

SANDRO MASSAO HIRABARA

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE AÇÃO DO
PERÓXIDO DE ORTOVANADATO DE SÓDIO EM MÚSCULO SÓLEO DE RATO
"IN VITRO"**

Monografia apresentada para a
obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas da UFPR.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio
Fernandes.

CURITIBA

2000

SANDRO MASSAO HIRABARA

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE AÇÃO DO
PERÓXIDO DE ORTOVANADATO DE SÓDIO EM MÚSCULO SÓLEO DE RATO
"IN VITRO"**

CURITIBA

2000

À minha família pelo incentivo,
amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luiz Claudio Fernandes, pela orientação, atenção e dedicação com que se dispôs para a realização desta monografia, demonstrando sempre muita seriedade, humildade e amor à profissão.

Aos meus familiares, que sempre me incentivaram à vida acadêmica e pelo apoio financeiro.

À professora Mestre Alessandra Folador, pelos indispensáveis e exímios ensinamentos e dicas, sempre com muita competência e profissionalismo.

Ao bolsista Osvado Tchaikobski pelos ensinamentos técnicos, auxílio no desenvolvimento da monografia e, principalmente, pelo companheirismo.

Ao estagiário Ricardo Yamazaki, pelo auxílio, disponibilidade e participação durante todo o transcorrer da monografia.

Aos demais colegas de laboratório Débora, Fábio, Patrícia, Marina, Karla, Claudinha, Cecília e Valéria, por propiciarem um ambiente de trabalho agradável e pelas conversas divertidas e descontraídas.

Ao amigo Bere, funcionário do Hospital das Clínicas, pela disposição e ajuda técnica.

E ao departamento de Fisiologia, pelo espaço cedido ao meu trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
I. INTRODUÇÃO.....	3
A) Diabetes melitus.....	3
B) Insulina.....	6
C) Sais de Vanádio.....	10
II. OBJETIVOS.....	13
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. Procedimentos.....	14
1.1. <i>Incubação do músculo sóleo</i>	14
1.2. <i>Determinação do lactato total produzido</i>	16
1.3. <i>Quantificação de proteínas musculares</i>	17
1.3.1. Preparo da curva padrão.....	17
1.3.2. Determinação protéica.....	19
1.4. <i>Eletroforese: método "SDS-PAGE"</i>	20
1.4.1. Preparo do gel SDS - poliácridamida.....	21
1.4.2. Corrida das amostras.....	22
1.4.3. Coloração dos géis.....	22
1.4.4. Secagem dos géis.....	23
1.5. <i>"Western Blotting"</i>	24
1.5.1. Montagem do "stack" de transferência.....	25
1.5.2. Eletrotransferência de proteínas.....	26
1.5.3. Bloqueio de sítios não específicos.....	27
1.5.4. Incubação com o primeiro anticorpo.....	27
1.5.5. Incubação com o segundo anticorpo conjugado ao HRP.....	27
1.5.6. Incubação com o substrato quimiluminescente.....	27
1.5.7. Revelação dos filmes.....	28

2.	Soluções	28
2.1.	<i>Soluções usadas para a incubação</i>	28
2.1.1.	Tampão Krebs-Ringer	28
2.1.2.	Solução de insulina	29
2.1.3.	Peróxido de ortovanadato de sódio	29
2.2.	<i>Solução para medir lactato</i>	30
2.2.1.	Tampão para medir lactato	30
2.3.	<i>Soluções para quantificação protéica</i>	31
2.3.1.	Tampão de lise	31
2.3.2.	Solução de Bradford	31
2.3.3.	Tampão Laemmli	32
2.4.	<i>Soluções para eletroforese</i>	32
2.4.1.	Gel de separação	32
2.4.2.	Gel de empilhamento	32
2.4.3.	Tampão de corrida	33
2.4.4.	Corante azul de Coomassie	33
2.4.5.	Descorante de gel	33
2.4.6.	"Kit" coloração de prata	34
2.5.	<i>Soluções para "Western Blotting"</i>	34
2.5.1.	Tampão de transferência	34
2.5.2.	TBS	34
2.5.3.	Tampão de bloqueio	35
2.5.4.	Tampão de incubação	35
2.5.5.	Tampão de lavagem	35
2.5.6.	Corante vermelho de Ponceau	35
IV.	RESULTADOS	36
V.	DISCUSSÃO	42
VI.	CONCLUSÃO	45
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

A diabetes é uma doença que acomete milhões de pessoas em todo o mundo, ano após ano. Associado à ela, alterações importantes ocorrem no metabolismo intermediário, levando a várias complicações, como doenças dos olhos, dos rins, lesão dos nervos e problemas nos vasos sanguíneos. O tipo mais comum de diabetes é o denominado insulino-independente (tipo II), caracterizado principalmente pela resistência periférica à insulina. Esta resistência também é comum em diversas patologias, como câncer, traumas em geral e jejum. Portanto, o estudo de substâncias com atividades *insulin-like* é de interesse particular para a reversão ou amenização deste quadro. Este trabalho teve como objetivo investigar o papel do IRS-1 e do GLUT-4 no mecanismo de ação do ortovanadato de sódio peroxidado, um composto *insulin-like*, em músculo sóleo *in vitro*. Ratos machos Wistar pesando 180 g foram obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e sacrificados por deslocamento cervical, seus músculos sóleos retirados e pré-incubados por 30' em tampão Krebs-Ringer contendo 5.6 mM de glicose e BSA a 1.0%. Em seguida, os músculos foram transferidos para outros frascos contendo o mesmo tampão, na ausência ou presença de insulina - I (1 mU/ml) ou peróxido de Ortovanadato de Sódio - POV (1 mM) e incubados por mais 15", 30", 60" ou 90". Ao término do tempo de incubação, o músculo foi congelado em nitrogênio líquido e homogeneizado em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; Tween 20 1%; ortovanadato de sódio 1 mM e aprotinina 10 µg/ml). O lisado muscular foi submetido a SDS-PAGE (géis de 7,5; 10 e 12%) e, em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à técnica de "Western Blotting" para a identificação de duas proteínas específicas: o IRS-1 e o

GLUT-4. Não foi possível detectar expressão do IRS-1, talvez devido ao uso do anticorpo escolhido. Já para o GLUT-4, houve aumento na sua expressão tanto nos músculos incubados com POV como nos incubados com insulina no tempo de 15". Interessantemente, com POV esta expressão perdurou até 60" e nos músculos incubados com insulina a expressão do GLUT-4 voltou aos níveis do controle. O aumento prolongado de GLUT-4 nos músculos incubados com peróxido de ortovanadato de sódio pode ter como possível explicação a ação do vanádio como potente inibidor de fosfatase de fosfotirosinas protéicas prevenindo, assim, a desfosforilação de intermediários com fosfotirosinas o que iria resultar na maior permanência (expressão) do GLUT-4 na membrana plasmática. Assim, demonstramos que a proteína GLUT-4 está envolvida no mecanismo de ação do peróxido de ortovanadato de sódio em músculo sóleo e este é um dos mecanismos pelo qual o vanádio exerce seus efeitos *insulin-like*, porém acreditamos que sua via de sinalização seja diferente do da insulina.

I. INTRODUÇÃO

A diabetes é uma doença que acomete milhares de pessoas em todo o mundo, sendo o tipo II (também conhecida como insulino-independente ou da maturidade) o mais comum. As complicações mais freqüentes incluem doenças dos olhos, dos rins, lesão dos nervos e problemas nos vasos sanguíneos.

Embora o mecanismo de ação da insulina ainda não seja completamente conhecido, é sabido que ela tem um papel fundamental na captação de glicose em músculos esquelético e cardíaco, em adipócitos e na regulação de enzimas chaves no fígado, atuando como um hormônio 100% anabolizante na síntese de glicogênio, proteínas e lipídios (Maasen *et al.*, 1997). Por isso, é amplamente utilizada no tratamento de doenças onde hajam deficiências ou distúrbios assim relacionados, como por exemplo a diabetes e o câncer.

O vanádio vem despertando cada vez mais interesses devido as suas propriedades semelhantes às da insulina. Dessa forma, torna-se importante estudar o vanádio e seus sais, visto a possibilidade destes serem utilizados como tratamento alternativo à insulina e nos casos onde haja resistência à insulina (diabetes tipo II).

A) Diabetes melitus

A Diabetes melitus é caracterizada por uma redução ou ausência da secreção de insulina e/ou aumentada resistência celular à insulina resultando em hiperglicemia e outros distúrbios metabólicos. Os sintomas da diabetes incluem sede e fome, diurese freqüente, perda de peso e infecções recorrentes, contudo, a

doença é assintomática no seu estágio inicial. A doença está associada com severas complicações neurológicas, vasculares, ocular e renal. Estima-se que nos Estados Unidos da América do Norte existam 8 milhões de casos não diagnosticados em adultos. No 16º Congresso Internacional de Diabetes em Helsinque, Finlândia (1997), foi anunciado que a doença atinge 153 milhões de pessoas no mundo e, segundo a Organização Mundial da Saúde, no ano 2025 este número passará a 300 milhões. A doença mata cerca de 2,8 milhões de pessoas por ano em todo o mundo; deste total de casos, 10% das vítimas são portadoras do diabetes insulino-dependente.

A Associação Americana de Diabetes (1997) estabelece que diabetes é um estado de doença que pode ser classificado em 5 grupos :

- 1) Tipo I, insulino-dependente, diabetes juvenil ou Cetose. Deficiência de insulina devido à perda das células β da ilhota de Langerhans. Frequentemente associado com antígenos HLA específicos, com pré-disposição à insulite viral ou fenômeno auto-imune (anticorpo contra a ilhota). Ocorre em qualquer idade, comum em jovens;
- 2) Tipo II, insulino-independente, diabetes da maturidade ou cetose resistente. Mais frequente em adultos, porém ocorre em qualquer idade. Associado a obesidade. Pode ser visto em agregados familiares com herança genética dominante autossomal. Pode requerer insulina para controle tanto crônico ou agudo da hiperglicemia em situação de estresse;
- 3) Diabetes associada com certas condições ou síndromes. Hiperglicemia ocorrendo em relação a outros casos de doença. Doenças pancreáticas,

droga ou diabetes quimicamente induzida, endocrinopatias, desordens no receptor da insulina, certas síndromes genéticas;

- 4) Tolerância à glicose diminuída (IGT). Anormalidade na concentração da glicose intermediando entre o normal e estabelecimento do diabetes. Pode “piorar o diabetes”, melhorar em direção ao normal, ou permanecer inalterado em uma série de testes;
- 5) Diabetes Mellitus Gestacional (GDM). A diabetes gestacional é a elevação da taxa de glicose no sangue que ocorre apenas nas mulheres grávidas que nunca tiveram diabetes. Essa elevação surge por volta da 24ª semana de gestação, quando o organismo está produzindo grandes quantidades de hormônios para ajudar no crescimento do bebê. Supõe-se que esses hormônios bloqueiam a ação da insulina. Esta resistência à insulina causa uma tolerância à glicose durante a gravidez, com volta ao normal após o parto. Porém estima-se que 50% das pacientes com diabetes gestacional ficarão diabéticas no futuro, principalmente as que permanecerem obesas.

