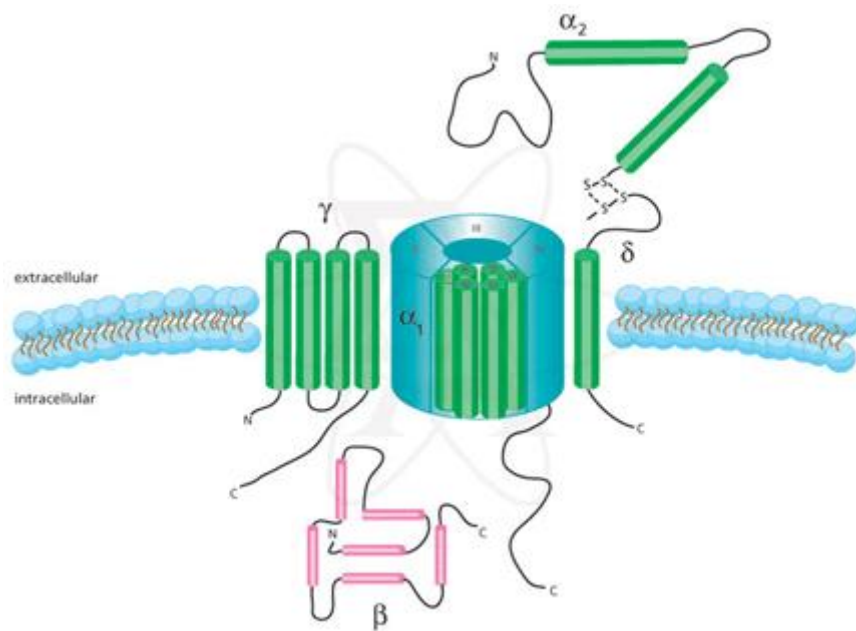




Universidade da Beira Interior

Faculdade das Ciências da Saúde

Centro de Investigação das Ciências da Saúde



Optimização do processo de purificação dos canais de cálcio tipo L, isolados a partir de células do músculo liso

Michael Santos

Orientador: Professor Doutor Ilídio J. Correia



Universidade da Beira Interior

Faculdade das Ciências da Saúde

Centro de Investigação das Ciências da Saúde

**Optimização do processo de purificação dos
canais de cálcio tipo L, isolados a partir de
células do músculo liso**

Michael Santos

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior
para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Orientador:

Professor Doutor Ilídio J. Correia

Centro de Investigação das Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da
Saúde da Universidade da Beira Interior

Covilhã

2008

Índice

	Página
Agradecimentos	III
Resumo	XIII
Abstract	XIV
Abreviaturas	XV
I – Objectivo	1
II – Introdução	3
1. Morfologia e Fisiologia do Cordão Umbilical	4
1.1 Morfologia dos vasos sanguíneos	5
1.2 Artérias e veias umbilicais	8
1.3 Circulação placentária fetal	8
1.4 - Músculo Liso	11
1.4.1 – Estrutura e caracterização do músculo liso	11
1.4.2 – Mecanismos de contracção e aspectos fundamentais	12
1.4.3 – Regulação da contracção muscular	14
2 – Canais iónicos	15
3 – Canais cálcio	16
3.1 – O íão cálcio no organismo	16
3.2 – Regulação da concentração de cálcio	17
3.3 – Nomenclatura dos canais de cálcio dependentes de voltagem	19
3.4 – Classificação dos canais de cálcio	20
3.5 – Estrutura e função dos CCDV tipo L	23
3.6 – Estudos estruturais dos canais de cálcio	26
3.7 – Patologias associadas aos canais de cálcio	28
4 – Purificação e separação de proteínas	30
4.1 – Precipitação de proteínas	30
4.2 – Cromatografia de interacção hidrofóbica, HIC	31
4.2.1 – Interacções reversíveis	33
4.2.2 – Passos na separação por HIC	34
4.2.3 – Resolução na HIC	35
4.2.4 – Eficiência na HIC	36

4.2.5 – Selectividade e capacidade de ligação da HIC	36
4.2.6 – Selectividade e selecção do sal	37
4.2.7 – A selectividade e as propriedades da matriz de HIC	38
4.2.8 – Ligandos e o grau de substituição	39
III – Material e métodos	41
1. Métodos	40
3.1 Recolha do material biológico	42
3.2 Limpeza das artérias e isolamento das camadas de células do músculo liso	42
3.3 Isolamento dos canais de cálcio membranares das células de músculo vascular liso (CMVL)	43
2. Método de <i>Bradford</i> (macro)	44
3. Precipitação de proteínas com sulfato de amónio	44
4. Ensaios de Cromatografia de Interação Hidrofóbica	45
5. Concentração das amostras	46
6. Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (<i>SDS-PAGE</i>)	46
7. <i>Western Blot</i>	48
8. <i>Dot Blot</i>	50
9. Imunofluorescência	50
IV – Resultados e Discussão	52
1. Imunofluorescência	53
2. Isolamento dos canais de cálcio membranares das células de músculo vascular liso	55
3. Método de <i>Bradford</i>	58
4. Ensaios em mini-colunas	59
4.1 Ensaios em mini-colunas utilizando diversas misturas de sais	64
4.1.1 Sulfato de Amónio e Fosfato de Sódio	64
4.1.2 Sulfato de Amónio e Sulfato de Sódio	68
5. Ensaio no FPLC	72
V – Conclusão	74
VI – Anexos	77
1. Reagentes	78
2. Equipamento utilizado	78

2.1 Sistema de cromatografia	78
2.2 Sistema de electroforese	79
2.3 Espectrofotómetro	79
2.4 Sistema de electrotransferência	79
2.5 Equipamento diverso que foi utilizado	80
2.6 Preparação de soluções	80
VII – Referências bibliográficas	87

Índice de Tabelas

Tabela		Página
1	Alterações na composição e metabolismo do cordão umbilical associadas a patologias/doenças no feto (adaptado de Di Naro <i>et al.</i> , 2001).	10
2	Quadro comparativo dos diferentes tipos de músculo Liso (Seeley <i>et al.</i> , 2006).	12
3	Nomenclatura para os diferentes canais de cálcio dependentes de voltagem (adaptado de Dolphin <i>et al.</i> , 2006).	19
4	Classificação e caracterização electrofisiológica dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (adaptado de Yamakage, 2002).	20
5	Funções fisiológicas e farmacológicas dos diferentes tipos de canais de Cálcio (Adaptado de Catterall, <i>et al.</i> , 2005; Gribkoff, 2006).	22
6	Patologias associadas aos canais de Ca^{2+} (<i>Calcium Channelopathies</i>).	29
7	Resultados do método de <i>Bradford</i> para a obtenção da recta de calibração.	58

Tabelas em Anexo:

1	Reagentes e modo de preparação da solução de PSS concentrado.	80
2	Reagentes e modo de preparação da solução de PSS diluído.	81
3	Composição da mistura de antibiótico-antimicótico	81
4	Reagentes e modo de preparação da solução de antiproteases.	81
5	Reagentes e modo de preparação das soluções para o processo de cromatografia de interacção hidrofóbica em mini-colunas (exemplo).	82
6	Composição dos géis de electroforese e volumes a pipetar para a sua preparação	82
7	Reagentes e modo de preparação de cada uma das soluções necessárias para preparar os géis de electroforese.	83
8	Reagentes e modo de preparação do tampão de redução do <i>SDS-PAGE</i> .	83
9	Reagentes e modo de preparação do tampão de migração de <i>SDS-PAGE</i>	83
10	Reagentes e modo de preparação para as soluções de coloração, descoloração I e descoloração II para os géis de <i>SDS-PAGE</i> .	84
11	Reagentes e modo de preparação das soluções para a diluição dos anticorpos primário e secundário.	84
12	Reagentes e modo de preparação das soluções utilizadas no Western-Blot	85
13	Reagentes e modo de preparação de reagentes para o método de <i>Coomassie</i> .	86

Índice de Gráficos

Gráfico		Página
1	Recta de calibração.	59
2	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1,5M, 1M, 0,5M de Sulfato de Amónio, de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4) e de água.	59
3	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1M S.A.+ 0,8M C.S., 0,5M S.A. + 0,4M C.S., de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e de água.	60
4	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1M S.A.+ 0,7M C.S., 0,5M S.A. + 0,35M C.S., de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e de água.	61
5	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1M S.A.+ 0,7M C.S., 0,5M S.A. + 0,35M C.S., de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e de água.	62
6	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1M S.A.+ 1M F.S., 0,5M S.A. + 0,5M F.S., de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e de água.	64
7	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1M S.A.+ 0,8M F.S., 0,5M S.A. + 0,4M F.S., de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e de água.	65
8	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1M S.A.+ 0,5M F.S., 0,5M S.A. + 0,25M F.S., de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e de água.	66
9	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1M S.A.+ 1M S.S., 0,5M S.A. + 0,5M S.S., de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e de água.	68
10	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1M S.A.+ 0,8M S.S., 0,5M S.A. + 0,4M S.S., de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e de água.	69
11	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1M S.A.+ 0,5M S.S., 0,5M S.A. + 0,25M S.S., de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e de água.	70
12	Gradiente por passos na matriz <i>Epoxy-Sepharose</i> de 1M S.A.+ 0,8M C.S., 0,5M S.A. + 0,4M C.S., de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e de água.	72

