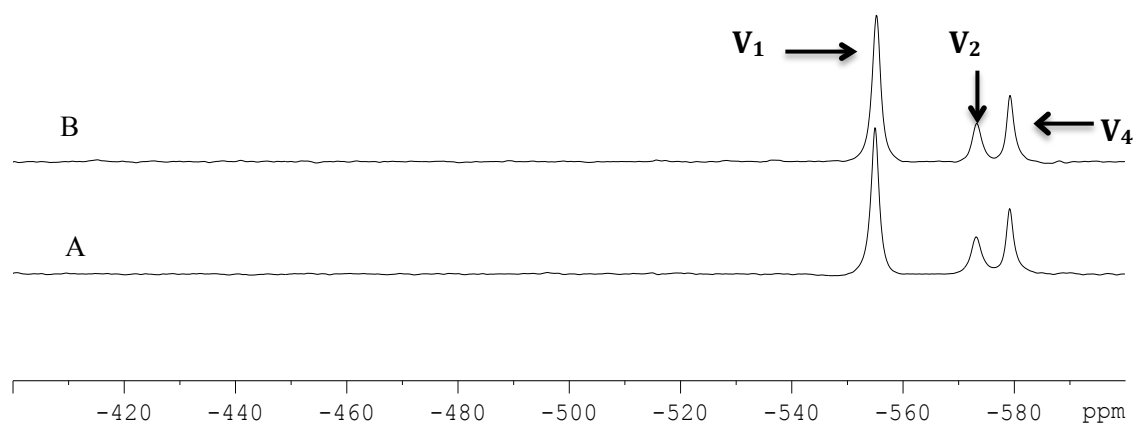


Figura III.21 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 2 mM metavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de uma solução concentrada de 50 mM metavanadato em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μM F-actina. Os sinais de RMN V_1 , V_2 e V_4 correspondem, respectivamente, às espécies monomérica, dimérica e tetramérica de vanadato (indicar). Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.

Tabela III.VIII – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 2 mM metavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.21. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído.

	2 mM Metavanadato		
	V_1	V_2	V_4
A: 5 mM MgATP			
C (mM)	1.163	0.179	0.119
δ (ppm)	-554.9624	-573.1406	-579.1616
I (cm)	3.3	0.8	1.5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	67.4374	218.9284	59.4642
F (relativo a A da Tab. III.VII)	1.1	1.0	1.0
B: (A) + 40 M μG-actina			
C (mM)	1.198	0.161	0.120
δ (ppm)	-555.2150	-573.2426	-579.2207
I (cm)	3.3	0.8	1.5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	83.4123	218.9284	59.4642
F (relativo a A)	1.2	1.0	1.0

A adição de G-actina (40 μM) à solução mista (5 mM decavanadato e 2 mM metavanadato) provoca um alargamento e diminuição da intensidade dos sinais correspondentes ao vanadato decamérico semelhantes aos observados aquando da adição de proteína à solução de decavanadato (F igual a 2,1 em ambos os casos).

Tal como se havia verificado para a solução de metavanadato, os sinais correspondentes às espécies monomérica, dimérica e tetramérica não sofrem alterações significativas (Fig. III.22, Tab. III.IX), o que parece indicar uma ligação preferencial de V_{10} à G-actina. Na presença de

MgCl_2 não se verificaram alterações dos parâmetros espectrais analisados (Fig. III.22, Tab. III.IX), enquanto que na presença de 5 mM ATP as alterações observadas foram idênticas às anteriormente observadas para as soluções de deca- e metavanadato, aquando da sua análise separadamente (Fig. III.23; Tab. III.X)

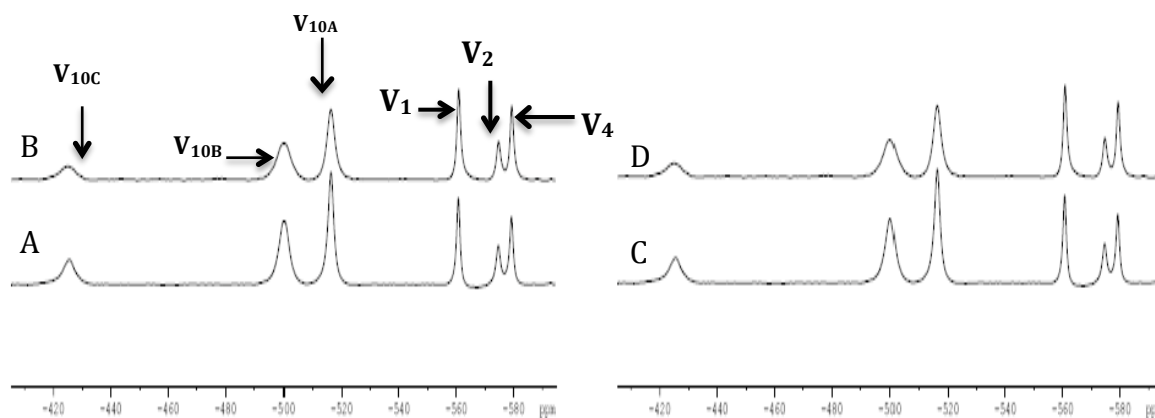


Figura III.22 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato e 2 mM metavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de soluções concentradas de 50 mM decavanadato e 50 mM metavanadato, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μM F-actina. Os sinais de RMN V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os sinais V_1 , V_2 e V_4 correspondem às espécies monomérica, dimérica e tetramérica de vanadato, respectivamente. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.

Tabela III.IX – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato e 2 mM metavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.22. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal $\text{V}_{10\text{A}}$, devido à melhor razão sinal/ruído.

	2 mM Metavanadato + 5 mM Decavanadato			
	V10	V1	V2	V4
A: Controlo				
C (mM)	0.337	0.670	0.181	0.149
δ (ppm)	-516.2745	-560.6647	-574.6093	-579.1779
I (cm)	2.2	1.7	0.8	1.3
$\Delta\nu$ (1/2) (Hz)	139.1963	59.4642	139.1963	59.4642
B: (A) + 40 μM G-actina				
C (mM)	0.290	0.915	0.194	0.199
δ (ppm)	-516.2429	-560.7931	-574.6883	-579.2984
I (cm)	1.4	1.7	0.8	1.4
$\Delta\nu$ (1/2) (Hz)	298.6605	59.4642	139.1963	59.4642
F (relativo a A)	2.1	1.0	1.0	1.0
C: (A) + 5 mM MgCl_2				
C (mM)	0.335	0.673	0.168	0.161
δ (ppm)	-516.0238	-560.8519	-574.5935	-579.0389
I (cm)	2.2	1.6	0.8	1.5
$\Delta\nu$ (1/2) (Hz)	139.1963	59.4642	139.1963	59.4642
F (relativo a A)	1.0	1.0	1.0	1.0
D: (C) + 40 μM G-actina				
C (mM)	0.291	0.901	0.208	0.193
δ (ppm)	-515.8950	-560.9336	-574.6266	-579.1237
I (cm)	1.2	1.6	0.8	1.3
$\Delta\nu$ (1/2) (Hz)	298.6605	59.4642	139.1963	59.4642
F (relativo a A)	2.1	1.0	1.0	1.0

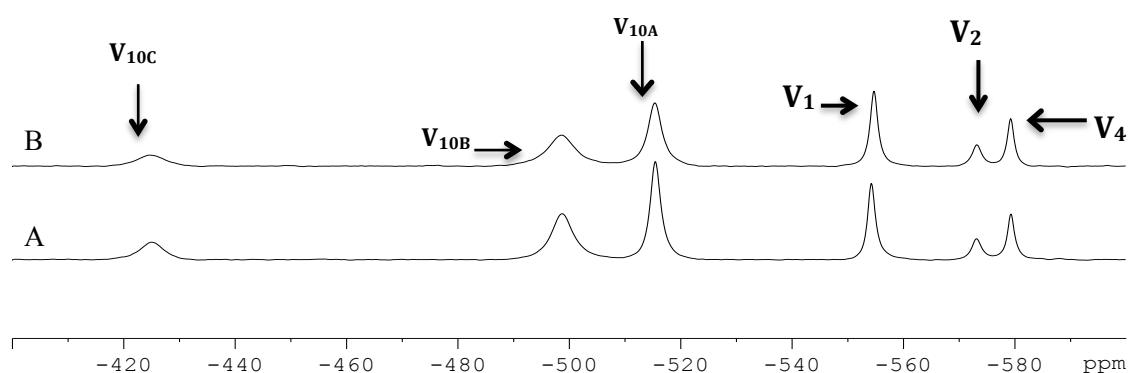


Figura III.23 – Espectros de ^{51}V -RMN (105,2 MHz) de 5 mM decavanadato e 2 mM metavanadato (em vanadato total) obtidas após diluição de soluções concentradas de 50 mM decavanadato e 50 mM metavanadato, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, na ausência (A) ou na presença (B) de 40 μM F-actina. Os sinais de RMN $\text{V}_{10\text{A}}$, $\text{V}_{10\text{B}}$ e $\text{V}_{10\text{C}}$ correspondem, respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) na espécie decamérica de vanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) apresentada na Figura III.3. Os sinais V_1 , V_2 e V_4 correspondem às espécies monomérica, dimérica e tetramérica de vanadato, respectivamente. Os espectros foram adquiridos de acordo com o descrito na secção III.2.3.

Tabela III.X – Parâmetros espectrais, desvio químico (δ), largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de 5 mM decavanadato e 2 mM metavanadato (em vanadato total) apresentados na Figura III.23. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal V_{10A} , devido à melhor razão sinal/ruído.

	5 mM Decavanadato + 2 mM Metavanadato			
	V10	V1	V2	V4
A: 5 mM MgATP				
C (mM)	0,334		0,053	0,051
δ (ppm)	-515,4222	-554,2163	-573,0932	-579,2676
I (cm)	2,5	3,2	0,9	1,5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	139,1873	67,4347	218,9284	59,4642
F (relativo a A da Tab. III.IX)	1.0	1.1	1.0	1.0
B: (A) + 40 μM G-actina				
C (mM)	0,314			
δ (ppm)	-515,3427	-555,9624	-573,1526	-579,2288
I (cm)	1,8	3,3	0,8	1,5
$\Delta\nu$ (1/2h) (Hz)	218,9824	83,4123	218,9284	59,4642
F (relativo a A)	1.6	1.2	1.0	1.0

III.3.2.3 Estudo por RPE da ligação de vanadilo à actina

Enquanto se utilizou a espectroscopia de RMN para estudar a interacção de vanadatos com a actina, o sistema vanadilo-actina foi analisado recorrendo à espectroscopia de RPE.

A adição de 250 μM VO_4 a um meio contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 não promove o aparecimento dos sinais de EPR típicos do oxovanádio(IV) (Fig. III.24). De facto, para as espécies V(IV), a pH fisiológico e num meio não-complexante, não podem ser observados quaisquer sinais de EPR (Crans *et al.*, 2004). No entanto, para concentrações de Tris mais elevadas (20 mM Tris e 0,001 M VO_4^{2-}), observou-se uma interacção bastante forte com o catião vanadilo (Crans *et al.*, 1989). Assim, a observação de um sinal de EPR a pH neutro indicará que se encontra presente em solução um ligando capaz de formar complexos com o vanadilo, ou que a solução não se encontra a pH neutro (Chasteen & Theil, 1982; Crans *et al.*, 2004). Uma vez que não se registaram alterações no valor de pH (7,5) após a adição de VO_4 , imediatamente antes das amostras serem congeladas em azoto líquido, os sinais observados após a adição de G- e F-actina (50 e 30 μM , respectivamente) podem ser atribuídos unicamente a uma interacção metal-proteína. Assim, a intensidade absoluta dos sinais de EPR de vanádio(IV) podem ser correlacionados com a concentração de proteína adicionada ao meio reaccional, tal como anteriormente descrito (Fukui *et al.*, 2003). Na presença de ATP, forma-se um complexo entre o catião oxovanádio(IV) e este nucleótido (Fig. III.24D), o que está de acordo com estudos anteriores (Katsaros, 1982). Assim, quando o meio reaccional contém ATP (2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP), a formação do complexo VO_4^{2-} -ATP pode ser observada no

espectro de EPR. Além disso, observa-se que a presença de ATP no meio reaccional previne a interacção entre o catião vanadilo e a G-actina, uma vez que os sinais de EPR se tornam menos intensos até ao ponto de não-deteccção quando o nucleótido é concomitantemente adicionado ao ensaio. Provavelmente o vanadilo interactua com a G-actina num local próximo do bolso de ligação de nucleótidos ou o ATP induz alterações conformacionais na estrutura da proteína que previnem a sua interacção com o ião vanadilo. Apesar de todas as amostras terem sido preparadas em condições anaeróbias, uma diminuição na intensidade dos sinais de EPR, no caso de iões paramagnéticos, pode dever-se a interacções spin-spin entre o VO^{2+} e o ATP adicionado ou a uma menor interacção entre o VO^{2+} e a proteína. A diminuição da intensidade dos sinais pode dever-se, de igual modo, a um re-oxidação parcial do metal.

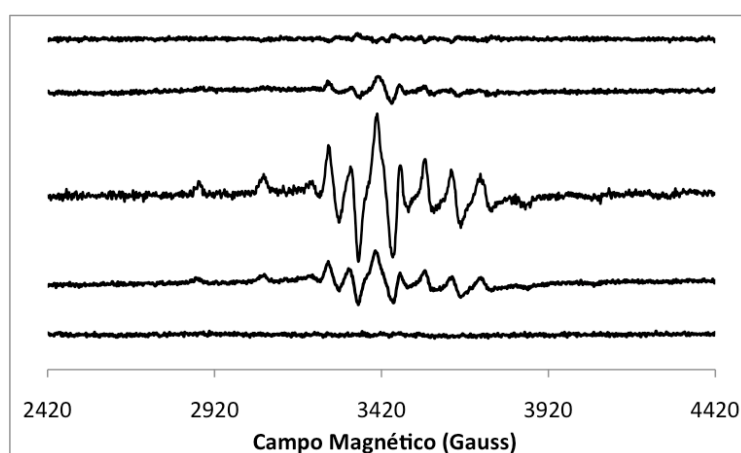


Figura III.24 – Espectros de RPE banda-X de 250 μM VOSO_4 em (A) 2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM CaCl_2 , na presença de (B) 50 μM G-actina, (C) 30 μM F-actina, (D) 0,2 mM ATP e (E) 50 μM G-actina e 0,2 mM ATP. Os espectros foram adquiridos a 77 K, nas seguintes condições: frequência de micro-onda, 9,65 GHz; potência de micro-onda, 0,63 mW; amplitude de modulação, 10 Gauss; ganho do receptor, $2,0 \times 10^5$; scans, 4, tal como descrito na secção III.2.4.

Com base na constante hiperfina ($A_{//}$) determinada experimentalmente, é possível prever a contribuição de diferentes dadores para este valor, ou seja, os núcleos aos quais os electrões desemparelhados se encontram acoplados. No entanto, uma vez que os valores típicos de $A_{//}$ obtidos através da simulação dos espectros de EPR variam entre $31,9 \times 10^{-4}$ e $45,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, com um erro associado de ca. $\pm 1,5 \times 10^{-4}$, o uso destas relações de aditividade requer alguma precaução, visto mais do que uma combinação de ligandos poder satisfazer o valor da constante hiperfina determinado experimentalmente, dentro do limite do erro. Como consequência, torna-se essencial ter em consideração os diferentes tipos de ligandos possíveis na estrutura da proteína, ou qualquer outra molécula. Tendo em consideração que o espectro de simulação da interacção entre o oxovanádio(IV) e a G-actina apresenta os seguintes seguintes parâmetros, $A_{//} = 195,6 \text{ G} = 531,0798 \text{ MHz}$, $A_{\perp} = 65 \text{ G}$, $g_{\perp} = 1,998$ e $g_{//} = 1,9399$ (Fig. III.25,

topo), pode sugerir-se que o ião vanadilo se encontrará ligado ao oxigénio de três moléculas de água e a um carboxilato (Asp ou Glu), ou a um azoto equatorial de um grupo amina, presente nas cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, como a asparagina, glutamina ou lisina, tendo por base os valores de os valores de $A_{//}$ e $g_{//}$ obtidos, bem como a tabela de ligandos equatoriais publicada por Chasten (1981).

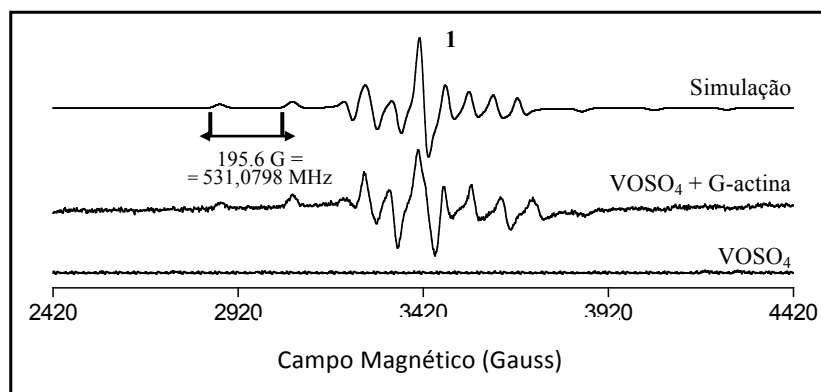


Figura III.25 – Espectros de RPE banda-X de 250 μM VOSO_4 , em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 (A) e 30 μM G-actina, experimental (B) ou simulação (C). Para o espectro simulado usaram-se larguras de linha de 20,0, 20,0 e 24,0 G para as direcções x, y e z, respectivamente, e uma linha de forma Lorentziana/Gaussiana. Os espectros foram adquiridos a 77 K, nas seguintes condições: frequência de micro-onda, 9,65 GHz; potência de micro-onda, 0,63 mW; amplitude de modulação, 10 Gauss; ganho do receptor, $2,0 \times 10^5$; scans, 4, tal como descrito na secção III.2.4.

A extensão da ligação do ião vanadilo à actina foi determinada a partir da linha $m_i = -1/2$ perpendicular (Fig. III.25, 1), uma vez que esta banda apresenta uma maior intensidade e uma melhor correlação linear aquando da titulação de uma solução de actina com VOSO_4 (dados não apresentados). Deste modo, titulou-se uma solução de 50 e 30 μM G- e F-actina com VOSO_4 , em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP. Traçou-se o gráfico da intensidade da banda $-1/2$ perpendicular (em unidades arbitrárias) em função da concentração de VOSO_4 (em micromolar), e ajustaram-se os pontos experimentais a uma função hiperbólica; a partir desta calculou-se uma constante de dissociação, K_d , de $7,48 \pm 1,11$ μM G-actina e $43,05 \pm 5,34$ μM F-actina (Fig. III.26A e B). A partir destes dados, determinou-se que se ligarão, aproximadamente, 1 e 4 iões VO^{2+} por molécula de G-e F-actina, respectivamente.

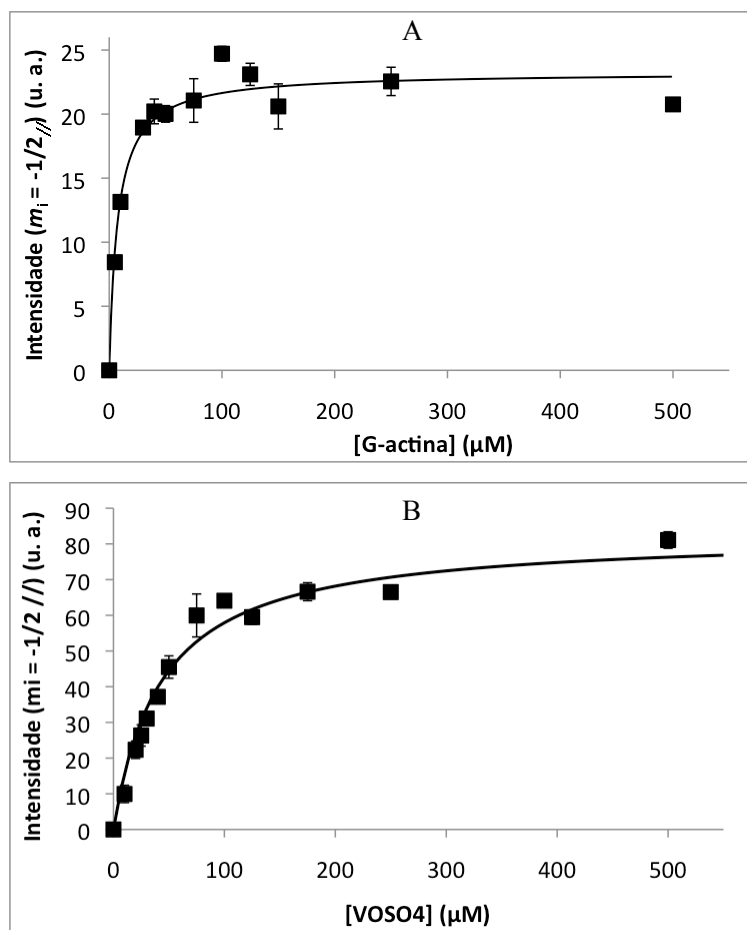


Figura III.26 –Intensidades do pico correspondente à linha $m_i = -1/2$ perpendicular dos espectros de RPE (representado na Figura III.25 pelo número 1) de banda-X de (A) 50 μM G-actina e (B) 30 μM F-actina, tituladas com diferentes concentrações de VOSO_4 , em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm$ 0,2 mM ATP. Os dados experimentais correspondem a três ensaios diferentes. Os espectros foram adquiridos a 77 K, nas seguintes condições: frequência de micro-onda, 9,65 GHz; potência de micro-onda, 0,63 mW; amplitude de modulação, 10 Gauss; ganho do receptor, $2,0 \times 10^5$; scans, 4, tal como descrito na secção III.2.4.

III.4 Conclusões

A caracterização das espécies de vanadato no meio reaccional utilizado no presente trabalho (2 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,2 mM CaCl₂ ± 0,2 mM ATP), recorrendo à espectroscopia de ⁵¹V-RMN, permitiu concluir que a concentração da espécie decamérica de vanadato corresponde a 10% da concentração inicial da solução de decavanadato (em vanadato total). Por seu turno, a concentração da espécie monomérica de vanadato mantém-se, sensivelmente, constante (~200 μM). Na solução de metavanadato existem, essencialmente, as espécies monomérica, dimérica e tetramérica, sendo a espécie pentamérica apenas mensurável para concentrações de metavanadato bastante elevadas.

Por espectroscopia de absorção UV-vis foi possível determinar que a espécie V₁₀ se decompõe, sendo o seu tempo de meia-vida, a 25 °C, de cerca de 5 horas, o que permite concluir que no tempo de realização dos ensaios (cerca de 20 minutos) esta se encontrará presente em solução. Além disso, determinou-se que a energia de activação da reacção de desoligomerização da espécie decamérica de vanadato é $E_a = 63,4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Verificou-se, ainda, que nas condições experimentais usadas, podem ser detectadas por espectroscopia de absorção UV/vis concentrações da espécie decamérica de vanadato de 5 μM.

A adição de G-actina à mistura reaccional, na ausência de ATP, provoca um aumento do tempo de meia-vida do V₁₀ de 5 para 27 horas, o que é indicativa da interacção entre a proteína e o metal. Na presença de ATP, não se verificaram quaisquer alterações neste parâmetro, o que indicará que o nucleótido previne, de alguma forma, esta interacção. Estes resultados foram confirmados por ⁵¹V-RMN: na presença de ATP o factor de alargamento do sinal correspondente à espécie decamérica é menor, por comparação com o valor obtido na ausência de ATP, para a mesma concentração de G-actina.

Estabelecidas as condições óptimas que favorecem a interacção V₁₀-actina, determinou-se um valor de $V_{50} = 25,42 \pm 2,32 \text{ μM}$ G-actina, após titulação de uma solução de decavanadato com G-actina, tendo por base o factor de alargamento das ressonâncias correspondentes aos átomos V_{10A}.

Por seu turno, a caracterização da interacção V(IV)-actina, por espectroscopia de RPE, permitiu concluir que o vanadilo se liga a ambas as formas monomérica e filamentosa de actina, sendo os valores de K_d de $7,48 \pm 1,11 \text{ μM}$ G-actina e $43,05 \pm 5,34 \text{ μM}$ F-actina. Verificou-se, de igual modo, que a presença de ATP previne a interacção entre o vanádio(IV) e a G-actina. Com base nos parâmetros obtidos a partir do espectro simulado, sugere-se a ligação do vanadilo a três moléculas de H₂O e (i) a um carboxilato ou (ii) ao azoto equatorial de um grupo amina.