A diabetes melitus insulino-independente ou tipo II é uma das mais comuns desordens metabólicas e endócrinas. É uma desordem multifatorial na qual fatores genéticos desempenham papel complexo no seu desenvolvimento, entretanto avanços na abordagem em biologia e genética molecular têm tornado possível começar a identificar os genes suscetíveis ao diabetes tipo II (Seino, 1996). A resistência à insulina em vários tecidos-alvo e uma insuficiência no aumento compensatório na liberação de insulina pelas células β , são as principais causas do “diabetes insulino-independente” (Eriksson *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1992).

B) Insulina

A insulina desempenha um papel chave na regulação do metabolismo em muitas células de mamíferos, principalmente no fígado, tecido muscular esquelético e cardíaco e no tecido adiposo (White *et al.*, 1994; Kahn *et al.*, 1994). A habilidade da insulina em aumentar o transporte de glicose para a musculatura esquelética e tecido adiposo é mediada pela translocação de um transportador específico de glicose, denominado de GLUT-4 (*glucose transporter - 4*), das vesículas intracelulares para a superfície da célula. O GLUT-4 é uma glicoproteína transmembrana transportadora de glicose insulino-dependente com peso molecular entre 42-50 KDa (Stephens *et al.*, 1995), presente em músculos estriados esquelético e cardíaco e em adipócitos (Klip *et al.*, 1990); seu transporte se dá a favor do gradiente, por difusão facilitada (Stephens *et al.*, 1995; Pâquet *et al.*, 1992), predominando em vesículas intracelulares de células não estimuladas, mas quando há estímulo com insulina, ele é translocado à membrana plasmática, aumentando a captação de glicose (Cushman *et al.*, 1980; Suzuki *et al.*, 1980; Slot *et al.*, 1991). Este processo é transitório e reversível, resultando em um ciclo do GLUT-4 de vesículas intracelulares para a membrana plasmática e vice-versa (Stephens *et al.*, 1995). Outros estímulos adicionais à insulina também podem aumentar a translocação do GLUT-4 à membrana plasmática, como a atividade física, hipóxia tecidual, exposição à hipoglicemia e exposição a não acopladores de respiração mitocondrial (Maassen *et al.*, 1997), mas o mecanismo básico de translocação de GLUT-4 por estes estímulos é desconhecido.

A musculatura esquelética é o principal sítio para a utilização de glicose mediada pela insulina (DeFronzo *et al.*, 1988). A insulina também ativa as enzimas

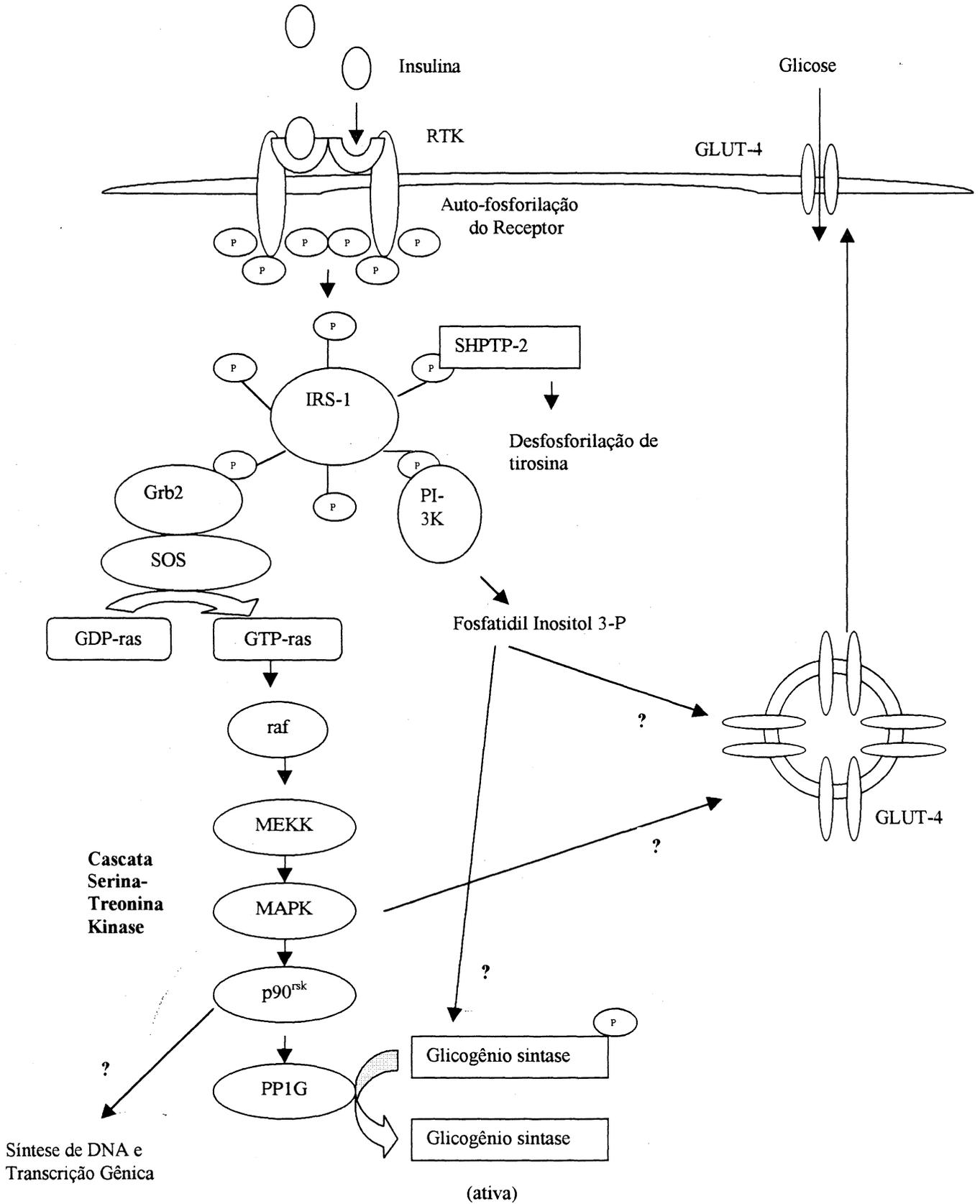
chaves que não estão em equilíbrio das vias metabólicas da glicólise, síntese de glicogênio (ex. Glicogênio sintase) e da oxidação da glicose (ex. Piruvato desidrogenase).

O mecanismo inicial da insulina envolve sua ligação a receptores específicos na superfície celular, levando a uma autofosforilação e ativação de uma tirosina kinase intrínseca associada com a subunidade β do receptor. As proteínas denominadas "insulin receptor substrate" 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) são substratos para o receptor da insulina e outras tirosinas kinases associadas aos receptores dos fatores de crescimento e citocinas (Eriksson *et al.*, 1989; White *et al.*, 1985; Sun *et al.*, 1991 e 1993; Wang *et al.*, 1993; Myers *et al.*, 1994). A fosforilação mediada pelo receptor-IRS é requerida para a propagação dos sinais para a mitogênese, transporte de glicose e numerosos outros eventos bioquímicos e biológicos durante a sinalização pela insulina (Myers *and* White, 1996). As proteínas IRS atuam como uma interface entre receptores ativados e proteínas sinalizadoras com 2 domínios homólogos ao Src (SH2). O IRS-1 é o substrato predominante para receptores da insulina e outros fatores de crescimento (Sun *et al.*, 1991), sendo uma proteína citoplasmática com, pelo menos, 22 sítios potenciais para fosforilação de tirosina. Assim, seu peso molecular pode variar de 131 a 185 KDa, conforme o seu grau de fosforilação (White *et al.*, 1997). Após estimulação pela insulina, IRS-1 associa-se com várias proteínas incluindo fosfatidilinositol 3-kinase (PI3-kinase), Syp, Nck, Grb2 e Fyn (Myers *et al.*, 1992; 1994; Noguchi *et al.*, 1994; Kuhne *et al.*, 1993). A PI3-kinase é uma enzima heterodimérica consistindo de uma subunidade reguladora de 85 kDa com domínios SH2 capazes de se ligarem ao IRS-1 com tirosina fosforilada e uma subunidade catalítica de 110 kDa que fosforila o anel inositol do PI e seus derivados fosforilados

(Kapeller *and* Cantley, 1994; Whitman *et al.*, 1988). A PI3-kinase tem sido implicada como uma das enzimas chaves na transdução de sinais para a translocação de GLUT4 e captação de glicose estimulada pela insulina (Kanai *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1994; Cheatham *et al.*, 1994; Hara *et al.*, 1994). Pouco se sabe sobre o papel das proteínas IRS na regulação da ligação e ativação da PI3-kinase em estados de resistência à insulina, bem como na fisiologia normal. Na última década, tornou-se claro que o tráfego de vesículas intracelulares é regulado por uma variedade de proteínas ligadas à GTP, incluindo às das famílias Rab e Arf, das pequenas proteínas G relacionadas com o Ras (Novick *and* Brennwald 1993; Boman *and* Kahn, 1995), bem como as proteínas triméricas ligadas a GTP (Helms, 1995) e as grandes proteínas G, tais como a dinamina (Liu & Robinson, 1995). Em adipócitos permeabilizados, análogos de GTP não hidrolisáveis induzem translocação de GLUT4, sugerindo que proteínas ligadas ao GTP podem estar envolvidas na translocação de GLUT4 induzida pela insulina (Baldini *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 1992; Yano *et al.*, 1993). Assim, o receptor da insulina, IRS-1 e PI 3-kinase representam os primeiros passos do mecanismo de ação da insulina, pelo menos em dois principais tecidos alvos: o fígado e a musculatura esquelética (Saad *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 1996).

