

RICARDO KEY YAMAZAKI

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE AÇÃO
DO ORTOVANADATO DE SÓDIO PEROXIDADO EM MÚSCULO SÓLEO DE
RATO ISOLADO INCUBADO “IN VITRO”**

CURITIBA 2001

RICARDO KEY YAMAZAKI

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE AÇÃO
DO ORTOVANADATO DE SÓDIO PEROXIDADO EM MÚSCULO SÓLEO DE
RATO ISOLADO INCUBADO “IN VITRO”**

Monografia apresentada para a
obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas da UFPR.

Orientador: Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA 2001

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, pelo apoio e incentivo que possibilitaram o desenvolvimento desta monografia.

Aos meus pais, pelo amor e carinho que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

Aos meus amigos Sandro M. Hirabara, Osvaldo Tchaikovski Jr. e Prof. Mestre Alessandra Folador, pela ajuda e ensinamentos proporcionados no cotidiano do laboratório.

Aos colegas de laboratório Júlia, Fábio, Karla, Valéria, Cláudia, Cecília, Mariana, Débora e Irlena, que proporcionaram um excelente ambiente de trabalho.

A todas minhas amigas da faculdade, pela amizade e alegria proporcionada durante estes 4 anos passados juntos.

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO.....	1
	1) Diabetes Mellitus.....	1
	2) Insulina.....	4
	3) Sais de Vanádio.....	6
II.	OBJETIVOS.....	9
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	10
	1. Procedimentos.....	10
	1.1. Incubação do músculo sóleo.....	10
	1.2. Quantificação protéica.....	11
	1.3. Eletroforese: método “SDS-PAGE”.....	13
	1.4. “Western Blotting”.....	15
IV.	RESULTADOS.....	19
V.	DISCUSSÃO	22
VI.	CONCLUSÃO.....	24
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
	APÊNDICE 1 – Soluções.....	29

LISTA DE SIGLAS

IRS	– Insulin Receptor Substrate
GLUT-4	– Glucose Transporter-4
MAPK	– Mitogen Activated Protein Kinase
PI-3K	– Phosphatidil Inositol – 3 Kinase
PH	– Pleckstrin Homology
PTB	– Phosphotyrosine Binding
RTK	– Receptor Tيروسine Kinase
PTP	– Phosphotyrosine Phosphatase
PKB	– Proteína Kinase B

RESUMO

A diabetes é uma doença que acomete milhões de pessoas em todo o mundo. Associado à ela, alterações importantes ocorrem no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, levando a várias complicações crônicas a nível microvascular (retinopatias, nefropatias) e macrovascular (doenças coronárias, doenças vasculares periféricas). O tipo mais comum de diabetes é o denominado insulino-independente (tipo II), caracterizado principalmente pela resistência periférica à insulina. Deste modo, o estudo de substâncias com atividades insulino-miméticas é de interesse particular para a reversão ou amenização deste quadro. Este trabalho teve como objetivo investigar os papéis do IRS-1, IRS-2, PI-3K e GLUT-4 no mecanismo de ação do ortovanadato de sódio peroxidado, um composto *insulin-like*, em músculo sóleo *in vitro*. Ratos machos Wistar pesando entre 150 - 180 g foram sacrificados por deslocamento cervical, seus músculos sóleos retirados e pré-incubados por 30' em tampão Krebs-Ringer. Em seguida, os músculos foram transferidos para 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 segundos. 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 (gel de 7,5%) e, em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à técnica de "Western Blotting" para a identificação das proteínas específicas. As proteínas intracelulares IRS-1, PI-3K e GLUT-4 estão envolvidas no mecanismo de ação do peróxido de ortovanadato de sódio. A IRS-2 não foi detectada nos experimentos.

I - INTRODUÇÃO:

A Diabetes mellitus é uma doença caracterizada, principalmente, pela presença de hiperglicemia, causada por deficiência na secreção e/ou na ação da insulina. A Diabetes mellitus do tipo II (não dependente de insulina) é a mais comum, podendo causar sérias complicações no sistema circulatório, excretório e nervoso (GUYTON, 1997).

A insulina é um hormônio produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans, distribuídas em todo o pâncreas. Sua capacidade de induzir respostas anabólicas no fígado, tecido muscular e tecido adiposo são de extrema importância para o funcionamento do organismo. Devido a estas características, a insulina poderia ser ótima no tratamento de doenças que provocam catabolismo, como a diabetes e o câncer. Além disso, a insulina estimula várias respostas celulares como a captação de íons e aminoácidos pelas células, rearranjo do citoesqueleto e regulação de enzimas celulares (MAASSEN; OWENS, 1997).

Os sais de vanádio são compostos que vêm despertando interesse, devido à sua ação insulinomimética. O estudo destes compostos é importante para uma possível utilização dos sais como tratamento alternativo a doenças relacionadas à resistência à insulina, especificamente a Diabetes mellitus tipo II (TSIANI; FANTUS, 1997).

1) *Diabetes mellitus*:

A diabetes pode ser classificada como primária e secundária. A secundária corresponde a apenas 5% dos casos e ocorre devido a processos que inibem a secreção de insulina, seja por destruição do pâncreas, inibição específica da secreção de insulina ou aumento na concentração de hormônios contra-regulatórios. A primária é a mais comum, com 95% dos casos, e está subdividida em tipo I (dependente de insulina) e tipo II (não dependente de insulina). A diabetes tipo I é a menos comum e é causada pela destruição autoimune das células β pancreáticas. Também conhecida como diabetes do tipo juvenil, por atingir indivíduos com idade abaixo de 30 anos, esta

doença apresenta sintomas clínicos severos como poliúria (aumento do fluxo urinário), polidipsia (aumento da ingestão de água) e perda de peso com elevadas concentrações séricas de glicose. Outra consequência é a cetoacidose, que devido à lipólise aumentada, faz com que o fígado produza grandes quantidades de corpos cetônicos, que são liberados para o líquido extracelular. Como resultado, o organismo sofre acidose metabólica e perde quantidade significativa de água e eletrólitos, provocando diminuição do volume plasmático, insuficiência circulatória e coma, podendo ocasionar a morte (AIRES, 1999).