III.5 Referências Bibliográficas

- Aureliano, M., V. Madeira (1994) “Interactions of vanadate with sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase”, **Biochim. Biophys. Acta** 1221:259-271;
- Aureliano, M., V. Madeira (1998) “Energy transduction mechanism as affected by vanadium(V) species: Ca^{2+} -pumping in sarcoplasmic reticulum”, **Adv. Environ. Sci. Technol.** 30:333–358;
- Aureliano, M. (2000) “Vanadate oligomers interactions with myosin”, **J. Inorg. Biochem.** 80:141-143
- Aureliano, M, R. M. C. Gândara (2005) “Decavanadate effects in biological systems”, **J. Inorg. Biochem.** 99:979–985;
- Aureliano, M., T. Tiago, R.M.C. Gândara, A. Sousa, A. Moderno, M. Kaliva, A. Salifoglou, R.O. Duarte, J.J.G. Moura (2005) “Interactions of vanadium(V)-citrate complexes with the sarcoplasmic reticulum calcium pump”, **J. Inorg. Biochem.** 99:2355–2361
- Aureliano, M. & Crans, D. C. (2009) “Decavanadate ($V_{10}O_{28}^{6-}$) and oxovanadates: oxometalates with many biological activities”, **J. Inorg. Biochem.** 103:536-546
- Borah, B., C.-W. Chen, W. Egan, M. Miller, A. Wlodawer, J. S. Cohen (1985) “Nuclear magnetic resonance and neutron diffraction studies of the complex of ribonuclease A with uridine vanadate, a transition-state analogue”, **Biochemistry** 24:2058-2067;
- Borgen, O., M. R. Mahmoud, I. Skauvik (1977) “Reinvestigation of hydrolysis of pentavalent vanadium”, *Acta Chem. Scand. A* 31:329-339;
- Butler, A. (1998) “Vanadium Haloperoxidases”, **Curr. Opin. Chem. Biol.** 2:279-285;
- Butler, A. & H. Eckert (1989) “ ^{51}V NMR as a probe of vanadium(V) coordination to human apotransferrin”, **J. Am. Chem. Soc.** 111:2802-2809;
- Ceccato, A. S., A. Neves, M. A. de Brito, S. M. Drechsel, A. S. Mangrich, R. Werner, W. Haase, A. J. Bortoluzzi (2000) “Magneto-structural correlation for binuclear octahedral vanadium(IV)-oxo complexes. Synthesis, structure and magnetic properties of a $V^{IV}O^{2+}$ complex with a new ligand derived from glycine”, **J. Chem. Dalton Trans.** 1573-1577;
- Chasteen, N. D. (1981) In: **Biological Magnetic Resonance**, L. J. Berliner, J. Reuben (Eds.), Biological Magnetic Resonance, vol. 3, Plenum Press, New York;
- Chasteen, N. D. & E. C. Theil (1982) “Iron binding by horse spleen apo-ferritin: a vanadyl(IV) EPR spin probe study”, **J. Biol. Chem.** 257:7672-7677;

- Chasteen, N. D. (1983) *“The biochemistry of vanadium”*, **Structure and Bonding** 53:105-138;
- Chasteen, N. D., J. K. Grady, C. E. Holloway (1986) *“Characterization of Binding, Kinetics, and Redox Stability of Vanadium(IV) and Vanadium(V) Protein Complexes in Serum”*, **Inorg. Chem.** 25:2754-2760;
- Chasteen, N. D. (1995) *“Vanadium-protein interactions”*, **Met. Ions Biol. Syst.** 31:231-247;
- Chen, W., R. LoBrutto, W. D. Frasch (1999) *“EPR Spectroscopy of VO₂⁺-ATP bound to catalytic site 3 of chloroplast F1-ATPase from Chlamydomonas reveals changes in metal ligation resulting from mutations to the phosphate-binding loop Threonine (betaT168)”*, **J. Biol. Chem.** 274:7089-7094;
- Correia, J. J., L. D. Lipscomb, J.C. Dabrowiak, N. Isern and J. Zubietta (1994) *“Cleavage of tubulin by vanadate ion”*, **Arch. Biochem. Biophys.** 309:94-104;
- Crans, D. C., R. L. Bunch, L. A. Theisen (1989) *“Interactions of trace levels of vanadium(IV) and (V) in biological systems”*, **J. Am. Chem. Soc.** 111:7597-7607;
- Crans, D. C. & S. M. Shelbe (1990) *“Vanadate dimer and tetramer both inhibit glucose-6-phosphate dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides”*, **Biochemistry** 29:6698-6706;
- Crans, D. C., C. D. Rithner, L. A. Theisen (1990) *“Time-resolved ⁵¹V 2-D NMR for studies of kinetic exchange between vanadate oligomers”*, **J. Am. Chem. Soc.** 112:2901-2908;
- Crans, D. C. (1994) *“Aqueous chemistry of labile oxovanadates: relevance to biological studies”*, **Comments Inorg. Chem.** 16:1-33;
- Crans, D. C. & P. K. Shin (1994) *“Characterization of vanadium(V) complexes in aqueous solutions: ethanolamine- and glycine-derived complexes”*, **J. Am. Chem. Soc.** 116:1305-1315;
- Crans, D. C., M. Mahroof-Tahir, A. D. Keramidias (1995) *“Vanadium chemistry and biochemistry of relevance for use of vanadium compounds as antidiabetic agents”*, **Mol. Cell Biochem.** 153:17-24;
- Crans, D. C. & S. S. Amin (1998) *“Chemistry of relevance to vanadium in the environment”*, **In: Vanadium in the Environment**, J. O. Nriagu Ed.;
- Crans, D. C., J. J. Smee, E. Gaidamauskas, L. Yang (2004) *“The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds”*, **Chem. Rev.** 104:849-902;
- Csermely, P., A. Martonosi, G. C. Levy, A. J. Eijchart (1985) *“⁶¹V-n.m.r. analysis of the binding of vanadium(V) oligoanions to sarcoplasmic reticulum”*, **Biochem. J.** 230:807-815;

- Cruywagen, J. J., J. B. B. Heyns, A. N. Westra (1996) "Protonation Equilibria of Mononuclear Vanadate: Thermodynamic Evidence for the Expansion of the Coordination Number in VO_2^+ ", **Inorg. Chem.** 35:1556-1559;
- De Boer, E., K. Boon, R. Wever (1988) "Electron paramagnetic resonance studies on conformational states and metal ion exchange properties of vanadium bromoperoxidase", **Biochemistry** 27:1629-1635;
- DeKoch, R. J., D. J. West, J. C. Cannon, N. D. Chasteen (1974) "Electron paramagnetic resonance studies of the structure and metal ion exchange kinetics of vanadyl(IV) bovine carbonic anhydrase", **Biochemistry** 13:4338-4347;
- Francavilla, J., Chasteen, N. D. (1975) "Hydroxide effects on the electron paramagnetic resonance spectrum of aqueous vanadyl(IV)-ion", **Inorg. Chem.** 14:2860-2862;
- Fukui, K., T. Ueki, H. Ohya, H. Michibata (2003) "Vanadium-binding protein in a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneinsis samea*: CW and Pulsed EPR studies", **J. Am. Chem. Soc.** 125:6352-6353;
- Grammer, J. C. & R. G. Yount (1991) "Photochemical evidence that Ser-243 of myo- sin's heavy chain is near the phosphate binding site for ATP", **Biophys. J.** 53:236a Heath, E. & O. W. Howarth (1981) "Vanadium-51 and oxygen-17 nuclear magnetic resonance study of vanadate(V) equilibria and kinetics", **J. Chem. Soc. Dalton Trans.** 1105-1110;
- Howarth, O. W. (1990) "Vanadium-51 NMR", **Prog. NMR Spectrosc.** 22:453-483;
- Hu, C.-Y., A. L. P. Houseman, L. Morgan, A. N. Webber, W. D. Frasch (1996) "Catalytic and EPR Studies of the $\beta E204Q$ Mutant of the Chloroplast F_1 -ATPase from *Chlamydomonas reinhardtii*", **Biochemistry** 35:12201-12211;
- Iannuzzi, M. M., P. H. Rieger (1975) "Nature of 2238 M. D. Lewan vanadium(IV) in basic aqueous solution", **Inorg. Chem.** 14:2895-2899;
- Katsaros, N. (1982) "Vanadyl Ion Complexes with Nucleotides", **Transition Met. Chem.** 7:72-74;
- Kustin, K. & I. G. Macara (1982) "The new biochemistry of vanadium", **Comments Inorg. Chem.** 2:1-22;
- Lindquist, R. N., J. L. Lynn, G. E. Lienhard (1973) "Possible transition state analogs for ribonuclease: the complexes of uridine with oxovanadium(IV) ion and vanadium(V) ion", **J. Am. Chem. Soc.** 95:8762-8768;
- Liu, S., M. J. Gresser, A. S. Tracey (1992) " dH and ^{51}V NMR studies of the interaction of vanadate and 2-vanadio-3-phosphoglycerate mutase", **Biochemistry** 31:2677-2685;

- Newman, L. & K. P. Quinlan (1959) “*A Spectrophotometric Investigation of Vanadium(V) Species in Acidic Solutions*”, **J. A. Chem. Soc.** 81: 547-549;
- O'Donnell, S. E. & M. T. Pope (1976) “*Applications of vanadium-51 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy to the study of iso- and hetero-polyvanadates*”, **J. Chem. Soc. Dalton Trans.** 2290-2297;
- Pettersson, L., B. Hedman, I. Andersson, N. Ingri (1983) “*Multicomponent polyanions. 34. A potentiometric and ^{51}V NMR study of equilibria in the H^+ - HVO_4^{2-} system in 0.6 M Na(Cl) medium covering the range $1 < \approx -\lg[\text{H}^+] < \approx 10$* ”, **Chem. Scr.** 1983, 22:254-264.
- Pettersson, L., I. Andersson, B. Hedman (1985) “*Multicomponent polyanions. 37. A potentiometric and ^{51}V -NMR study of equilibria in the H^+ - HVO_4^{2-} system in 3.0 M Na(ClO₄) medium covering the range $1 < \approx -\lg[\text{H}^+] < \approx 10$* ”, **Chem.Scr.** 25:309-317;
- Petersen, J., T. R. Hawkes, D. J. Lowe (1997) “*The metal-binding site of imidazole glycerol phosphate dehydratase; EPR and ENDOR studies of the oxo-vanadyl enzyme*”, **J. Bio. Inorg. Chem.** 2:308-378;
- Pope, M. T. (1983) “*Heteropoly and Isopoly Oxometalates*”, Springer-Verlag, New York;
- Rehder, D. (1982) “*A survey of ^{51}V NMR spectroscopy*”, **Bull. Magnetic Resonance** 4:33-83;
- Rehder, D. (1991) “*The bioinorganic chemistry of vanadium*”, **Chem. Int. Ed. Engl.** 30:148-167;
- Rehder, D., M. Casny, R. Grosse (2004) “*A vanadium-51 NMR study of the binding of vanadate and peroxovanadate to proteins*”, **Magn. Reson. Chem.** 42:745-749;
- Rehder, D. (2008) “*Vanadium NMR of organovanadium complexes*”, **Coord. Chem. Rev.** 252:2209-2223;
- Rossoti, F. J. C. & H. Rossoti (1956) “*Equilibrium studies of polyanions. I. Isopolyvanadates in acidic medium*”, **Acta Chim. Scand.** 10:957-984;
- Smith, C. A., E. W. Ainscough, A. M. Brodie (1995) “*Complexes of human lactoferrin with vanadium in oxidation states +3, +4 and +5*”, **J. Chem. Soc. Dalton Trans.** 1121-1126;
- Soti, C., L. Radics, I. Yahara, P. Csermely (1998) “*Interaction of vanadate oligomers and permolybdate with the 90-kDa heat-shock protein*”, **Eur. J. Biochem.** 255:611-617;
- Stankiewicz, P. J., M. J. Gresser, A. S. Tracey, L. F. Hass (1987) “*2,3 Diphosphoglycerate phosphatase activity of phosphoglycerate mutase*”, **Biochemistry** 26:1264-1269;

- Tiago, T., M. Aureliano, R. O Duarte, J. J. G. Moura (2002) “*Vanadate oligomers interaction with phosphorylated myosin*”, **Inorg. Chim. Acta** 339:317-321;
- Werneburg, B. G. & D. E. Ash (1997) “*VO²⁺(IV) Complexes with Pyruvate Carboxylase: Activation of Oxaloacetate Decarboxylation and EPR Properties of Enzyme-VO²⁺ Complexes*”, **Biochemistry** 36:14392-14402;
- Willsky, G. R., A. B. Goldfine, P. J. Kostyniak, J. H. McNeill, L. Q. Yang, H. R. Khan, D. C. Crans (2001) “*Effect of vanadium(IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro studies with vanadyl sulphate and bis(maltolato)oxovanadium*”, **J. Inorg. Biochem.** 85:33-42;
- Wittenkeller, L., A. Abraha, R. Ramasamy, D. M. de Freitas, L. A. Theisen, D. C. Crans (1991) “*Vanadate interactions with bovine Cu, Zn-superoxide dismutase as probed by ⁵¹V NMR*”, **J. Am. Chem. Soc.** 113:7872-7881;
- Zhang, Boyan, L. Ruan, B. Chen, J. Lu, K. Wang (1997) “*Binding of vanadate to human erythrocyte ghosts and subsequent events*”, **BioMetals** 10:291-298.

CAPÍTULO IV.

*EFEITO DE VANÁDIO NA FUNÇÃO
FISIOLÓGICA DE ACTINA*

Neste capítulo avalia-se o efeito de diferentes espécies de vanádio(V) e (IV) na capacidade da F-actina estimular a actividade Mg^{2+} -ATPásica de subfragmento-1 de miosina, determinado pelo método de enzimas acoplados (cinase do piruvato e desidrogenase do lactato). Avaliar-se, também, por métodos de dispersão de luz, de que forma as soluções de metavanadato, decavanadato e vanadilo alteram o equilíbrio existente entre as formas monomérica e filamentosa da actina.

IV.1 Introdução

IV.1.1 Vanádio como inibidor enzimático

O ortovanadato é considerado um análogo estrutural do ortofosfato, sendo as suas reacções de protonação bastante semelhantes (Chasteen, 1983; Gresser *et al.*, 1987; Rehder, 1999; Crans, 1994). Esta analogia é evidente, sobretudo, nas formas tetraédricas trianiónicas, VO_4^{3-} e PO_4^{3-} . Os valores de pK_a para o vanadato (3,5, 7,8 e 12,5) e para o fosfato (2,1, 7,2 e 12,7) (Chasteen, 1990) demonstram, de igual modo, que esta analogia se estende às propriedades electrónicas destas espécies. A maior diferença entre ambos reside no facto de que, para valores de pH próximos de 7, o vanadato monomérico existe principalmente como um monoanião ($H_2VO_4^-$), para baixas concentrações de vanádio(V) total, enquanto o fosfato se encontrará como dianião (HPO_4^{2-}). Em particular, a analogia dos compostos de vanadato pentacoordenados com o estado de transição das reacções de (i) hidrólise de um grupo fosfato ou de (ii) transferência de um grupo fosforilo (PO_3^-), permite explicar o facto de muitos compostos de vanadato serem potentes inibidores de ribonucleases, fosfatases, ATPases e outras fosforilases (Nour-Eldeen *et al.*, 1985; Gresser & Tracey, 1990; Crans *et al.*, 1992a; Crans *et al.*, 2004).

No entanto, as soluções de vanadato apresentam, para além da espécie monomérica de vanadato, outras espécies oligoméricas, sendo estas geralmente omitidas nos estudos sobre inibição de enzimas pelo vanadato, devido a uma deficiente caracterização das soluções usadas. Pode, assim, considerar-se que muitos efeitos atribuídos à espécie VO_4^{3-} se devam à presença em solução de outras espécies oligoméricas. Os primeiros estudos que permitiram demonstrar de forma inequívoca que, para além da espécie monomérica, também as espécies dimérica, tetramérica e decamérica de vanadato são responsáveis pela inibição de processos enzimáticos foram descritos por Stankiewicz *et al.*, 1987; Crans & Schelble, 1990; Crans *et al.*, 1990a; Aureliano & Madeira, 1994a e 1994b.

De facto, a espécie dimérica de vanadato é estruturalmente análoga do pirofosfato, o que sugere poder interagir com sítios de ligação de cofactores, tais como o NAD^+ , NADP, FAD e

CoA. Além disso, a espécie V_2 é também um forte inibidor da mutase do fosfoglicerato (Stankiewicz *et al.*, 1987), da fosfatase ácida (Crans *et al.*, 1989) e da desidrogenase da glucose-6-fosfato (Crans & Shelble, 1990). O reconhecimento de que uma espécie oligomérica de vanadato poderia ser um inibidor mais potente que o vanadato monomérico surgiu num estudo com a desidrogenase de 6-fosfogluconato e a espécie V_4 (Crans *et al.*, 1990b).

Quanto ao decavanadato, o primeiro estudo de inibição reporta a 1973, com o enzima cinase do adenilato (DeMaster & Mitchell, 1973). Desde então, têm sido vários os estudos de inibição pela espécie decamérica de vanadato, com enzimas tão distintas como a Ca^{2+} -ATPase (Csermely *et al.*, 1985a), fosforilase muscular (Soman *et al.*, 1983), hexocinase, fosfofrutocinase, aldolases e enzimas envolvidas no metabolismo do inositol (Crans, 1994; Stankiewicz *et al.*, 1995).

A Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático foi outro dos enzimas mais amplamente estudados na presença de vanadato (Pick, 1982; Pick & Karlish, 1982), tendo sido concluído que a inibição pelo ortovanadato se devia à formação, também, de um estado de transição análogo ao fosfato. A inibição por espécies oligoméricas de vanadato, nomeadamente V_4 e V_{10} , foi também determinada (Csermely *et al.*, 1985a e 1985b; Aureliano & Madeira, 1994a e 1994b; Aureliano *et al.*, 2005).

De todos os exemplos conhecidos, o decavanadato parece ligar-se preferencialmente a sítios de ligação de polifosfatos, quer no domínio de ligação do substrato, quer no domínio alostérico dos enzimas.

Na Tabela IV.1 apresentam-se alguns exemplos de enzimas cuja actividade é inibida na presença de compostos de vanadato:

Tabela IV.1 – Enzimas inibidos na presença das diferentes espécies de oxovanadato indicadas (V_1 , V_2 , V_4 e V_{10}).

Enzima	Espécie vanadato envolvida na inibição	Referência
Ribonuclease A	V_1	Lindquist <i>et al.</i> , 1973 Borah <i>et al.</i> , 1985
Na^+, K^+ -ATPase	V_1	Cantley <i>et al.</i> , 1977 Beaugé & Glynn, 1978
Fosfatase alcalina	V_1	Lopez <i>et al.</i> , 1976
Fosfofrutocinase	V_1	Choate & Mansour, 1978
Mutase de fosfoglicerato	V_2	Stankiewicz <i>et al.</i> , 1987; Liu <i>et al.</i> , 1992
Desidrogenase de 6-fosfogluconato	V_4	Crans <i>et al.</i> , 1990b
Dismutase de superóxido	V_4	Wittenkeller <i>et al.</i> , 1991
Desidrogenase de glucose-6-fosfato	V_2 e V_4	Crans & Schelble, 1990 Crans <i>et al.</i> , 1990a
Aldolase de fructose-1,6-bifosfato	V_2 e V_4	Crans <i>et al.</i> , 1992b
Cinase de adenilato	V_{10}	DeMaster & Mitchell, 1973
Antagonista do IP3	V_{10}	Fohr <i>et al.</i> , 1989
Trifosfatase de ARN	V_{10}	Bougie & Bisailon, 2006

A rápida interconversão entre o V(V) e o V(IV), como anteriormente referido, torna difícil a análise da interacção entre o primeiro e as proteínas, requerendo condições experimentais adequadas e bastante precisas, pelo que não existem muitos estudos sobre a inibição de enzimas pelo vanadilo. No entanto, esta rápida interconversão faz com que o vanadilo tanto possa competir com o fosfato, como acima referido, como com outros metais na coordenação a apometaloenzimas (Rehder, 1992). De facto, no interior das células o vanádio existirá essencialmente no estado de oxidação V(IV), podendo ser o responsável pela inibição de várias enzimas na forma de vanadilo. De facto, os iões vanadilo são conhecidos como potentes inibidores de enzimas que utilizam substratos fosforilados (Cohen *et al.*, 1987). Ao contrário do que sucede com o vanadato, o vanadilo é mais flexível do ponto de vista estereoquímico, podendo facilmente adoptar a estrutura bipiramidal do intermediário enzima-fosfato, através do rearranjo da sua forma piramidal quadrada hidratada (Chasteen *et al.*, 1969).

O enzima desidrogenase da glucose-6-fosfato é fortemente inibido pelo vanadilo, competindo com os substratos NADP e glucose-6-fosfato, com uma constante de inibição, K_i igual a 49 e 52 μM , respectivamente (Cohen *et al.*, 1987). Este valor para a constante de inibição está de acordo com estudos efectuados com os enzimas fosfatase alcalina (Van Etten *et al.*, 1974) e ribonuclease (Lindquist *et al.*, 1973). Os enzimas tripsina e subtilisina, papaína e bromelaína, pertencentes às proteases de serina e de cisteína, respectivamente, são também inibidas pelo V(IV), apresentando, contudo, constantes de inibição da ordem dos 12 e 1 mM (Guerrieri *et al.*, 1999).

IV.1.2 Inibição das proteínas actina e miosina por espécies de vanádio(V) e (IV)

Os primeiros estudos sobre a inibição de proteínas do sistema contráctil pelo vanadato surgiram no final da década 70 (Johnson & Taylor, 1978; Goodno, 1979), tendo sido determinado que o V_i inibia a miosina através da formação de um complexo miosina-ADP-vanadato ($M.ADP.V_i^\dagger$) bastante estável, o qual funciona como um análogo do intermediário miosina-ADP-fosfato ($M.ADP.P_i^*$). O comportamento do complexo $M.ADP.V_i^\dagger$ foi analisado na presença de actina, tendo sido determinado que esta se liga de forma bastante fraca a este complexo ternário, de forma semelhante ao que acontece na presença de fosfato; de igual modo, na presença de actina a velocidade de dissociação tanto do P_i como do V_i do complexo são aumentadas, apesar da libertação do vanadato ser muito mais lenta que a do fosfato (Goodno & Taylor, 1982). Além disso, verificou-se que a espécie V_i se liga no local de ligação do ATP, ou perto deste (Ringel *et al.*, 1990).

Estudos sobre o efeito do vanadato em fibras de músculo esquelético de coelho foram conduzidos por Dantzig & Goldman (1985), tendo estes concluído, , que a presença de V_i inibia a produção de força com uma ordem de grandeza superior à inibição observada para a actividade da ATPase do subfragmento-1 de miosina estimulada por F-actina em solução.

No entanto, só bastante mais tarde ficou demonstrado de forma inequívoca qual o papel que outras espécies oligoméricas de vanadato possuíam na inibição da actividade ATPásica da miosina, nomeadamente di-, tetra-, hexa- e decavanadatos (Ringel *et al.*, 1990; Aureliano, 2000). A interacção das espécies oligoméricas, contrariamente à monomérica, não depende da formação de um complexo ternário com o nucleótido no local activo. De facto, a espécie decamérica de vanadato inibe a ATPase de miosina através da ligação à *backdoor* deste enzima (Tiago *et al.*, 2004).

Cortizo *et al.* (1996) demonstraram que concentrações de vanadato e vanadilo superiores a 10 μM induziam alterações bastante significativas na morfologia celular, *in vivo*, sendo as alterações no citoesqueleto dependentes do estado de oxidação dos compostos de vanádio.

No entanto, de acordo com o conhecimento actual, não existem estudos sobre o efeito que a ligação à actina de diferentes espécies de $V(V)$ e $V(IV)$ promove na actividade do complexo acto-miosina. Torna-se, assim, fundamental caracterizar a estimulação da actividade da Mg-ATPase de subfragmento-1 de miosina por F-actina, na presença de soluções de meta-, decavanadato e vanadilo.

IV.1.3 Técnicas de dispersão de luz aplicadas ao estudo da polimerização/despolimerização da actina

O fenómeno de dispersão de luz ocorre quando o campo eléctrico da radiação electromagnética incide numa determinada partícula, induzindo oscilações periódicas na nuvem electrónica das suas moléculas constituintes, passando esta a funcionar como uma fonte secundária de radiação (Cantor & Schimmel, 1980). Em *Anexo* encontra-se uma breve descrição teórica desta técnica.

O estudo do mecanismo da ATPase do complexo actomiosina foi elucidado por dispersão de luz, baseado na observação de que a intensidade da luz dispersa do complexo acto-S1 é superior ao somatório da dispersão de luz da actina e do S1 separadamente, e que este aumento é correlacionado linearmente com o aumento de S1 ligado ao filamento (White & Taylor, 1976).

Quanto ao decavanadato, este não promove a dissociação do complexo acto-S1, aumentando, contudo, o tempo necessário para re-associar o S1 e a actina após o consumo de ATP adicionado, sendo este aumento dependente da concentração de V_{10} (Tiago *et al.*, 2004).

Desde o primeiro uso extensivo por Wegner & Engel (1975), a técnica de dispersão de luz tem sido amplamente utilizada na caracterização da actina, bem como na análise do equilíbrio entre a polimerização e a despolimerização, uma vez que os filamentos de actina dispersam mais luz do que os monómeros.. A Tabela IV.2 apresenta alguns dos estudos sobre a polimerização e a despolimerização da actina, avaliadas por dispersão de luz, na presença de diferentes compostos.

Tabela IV.II – Estudos sobre o equilíbrio entre a polimerização e a despolimerização da actina, na presença de diferentes compostos, avaliado por dispersão de luz.

Composto usado para avaliar o efeito na polimerização/despolimerização da actina	Efeito produzido	Referência bibliográfica
Detergentes TX100, NP40 e CHAPS Detergente Brij5	Inibem a polimerização Estimula a polimerização	Ujfalusi-Pozsonyi <i>et al.</i> , 2010
Peroxinitrito sintético (SIN-1)	Inibe a polimerização / Promove a despolimerização	Tiago <i>et al.</i> , 2006
GSSG GSS-Actina	Não altera a polimerização Polimerização menos eficiente	DalleDonne <i>et al.</i> , 2003
Cloroamina-T	Inibe a polimerização / Promove a despolimerização	DalleDonne <i>et al.</i> , 2002
HOCl	Inibe a polimerização / Promove a despolimerização	DalleDonne <i>et al.</i> , 2001

Actualmente não existem estudos sobre a polimerização da G-actina ou a despolimerização da F-actina, na presença de espécies de vanadato e vanadilo, avaliada por dispersão de luz, pelo que se torna aliciante recorrer a esta técnica para melhor elucidar quais os efeitos promovidos pela ligação do vanádio(V) e (IV) à actina.

IV.2 Materiais e métodos

IV.2.1 Efeito na actividade Mg^{2+} -ATPásica de subfragmento-1 de miosina estimulada por F-actina na presença de vanádio

As actividades de estado estacionário da Mg^{2+} -ATPase de S1 foram determinadas espectrofotometricamente, a 25 °C, usando o sistema de enzimas acoplados cinase do piruvato/desidrogenase do lactato (PK/LDH), de acordo com o anteriormente descrito na secção II.2.4.2. A F-actina foi adicionada ao ensaio com uma concentração final de 2 μ M, após incubação com diferentes concentrações de meta-, decavanadato e vanadilo, durante 20 minutos, a 25 °C, a partir de soluções concentradas (50 mM) ou diluídas 10 vezes, preparadas como se descreve na secção III.2.1. Os ensaios de actividade na presença de vanadilo foram efectuados anaerobicamente, numa câmara de luvas (MBraun, modelo UniLab) com atmosfera de árgon e contaminação máxima de O_2 inferior a 5 ppm.

Os dados foram tratados através do ajuste não-linear dos mínimos quadrados dos pontos experimentais à equação de decaimento exponencial de primeira ordem (Eq. IV.1) usando o programa GraphPad 4.0TM:

$$y = y_0 \cdot e^{(-k \cdot [V])} + y_{\min} \quad (IV.1)$$

y_0 corresponde ao valor de y quando a concentração de vanádio ($[V]$) é igual a zero e k é a constante de decaimento. O valor de IC_{50} é determinado por $\ln 2/k$.

IV.2.2 Medição da polimerização e despolimerização da actina por dispersão de luz

Os estudos de dispersão de luz foram realizados, na sua totalidade, num espectrofluorímetro Jobin Yvon Horiba FluoroMax-3, com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm (Cooper & Pollard, 1982), sendo de 90° o ângulo formado entre a luz incidente e a luz emitida.

A despolimerização da F-actina (8 μ M) foi monitorizada durante 2 horas após adição das diferentes concentrações de meta-, decavanadato e vanadilo, em tempo real e com agitação contínua. Considerou-se 1,00 (em unidades arbitrárias) a intensidade de sinal da F-actina antes da adição de vanádio. No que à polimerização diz respeito, esta foi avaliada adicionando a solução de polimerização (50 mM KCl e 1 mM $MgCl_2$) a 8 μ M G-actina, após 20 minutos de incubação

com as diferentes espécies de vanádio(V) e V(IV). A reacção foi seguida até se atingir um patamar na intensidade da luz emitida, considerando 1,00 (em unidades arbitrárias) a diferença entre os sinais antes e depois da adição de polimerização, na ausência de vanádio.

Em ambos os casos, a linha de base foi obtida a partir do sinal da solução tampão 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl₂ ± 0,2 mM ATP.