O mecanismo de ação da insulina está representado no esquema 1.

Esquema 1: Mecanismo de ação da insulina
(modificado a partir de Conn *and* Melmed, 1997)



C) Sais de vanádio

O vanádio é um metal de transição encontrado em organismos vivos em concentrações variando de picomolar até micromolar. É um fator de crescimento para várias plantas e é considerado essencial em algumas espécies de animais, tais como galinha ou rato, para as quais, a completa privação na alimentação induz redução no crescimento e desempenho na reprodução (Rasaram *and* Carne 1981). Na espécie humana sua essencialidade ainda não foi estabelecida. A partir de 1979, vanádio, na forma de vanadato de sódio, tem demonstrado ter propriedades semelhantes à da insulina em vários modelos celulares, tais como adipócitos, células musculares e hepatócitos isolados (Tolman *et al.*, 1979; Dubyak *and* Kleinzeller, 1980; Clark *et al.*, 1985; Duckworth *et al.*, 1988; Jackson *et al.*, 1988; Swarup *et al.*, 1982). Particularmente, o vanadato estimula o transporte de glicose, inibe a glicogénólise e a lipólise. Embora esta atividade semelhante à da insulina tenha sido demonstrada, um número grande de estudos têm sido conduzidos para estudar seu mecanismo de ação. Várias hipóteses foram postuladas sobre seu possível mecanismo de ação, entretanto, são ainda matéria de debate:

- a) inibição das proteínas-fosfotirosil fosfatases (Swarup *et al.*, 1982);
- b) indução direta da fosforilação da tirosina (Tamura *et al.*, 1984; Gherzi *et al.*, 1988; Tracey *et al.*, 1986), embora esta hipótese tenha sido posteriormente contestada (Mooney *et al.*, 1989);
- c) ativação direta do transportador de glicose, através da ativação do gene para esta proteína (Strout *et al.*, 1990) ou translocação do transportador das vesículas intracelulares para a membrana plasmática (Paquet *et al.*, 1990);

- d) aumento da cálcio intracelular, secundário à inibição da Ca-Mg-ATPase (Delfert *and* McDonald 1985);
- e) estimulação da NADH-oxidase e formação de peróxido de hidrogênio (Ramassarma & Crane 1981), um mecanismo sustentado pela mútua potenciação do vanadato e peróxido de hidrogênio demonstrado "in vitro" (Kadota *et al.*, 1987).

Os sais do vanádio são potentes inibidores das proteínas tirosina fosfatases (Swarup *et al.*, 1982) e, assim, foram inicialmente pensadas ativar a atividade tirosina kinase do receptor da insulina prevenindo a desfosforilação da subunidade β do receptor da insulina (Tamura *et al.*, 1984, Pugazhenti & Khandelwal, 1993). Entretanto, vários trabalhos têm sugerido que o sítio de ação do vanádio pode não envolver o receptor da insulina (Strout *et al.*, 1989; Mooney *et al.*, 1989; Blondel *et al.*, 1990).

Tolman *et al.* (1979) foram os primeiros a demonstrar que vários compostos do vanádio tem efeitos semelhante à da insulina sobre o metabolismo da glicose no diafragma de ratos "in vitro". Outros trabalhos têm demonstrado que a administração de vanadato a ratos diabéticos, induzidos com estreptozotocina, diminui a hiperglicemia observada nestes animais (Heyliger *et al.*, 1985). A diabetes induzida por estreptozotocina resulta em um estado de resistência à insulina na musculatura esquelética. O mesmo estado também é encontrado em ratos parcialmente pancreateomizados, onde observa-se 90% na deficiência de insulina (Rossetti *and* Laughlin, 1989). Interessantemente, a taxa de síntese de glicogênio pela musculatura esquelética reduz-se em 80% em ratos pancreateomizados, porém o tratamento oral com ortovanadato normaliza a taxa de síntese de glicogênio neste

tecido (Rossetti *and* Laughlin, 1989). Desse modo, o tratamento com vanadato pode melhorar a resistência à insulina, largamente determinada pela diminuída síntese de glicogênio pela musculatura esquelética. Além disso, o tratamento de ratos não diabéticos com vanadato na sua água de beber está associada com um significativo aumento nas taxas de síntese de glicogênio basal e submáxima estimuladas pela insulina no músculo sóleo incubado (Challis *et al.*, 1987). Portanto, um importante ponto intracelular para os efeitos semelhantes à insulina do vanadato "in vivo" é a síntese de glicogênio na musculatura esquelética. Peróxidos de vanadato têm demonstrado ter potentes efeitos, semelhantes aos da insulina, em adipócitos isolados através da ativação do receptor tirosina kinase da insulina (Kadota *et al.*, 1987).

Um passo importante e crítico na cascata de sinalização pela insulina é a ativação de um grupo de proteínas serinas/treoninas kinases, as quais incluem a MAP kinase ("mitogen activated protein kinase"), 90 kDa ribosomal S6 kinase (p90rsk) e 70 kDa ribosomal S6 kinase (p70s6k) (White *and* Khan, 1994). D'Onofrio *et al.* (1993, 1994) mostraram que o ortovanadato de sódio estimula a fosforilação do tirosil e a ativação das MAP kinases (p42^{mapk} e p44^{mapk}) de uma maneira independente da atividade tirosina kinase do receptor da insulina. Pandey *et al.* (1995) estudaram o efeito de vários sais de vanádio em ovário de Hamster chinês, os quais têm como característica principal expressar um grande número de receptores da insulina humana. Nestas células, eles demonstraram que estes sais ativaram a MAP kinase; a p90rsk, a qual está imediatamente abaixo da MAP kinase na cascata de sinalização pela insulina, assim como também ativaram a p70s6k, que também é ativada pela insulina por uma via ainda não definida. Os autores sugerem,

portanto, que o efeito semelhante à insulina do vanadato possa ser através da ativação dessas proteínas. Poucos trabalhos têm abordado o papel destas proteínas sinalizadoras e sua ativação pelo vanádio no fígado, musculatura esquelética e tecido adiposo. Hey *et al.* (1995) demonstraram que o tratamento de ratos cronicamente diabéticos (6 meses) com bis (maltolato) oxovanádio produziu euglicemia e a restauração ao nível basal da atividade da S6 kinase e da MAP kinase. Os autores sugeriram que a resistência à insulina associada ao diabetes crônico possa estar ligado com a depressão dos sinais através dessas vias e que isto pode ser retificado por compostos contendo vanádio.

II. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo estudar e identificar proteínas intracelulares envolvidas nos mecanismo de ação dos sais de vanádio peroxidados.

Para alcançar este objetivo pretendemos:

1. Verificar se o peróxido de ortovanadato de sódio aumenta a captação de glicose em músculo esquelético de rato *in vitro*;
2. Verificar a participação do IRS-1 e do GLUT-4 no transporte de glicose em músculo sóleo de rato estimulado com peróxido de ortovanadato de sódio *in vitro*, através da análise do perfil eletroforético e da técnica de "Western Blotting".

III. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 35 ratos machos da linhagem Wistar pesando entre 150 e 180 gramas, adquiridos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR; "kit" de coloração prata adquirido da Pharmacia Biotech; anticorpos policlonais de coelho anti-IRS-1 e de cabra anti-GLUT-4 adquiridos da Santa Cruz Biotechnology; anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com a enzima HRP ("Horseradish Peroxidase") e Substrato Quimiluminescente ULTRA SuperSignal ambos adquiridos da Pierce. A revelação dos filmes da técnica de "Western Blotting" foi realizada no Hospital das Clínicas de Curitiba. Os demais compostos, bem como materiais e equipamentos utilizados são do Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia, onde se desenvolveu a monografia. Os testes estatísticos foram feitos pelo teste "*t student*" ($p < 0.05$).

1. PROCEDIMENTOS

1.1. Incubação do músculo sóleo

Cinco ratos pesando entre 150 e 180 g foram sacrificados por deslocamento cervical e seus músculos sóleos retirados e cortados ao meio, resultando em 20 músculos totais para a incubação. Os músculos foram tratados segundo o seguinte protocolo:

Tempo	15"	30"	60"	90"	1 h 30'
Tratamento					
Insulina 1 mU/ml	1	2	3	4	13, 14 e 15
POV 1 mM	5	6	7	8	16, 17 e 18
Controle	9	10	11	12	19 e 20

O procedimento para a incubação foi o seguinte:

- Prepara-se 130 ml de tampão Krebs-Ringer e colocar 3 ml em 2 sets de 20 frascos de incubação;
- Sacrifica-se 5 ratos, retira-se os músculos sóleos das patas traseiras, corta-os ao meio (corte longitudinal às fibras), pesa-os e coloca-os no primeiro set de frascos de incubação (20 primeiros frascos); fecha-se os frascos com tampas de borracha com sistema de oxigenação (O₂ 95%) aberto;

Obs.: o tempo desde o sacrifício do animal até a colocação dos músculos nos frascos não deve exceder 3 min para que os músculos não sofram anóxia.

- Para os músculos de 1 a 12, parou-se o O₂ após 25 min de pré-incubação e passou-os para os 15 primeiros frascos do segundo set aos 30 min, porém com os devidos tratamentos (conforme protocolo); parou-se a incubação com nitrogênio líquido e procedeu-se a quantificação protéica para estes músculos;
- Para os músculos de 12 a 20, passou-se os músculos para os frascos correspondentes do segundo set após 30 min de pré-incubação, porém com os devidos tratamentos; parou-se o O₂ após 15 min da transferência e deixou-se

incubando por mais 30 min; parou-se a incubação, coletou-se o meio de incubação e procedeu-se a determinação do lactato total produzido por estes músculos.

1.2. Determinação do lactato total produzido

Uma vez captada, a glicose pode ser metabolizada em diferentes vias, como a formação de lactato e piruvato, formação de gás carbônico e síntese de glicogênio. Para verificar se os tratamentos com a insulina ou peróxidos de vanádio estava realmente aumentando a captação de glicose do meio de incubação, foi feita a dosagem de lactato total produzido pelo músculo e exportado para o meio de incubação.