A diabetes tipo II é dez vezes mais freqüente que a tipo I, mais comum em indivíduos adultos, e está relacionada, tanto a um defeito na ação da insulina nos seus sítios de ação quanto a uma disfunção na secreção de insulina pelo pâncreas (KRUSZYNSKA; OLEFSKY, 1996). Em 85% dos casos, esta doença está relacionada com a obesidade, um fator que aumenta a resistência à insulina, e que ainda não está completamente compreendido (GUYTON, 1997). Devido a quantidades significativas de insulina residual, a hiperglicemia e cetoacidose no organismo não é tão acentuada nos indivíduos diabéticos do tipo II, dificultando o diagnóstico precoce da doença. Por esta razão, a diabetes tipo II causa complicações crônicas a nível microvascular (retinopatias, nefropatias) e macrovascular (doenças coronárias, doenças vasculares periféricas). Neuropatias também ocorrem comumente e são a maior causa de morbidade desta doença (FEINGOLD; FUNK, 1997).

Concentrações elevadas de ácidos graxos livres podem reduzir a captação da glicose por competição de substrato. Entretanto, algumas questões ainda não foram esclarecidas sobre o papel dos ácidos graxos na patogênese da diabetes tipo II: 1) as alterações nas concentrações de ácidos graxos nem sempre alteram a produção e a utilização de glicose; e 2) a dificuldade técnica em estimar a lipólise intramuscular impossibilita o melhor estudo da interação do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos em humanos (ALZAID, 1996).

O desenvolvimento da diabetes não dependente de insulina resulta da combinação de dois fatores principais. O fator genético, que provavelmente envolva genes

defeituosos relacionados com a sinalização da insulina e o fator ambiental relacionado ao sedentarismo, tipo de dieta, uso de drogas e outros (WHITE, 1997).

RONDINONE et al. (1997) verificaram que, em indivíduos com diabetes tipo II, algumas proteínas envolvidas na cascata de sinalização intracelular, como IRS-1 e PI-3K, são expressas em menor quantidade em resposta à insulina quando comparada com indivíduos não diabéticos e diabéticos do tipo I. No entanto, as causas moleculares identificadas até o momento, explicam somente a uma minoria dos pacientes com diabetes tipo II, indicando que a resistência à insulina é causada por uma ampla variedade de genes (ALZAID, 1996).

A hiperglicemia em indivíduos diabéticos é explicada pelo aumento na produção de glicose pelo fígado, pela secreção de insulina desregulada e pela redução da captação de glicose pelos tecidos-alvo da insulina. Esta redução é causada por uma resistência à insulina devido a defeitos a nível de receptor e pós-receptor das células (KRUSZYNSKA; OLEFSKY, 1996).

Embora a hiperglicemia possa aumentar, até um limite, a entrada de glicose para dentro dos tecidos, ela não pode compensar a ação da insulina em relação à ativação da glicogênio sintase. Portanto, existem alterações das vias do metabolismo da glicose a nível intracelular, com decréscimo no armazenamento de glicogênio e aumento da via glicolítica. Como consequência, há aumento de substratos gliconeogênicos como lactato, piruvato e alanina, que ajudam a manter as altas taxas de gliconeogênese e de produção de glicose hepática (KRUSZYNSKA; OLEFSKY, 1996). A capacidade da insulina em ativar a piruvato desidrogenase, enzima envolvida na via de oxidação da glicose, também encontra-se reduzida em indivíduos com diabetes tipo II (KELLEY¹, apud ALZAID, 1996).

Dieta e exercício físico são hábeis em melhorar a glicemia de indivíduos diabéticos, sem, no entanto, restaurar completamente a ação da insulina (ALZAID, 1996). Dentre os fármacos utilizados no tratamento, existem as sulfonilúreas que agem na secreção da insulina e as tiazolidinedionas (glitazonas) que aumentam a sensibilidade dos

¹ KELLEY, D. E.; MOKAN, M.; MANDARINO, L. J.. Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM. **Diabetes** 41: 698 – 706, 1992.

tecidos à insulina. No entanto, informações sobre o mecanismo de ação, segurança e eficácia destas drogas a longo prazo ainda necessitam de maiores detalhes (ALZAID, 1996).

2) *Insulina:*

A insulina é uma proteína composta por duas cadeias peptídicas (cadeias A e B) que estão ligadas entre si por duas pontes dissulfeto. A liberação da insulina é regulada primariamente pela entrada de glicose nas células β via transportador de glicose (GLUT-2). O metabolismo da glicose dentro das células libera fatores de acoplagem como o ATP, que inibem o efluxo de potássio das células β . Como resultado, ocorre a despolarização da célula possibilitando a entrada de íons cálcio via ativação de canais de cálcio, provocando a exocitose dos grânulos de insulina.

Este hormônio promove a síntese de glicogênio hepático, estimula a lipogênese e a captação de glicose via transportador (GLUT-4) para o interior das células do tecido muscular e adiposo (FEINGOLD; FUNK, 1997). A insulina apresenta uma ação anabólica em músculo, estimulando a captação de aminoácidos e a síntese protéica, além de inibir a proteólise (ROOYACKERS; NAIR, 1997).

O receptor da insulina faz parte da classe de receptores que estimulam atividade da proteína tirosina quinase, a qual provoca todo o processo de cascata de fosforilação. O receptor é composto por duas subunidades α (localizadas na porção extracelular e responsáveis pela ligação da insulina ao receptor) e duas β (encontradas na porção intracelular e responsáveis pela atividade tirosina quinase).