Índice de Figuras

Figura		Página
1	Plano transversal de um cordão umbilical, onde se observam as duas artérias a veia umbilical (Adaptado de Bergman <i>et al.</i> , 1999).	5
2	Comparação estrutural das artérias e veias do organismo humano (adaptado de Fox, 2004).	7
3	Morfologia das artérias e veias do organismo (adaptado de http://www.afh.bio.br/cardio/Cardio3.asp).	7
4	A – Ultrasonografia com visão longitudinal do cordão umbilical; B – Ultrasonografia com visão da secção transversal do cordão umbilical (Di Naro <i>et al.</i> , 2001).	8
5	A troca de produtos gasosos e metabólicos entre o feto e a mãe através da placenta (adaptado de http://www.med-brazil.com/med43/m_manual/mm_sec22_247.htm).	9
6	Histologia do Músculo Liso (Adaptado de Seeley <i>et al.</i> , 2006).	11
7	Contração das células do músculo liso (adaptado de Craig C. Freudenrich , 2001).	13
8	O papel dos iões Ca^{2+} na contração do músculo liso (Seeley <i>et al.</i> , 2006).	14
9	Estrutura dos canais de sódio dependentes de voltagem (Yu <i>et al.</i> , 2005).	16
10	Representação dos diferentes tipos de canais que promovem a regulação da concentração intracelular de cálcio (Adaptado de Carafoli, 2003).	18
11	Organização estrutural dos CCDV tipo L. (Figura retirada de: www.sigmaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/Pathway_Slides_Charts/Voltage_Gated_Calcium_Channel.html)	23
12	Árvore filogenética que ilustra as várias subfamílias dos CCDV, que existem nas células humanas. Quatro genes codificam os CCDV do tipo L. Os CCDV neuronais tipos P/Q, N e R são codificados por 3 genes, tal como os CCDV do tipo T (Adaptado de Bidaud <i>et al.</i> , 2006).	25

13	A) 3 planos da estrutura 3D do receptor de dihidropiridina, com uma resolução de 23-Å. Esquerda: vista que enfrenta o lado citosólico. Meio: vista ao longo do plano da membrana (descrito por uma barra amarela) com os revestimentos extracelulares das subunidades α_2 para cima. Direita: vista ao longo do plano após rotação de 90° da orientação mostrada no painel do meio. B) Esquema proposto para os canais de cálcio tipo L (figura adaptada de Wolf <i>et al.</i> , 2003).	27
14	Principiais técnicas de purificação cromatográfica (Amersham, 2006).	31
15	O equilíbrio das interações hidrofóbicas é controlado predominantemente pela concentração de sal (Amersham, 2006).	33
16	Passos da separação por HIC (Adaptado de Amersham, 2006).	35
17	Série de <i>Hofmeister</i> (Adaptado de Queiroz <i>et al.</i> , 2001).	37
18	Estrutura de uma matriz de agarose (Sephacrose) (Amersham, 2006).	38
19	Estrutura esquemática de alguns ligandos para HIC (Queiroz <i>et al.</i> , 2001).	40
20	Obtenção das camadas de músculo liso a partir das artérias isoladas do cordão umbilical.	42
21	Isolamento dos canais de cálcio membranares a partir das camadas de músculo liso. A) Lise celular realizada por um processo de homogeneização; B) Centrifugação a 26000g; C) Ultracentrifugação a 210000 g.	43
22	A) Mini-coluna (Biorad) (<i>adaptado de http://www.bio-rad.com</i>); B) FPLC.	45
23	Sistema de electroforese, miniprotean da Biorad	47
24	Representação da migração das proteínas no “ <i>Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers</i> ” numa electroforese <i>SDSPAGE</i> , num gel de migração de 12%.	48
25	Sequência do processo de <i>Western Blot</i> . (<i>adaptado de: www.genscript.com/western_tech.html</i>)	49
26	Microscópio de Imunofluorescência.	51
27	Caracterização do fenótipo das células humanas de músculo liso por imunofluorescência. Expressão da α -actina com ampliação 630x (A) e 1000x (B).	53
28	Fotos subunidade α_{1C} dos canais de cálcio tipo L e das células do músculo liso das artérias do cordão umbilical humano obtidas por imunofluorescência com dupla marcação. Expressão da subunidade α_{1C} dos canais de cálcio tipo L (verde) e da α -actin (vermelho) com ampliação 1000x.	54

29	Gel de electroforese SDS-PAGE das fracções resultantes das centrifugações da amostra de células do músculo liso. 1 – 1º Pellet; 2 – 2º Pellet; 3 – 1º Sobrenadante; 4 – 2º Sobrenadante.	55
30	Western Blot das fracções resultantes das centrifugações da amostra de células do músculo liso. 1 – 1º Pellet; 2 – 2º Pellet; 3 – 2º Sobrenadante.	56
31	Gel de electroforese PAGE com a amostra concentrada. 1 – 1º Pellet; 2 – 2º Pellet; 3 – 1º Sobrenadante; 4 – 2º Sobrenadante.	56
32	Dot Blot das fracções obtidas no isolamento das células a partir do cordão umbilical. 1 – 1º Pellet; 2 – 2º Pellet; 3 – 1º Sobrenadante; 4 – 2º Sobrenadante.	58
33	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por (A) SDS PAGE e (B) Western-Blot. ; 1, 2, 3 e 4 - amostras recolhidas após eluição com 1,5 M, 1M, 0,5 M e 0M de Sulfato de Amónio.	60
34	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por (A) SDS PAGE e (B) Western-Blot. ; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,8M C.S., 0,5M S.A. + 0,4M S.A. e 0 M S.A. + 0M C.S..	61
35	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por (A) SDS PAGE e (B) Western-Blot. ; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,7M C.S., 0,5M S.A. + 0,35M S.A. e 0 M S.A. + 0M C.S..	62
36	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por (A) SDS PAGE e (B) Western-Blot. ; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,5M C.S., 0,5M S.A. + 0,25M S.A. e 0 M S.A. + 0M C.S..	63
37	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por SDS PAGE ; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 1M F.S., 0,5M S.A. + 0,5M F.S. e 0 M S.A. + 0M F.S..	64
38	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por SDS PAGE ; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,8M F.S., 0,5M S.A. + 0,4M F.S. e 0 M S.A. + 0M F.S..	65

39	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por SDS PAGE ; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,5M F.S., 0,5M S.A. + 0,25M F.S. e 0 M S.A. + 0M F.S..	66
40	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por SDS PAGE ; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 1M S.S., 0,5M S.A. + 0,5M S.S. e 0 M S.A. + 0M S.S..	68
41	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por SDS PAGE ; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,8M S.S., 0,5M S.A. + 0,4 M S.S. e 0 M S.A. + 0M S.S..	69
42	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por SDS PAGE ; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,5M S.S., 0,5M S.A. + 0,25 M S.S. e 0 M S.A. + 0M S.S..	70
43	Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de <i>Epoxy-Sepharose</i> por SDS PAGE ; 1, 2- amostras recolhidas após eluição 0,5M S.A. + 0,4 M C.S. e 0 M S.A. + 0M C.S..	72
44	Sistema cromatográfico FPLC	78
45	Sistema de electroforese	79

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Ilídio Correia da Universidade da Beira Interior, meu orientadora, quero agradecer-lhe todo o apoio, força, ajuda, ensinamentos e coragem que deu no decorrer do trabalho. Um obrigado especial!

Ao Professor Doutor João Queiroz da Universidade da Beira Interior, meu co-orientador, quero também agradecer-lhe toda a ajuda nalgumas fases do trabalho, a disponibilidade e ensinamentos no decorrer do trabalho. Um obrigado especial!

À Doutora Fani Sousa da Universidade da Beira Interior, agradeço todo o apoio laboratorial, companheirismo, disponibilidade, simpatia e força que deu no decorrer do trabalho laboratorial. Muito obrigado!

Ao Doutor Nuno, companheiro de laboratório neste estágio, agradeço o apoio laboratorial, disponibilidade e simpatia. Obrigado!

Agradeço de um modo especial a todas as mães que, amavelmente, aceitaram participar neste estudo.

Agradeço de um modo especial a toda a equipa de trabalho do serviço de Obstetrícia do Hospital Sousa Martins, em especial às Enfermeiras, toda a simpatia, disponibilidade e paciência.

A todos os meus colegas de laboratório quero agradecer por todo o tipo de ajuda e apoio que demonstraram.

À minha irmã, agradeço-lhe o apoio, amizade, paciência e a ajuda nos momentos mais complicados. Obrigado, mana!

À minha namorada Teresa, agradeço-lhe o apoio, a moral, a coragem, a muita paciência e compreensão e muito mais. Sem mais palavras um muito e especial obrigado, meu amor!

Por último, um agradecimento muito especial aos meus pais, pois sem o apoio, os ensinamentos, a educação, a imensa compreensão e paciência, o incentivo e os valores que me transmitiram não seria possível estar aqui. A eles devo tudo o que tenho e sou. Um muito e especial obrigado mamã e papá!