A determinação da produção de lactato foi feito seguindo a metodologia de Engle e Jones (1978):

- Prepara-se 10 ml do tampão para medir lactato;
- Coloca-se 200 µl do meio mais 1 ml do tampão em tubos de ensaio pequenos;
- Para o tubo branco, coloca-se 200 µl de água destilada mais 1 ml do tampão;
- Agita-se os tubos e deixa-se reagir por 30 min a 20° C:



- Lê-se no espectrofotômetro na absorvância de 340 nm, contra referência do branco;
- Determina-se o lactato total produzido:

$$[\text{lactato}] \mu\text{M/h/g tecido} = \frac{\text{DO}}{6,22} \times \frac{1,2}{0,2} \times 3 \times \frac{1}{\text{wwg}},$$

sendo que DO = densidade ótica e wwg = peso fresco do músculo em gramas.

1.3. Quantificação de proteínas musculares

O Método de Bradford surgiu em 1976, sendo relativamente preciso para a maioria das proteínas, exceto pequenos polipeptídeos básicos, como ribonucleases e lisozimas. Utiliza-se o Azul Brilhante de Coomassie G-250, o qual liga-se à cadeia protéica, aumentando a sensibilidade do método. A concentração da proteína da amostra desconhecida é calculada com base em uma curva padrão de uma proteína conhecida; o essencial é utilizar uma proteína padrão mais próxima da amostra em questão. A curva padrão tem uma linearidade entre as concentrações de 20 a 150 μg de proteínas por 100 μl da amostra. Há interferentes que devem ser evitados ou adicionados no branco, como detergentes (Triton X-100, SDS e NP-40, principalmente acima de 0.2%), fosfatos, etc..

Os músculos congelados foram diluídos com tampão de lise na proporção 1:7 e, em seguida, homogeneizados, centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante coletado. A quantificação protéica foi feita seguindo o método de Bradford.

1.3.1. Preparo da curva padrão

- Pesa-se 10 mg de albumina sérica bovina (BSA) e diluí-la em 10 ml de água destilada;
- Lê-se no espectrofotômetro a 280 nm, contra referência de água destilada;
- Divide-se a densidade ótica por 0.66 (fator de correção para concentração) e tem-se a concentração da solução-mãe em mg/ml;

Obs.: a densidade ótica deve estar entre 0.1 e 0.8; caso seja menor que 0.1 e maior que 0.8, adicionar mais BSA ou água destilada, respectivamente.

- Faz-se a diluição da "solução-mãe" de BSA para a curva padrão, como descrita a seguir:

Diluição	Solução-mãe	Água destilada
1:1	500 μ l	0 μ l
1:1.25	400 μ l	100 μ l
1:1.666	300 μ l	200 μ l
1:2	250 μ l	250 μ l
1:2.5	200 μ l	300 μ l
1:4	125 μ l	375 μ l
1:5	100 μ l	400 μ l
1:10	50 μ l	450 μ l
1:20	25 μ l	475 μ l
1:50	10 μ l	490 μ l

- Prepara-se uma bateria de 21 tubos, colocar 1 ml da solução de Bradford mais 20 μ l de cada diluição em cada tubo (faz-se em duplicata para cada diluição); no tubo branco, coloca-se 1 ml da solução de Bradford mais 20 μ l de água destilada;

Obs.: antes de usar a solução de Bradford, agitar bem; transferir o volume que será usado em um béquer e descartar a sobra.

- Agita-se os tubos e ler no espectrofotômetro a 595 nm, contra referência do tubo branco.

Obs.: a leitura deve ser imediata após a adição das diluições, pois as proteínas ficam estáveis por pouco tempo; deixar os tubos e as cubetas utilizados de molho logo após o uso, pois a solução de Bradford pode manchá-las.

- Monta-se o gráfico da curva padrão (concentração de BSA x densidade ótica) e acha-se a equação da reta ($y = ax + b$, sabendo que $a =$ coeficiente angular $= \operatorname{tg} \alpha = (y_2 - y_1) : (x_2 - x_1)$ e $b =$ coeficiente linear = ponto do eixo das coordenadas por onde a reta passa).

1.3.2. Determinação protéica

- Para a determinação protéica, dilui-se 10 μl de cada amostra 1:25 com tampão de lise;
- Prepara-se uma bateria de tubos (em duplicata para cada amostra mais o tubo branco);
- Coloca-se 1 ml da solução de Bradford em cada tubo + 20 μl de cada amostra; no tubo branco colocar 1 ml da solução mais 20 μl do tampão de lise (na qual a amostra foi preparada);
- Lê-se no espectrofotômetro a 595 nm, contra referência do branco;

Obs.: as densidades óticas devem ficar entre 0 e 1 que é a faixa de sensibilidade da curva padrão.

- Utiliza-se da equação da reta para o cálculo da concentração protéica de cada amostra [sabendo que y = densidade ótica, x = concentração da amostra e sendo $y = ax + b$, logo $x = (y - b) : a$].
- Após a quantificação protéica das amostras, dilui-se com tampão Laemmli de forma que a concentração final fique entre $1.33 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e $1.66 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (concentração necessária para a eletroforese); é importante que todas as amostras fiquem em uma concentração protéica única para que isso não interfira na análise das suas bandas.

1.4. Eletroforese: método "SDS-PAGE"

Quando submetidas a um campo elétrico, as proteínas migram de acordo com vários fatores, como o peso molecular, a carga, o formato e a interação com outras moléculas (proteínas e lipídios).

O método "SDS-PAGE" surgiu em 1960 descrito por Laemmli e desenvolvido para que esta migração dependa unicamente do tamanho da proteína. O SDS (dodecil sulfato de sódio) é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. Como consequência, tem-se a desnaturação, resultando em longas cadeias de polipeptídeos, e a neutralização da carga intrínseca das proteínas. Perdendo a sua conformação, a proteína também dissocia-se de outras moléculas. Várias moléculas de SDS ligam-se a uma mesma proteína tornando-a carregada negativamente (migrará para o pólo positivo do campo elétrico). Portanto, a migração das proteínas no método "SDS-PAGE" depende unicamente dos seus pesos moleculares.

Outra vantagem deste método é a utilização do 2-mercaptoetanol, um agente redutor que quebra ligações dissulfeto das cadeias polipeptídicas permitindo, assim, que as subunidades protéicas sejam analisadas independentemente.

Usualmente utiliza-se géis de poliacrilamida para esta migração. O gel de empilhamento é preparado a 4% e permite que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Chegando ao gel de separação, as proteínas começam a migrar de acordo com seus tamanhos. A concentração do gel de separação vai depender da proteína que se pretende analisar; geralmente utilizam-se géis de 7,5 a 10%. Os géis são preparados a partir de uma solução de acrilamida:bisacrilamida (30:1); a polimerização química da acrilamida com a bisacrilamida é, então, iniciada com a adição do persulfato de amônio e do TEMED; o persulfato de amônio gera radicais livres que levam à polimerização, enquanto o TEMED cataliza a formação destes radicais.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em "SDS-Page" em diferentes porcentagens por cerca de 3 a 5 horas.

1.4.1. Preparo do gel de SDS – Poliacrilamida

- Monta-se a base de vidro com separadores, tomando cuidado para evitar regiões passíveis de vazamento (colocar um pouco de vaselina ou parafilme nos separadores); coloca-se o pente e marca-se cerca de 1 cm abaixo do mesmo; retira-se o pente;
- Em um béquer, prepara-se o gel de separação na porcentagem desejada e colocá-lo entre as placas, até a marca (trabalhar com certa velocidade já que, após a adição do persulfato de amônio e do TEMED, a reação de polimerização já se inicia);

- Adiciona-se uma camada de álcool isoamílico ou isobutílico (cerca de meio cm) para a retirada de bolhas, nivelamento do gel e isolamento do gel do ar (o oxigênio impede a polimerização); aguarda-se a polimerização por 30 min;
- Lava-se a superfície do gel com água destilada 3 vezes e seca-la com uma pedaço de papel-filtro (cuidar para não danificá-la);
- Prepara-se o gel de empilhamento é colocá-lo sobre o gel de corrida; adiciona-se o pente e aguarda-se a polimerização;
- Retira-se o pente, coloca-se o gel na cuba de eletroforese e lava-se os poços com água e/ou tampão de corrida.

1.4.2. Corrida das amostras

- Coloca-se as amostras a serem corridas (20 a 100 μ g de proteínas totais) e o marcador nos lanes, enche-se a cuba com tampão de corrida e inicia-se a corrida a 300 v, 25-50 mA, por cerca de 3-5 hrs;

1.4.3. Coloração dos géis

c.1) Corante Azul Brilhante de Coomassie

- Mergulha-se a membrana em corante por 5 min;
- Mergulha-se a membrana em tampão descorante até as bandas aparecerem.

c.2) Corante Silver

- Mergulha-se a membrana em tampão de fixação por 30 min;
- Mergulha-se a membrana em tampão de sensibilização por 30 min;
- Lava-se a membrana com água destilada 3 X 5 min;
- Mergulha-se a membrana em reativo Silver por 20 min;
- Lava-se a membrana com água destilada 2 X 1 min;
- Mergulha-se a membrana em tampão de revelação por 2-5 min (até bandas aparecerem);
- Mergulha-se a membrana em tampão de parada por 10 min;
- Lava-se a membrana com água destilada 3 X 5 min;
- Mergulha-se a membrana em tampão de preservação 2 X 30 min.

1.4.4. Secagem dos géis

- Coloca-se os géis para secagem entre duas placas de vidro com papel-filtro de um lado e papel celofane do outro; deixa-se secar à temperatura ambiente por alguns dias.

1.5. "Western Blotting"

O método de "Western blotting" surgiu em 1979, descrito por Towbin. A idéia geral deste método é a identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono ou policlonais, incluindo a detecção, a quantidade relativa e o peso molecular de proteínas, em uma mistura complexa. Após a separação das proteínas em gel de poliácridamida "SDS-PAGE", elas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde se procederá o método. Como restará regiões onde não haverá proteínas na membrana, primeiro é necessário incubá-la em um tampão de bloqueio; isso evitará que os anticorpos liguem-se inespecificamente a estas regiões. Após bloqueada, a membrana é, então, incubada em tampão contendo o anticorpo primário para a proteína que se quer analisar. Para visualizar a interação antígeno-anticorpo é necessário um método de detecção; usualmente utiliza-se um segundo anticorpo voltado para o primeiro (anti-anticorpo) conjugado com uma enzima, a qual permitirá, pela adição de um substrato cromogênico ou quimiluminescente, tal visualização.