Mecanismo de sinalização da insulina: (1) o processo é iniciado com a ligação da insulina às subunidades α do receptor que estão localizadas inteiramente no exterior da célula; (2) auto fosforilação cruzada em três principais sítios de tirosina kinase (posições 1146, 1150 e 1151), localizados nas subunidades β do receptor, que alteram a conformação possibilitando acesso ao ATP e substratos (WHITE, 1997); (3) os substratos para receptor de insulina (IRS-1, -2, -3 e -4) fazem parte de uma família de proteínas que atuam como mediadores entre receptor e moléculas sinalizadoras; (4) fosforilação de várias outras proteínas como a fosfatidilinositol-3-kinase (PI-3k), a

fosfotirosina fosfatase (PTP1D ou Syp) e a proteína adaptadora Grb2 (MAASSEN; OWENS, 1997).

As proteínas da família IRS são fundamentais no mecanismo de sinalização da insulina. Estas proteínas possuem algumas características em comum, como domínios PH (pleckstrin homology) e PTB (phosphotyrosine binding) que são responsáveis pela interação com o receptor da insulina e seqüência YXXM, conhecida pela ligação aos domínios SH2 na subunidade regulatória p-85 da PI3K. Embora apresentem tais semelhanças, as proteínas IRS apresentam diferenças entre si, indicando que suas funções não são exatamente as mesmas (NYSTROM; QUON, 1999). O Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1), substrato encontrado em maior quantidade para o receptor de insulina, é uma proteína que possui pelo menos 22 sítios tirosina e dois domínios envolvidos com a interação proteína-proteína. Estes sítios de fosforilação de tirosina direcionam a ligação de diversas proteínas que possuem domínio SH2, incluindo a subunidade regulatória de 85 kDa da PI-3K, a PTP1D (ou Syp), a proteína adaptadora Grb2 e outras (MAASSEN; OWENS, 1997). A proteína IRS-2 tem sido apontada como principal responsável pela ativação da PI-3K em indivíduos com diabetes não dependente de insulina, visto que a IRS-1 apresenta expressão reduzida nestes casos (RONDINONE, 1997).

As proteínas tirosina fosfatases (PTP) possuem papel fundamental na regulação da sinalização intracelular, uma vez que elas desfosforilam receptores tirosina kinase e seus substratos. As PTPs são subdivididas em proteínas não transmembrana e transmembrana semelhantes ao receptor. A ampla diversidade das PTPs sugerem que cada tipo é responsável por um mecanismo específico na sinalização. Ao contrário dos RTKs (Receptor Tirosina Kinase) que exigem a dimerização do receptor para serem ativados, a dimerização dos domínios PTPs inibe a atividade catalítica em alguns casos. Algumas PTPs como a LAR e a PTP1B demonstraram a capacidade de interagir com e desfosforilar o receptor da insulina (NYSTROM; QUON, 1999).

A atividade da PI-3K (fosfatidilinositol -3 kinase) está relacionada principalmente com o transporte de glicose (RONDINOME et al, 1997) e com a síntese de glicogênio, não interferindo com a ação da insulina na formação da RasGTP (MAASSEN; OWENS,

1997). Composta por uma subunidade regulatória (85 kDa) e uma catalítica (110 kDa), esta proteína fosforila a posição 3 do anel inositol em inositóis fosfolípidos, resultando em aumento nos níveis de fosfatidilinositol 3, 4, 5- trifosfato (PtdIns (3,4,5)P₃), que regulam a atividade da proteína kinase B (PKB ou Akt). A PKB está envolvida na ativação da glicogênio sintase, na estimulação da glicólise no músculo cardíaco, na síntese protéica e no transporte de glicose (ALESSI; DOWNES, 1998).

O transportador de glicose GLUT-4 é o principal responsável pela entrada da glicose nas células do tecido muscular e adiposo (AIRES, 1999). Localizado em vesículas intracelulares, seu transporte para a membrana da célula é ativado pela cascata de sinalização celular descrito acima. A expressão reduzida da proteína GLUT-4, está intimamente envolvida com resistência à insulina em indivíduos diabéticos do tipo II (ALZAID, 1996). A insulina possui a capacidade de restaurar a expressão de GLUT-4, mas não a longo prazo. GLUT-4 pode ser expresso em maior quantidade através do exercício, um mecanismo diferente do induzido pela insulina. A atividade contrátil do músculo e, conseqüentemente, a necessidade de entrada de glicose para o tecido, é mediada pelo GLUT- 4 (STEPHENS; PILCH, 1995).

3) *Sais de vanádio:*

O vanádio é um elemento encontrado em baixas concentrações na crosta terrestre, sendo obtido comercialmente como produto através dos processos de mineração de outros metais. Ele também é encontrado como elemento ultratraço amplamente distribuído em tecidos de mamíferos e outros animais (SHAVER et al, 1995). Sua ação no organismo provavelmente está relacionada com o crescimento e o desenvolvimento do organismo (HAMEL; DUCKWORTH, 1995).

O interesse nos compostos de vanádio encontra-se, principalmente, na sua ação insulino-mimética. Seus efeitos conseguem normalizar a concentração de glicose sangüínea, restaurar a função cardíaca e aumentar a lipogênese (HAMEL; DUCKWORTH, 1995). Foi demonstrado em estudos que os efeitos semelhantes aos da insulina são potencializados ao se adicionar o peróxido de hidrogênio aos compostos de vanádio (TSIANI; FANTUS, 1997).

O mecanismo de ação dos compostos de vanádio ainda não foi totalmente esclarecido. Embora alguns estudos tenham demonstrado uma ação dos sais de vanádio via ativação do receptor tirosina kinase, vários estudos sugerem que a ação do vanádio não está envolvida com o receptor da insulina (SHISHEVA; SHECHTER, 1992; D'ONOFRIO et al., 1993; D'ONOFRIO et al., 1994). A maioria dos estudos apontam, como mecanismo de ação, a inibição de fosfotirosinas fosfatases (PTPs), resultando em estimulação indireta da fosforilação da tirosina (TSIANI; FANTUS, 1998; BEVAN et al, 1995; MCNEILL et al, 1995). Além desta estimulação indireta, o vanadato (composto de vanádio) pode estimular, diretamente, proteínas envolvidas na sinalização pós receptor de insulina e IRS (TSIANI; FANTUS, 1997).