Michael Santos

Resumo

O ião cálcio é um ião fundamental em todos os sistemas biológicos. Devido à sua capacidade para se ligar a diferentes ligandos, este ião tem um papel fundamental em muitas funções biológicas, tais como: regulação da pressão sanguínea, actividade cardíaca, proliferação celular, adesão celular, expressão génica, libertação de hormonas e de neurotransmissores. Os canais de cálcio dependentes de voltagem envolvidos no transporte deste ião para o interior da célula tornaram-se alvo de fármacos para a terapia de várias doenças, entre elas, cardiovasculares e gastrointestinais. Os canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L são complexos polipeptídicos oligoméricos (~ 430 kDa), compostos por 4 ou 5 subunidades polipeptídicas com diferentes pesos moleculares: a subunidade α_1 (190 – 250 kDa) é responsável pela formação do poro e confere as propriedades funcionais aos canais de cálcio tipo L; as subunidades auxiliares α_2 (143 kDa), β (54 kDa), γ (30 kDa), δ (25 kDa), que modulam propriedades dos complexos do canal.

O objectivo do presente estudo foi purificar os canais de cálcio tipo L existentes nas membranas das células do músculo liso isoladas de artérias umbilicais humanas. Para isso, foram removidos a geleia de Wharton e o sangue que rodeava as artérias. Posteriormente, isolaram-se as camadas de músculo liso a partir das artérias umbilicais. O passo seguinte constitui numa lise celular por métodos mecânicos/térmicos e em algumas centrifugações para obter as membranas celulares. Os canais de cálcio foram solubilizadas com N-Dodecil β -D-maltoside e posteriormente realizou-se uma ultracentrifugação a 210000g durante 2h00 para obter as proteínas membranares.

A purificação dos canais de cálcio tipo L foi efectuada por cromatografia de interacção hidrofóbica usando a matriz *epoxy sepharose*. Inicialmente realizaram-se estudos em mini colunas com misturas de sais de diferentes concentrações. As diferentes fracções obtidas pela cromatografia de interacção hidrofóbica foram analisadas por electroforese SDS-PAGE e Western-Blot.

Palavras-chave:

Canal de cálcio dependente da voltagem, artéria umbilical, músculo vascular liso, cromatografia de interacção hidrofóbica.

Abstract

Calcium is a fundamental ion in all biological systems. Due to its capacity to bind different ligands it plays a fundamental role in many cellular functions, such as: blood clotting, cardiac activity, cell death, cell membrane maintenance, cell proliferation, cellular adhesion, gene expression, hormone release, neurotransmitters release. Voltage-dependent calcium channels involved in calcium transport across membrane became targets of drugs for therapy of several illnesses, among them cardiovascular and gastrointestinal disease. The L-Type calcium channel voltage gated are polypeptide complexes (~ 430 kDa), composed by four or five subunits with different molecular weight: the subunit α_1 (190-250 kDa) which forms the channel pore, confers most functional properties to the L-type calcium channel; and auxiliary subunits α_2 (143 kDa), β (54 kDa), δ (25 kDa) and γ subunit (30 kDa), that are involved in the modulation of the properties of the channel complex.

The aim of the present study was to purify the L-type calcium channels from smooth muscle cells membrane isolated from human umbilical cord arteries. To isolate this type calcium channels the Wharton's jelly and the blood the surrounded the arteries of the umbilical cord was removed. Then, layers of smooth muscle cells were isolated from the arteries, Lise was done by mechanical and osmotic shock. After several centrifugations steps were done to obtain the cellular membranes. The solubilization of the membranes proteins was accomplished with N-dodecyl β -D-maltoside. Subsequently an ultracentrifugation at 210000 g during 2 hours was performed.

The following step for the purification of the L-type calcium channels was hydrophobic interaction chromatography using the adsorbent, Epoxy-Sepharose. Initially, studies in mini columns were done with different mixtures of salt with different concentrations. The purity of the fractions obtained was determined by SDS-PAGE and Western Blot.

Keywords:

Voltage dependent calcium channels, umbilical artery, smooth muscle, hydrophobic interaction chromatography.

Abreviaturas

3D – nível tridimensional;

E₁ – *rabbit anti-human von Willibrand factor polyclonal*;

E₂ – *anti-VE-Cadherin*;

F – *monoclonal anti-human fibroblast*;

S – *monoclonal anti-actin, α smooth muscle*;

AMPC – adenosina monofosfato;

BTZ – Benzotiazepinas;

BSA – Albumina Sérica Bovina;

CCAV – Canais de cálcio activados por alta voltagem;

CCBV – Canais de cálcio activados por baixa voltagem;

CCDV – Canais de cálcio dependentes de voltagem;

CCOR – canais de cálcio operados por receptor;

CCVI – canais activados por voltagem intermédia;

[Ca²⁺]_i – Cálcio livre intracelular;

CMVL – células do músculo vascular liso;

C.S. – Citrato de sódio;

DIA – Domínio de Interacção de Alfa;

DIB – Domínio de Interacção de Beta;

DHP – dihidropiridinas;

DHPR – receptores de dihidropiridina;

DM – dodecil- β -D-maltoside;

ECF – *Enhanced ChemiFluorescence*;

FGFs – factor de crescimento dos fibroblastos;

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*;

F.S. – Fosfato de Sódio;

FTX – fracção tóxica;

GFP – *green fluorescent protein*;

HIC – Cromatografia de Interacção Hidrofóbica;

IGF-1 – factor de crescimento do tipo insulina;

IP3 – inositol 1,4,5 – trifosfato;

K_D – constante de dissociação;

NC – IUPHAR - *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*;

NCX – ATPase de alta afinidade
PAA – Poliacrilamida;
PAGE – gel de poliacrilamida;
PBS - *Phosphate Buffered Saline*;
pI – ponto isoelétrico;
PKA – proteína cinase A;
PKC – proteína cinase C;
PMSF – *Phenylmethylsulfonyl fluoride*;
PVDF – membranas de polivinilidenodifluoreto;
Rs – Resolução;
RS – retículo sarcoplasmático
S.A. – Sulfato de amónio;
SDS – dodecilsulfato de sódio;
SDS-PAGE – gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio;
S.S. – Sulfato de Sódio;
TBS-T – *Tris Buffer Saline – Tween*;
TGF- β – factor de transformação do crescimento beta;
V – voltagem
 ω – CTX – ω -conotoxina;
 ω -Aga IIIA – toxina;

I. Objectivos

O presente trabalho de investigação tem como principal objectivo, o isolamento e purificação dos canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L da membrana citoplasmática das células de músculo liso, obtidos a partir de artérias do cordão umbilical.

Para efectuar a purificação dos canais de cálcio tipo L tiveram que se realizar estudos de precipitação dos canais de cálcio com sulfato de amónio seguidos de estudos cromatográficos de interacção hidrofóbica.

II. Introdução

1. Morfologia e Fisiologia do Cordão Umbilical

O cordão umbilical é um órgão exclusivo dos mamíferos que permite a comunicação entre o embrião e a placenta. É um longo cordão branco, que pode apresentar entre 50-60 cm de comprimento e 1,5-2 cm de diâmetro, contem 3 vasos sanguíneos, dispostos de forma helicoidal num tecido conjuntivo mucóide, designado por geleia de *Wharton* (ver figura 1) (Di Naro *et al.*, 2001).

Habitualmente o cordão umbilical apresenta duas artérias, que transportam o sangue venoso, com dióxido de carbono e uma única veia que transporta o sangue com oxigénio, estas estruturas garantem a nutrição e a respiração do embrião. O cordão umbilical tem origem a partir do saco amniótico (forma o epitélio do cordão), do alantóide (forma a veia e as artérias umbilicais) e da vesícula vitelínica (Moore *et al.*, 2000).

A geleia de *Wharton* (tecido mucóide) é um tecido rico em proteoglicanos, e tem a função de protecção dos vasos sanguíneos (Sadler, 2000). Contém um baixo número de células e grandes quantidades de colagénio, ácido hialurónico e glicosaminoglicanos sulfatados. As células da geleia de *Wharton* devem ser fortemente estimuladas para produzir uma grande quantidade de componentes da matriz extracelular.

A matriz extracelular é a massa que une as células dos animais e que é composta de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas e integrinas, segregadas pelas próprias células. Para além de permitir a migração das células durante o desenvolvimento embrionário, esta matriz é também um factor de coesão e de flexibilidade do corpo dos animais. A matriz extracelular é uma característica única dos animais – as plantas e outros organismos multicelulares não possuem este elemento estrutural.

Os colágenos são proteínas que formam longas cadeias e se enrolam numa tripla hélice, resultando em fibras com uma grande força de tensão; Os proteoglicanos são longas cadeias de polissacarídeos ligados a proteínas, que formam igualmente uma massa de grande resistência (a cartilagem é um tecido formado essencialmente por proteoglicanos e colágenos); As glicoproteínas desenvolvem moléculas ramificadas com uma grande viscosidade, protegendo assim as células, como acontece com a clara do ovo; As integrinas são as moléculas que asseguram a “comunicação” entre as células e entre estas e a matriz extracelular (são glicoproteínas especiais).