Neste projeto foram utilizados anticorpos monoclonais para o IRS-1 e para o GLUT-4. O método de detecção foi feito pelo uso de anti-anti-IRS-1 e anti-anti-GLUT-4 conjugados com a enzima HRP, a qual permitiu a visualização através da adição de um substrato quimiluminescente, o luminol.

1.5.1. Montagem do “stack” de transferência

- Após a corrida eletroforética, retira-se um dos vidros com auxílio de espátula, retira-se o gel de empilhamento e recorta-se um dos cantos para dar idéia de orientação;

Obs.: usar luvas para evitar manchas com gordura e proteínas da pele.

- Equilibra-se o gel em tampão de transferência por 10 min para permitir que ele aumente ou encolha antes do contato com a membrana de nitrocelulose e para remover o excesso de sais de tampão e detergentes;
- Recorta-se a membrana de nitrocelulose e dois papéis-filtro do tamanho do gel, com máximo 0,5 cm maior (material excedente pode dobrar durante a transferência, gerando um curto circuito);
- Pré-umedece-se a membrana de nitrocelulose em água destilada, cuidando para não formar bolhas (mergulhar uma das bordas e submergir lentamente);
- Mergulha-se a membrana de nitrocelulose em tampão de transferência por 2-5 min;
- Umedece-se os dois papéis-filtro em tampão de transferência;
- Monta-se o “stack” de transferência seguido os passos:
- Centraliza-se uma camada de esponja sobre o lado catódico do módulo;
- Coloca-se um dos papéis-filtro sobre a esponja;
- Posiciona-se o gel equilibrado sobre o papel-filtro; umedece-se a superfície do gel com gotas de tampão de transferência;

- Coloca-se membrana de nitrocelulose sobre o gel; não reposicionar a membrana após ela entrar em contato com o gel (há transferência de proteínas pelo simples contato);
- Coloca-se o outro papel-filtro sobre a membrana de nitrocelulose;
- Coloca-se mais 2 camadas de esponjas sobre o papel-filtro;
- Obs.: um segundo "stack" de transferência pode ser executado entre estas outras duas camadas de esponjas. Para isso, repetir passos b-e.
- Verifica-se a posição do "stack" de transferência que deve estar centralizado sobre a placa de eletrodo (nenhuma camada deve ser "beliscada" quando o módulo for fechado) e fecha-se o módulo.

1.5.2. Eletrotransferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose

- Entorna-se 300-350 ml de tampão de transferência dentro do módulo; bate-se de leve o jogo de blotting para expulsar quaisquer bolhas de ar das esponjas;
- Posiciona-se o módulo no tanque com os "plugs" voltados ao centro;
- Adiciona-se 1,7 litros de água deionizada a 4° C no tanque;
- Coloca-se a tampa de segurança sobre o tanque;
- Inicia-se a eletrotransferência a 25 V e 300-400 mA por 1-2 hrs;
- Após a eletrotransferência, retira-se o módulo do tanque e joga-se o tampão de transferência; marca-se cada membrana e indica-se o lado das amostras; suspende-se a membrana com uma pinça e deixa-se secar ao ar.

1.5.3. Bloqueio de sítios não específicos

- Incuba-se a membrana com tampão de bloqueio por 30 min a 1 hr à temperatura ambiente com agitação ou *overnight* a 4-8° C.

1.5.4. Incubação com o primeiro anticorpo: anti-IRS-1 ou anti-GLUT-4

- incuba-se a membrana em solução de bloqueio com anticorpo primário (anti-IRS-1 ou anti-GLUT-4), com volume suficiente para cobrir a membrana de nitrocelulose por 30' a 1 hr com agitação ou *overnight* a 4-8° C;
- lava-se a membrana com tampão de lavagem 4 vezes de 5 min com agitação e volumes de tampão apropriados (suficientes para cobrir completamente a membrana de nitrocelulose).

1.5.5. Incubação com o anticorpo secundário conjugado ao HRP

- incuba-se a membrana em solução de bloqueio contendo o anticorpo secundário conjugado ao HRP por 30' a 1 hr à temperatura ambiente com agitação ou *overnight*;
- lava-se a membrana com tampão de lavagem 4 vezes de 5 min com agitação e volumes de tampão apropriados.

1.5.6. Incubação com o substrato quimioluminescente/acentuador

- Incuba-se a membrana em solução de trabalho por 5 min com agitação; usa-se volume suficiente para cobrir completamente a membrana;
- Remove-se a membrana da solução de trabalho e deixa-se que o excesso da solução escorra dela; coloca-se um protetor de membrana, tal como um

protetor plástico, sobre a membrana de nitrocelulose e retira-se quaisquer bolhas de ar.

1.5.7. Revelação

- Coloca-se a membrana em cassete, sobrepô-la com um filme e expô-la por um comprimento de tempo apropriado (uma primeira exposição de 30 s é recomendada e, conforme resultado, acerta-se o tempo de exposição inicial);
- Revela-se o filme.

2. SOLUÇÕES

2.1. Soluções usadas para a incubação

2.1.1. Tampão de Krebs-Ringer (130 ml = volume para incubação de 20 músculos)

NaCl 0,9% + Hepes 10 mM	100ml
CaCl ₂ 0,11M	1,5ml
KH ₂ PO ₄ 2,11%	1ml
Mg SO ₄ 3,82%	1ml
KCl 1,15%	4ml
Na HCO ₃ 1,3 %	21ml

- Gaseificar com O₂ 95% por 30 min (cobrir com um plástico para não perder muito gás);
- Acertar o pH com HCl/NaOH para 7,4;
- Adicionar a albumina sérica bovina (BSA) 1% do volume total e esperar que ela dissolva no meio a 37°C;
- Adicionar a glicose na concentração de 5,5mM do volume total.

Obs.: preparar o tampão Krebs-Ringer somente no dia que será usado (as soluções separadas podem ser preparadas antecipadamente e armazenadas a 4°C); adicionar a glicose e o BSA apenas na hora de uso.

2.1.2. Solução de insulina

- Diluir a solução-mãe de insulina (100U/ml) 10000 vezes em salina/Hepes (NaCl 0,9%; Hepes 10mM);
- Para a incubação, adicionar 300 µl em 3 ml de tampão Krebs-Ringer (concentração final de 1000 µU de insulina por ml).

Obs.: preparar a diluição da insulina em gelo, apenas na hora de uso.

2.1.3. Peróxido de ortovanadato de sódio

- Preparar uma solução com 20 mM de ortovanadato de sódio, acertar o pH com NaOH/HCl para 10;
- Esta solução fica amarelada, então deve-se fervê-la coberta por um plástico para não evaporar a água, até ficar translúcida; esperar esfriar e guardar a 4°C;

- Para a incubação de 20 músculos, incubar 3 ml da solução de ortovanadato de sódio com mais 3 ml de peróxido de hidrogênio 30% (H₂O₂) a 20°C por 10 min;
- Adicionar a catalase 200µg/ml e incubar por mais 10 min;
- Para a incubação, adicionar 300 µl da solução de peróxido de ortovanadato de sódio em 3 ml de tampão Krebs-Ringer (concentração final de 1 mM de peróxido de ortovanadato de sódio).

Obs.: peroxidar o ortovanadato de sódio somente na hora de uso.

2.2. Solução para medir lactato

2.2.1. Tampão para medir lactato

EDTA 7.52 mM

Glicina 373mM

Hidrato de Hidrazina 1.5%

LDH solúvel 306 U/ml

NAD⁺ 0.9 mM

- Inicialmente pesar o EDTA (quelante de íons) e solubilizar no agitador magnético;
- Pesar a glicina (usada para tamponar), misturar e solubilizar;
- Colocar o hidrato de hidrazina;
- Acertar o pH com NaOH/HCl para 8,85;
- Por último colocar o LDH e o NAD⁺;

Obs.: após colocar o LDH e o NAD⁺, deixar o tampão a 4° C.

2.3. Soluções para quantificação protéica

2.3.1. Tampão de lise

Tris-HCl 50mM pH 7.5

Na Cl 150 mM

Brij, Triton ou Tween 20 1%

Ortovanadato de sódio 1mM

Apropitina 10 µg/ml

2.3.2. Solução de Bradford

- Azul Brilhante de Coomassie G-250 0.01%
- Etanol 4.75%
- Ácido fosfórico 8.5%
- Dissolver o corante com o etanol;
- Adicionar o ácido fosfórico;
- Completar o volume com água destilada;
- Guardar em frasco âmbar a 4° C.

Obs.: antes de transferir a solução para uma garrafa escura, lavar a garrafa 3 vezes com a própria solução; o corante é estável a 4°C por 6 meses.

2.3.3. Tampão de amostra para proteínas (3X) - Tampão Laemmli

- Tris-HCl 62.5 mM
- beta-mercaptoetanol 1% (v/v)
- SDS 2%
- glicerol 10% (v/v)
- azul de bromofenol 0,01%
- Ajustar o pH para 6.8 com Tris-HCl/Tris e armazenar a -20°C.

2.4. Soluções para eletroforese

2.4.1. Gel de separação

- Tris 375 mM pH 8.8
- Acrilamida:Bisacrilamida (30:1) - 7.5 ou 12%
- SDS 0.1%
- APS 0.05%
- TEMED 0.1%

Obs.: colocar o persulfato de amônio e o TEMED somente na hora do uso.

2.4.2. Gel de empilhamento

- Tris 125 mM pH 8.8
- Acrilamida:Bisacrilamida (30:1) - 4%
- SDS 0.1%
- APS 0.1%

➤ TEMED 0.2%

Obs.: colocar o persulfato de amônio e o TEMED somente na hora de uso.

2.4.3. Tampão de corrida

➤ 25mM Tris

➤ 250 mM glicina (pH 8,3)

➤ 0,1% SDS

➤ Acertar o pH com Tris base/glicina para 8,3 e armazenar a 4°C.

Obs.: este tampão pode ser usado de 5-6 vezes.

2.4.4. Corante Azul de Coomassie

Coomassie 0,05%

Metanol 45,5%

Ácido acético 9,1%

➤ Guardar em frasco âmbar e armazenar à temperatura ambiente (TA).

2.4.5. Tampão para descorar Gel

Metanol 30%

Ácido acético 7.5%

➤ Guardar em frasco âmbar e armazenar à TA.