Sua ação na promoção da mitogênese e da proliferação celular está envolvida com proteínas tirosina kinases específicas e indução da expressão de proto oncogenes c-jun e junB (WANG; SCOTT, 1995). A MAP (mitogen activated protein) kinase também é ativada na presença do vanadato por via independente do receptor da insulina, provavelmente, por inibição de PTPs específicas que são necessárias para a ativação da via ras-raf-MAPK. Interessantemente, CRUZ et al. (1995) demonstraram que o vanadato é citotóxico para algumas linhagens de células tumorais (HTB14, MDAY-D2, EOMA), sem, entretanto, conhecer exatamente seu mecanismo de ação.

FANTUS et al. (1995) demonstraram a capacidade do vanadato em modular a ação da insulina, em adipócitos, através do aumento da afinidade do receptor pela insulina. Foi verificado que o tempo de ligação da insulina com o receptor não é alterado, entretanto, o tempo de ação da insulina aumentou significativamente na presença do vanadato. Estes dados corroboram a hipótese de que os compostos de vanádio inibem PTPases, alterando a relação da fosforilação e desfosforilação do receptor tirosina kinase. No entanto, esta modulação não foi verificada em hepatócitos, indicando que os efeitos dos compostos de vanádio variam de acordo com o tipo celular e a forma do vanádio (HAMEL; DUCKWORTH, 1995).

O vanadato demonstrou ser capaz de reduzir a hiperglicemia e os níveis de insulina em ratos obesos, além de reduzir a alta atividade de PTPases encontrada no fígado dos mesmos (PUGAZHENTHI et al, 1995). Como um dos efeitos de maior importância

dos sais de vanádio, verificou-se a indução do transportador GLUT 4, do seu compartimento intracelular para a superfície da célula, aumentando a captação de glicose (PÂQUET et al., 1992). BRICHARD (1995) demonstrou que não há modificação no RNAm GLUT-4, corroborando a hipótese de que o vanadato atue no “melhoramento” funcional do transportador de glicose. Este composto provou ser eficiente em modelos com diabetes tipo II, sendo capaz de normalizar a concentração de glicose e de reduzir a hiperinsulinemia e os níveis de triacilgliceróis no plasma (KHANDELWAL; PUGAZHENTHI, 1995).

Estudos em roedores mostraram alguns efeitos tóxicos, como redução no consumo de água e de alimento, e diarreia (DOMINGO et al., 1995). Também foi verificado acúmulo do vanádio em diferentes órgãos, principalmente nos rins, o que poderia resultar em toxicidade a longo prazo (HAMEL; DUCKWORTH, 1995). No entanto, a administração destes agentes em concentrações pequenas, com aumento gradativo, mostrou ser suficiente para evitar tais efeitos (TSIANI; FANTUS, 1997). Estudos recentes com compostos de vanádio orgânicos demonstraram ser mais potentes e menos tóxicos (GOLDWASER et al., 2000; MCNEILL et al., 1995).

GOLDFINE et al. (1995) realizaram estudos em humanos, por curto período de tempo, com metavanadato de sódio e verificaram melhora na sensibilidade da insulina em pacientes diabéticos tipo II e alguns do tipo I. Esta melhora está relacionada principalmente com aumento da captação de glicose nos tecidos periféricos, visto que não houve alteração na produção de glicose hepática. Não foram detectados efeitos tóxicos sérios a partir de exames laboratoriais.

Embora o mecanismo de ação dos compostos de vanádio não esteja totalmente conhecido, sabe-se que seus efeitos semelhantes aos da insulina não seguem exatamente a mesma via de sinalização da insulina. Sendo assim, os sais de vanádio podem ser importantes agentes farmacológicos em doenças onde a ação da insulina não seja satisfatória.

II - OBJETIVO:

Este trabalho objetivou investigar a participação das proteínas intracelulares IRS-1, IRS-2, PI-3K e GLUT-4 no mecanismo de ação dos sais de vanádio peroxidados. Para alcançar este objetivo foi determinada a presença destas proteínas nos tempos 15, 30, 60 e 90 segundos em músculo sóleo de rato, estimulado com peróxido de ortovanadato de sódio in vitro, através da técnica de "Western Blotting".

III - MATERIAIS E MÉTODOS:

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar pesando entre 150 e 180 gramas, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR; anticorpos policlonais de coelho anti-IRS-1 e de cabra anti-GLUT-4, anti-PI3K e anti-IRS-2 da Santa Cruz Biotechnology; anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com a enzima HRP ("Horseradish Peroxidase") e Substrato Quimiluminescente ULTRA SuperSignal ambos 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, local onde foi desenvolvida a monografia.

1. PROCEDIMENTOS:

1.1. Incubação do músculo sóleo:

Cinco ratos machos pesando entre 150 e 180 g foram sacrificados por deslocamento cervical, e os músculos sóleo retirados e cortados ao meio, pesados e colocados no primeiro set de frascos de incubação (20 primeiros frascos) para a incubação. Estes músculos foram colocados em frascos na ausência ou presença de insulina (1 mU/ml) ou ortovanadato de sódio peroxidado (1 mM), nos tempos 15, 30, 60 e 90 segundos.

O procedimento para a incubação foi o seguinte:

- Preparou-se 130 ml de tampão Krebs-Ringer e 3 ml deste tampão foram colocados em 2 sets de 20 frascos de incubação;
- Os frascos com os músculos foram fechados com tampas de borracha e mantidos por 30 minutos com carbogênio (95% O₂; 5% CO₂).

Obs.: O tempo desde o sacrifício do animal até a colocação dos músculos nos frascos excedem 3 minutos para que os músculos não sofressem anóxia.

- Após a pré-incubação de 30 minutos, o suprimento de carbogênio foi interrompido e os músculos foram transferidos para outros frascos, contendo seus respectivos tratamentos, ou seja, a incubação nos tempos pré-determinados. Após a incubação, os músculos foram mergulhados em nitrogênio líquido, para encerrar as reações. Em seguida, os músculos foram processados como descrito em detalhes a seguir.