IV.3 Resultados e discussão

IV.3.1 Efeito do vanádio na actividade Mg^{2+} -ATPásica de subfragmento-1 de miosina estimulada por F-actina

Os resultados obtidos por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, descritos no capítulo III, permitiram concluir que ocorre interacção entre a espécie decamérica de vanadato e a actina, com base nas alterações das ressonâncias dos sinais típicos deste oligoanião. Com base nestes dados torna-se, então, fundamental avaliar se a função fisiológica da actina, isto é, a capacidade de estimular a actividade ATP-ásica de miosina durante o processo da contracção muscular, é afectada na presença de decavanadato. A incubação de $2 \mu M$ F-actina com diferentes concentrações de meta- e decavanadato e a sua subsequente capacidade de estimular a actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 de miosina ($0,05 \text{ mg ml}^{-1}$), foi analisada através do método de enzimas acoplados cinase do piruvato/desidrogenase do lactato (PK/LDH) (ver secção IV.2.1), tendo-se verificado que a solução de metavanadato não promove mais do que 15 % de inibição para a concentração máxima utilizada ($50 \mu M$). Por seu turno, o decavanadato é um inibidor consideravelmente mais potente, diminuindo a estimulação pela F-actina em cerca de 70 %, com um valor de IC_{50} (isto é, a concentração de decavanadato necessária para produzir 50 % de inibição da actividade ATPásica estimulada por F-actina) igual a $8,04 \pm 1,49 \mu M$ decavanadato (em vanadato total), ou seja, $0,80 \pm 0,15 \mu M V_{10}$ (Fig. IV.1A).

Uma vez que foi anteriormente demonstrado que, cerca de 20 minutos após diluição num meio de reacção (pH 7,5), uma solução de decavanadato contém apenas as espécies V_1 e V_{10} , nas concentrações utilizadas ($0-50 \mu M$ decavanadato, em vanadato total), correspondendo a concentração desta última a 10 % da concentração em vanadato total, e considerando que a solução de metavanadato produziu apenas 15 % de inibição para a concentração máxima de vanadato testada ($IC_{50} = 7,08 \pm 0,4 \mu M$ metavanadato), pode concluir-se que o efeito observado na presença da solução de decavanadato se deve exclusivamente à espécie decamérica de vanadato.

A região da cabeça de miosina liga-se a dois monómeros de actina, no filamento de F-actina, no que se designa por locais de ligação primário e secundário. O local de ligação primário é constituído por contactos com os domínios I e II de um monómero, envolvendo (i) a região N-terminal e os resíduos acídicas 1-4 e 24-25; (ii) o *loop* formado pelos resíduos 332, 333, e 34; (iii) um local hidrofóbico contendo os resíduos 144, 341, 345, 349 e 352; e (iv) um contacto com os resíduos 40 e 42 de um monómero adjacente. O local de ligação secundário encontra-se no monómero de actina subjacente, incluindo os resíduos de aminoácido nas posições 79-92,

localizados na região C-terminal, e os resíduos 93, 95, 99 e 100 (Sheterline *et al.*, 1998). Assim, pode sugerir-se que a espécie decamérica de vanadato provocará alterações na estrutura da F-actina que conduzirão a que estas zonas de ligação à miosina se encontrem modificadas.

Tal como se observa na Figura IV.1B, a incubação de F-actina com VOSO_4 , no intervalo de concentrações utilizado (0-50 μM), provoca uma diminuição de cerca de 20 % na capacidade que esta proteína tem de estimular a ATPase de S1 de miosina, sendo o valor de IC_{50} para esta reacção de inibição de $3,77 \pm 0,5 \mu\text{M VOSO}_4$.

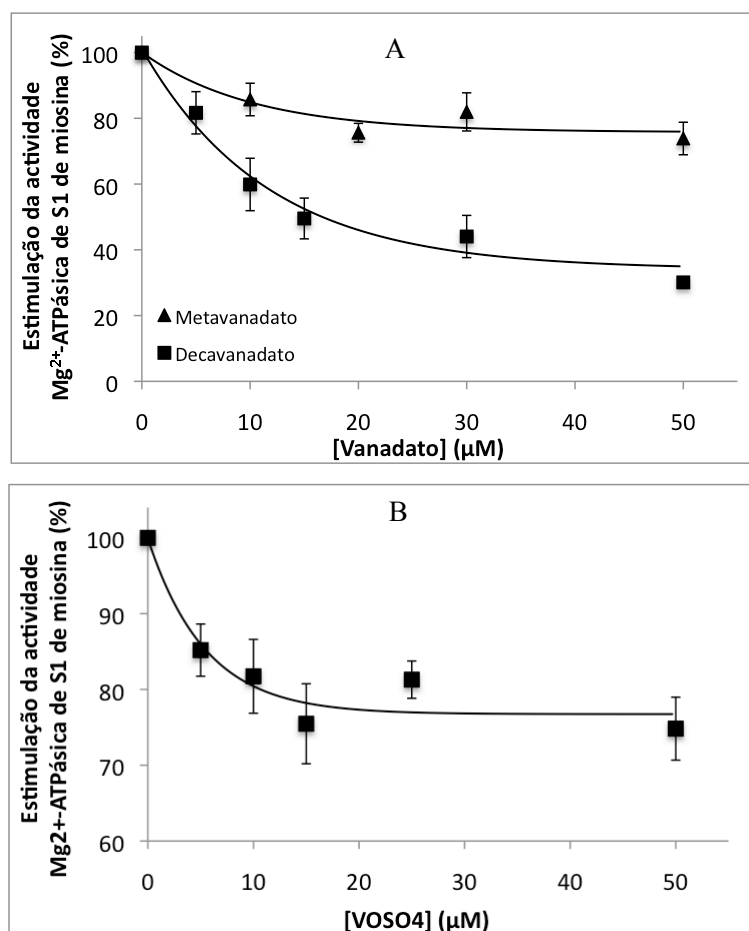


Figura IV.1 – Inibição da actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 de miosina (0,5 mg/ml) estimulada por 2 μM F-actina na presença de (A) meta- e decavanadato ou (B) VOSO_4 , em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 e 2 mM ATP, a 25 °C. Quantificação pelo método de enzimas acoplados, cinase do piruvato/desidrogenase do lactato (PK/LDH), de acordo com o descrito na secção II.2.4.2 do Capítulo II. Os valores são expressos em percentagem, considerando 100 % a actividade obtida na ausência de vanádio. Os dados experimentais foram ajustados com a equação IV.1 apresentada na secção IV.2.1.

Uma vez que o oxovanádio(IV) conduz apenas a uma ligeira diminuição na actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 de miosina estimulada por F-actina, apesar da forte evidência da sua ligação à actina, obtida por espectroscopia de RPE, tal como descrito no capítulo anterior, pode

predizer-se que o vanadilo se ligará à actina em locais que não alteram de forma significativa a conformação da F-actina e a sua capacidade de interagir com o subfragmento-1 de miosina.

Além disso, é de referir que, em ambos os casos, a inibição é atingida em menos de 15 segundos, demonstrado pela linearidade da cinética da actividade ATPásica após homogeneização manual, desde o ponto inicial até um período superior a 10 minutos.

Sabendo que o anião $\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$ possui um valor de pK_a de 6,14 (Pettersen *et al.*, 1983), os ensaios experimentais foram também realizados a pH 6,0, em 2 mM MES, 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, tendo-se obtido um valor de $\text{IC}_{50} = 0,52 \pm 0,06 \text{ mM } \mu\text{M V10}$ (Tabela IV.3). Deste modo, os aniões $\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$ e $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$ parecem possuir afinidades semelhantes para a F-actina, bem como efeitos inibitórios idênticos na estimulação da ATPase de miosina pela F-actina, nas condições em que os estudos foram realizados.

Tabela IV.III – Efeito do pH na actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 de miosina ($0,05 \text{ mg ml}^{-1}$) estimulada por $2 \mu\text{M}$ F-actina tratada com diferentes concentrações de decavanadato ($[\text{Decavanadato}]_{\text{stock}} = 5 \text{ mM}$), em 2 mM MES (pH 6,0) ou 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 20 minutos. Quantificação pelo método de enzimas acoplados (PK/LDH), de acordo com o descrito na secção IV.2.1. Os resultados apresentados são a média de três ensaios experimentais independentes.

Tampão	pH	$\text{IC}_{50} (\mu\text{M}) (\text{V}_{10})$
2 mM MES	6,0	$0,52 \pm 0,06$
2 mM Tris	7,5	$0,80 \pm 0,15$

A actividade Mg^{2+} -ATPásica da miosina estimulada por F-actina tratada com outros metais foi anteriormente avaliada (dos Remédios & Barden, 1977), tendo sido verificado que uma concentração de gadolínio Gd(III) 15 vezes superior à de F-actina não conduzia a qualquer alteração significativa na estimulação da ATPase de miosina, à semelhança do agora observado para o metavanadato e para o vanadilo, sendo que a razão vanádio:F-actina no presente estudo é de 25:1 para a concentração de V(V) e (IV) máxima testada ($50 \mu\text{M}$).

IV.3.2 Efeito de vanádio na polimerização e despolimerização de actina

Considerando que no interior das células a quantidade de F-actina resulta de um equilíbrio entre a polimerização e a despolimerização da actina, determinou-se qual o efeito que as diferentes espécies de vanádio provocam na capacidade da G-actina polimerizar em filamentos de F-actina. Verificou-se a dependência linear entre a intensidade da luz dispersa e a concentração de G-actina em solução, para uma concentração máxima de $9 \mu\text{M}$ G-actina (dados

não apresentados), pelo que as alterações na intensidade da dispersão de luz podem ser convertidas em quantidade de F-actina polimerizada, em unidades arbitrárias, considerando a intensidade do sinal da G-actina. Na Figura IV.2 encontra-se representada a cinética típica da polimerização da G-actina, na ausência de vanádio.

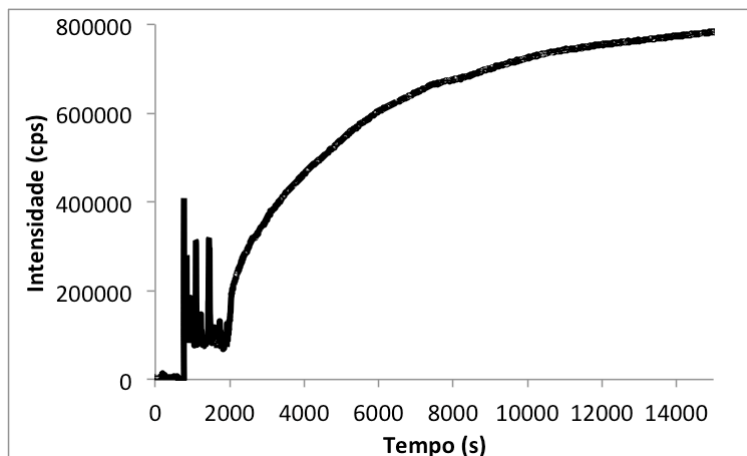


Figura IV.2 – Cinética típica da polimerização da F-actina (8 μ M) na ausência de decavanadato, obtido por dispersão de luz, monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção IV.2.2.

Na presença de decavanadato no intervalo de concentrações utilizado (0-8 mM) verifica-se a completa inibição da polimerização da G-actina (Fig. IV.3). Pela análise do ajuste não-linear dos mínimos quadrados dos dados experimentais a uma equação de decaimento exponencial de 2ª ordem, obtiveram-se os valores de IC_{50} de $0,17 \pm 0,02$ e $3,7 \pm 0,72$ mM decavanadato, ou seja, 17 ± 2 e 373 ± 72 μ M V_{10} , respectivamente. Contrariamente, concentrações de metavanadato até 2 mM não conduzem a qualquer efeito na polimerização da G-actina. Para concentrações de metavanadato compreendidas entre 2 e 8 mM, observa-se uma acentuada diminuição na capacidade de formação de filamentos pela G-actina, atingindo-se 50 % de inibição para 4 mM metavanadato (em vanadato total) (Fig. IV.3). Uma vez que se sabe que o aumento da concentração de metavanadato favorece o aparecimento em solução das espécies oligoméricas de vanadato, pode concluir-se que o efeito promovido pelas soluções de metavanadato com concentrações superiores a 2 mM se deve, essencialmente, ao aparecimento em solução de espécies de polivanádios, nomeadamente a espécie tetramérica de vanadato, cuja concentração aumenta de forma significativa, tal como demonstrado no capítulo anterior.

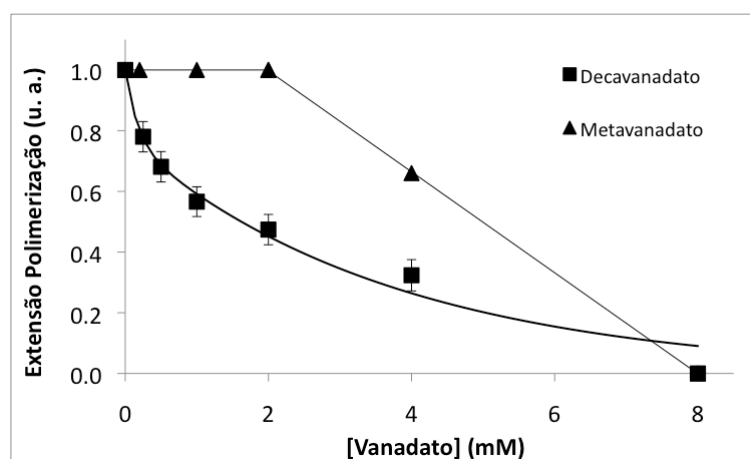


Figura IV.3 – Extensão da polimerização da G-actina (8 μ M), induzida por 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, na presença de meta- (▲) e decavanadato (■), em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM ATP. Os dados foram obtidos a partir da intensidade da dispersão de luz, monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção IV.2.2.

Combeau & Carlier (1988) demonstraram que concentrações de ortovanadato até 2 mM promovem o aumento das interações actina-actina, de modo semelhante ao fosfato inorgânico. Contudo, o aumento da concentração de vanadato (2-20 mM) provocará alguma deformação na molécula de actina, resultando o acumular destas na destabilização da estrutura do filamento, o que está de acordo com os resultados agora apresentados. De facto, sabe-se que concentrações de ortovanadato superiores a 2 mM promovem o aparecimento em solução de outras espécies oligoméricas, podendo o efeito observado por estes autores dever-se á sua presença.

Uma vez que se havia verificado, por espectroscopias de UV-vis e de RMN, que a presença de ATP no meio prevenia o aumento da estabilidade da espécie decamérica de vanadato na presença de G-actina, bem como diminuía a intensidade da interacção entre o V₁₀ e a actina, respectivamente, torna-se fundamental averiguar, de igual modo, qual o efeito que a adição de ATP (1 mM) provoca na capacidade da G-actina polimerizar. Verificou-se que a presença deste nucleótido em solução reverte completamente o efeito inibidor da polimerização da G-actina pelo meta- e decavanadato, nas concentrações utilizadas (0-8 mM) (dados não apresentados).

Pode, assim, ser sugerido que a espécie decamérica de vanadato inibe a polimerização da G-actina através de um mecanismo que envolverá (i) o local de ligação do ATP, (ii) um local perto deste ou (iii) um local cuja conformação é alterada após a ligação do substrato (efeito alostéreo). Inibindo a polimerização da G-actina, o vanadato decamérico previne a formação dos microfilamentos e, em última instância, a estimulação da actividade Mg²⁺-ATPásica de S1 de miosina.

Tendo-se verificado que na ausência de vanádio a F-actina não sofria despolimerização no intervalo de tempo em que as experiências foram realizadas (cerca de duas horas), e considerando que esta se encontrava completamente polimerizada antes da adição das diferentes espécies de vanádio (1,00 em unidades arbitrárias), foi possível quantificar o grau de despolimerização que esta sofria na presença de vanadatos e vanadilo, através da diferença das intensidades dos sinais antes e depois da adição de meta-, decavanadato e vanadilo. A título de exemplo apresenta-se uma cinética típica da despolimerização da F-actina obtida por dispersão de luz (Fig. IV.4).

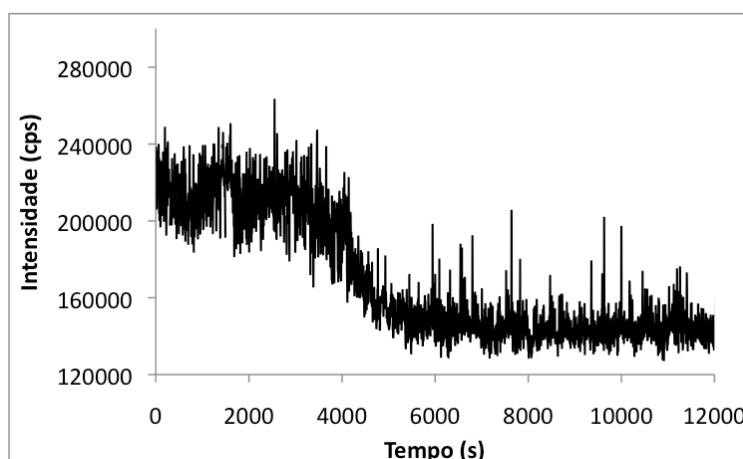


Figura IV.4 – Cinética típica da despolimerização da F-actina (8 μM) na presença de 8 mM decavanadato (em vanadato total) obtido por dispersão de luz, monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção IV.2.2.

Como se pode observar no gráfico da Figura IV.5, o efeito promovido pelos vanadatos na despolimerização da F-actina é muito menos acentuado que na polimerização da G-actina. De facto, verifica-se que as concentrações de meta- e decavanadato utilizadas (0-8 mM) promovem apenas 20 e 35 % de despolimerização da F-actina, respectivamente, sendo os valores de IC_{50} para esta reacção de $2,7 \pm 0,3$ mM metavanadato e $1,40 \pm 0,09$ mM decavanadato, ou seja, $140 \pm 9 \mu\text{M V}_{10}$.

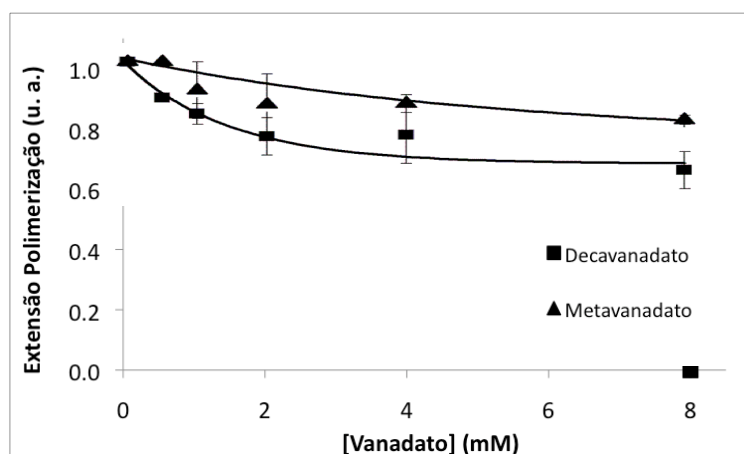


Figura IV.5 – Efeito de meta- (▲) e decavanadato (■) na despolimerização da F-actina (8 μ M), em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP. Os dados foram obtidos a partir da intensidade da dispersão de luz, monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção IV.2.2.

Em estudos anteriores (Combeau & Carlier, 1988) foi demonstrado que concentrações de ortovanadato compreendidas entre 1-2 mM promoviam uma diminuição na concentração crítica da ADP.F-actina, indicativo da estabilização dos filamentos, sendo esta semelhante à observada para as mesmas concentrações de fosfato inorgânico. O aumento da concentração de ortovanadato entre 2 e 20 mM, por seu turno, provoca uma destabilização progressiva do filamento, demonstrado pelo grande aumento na concentração crítica.

Uma vez que a presença de decavanadato promove apenas uma ligeira despolimerização da F-actina, a acentuada inibição da actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 de miosina estimulada por F-actina tratada com diferentes concentrações de decavanadato terá que ser, obrigatoriamente, explicada por outras alterações no filamento de actina, que não apenas a sua despolimerização.

Em relação ao vanádio(IV), os resultados apresentados na Figura IV.6 permitem inferir que a polimerização da G-actina é completamente inibida na presença de 500 μM VOSO_4 . Os dados experimentais foram ajustados com duas equações de decaimento exponencial de 1ª ordem, originando valores de IC_{50} de $15,1 \pm 0,3$ e $335,8 \pm 6,3$ μM VOSO_4 para a extensão da polimerização da G-actina. Por seu turno, o VOSO_4 não produz alterações significativas na despolimerização da F-actina, para o intervalo de concentrações utilizado (0-500 μM), tendo-se verificado, inclusivé, um ligeiro aumento na intensidade da luz dispersa, o que pode ser explicado pela clivagem do polímero em fragmentos de menores dimensões. Uma vez que não se verifica uma diminuição significativa da actividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 de miosina estimulada por F-actina tratada com VOSO_4 , pode concluir-se que estes fragmentos possuem, ainda, capacidade de interagir com o subfragmento-1 de miosina. Deste modo, a ligação do oxovanádio(IV) à F-actina ocorrerá num domínio da proteína que não estará implicado na ligação à miosina.

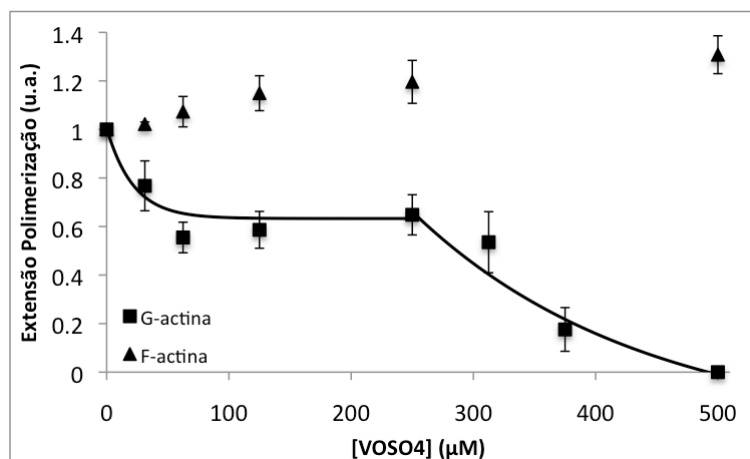


Figura IV.6 – Extensão da polimerização da G- (■) e F-actina (▲) (8 µM), em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl₂ ± 0,2 mM ATP, na presença de diferentes concentrações de VOSO₄. A polimerização da G-actina foi induzida por 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂. Os dados foram obtidos a partir da intensidade da dispersão de luz, monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção IV.2.2.

A polimerização da G-actina *in vitro* foi estudada na presença de outros metais, considerados como não-essenciais nos sistemas biológicos, como gadolínio (dos Remédios & Barden, 1977), lítio (Pan & Ware, 1988; Colombo *et al.*, 1991a e 1991b) e cádmio (DalleDonne *et al.*, 1997). Quando a razão Gd:G-actina é igual a 4, não se observam quaisquer alterações na polimerização, enquanto que uma razão Gd:G-actina = 9 promove a sua completa inibição (dos Remédios & Barden, 1977). Resultados semelhantes foram obtidos para o cádmio: para concentrações de Cd²⁺ compreendidas entre 0,25 e 0,5 mM, a actina polimeriza de forma mais eficiente, por comparação com a adição dos iões Ca²⁺ e Mg²⁺, enquanto que para 1 mM CdCl₂, a percentagem de actina polimerizada diminui para cerca de 50 e 30 % do observado para a mesma concentração de CaCl₂ e MgCl₂, respectivamente (DalleDonne *et al.*, 1997). No que à F-actina diz respeito, este metal, à semelhança do vanadato e do vanadilo, não produziu alterações significativas na sua despolimerização. Por seu turno, o lítio é um forte indutor da polimerização da G-actina (Pan & Ware, 1988; Colombo *et al.*, 1991a e 1991b), contrariamente a qualquer uma das espécies de vanádio agora usadas.

IV.4 Conclusões

As espécies de vanádio V(IV) e V(V) afectam a função da actina. De facto, a incubação de F-actina com concentrações de decavanadato compreendidas entre 0-50 μM conduz a uma inibição da estimulação da actividade Mg^{2+} -ATPásica do subfragmento-1 de miosina em cerca de 70 %, o que indica, de forma inequívoca, que a espécie decamérica de vanadato tem um efeito pronunciado no mecanismo de hidrólise de ATP pelo complexo actomiosina.

No que ao efeito no equilíbrio G-actina/F-actina diz respeito, verificou-se que 8 mM decavanadato inibe por completo a polimerização da actina, sendo este efeito completamente revertido aquando da adição concomitante de ATP ao meio reaccional. Estes dados permitem concluir que o decavanadato se ligará à G-actina através de um mecanismo que envolverá (i) o local de ligação do ATP, (ii) um local perto deste ou (iii) um local cuja conformação é alterada após a ligação do substrato.

Por seu turno, o vanadilo, apesar de inibir o ATPase do subfragmento-1 de miosina estimulado por F-actina em apenas 20 %, tem um efeito bastante pronunciado no que à polimerização da G-actina diz respeito, apresentando-se como um inibidor mais potente que a espécie decamérica de vanadato, por comparação dos valores de IC_{50} obtidos.

No entanto, tanto o decavanadato como o vanadilo não promovem nenhum efeito considerável na despolimerização da F-actina, pelo que pode ser sugerido que a alteração da conformação dos filamentos aquando da formação do filamento é tal que o local de ligação destas espécies de vanádio fica menos acessível para se ligar de forma eficiente.

De forma semelhante ao anteriormente observado por espectroscopia de RMN, o metavanadato não provoca nenhum efeito considerável, tanto na capacidade de estimulação de ATPase-S1, como no equilíbrio polimerização/despolimerização.

Por conseguinte, e considerando os dados acima apresentados, torna-se fundamental analisar de que forma a presença das diferentes espécies de vanádio alteram a estrutura da actina, permitindo explicar os efeitos agora observados e estabelecer quais os locais de ligação do V(V) e V(IV), o que será apresentado no próximo capítulo.