A geleia é envolvida por uma fina camada de epitélio cúbico simples ou escamoso estratificado, servindo como local de armazenamento para concentrar e estabilizar factores de crescimento (Di Naro *et al.*, 2001; Todros *et al.*, 2002). A geleia de Wharton acumula quantidades significativas de factor de crescimento do tipo insulina (IGF-1), factor de crescimento dos fibroblastos (FGFs) e de factor de transformação do crescimento beta (TGF- β) que são responsáveis por estimularem as células da geleia (Zang, 1999). Estudos recentes demonstram, que a geleia de Wharton tem um papel protector nos vasos do cordão umbilical (Zang, 1999; Todros *et al.*, 2002).

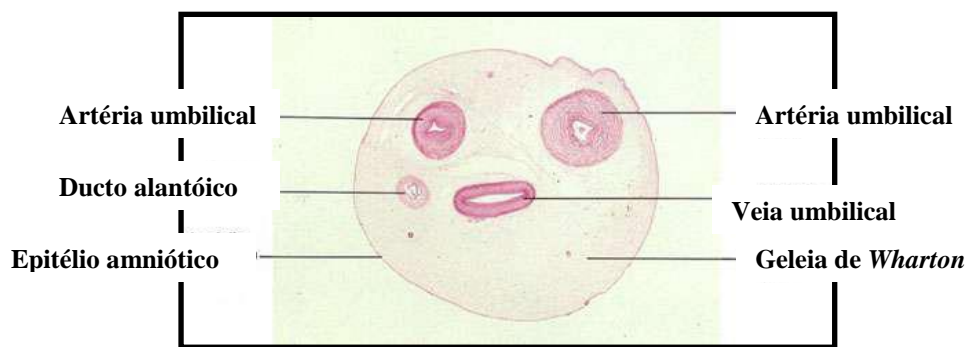


Figura 1 – Plano transversal de um cordão umbilical, onde se observam as duas artérias a veia umbilical (Adaptado de Bergman *et al.*, 1999).

1.1 Morfologia dos vasos sanguíneos

As artérias existentes no corpo humano são compostas por várias zonas: Túnica íntima; Túnica média; Túnica externa (Zang, 1999), ver figura 2. A túnica interna é constituída por três camadas: camada endotelial, camada subendotelial e uma lâmina elástica interna (Pugsley e Tabrizchi, 2000); a túnica média constituída por uma zona muscular espessa, com 20-40 camadas de fibras musculares lisas; a túnica externa contém um tecido conjuntivo frouxo composto por “*vasa vasorum*”, fibras nervosas, células adiposas, fibroblastos e fibras elásticas (Zang, 1999).

As células endoteliais formam a túnica interna, que é um epitélio simples e plano (de uma só camada de células) que recobre a face interna dos vasos sanguíneos e o coração. As células endoteliais possuem várias funções na homeostase, entre as quais: a formação de uma superfície lisa que facilita o fluxo laminar do sangue e previne a aderência das células sanguíneas; a formação de uma barreira de permeabilidade para

facilitar o intercâmbio de nutrientes entre o plasma e o interstício celular, regulando ao mesmo tempo o transporte de substâncias entre ambos; regulação da angiogênese; contribuem para a formação e manutenção da matriz extracelular; produção de factores de crescimento em resposta ao dano vascular, influenciando especialmente na proliferação do músculo vascular liso; produção de substâncias que regulam a agregação das plaquetas, coagulação e fibrinólise; sintetizam e degradam diversas hormonas; participam na resposta imune, gerando citocinas que modulam a actividade dos linfócitos e libertam agentes que actuam de forma parácrina sobre as células musculares lisas adjacentes, regulando a sua contracção (Seeley *et al.*, 2006).

O músculo liso, constituinte da túnica média, encontra-se nas paredes dos órgãos ocos, tais como os vasos sanguíneos, bexiga, útero e tracto gastrointestinal. O músculo liso está presente nestes órgãos pois, por contracções peristálticas controladas automaticamente pelo Sistema Nervoso Autónomo, tem o papel preponderante de impulsionar sangue, urina, esperma, bile, etc. (Seeley *et al.*, 2006).

Os tecidos conjuntivos, constituintes da túnica externa, são responsáveis pela manutenção da forma do corpo. Este papel mecânico é dado por um conjunto de moléculas (matriz) que liga as células e órgãos, desta maneira, suporte do corpo. Do ponto de vista estrutural, os componentes do tecido conjuntivo podem ser divididos em três classes: células, fibras e substância fundamental. Diferente de outros tecidos que são formados apenas por células (epitelial, muscular e nervoso), o principal constituinte do conjuntivo é matriz extracelular (Seeley *et al.*, 2006).

Alem de desempenhar uma evidente função estrutural, a grande variedade de tecidos conjuntivos reflecte a variação de composição e quantidade dos seus três componentes, os quais são responsáveis pela notável diversidade estrutural, funcional e patológica do tecido conjuntivo. Fibras predominantemente colágeno, constituem os tendões, aponeuroses, cápsulas de órgãos, e membranas que envolvem o sistema nervoso central (meninge). As fibras também constituem as trabéculas e paredes que existem dentro de vários órgãos, formando o componente mais resistente do estroma (tecido de sustentação) dos órgãos (Seeley *et al.*, 2006).

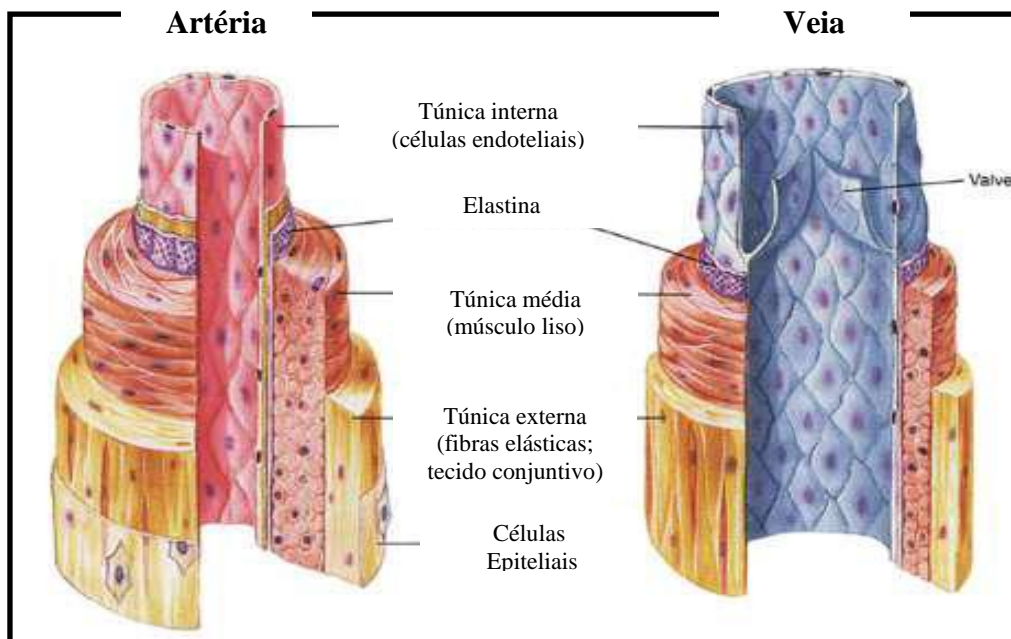


Figura 2 – Comparação estrutural das artérias e veias do organismo humano (adaptado de Fox, 2004).

A parede das veias, tal como a das artérias, também é constituída por 3 camadas. A diferença, porém, é que a camada muscular e a conjuntiva são menos espessas nas veias do que nas artérias (ver figura 3). Além disso, as veias apresentam válvulas no seu interior, que impedem o refluxo de sangue e garantem a circulação do sangue num único sentido (Zang, 1999; Moore *et al.*, 2002).

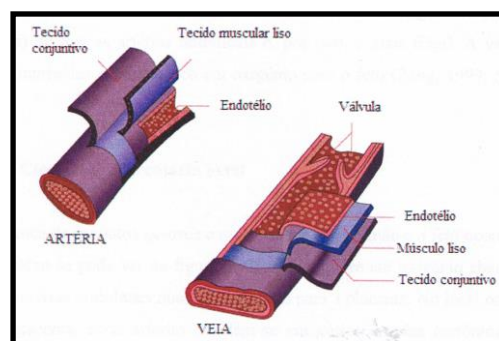


Figura 3 – Morfologia das artérias e veias do organismo (adaptado de <http://www.afh.bio.br/cardio/Cardio3.asp>).

1.2 Artérias e veias umbilicais

As artérias umbilicais não têm nenhuma camada subendotelial adjacente, apenas são rodeadas por endotélio, sendo este, uma fina camada de células epiteliais achatadas ou cúbicas, que se encontra adjacente às camadas musculares (Zang, 1999).

As paredes das artérias são constituídos por tecido muscular liso e contêm imensas fibras de colagénio, as quais contribuem para uma rápida constrição e contracção dos vasos umbilicais mesmo após o fim da ligação feto-placenta (Sadler, 2000).