1.2. Quantificação protéica:

Os músculos congelados foram homogeneizados com tampão de lise na proporção 1:7 com o auxílio de um homogeneizador Politron (2500 /min), centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante coletado. A quantificação protéica foi feita pelo método de Bradford. A concentração da proteína da amostra desconhecida é calculada com base em uma curva padrão de uma proteína conhecida (o correto 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 ml da amostra.

◆ Preparo da curva padrão:

- Pesa-se 10 mg de albumina sérica bovina (BSA) e dilui-se 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, com valores decrescentes de albumina para um volume total de 500 µl;
- Prepara-se uma bateria de 21 tubos, coloca-se 1 ml da solução de Bradford mais 20 µl 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 µl 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.

- Agitam-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 em $\mu\text{g/ml}$ x densidade ótica) e acha-se a equação da reta ($y = ax + b$, sabendo que $a =$ coeficiente angular $= \text{tg } \alpha = (y_2 - y_1) : (x_2 - x_1)$ e $b =$ coeficiente linear = ponto do eixo da ordenada por onde a reta passa).
- A partir dos valores de DO (y) é possível calcular a concentração da amostra, isolando-se o x . Este valor deve ser multiplicado pela diluição para se obter a concentração de proteína da amostra em $\mu\text{g/ml}$.

◆ 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 coloca-se 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 $y = ax + b$]. A partir dos valores de DO (y) é possível calcular a concentração da

amostra, isolando-se o x. Este valor deve ser multiplicado pela diluição para se obter a concentração de proteína da amostra em $\mu\text{g/ml}$.

- 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. O tampão Laemmli possui: SDS para desnaturar a proteína e gerar uma carga negativa constante para todas as proteínas; glicerol para dar maior densidade à amostra do que o tampão de corrida; e β -mercaptoetanol (agente redutor) responsável por quebrar as pontes dissulfeto presentes na amostra, possibilitando a separação das proteínas em subunidades.

1.3. 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. O complexo formado SDS-proteína distribui uma carga negativa semelhante entre todas as proteínas (migrará para o pólo positivo do campo elétrico). Portanto, a migração das proteínas no método "SDS-PAGE" depende unicamente dos seus pesos moleculares.

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 devem ser submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em "SDS-Page" na porcentagem de 7,5% por cerca de 2 horas (300V, 25 mA). Esta separação das proteínas são importantes para a posterior identificação das proteínas de interesse pelo Western Blotting.

◆ 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 coloca-se 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 e coloca-se 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 lavam-se os poços com água e/ou tampão de corrida.

◆ Corrida das amostras

- Colocam-se as amostras a serem corridas (20 a 100 µg 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. "Western Blotting":

O método de "Western blotting" surgiu em 1979, descrito por Towbin. A ideia 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 poliacrilamida "SDS-PAGE", elas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde se procederá o método. Como restarão 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 de incubação 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.

Foram utilizados anticorpos monoclonais para IRS-1, IRS-2, PI3K e GLUT-4. O método de detecção foi feito pelo uso de anti-anti-IRS-1, anti-anti-IRS-2, anti-anti-PI3K, anti-anti-GLUT-4 conjugados com a enzima HRP (Horseradish peroxidase), a qual permite a visualização através da adição de um substrato quimiluminescente, o luminol.

◆ Montagem do gel de empilhamento 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 ideia 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;
- Umedecem-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;
- Colocam-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.
- 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.
 - ◆ 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 fora o tampão de transferência; marca-se cada membrana, caso sejam feitas duas, e indica-se o lado das amostras; suspende-se a membrana com uma pinça e deixa-se secar ao ar.

- ◆ 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.
 - Incubação com o primeiro anticorpo: anti-IRS-1, anti-IRS-2, PI-3K e GLUT-4 incubase a membrana em solução de incubação com anticorpo primário (anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-PI-3K e anti-GLUT-4) na diluição de 1:500, 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).

- ◆ Incubação com o anticorpo secundário conjugado ao HRP
 - incubase a membrana em solução de incubação contendo o anticorpo secundário conjugado ao HRP na diluição 1:1667, 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.

- ◆ 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.

- ◆ 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);

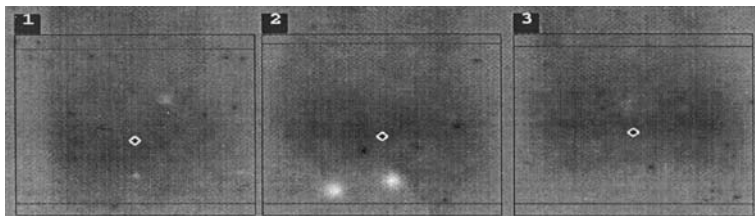
- Revela-se o filme.

- ◆ Análise das bandas:

As bandas foram analisadas por densiometria, utilizando-se “Image Master” da Pharmacia Biotech.

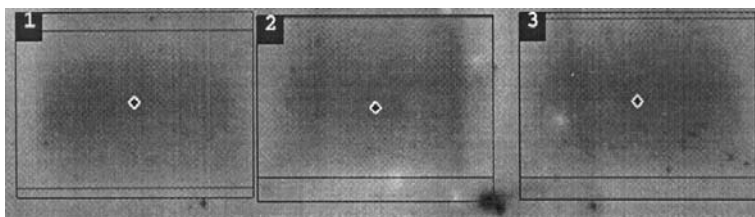
IV - RESULTADOS:

Figura 1a: GLUT-4 15"



Tempo	Lane	Volume do lane	%
15"	1- Controle	1280	100
	2- Insulina	1685	131,64
	3- POV	1716	134,06

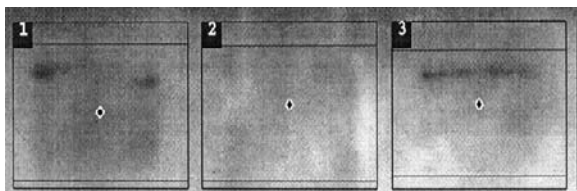
Figura 1b: GLUT-4 30"