IV.5 Referências bibliográficas

- Aureliano, M. & V. Madeira (1994a) “Interactions of vanadate oligomers with sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase” **Biochim. Biophys. Acta** 1221:259-271;
- Aureliano, M. & V. Madeira (1994b) “Vanadate oligoanions interact with the proton ejection by the Ca^{2+} pump of sarcoplasmic reticulum” **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 205:161-167;
- Aureliano, M. (2000) “Vanadate oligomer interactions with myosin” **J. Inorg. Biochem.** 80:141-143;
- Aureliano, M., T. Tiago, R. M. Gândara, A. Sousa, A. Moderno, M. Kaliva, A. Salifoglou, R. O. Duarte, J. J. Moura (2005) “Interactions of vanadium(V)-citrate complexes with the sarcoplasmic reticulum calcium pump” **J. Inorg. Biochem.** 99:2355-2361;
- Beaugé, L. A. & L. M. Glynn (1978) “Commercial ATP containing traces of vanadate alters the response of (Na^+, K^+) ATPase to external potassium” **Nature** 272:551-552;
- Borah, B., C.-W. Chen, W. Egan, M. Miller, A. Wlodawer, J. S. Cohen (1985) “Nuclear magnetic resonance and neutron diffraction studies of the complex of ribonuclease A with uridine vanadate, a transition-state analogue” **Biochemistry** 24:2058-2067;
- Bougie, I. & M. Bisailon (2006) “Inhibition of a metal-dependent viral RNA triphosphatase by decavanadate” **Biochem. J.** 398:557-567;
- Boyd, D. W., K. Kustin, M. Niva (1985) “Do vanadate inhibits phosphotransferase enzymes?” **Biochem. Biophys. Acta** 827:472-475;
- Cantley, L. C., L. Josephson, R. Warner, M. Yanagisawa, C. Lechene, G. Guidotti (1977) “Vanadate is a potent $(Na^+ - K^+)$ -ATPase inhibitor found in ATP derived muscle” **J. Biol. Chem.** 252:7421-7423;
- Cantor, C. R. & P. R. Schimmel (1980) **In: Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the study of biological structure and function**, W. H. Freeman and Company, New York, pp. 838-843;
- Chasteen, N. D. (1983) “The biochemistry of vanadium” **Structure and Bonding** 53:105-138;
- Chasteen, N. D. (1990) **In: Vanadium in Biological Systems**, Kluwer Academic Publisher’s, Dordrecht, The Netherlands;
- Choate, G. L. & T. E. Mansour (1979) “Studies on heart phosphofructokinase” **J. Biol. Chem.** 254:11457-11462;

- Cohen, M. D., A. C. Sen, C.-I. Wei (1987) “Vanadium inhibition of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase” **Inorg. Chim. Acta** 138:179-186;
- Colombo, R., A. Milzani, I. DalleDonne (1991a) “Lithium increases actin polymerization rates by enhancing the nucleation step” **J. Mol. Biol.** 217:401-404;
- Colombo, R., A. Milzani, P. Contini, I. DalleDonne (1991b) “Lithium effects on actin polymerization in the presence of magnesium” **Biochem. J.** 274:421-425;
- Combeau, C. & M.-F. Carlier (1988) “Characterization of function of actin” **J. Biol. Chem.** 263:17429–17436;
- Cooper, J.A. & T.D. Pollard (1982) “Methods to measure actin polymerization” **Methods Enzymol.** 85:182–210;
- Cortizo, A. M., V. C. Sálice, C. M. Vescina, S. B. Etcheverry (1996) “Proliferative and morphological changes induced by vanadium compounds in Swiss 3T3 fibroblasts” **BioMetals** 10:127-133;
- Crans, D. C., C. M. Simone, A. K. Saha, R. H. Glew (1989) “Vanadate monomers and dimers both inhibit the human prostatic acid phosphatase” **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 165:246-250;
- Crans, D. C. & S. M. Schelble (1990) “Vanadate dimer and tetramer both inhibit glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*” **Biochemistry** 29:6698-6706;
- Crans, D. C., E. M. Willing, S. R. Butler (1990a) “Vanadate tetramer as the inhibiting species in enzyme reactions *in vitro* and *in vivo*” **J. Am. Chem. Soc.** 112:427-432;
- Crans, D. C., C. D. Rithner, L. A. Theisen (1990b) “Application of time-resolved ^{51}V 2D-NMR for quantitation of kinetic exchange pathways between vanadate monomer, dimer, tetramer and pentamer” **J. Am. Chem. Soc.** 112:2901-2908;
- Crans, D. C., C. M. Simone, J. S. Blanchard (1992a) “Chemically induced modification of cofactor specificity of glucose-6-phosphate dehydrogenase” **J. Am. Chem. Soc.** 114:4926-4928;
- Crans, D. C., K. Sudhakar, T. J. Zamborelli (1992b) “Interaction of rabbit muscle aldolase at high ionic strengths with vanadate and other oxoanions” **Biochemistry** 31:6812-6821;
- Crans, D. C. (1994) “Aqueous chemistry of labile oxovanadates: relevance to biological studies” **Comments Inorg. Chem.** 16:1-34;
- Crans, D. C., J. J. Smee, E. Gaidamauskas, L. Yang (2004) “The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds” **Chem. Rev.** 104:849-902;

- Csermely, P., A. Martonosi, G. C. Levy, A. J. Eijchart (1985a) “⁵¹V-NMR analysis of the binding of vanadium(V) oligoanions to sarcoplasmic reticulum” **Biochem. J.** 230:807-815;
- Csermely, P. S. Varga, A. Martonosi (1985b) “Competition between decavanadato and fluorescein isothiocyanate on the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum” **Eur. J. Biochem.** 150:455-460;
- DalleDonne, I., A. Milzani, R. Colombo (1997) “Actin assembly by cadmium ions” **Biochim. Biophys. Acta** 1357:5-17;
- DalleDonne, I., R. Rossi, D. Giustarini, N. Gagliano, L. Lusini, A. Milzani, P. Di Simplicio, R. Colombo (2001) “Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment” **Free Rad. Biol. Med.** 31:1075-1083;
- DalleDonne, I., R. Rossi, D. Giustarini, N. Gagliano, R. Colombo, A. Milzani (2002) “Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin” **Free Rad. Biol. Med.** 32:927-937;
- DalleDonne, I., R. Rossi, D. Giustarini, R. Colombo, A. Milzani (2003) “Actin S-glutathionylation: evidence against a thiol-disulphide exchange mechanism” **Free Rad. Biol. Med.** 35:1185-1193;
- Dantzig, J. A. & Y. E. Goldman (1985) “Suppression of muscle contraction by vanadate” **J. Gen. Physiol.** 86:305-327;
- DeMaster, E. G. & R. A. Mitchell (1973) “A comparison of arsenate and vanadate as inhibitors or uncouplers of mitochondrial and glycolytic energy metabolism” **Biochemistry** 12:2616-2621;
- dos Remédios, C. G. & J. A. Barden (1977) “Activation of myosin ATPase activity by Gd-G-actin” **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 77:1339-1346;
- Fohr, K. J., J. Scott, G. Ahnert-Hilger, M. Gratzl (1989) “Characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release from permeabilized endocrine cells and its inhibition by decavanadate and p-hydroxymercuribenzoate” **Biochem. J.** 262:83-89;
- Goodno, C. C. (1979) “Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion” **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76:2620-2624;
- Goodno, C. C. & E. W. Taylor (1982) “Inhibition of actomyosin ATPase by vanadate” **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79:21-25;
- Gresser, M. J., A. S. Tracey, P. J. Stankiewicz (1987) **Adv. Prot. Phosphatases** 4:35-37;
- Gresser, M. J. & A. S. Tracey (1990) **In: Vanadium in Biological Systems**, N. D. Chasteen, Ed., Kluwer Academic Publisher's, Boston;

- Guerrieri, N., P. Cerletti, M. De Vincentiis, A. Salvati, S. Scippa (1999) “*Vanadium inhibition of serine and cysteine proteases*” **Comp. Biochem. Physiol. Part A** 122:331-336;
- Johnson, K. A. & E. W. Taylor (1978) “*The Intermediate States of Subfragment-1 and Acto-Subfragment-1 ATPase - a Reevaluation of the Mechanism*” **Biochemistry** 17:3432-3442;
- Lindquist, R. N., J. L. Lynn, G. E. Lienhard (1973) “*Possible transition state analogs for ribonuclease, the complexes of uridine with oxovanadium(IV) ion and vanadium(V) ion*” **J. Am. Chem. Soc.** **95**:8762-8768;
- Liu, S., M. J. Gresser, A. S. Tracey (1992) “*Proton and vanadium-51 NMR studies of the interaction of vanadate and 2-vanadio-3-phosphoglycerate with phosphoglycerate mutase*” **Biochemistry** 31:2677-2685;
- Lopez, V, T. Stevens, R. N. Lindquist (1976) “*Vanadium ion inhibition of alkaline phosphatase-catalyzed phosphate ester hydrolysis*” **Arch. Biochem. Biophys.** 175:31-38;
- Nour-Eldeen, A. F., M. M. Craig, M. J. Gresser (1985) “*Interaction of inorganic vanadate with glucose-6-phosphate dehydrogenase. Non enzymatic formation of glucose-6-vanadate*” **J. Biol. Chem.** 260:11140-11148;
- Pan, X. X. & B. R. Ware (1988) “*Actin assembly by lithium ions*” **Biophys. J.** 53:11-16;
- Petterson, L., B. Hedman, I. Andersson, N. Ingri (1983) “*Multicomponent polyanions*” **Chem. Scripta** 22:254-264;
- Pick, U. (1982) “*The interaction of vanadate ions with the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum*” **J. Biol. Chem.** 257:6111-6119;
- Pick, U. & S. J. D. Karlish (1982) “*Regulation of the conformational transition in the ca -ATPase from sarcoplasmic reticulum by pH, temperature, and calcium*” **J. Biol. Chem.** 257:6120-6126;
- Rehder, D. (1992) “*Structure and function of vanadium compounds in living organisms*” **BioMetals** 5:3-12;
- Rehder, D. (1999) “*The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions*” **Coord. Chem. Rev.** 182:297-322;
- Ringel, I., Y. M. Peyser, A. Muhrad (1990) “ *^{51}V NMR study of vanadate binding to myosin and its subfragments*” **Biochemistry** 29:9091-9096;
- Sheterline, P. J. Clayton, J. C. Sparrow (1998) “*Actin*”, 4th edition, Oxford University Press, New York;

- Soman, G., Y. C. Chang, D. J. Graves (1983) “*Effect of oxyanions of the early transition metals on rabbit skeletal muscle phosphorilase*” **Biochemistry** 22:4994-5000;
- Stankiewicz, P. J., M. J. Gresser, A. S. Tracey, L. F. Hass (1987) “*2,3-Diphosphoglycerate mutase. Stimulation by vanadate and phosphate*” **Biochemistry** 26:1264-1269;
- Stankiewicz, P. J., A. S. Tracey, D. C. Crans (1995) “*Inhibition of phosphate metabolizing enzymes by oxovanadium(V) complexes*” In: **Metal Ions in Biological Systems: Vanadium and its Role in Life**, H. Sigel & A. Sigel Eds., Marcel Dekker, New York;
- Tiago, T., M. Aureliano, C. Gutiérrez-Merino (2004) “*Decavanadate binding to a high affinity site near the myosin catalytic centre inhibits F-actin-stimulated myosin ATPase activity*” **Biochemistry** 43:5551-5561;
- Tiago, T., S. Ramos, M. Aureliano, C. Gutiérrez-Merino (2006) “*Peroxynitrite induces F-actin depolymerization and blockade of myosin ATPase stimulation*” **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 342:44-49;
- Ujfalusi-Pozsonyi, K., G. Hild, P. Gróf, Z. Gutay-Tóth, Z. Bacsó, M. Nyitrai (2010) “*The effects of detergents on the polymerization properties of actin*” **Cytometry Part A** 77A:447-456;
- Van Etten, R. L., P. P. Waymack, D. M. Rehkop (1974) “*Transition metal ion inhibition of enzyme-catalyzed phosphate ester displacement reaction*” **J. Am. Chem. Soc.** 96:6782-6785;
- Wegner, A. & J. Engel (1975) “*Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments*” **Biophys. Chem.** 3:215-225;
- White, H. D. & E. W. Taylor (1976) “*Energetics and mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase*” **Biochemistry** 15:5818-5826;
- Wittenkeller, L., A. Abraha, R. Ramasany, D. F. de Freitas, L. A. Theisen, D. C. Crans (1991) “*Vanadate interactions with bovine Cu, Zn-superoxide dismutase as probed by ⁵¹V-NMR spectroscopy*” **J. Am. Chem. Soc.** 113:7872-7881.

CAPÍTULO V.

EFEITO DE VANÁDIO NA ESTRUTURA DE ACTINA

Considerando as alterações funcionais que as diferentes espécies de vanádio V(IV) e V(V) produzem na actina, que foram analisados em pormenor no capítulo anterior, torna-se fundamental caracterizar as modificações estruturais da proteína que lhes estão subjacentes.

Para tal, neste capítulo, e com recurso à espectroscopia de fluorescência, determina-se qual o efeito que as soluções de vanadato, decavanadato e vanadilo produzem na fluorescência intrínseca da actina, no local de ligação de nucleótidos e na superfície hidrofóbica da proteína. Além disso, analisa-se o estado redox dos resíduos de cisteína e a possível redução concomitante das espécies de vanadato, avaliada por espectroscopia de RPE. As modificações estruturais de actina são, posteriormente, avaliadas também por espectroscopia de ¹H-RMN.

V.1 Introdução

V.1.1 Espectroscopia de fluorescência aplicada ao estudo da estrutura da actina e supressão de fluorescência intrínseca na presença de vanádio

A fluorescência tem sido amplamente usada como uma ferramenta no estudo da estrutura e dinâmica moleculares, devido à elevada sensibilidade das técnicas fluorimétricas e à especificidade das características de fluorescência consoante o microambiente em que se encontra o fluoróforo, permitindo esta última a obtenção de informação espaço-temporal relativa ao sistema em análise. De facto, a emissão de fluorescência de uma determinada molécula depende de vários parâmetros, tais como valor de pH, pressão, viscosidade, temperatura, supressores de fluorescência, entre outros (Valeur, 2002). Adicionalmente, o espectro de fluorescência de uma molécula é mais sensível ao meio envolvente do que o espectro de absorção, uma vez que a absorção ocorre mais rapidamente do que uma vibração molecular.

Os fluoróforos podem dividir-se em três classes: (i) intrínsecos; (ii) extrínsecos, ligados covalentemente; e (iii) extrínsecos, em associação não-covalente (como, por exemplo, o ϵ -ATP e o ANSA, usados neste trabalho e descritos em pormenor nas secções seguintes).

Os grupos indolo dos resíduos de triptofano (Trp) constituem-se como sondas fluorescentes intrínsecas das proteínas e têm sido amplamente utilizados na elucidação da estrutura proteica. Tal deve-se à grande sensibilidade para as diferentes condições do seu ambiente químico e particularidades da sua localização relativa na proteína que os seus parâmetros de fluorescência apresentam, como por exemplo, (i) a posição do espectro, (ii) o rendimento quântico, (iii) anisotropia, entre outras características. De facto, a posição do espectro de fluorescência dos resíduos de Trp é principalmente determinada pela sua acessibilidade ao solvente – os resíduos que se encontram inacessíveis ao solvente possuem

espectros de fluorescência com uma banda predominante na zona do azul (c.d.o. mais curtos), enquanto os que se encontram expostos se encontram deslocados para a região do vermelho (c.d.o. mais longos).

A fluorescência intrínseca da actina encontra-se amplamente caracterizada (Lehrer & Kerwar, 1972; Turoverov & Kuznetsova, 2003; Thomas *et al.*, 2009), tendo sido já possível desconvoluir a contribuição dos diferentes resíduos de Trp para a fluorescência intrínseca desta proteína (Kuznetsova *et al.*, 1999; Doyle *et al.*, 2001), bem como o estado de *folding/unfolding* induzido por diferentes compostos (Turoverov *et al.*, 1999 e 2000).

Por outro lado, diversos estudos têm permitido observar que o vanádio pode actuar como um supressor efectivo da fluorescência intrínseca de diferentes proteínas (Tab. V.II).

Tabela V.I – Espécies de vanádio responsáveis pela supressão intrínseca de diferentes proteínas.

Proteína	Espécie vanádio responsável pela supressão de fluorescência intrínseca	Referência bibliográfica
Fosfatases de tirosina	$\text{Na}_2[\text{VO}(\text{Glu})_2(\text{CH}_3\text{OH})]$ (Glu = glutamato)	Lu <i>et al.</i> , 2010
Transferrina humana	Cp_2VCl_2 (Cp = $\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$)	Du <i>et al.</i> , 2008
Proteínas membranares de eritrócitos humanos	V_1	Zhang & Wang, 1999
Subfragmento-1 de miosina	V_{10}	Tiago <i>et al.</i> , 2002
Trifosfatase de ARN	V_{10}	Bougie & Bisailon, 2006

O efeito do vanádio na fluorescência intrínseca da actina não foi, até ao presente, ainda descrito pelo que se torna fundamental proceder a esta caracterização, a qual permitirá esclarecer quais as modificações estruturais que ocorrem na presença de vanadato, decavanadato e vanadilo. Estas, prediz-se, encontrar-se-ão intimamente ligadas às alterações funcionais anteriormente descritas.

V.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H aplicada ao estudo da estrutura da actina

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN) tem sido extensivamente usada na análise estrutural e funcional da actina (Cozzone *et al.*, 1974; Highsmith *et al.*, 1979; Highsmith & Jardetzky, 1980; Barden *et al.*, 1980, 1983 e 1989; Barden & dos Remédios, 1984; Barden & Kemp, 1987; Trayer *et al.*, 1987; Heintz *et al.*, 1996; Kany *et al.*, 2002).

De facto, a distância de 16 Å entre os locais de ligação de nucleótidos e de alta afinidade para catiões divalentes foi estabelecida recorrendo a esta técnica espectroscópica (Barden *et al.*, 1980; Barden & dos Remédios, 1984). Segundo estes autores, os prótons da adenosina do ATP ligado são mobilizados pela adição de concentrações equimolares de Gd^{3+} ou Lu^{3+} à actina, não se verificando, por outro lado, qualquer alargamento das ressonâncias do ATP. O aumento da concentração de Gd^{3+} provoca o aumento progressivo das intensidades dos picos dos prótons da adenosina, o que indica que, na presença deste lantanídeo, o nucleósido, geralmente ligado à actina de forma rígida, se encontra agora a precessar de forma relativamente livre. Foi, ainda, proposto que o local de ligação de catiões se encontrasse associado aos primeiros 12 resíduos da estrutura primária da actina (Barden & dos Remédios, 1984).

Adicionalmente, verificou-se que a polimerização da ATP-G-actina, conseguida através do aumento da força iónica do meio reaccional, produz a supressão da maioria dos sinais de 1H -RMN. Contudo, os filamentos de F-actina apresentam sinais com larguras de linhas relativamente pequenas, indicativo da existência de resíduos com alguma mobilidade, visíveis por RMN de 1H , na estrutura macromolecular da proteína (Slósarek *et al.*, 1994). Posteriormente, identificaram-se estes resíduos móveis como sendo a região N-terminal da actina e as duas primeiras cadeias enroladas em folha- β existentes nesta região (Heintz *et al.*, 1996).

Foram também realizados estudos de 1H -RMN sobre a interacção entre a actina e a miosina. Os sinais correspondentes ao resíduo N-trimetil-alanina, presente na região N-terminal da cadeia leve essencial LC1 de miosina podem ser observados recorrendo a esta técnica espectroscópica, sendo estes suprimidos após a ligação do subfragmento-1 de miosina à F-actina. Tal sugere que a região N-terminal da cadeia LC1 se liga à actina filamentosa (Henry *et al.*, 1985).

O efeito de ortovanadato na ligação da miosina à actina foi, de igual modo, avaliado por 1H -RMN. O complexo $ADP.VO_4^{3-}$ é mais estável que o complexo $ADP.PO_4^{3-}$, pelo que a sua ligação à miosina permitirá simular uma interacção fraca entre a miosina e a actina. De facto, na presença de $ADP.Vi$, obtém-se os sinais de RMN típicos da miosina livre em solução. Verificou-se, também, que os sinais correspondentes à região N-terminal da actina não sofrem qualquer alteração na presença de vanadato (Kany *et al.*, 2002).

No entanto, não se encontra descrito qualquer estudo exaustivo sobre a interacção de outras espécies de vanadato e vanadilo e a actina, analisada por 1H -RMN, pelo que se torna essencial o recurso a esta técnica espectroscópica para elucidar possíveis alterações estruturais desta proteína na presença de vanádio.

V.2 Materiais e métodos

V.2.1 Medições da fluorescência intrínseca da actina na presença de vanádio

Os espectros de fluorescência intrínseca de G- e F-actina (5 μM) na presença de diferentes concentrações de vanádio, em 2 mM Tris-HCl, 0.2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0.2$ mM ATP, foram obtidos para um intervalo de emissão compreendido entre os 300 e os 400 nm, após excitação das amostras a 295 nm. Os espectros foram adquiridos num espectrofluorímetro (BioLogic, MOS-250), com uma fenda espectral de emissão e de excitação de 5 nm e uma velocidade de varrimento de 125 nm s^{-1} , a uma temperatura de 25 °C. Os ensaios na presença de VOSO_4 foram realizados anaerobicamente numa câmara de luvas (MBraun, modelo UniLab), com atmosfera de árgon, sendo a concentração de O_2 no seu interior inferior a 5 ppm. Todas as soluções desarejadas com azoto gasoso.

Sempre que se verificou a supressão (*quenching*) de fluorescência intrínseca da actina na presença das diferentes espécies de vanádio, recorreu-se à equação de Stern-Volmer (Eq. V.1), de modo a determinar os valores das constants K_{sv} e k_q :

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (\text{Eq. V.1})$$

onde F_0 e F correspondem à intensidade da fluorescência antes e depois da adição do supressor (Q), K_{sv} representa a constante de supressão efectiva, sendo dependente tanto do tempo de vida antes da adição do supressor (τ_0) como da constante bimolecular da reacção de supressão (k_q).

V.2.2 Análise da troca de ATP no local de ligação de nucleótidos da actina na presença de vanádio

A concentração de ATP livre na solução de G-actina foi diminuída através de uma diálise da proteína, a 4 °C, durante cerca de 12 horas, contra uma solução contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl_2 e 20 μM ATP, tal como anteriormente descrito (DalleDonne *et al.*, 2002). A incorporação de ϵ -ATP no local de ligação de nucleótidos da G-actina (5 μM) foi obtida adicionando esta sonda fluorescente ao meio reaccional, com uma concentração final de 0,2 mM. Torna-se possível acompanhar esta incorporação através do aumento da intensidade de fluorescência a um comprimento de onda de 410 nm após excitação a 350 nm, atingindo-se o máximo de intensidade 20 minutos após a adição do ϵ -ATP. Os espectros foram adquiridos num

espectrofluorímetro (BioLogic, MOS-250), com uma fenda espectral de emissão e de excitação de 5 nm e uma velocidade de varrimento de 125 nm s^{-1} , a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Os ensaios na presença de VOSO_4 foram realizados anaerobicamente numa câmara de luvas (modelo UniLab) com atmosfera de árgon e uma concentração de O_2 no seu interior inferior a 5 ppm, tendo sido todas as soluções desarejadas com azoto gasoso.

A troca entre o ϵ -ATP e o ATP não-marcado é monitorizada pela diminuição da intensidade de fluorescência que ocorre quando o ATP fluorescente é libertado para o meio reaccional, após adição de ATP não-marcado em excesso (1 mM). A velocidade de troca de nucleótido na ausência e na presença de diferentes espécies de vanádio foi determinada através do ajuste não-linear dos pontos experimentais a uma equação de decaimento exponencial de primeira ordem, através do programa GraphPad[®]. A intensidade de fluorescência foi expressa em percentagem, considerando 100 % a intensidade do sinal da ϵ -ATP-G-actina nativa.

V.2.3 Determinação da superfície hidrofóbica da actina na presença de vanádio

A superfície hidrofóbica de G- e F-actina foi determinada de acordo com o descrito por Chao *et al.* (1997). As formas globular e filamentosa ($9 \text{ } \mu\text{M}$) foram incubadas com as diferentes espécies de vanádio (metavanadato, decavanadato e vanadilo), em 2 mM Tris-HCl, 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0.2 \text{ mM ATP}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 20 minutos. Após este período, a sonda fluorescente ANSA (do inglês, *1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid*; ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico) ($200 \text{ } \mu\text{M}$ em 1 M NaOH) foi adicionada ao ensaio e as amostras incubadas durante 45 minutos, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. A ligação da sonda ANSA à superfície hidrofóbica da actina foi monitorizada para comprimentos de onda compreendidos entre os 400 e os 600 nm, após excitação das amostras a 370 nm, subtraindo o espectro de emissão do ANSA na ausência de proteína daquele obtido na sua presença. Os espectros foram adquiridos num espectrofluorímetro (BioLogic, MOS-250), com uma fenda espectral de emissão e de excitação de 5 nm e uma velocidade de varrimento de 125 nm s^{-1} , a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Os ensaios na presença de VOSO_4 foram realizados anaerobicamente numa câmara de luvas (MBraun, modelo UniLab), com atmosfera de árgon e uma concentração de O_2 no seu interior inferior a 5 ppm, tendo sido todas as soluções desarejadas com azoto gasoso.

A intensidade de fluorescência foi expressa em percentagem, considerando 100 % o sinal correspondente à intensidade de fluorescência de ANSA na presença de actina no seu estado nativo (i. e., na ausência de espécies de vanádio no meio reaccional), e sabendo que esta sonda fluorescente se liga apenas às zonas hidrofóbicas das proteínas (Chao *et al.*, 1997).

V.2.4 Efeito de filtro interno

As soluções de vanadilo, metavanadato e, em especial, as de decavanadato absorvem, de forma significativa, em alguns dos comprimentos de onda usados nas experiências acima descritas, realizadas com recurso à técnica de espectroscopia de fluorescência (Tiago *et al.*, 2002). Enquanto as soluções de metavanadato não absorvem para comprimentos de onda na região do visível, o decavanadato possui picos de absorvência a 365 e 400 nm, devido à presença das espécies decaméricas de vanadato, tal como descrito no Capítulo III.

Como tal, em todas as experiências de fluorescência foi necessário corrigir os efeitos de filtro interno, uma vez que estas absorções podem atenuar as intensidades de excitação e emissão observadas. Deste modo, preparou-se uma solução de triptofano com a mesma absorvência que a solução de 9 μM actina, ao comprimento de onda de excitação (A_{ex}), sendo esta titulada com as soluções de meta-, decavanadato e vanadilo. Com os valores obtidos, recorreu-se à equação V.II (Lakowicz, 2006), de modo a corrigir a intensidade de fluorescência:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \text{ antilog } [(Abs_{\text{ex}} + Abs_{\text{em}})/2] \quad (\text{Eq. V.II})$$

onde F_{corr} e F_{obs} correspondem, respectivamente, às intensidades de fluorescência corrigida e observada, Abs_{ex} e Abs_{em} são as absorvências aos comprimentos de onda de excitação e de emissão.

V.2.5 Quantificação de resíduos de cisteína de actina reduzidos na presença de vanádio

O procedimento que se descreve em seguida foi originalmente descrito por Gutiérrez-Martin *et al.*, (2004) e consiste na reacção entre os grupos tiol reactivos das proteínas e o reagente de Ellman, ou DTNB (do inglês, *5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid*; ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)), formando-se uma ligação perssulfureto (-SS-) entre a proteína e o anião 3-carboxilato-4-nitrotiofenolato (CNT), o qual apresenta um máximo de absorvência a um comprimento de onda de 412 nm (Robyt & White, 1990). Deste modo, e após a incubação com as diferentes espécies de vanádio, o número de resíduos de cisteína reduzidos é determinado através da medição da absorvência do anião CNT que se encontra ligado aos grupos -SH, uma vez a estequiometria de reacção entre grupos sulfidrílo e DTNB para formar CNT é 1:1.