Contudo, as artérias umbilicais são mais simples do que as restantes artérias do organismo. As camadas são compostas por apenas uma camada longitudinal interna de lúmen irregular, sem nervos nem “*vasa vasorum*” e tem uma camada circular externa contínua com a geleia de *Wharton* (Di Naro *et al.*, 2001).

A veia umbilical apresenta uma estrutura similar às artérias umbilicais, no entanto, existem algumas diferenças entre estes dois tipos de vasos sanguíneos (Zang, 1999). A veia umbilical é mais larga e tem paredes mais delgadas (menos camadas musculares) do que as artérias umbilicais e, por isso, é mais frágil.

1.3 Circulação placentária fetal

A avaliação do cordão umbilical pode ser acompanhada tanto por uma visão ao longo do eixo, figura 4-A, ou por uma visão de secção transversal, figura 4-B. No entanto, este último método parece mais apropriado, uma vez que não só permite a quantificação dos vasos umbilicais mas também da quantidade de geleia de *Wharton* (Di Naro *et al.*, 2001).

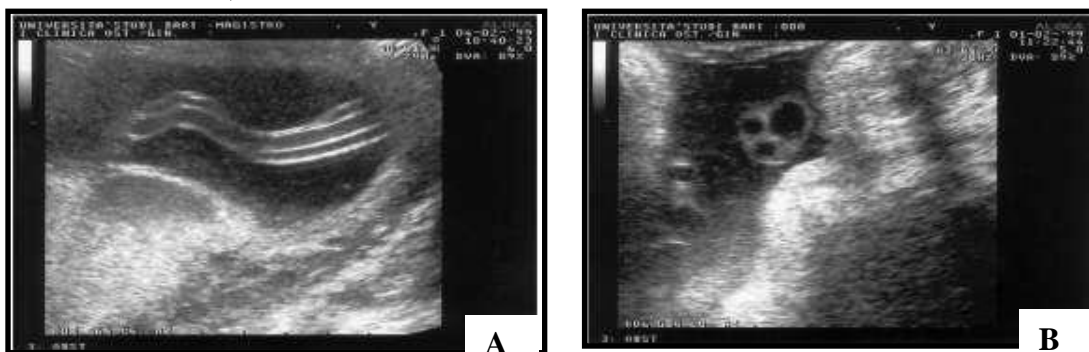


Figura 4 – **A** – Ultrasonografia com visão longitudinal do cordão umbilical; **B** – Ultrasonografia com visão da secção transversal do cordão umbilical (Di Naro *et al.*, 2001).

A ultrasonografia *Doppler* de fluxo colorido pode ser usada para a descoberta pré-natal da posição e de anormalidades estruturais do cordão umbilical e dos seus vasos (Moore *et al.*, 2002).

A troca de produtos gasosos e metabólicos entre a mãe e o feto ocorre através da placenta, como se pode ver na figura 5. O sangue pobre em oxigénio abandona o feto através de artérias umbilicais que o transportam para a placenta. No local onde o cordão se une à placenta, estas artérias dividem-se em várias artérias coriônicas, dispostas radialmente e ramificadas livremente na placa coriônica, antes de penetrarem nas vilosidades coriônicas. Os vasos sanguíneos formam um extenso sistema artério-capilar-venoso nas vilosidades coriônicas, que leva o sangue fetal muito próximo do sangue materno (Moore *et al.*, 2000).

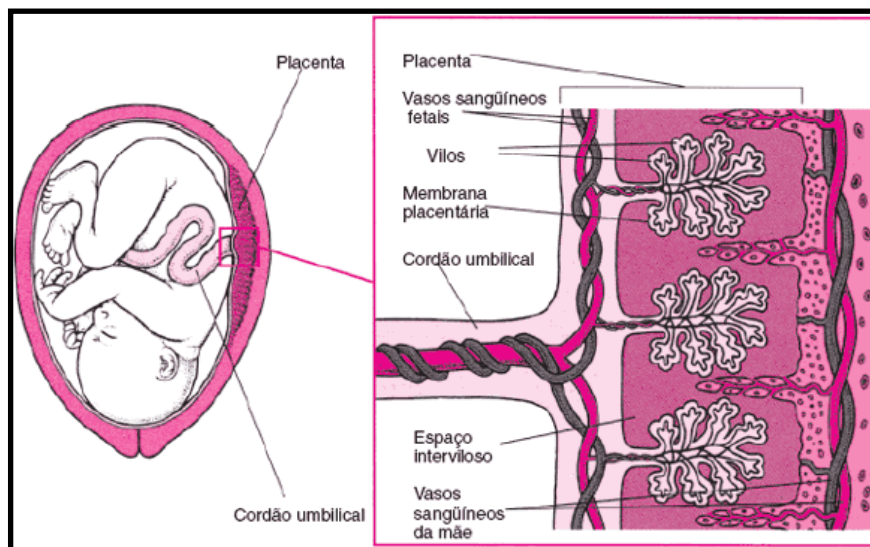


Figura 5 – A troca de produtos gasosos e metabólicos entre o feto e a mãe através da placenta (adaptado de http://www.med-brazil.com/med43/m_manual/mm_sec22_247.htm).

Este sistema artério-capilar-venoso proporciona uma área muito grande para as trocas de produtos gasosos e metabólicos, entre as correntes sanguíneas maternas e fetais. O sangue fetal, bem oxigenado nos capilares fetais, passa para as veias de paredes delgadas, que acompanham as artérias coriônicas até ao local de união do cordão umbilical, onde elas convergem, formando a veia umbilical (Moore *et al.*, 2000).

Trabalhos de investigação recentes demonstraram que, as alterações na composição e no metabolismo do cordão umbilical estão, frequentemente associadas com certas doenças que ocorrem durante a gravidez (como por exemplo, restrição do crescimento fetal, diabetes ou dano fetal) ou durante o parto podendo haver perigo fetal, distúrbios no coração do feto, entre outros (Di Naro *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Alterações na composição e metabolismo do cordão umbilical associadas a patologias/doenças no feto (adaptado de Di Naro *et al.*, 2001).

Alterações no cordão umbilical	Características	Patologias/Doenças
Cordão umbilical com diâmetro menor	Diminuição da quantidade da geleia de <i>Wharton</i>	Redução do crescimento fetal, diminuição da protecção dos vasos sanguíneos, diminuição do líquido amniótico e stress fetal;
Cordão umbilical largo	Cordão umbilical com diâmetro superior ao normal. Serve como parâmetro adicional que ajuda a identificar desordens na mãe (p. ex. intolerância à glucose).	Anomalias da estrutura fetal, tais como: - Tumor no cordão umbilical e quistos; - Degeneração mucóide do cordão umbilical.
Presença de uma única artéria umbilical	Mais larga do que o normal e pode ter aproximadamente o diâmetro da veia. Ocorre em 0,5-2,5% dos casos de neonatos sem complicações, de 1,5-7% dos casos de aborto e em 9-11% em aneuplóides.	Aumento do risco de doença intra-uterina e intra-parto; Possíveis complicações pré-natais, tais como: - Anomalias no feto e na placenta; - Aneuploidia; restrição ao crescimento e morte fetal (está associada à diminuição da protecção dos vasos sanguíneos).

1.4 - Músculo Liso

1.4.1 – Estrutura e caracterização do músculo liso

O tecido muscular altamente especializado, tem quatro características funcionais fundamentais: contractilidade, excitabilidade, extensibilidade e elasticidade. Há três tipos de tecido muscular, o músculo-esquelético que move o tronco e os membros, o músculo liso que desloca os alimentos ao longo do tubo digestivo e as secreções glandulares através dos canais e o músculo cardíaco que bombeia o sangue para os vasos sanguíneos (Seeley *et al.*, 2006).

O músculo liso é o tipo de músculo mais variável do corpo no que diz respeito à distribuição e funcionamento. Constituído por células alongadas fusiformes com a extremidade afunilada, envolvidas por tecido fibroelástico que forma uma porção contráctil em alguns órgãos, existe nas paredes dos órgãos ocos, músculos intrínsecos do olho, paredes dos vasos sanguíneos. O músculo liso desempenha as mais variadas funções, tais como, impelir a urina através das vias urinárias, misturar os alimentos no estômago e intestino, dilatar e contrair a pupila e regular o fluxo sanguíneo nos vasos sanguíneos (Seeley *et al.*, 2006).

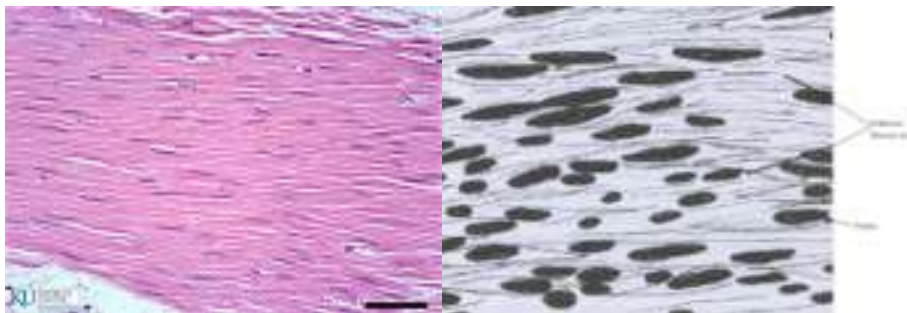


Figura 6 – Histologia do Músculo Liso (Adaptado de Seeley *et al.*, 2006).