2.4.6. "Kit" de Coloração de prata

- Tampão de fixação: etanol 40%, ácido acético glacial 10%;
- Tampão de sensibilização: etanol 30%, glutardialdeído 0.125%, trifosfato de sódio 0.2%, acetato de sódio 830 mM;
- Reativo de prata: nitrato de prata 0.25%, formaldeído 0.015%;
- Tampão de revelação: carbonato de sódio 236 mM, formaldeído 0.0075%;
- Tampão de parada: EDTA dissódio dihidratado 40 mM;
- Tampão de preservação: etanol 30%, glicerol 4%.

2.5. Soluções para "Western Blotting"

2.5.1. Tampão de transferência

- Glicina 3mM
- Tris base 48mM
- SDS 0,037%
- Acertar o pH com Tris base/glicina para 8,3; adicionar, por último, o metanol a 20%.

Obs.: este tampão deve ser preparado apenas no dia de uso.

2.5.2. TBS

- Tris-HCl 10 mM pH 7.5
- NaCl 150 mM

2.5.3. Tampão de bloqueio

- Dissolver leite desnatado a 5% e BSA a 3% em TBS.

2.5.4. Tampão de incubação

- Dissolver BSA a 1% em TBS.

2.5.5. Tampão de lavagem

- Dissolver Tween 20 a 0.3% em TBS.

2.5.6. Corante Vermelho Ponceau

- Ponceau 0.1%
- Ácido acético glacial 5%
- Guardar em frasco âmbar e armazenar a TA.

IV. RESULTADOS

A produção total de lactato pelo músculo sóleo incubado está representada na fig.1. Nos músculos incubados com peróxido de ortovanadato de sódio ou insulina, a produção total de lactato dobrou quando comparada ao controle.

O perfil eletroforético das proteínas obtidas dos músculos incubados durante 15" está representado na fig. 2a. Observa-se aumento na banda protéica de peso molecular de aproximadamente 43 KDa no músculo incubado com peróxido de ortovanadato de sódio (fig. 2a), expressão esta que se manteve durante os 30, 60 e 90 segundos subseqüentes (fig. 2b). O aumento desta banda nos músculos incubados com insulina só apareceu no tempo de 90 segundos (fig. 2b).

Com relação à banda que corresponde ao IRS-1, não foi detectado sua expressão nos tempos incubados.

Nas figuras 3a, 3b e 3c está identificada a proteína de peso molecular de aproximadamente 43.2 KDa representada nas figs. 2a e 2b, através da utilização de anticorpo anti-GLUT-4 pela técnica de *Western Blotting*.

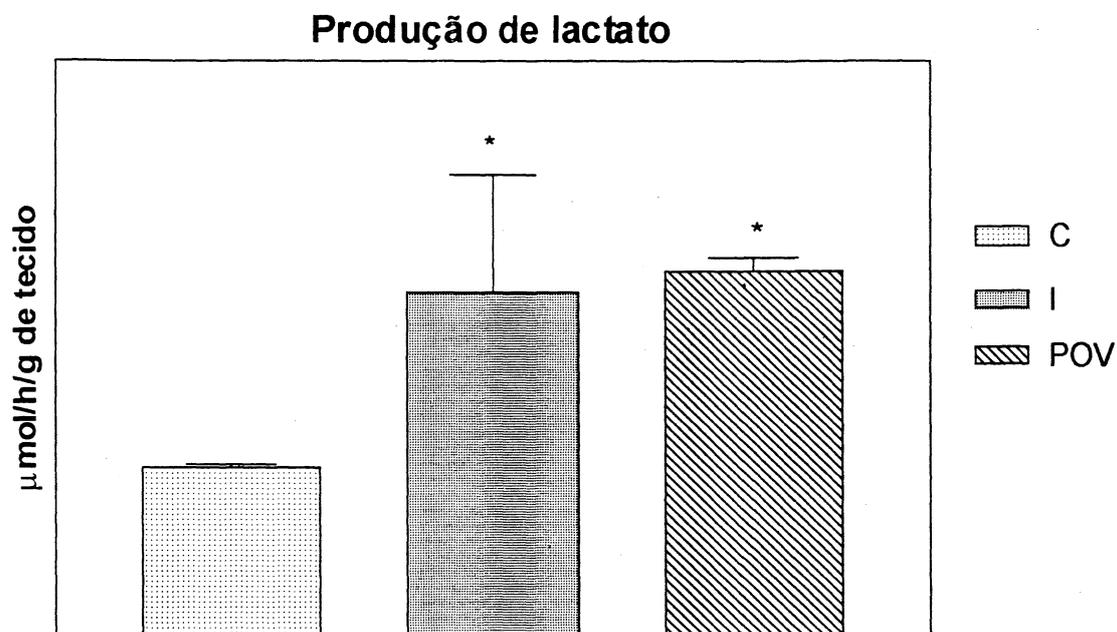


Figura 1: Lactato total produzido pelo músculo e exportado para o meio de incubação. Os dados estão apresentados com média \pm EPM de 5 incubações em duplicata. POV = peróxido de ortovanadato de sódio; I = insulina e C = controle. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

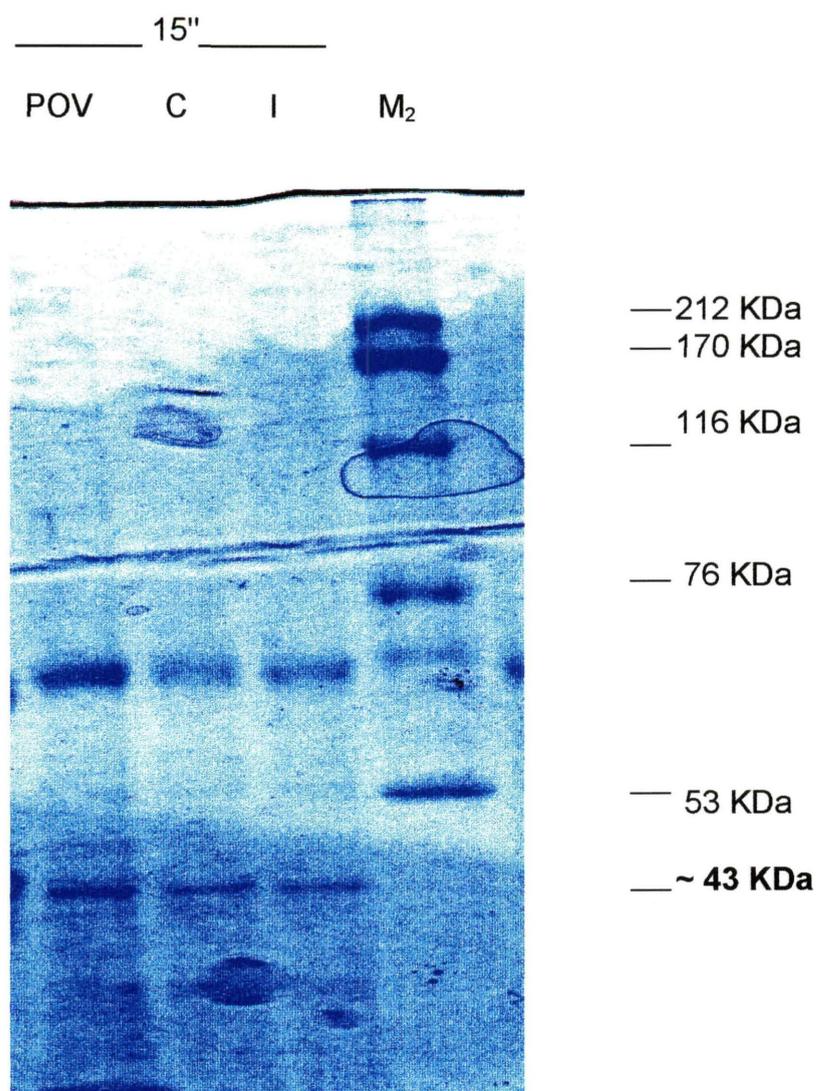


Figura 2a: Mini-gel de poliacrilamida a 7,5%, submetido a eletroforese "SDS-PAGE", mostrando o perfil eletroforético das proteínas obtidas dos músculos incubados durante 15". Foram colocados 72 μ g de proteínas por "lane". M₂ representa um marcador de peso molecular; POV = peróxido de ortovanadato de sódio; I = insulina e C = controle.