Deste modo, após incubação de G- e F-actina (2 μM) com as diferentes concentrações de metavanadato, decavanadato e VOSO_4 (em 2 mM Tris-HCl, 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP, a 25 $^\circ\text{C}$, durante 20 minutos), adicionou-se ao meio reaccional 50 mM de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$

(pH 7,2) + 1 mM DTNB, e deixou-se reagir durante cerca de 5 minutos, o que permite quantificar os resíduos de cisteína expostos ao solvente (cisteínas “rápidas”). De seguida, adicionou-se 1 % SDS (p/V), o qual provoca a desnaturação da actina e, conseqüentemente, conduz á exposição ao solvente dos resíduos de cisteína que se encontram no interior hidrofóbico da proteína, os quais ficam assim possibilitados de reagir com o DTNB (cisteínas totais).

O número de resíduos de cisteína reduzidos, “rápidos” e totais, por molécula de actina tratada com as diferentes espécies de vanádio foi determinado através dos valores de absorvência a um comprimento de onda de 412 nm registados aquando das adições de DTNB e SDS, respectivamente, ao meio reaccional, utilizando um coeficiente de extinção molar de $10\,900\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (determinado para as condições experimentais utilizadas).

V.2.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de actina na presença de vanádio

Os espectros de ^1H -RMN de actina, na ausência e na presença de diferentes espécies de vanádio (em 2 mM Tris-HCl, 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP), foram adquiridos a uma temperatura de 298 K num espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado com uma criosonda TCI-Z e uma unidade de controlo de temperatura. Por espectro acumularam-se 256 FIDs (do inglês, *free-induction decays*), com uma pausa entre *scans* de 1,5 s. A ressonância da água foi suprimida usando a sequência de pulsos *zgpg30*, na qual se obtém a supressão do solvente através de pulsos a 180° selectivos para a água. Os espectros foram processados usando o programa TOPSPIN 2.0 (Bruker), multiplicando as FIDs por uma função de janela exponencial com largura de linha de 10 Hz.

V.3 Resultados e discussão

V.3.1 Supressão da fluorescência intrínseca da actina por vanádio

A fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano de uma determinada proteína permite obter informações relevantes sobre a sua estrutura e dinâmica, bem como o seu *folding/unfolding* (Turoverov, 2003). Como tal, e com base no facto da função da actina ser amplamente inibida na presença de diferentes espécies de vanádio, tanto ao nível da sua capacidade de estimular a actividade do ATPase de subfragmento-1 de miosina como no equilíbrio entre a forma monomérica e filamentosa, torna-se essencial determinar que alterações estruturais ocorrerão na presença de diferentes espécies de vanadato e de vanadilo.

Como se pode observar na Figura V.1A, a presença de decavanadato até uma concentração de 500 μM (em vanadato total) aumenta a intensidade de fluorescência relativa da G-actina em cerca de 80 %. Através do ajuste não-linear dos pontos a uma função sigmoideal de Boltzmann obtiveram-se os seguintes parâmetros: $(\text{Fluores. Intrín.})_{\text{mín}} = 0,85 \pm 0,19$; $(\text{Fluoresc. Intrín.})_{\text{máx}} = 1,75 \pm 0,04$; $V_{50} = 108,0 \pm 32,9 \mu\text{M}$ decavanadato (em vanadato total). O aumento da concentração de decavanadato até 1330 μM produz aproximadamente 30% de supressão de fluorescência, por comparação com o valor de fluorescência intrínseca inicial da G-actina, tendo-se obtido uma constante de dissociação aparente de $K_{\text{d,app}} = 870,1 \pm 6,9 \mu\text{M}$ decavanadato.

Por seu turno, a incubação de G-actina com concentrações de metavanadato até 700 μM não provoca alterações significativas na intensidade relativa de fluorescência intrínseca, enquanto concentrações acima deste valor diminuem a intensidade relativa de fluorescência em cerca de 30 %, a mesma supressão de fluorescência observada para a solução de decavanadato acima descrita (Fig. 1B). Uma vez que concentrações de metavanadato mais elevadas favorecem a formação de oligoaniões de vanadato, tais como as espécies dimérica, tetramérica e pentamérica, pode assumir-se que a espécie monomérica não produz qualquer alteração significativa na fluorescência intrínseca da G-actina, sendo os efeitos observados devido à presença em solução de oligómeros de vanadato, nomeadamente tetravanadatos.

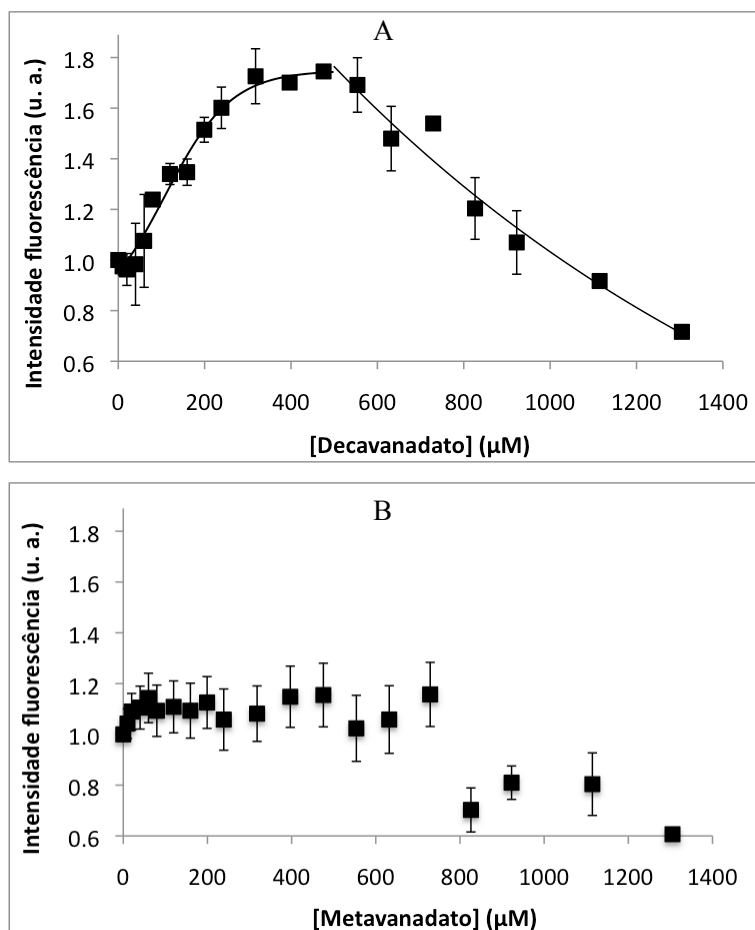


Figura V.1 – Fluorescência intrínseca de G-actina. A actina monomérica (5 µM) foi incubada durante 20 minutos com 0-1300 µM (A) deca- ou (B) metavanadato (em vanadato total), em 2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0,2 mM CaCl₂. Representação gráfica do valor máximo de intensidade do espectro de fluorescência intrínseca ($\lambda_{ex} = 295$ nm) em função da concentração de vanadato, considerando 1,00 o valor para a G-actina nativa, de acordo com o descrito na secção V.2.1.

De forma semelhante ao observado para a G-actina, o metavanadato apenas suprime a fluorescência intrínseca de F-actina para concentrações superiores a 600 µM (em vanadato total) (Fig. V.2B). Contudo, quando a actina se encontra na sua forma filamentosa a supressão de fluorescência é quase total para concentrações de metavanadato superiores, possivelmente devido à presença em solução de espécies tetraméricas de vanadato, tal como acima descrito. Por outro lado, o decavanadato até 600 µM produz um aumento da intensidade relativa de fluorescência intrínseca ligeiramente inferior ao observado para a G-actina (1,7 vezes), aumentando-a em 1,4 vezes (Fig. V.2A). Para intervalos de concentração compreendidos entre 600-1300 µM decavanadato, verifica-se uma diminuição linear da intensidade relativa da fluorescência intrínseca da F-actina, atingindo-se os 50 % de supressão para $961,1 \pm 7,8$ µM decavanadato. Além disso, e contrariamente ao observado para a G-actina, a actina filamentosa perde completamente a sua fluorescência intrínseca para 1300 µM decavanadato (em vanadato total).

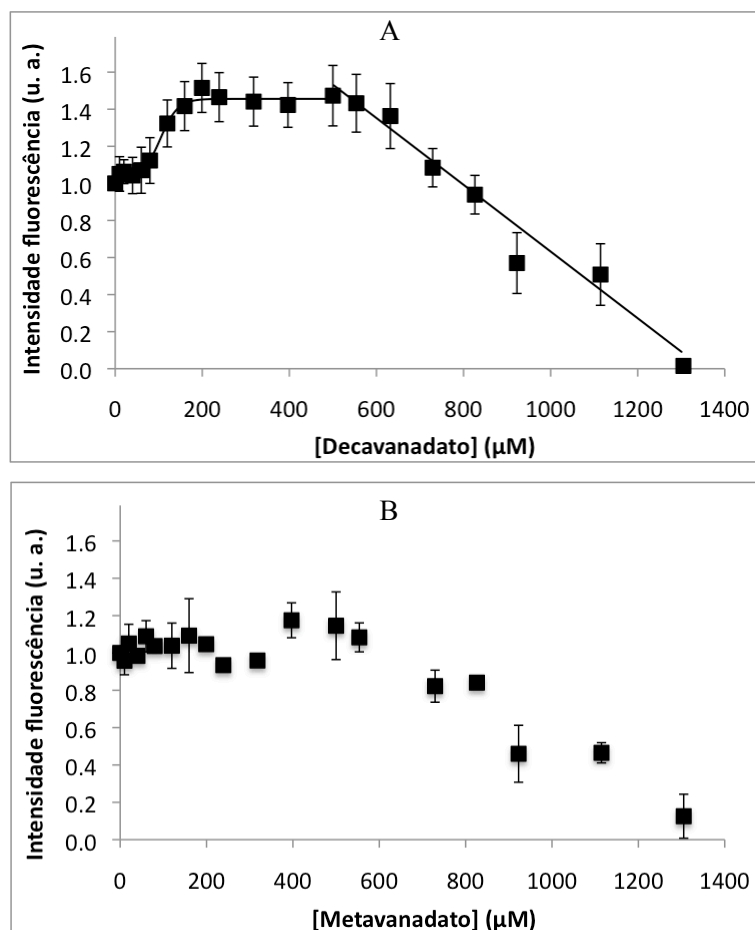


Figura V.2 - Fluorescência intrínseca de F-actina. A actina filamentosa ($5 \mu\text{M}$) foi incubada durante 20 minutos com 0-1300 μM (A) deca- ou (B) metavanadato (em vanadato total), em 2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP. Representação gráfica do valor máximo de intensidade do espectro de fluorescência intrínseca ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$) em função da concentração de vanadato, considerando 1,00 o valor para a F-actina nativa, de acordo com o descrito na secção V.2.1.

A titulação da fluorescência intrínseca da G-actina com VOSO_4 produz aproximadamente 100 % de supressão, no intervalo de concentrações utilizado (0-500 μM VOSO_4) (Fig. V.3). Por outro lado, a F-actina é menos susceptível ao vanadilo, uma vez que esta perde apenas cerca de 75 % da sua intensidade de fluorescência intrínseca inicial (Fig. V.3). Em ambos os casos, o ajuste não-linear dos pontos experimentais com uma função sigmoideal de Boltzmann originou os seguintes parâmetros: G-actina, $(\text{Fluoresc. Intrínsc.})_{\text{mín}} = 0,05 \pm 0,03$; $(\text{Fluoresc. Intrínsc.})_{\text{máx}} = 1,00 \pm 0,03$; $V_{50} = 130,9 \pm 5,65 \mu\text{M}$ VOSO_4 ; F-actina, $(\text{Fluoresc. Intrínsc.})_{\text{mín}} = 0,27 \pm 0,02$; $(\text{Fluoresc. Intrínsc.})_{\text{máx}} = 0,96 \pm 0,02$; $V_{50} = 319,9 \pm 11,5 \mu\text{M}$ VOSO_4 .

Face à diferença na supressão da fluorescência intrínseca que o catião vanadilo promove nas diferentes formas de actina (75 % na F-actina, 100 % na G-actina), um de dois acontecimentos serão possíveis para explicar este comportamento: (i) alguns dos resíduos de triptofano encontram-se parcialmente protegidos dos efeitos do vanadilo quando a actina se

encontra na sua forma polimerizada ou (ii) algumas das alterações conformacionais induzidas pelo vanádio(IV) são prevenidas/impedidas devido à polimerização.

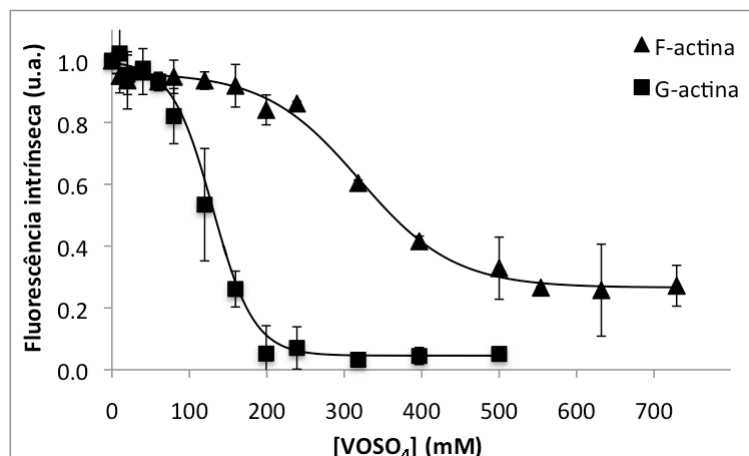


Figura V.3 - Fluorescência intrínseca de (■) G- e (▲) F-actina. A actina (5 μ M) foi incubada durante 20 minutos com 0-700 μ M VOSO₄, em 2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0,2 mM CaCl₂ \pm 0,2 mM ATP. Representação gráfica do valor máximo de intensidade do espectro de fluorescência intrínseca ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm) em função da concentração de vanádio, considerando 1,00 o valor para a G- e F-actina nativas, de acordo com o descrito na secção V.2.1.

Os dados acima descritos permitem concluir que a supressão de 50 % da fluorescência intrínseca da G-actina pela espécie decamérica de vanadato e pelo vanadilo ocorre para concentrações de metal similares ($87,0 \pm 0,7 \mu\text{M V}_{10}$ e $130,9 \pm 5,7 \mu\text{M VOSO}_4$), enquanto que a fluorescência intrínseca da F-actina é afectada primeiramente pelo decavanadato: $96,1 \pm 0,8 V_{10}$ por comparação com $319,9 \pm 11,5 \mu\text{M VOSO}_4$.

Verificando-se que tanto o decavanadato como o vanadilo são supressores efectivos de fluorescência intrínseca da actina, traçaram-se os gráficos de Stern-Volmer para as concentrações de vanádio em que se observou supressão da fluorescência (Fig. V.4), de acordo com o descrito na equação V.1 (secção V.1.1.1).

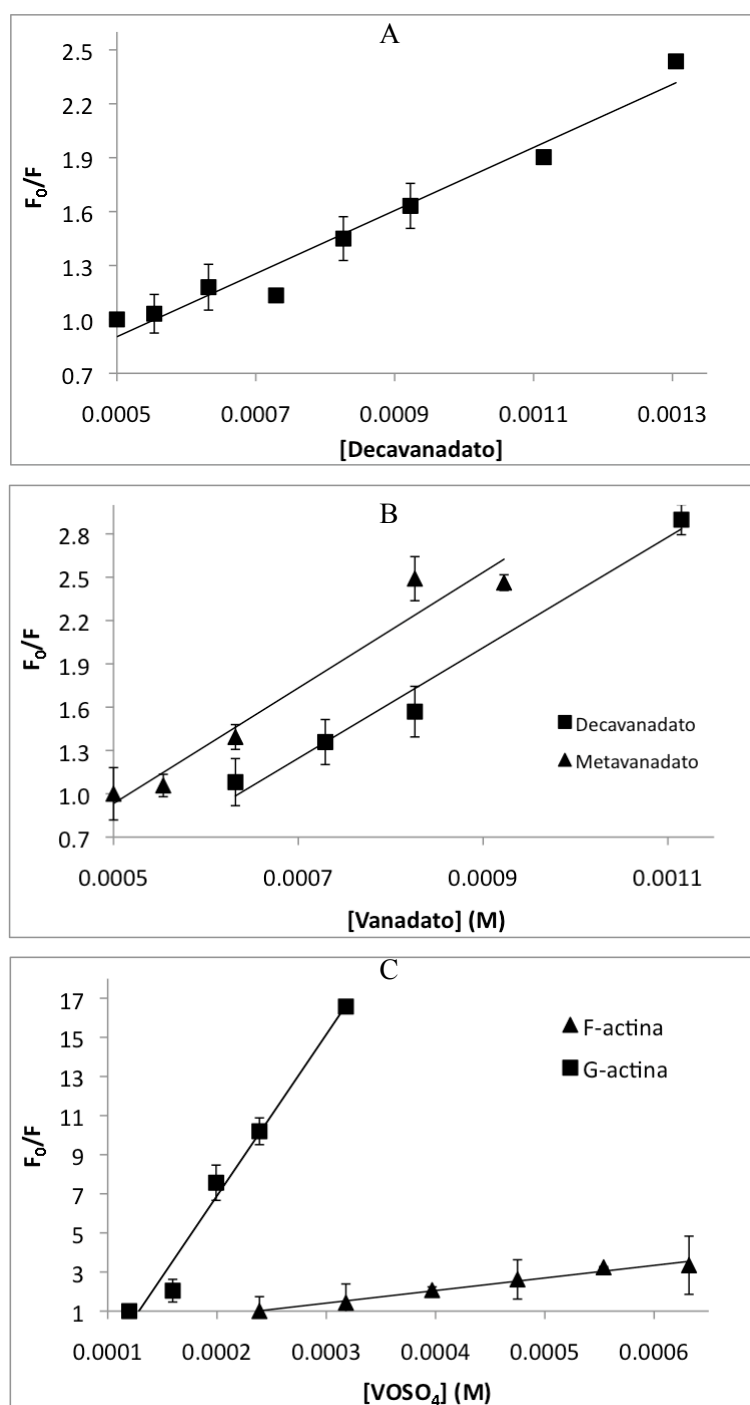


Figura V.4 – Gráficos de Stern-Volmer da supressão de fluorescência intrínseca de actina. Os ensaios foram realizados com 5 μ M G- e F-actina, num meio contendo 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm$ 0,2 mM ATP. A incubação com (A) metavanadato, (B) decavanadato e (C) VOSO_4 foi realizada a 25 $^\circ\text{C}$, durante 20 minutos. Os espectros foram obtidos num espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm), de acordo com o descrito na secção V.2.1.

A partir dos gráficos de Stern-Volmer dos dados obtidos para soluções de actina na presença de meta-, decavanadato e vanadilo, calcularam-se as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e de supressão (k_q), indicados na Tabela V.III, usando um valor para o tempo de meia-vida dos triptofanos (τ_0) da G- e F-actina de 3,01 e 2,96 ns, respectivamente (Kouyama *et al.*, 1989). Os

valores de k_q determinados (superiores a $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), permitem concluir que existe, em todos os casos, supressão estática de fluorescência intrínseca da actina (Lakowicz, 2006).

Tabela V.II – Parâmetros de supressão de fluorescência intrínseca da actina obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer da Figura V.4: efeito de diferentes espécies de vanádio.

Amostra	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	$k_q (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
G-actina + Decavanadato	1756,3	$5,83 \times 10^{11}$
F-actina + Metavanadato	4003,5	$1,37 \times 10^{12}$
F-actina + Decavanadato	3830,2	$1,31 \times 10^{12}$
G-actina + VOSO_4	82477	$2,70 \times 10^{13}$
F-actina + VOSO_4	6442,3	$2,20 \times 10^{12}$

Os resultados obtidos por fluorescência intrínseca sugerem que a ligação da espécie decamérica de vanadato e do ião vanadilo à actina ocorre em locais de alta afinidade para o metal, produzindo alterações conformacionais locais perto dos resíduos de triptofano da proteína. A actina possui 4 triptofanos, todos eles localizados no subdomínio 1 (Kabsch *et al.*, 1990). Os resíduos de triptofano Trp-79, Trp-86 e Trp-340 localizam-se nas hélices- α formado pelos resíduos Trp-79-Asn-92 e Ser-338-Ser-348, enquanto o resíduo Trp-356 se situa na região não-resolvida entre as hélices- α formadas por Ser-350-Met-355 e Lys-359-Ala-365 (Fig. V.5). Destes, e apesar se encontrarem localizados na parte mais periférica da proteína, os resíduos Trp-86, Trp-340 e Trp-356 encontram-se, aparentemente, inacessíveis ao solvente, pelo que apenas o resíduo Trp-79 se pode considerar exposto ao solvente. Na vizinhança dos resíduos Trp-79 e Trp-86 existem átomos de enxofre, presentes nas cadeias laterais dos resíduos de metionina e cisteína, que se sabe serem supressores efectivos de fluorescência (Burstein, 1976). Estes enxofres encontram-se na Met-119, na vicinidade do Trp-79, e nas Met-82, Met-119, Met-123 e Cys-10 no ambiente do Trp-86. Além disso, o espectro de fluorescência intrínseca da actina possui um máximo de intensidade para um comprimento de onda de 325 nm, característico de resíduos de triptofano inacessíveis ao solvente. Com base no anteriormente descrito, pode ser sugerido que os resíduos Trp-79 e Trp-86 não contribuirão grandemente para a fluorescência intrínseca da actina, devendo-se esta aos resíduos Trp-340 e Trp-356 (Kuznetsova *et al.*, 1999; Doyle *et al.*, 2001).

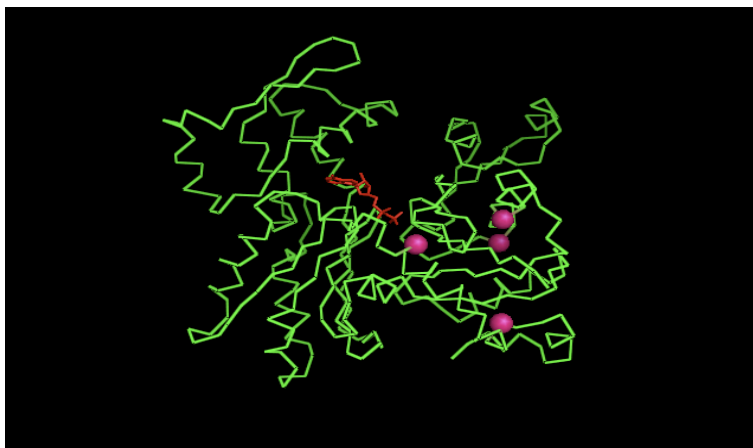


Figura V.5 – Estrutura tridimensional de G-actina de músculo esquelético de coelho (PDB: 1J6Z) (verde), com a molécula de ATP destacada a vermelho e os resíduos de triptofano a rosa. Imagem criada com o programa Pymol.

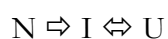
Assim, a deslocação do máximo de absorção do espectro de fluorescência intrínseca da actina para a zona dos vermelhos (cerca de 8 nm), na presença da espécie decamérica de vanadato e do ião vanadilo, indica que alguns dos resíduos de Trp, inicialmente orientados para o interior hidrofóbico da actina, terão ficado expostos ao solvente. Esta alteração da estrutura tridimensional da G-actina pode explicar o aumento da intensidade relativa de fluorescência intrínseca para concentrações de decavanadato inferiores a 500 μM , como acima apresentado: os resíduos de triptofano Trp-79 e Trp-86 poderão passar a ocupar uma posição relativa tal, que a sua fluorescência intrínseca deixe de se encontrar suprimida pelos átomos de enxofre presentes nas cadeias laterais das cisteínas e metioninas existentes na sua vizinhança.

Com base nos espectros de fluorescência intrínseca da actina, determinou-se também o valor do parâmetro A, definido como

$$A = I_{320}/I_{365} \quad (\text{Eq. V.x})$$

onde I_{320} e I_{365} correspondem, respectivamente, aos valores da intensidade de fluorescência aos comprimentos de onda de 320 e 365 nm (Fig. V.6).

De acordo com o descrito por Turoverov (1999), um valor de $A = 2,61$ corresponde a actina nativa (N), enquanto que a actina inactiva possui $A = 1,4$. Por actina inactiva (I) entende-se um estado intermédio da actina que ocorre antes da sua completa desnaturação, (U, *unfolded*), sendo que a transição entre os estados $U \Leftrightarrow I$ é mais rápida que o processo inverso $I \Leftrightarrow U$:



No estado inativo, a estrutura secundária mantém-se inalterada, tendo a proteína, no entanto, perdido a sua estrutura terciária, apresentando um aumento considerável da mobilidade conformacional, por comparação com o estado nativo. Além disso, a inativação da actina provoca um deslocamento do espectro de fluorescência intrínseca para a zona dos vermelhos (Turoverov, 1999), tal como acima se descreveu para a G-actina na presença de decavanadato e vanadilo. Tal indica que os resíduos de triptofano na actina inactiva se encontram em ambientes mais polares e com maior mobilidade. Por seu turno, a actina completamente desnaturada apresenta um valor de $A = 0,4$, observando-se a intensidade máxima de fluorescência para um comprimento de onda de 350 nm (Turoverov, 1999). Além disso, importa referir que tanto a forma como a posição do espectro de fluorescência da actina inactiva são independentes da força iónica da solução, da presença de agentes redutores, da quantidade de ATP ou Ca^{2+} em solução, da concentração de proteína e da forma de inactivação (Turoverov, 1999).

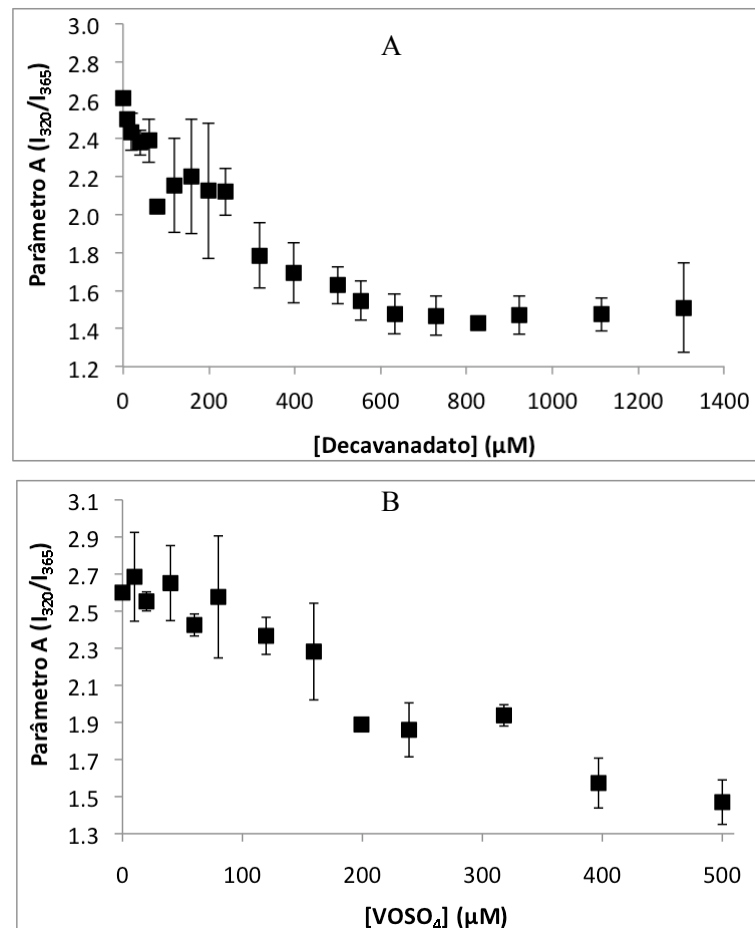


Figura V.6 – Representação gráfica do Parâmetro A (I_{320}/I_{365}), obtido a partir dos espectros de fluorescência intrínseca da G-actina ($5 \mu\text{M}$), em função da concentração de decavanadato (em vanadato total) e VOSO_4 .