As células musculares lisas, também chamadas de fibras, figura 6, têm um comprimento de 15 a 500 μm e um diâmetro de 5 a 10 μm . Na zona central da célula (mais larga) encontra-se apenas um núcleo ovóide que apresenta uma forma em espiral na secção longitudinal (Ross, 2002; Burkitt *et al.*, 2000). Em comparação com o músculo esquelético, apresenta um menor número de miofilamentos de actina e miosina. Embora os miofilamentos na célula muscular lisa se aproximem de uma orientação longitudinal ou espiral, eles não se organizam em sarcômeros, por isso o

músculo liso não apresenta um aspecto estriado. São conhecidos dois tipos de músculo liso, descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Quadro comparativo dos diferentes tipos de músculo Liso (Seeley *et al.*, 2006).

Músculo liso	Localização	Composição	Características
Visceral (unitário)	Túnicas envolventes de órgãos ocos, constituindo o músculo liso dos sistemas digestivo, reprodutor e urinário	Possui numerosas fendas sinápticas, permitindo a passagem directa dos potenciais de acção de uma célula para outra.	Muitas vezes é autorítmico, mas parte dele contrai-se apenas quando estimulado.
Multiunitário	Túnicas ou camadas nas paredes dos vasos sanguíneos, ou em pequenos feixes como nos músculos erectores do pêlo e da íris, ou ainda em células isoladas como na cápsula do baço.	Possui poucas fendas sinápticas e cada célula actua como uma unidade independente.	Contraí-se habitualmente apenas quando estimulado por nervos ou hormonas.

As células musculares lisas contêm filamentos intermédios não contrácteis. Ligam-se aos corpos densos dispersos na célula e, ocasionalmente, ligam-se à membrana plasmática. Os miofilamentos de actina unem-se aos filamentos intermédios, estes em conjunto com os corpos densos formam um citoesqueleto intracelular, que leva ao encurtamento da célula quando os miofilamentos de actina e miosina deslizam uns sobre os outros durante o processo de contracção (Seeley *et al.*, 2006).

As células do músculo vascular liso (CMVL) presentes na camada média das artérias e veias são mecano-sensores do sistema cardiovascular. Através da modulação do diâmetro e tono dos vasos sanguíneos, as CMVL influenciam a pressão sanguínea e a regulação da perfusão tecidual (Anastassi, *et al.*, 2007).

As células do músculo liso dos vasos sanguíneos dividem-se regularmente no adulto, presumivelmente para substituir células danificadas ou senis (Ross, 2002). As CMVL, possuem um aparato contráctil de filamentos finos e espessos, um citoesqueleto de actina e filamentos intermédios de desmina. Os filamentos finos contêm actina, tropomiosina e proteínas de ligação à calmodulina “caldesmon”, enquanto que os

filamentos espessos contêm miosina II que é similar à miosina II do músculo esquelético (Ross, 2002).

1.4.2 – Mecanismos de contracção e aspectos fundamentais

O mecanismo de contracção do músculo liso é diferente do mecanismo do músculo estriado, uma vez que as proteínas têm uma disposição diferente em redor da membrana celular. As células do músculo liso mediante pequenas contracções sofrem alterações na sua estrutura. No estado de repouso tem uma forma alongada enquanto que na forma contraída tem uma forma globular (ver figura 7) (Burkitt et al., 2000; Ross, 2002).

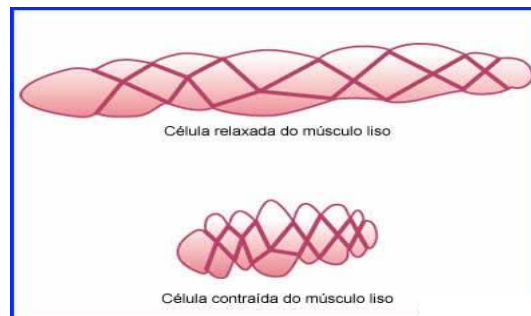


Figura 7: Contracção das células do músculo liso (adaptado de Craig C. Freudenrich, 2001).

O mecanismo de contracção (figura 8) é iniciado pelo aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma da célula proveniente do meio extracelular ou por libertação de reservas intracelulares. O aumento de concentração de cálcio no citoplasma das células de músculo liso faz com que este se ligue a uma proteína designada de calmodulina e é este complexo que estimula a enzima miosina cinase, fosforilando duas cadeias da miosina (Seeley *et al.*, 2006).

A reacção de fosforilação é regulada pelo complexo Ca^{2+} – calmodulina. Quando a miosina é fosforilada, a cabeça da miosina liga-se à actina produzindo contracção (figura 7). A actina e a miosina interagem por deslizamento dos filamentos produzindo contracções de forma similar às do músculo esquelético. Quando a cabeça da miosina é desfosforilada esta dissocia-se da actina, ocorrendo relaxação muscular (Seeley *et al.*, 2006; Ross, 2002).

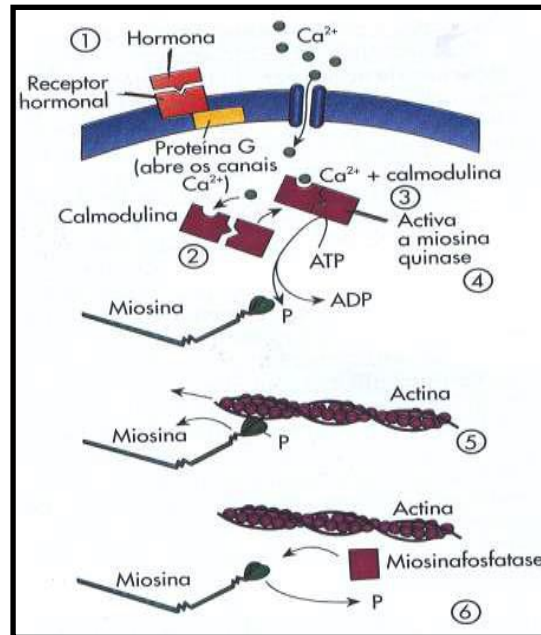


Figura 8 – O papel dos íons Ca^{2+} na contração do músculo liso (Seeley *et al.*, 2006).

1.4.3 – Regulação da contração muscular

A regulação da contração muscular envolve a manutenção da concentração de cálcio intracelular através de dois sistemas de membranas: a membrana da fibra muscular e a membrana do retículo sarcoplasmático (RS). As células do músculo liso contêm numerosos domínios de libertação de cálcio que, dependendo das suas concentrações intracelulares, determinam o estado contráctil do vaso (Catterall *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005).

O mecanismo de excitação/contração é um processo que ocorre no músculo e que liga a despolarização da membrana plasmática à libertação de cálcio do RS, fonte principal de cálcio no músculo (Burkitt *et al.*, 2000). A libertação de cálcio ocorre por uma via de selectividade ao catião e por ligandos que regulam a libertação de cálcio do canal localizado na membrana do RS (Serysheva *et al.*, 1999).

Embora a maioria do cálcio entre no citoplasma durante a despolarização pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, existe também a entrada de cálcio na célula através de canais de cálcio dependentes de ligandos que são activados por hormonas. Posto isto, a contração do músculo liso pode ser iniciada por certas hormonas secretadas da glândula pituitária posterior, como por exemplo, a prolactina, a hormona do crescimento e a hormona estimulante da tiróide (Ross, 2002).

2 – Canais iónicos

Os canais iónicos são proteínas transmembranares de grandes dimensões, essenciais para um correcto funcionamento de todas as células eucarióticas. Estes canais têm um papel fundamental nas células excitáveis porque determinam o potencial de membrana (Hanna *et al.*, 1998).

Os canais iónicos consistem em vias para o movimento de partículas com carga através das membranas celulares e promovem a interacção entre a célula e o seu ambiente. A propriedade de transporte dos canais iónicos é central para a fisiologia dos organismos vivos, subjacente a diversos fenómenos (por exemplo, condução e conversão de sinais eléctricos) (Hanna *et al.*, 1998).

Há diferentes tipos de canais iónicos para realizar uma grande variedade de funções requeridas pelos organismos. Estes canais diferem na sua localização dentro do organismo, pois quando abrem/fecham, permitem ou impedem o fluxo de iões, assim como, controlam o tipo de iões que podem passar e a velocidade a que passam no seu interior. Alguns canais são muito selectivos, permitindo, apenas a passagem de uma espécie iónica que predomina fisiologicamente (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) (Corry *et al.*, 2006).

A abertura dos canais pode ser iniciada de muitas maneiras diferentes, existem canais dependentes de ligando, canais mecanosensíveis (respondem à pressão da membrana), canais dependentes de voltagem (abrem em resposta a alterações do potencial da membrana celular), e os canais mediadores de segundo mensageiro (a activação de um canal provoca uma cascata de eventos bioquímicos dentro da célula que activa um conjunto de canais iónicos que medeiam a produção de um segundo mensageiro) (Corry B. *et al.*, 2006).