Tempo	Lane	Volume do lane	%
30"	1- Controle	1185	100
	2- Insulina	1185	100
	3- POV	1359	114,68

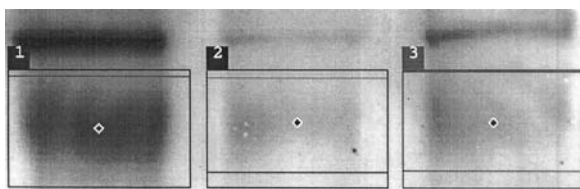
Os resultados das figuras 1a e 1b, obtidos por HIRABARA (2000), representam a expressão de GLUT-4 nos tempos de 15 e 30 segundos, respectivamente. O tempo de 15"apresentou expressão similar entre a insulina e o POV, chegando, praticamente, a ser 30% maior em relação ao controle. Já no tempo de 30", a expressão de GLUT-4 retorna aos níveis basais na presença da insulina. Quanto ao POV, esta ainda permanece ativada em 15% acima da do controle e insulina.

Figura 2a: IRS-1 15"



Tempo	Lane	Volume do lane	%
15"	1- POV	331	312,26
	2- Insulina	26	24,53
	3- Controle	106	100

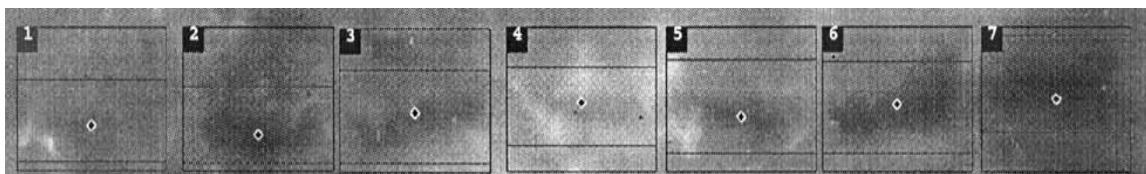
Figura 2b: IRS-1 30"



Tempo	Lane	Volume do lane	%
30"	1- POV	2173	521,10
	2- Insulina	248	59,47
	3- Controle	417	100

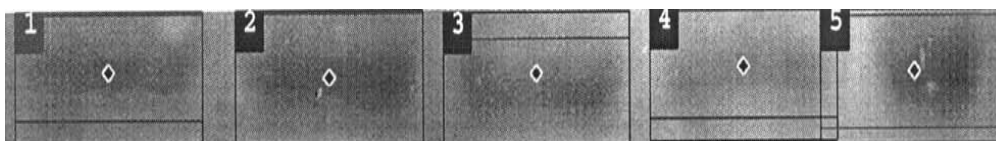
As figuras 2a e 2b representam a expressão da IRS-1 nos tempos de 15 e 30 segundos, respectivamente. No primeiro, o POV aumentou a expressão da IRS-1 até 3 vezes acima do basal, enquanto que no segundo, o aumento chegou a ser de 5 vezes. A insulina não foi capaz de estimular IRS-1 nestes tempos.

Figura 3a: PI-3K



Tempo	Lane	Volume do lane	%
30"	1- Controle	182	100
	2- Insulina	282	154,95
	3- POV	318	174,73
	4- marcador		
60"	5- Controle	202	100
	6- Insulina	596	295,05
	7- POV	495	245,05

Figura 3b: PI-3K



Tempo	Lane	Volume do lane	%
90"	1- Controle	251	100
	2- Insulina	340	135,46
	3- POV	295	117,53
15"	4- Controle	192	100
	5- Insulina	313	162,02

As figuras 3a e 3b representam a expressão da proteína PI-3K estimulada com insulina, POV e controle nos tempos de 15, 30, 60 e 90 segundos. Nos tempos de 30" e 60" houve aumento contínuo na presença da insulina (55% - 30"; 195% - 60") e do POV (75% - 30"; 145% - 60"). O tempo de 90 " apresentou uma redução na expressão, quando comparado aos primeiros tempos, com a insulina expressando 35% a mais que o controle, e o POV, apenas 17%. No tempo de 15", apenas a ação da insulina foi detectada, apresentando um aumento de 62% em relação ao controle. O POV não foi detectado neste tempo.

V - DISCUSSÃO:

Os sais de vanádio podem ser potentes agentes farmacológicos por apresentarem uma via de sinalização diferente da insulina. Esta característica possibilita melhorar o quadro de desordens metabólicas, principalmente, em indivíduos que apresentam resistência à insulina, como a diabetes do tipo II.

FOOT et al. (1992) demonstraram que os peroxovanadatos aumentam as taxas de formação do lactato e de síntese de glicogênio, favorecendo o metabolismo de carboidratos e, conseqüentemente, diminuir a hiperglicemia sérica. Estudos anteriores confirmaram a capacidade do POV em aumentar o metabolismo de glicose pelo músculo esquelético (HIRABARA, 2000; TCHAIKOVSKI et al., 1999).

O transportador GLUT-4, apresenta processo de translocação extremamente dinâmico. Os dados obtidos por HIRABARA (2000), indicam que há pequeno aumento na expressão desta proteína nos primeiros 15 segundos (figura 1a), retornando, aos níveis basais no final de 30 segundos (figura 1b). Este retorno rápido pode ser explicado pelo fato do GLUT-4 ser constantemente reciclado, sendo a ação da insulina importante não na biossíntese da proteína, mas no aumento da transporte das vesículas de GLUT-4 para a membrana da célula e na inibição da internalização destes transportadores (STEPHENS; PILCH, 1995).