Pode assim concluir-se que a espécie decamérica de vanadato e o ião vanadilo promovem a inativação da G-actina, uma vez que o parâmetro A varia entre 2,61, no estado nativo, e $1,51 \pm 0,23$ ou $1,47 \pm 0,12$, para as concentrações máximas de decavanadato e VO_2SO_4 testadas – 1300 e 500 μM , respectivamente (Fig. V.6).

Uma vez que se encontra descrito que a actina inactiva perde a sua capacidade de polimerizar (Turoverov *et al.*, 1999), os resultados agora apresentados permitem esclarecer quais as alterações estruturais subjacentes à inibição da polimerização da G-actina na presença de decavanadato e vanadilo, anteriormente descrita.

V.3.2 Análise da superfície hidrofóbica da actina na presença de vanádio

As alterações conformacionais das proteínas encontram-se, muitas vezes, associadas a alterações na sua superfície hidrofóbica. Deste modo, a hidrofobicidade da actina foi avaliada após incubação com as diferentes espécies de vanádio (0-200 μM), recorrendo à sonda fluorescente ANSA, a qual se liga apenas às regiões hidrofóbicas das proteínas.

Como se pode observar pela Figura V.7A, a titulação de G-actina com concentrações crescentes de decavanadato conduz a um aumento linear da sua superfície hidrofóbica, aumentando esta em cerca de 2,6 vezes, enquanto que para a F-actina se observa um aumento (1,5 vezes) apenas para concentrações de decavanadato superiores a 100 μM (em vanadato total) (Fig. V.7B). A presença de metavanadato não promove qualquer alteração significativa na superfície hidrofóbica tanto da G- como da F-actina, no intervalo de concentrações testado (0-200 μM).

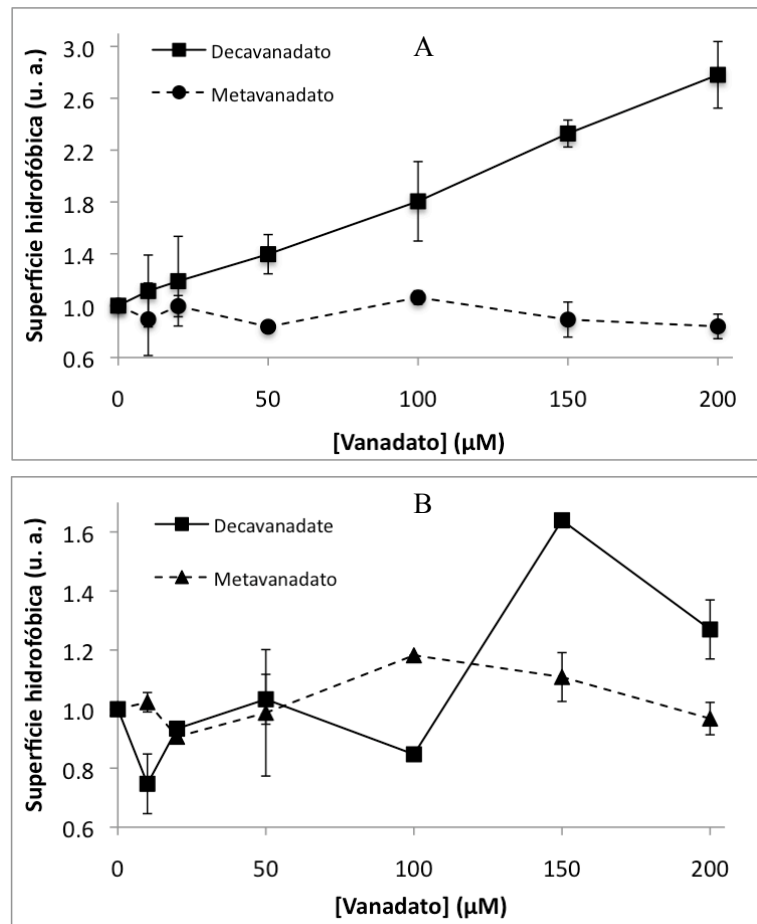


Figura V.7 – A alteração na intensidade de fluorescência associada à ligação de ANSA às zonas hidrofóbicas da superfície da (A) G- e (B) F-actina ($9 \mu\text{M}$) foi determinada a um comprimento de onda de 500 nm , após excitação a 370 nm . A incubação com diferentes concentrações de (\blacktriangle) meta- ou (\blacksquare) decavanadato, em 2 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7,5$), $0,2 \text{ mM CaCl}_2 \pm 0,2 \text{ mM ATP}$, foi realizada durante 20 minutos, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Por sua vez, na presença de $200 \mu\text{M VOSO}_4$, a superfície hidrofóbica da G-actina diminuiu em cerca de 15% , com um valor de IC_{50} de $22,26 \pm 2,09 \mu\text{M VOSO}_4$ (Fig. V.8A). Contrariamente, a presença de vanadilo não produz alterações significativas na superfície hidrofóbica da F-actina (Fig. V.8B). Vogt (1995) demonstrou que uma diminuição da superfície hidrofóbica pode ser explicada pela oxidação de resíduos de metioninas e cisteínas. Além disso, pode ser sugerido que o vanadilo induz um estado intermédio mais compacto, no qual as interações hidrofóbicas no interior da proteína aumentam, originando uma diminuição da superfície hidrofóbica, por comparação com a estrutura nativa.

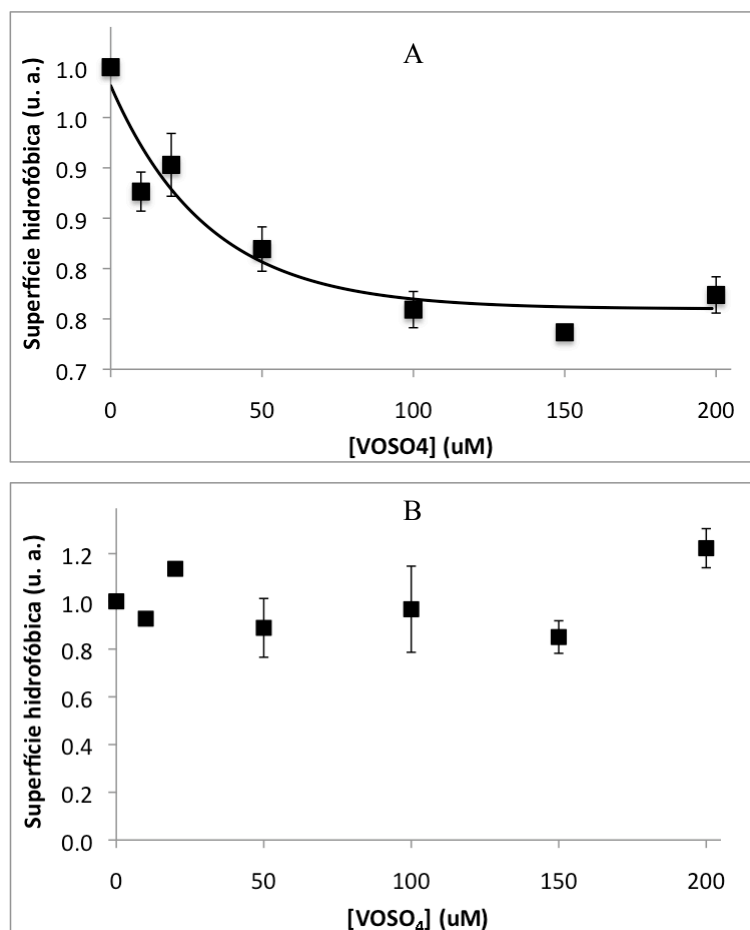


Figura V.8 – A alteração na intensidade de fluorescência associada à ligação de ANSA às zonas hidrofóbicas da superfície da (A) G- e (B) F-actina (9 μM) foi determinada a um comprimento de onda de 500 nm, após excitação a 370 nm. A incubação com diferentes concentrações de VOSO_4 , em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP, foi realizada durante 20 minutos, a 25 °C.

V.3.3 Alteração do local de ligação de nucleótidos da actina na presença de vanádio

A troca entre o ϵ -ATP ligado à G-actina no local de ligação de nucleótidos pelo ATP livre em solução foi monitorizada através da diminuição da intensidade de fluorescência a um comprimento de onda de emissão de 410 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm), a qual acompanha a libertação do ATP fluorescente para o meio reaccional.

Na Figura V.9A verifica-se que a velocidade de troca é substancialmente aumentada à medida que se aumenta a concentração de decavanadato: $k = 3,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $k = 6,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para a G-actina nativa e na presença de 200 μM decavanadato (em decavanadato total), respectivamente. Selden *et al.* (1999) obtiveram constantes de velocidade similares para a G-actina nativa ($2,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), enquanto a G-actina tratada com CT (cloramina-T) oito vezes em excesso possui uma constante de velocidade para a troca do ϵ -ATP de $6,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (DalleDonne *et al.*, 2002), sendo semelhante à observada para o decavanadato.

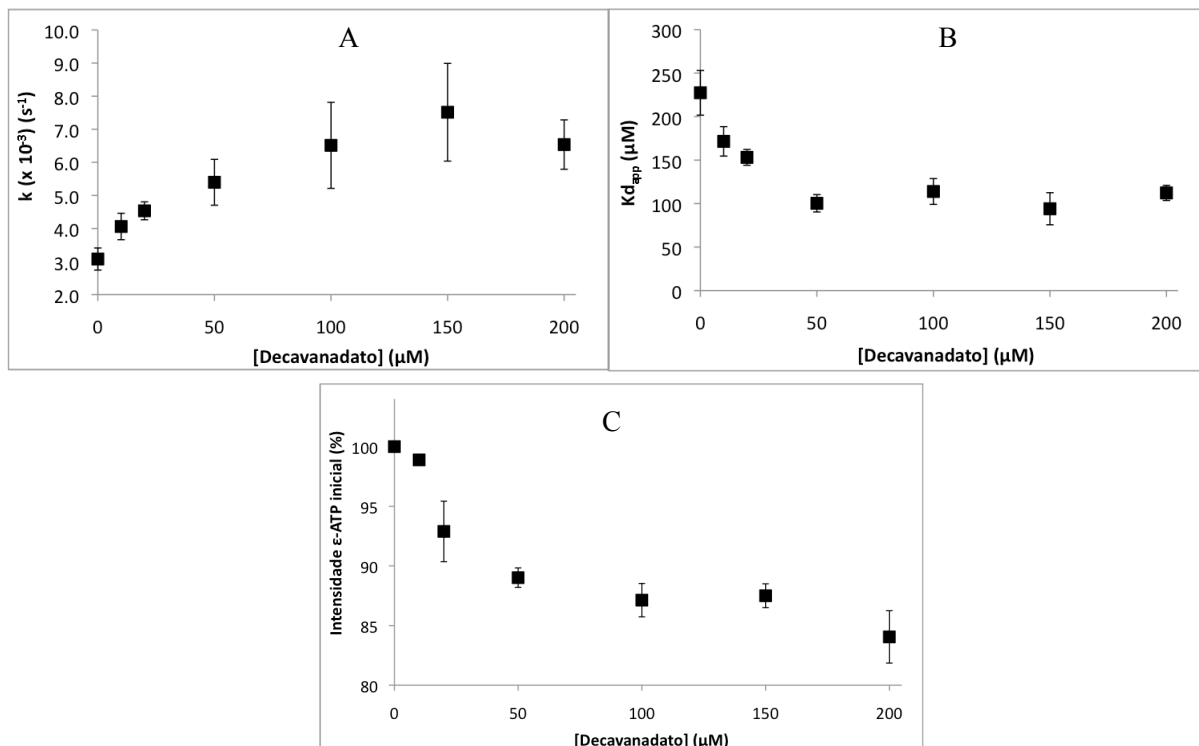


Figura V.9 – A troca entre ϵ -ATP e ATP no local de ligação de nucleótidos foi monitorizada através da diminuição da intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$). (A) Constante de velocidade da reacção de troca do ϵ -ATP (k), (B) constante de dissociação aparente ($K_{d,\text{app}}$) e (C) intensidade de fluorescência inicial do ϵ -ATP em função da concentração de decavanadato. A G-actina ($5 \mu\text{M}$) foi incubada com decavanadato, em 2 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7,5$), $0,2 \text{ mM}$ CaCl_2 , durante 20 minutos, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Por seu turno, obtiveram-se constantes de dissociação aparente ($K_{d,\text{app}}$) de $227,4 \pm 25,7 \mu\text{M}$ e $112,3 \pm 8,7 \mu\text{M}$ na ausência e na presença de $200 \mu\text{M}$ decavanadato (em vanadato total), respectivamente (Fig. V.9B). Os resultados apresentados na Figura V.9C mostram que a quantidade de ϵ -ATP incorporado na G-actina (i. e., a fluorescência relativa de ϵ -ATP para o tempo inicial) é diminuída em cerca de 15 % na presença de $200 \mu\text{M}$ decavanadato (em vanadato total), por comparação com a incorporação obtida na sua ausência.

Na presença de metavanadato, no intervalo de concentrações usado (0 - $200 \mu\text{M}$), não se observaram quaisquer alterações na troca do nucleótido (resultados não apresentados), pelo que é possível concluir que as alterações observadas se devem, efectivamente, à espécie decamérica de vanadato.

De igual modo, o estado funcional de G-actina nativa e tratada com VOSO_4 foi avaliada recorrendo à análise da troca de nucleótido no seu local de ligação. Na presença de $200 \mu\text{M}$ VOSO_4 a intensidade de fluorescência inicial da sonda ϵ -ATP diminuiu cerca de 10 % (Figura V.10C), o que significa, como anteriormente referido, uma menor capacidade do nucleótido para

se ligar à proteína. De facto, a constante de velocidade da troca, k , é aumentada em cerca de 1,5 vezes na presença de vanadilo: $3,00 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $4,47 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para a G-actina na ausência e na presença de $200 \mu\text{M VOSO}_4$, respectivamente (Fig. V.10A). Como se pode observar na Figura V.10B, a constante de dissociação aparente diminui de $K_{d,app} = 220,00 \pm 9,16$ para $150,14 \pm 6,26 \mu\text{M VOSO}_4$.

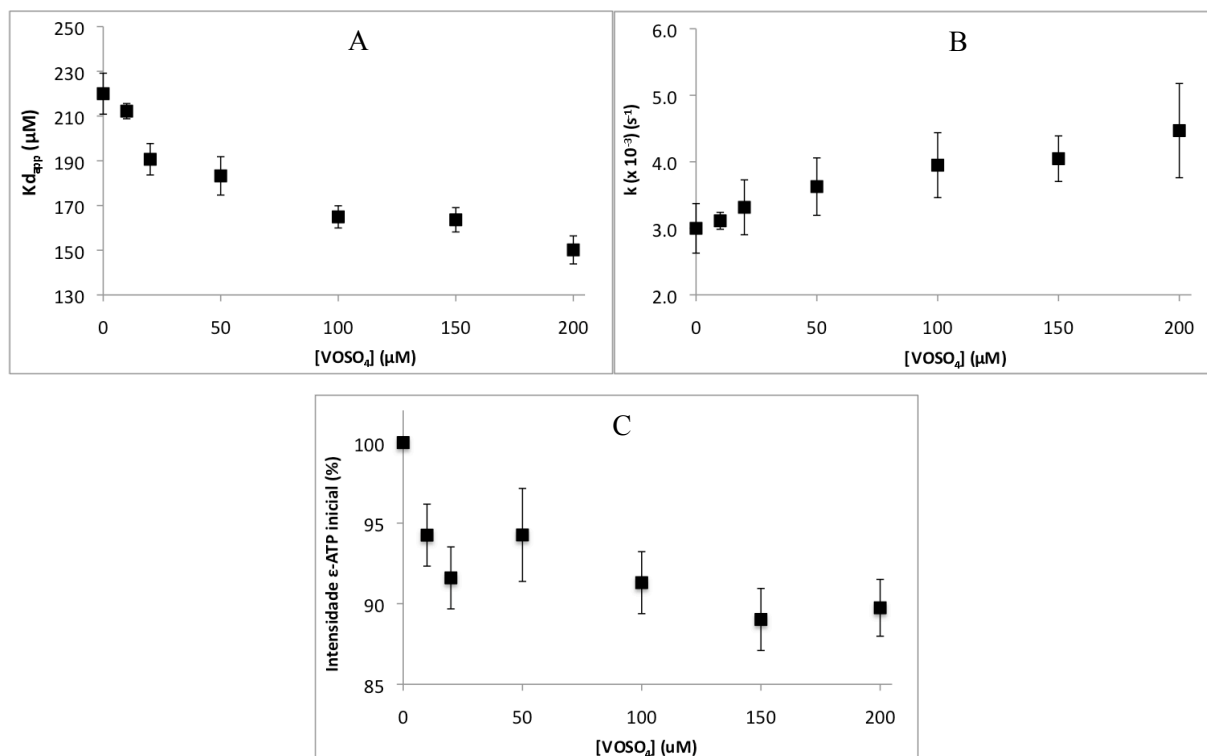


Figura V.10 – A troca entre ϵ -ATP e ATP no local de ligação de nucleótidos foi monitorizada através da diminuição da intensidade de fluorescência ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 410 \text{ nm}$). (A) Constante de velocidade da reacção de troca do ϵ -ATP (k), (B) constante de dissociação aparente ($K_{d,app}$) e (C) intensidade de fluorescência inicial do ϵ -ATP em função da concentração de VOSO_4 . A G-actina ($5 \mu\text{M}$) foi incubada com VOSO_4 , em 2 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7,5$), $0,2 \text{ mM CaCl}_2$, durante 20 minutos, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Uma vez que é geralmente aceite que uma troca mais rápida reflecte uma maior abertura no domínio proteico onde os nucleótidos se ligam (Crosbie *et al.*, 1994; DalleDonne *et al.*, 2002), os resultados obtidos permitem prever que a espécie decamérica de vanadato e o vanadilo promovem alterações conformacionais na G-actina ao nível do local de ligação de nucleótidos.

Uma vez que no capítulo anterior, e a partir da titulação de uma solução de VOSO_4 com G-actina por espectroscopia de RPE, foi proposto que o vanádio(IV) se encontrará coordenado ao oxigénio de três moléculas de água e a um nitrogénio equatorial de um grupo amina, pode agora sugerir-se que o ião vanadilo se encontre ligado à Lys-336 (Figs. V.11), uma vez que este resíduo de aminoácido se encontra próximo do anel do nucleótido na estrutura terciária da actina

(Stournaras *et al.*, 1988). Assim, a ligação de VO^{2+} à Lys-336 promoverá uma alteração conformacional que reduz em 10 % a capacidade de ligação do nucleótido, como acima referido. A presença de outro resíduo de lisina (Lys-18) localizado perto do local de alta afinidade para cátions divalentes, ao qual o vanadilo se poderia ligar, não será uma hipótese provável, uma vez que existe uma correlação directa entre o raio iónico de um determinado cátion e a sua capacidade para substituir o Ca^{2+} na G-actina. De facto, tanto o Ba^{2+} como o Sr^{2+} , cujos raios iónicos são bastante maiores que o do Ca^{2+} (149 e 132 pm, respectivamente) não são capazes de substituir este último (Strzelecka-Golaszewska & Drabikowski, 1968), ocorrendo, provavelmente, o mesmo com o vanadilo, possuindo a ligação V-O possui um comprimento de 167 pm (Ballhausen & Gray, 1961).

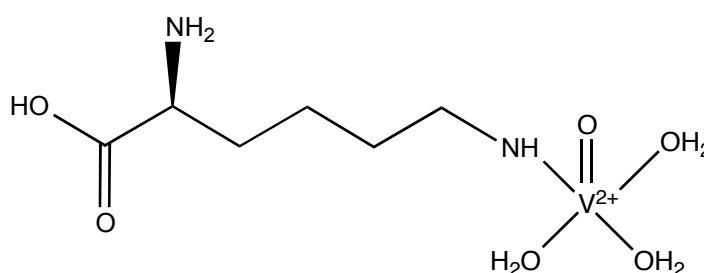


Figura V.11 – Coordenação do ião vanadilo a átomos de oxigénio de três moléculas de água e ao azoto equatorial do resíduo de Lys-336. Esta esfera de coordenação foi obtida com base no valor de $A_{//} = 195,6$, $G = 531,0798$ MHz, obtido a partir da simulação do espectro de RPE resultante da adição de 250 μM VOSO_4 a 50 μM G-actina (em 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM CaCl_2).

V.3.4 Modificação química dos resíduos de cisteína da actina na presença de vanadatos

Os grupos tiol (-SH) das cisteínas são dos resíduos de aminoácido mais rapidamente oxidados nas proteínas, pelo que a análise do seu estado redox representa um parâmetro essencial em estudos sobre alterações estruturais e modificações químicas sofridas por uma determinada proteína. Além disso, existem bastantes evidências acerca da reciprocidade existente entre perturbações estruturais no local de ligação de nucleótidos e a região C-terminal da actina (Frieden & Patane, 1985; Carlier *et al.*, 1986; Drummond *et al.*, 1992; Crosbie *et al.*, 1994). Além disso, verificou-se que o número de resíduos de cisteína expostos ao solvente depende da presença e da natureza do nucleótido ligado (Frieden & Patane, 1985).

Assim, e com base nos resultados acima descritos, referentes às alterações estruturais no local de ligação de nucleótidos da actina, torna-se fundamental avaliar de que forma o vanadato altera o estado redox dos diferentes resíduos de cisteína da actina, representados na Figura V.12.

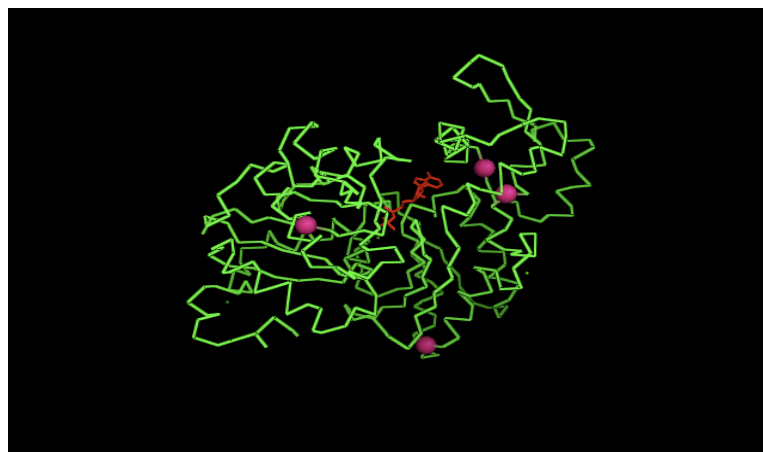


Figura V.12 – Estrutura tridimensional da G-actina de músculo esquelético de coelho (PDB: 1J6Z) (verde), com a molécula de ATP destacada a vermelho e os resíduos de cisteína a rosa. A Cys-374 não se encontra representada por se localizar na região C-terminal, não resolvida por cristalografia de raios-X. Imagem criada com o programa Pymol.

Observou-se que a exposição da actina a uma solução de metavanadato, no intervalo de concentrações utilizado (0-100 μM), mantém os 5 resíduos de cisteína na sua forma reduzida, tanto na G- como na F-actina (dados não apresentados). Por outro lado, na presença de decavanadato, uma das cisteínas localizada no interior hidrofóbico da G-actina é oxidada, com um valor de $\text{IC}_{50} = 7,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ decavanadato, ou seja, $0,78 \text{ mM} \pm 0,02 \mu\text{M}$ V_{10} , enquanto a cisteína que se encontra exposta ao solvente (Cys “rápida”) permanece na sua forma reduzida (Fig. V.13A).

Na forma ATP-G-actina todos os resíduos de cisteína mantêm o seu estado redox nativo (dados não apresentados), o que sugere, à semelhança de todos os dados anteriormente apresentados, que a interação entre a espécie decamérica de vanadato e a actina é inibida na presença deste nucleótido.

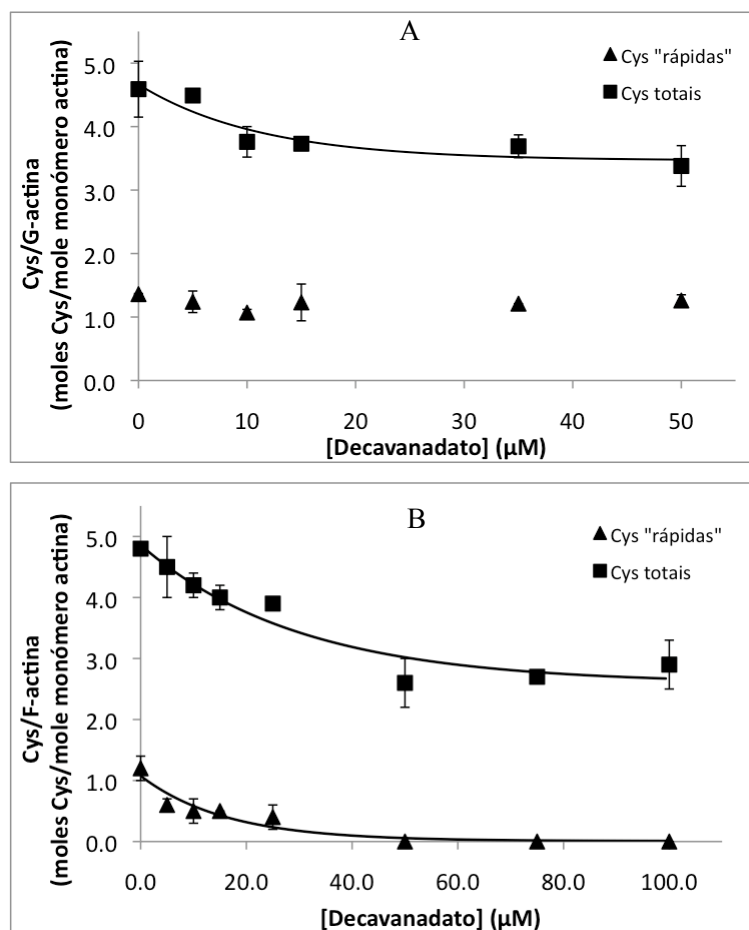


Figura V.13 – Oxidação dos resíduos de cisteína de G- e F-actina na presença de decavanadato. A titulação dos resíduos de cisteína foi realizada com 0,1 mM DTNB, em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm 0,2$ mM ATP. O aumento na absorvência a um comprimento de onda de 412 nm foi continuamente monitorizado durante 10 minutos (Cys “rápidas”); a determinação dos resíduos de cisteína totais foi efectuada adicionando 1 % SDS. (A) O tratamento de G-actina (2 μM) com decavanadato produz uma diminuição do número de resíduos de cisteína reduzidos totais (■) permanecendo a Cys-374 na sua forma reduzida (▲). (B) O tratamento de F-actina (2 μM) com decavanadato produz a completa oxidação da Cys-374 (▲) e uma diminuição do número de resíduos de cisteína totais reduzidos (■).