Organismos multicelulares complexos requerem uma transmissão rápida e exacta da informação entre as células, tecidos e coordenação de funções distantes. Nos vertebrados, os sinais eléctricos e o cálcio intracelular controlam a contracção muscular, secreção de hormonas, processamento da informação no cérebro e a saída de Ca^{2+} do cérebro para os tecidos periféricos. Em células não excitáveis, o sinal de curta duração do cálcio manipula eventos celulares, incluindo secreção, expressão génica e divisão celular (Yu *et al.*, 2005).

Todos estes processos fisiológicos são mediados em parte por membros da super família (140 membros) dos canais iónicos dependentes de voltagem (Yu *et al.*, 2005).

A arquitectura das famílias de canais iónicos consiste em 4 domínios que dão a forma estrutural ao poro. Os primeiros canais iónicos a serem isolados foram os canais de sódio dependentes de voltagem (figura 9). A subunidade principal, a subunidade α é composta por 4 domínios homólogos (I-IV) que forma a estrutura comum desta família. Cada domínio contém seis hélices α transmembranares (segmentos denominados S1 – S6) com uma reentrância na membrana entre os segmentos S5 e S6. Os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) têm uma estrutura similar (Yu *et al.*, 2005).

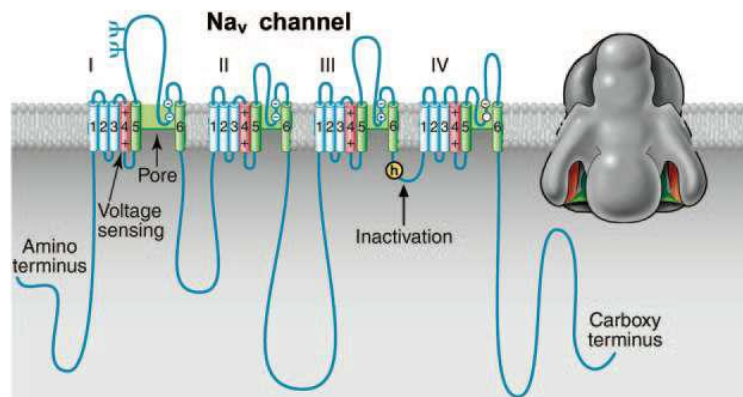


Figura 9 – Estrutura dos canais de sódio dependentes de voltagem (Yu *et al.*, 2005).

O poro formado pelas subunidades dos canais iónicos dependentes de voltagem e as suas relações estruturais são primariamente responsáveis pelas suas características de bloqueio, condutância iónica selectiva, e regulação pelo sinal de segundo mensageiro assim como agentes farmacológicos. Contudo, muitas destas subunidades principais estão associadas com subunidades auxiliares que modificam esta expressão, as suas propriedades funcionais e a sua localização subcelular (Yu *et al.*, 2005).

3 – Canais cálcio

3.1 – O ião cálcio no organismo

Existem cerca de 1400g de cálcio em todo o organismo, que se encontra principalmente distribuído pelo esqueleto e pelos dentes, embora apenas aproximadamente 10g circule entre o sangue e os espaços celulares. Apesar desta quantidade não ter significado quantitativo é qualitativamente muito importante, pois, o Ca^{2+} livre é um importante mensageiro intracelular presente em todas as células, onde actua como componente chave numa grande variedade de processos bioquímicos (Gribkoff, 2006).

O papel fundamental do cálcio foi pela primeira vez proposto pelo fisiopatologista Sidney Ringer (1835-1910) que revelou a sua importância biológica na manutenção da integridade da célula (citado em Carafoli, 2003).

O Ca^{2+} é particularmente importante nas células excitáveis como por exemplo nos neurónios, células endócrinas e miócitos, onde para além das funções comuns a nível celular regula também a excitabilidade da célula, a libertação tanto de transmissores, como de hormonas que também medeiam a regulação da contracção muscular do batimento cardíaco, excitação/contracção, para a fertilização e para a adesão célula a célula. Este íão é também da mesma forma fundamental na neurotransmissão, na secreção de hormonas, no processamento de informação no cérebro e na subsequente transmissão da resposta para os tecidos periféricos (Carafoli, 2003; Triggle, 2006). Os componentes celulares envolvidos na regulação da concentração intracelular de cálcio são potenciais locais para acção de drogas, que possibilitam por exemplo, a terapia de doenças cardiovasculares e gastrointestinais. (Yamakage e Namiki, 2002; Triggle, 2006).

O Ca^{2+} livre é sequestrado intracelularmente por proteínas que se ligam a este especificamente, estas proteínas são libertadas intracelularmente após um estímulo específico, este é o ponto de regulação que é mediado pelos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV; Ca_v s), uma família de 10 membros de canais iónicos dependentes de voltagem que estão envolvidos no acoplamento fisiológico de mudanças relevantes no potencial de membrana com a entrada de Ca^{2+} (Gribkoff, 2006).

A concentração intracelular de Ca^{2+} livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) é mantido a níveis baixos, e expressa a sua função em cada célula/tecido/órgão como secreção e contracção, originando processos de memória, movimento, dor, entre outros. Em condições de descanso, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é mantida aproximadamente a 100 nM, que corresponde a 1/10000 da concentração extracelular de Ca^{2+} livre (aproximadamente 1 mM) (Yamakage, 2002).

3.2 – Regulação da concentração de cálcio no organismo

As oscilações na concentração intracelular de cálcio devem-se não só à sua entrada ou saída da célula através da membrana celular, mas também à sua mobilização de reservas intracelulares (mitocôndria e RS) (Triggle, 2006).

Podem estar envolvidos diferentes tipos de canais que medeiam a entrada, mobilização e armazenamento de cálcio intracelular: canais de cálcio dependentes de

voltagem (CCDV), canais de cálcio operados por receptor (CCOR), bombas de sódio e cálcio, canais de cálcio existentes na mitocôndria e RS (Carafoli, 2003; Triggle, 2006). Alguns dos canais que estão envolvidos no transporte de cálcio estão representados na figura 10.

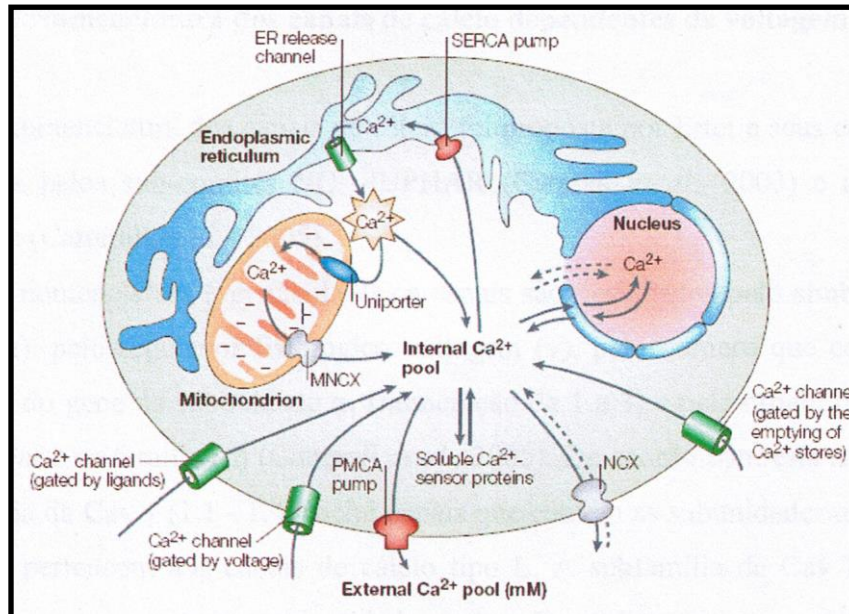


Figura 10: Representação dos diferentes tipos de canais que promovem a regulação da concentração intracelular de cálcio (Adaptado de Carafoli, 2003).

A entrada de cálcio para o RS é feita através da Ca^{2+} ATPase existente nessa membrana sendo conhecida por bomba SERCA. O cálcio é libertado do RS através de canais que são regulados pelo próprio cálcio e também requerem um efector inositol 1,4,5 – trifosfato (IP3) (Carafoli, 2002).

O cálcio pode sair da mitocôndria através de uma bomba Na/Ca^{2+} ou de $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$. O transporte de cálcio para a mitocôndria (uniporte) é dirigido pelo potencial negativo interno (-180 mV) que transporta Ca^{2+} para o seu interior. O cálcio pode ser transportado entre o núcleo e o citoplasma. O núcleo é envolvido por uma membrana nuclear (extensão do RS) e este funciona como reservatório de cálcio, que partilha transportadores e canais com o RS. O cálcio pode sair da célula por uma bomba membranar Ca^{2+} ATPase de alta afinidade/alta capacidade (NCX) (Carafoli, 2003).

A existência de diversos tipos de transportadores de cálcio é justificada pelas suas diferentes propriedades, que satisfazem todas as necessidades das células em termos de homeostase do cálcio (Carafoli, 2002).