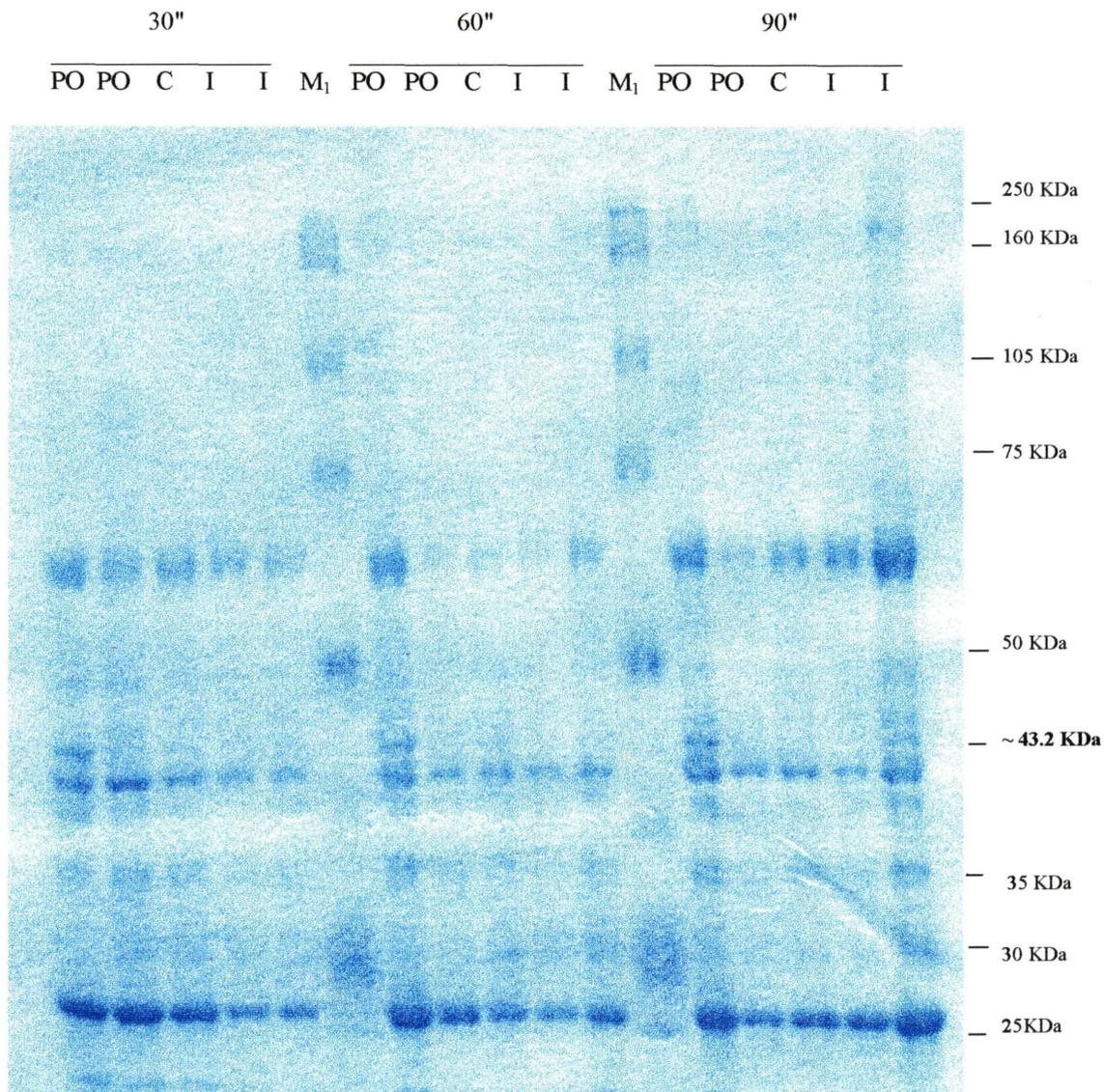


Figura 2b: Gel de poliacrilamida a 7,5%, submetido a eletroforese "SDS-PAGE", mostrando o perfil eletroforético das proteínas obtidas dos músculos incubados durante 30, 60 e 90". Foram colocados 52 µg de proteínas por "lane". M₁ representa um marcador de peso molecular; POV = peróxido de ortovanadato de sódio; I = insulina e C = controle.



Figura 3a: *Western Blotting* para o GLUT-4. Músculos sóleos incubados com insulina (I) ou peróxido de ortovanadato de sódio (POV) durante 15 segundos. C = controle.

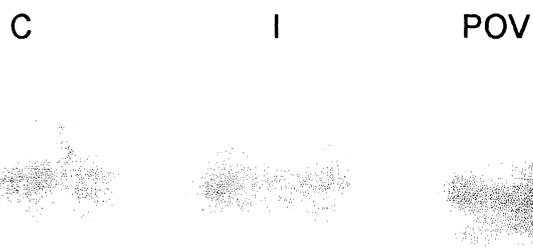


Figura 3b: *Western Blotting* para o GLUT-4. Músculos sóleos incubados com insulina (I) ou peróxido de ortovanadato de sódio (POV) durante 30 segundos. C = controle.

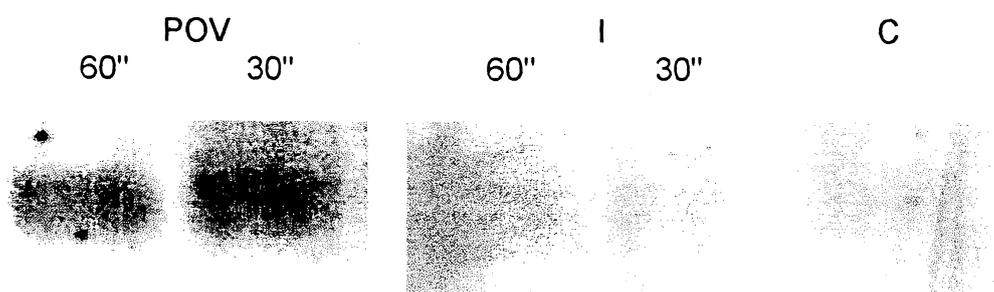


Figura 3c: *Western Blotting* para o GLUT-4. Músculos sóleos incubados com insulina (I) ou peróxido de ortovanadato de sódio (POV) durante 30 e 60 segundos. C = controle.

V. DISCUSSÃO

A diabetes é uma síndrome que acompanha diferentes patologias. Associado ao seu desenvolvimento, alterações importantes ocorrem no metabolismo intermediário, levando a intenso catabolismo. A reversão deste quadro ou a sua amenização é de fundamental importância para a integridade do organismo. Resistência à insulina é um relato comum em diversas patologias, tais como diabetes, câncer, traumas em geral, jejum, etc.. Portanto, o estudo de substâncias com atividades "insulin-like" e com mecanismos de ação diferentes ao da insulina é de grande interesse, pois permitirá o seu uso na terapia destas patologias. Os sais de vanádio, peroxidados ou não, têm sido mostrados terem esta habilidade.

É sabido que o transporte de glicose pelas células musculares esqueléticas e adipócitos é mediado por transportador específico, o GLUT-4, o qual é translocado à membrana plasmática, aumentando a captação de glicose (Cushman *et al.*, 1980; Suzuki *et al.*, 1980; Slot *et al.*, 1991). Nossos resultados mostram que tanto a insulina quanto o peróxido de ortovanadato de sódio aumentaram o metabolismo de glicose pelo músculo esquelético, o qual foi avaliado através do lactato total produzido pelo músculo e exportado para o meio de incubação (fig. 1). Este resultado é corroborado por nossos dados anteriores (Tchaikovski *et al.*, 1999).

O perfil eletroforético das proteínas musculares mostrou que não houve aumento significativo na banda correspondente à proteína IRS-1, pois esta mostrou-se pouco intensa, dificultando a sua análise. Submetidas ao *Western Blotting*, também não foi possível detectar quantidades suficientes de IRS-1 nos grupos e

tempos estudados. Nossa explicação para este resultado deve-se à baixa especificidade do anticorpo utilizado.

Com relação à banda correspondente à proteína GLUT-4, o peróxido de ortovanadato de sódio foi capaz de aumentá-la nos tempos de 15, 30, 60 e 90" (figs. 2a e 2b). A incubação com insulina promoveu o aparecimento desta banda somente no tempo de 90" (fig. 2b). Este aumento na banda poderia não estar relacionado com o aumento da expressão do GLUT4, visto que o perfil eletroforético mostra as proteínas musculares totais com diferentes massas (uma banda pode não corresponder somente à uma proteína, mas a várias de mesmo peso molecular). Para responder a questão de que a banda de aproximadamente 43 KDa correspondia ao GLUT-4, submetemos as amostras ao *Western Blotting*. O resultado obtido pela utilização de anticorpo específico contra GLUT-4 confirmou a presença de GLUT-4. No tempo de 15" tanto o peróxido de ortovanadato de sódio quanto a insulina, aumentaram a expressão de GLUT-4 (fig. 3a). A 30" somente o peróxido de ortovanadato de sódio manteve a expressão aumentada de GLUT-4, enquanto que a insulina retornou aos níveis do controle (3b). A 60" o resultado se repetiu, mas pode-se observar que o grau de expressão de GLUT-4 começa a diminuir quando comparado aos 30" (3c). Após 90" não foi observada expressão desta proteína (dados não mostrados). Pâquet *et al.*, 1992, demonstraram que o vanadato aumentou o recrutamento de GLUT-4 de vesículas intracelulares para a membrana plasmática em adipócitos de ratos *in vitro*, usando anticorpos radiomarcados.

O processo de expressão de GLUT-4 na membrana celular é transitório e reversível, resultando em um ciclo do GLUT-4 de vesículas intracelulares para a membrana plasmática e vice-versa (Stephens *et al.*, 1995). Isto pode explicar o resultado obtido pela ação da insulina onde houve mais expressão nos 15" e, em seguida, retornou aos níveis do controle (fig. 3a e 3b). Interessantemente, nos grupos incubados com peróxido de ortovanadato de sódio nos diferentes tempos a expressão de GLUT-4 foi maior e perdurou por mais tempo, quando comparado ao controle e à insulina, havendo redução de sua expressão após 60" (figs. 3a-c). Esta diferença de expressão de GLUT-4 estimulado com peróxido de ortovanadato de sódio e insulina pode ser, talvez, explicado por uma das possíveis hipóteses do mecanismo de ação dos sais de vanádio, ou seja, de que ele é um potente inibidor de fosfatase (Swarup *et al.*, 1982). Na presença desta substância, fosfatases presentes na célula são inibidas por período de tempo maior, o que explicaria o porquê do GLUT-4 ser expresso por período de tempo maior que o da insulina (4 vezes).

Nossos resultados, portanto, permitem sugerir que o peróxido de ortovanadato de sódio tem efeito "insulin-like" e, certamente, o GLUT-4 é uma proteína intracelular recrutada neste processo. Este resultado mostrando a participação do GLUT-4 sob a ação do POV é inédito, sendo nosso trabalho o primeiro a mostrar a participação desta proteína intracelular envolvida no mecanismo de ação da insulina em músculo esquelético.

VI. CONCLUSÃO

A proteína GLUT-4 está envolvida no mecanismo de ação do peróxido de ortovanadato de sódio em músculo sóleo e este é um dos mecanismos pelo qual o vanádio exerce seus efeitos *insulin-like*, porém acreditamos que sua via de sinalização seja diferente do da insulina, pois estes sais atuam em situações onde há resistência à insulina.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDINI, G.; HOHMAN, R.; CHARRON, M. J.; LODISH, H. F. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 4037-40, 1991.
- BLONDEL, O.; SIMON, J.; CHEVALIER, B.; PORTHA, B. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. E459-67, 1990.
- BOMAN, A. L.; KAHN, R. A. **Trends Biochem. Sci.**, v. 20, p. 147-50, 1995.
- BRADFORD, M. M. **Anal. Biochem.**, v. 142, p. 79-83, 1976.
- CARVALHO, C. R. O.; BRENELLI, S. L.; SILVA, A. C.; NUNES, A. L. B.; VELOSO, L. A.; SAAD, M. J. A. **Endocrinology**, v. 137, p. 151-59, 1996.
- CHALLISS, R. A. J.; LEIGHTON, B.; LOZEMAN, F. J.; BUDOHOSKI, L.; NEWSHOLME, E. A. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 357-61, 1987.
- CHEATHAM, B.; VLAHOS, C. J.; CHEATHAM, L.; WANG, L.; BLENIS, J.; KAHN, C. R. **Mol. Cell Biol.**, v. 14, p. 4902-11, 1994.
- CLARK, J. F.; YOUNG, P. W.; YONEZAWA, K.; FASUGA, M.; HOLMAN, G. D. **Biochem. J.**, v. 300, p. 631-35, 1994.
- CONN, P. M.; MELMED, S. **Endocrinology**, p. 355, 1997.
- CUSHMAN, S. W.; WARDZALA, L. J. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 4758-62, 1980.
- DEFRONZO, R. A. **Diabetes**, v. 37, p. 667-87, 1998.
- DELFTERT, D. M.; MCDONALD, J. M. **Arch Biochem. Biophys.**, v. 241, p. 665-72, 1985.
- DUBYAK, G. R.; KLEINZELLER, A. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 5306-12, 1980.
- DUCKWORTH, W. C.; SOLOMON, S. S.; LIEONIEKS, J.; HAMEL, F. G.; PEAVY, D. E. **Endocrinology**, v. 122, p. 2285-89, 1988.