Drewes & Faulstich (1991) demonstraram que a remoção do ATP do local de ligação de nucleótidos da G-actina, conduz a transição estrutural lenta do monómero, expondo ao solvente um segundo grupo tiol, presente no resíduo Cys-10. Na ausência de ATP, mas na presença da espécie decamérica de vanadato, a G-actina apresenta apenas um resíduo de cisteína exposto ao solvente (Cys-374), de acordo com os resultados acima descritos, o que permite concluir que o V_{10} modifica, claramente, o local de ligação de nucleótidos da G-actina. Se tal não ocorresse, na ausência de ATP teria que se observar a existência de dois resíduos de cisteína expostos ao solvente, o que não se verifica. Assim, pode sugerir-se que o ATP e a espécie decamérica de vanadato bloqueiam a interacção recíproca de ambos com a G-actina, ocorrendo alterações conformacionais que favorecem a interacção do decavanadato e a proteína. Além disso, e uma

vez que o ATP apenas perde 15 % de capacidade de ligação ao local de ligação de nucleótidos, como acima descrito, a ligação da espécie decamérica não poderá ocorrer precisamente no mesmo local de ligação de nucleótidos.

Por seu turno, a titulação dos resíduos de cisteína da F-actina com decavanadato, monitorizada por espectroscopia de UV-vis, revela a completa oxidação da Cys-374, bem como de outra cisteína não-exposta ao solvente, com valores de IC_{50} para a reacção de oxidação dos resíduos de cisteína “rápidos” e totais de $11,2 \pm 0,1$ e $20,9 \pm 0,2$ μM decavanadato (i. e., 1,1 e 2,1 μM V_{10}), respectivamente (Fig. V.13B).

A oxidação do resíduo de cisteína na posição 374, na presença de decavanadato, pode explicar a inibição da estimulação do ATPase de subfragmento-1 de miosina pela F-actina, uma vez que este resíduo é essencial para a interacção entre a actina e a miosina (Milzani *et al.*, 2000). Além disso, a oxidação da Cys-374 pode encontrar-se envolvida na despolimerização da F-actina, anteriormente descrita. De facto, este resíduo é essencial na manutenção dos contactos intramonómeros (DalleDonne *et al.*, 2001).

V.3.4.1 Redução de vanadato a vanadilo na presença de actina: análise por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica

Encontra-se descrita a rápida redução de compostos de vanádio(V) na presença de grupos tiol biológicos, como glutathione, cisteína, 2-mercaptoetanol e ditioneitol, em condições fisiológicas (Crans *et al.*, 2004). No entanto, o vanadato pode formar complexos com tióis sem sofrer redução, apesar do mesmo tiol, noutras condições experimentais, poder induzir química redox (Crans *et al.*, 2010). Uma vez que se verificou a oxidação de um ou dois resíduos de cisteína da actina, nas formas monomérica e filamentosa, respectivamente, pretendeu analisar-se se daí resultava a concomitante redução da espécie decamérica de vanadato(V) a vanadilo(IV). Para tal, obtiveram-se os espectros de RPE de decavanadato na presença de G- e F-actina (razão metal:proteína = 25:1), tendo-se observado o aparecimento do sinal típico da espécie tetravalente de vanádio (Fig. V.14), indicativo da redução do decavanadato. Tal como a G- e a F-actina apresentam diferente número de resíduos de cisteína oxidados, a intensidade do sinal correspondente à linha $m_l = -1/2$ perpendicular, resultante da incubação da G-actina com decavanadato é metade do observado para a F-actina, o que está de acordo com o número de resíduos de cisteína oxidados, num e noutro caso. Além disso, os espectros obtidos demonstram a existência de diferenças significativas no ambiente local de coordenação do catião vanadilo.

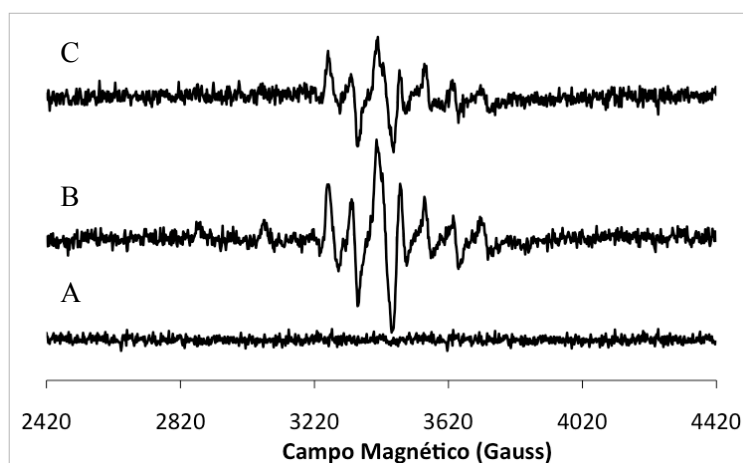


Figura V.14 – Espectros de RPE banda-X de 25 mM decavanadato (em vanadato total) em (A) 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \pm$ 0,2 mM ATP, na presença de (B) 100 μM G-actina ou (C) 100 μM F-actina. A adição de proteína elicou o aparecimento dos sinais típicos de oxovanádio(IV).

À semelhança do agora observado, a reacção do vanadato com os grupos tiol dos enzimas aldolase de fructose-1,6-bisfosfato (Crans *et al.*, 1992) e desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato (Benabe *et al.*, 1987) foi também descrita. Por outro lado, a desidrogenase de isocitrato tem a capacidade de reduzir o decavanadato (Rao & Ramasarma, 2000). Ramasarma & Rao (2006) reportaram uma redução parcial da molécula de V_{10} , encontrando-se apenas dois dos átomos de V da espécie decamérica reduzidos, permanecendo a sua estrutura inalterada. Apesar da existência de cinco resíduos de cisteína na actina não implicar, necessariamente, a química redox com o vanadato (Crans & Simone, 1991), com base no acima descrito, pode inferir-se que a espécie decamérica de vanadato reagirá com o grupo $-\text{SH}$ dos resíduos de cisteína, reduzindo-se.

V.3.5 Alterações estruturais da actina na presença de vanádio: análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

A G-actina apresenta um espectro de ^1H -RMN típico de uma proteína nativa, sem alterações da sua estrutura tridimensional, com a ressonância do grupo acetilo, existente na região N-terminal, a 2,05 ppm; uma segunda ressonância pode ser observada a campo alto deste sinal, sendo este atribuído aos grupos metilo de dois resíduos de metioninas, provavelmente os resíduos Met-44 e Met-47 (Figs. V.15, V.16 e V.17, espectros inferiores) (Heintz *et al.*, 1996).

A adição de 1 mM decavanadato (em vanadato total), na ausência de ATP, ou 250 μM VO_4 (Figs. V.15 e V.17, espectros intermédios) induz, de facto, alterações conformacionais na G-actina, sendo estas facilmente observáveis pelos deslocamento e diminuição de intensidade das ressonâncias localizadas nas regiões correspondentes aos grupos metilo e alifáticos (1-3 ppm),

bem como na região onde ressoam os grupos aromáticos e as ligações peptídicas (7-8 ppm).

Os resultados acima descritos indicam que (i) as ressonâncias dos grupos amida, bastante sensíveis ao ambiente de solvatação e à ligação de hidrogénio, manifestam uma alteração no seu ambiente químico (a exposição ao solvente de resíduos que se encontram, primeiramente, no interior hidrofóbico da proteína pode conduzir a uma rápida troca química e à diminuição da intensidade dos sinais), e (ii) um considerável decréscimo na intensidade na região alifática é, de igual modo, indicativo de alterações no ambiente químico.

A aquisição dos espectros da G-actina, na presença de decavanadato, adicionando concomitantemente ATP ao meio reaccional, resulta numa modificação estrutural da proteína bastante inferior à observada na ausência deste nucleótido, uma vez que são pequenas as alterações nos espectros de ^1H -RMN de actina (Figs. V.15 e V.16, espectros superiores). Estes resultados estão de acordo com todos aqueles obtidos anteriormente, permitindo confirmar de forma inequívoca que a presença de ATP impede a interacção entre a espécie V_{10} e a actina.

Na presença de $500\ \mu\text{M}$ VOSO_4 verifica-se um alargamento de algumas ressonâncias para além do limite de detecção (Fig. V.17, espectro superior). Uma vez que a presença de metavanadato não conduz a alterações significativas nos espectros de ^1H -RMN da actina (dados não apresentados), pode concluir-se que os efeitos observados se devem, exclusivamente, à espécie decamérica de vanadato. Assim, os resultados acima descritos permitem concluir que o decavanadato e o vanadilo promovem, de facto, alterações estruturais na actina.

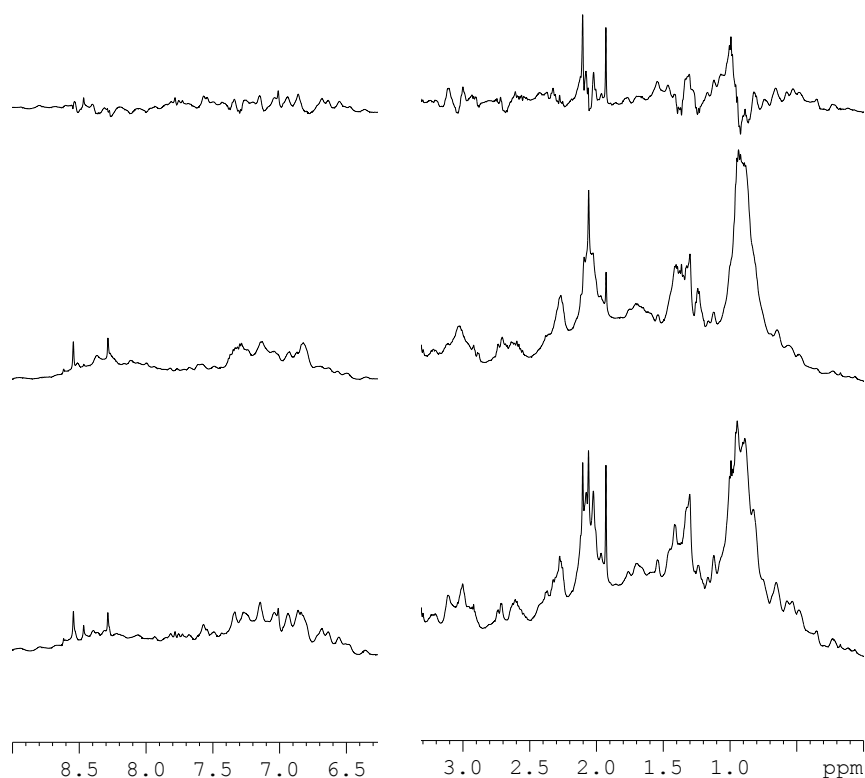


Figura V.15 – Espectros de ¹H-RMN de 63 μM G-actina, (espectro inferior), na presença de 1 mM decavanadato (em vanadato total) (espectro intermédio), em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl₂. O espectro intermédio resulta da diferença entre ambos. Os espectros foram adquiridos a 298 K, usando um espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado com uma crio-sonda TCI-Z e uma unidade de controlo da temperatura. Acumularam-se 256 transientes por espectro, com um tempo de espera de 1,5 segundos entre eles, de acordo com o descrito na secção V.2.5.

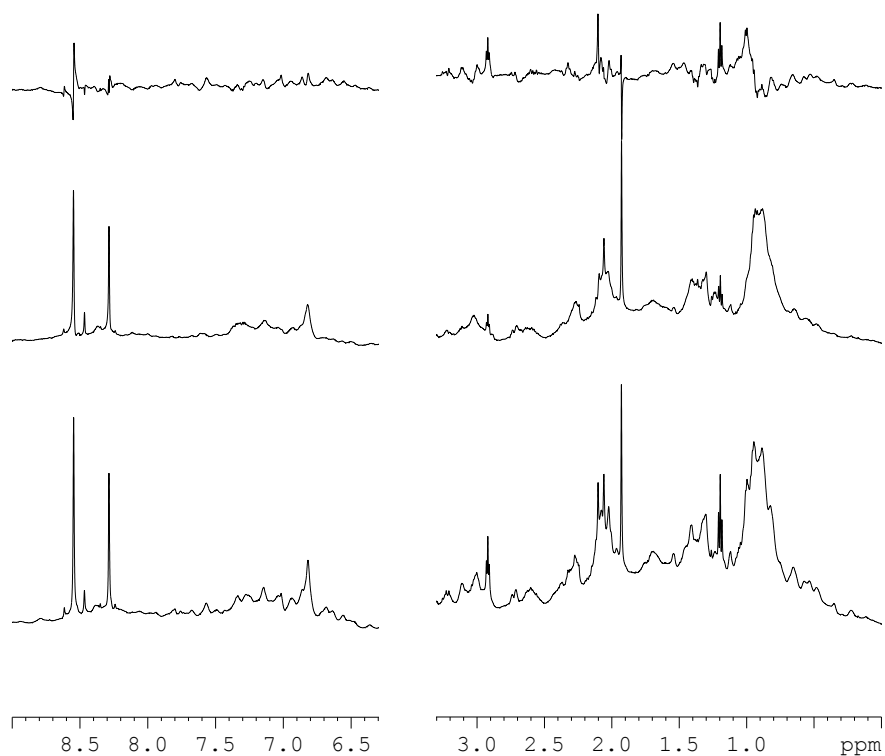


Figura V.16 – Espectros de ¹H-RMN de 63 μM G-actina, (espectro inferior), na presença de 1 mM decavanadato (em vanadato total) (espectro intermédio), em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM ATP. O espectro superior resulta da diferença entre ambos. Os espectros foram adquiridos a 298 K, usando um espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado com uma crio-sonda TCI-Z e uma unidade de controlo da temperatura. Acumularam-se 256 transientes por espectro, com um tempo de espera de 1,5 segundos entre eles, de acordo com o descrito na secção V.2.5.

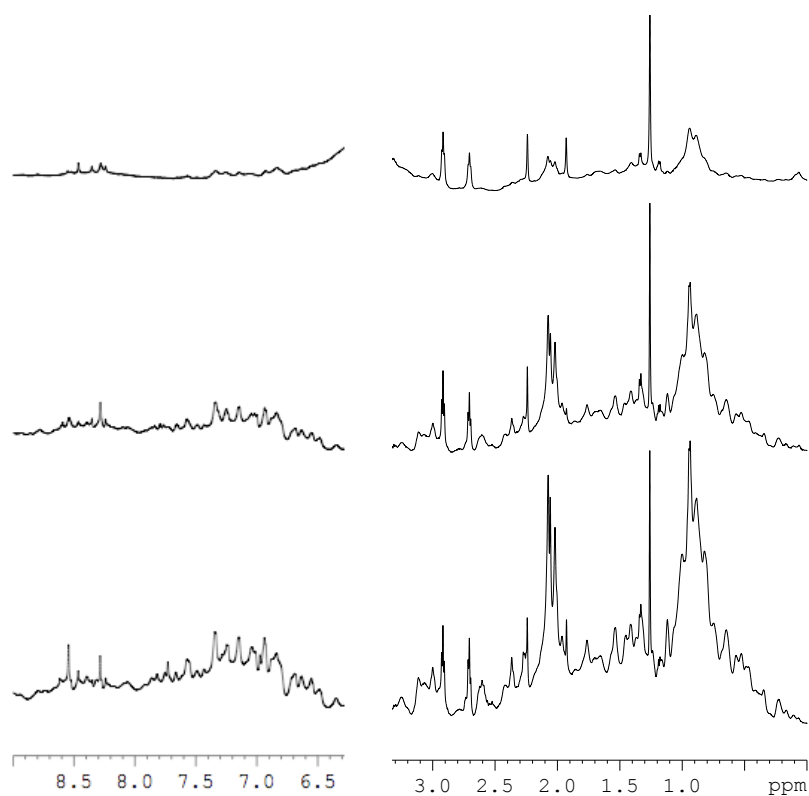


Figura V.17 – Espectros de ¹H-RMN de 63 μM G-actina, (espectro inferior), na presença de 250 μM VOSO₄ (espectro intermédio), ou 500 μM VOSO₄ (espectro superior), em 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM CaCl₂. Os espectros foram adquiridos a 298 K, usando um espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado com uma crio-sonda TCI-Z e uma unidade de control da temperatura. Acumularam-se 256 transientes por espectro, com um tempo de espera de 1,5 segundos entre eles, de acordo com o descrito na secção V.2.5.

V.4 Conclusões

O conjunto de dados apresentados no Capítulo IV permitiram concluir que a função da actina é fortemente inibida na presença de vanadatos, com especial destaque para a espécie decamérica de vanadato e outras espécies oligoméricas, nomeadamente os tetravanadatos. No entanto, torna-se essencial determinar quais as alterações estruturais subjacentes (i) à diminuição na capacidade da F-actina estimular a actividade do ATPase de subfragmento-1 de miosina, processo fisiológico essencial à contracção muscular, e (ii) à alteração do equilíbrio existente entre actina nas formas monomérica e filamentosa.

No presente capítulo, determinou-se, recorrendo à espectroscopia de fluorescência, que o decavanadato e o vanadilo promovem a inactivação da G-actina. Por actina inactiva entende-se um estado intermédio do monómero no processo de desnaturação, no qual a estrutura secundária se mantém inalterada, ocorrendo as modificações ao nível da estrutura terciária. De facto, a deslocação do máximo de intensidade do espectro de fluorescência intrínseca da actina para comprimentos de onda superiores indica, de forma inequívoca, a exposição ao solvente de resíduos de triptofano até então orientados para o interior hidrofóbico da proteína. Além disso, verificou-se que na presença da espécie decamérica de vanadato e do ião vanadilo ocorre supressão estática da fluorescência intrínseca da G- e F-actina, o que indica a existência de um local de alta afinidade para estas espécies de vanádio. Uma vez que se encontra descrito que a actina inactiva perde a sua capacidade de polimerizar, os dados anteriormente obtidos sobre a inibição da formação de F-actina na presença de decavanadato e vanadilo podem ser explicados com base nesta evidência experimental agora obtida.

Modificações estruturais das proteínas encontram-se intimamente ligadas a alterações na sua superfície hidrofóbica, o que se comprova pelo diferente modo de ligação da sonda fluorescente ANSA à actina. No caso do decavanadato, observa-se um aumento da superfície hidrofóbica da G-e F-actina, característico da exposição ao solvente de regiões hidrofóbicas, enquanto o ião vanadilo promove uma diminuição da ligação de ANSA, indicativo de (i) um estado inactivo mais empacotado e (ii) da oxidação de resíduos de metionina e cisteína.

A presença quer da espécie decamérica de vanadato, quer do ião vanadilo, promove alterações estruturais significativas no local de ligação de nucleótidos, encontrando-se este, de acordo com os parâmetros determinados experimentalmente, mais aberto. No entanto, o facto de o ATP perder apenas cerca de 15 % da sua capacidade de ligação a este local sugere que esta abertura não inibe a ligação do ATP, a qual poderá, no entanto, ocorrer numa conformação diferente do que acontece na actina nativa.

Uma vez que existe uma reciprocidade entre alterações estruturais ocorridas em diferentes domínios da actina, nomeadamente no que ao local de ligação de nucleótidos e à região C-terminal, diz respeito, verificou-se que o decavanadato promove, também, a oxidação de um resíduo de cisteína do interior da G-actina, enquanto que para a F-actina se observou também a oxidação da Cys-374, único resíduo de cisteína exposto ao solvente e considerado essencial na ligação à miosina e no estabelecimento dos contactos intermonómeros, o que poderá explicar a diminuição na capacidade de estimular a actividade ATPásica do subfragmento-1 de miosina, bem como a despolimerização observadas. A oxidação destas cisteínas resulta na concomitante redução da espécie decamérica de vanadato, avaliada por espectroscopia de RPE.

Também por ^1H -RMN foi possível observar alterações na estrutura de após interacção com decavanadato e vanadilo.

Os resultados agora obtidos, conjuntamente com os dados resultantes da espectroscopia de RPE descritos no capítulo III, permitiram, ainda, apontar a Lys-336 como possível local de ligação do ião vanadilo à G-actina.

Salienta-se, ainda, que a presença de ATP no meio reaccional, e à semelhança de todos os dados anteriormente obtidos, bloqueia a interacção da espécie decamérica de vanadato com a actina, não se observando qualquer alteração nos parâmetros analisados por comparação com a actina nativa.

V.5 Referências bibliográficas

- Ballhausen, C. J. & H. B. Gray (1961) “*The Electronic Structure of the Vanadyl Ion*” **Inorg. Chem.** 1:111-122;
- Barden, J. A., R. Cooke, P. E. Wright, C. G. dos Remédios (1980) “*Proton nuclear magnetic resonance and electron paramagnetic resonance studies on skeletal muscle actin indicate that the metal and nucleotide binding sites are separate*” **Biochemistry** 19:5912-5916;
- Barden, J. A., C.-S. Wu, C. G. dos Remédios (1983) **Biochim. Biophys. Acta** 748:230-235;
- Barden, J. A. & C. G. dos Remédios (1984) “*Conformational changes in actin resulting from Ca²⁺/Mg²⁺ exchange as detected by proton NMR spectroscopy*” **Europ. J. Biochem.** 146:5-8;
- Barden, J. A. & B. E. Kemp (1987) “*NMR of a synthetic peptide spanning the triphosphate binding site of adenosine 5'-triphosphate in actin*” **Biochemistry** 26:1471-1478;
- Barden, J. A., L. Phillips, B. A. Cornell, C. G. dos Remédios (1989) “*Fluorine-19 NMR studies of the interaction of selectively labeled actin and myosin*” **Biochemistry** 28:5895-5901;
- Benabe, J. E., L. A. Echevoyen, B. Pastrana, M. Martínez-Maldonado (1987) “*Mechanism of Inhibition of Glycolysis by Vanadate*” **J. Biol. Chem.** 262:9555-9560;
- Bougie, I. & M. Bisailon (2006) “*Inhibition of a metal-dependent viral RNA triphosphatase by decavanadate*” **Biochem. J.** 398:557-567;
- Burstein, E. A. (1976) “*Luminescence of protein chromophores. Model studies*” **Adv. Sci. & Technol.**, series Biophysics, vol. 6, VINITI, Moscow;
- Carlier, M.-F., D. Pantaloni, E.D. Korn (1986) “*Fluorescence measurements of the binding of cations to high-affinity and low-affinity sites on ATP-G-Actin*” **J. Biol. Chem.** 261:10778–10784;
- C.C. Chao, Y.S. Ma, E.R. Stadtman (1997) “*Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems*” **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:2969–2974;
- Cozzzone, P. J., D. J. Nelson, O. Jardetzky (1974) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 60:341-347;
- Crans, D. C. & C. M. Simone (1991) “*Nonreductive interaction of vanadate with an enzyme containing a thiol group in the active site: glycerol-3-phosphate dehydrogenase*” **Biochemistry** 30:6734-6741;
- Crans, D. C., K. Sudhakar, T. J. Zamborelli (1992) “*Interaction of rabbit muscle aldolase at high ionic strengths with vanadate and other oxoanions*” **Biochemistry** 31:6812-6821;
- Crans, D. C., J. J. Smee, E. Gaidamauskas, L. Yang (2004) “*The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds*”, **Chem. Rev.** 104:849-902;

- Crans, D. C., B. Zhang, E. Gaidamauskas, A. D. Keramidas, G. R. Willsky, C. R. Roberts (2010) “Is vanadate reduced by thiols under biological conditions? Changing the redox potential of $V(V)/V(IV)$ by complexation in aqueous solution” **Inorg. Chem.** 49:4245-4256;
- Crosbie, R.H., C. Miller, P. Cheung, T. Goodnight, A. Muhlrads, E. Reisler (1994) “Structural connectivity in actin: effect of C-terminal modifications on the properties of actin” **Biophys. J.** 67:1957–1964;
- DalleDonne, I., R. Rossi, D. Giustarini, N. Gagliano, L. Lusini, A. Milzani, P. Di Simplicio, R. Colombo (2001) “Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment” **Free Rad. Biol. Med.** 31:1075–1083;
- DalleDonne, I., R. Rossi, D. Giustarini, N. Gagliano, P. DiSimplicio, R. Colombo, A. Milzani (2002) “Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin” **Free Rad. Biol. Med.** 32:927–937;
- Doyle, T. C., J. E. Hansen, E. Reisler (2001) “Tryptophan Fluorescence of Yeast Actin Resolved via Conserved Mutations” **Biophys. J.** 80:427-434;
- Drewes, G. & H. Faulstich (1991) “A reversible conformational transition in muscle actin is caused by nucleotide exchange and uncovers cysteine in position 10” **J. Biol. Chem.** 266:5508-5513;
- Drummond, D. R., E.S. Hennessey, J.C. Sparrow (1992) “The binding of mutant actins to profilin, ATP and DNase P” **Eur. J. Biochem.** 209:171–179;
- Du, H. Y, J. F. Xiang, Y. Z. Zhang, Y. L.Tang, G. Z. Xu (2008) “Binding of VIV to human transferrin: potential relevance to anticancer activity of vanadocene dichloride” **J. Inorg. Biochem.** 102:146-149;
- Frieden, C. & K. Patane (1985) “Differences in G-actin containing bound ATP or ADP: The Mg^{2+} -induced conformational change requires ATP” **Biochemistry** 24:4192–4196;
- Gutiérrez-Martin, Y., F. J. Martin-Romero, F. A. Inesta-Vaquera, C. Gutiérrez-Merino, F. Henaó (2004) “Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by chronic and acute exposure to peroxynitrite” **Eur. J. Biochem.** 271:2647-2657;
- Heintz, D., H. Kany, H. R. Kalbitzer (1996) “Mobility of the N-terminal segment of rabbit skeletal muscle F-actin detected by 1H and ^{19}F nuclear magnetic resonance spectroscopy” **Biochemistry** 33:12686-12693;
- Henry, G. D., M. A. Winstanley, D. C. Dalgarno, G. M. Scott, B. A. Levine, I. P. Trayer (1985) “Characterization of the actin-binding site on the alkali light chain of myosin” **Biochim. Biophys. Acta** 830:233-243;
- Highsmith, S., K. Akasaka, M. Konrad, R. Goody, K. Holmes, N. Wade-Jardetzky, O. Jardetzky (1979) “Internal motions in myosin” **Biochemistry** 18:4238-4244;