Vários estudos apontam a IRS-1 como principal substrato responsável pela interação do receptor da insulina com as moléculas efetoras (PI-3K, PKB, MAPK ...) (RONDINOME et al., 1997; MAASSEN; OUWENS, 1997; WHITE, 1997). As figuras 2a e 2b demonstram que o POV foi capaz de ativar IRS-1 em grandes quantidades. A hipótese de que os sais de vanádio atuam via inibição de PTPases (TSIANI; FANTUS, 1997; CRUZ et al., 1995; BEVAN, 1995, McNEILL et al., 1995), juntamente com estes dados, indicam que o POV pode estar atuando em PTPases envolvidas nos primeiros passos da sinalização intracelular. Quais PTPases específicas são inibidas pelos compostos de vanádio ainda é uma questão controversa. Enquanto alguns estudos

afirmam que a subunidade β do receptor da insulina está envolvida (TAMURA et al.² apud McNEILL, 1995; SCIMECA et al., 1992), outros têm demonstrado sua ação através de uma via alternativa (WANG; SCOTT, 1995; SHISHEVA; SHECHTER, 1992).

Diferentes estudos têm demonstrado a importância da IRS-2 no mecanismo de ação da insulina (RONDINOME et al., 1997; MAASSEN; OUWENS, 1997; WHITE, 1997). No entanto, nossos experimentos não detectaram a presença da IRS-2, talvez devido à baixa especificidade do anticorpo.

A PI-3K está envolvida no mecanismo de sinalização da insulina e, por consequência, é responsável por efeitos metabólicos como transporte de glicose, inibição de lipólise e estimulação da síntese de glicogênio (ALESSI; DOWNES, 1998). O tempo de 15 segundos, testado apenas com a insulina, aumentou em 62,02% a expressão da PI-3K, quando comparada ao controle. O tempo de 30 segundos demonstra um aumento contínuo da expressão da proteína na presença da insulina, enquanto o POV apresenta a expressão ainda maior. O tempo de 60 segundos demonstrou ser o pico de ação, tanto para a insulina quanto para o POV, chegando praticamente a triplicar o grau de fosforilação em relação ao controle. O tempo de 90 segundos apresentou redução na ação da insulina e do POV, em comparação aos tempos de 30 e 60 segundos. Estes dados (figuras 3a e 3b) diferem de estudos anteriores (FANTUS; TSIANI, 1998; IDA et al., 1996) que afirmam que o estímulo de transporte de glicose pelo vanadato e vanadato peroxidado é realizado por uma via independente de PI-3K. Uma explicação para esta divergência de resultados seria o uso de compostos de vanádio em diferentes formas e graus de peroxidação do composto.

² TAMURA, S.; BROWN, T. A.; DUBLER, R. E.; LARNER, J. Insulin-like effect of vanadate on adipocyte glycogen synthase and on phosphorylation of 95.000 Da subunit of insulin receptor. **Biochem. Biophys. Research Communication**, v. 113, p.8042, 1983)

VI - CONCLUSÃO:

As proteínas IRS-1, PI-3K e GLUT-4 estão envolvidas no processo de sinalização intracelular, responsável pela ação “insulin-like” do ortovanadato de sódio peroxidado. No entanto, acreditamos que em algum momento desta via de sinalização o POV atua de modo diferente ao da insulina, uma vez que os compostos de vanádio possuem ação eficiente em modelos que apresentam resistência à insulina.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. **Fisiologia**. 2^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- ALESSI, D. R.; DOWNES, C. P. The role of PI 3-kinase in insulin action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1436, p. 151-164, 1998.
- ALZAID, A. A. Insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v.33, n. 2, p. 87-99, 1996.
- BEVAN, A. P.; DRAKE, P. G., YALE, J.; SHAVER, A; POSNER, B. I. Peroxovanadium compounds: Biological actions and mechanism of insulin-mimesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 49 – 58, 1995.
- BOLLI, G. B.; DI MARCHI, R. D.; PARK, G. D.; PRAMMING S.; KOIVISTO, V. A. Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 42, p. 1151-1167, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 142, p. 79 – 83, 1976.
- BRICHARD, S. M. Effects of vanadate on the expression of genes involved in fuel hoemostases in animal models of type I and type II diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 121-124, 1995.
- CRUZ, T. F.; MORGAN, A.; WEIXIAN, M. *In vitro* and *in vivo* antineoplastic effects of orthovanadate. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 161-166, 1995.
- D'ONOFRIO, F.; LE, M. Q.; CHIASSON, J. L.; SRIVASTAVA, A. K. Activation of mitogen activated protein (MAP) kinases by vanadate is independent of insulin receptor autophosphorylation. **FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters**, v. 340, p. 269 – 275, 1994.
- D'ONOFRIO, F.; LE, M. Q.; CHIASSON, J. L.; SRIVASTAVA, A. K. Vanadate dependent activation of mitogen activated protein (MAP)kinase in Chinese hamster ovary cells overexpressing a wild type human insulin receptor (CHO-HIRc). **The Farmacologist**, v. 35, p. 109, 1993.
- DOMINGO, J. L.; GOMEZ, M.; SANCHEZ O. J.; LLOBET, J. M.; KEEN, C. L. Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agents on vanadium accumulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 233 - 240, 1995.

FANTUS, I. G.; DERAGON, G.; LAI, R.; TANG, S. Modulation of insulin action by vanadate: evidence of a role for phosphotyrosine phosphatase activity to alter cellular signaling. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 103-112, 1995.

FEINGOLD, K. R.; FUNK, J. L. Disorders of the Endocrine Pancreas. In: MCPHEE, S. J.; LINGAPPA, V. R.; GANONG, W. F.; LANGE, J. D. **Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine**. Stamford: Appleton & Lange, 1997. p. 423 - 448.

FOOT, E.; BLISS, T.; FERNANDES, L. C.; DA COSTA, C.; LEIGHTON, B. The effects of orthovanadate, vanadyl and peroxides of vanadate on glucose metabolism in skeletal muscle preparations *in vitro*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 109, p. 157-162, 1992.

GOLDFINE, A. B.; SIMONSON, D. C.; FOLLI, F.; PATTI, M.; KAHN, C. R. Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus *in vivo* and *in vitro* studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, n.11, p. 3311 – 3320, 1995.

GOLDWASER, I.; GEFEL, D.; GERSHONOV, E.; FRIDKIN, M; SHECHTER, Y. Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 80, n.1/2, p. 21 – 5, 2000.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. Local: Guanabara & Koogan, 1997.