- ENGLE, P. C.; JONES, J. B. **Anal Biochem.**, v. 88, p. 475-84, 1978.
- ERIKSSON, J.; FRANSSILA-KALLUNKI, A.; EKSTRAND, A.; SALORANT, C.; WIDEN, E.; SCHALIN, C.; GROOP, L. N. **Engl. J. Med.**, v. 321, p. 337-43, 1989.
- GHERZI, R.; CARATTI, C.; ANDRAGHETTI, G.; BERTOLINI, S.; MONTEMURRO, A.; SESTI, G.; CORDERA, R. **Biochem. Biophys.**, v. 152, p. 1474-80, 1988 (Resumo).
- HARA, K.; YONEZAWA, K.; SAKAUE, H.; ANDO, A.; KOTANI, K.; KITAMURA, T.; KITAMURA, Y.; UEDA, H.; STEPHENS, L.; JACKSON, T. R.; HAWKINS, P. T.; DHAND, R.; CLARK, A. E.; HOLMAN, G. D.; WATERFIELD, M. D.; KASUGA, M. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 7415-19, 1994.
- HELMS, J. B. **Febs Lett.**, v. 369, p. 84-88, 1995
- HEYLIGER, C. E.; TAHILIANI, A. G. **MacNeill JH. Science**, v. 227, p. 1274-77, 1985.
- JACKSON, T. D.; SALHANICK, A. I.; SPARKS, J. D.; SPARKS, C. E. **Diabetes**, v. 37, p. 1234-40, 1988.
- JAMES, D. E.; STRUBE, M.; MUECKLER, M. **Nature**, v. 338, p. 83-87, 1989.
- KADOTA, S.; FANTUS, G.; DERAGON, G.; GUYDA, H. J.; HERSH, B.; POSNER, B. **I. Biochem. Biophys. Res. Commun. V. 147**, p. 259-266, 1987.
- KAHN, C. R. **Diabetes**, v. 43, p. 1066-84, 1994
- KANAI, F.; ITO, K.; TODAKA, M.; HAYASHI, H.; KAMOHARA, S.; ISHII, K.; OKADA, T.; HAZEKI, O.; UI, M.; ELBINA, Y. **Biochem. Biophys.**, v. 195, p. 762-68, 1994 (Resumo).
- KAPPELLER, R.; CANTLEY, L. C. **BioEssays.**, v. 16, p. 565-76, 1994.
- KLIP, A.; PAQUET, M. R. **Diabetes Care**, v. 3, pp 228-243, 1990.

- KUHNE, M. R.; PAWSON, T.; LIENHARD, G. E.; FENG, G. S. **J Biol Chem.**, v. 268, p. 11479-81, 1993.
- LAEMMLI, U. K. **Nature.**, v. 227, p. 680-85, 1970.
- LIU, J. P.; ROBINSON, P. J. **Endocr. Rev.**, v. 16, p. 590-607, 1995.
- MAASSEN, J. A.; OUWENS, D. M. **Molecular Pathogenesis of Diabetes mellitus**, v. 22, pp 201-221, 1997.
- MOONEY, R. A.; BORDWELL, K. L.; LUHOWSKY, S.; CASNELLIE, J. H. **Endocrinology**, v. 124, p. 422-29, 1989.
- MYERS, M. G.; WHITE, M. F. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 615-58, 1996.
- MYERS, M. G. Jr.; BACKER, J. M.; SUN, X. J.; SHOELSON, S. E.; HU, P.; SCHLESSINGER, J.; YOAKIM, M.; SCHAFFHAUSEN, B.; WHITE, M. F. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 10350-54, 1992.
- MYERS, M. G. Jr.; WANG, L. M.; SUN, X.; ZHANG, Y.; YENUSH, L. P.; SCHLESSINGER, J.; PIERCE, J. H.; WHITE, M. F. **Mol Cell. Biol.**, v. 14, p. 3577-87, 1994.
- MYERS, M. G.; SUN, X. J.; WHITE, M. F. **Trends Biochem. Sci.**, v. 19, p. 289-94, 1994.
- NOGUCHI, T.; MATOZAKI, T.; HORITA, K.; FUJIOKA, Y.; KASUGA, M. **Mol Cell. Bio.**, v. 14, p. 6674-82, 1994.
- NOVICK, P.; BRENNWALD, P. **Cell**, v. 75, p. 597-601, 1993.
- OKADA, T.; KAWANO, Y.; SAKAKIBARA, T.; HAZEKI, O.; UI, M. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 3568-73, 1994.

- PAQUET, M. R.; ROMANEK, R. J.; SARGENT, R. J. **Fund. Clin. Pharmacol.**, v. 4, n.1, p. 44, 1990 (Resumo).
- PAQUET, M. R.; ROMANEK, R. J.; SARGENT, R. J. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 109, pp 149-155, 1992.
- PUGAZHENTHI, S.; TANHA, F.; DAHL, B.; KHANDELWAL, R. L. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 125-129, 1995.
- PUGAZHENTHI, S.; KHANDELWAL, R. L. **Mol Cell Biochem.**, v. 217-218, p. 211-18, 1993.
- RAMASARMA, T.; CRANE, F. L. **Curr. Topics Cell. Reg.**, v. 20, p. 247-301, 1981.
- ROBINSON, L. J.; PANG, S.; HARRIS, D. S.; HEUSER, J.; JAMES, D. E. **J. Cell Biol.**, v. 117, p. 1181-96, 1992.
- ROSSETTI, L.; LAUGHLIN, M. R. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 892-99, 1989.
- SAAD, M. J. A.; HARTMAN, L. G. C.; CARVALHO, D. S.; GALORO, C. A. O.; RENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R. O. **Endocrine**, v. 3, p. 755-59, 1995.
- SLOT, J. W.; GEUZE, H. J.; GIGENGACK, S.; LIENHARD, G. E.; JAMES, D. E. **J. Cell Biol.**, v. 113, pp 123-135, 1991.
- STEPHENS, J. M.; PILCH, P. F. **Endocr. Rev.**, v. 16, pp 529-546, 1995.
- STROUT, H. V.; VICARIO, P. P.; BISWAS, C.; SAPERSTEIN, R.; BRADY, E. J.; PILCH, P. F.; BERGER, J. **Endocrinology**, v. 126, p. 2728-2732.
- STROUT, H. V.; VICARIO, P. P.; SAPERSTEIN, R.; SLATER, E. E. **Endocrinology**, v. 124, p. 1918-24, 1989.
- SUN, X. J.; ROTHENBERG, P.; KAHN, C.; BACKER, J. M.; ARAKI, E.; WILDEN, P. A.; CAHILL, D. A.; GOLDSTEIN, B. J.; WHITE, M. F. **Nature**, v. 352(6330), p. 73-77, 1991.

- SUN, X. J.; CRIMMINS, D. L.; MYERS, M. G.; MIRALPEIX, M.; WHITE, M. F. **Mol. Cell Biol.**, v. 13, p. 7418-28, 1993.
- SUN, X. J.; ROTHENBERG, P.; KHAN, C. R.; BACKER, J. M.; ARAKI, E.; WILDEN, P. A.; CAHILL, A.; GOLDSTEIN, B. J.; WHITE, M. F. **Nature**, v. 352, p. 73-77, 1995.
- SUZUKI, K.; KONO, T. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, p. 2542-45, 1980.
- SWARUP, G.; COHEN, S.; GARBERS, D.L. **Biochem. Biophys.**, v. 107, p. 1104-09, 1982 (Resumo).
- SWARUP, G.; SPREEG, K. V. Jr.; COHEN, S.; GARBERS, D. I. **J. Biol. Chem.**, v. 257, pp 7298-7301, 1982.
- TAMURA, S.; BROWN, T. A.; WHIPPLE, J. H.; FUJITA-YAMAGUCHI, Y.; DUBLER, R. E.; CHENG, K.; LARNER, J. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 6650-58, 1994.
- TAMURA, S.; BROWN, T. A.; WHIPPLE, J. H.; YAMAGUCHI, Y. F.; DUBLER, R. E.; CHEN, K.; LARNER, J. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 6650-58, 1984.
- TCHAIKOVSKI, O. Jr.; PARDAL, D.; LOPES, M. C. P. **Evinci 99**, v. 1, p. 114, 1999.
- TOLMAN, E. L.; BARRIS, E.; BURNS, M.; PANSINI, A.; PARRIDGE, A. **Life Sci.**, v. 25, p. 1159-64, 1979.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p. 4350-54, 1979.
- TRACY, A. S.; GRESSER, M. J. **PROC. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 609-13, 1986.
- WANG, L. M.; MYERS, M. G. JR.; SUN, X. J.; ANRONSON, S. A.; WHITE, M. F.; PIERCE, J. H. **Science**, v. 261, p. 1591-94, 1993.
- WHITE, M. F. **Diabetologia**, v. 40, pp S2-S17, 1997.
- WHITE, M. F.; KAHN, C. R. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p.1-4, 1994.

WHITE, M. F.; MARON, R.; KAHN, C. R. **Nature**, v. 318, p.183-86, 1985.

WHITMAN, M. DOWNES, C. P.; KEELER, M.; KELLERT, T.; CANTLEY, L. **Nature**,
v. 332, p.644-46, 1988.

YANO, Y.; SUMIDA, Y.; BENZING, C.F.;; ROBINSON, F. W.; KONO, T. **Biochim.**
Biophys. Acta, v. 1176, p.327-32, 1993.