- Highsmith, S. & O. Jardetsky (1980) “G-actin binding quenches internal motions in myosin subfragment-1” **FEBS Lett.** 121:55-60;
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, K. C. Holmes (1990) “Atomic structure of the actin: DNase I complex” **Nature** 347:37-44;
- Kany, H., J. Wolf, H. R. Kalbitzer (2002) “Myosin II from rabbit skeletal muscle and Dictyostelium discoideum and its interaction with F-actin studied by ¹H NMR spectroscopy” **FEBS Lett.** 521:121-126;
- Kouyama, T., K. Kinoshita Jr., A. Ikegami (1989) “Correlation between internal motion and emission kinetics of tryptophan residues in proteins” **Eur. J. Biochem.** 182:517-521;
- Kuznetsova, I. M., T. A. Yakusheva, K. K. Turoverov (1999) “Contribution of separate tryptophan residues to intrinsic fluorescence of actin. Analysis of 3D structure” **FEBS Lett.** 452:205-210;
- Lu, L., S. Wang, M. Zhu, Z. Liu, M. Guo, S. Xing, X. Fu (2010) “Inhibition protein tyrosine phosphatases by an oxovanadium glutamate complex, Na₂[VO(Glu)₂(CH₃OH)] (Glu = glutamate)” **Biomaterials** 23:1139-1147;
- Lakowicz, J. R. (2006) “Principles of Fluorescence Spectroscopy”, 3rd edition, Plenum Press, New York
- Lehrer, S. S. & G. Kerwar (1972) “Intrinsic fluorescence of actin” **Biochemistry** 11:1211-1217;
- Milzani, A., R. Rossi, P. Di Simplicio, D. Giustarini, R. Colombo, I. Dalle-Donne (2000) “The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin” **Protein Sci.** 9:1774-1782;
- Ramasarma, T. & A. V. S. Rao (2006) “Decavanadate interacts with microsomal NADH oxidation system and enhances cytochrome C reduction” **Mol. Cell. Biochem.** 281:139-144;
- Rao, A. V. S. & T. Ramasarma (2000) “NADH-dependent decavanadate reductase, an alternative activity of NADP-specific isocitrate dehydrogenase protein” **Biochem. Biophys. Acta** 1474:321-330;
- Robyt, J. F. & B. J. White (1990) “Biochemical Techniques – Theory and Practice”, Waveland Press Inc.;
- Selden, L. A., H. J. Kinoshian, J. E. Estes, L. C. Gershman (1999) “Impact of Profilin on Actin-Bound Nucleotide Exchange and Actin Polymerization Dynamics” **Biochemistry** 38:2769–2778;
- Slósarek, G. D. Heintz, H. R. Kalbitzer (1994) “Mobile segments in rabbit skeletal muscle F-actin detected by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy” **FEBS Lett.** 351:405-410;
- Stourmaras, C., I. Merkler, H. Faulstich (1988) “Thiol group reactivity and polymerization of actin in the presence of ATP analogs” **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 155:962–970;
- Strzelecka-Golaszewska, H. & W. Drabikowski (1968) “Studies on the exchange of G-actin-bound calcium with bivalent cations” **Biochim. Biophys. Acta** 162:581-595;
- Thomas, D. D., D. Kast, V. L. Korman (2009) “Site-directed spectroscopic probes of actomyosin structural dynamics” **Annu. Rev. Biophys.** 38:47-69;

- Tiago, T., M. Aureliano, C. Gutiérrez-Merino (2002) “*Quenching of myosin intrinsic fluorescence unravels the existence of a high affinity binding site for decavanadate*” **J. Fluorescence** 12:87-90;
- Trayer, I. P., H. R. Trayer, B. A. Levine (1987) “*Evidence that the N-terminal region of the A1 light chain of myosin interacts directly with the C-terminal region of actin*” **Eur. J. Biochem.** 164:259-266;
- Turoverov, K. K., A. G. Biktashev, S. Y. Khaitlina, I. M. Kuznetsova (1999) “*The structure and dynamics of partially folded actin*” **Biochemistry** 38:6261-6269;
- Turoverov, K. K., V. V. Verkhusha, M. M. Shavlovsky, A. G. Biktashev, O. I. Povarova. I. M. Kuznetsova (2002) “*Kinetics of Actin Unfolding Induced by Guanidine Hydrochloride*” **Biochemistry** 41:1014-1019;
- Turoverov, K. K. & I. M. Kuznetsova (2003) “*Intrinsic Fluorescence of Actin*” **J. Fluoresc.** 13:41-57;
- Valeur, B. (2002) “*Molecular Fluorescence – Principles and Applications*”, 1st edition; Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany;
- Vogt, W. (1995) “*Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal*” **Free Rad. Biol. Med.** 18:93-106;
- Zhang, T. & K. Wang (1999) **Sci. China** 42:543-551.

CAPÍTULO VI.

CONCLUSÃO GERAL

VI.1 Vanádio(V)

O comportamento químico do vanádio(V) em solução aquosa é complexo, mesmo na ausência de ligandos. Por espectroscopia de ^{51}V -RMN verificou-se que uma solução de metavanadato contém as espécies monomérica, dimérica, tetramérica e pentamérica, enquanto que a solução de decavanadato é composta pela espécie decamérica de vanadato, encontrando-se contaminada pelo vanadato monomérico. O aumento da concentração em vanadato total propicia o aparecimento em solução das espécies oligoméricas de vanadato. Verificou-se, ainda, que as espécies oligoméricas de vanadato interactivam com a G-actina e a F-actina, uma vez que as ressonâncias dos seus sinais de RMN alargam substancialmente aquando da adição destas proteínas ao meio reaccional. A interacção G-actina- V_{10} é menos intensa na presença de ATP.

A estabilidade da espécie decamérica de vanadato foi avaliada por espectroscopia de UV-vis, tendo-se concluído que o tempo de meia-vida para a reacção de decomposição é de cerca de 5 horas (o que permite efectuar os estudos sobre a interacção entre o V_{10} e a actina), sendo a sua energia de activação de 63 kJ mol^{-1} . A estabilidade da espécie decamérica de vanadato é aumentada na presença de G-actina e F-actina. No entanto, a presença de ATP mitiga este efeito para a actina monomérica.

Estabelecidas as condições que favorecem a interacção entre a actina e a espécie decamérica de vanadato, avaliou-se qual o efeito que a presença de V_{10} provocava na capacidade da F-actina estimular a actividade fisiológica de subfragmento-1 de miosina, tendo-se verificado 70 % de inibição na presença de $50 \mu\text{M}$. No mesmo intervalo de concentrações, a solução de metavanadato promove apenas 15 % de inibição.

Uma vez que as formas monomérica e filamentosa de actina se encontram em equilíbrio no interior das células, verificou-se que a presença de decavanadato inibia completamente a polimerização de G-actina, sendo o seu efeito menos pronunciado na despolimerização da F-actina (35 %). À semelhança dos resultados anteriores, a presença de ATP no meio reaccional previne inibição da polimerização da actina pelo decavanadato. A solução de metavanadato só produzia efeito na inibição da polimerização quando adicionada em concentrações superiores a 2 mM, onde se sabe que começam a coexistir em solução as espécies oligoméricas de vanadato. Na presença de metavanadato, a F-actina é despolimerizada em cerca de 20 %.

Determinado qual o efeito que a espécie decamérica de vanadato promovia na função fisiológica da actina, avaliou-se qual o seu efeito na estrutura desta proteína. A presença de decavanadato diminui a intensidade de fluorescência intrínseca de G-actina em cerca 30 %, para concentrações compreendidas entre 500 e $1300 \mu\text{M}$ decavanadato. Concentrações inferiores promovem o aumento da fluorescência intrínseca da actina monomérica (80 %). No que à

solução de metavanadato diz respeito, apenas concentrações superiores a 700 μM promovem a diminuição da fluorescência intrínseca de G-actina.

Na presença de V_{10} , o local de ligação de nucleótidos de G-actina sofre modificações estruturais, encontrando-se mais aberto, sendo também a espécie decamérica de vanadato responsável pelo aumento da superfície hidrofóbica da actina globular.

Uma vez que existe uma estreita relação entre o local de ligação de nucleótidos e a região C-terminal da actina, onde se localiza o resíduo de cisteína 374 (essencial para a polimerização e para a ligação à miosina), avaliou-se o estado redox dos resíduos de cisteína na presença de decavanadato, tendo-se verificado que na G-actina apenas um dos resíduos localizados no interior hidrofóbico da proteína era oxidado, enquanto que na F-actina se observava, adicionalmente, a oxidação da Cys-374. A concomitante redução da espécie decamérica de vanadato foi avaliada por RPE, sendo esta prevenida pela presença de ATP.

Todas estas alterações estruturais foram, também, observadas por $^1\text{H-RMN}$.

VI.2 Vanádio(IV)

Apresentando, também, uma química complexa em solução aquosa, o facto de apenas algumas espécies de vanádio(IV), isoladas ou complexadas, apresentarem sinais de RPE facilita a interpretação dos dados observados. Além disso, se todas as precauções forem tomadas no que diz respeito aos convenientes preparação e manuseamento das soluções utilizadas, sabe-se que a sua oxidação a vanádio(V) se encontra protegida.

Verificou-se que o oxovanádio(IV) interacciona com a G-actina e F-actina, tendo sido possível determinar os valores da constante de dissociação entre esta espécie de vanádio e a actina globular ($K_D = 7,48 \pm 1,11 \mu\text{M}$) e filamentosa ($43,05 \pm 5,34 \mu\text{M}$). Na presença de ATP, a intensidade da interacção G-actina-oxovanádio(IV) diminui substancialmente. Com base no espectro de RPE simulado de $\text{VO}_4\text{-G-actina}$, prediz-se que o ião vanadilo se ligue ao resíduo de Lys-316.

Apesar dos efeitos pouco pronunciados de VO_4 na capacidade de F-actina estimular a actividade fisiológica de subfragmento-1 de miosina (20 %) e na despolimerização dos filamentos de actina, esta espécie de vanádio (500 μM) inibe completamente a polimerização de G-actina.

A fluorescência intrínseca de G-actina é totalmente suprimida na presença de 200 μM VO_4 , enquanto o efeito na F-actina é menos pronunciado (75 % supressão para 500 μM VO_4). Contrariamente ao observado na presença de decavanadato, a superfície hidrofóbica de G-actina diminui na presença de oxovanádio(IV). No entanto, observa-se também a abertura do

local de ligação de nucleótidos. Estas alterações estruturais, avaliadas também por $^1\text{H-RMN}$, poderão contribuir decisivamente para a inibição da polimerização de G-actina reportada.

VI.3 Vanádio(V) *versus* Vanádio(IV)

As espécies de vanádio(V) e V(IV) apresentam bastantes características similares, no que à sua interacção com a actina diz respeito, nomeadamente na inibição da polimerização de G-actina, na supressão de fluorescência intrínseca e na modificação estrutural do local de ligação de nucleótidos.

No entanto, e com excepção da maior capacidade de inibir a actividade de ATPase de subfragmento-1 de miosina que a espécie decamérica apresenta relativamente ao oxovanádio(IV), este último promove efeitos mais pronunciados em todos os outros parâmetros analisados, pelo que os seus efeitos na função e na estrutura da actina serão os primeiros a observar-se.

Uma vez que o efeito de VOSO_4 na F-actina se manifesta, essencialmente, na supressão da sua fluorescência intrínseca, o mecanismo de acção do oxovanádio(IV) na interacção com a actina terá que ser, maioritariamente, através da G-actina, alterando o equilíbrio entre a polimerização e a despolimerização e modificando estruturalmente o monómero de actina.

Por seu turno, o pronunciado efeito que a espécie decamérica de vanadato promove na actividade ATPásica de subfragmento-1 de miosina estimulada por F-actina pode ser explicado pelas modificações estruturais que a F-actina sofre na presença de V_{10} , nomeadamente a oxidação da Cys-374. As alterações estruturais sofridas pelo monómero de actina, nomeadamente a inibição da polimerização e a supressão de fluorescência intrínseca, ocorrendo para concentrações de V_{10} superiores, ocorrerão subsequentemente.

ANEXOS

A.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de RMN é uma manifestação do momento angular de spin nuclear, sendo este caracterizado pelo número quântico de spin nuclear, I . Núcleos com número de massa ímpar possuem número quântico de spin semi-inteiro, núcleos com números de massa e de carga par possuem número quântico de spin igual a zero e núcleos com número de massa par e número de carga ímpar apresentam números quânticos de spin inteiros diferentes de zero. Uma vez que a espectroscopia de RMN se baseia na existência de spin nuclear, núcleos com $I = 0$ não apresentam sinal de RMN.

Na presença de um campo magnético externo, os estados de spin dos núcleos possuem energias dadas por

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{H}_0 \quad (\text{A.1})$$

onde $\boldsymbol{\mu}$ é o momento magnético nuclear e H_0 corresponde ao vector campo magnético. Da equação III.7 resulta que a energia mínima é obtida quando a projecção de $\boldsymbol{\mu}$ em H_0 é maximizada. Como $\boldsymbol{\mu}$ não pode ser colinear com H_0 , os estados de spin m tornam-se quantizados, com as suas energias proporcionais à sua projecção no eixo de H_0 . Considerando o campo magnético externo alinhado com o eixo z , a equação A.1 pode ser escrita como

$$\Delta E_m = -(\hbar\gamma B_0)/2\pi \quad (\text{A.2})$$

na qual h é a constante de Planck, γ é a razão magnetogírica (característica de cada núcleo) e B_0 corresponde à magnitude do campo magnético estático.

Um espectro de RMN apresenta bandas de ressonância de forma lorentziana, com as seguintes características: (1) desvio químico, δ ; (2) amplitude: altura do sinal (em unidades arbitrárias); (3) intensidade: área do pico; (4) largura a meia altura, $\Delta\nu_{1/2}$: medida da largura do sinal a metade da amplitude máxima (em Hz); (5) constante de associação de spin escalar, J : separação entre os sinais de um multiplete (em Hz); (6) tempos de relaxação spin-rede, T_1 , e de relaxação spin-spin, T_2 .

O desvio químico (δ) fornece informação valiosa acerca do ambiente local de um determinado núcleo, reflectindo alterações subtis nos núcleos observados devido a interacções com outros spins nucleares ou electrónicos na sua vizinhança. Os valores de desvio químico reflectem, de forma bastante consistente, o ambiente electrónico do núcleo em ressonância. Podem ser expressos em termos da frequência (em Hz) a que um sinal aparece em relação a um

signal de referência. No entanto, uma vez que o desvio químico é dependente da intensidade do campo magnético aplicado, torna-se conveniente expressá-lo em função do campo magnético necessário para se obter a condição de ressonância, pelo que é normalmente referido como uma unidade adimensional, expresso em parte por milhão (ppm).

O valor da largura a meia altura de um sinal de RMN está directamente relacionado com o tempo de relaxação spin-spin (tempo que demora a desaparecer a magnetização macroscópica no plano xy - relaxação transversal), T_2 , do núcleo em causa:

$$\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_2 \quad (\text{A.3})$$

Quando um núcleo quadrupolar ($I > 1/2$) é colocado sob a acção de um campo magnético, o valor de T_2 depende inversamente do tempo de correlação rotacional, τ_c , do sistema, entre outros. Este, por sua vez, varia com as dimensões da molécula e a viscosidade do meio onde ela se move, pelo que aumenta na presença de macromoléculas, soluções viscosas e temperaturas baixas. Por seu turno, o tempo de relaxação spin-rede, T_1 , corresponde ao tempo de recuperação da magnetização no eixo z (relaxação longitudinal).

A.2 Ressonância Paramagnética Electrónica

Um espectro de RPE consiste na representação da absorção de energia da radiação de micro-ondas em função do campo magnético aplicado. Devido aos processos electrónicos envolvidos na detecção do sinal, o espectro de RPE aparece, geralmente, com a forma da derivada de primeira ordem, sendo o valor do campo de ressonância determinado pelo ponto de encontro da curva derivada com a linha de base (derivada nula no ponto de máxima absorção). Uma vez que existe um conjunto de interacções entre o momento de spin do electrão desemparelhado e a sua vizinhança, para além da interacção com o campo magnético aplicado, um espectro de RPE reflecte (i) a interacção do momento de spin do electrão com o momento angular orbital (acoplamento spin-órbita), (ii) interacção de spin electrónico com o spin nuclear (interacção nuclear hiperfina e super-hiperfina) e (iii) interacção spin-spin electrónico.

Sendo o electrão uma partícula elementar, possui um número quântico de spin, S , com um valor de $1/2$. A sua projecção segundo o eixo z é, de igual modo, caracterizada pelo número quântico, m_S , cujos valores podem ser $\pm 1/2$. Ao momento angular de spin está, por seu turno, associado um campo magnético, o qual interactua com o momento magnético de spin do

electrão, pelo que a aplicação de um campo magnético externo, H_0 , faz com que o campo que efectivamente actua sobre o electrão seja diferente de H_0 (Eq. B.1).

$$h\nu = g\beta H_0 \quad (\text{A.4})$$

onde h é a constante de Planck, β é o magnetão de Bohr e H_0 é a magnitude do campo aplicado.

Uma vez que o g é diferente de g_e (valor de g para o electrão livre, $g_e = 2,0023$), a equação acima pode ser reescrita da seguinte forma (Eq. B.2):

$$h\nu = g\beta(g/g_e H) \quad (\text{A.5})$$

Uma vez que o acoplamento spin-órbita é particularmente forte em iões de metais de transição, os sinais de RPE destes apresentam valores de g muito diferentes de g_e . O valor de g afasta-se tanto mais do valor de g_e quanto mais forte for o acoplamento spin-órbita. No caso do ião vanadilo, o valor de g é, geralmente, ca. 1,95.

O factor g possui, ainda, outra característica importante: devido ao acoplamento órbita-spin, o seu valor varia conforme a orientação da molécula em relação ao campo aplicado (anisotropia). Para moléculas dispostas aleatoriamente numa matriz sólida, o sinal de RPE resulta da sobreposição de múltiplos espectros, correspondentes às diferentes orientações em relação ao campo aplicado e, conseqüentemente, aos diferentes valores de g . Assim, a forma do espectro variará com a simetria do sistema, podendo dividir-se em três tipos: (i) isotrópico ($g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$); (ii) axial, em que os eixos x e y são equivalentes ($g_{xx} = g_{yy} = g_{\perp}$ e $g_{zz} = g_{\parallel}$); (iii) rômbico ($g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$). Devido à forte interacção vanádio-oxigénio no catião vanadilo, os espectros de RPE observados para complexos de vanadilo são, geralmente, axiais ou bastante próximo destes.

A interacção do momento angular de spin do electrão com o momento angular de spin (I) dos núcleos vizinhos designa-se por interacção nuclear hiperfina. De facto, os momentos de spin nucleares originam campos magnéticos locais que se fazem sentir no electrão, estando este, então, sujeito a um campo magnético efectivo diferente do campo aplicado, H_0 (Eq. B.3):

$$H_{ef} = H_0 + H_{local} \quad (\text{A.6})$$

Os estados electrónicos são, pois, separados com base na sua interacção com o spin nuclear, o que se designa por acoplamento hiperfino. Um maior desdobramento dos estados de energia na presença de núcleos na vizinhança do electrão designa-se por acoplamento super-hiperfino, consistindo o espectro num conjunto complexo de multipletos, cuja forma depende do valor relativo das constantes de acoplamento. Devido à presença de um electrão numa orbital

σ -não-ligante, a qual é perpendicular ao plano equatorial definido pelos ligandos (plano xy), o acoplamento super-hiperfino do vanádio não é resolvido num espectro típico de RPE de banda-X (9 GHz).

A.3 Dispersão de luz: considerações gerais

O dipolo induzido oscila com o campo eléctrico da radiação de excitação, com intensidade proporcional ao campo e à polarizabilidade da molécula. A maioria da luz dispersa por determinada partícula é emitida com a mesma frequência da luz incidente, no que se designa por dispersão estática de luz ou de Rayleigh, podendo esta ser medida num espectrofotómetro normal, através da diminuição da luz transmitida, ou num espectrofluorímetro, no qual a luz dispersa é medida directamente através do uso da geometria a 90° entre os feixes de luz incidente e emitida.

A intensidade da luz dispersa num período de tempo de segundos varia com o ângulo de medição (θ) e com a concentração, de acordo com a equação (Zimm, 1948):

$$K.c/R_{\theta} = (1/MP) + 2.A_2.c \quad (\text{A.7})$$

sendo,

$$K = [4\pi.\eta_0^2 (d\eta / dc)^2] / (N_A \lambda^4) \quad (\text{A.8})$$

e

$$R_{\theta} = (d^2 / \text{sen}^2 \theta_z).(I_s / I_{\theta}) \quad (\text{A.9})$$

onde c representa a concentração (expressa em massa/volume), K a constante óptica do sistema, R_{θ} a razão de Rayleigh, $d\eta/dc$ o incremento do índice de refração com a concentração, N_A é a constante de Avogadro, λ é o comprimento de onda da radiação incidente, I_{θ} e I_s correspondem, respectivamente, às intensidades do feixe de luz incidente e da luz dispersa, θ_z é o ângulo de medição relativo ao eixo vertical, d a distância entre a amostra e o detector, η_0 e η são os índices de refração do solvente e da solução, respectivamente, A_2 o segundo coeficiente do virial (relativo às interacções interpartículas), M é a massa molecular e

$$P_{\theta} = I_{s,\theta} / I_{s,\theta=0} \quad (\text{A.10})$$

é o factor estrutural intrapartícula, relativo à interferência da luz dispersa de pontos diferentes da molécula ou agregado molecular.

A.4 Espectroscopia de fluorescência: considerações gerais

Designa-se por luminescência a emissão de um fóton (ultravioleta, visível ou infravermelho), por parte de qualquer substância, a partir de estados electrónicos excitados.

Formalmente, divide-se a fotoluminescência em duas categorias, fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado vibracional. No entanto, após a absorção de um fóton (10^{-15} segundos) existem outros percursos possíveis para o retorno ao estado fundamental (S_0), tal como se pode observar pelo diagrama de Jablonski apresentado na Figura D.1: (i) conversão interna, CI; (ii) cruzamento intersistemas, CIS; (iii) transferência de carga intramolecular; e (iv) alterações conformacionais. A conversão interna é o processo pelo qual o estado excitado pode retornar ao estado fundamental sem emissão de fluorescência, sendo a sua energia dissipada em vibrações moleculares através de uma transição não-radiativa (10^{-11} a 10^{-9} segundos). O cruzamento intersistemas é também uma transição não radiativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos pertencentes a estados electrónicos de diferentes multiplicidades (10^{-10} a 10^{-8} segundos). Este último pode ser suficientemente rápido para competir com outras vias de decaimento do estado S_1 , como fluorescência e conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$.

A fosforescência consiste na emissão de um fóton de um estado excitado tripleto (T_1), no qual o electrão possui a mesma orientação de spin que aquele se encontra no estado fundamental, pelo que as transições para o estado fundamental são proibidas, sendo necessário que o spin electrónico se inverta primeiramente, podendo então decair. Na fluorescência, o electrão que se encontra no estado excitado singleto (S_1) possui um spin inverso ao que se encontra no estado fundamental, pelo que o retorno ao estado fundamental é uma transição permitida por spin e ocorre rapidamente através da emissão de um fóton. Deste modo, o fenómeno de fosforescência é um processo mais lento (10^{-3} - 10^0 segundos), por comparação com o de fluorescência (10^{-8} segundos). Além disso, o espectro de fosforescência localiza-se a comprimentos de onda superiores ao de fluorescência, uma vez que a energia do nível vibracional mais baixo do estado tripleto T_1 é mais baixa que a do estado singleto S_1 .

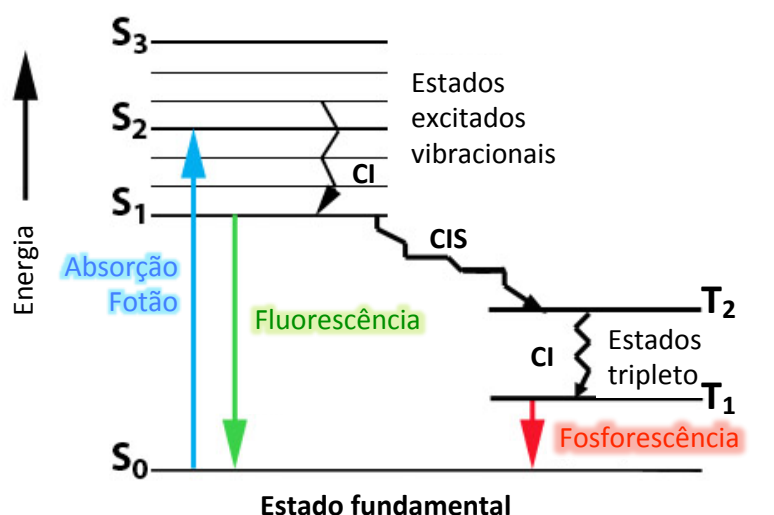


Figura A.1 – Representação do diagrama de Jablonski.

A.4.1 Supressão de fluorescência

A intensidade de fluorescência pode diminuir através de uma grande variedade de processos, o que se designa por supressão de fluorescência (*quenching*). A supressão de fluorescência pode ser colisional ou estática. A supressão colisional ocorre quando o estado excitado do fluoróforo é desactivado pelo contacto com outra molécula em solução, sendo esta designada por supressor de fluorescência (Q), não sendo as moléculas envolvidas quimicamente alteradas durante o processo. O fluoróforo retorna ao estado fundamental sem emissão de um fóton. São exemplos de supressores dinâmicos de fluorescência moléculas como o oxigénio, halogéneos, aminas e acrilamida, entre outras. Por seu turno, os supressores de fluorescência podem formar complexos não-fluorescentes com os fluoróforos, o que se designa por supressão estática, verificando-se esta no estado fundamental. O mecanismo de supressão de fluorescência difere para cada par fluoróforo-supressor envolvido, mas tanto a supressão colisional como a estática implicam que ambos se encontrem em contacto.

O decréscimo na intensidade de fluorescência na presença de um supressor é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (\text{A.11})$$

onde F_0 e F correspondem à intensidade da fluorescência antes e depois da adição do supressor (Q), K_{SV} representa a constante de supressão efectiva, sendo dependente tanto do tempo de vida antes da adição do supressor (τ_0) como da constante bimolecular da reacção de supressão (k_q). A

constante K_{sv} indica a sensibilidade de um fluoróforo a um determinado supressor: quando o fluoróforo se encontra no interior da macromolécula, geralmente inacessível ao solvente, o valor de K é baixo; valores de K superiores indicam que o fluoróforo se encontra livre em solução ou na superfície da biomolécula. A constante k_q reflecte a eficiência da supressão de fluorescência ou a acessibilidade dos fluoróforos para o supressor: supressões controladas por difusão apresentam valores de k_q próximos de $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, enquanto valores superiores indicam algum tipo de ligação entre ambos (Lakowicz, 2006).

A.5 Referências bibliográficas

- Lakowicz, J. R. (2006) *“Principles of fluorescence spectroscopy”*, Plenum Press, New York;
- Zimm, B. H. (1948) *“Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of Light scattering – preliminar results on polystyrene solutions”* **J. Chem. Phys.** 16:1099-1116.