HAMEL, F. G.; DUCKWORTH, W. C. The relationship between insulin and vanadium metabolism in insulin target tissues. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.153, p. 95 - 102, 1995.

HIRABARA, S. M. **Envolvimento do IRS-1e do GLUT-4 no mecanismo de ação do peróxido de ortovanadato de sódio em músculo sóleo de rato "in vitro"**. Curitiba, 2000. 50 f. Monografia (bacharel em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

IDA, M; IMAI, K. HASHIMOTO, S; KAWASHIMA, H. Pervanadate stimulation of wortmannin-sensitive and -resistant 2-deoxyglucose transport in adipocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 1061 – 1067, 1996.

KHANDELWAL, R. L.; PUGAZHENTHI. *In vivo* effects of vanadate on hepatic glycogen metabolizing and lipogenic enzymes in insulin-dependent and insulin-resistant diabetic animals. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.153, p. 87 – 94, 1995.

KRUSZYNSKA, Y. T.; OLEFSKY, J. M. Cellular and molecular mechanisms of non-insulin dependent diabetes mellitus. **Journal of Investigative Medicine**, v.44, n.8, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680 – 85, 1970.

MAASSEN, J. A.; OUWENS, D. M. Mechanism of Insulin Action. **Molecular Pathogenesis of Diabetes mellitus**, v. 22, p. 201-221, 1997.

McNEILL, J. H., YUEN, V. G.; DAÍ S.; ORVIG C. Increased potency of vanadium using organic ligands. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 175 – 180, 1995.

NYSTROM, F. H.; QUON, M. J. Insulin Signalling: Metabolic pathways and mechanism for specificity. **Cellular Signalling**, v. 8, p. 563-574, 1999.

PANDEY, S. K.; CHIASSON, j.; SRIVASTAVA, A.K. Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 69 – 78, 1995.

PÂQUET, M. R.; ROMANEK, R. J.; SARGEANT, R. J. Vanadate induces the recruitment of glut - 4 glucose transporter to the plasma membrane of rat adipocytes. **Molecular and Celular Biochemistry**, v. 109, p. 149 - 155, 1992.

PUGAZHENTHI, S.; TANHA, F.; DAHL, B.; KHANDELWAL, R. L. Decrease in protein tyrosine phosphatase activities in vanadate-treated obese Zucker (fa/fa) rat liver. **Molecular and Celular Biochemistry**, v. 153, p. 125-129, 1995.

RONDINOME, C. M.; WANG, L; LONNROTH, P; WESSLAU, C.; PIERCE, J. H.; SMITH, U. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 94, p. 4171 – 4175, 1997.

ROOYACKERS, O. E.; NAIR, K. S. Hormonal regulation of human muscle protein metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, p. 457 - 85, 1997.

SAAD, M. J. A.; MAEDA, L.; BRENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R. O.; PAIVA, R. S.; VELLOSO, L. A. Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. **Diabetologia**, v. 40, p. 179-186, 1997.

SCIMECA, J; BALLOTTI, R.; FILLoux, C.; OBBERGHEN, E. V. Insulin and orthovanadate stimulate multiple phosphotyrosine-containing serine kinases. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.109, p. 139 – 147, 1992.

SHAVER, A; NG, J. B.; HALL, D. A.; POSNER. B. I. The chemistry of peroxovanadium compounds relevant to insulin mimesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 5 - 15, 1995.

SHISHEVA, A; SHECHTER, Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponse of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. **Biochemistry**, v. 31, p. 8059 – 8063, 1992.

STEPHENS, J. M.; PILCH, P. F. The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT 4, the major insulin-responsive glucose transporter. **Endocrine Reviews.**, v. 16, p. 529 – 546, 1995.

TCHAIKOVSKI, O. Jr.; PARDAL, D.; LOPES, M. C. P. In: EVINCI, 7, 1999, Curitiba. **Atividade insulin-like dos sais de vanádio peroxidados em músculos sóleos isolados de ratos.** Curitiba, v. 1, p. 144.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy Sciences USA.**, v. 76, p. 4350-54, 1979.

TSIANI, E.; FANTUS, I. G. Multifunctional actions of vanadium compounds on insulin signaling pathways: Evidence for preferential enhancement of metabolic versus mitogenic effects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 182, p. 109 – 119, 1998.

TSIANI, E.; FANTUS, I. G. Vanadium compounds: Biological actions and potential as pharmacological agents. **Trends in Endocrinology Metabolism**, v. 8, p. 51 - 58, 1997.

WANG, H.; SCOTT, R. E. Unique and selective mitogenic effects of vanadate on SV40 – transformed cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 59 – 67, 1995.

WHITE, M. F. The insulin signalling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, v. 40, p. 2 - 17, 1997.

APÊNDICE 1 - SOLUÇÕES

1.1. Soluções usadas para a incubação

◆ 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.

◆ 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.

- ◆ 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.

1.2. Soluções para quantificação protéica

- ◆ 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

- ◆ 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.

- ◆ 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.

1.3. Soluções para eletroforese

- ◆ 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.

- ◆ 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.

- ◆ Tampão de corrida
- 25mM Tris
- 250 mM glicina (pH 8,3)
- 0,1% SDS

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

1.4. Soluções para "Western Blotting"

- ◆ Tampão de transferência
- Glicina 3mM
- Tris base 48mM
- SDS 0,037%

Obs: 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.

- ◆ TBS
- Tris-HCl 10 mM pH 7,5
- NaCl 150 mM

- ◆ Tampão de bloqueio
- Dissolver leite desnatado a 5% e BSA a 3% em TBS.

- ◆ Tampão de incubação
- Dissolver BSA a 1% em TBS.

- ◆ Tampão de lavagem
- Dissolver Tween 20 a 0,3% em TBS.

- ◆ Corante Vermelho Ponceau
- Ponceau 0,1%
- Ácido acético glacial 5%
- Guardar em frasco âmbar e armazenar a TA.