3.3 – Nomenclatura dos canais de cálcio dependentes de voltagem

A nomenclatura dos canais de cálcio foi proposta por Ertel e seus colaboradores e aprovada pelos sub-comités NC – IUPHAR (Caterall *et al.*, 2003) e recentemente actualizada (Caterall *et al.*, 2005).

Na nomenclatura (ver tabela 3) os canais são designados pelo símbolo químico do íão (Ca), pelo regulador fisiológico voltagem (v), pelo número que corresponde à subfamília do gene da subunidade α_1 (numeração 1 a 3) e pela ordem de descoberta da subunidade na família (n) (Caterall *et al.*, 2005). De acordo com esta nomenclatura, a subfamília da Cav 1 (1.1 – 1,4) inclui canais que contêm as subunidades α_1S , α_1C , α_1D e α_1F que pertencem aos canais de cálcio tipo L. A subfamília da Cav 2 (2.1 – 2.3) incluem canais que contêm as subunidades α_1A , α_1B , α_1E que pertencem aos canais de cálcio tipo P/Q, N e R, respectivamente. A subfamília da Cav 3 (3.1 – 3.3) inclui canais que contêm as subunidades α_1G , α_1H , α_1I que pertencem aos canais de cálcio tipo T (Catterall *et al.*, 2005; Dolphin, 2006).

Tabela 3 – Nomenclatura para os diferentes canais de cálcio dependentes de voltagem (adaptado de Dolphin *et al.*, 2006).

Família	Nome anterior	Nome proposto
Tipo L	α_1S	Cav 1.1
	α_1C	Cav 1.2
	α_1D	Cav 1.3
	α_1F	Cav 1.4
Tipo N	α_1A	Cav 2.1
Tipo P/Q	α_1B	Cav 2.2
Tipo R	α_1E	Cav 2.3
Tipo T	α_1G	Cav 3.1
	α_1H	Cav 3.2
	α_1I	Cav 3.3

3.4 – Classificação dos canais de cálcio

Baseado nas suas propriedades electrofisiológicas e farmacológicas, os CCDV, foram divididos em dois grandes grupos (Yamakage, 2002):

1. Canais de Ca^{2+} activados por alta voltagem (CCAV);
2. Canais de Ca^{2+} activados por baixa voltagem (CCBV).

A activação limite dos CAAV ocorre a $-40\sim-10\text{mV}$, enquanto a activação CCBV ocorre a baixos potenciais de membrana, $-60\sim-70\text{mV}$ (Yamakage, 2002).

Os CCAV estão divididos em canais tipo L, tipo N, tipo P/Q e tipo R, enquanto os CCBV consistem somente nos canais do tipo T. Os canais tipo R são ocasionalmente classificados como canais activados por voltagem intermédia, CCVI. A selectividade iónica e os antagonistas/bloqueadores destes subtipos de canais estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Classificação e caracterização electrofisiológica dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (adaptado de Yamakage, 2002).

	Tipo T	Tipo N	Tipo L	Tipo P/Q	Tipo R
Dependência de voltagem	CCBV	CCAV	CCAV	CCAV	CCVI
Limiar de activação (mV)	-70	-20	-30~-10	-60	-40
Intervalo de inactivação (mV)	-100~-60	-120~-30	-60~-10		
Taxa de inactivação (mseg)	20-50	50-80	>500		20-40
Condutância de um canal (pS)	8	13	25	10-20	14
Selectividade iónica	$\text{Ba}^{2+} = \text{Ca}^{2+}$	$\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$	$\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$	$\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$	$\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$
Isoformas	$\alpha_{1G}, \alpha_{1H}, \alpha_{1I}$	α_{1B}	$\alpha_{1C}, \alpha_{1D}, \alpha_{1S}$	α_{1A}	α_{1B}
Antagonistas/Bloqueadores*		ω -CTX	DHP	FTX	
		ω -CTX -GVIA	PAA	ω -CTX-MVIIC	ω -Aga IIIA
		ω -Aga IIIA	BTZ		

* ω - CTX - ω - conotoxina; ω -Aga IIIA - toxina; DHP - dihidropiridinas; BTZ - Benzotiazepinas; PAA - Poliacrilamida; FTX - fracção tóxica;

Enquanto os canais de tipo L e tipo T são observados numa vasta gama de células, os canais de tipo N, P/Q e R estão predominantemente localizados em neurónios (terminais pré-sinápticos) (Catterall *et al.*, 2000; Yamakage e Namiki, 2002). Em muitos tipos de células, os componentes dos canais de cálcio P e Q não são adequadamente separados, estão associados, daí que em muitas pesquisas tenha sido adoptado a terminologia de canais tipo P/Q.

Os CCDV tipo N, P/Q e R requerem uma forte despolarização para a sua activação e apresentam geralmente muita actividade e selectividade, localizam-se nos terminais pré-sinápticos e a sua principal função é permitir a libertação de neurotransmissores (Catterall *et al.*, 2005; Dolphin, 2006). Estes tipos de canais não são muito afectados por antagonistas dos canais de cálcio tipo L, no entanto, podem ser bloqueados através de toxinas polipeptídicas específicas do caracol e de venenos de aranha. São primariamente expressos nos neurónios, onde iniciam a neurotransmissão e num maior número de sinapses centrais e periféricas, mediando a entrada de cálcio nos corpos celulares e dendrites (Catterall *et al.*, 2005).

Os CCDV tipo T são activados por potenciais muito negativos e por uma pequena despolarização. São resistentes a vários tipos de antagonistas orgânicos, bem como às toxinas de serpentes e de aranha usadas para bloquear as correntes de cálcio tipo N e P/Q. São expressos numa vasta variedade de tipos de células, onde estão envolvidos (Catterall *et al.*, 2005).

Os CCDV tipo L são expressos em neurónios, células endócrinas, músculo liso, esquelético, cardíaco, fibroblastos e células renais. (Dolphin, 2006; Triggle, 2006). No músculo esquelético, liso e cardíaco, os principais fluxos de cálcio tipo L são distinguidos pela forte despolarização de longa duração, permitindo entrada de cálcio, o que induz a vasoconstrição neste tipo de músculos, activação de alta voltagem, condutância dos canais, lenta inactivação dependente da voltagem, regulação por fosforilação de proteínas dependentes de adenosina monofosfato (AMPc) e inibição específica por drogas antagonistas de cálcio, incluindo as dihidropiridinas, fenilalquilaminas, e benzotiazepinas (Catterall *et al.*, 2005). Devido à sensibilidade destes canais para estas drogas, podem também ser designados por receptores de dihidropiridina (DHPR) (Serysheva, 2004). Os canais tipo L são particularmente mas não extensivamente, associados ao sistema cardiovascular (Triggle, 2006).

A nomenclatura dos canais de Ca^{2+} foi recentemente actualizada (Catterall *et al.*, 2005). Tabela 5.

Tabela 5: Funções fisiológicas e farmacológicas dos diferentes tipos de canais de Cálcio (Adaptado de Catterall, *et al.*, 2005; Gribkoff, 2006).

Canal	Tipo	Localização	Antagonistas	Função celular.	Patologias associadas
Ca _v 1.1	L	Músculo Esquelético; túbulos transversos.	Dihidropiridinas Fenilalquilaminas Benzotiazepinas	Processo excitação/contracção e homeostase do Ca ²⁺ no músculo esquelético.	Patologias que dificultam os movimentos
Cav1.2	L	Miócitos cardíacos; músculo liso; miócitos; células endócrinas; neurónios; corpos celulares; dendrites proximais	Dihidropiridinas Fenilalquilaminas Benzotiazepinas	Processo excitação/contracção nos músculos cardíaco e liso; secreção de hormonas; regulação da transcrição; integração sináptica	Cardiovasculares
Ca _v 1.3	L	Células endócrinas; células neuronais e dendrites; miócitos cardíacos e células pacemaker; células do couro cabeludo.	Dihidropiridinas Fenilalquilaminas Benzotiazepinas	Secreção de hormonas; regulação da transcrição; regulação sináptica; controlo do ritmo cardíaco; libertação de neurotransmissores para células sensoriais	Arritmia, disfunção na audição
Ca _v 1.4	L	Retina e células bipolares; Glândulas adrenais.	Dihidropiridinas Fenilalquilaminas Benzotiazepinas	Secreção de neurotransmissores para fotoreceptores	Doenças oftalmológicas
Ca _v 2.1	P/Q	Nervos terminais e dendrites; Células neuroendócrinas.	ω-Agatoxin IVA	Libertação de neurotransmissores; passagem de Ca ²⁺ nas dendrites; secreção de hormonas.	Ataxia e enxaquecas hemiplégicas
Ca _v 2.2	N	Nervos terminais e dendrites; Células neuroendócrinas; coração; pâncreas e pituitária.	ω-Conotoxin-GVIA	Libertação de neurotransmissores; passagem de Ca ²⁺ nas dendrites; secreção de hormonas; processo de excitação/contracção nas células β pancreáticas.	Dores neuropáticas e agudas
Ca _v 2.3	R	Corpos de células neuronais e Dendrites.	SNX-482	Controlo do ritmo cardíaco; passagem de Ca ²⁺ nas dendrites disparos repetitivos.	Doenças neurológicas
Cav3.1	T	Corpos de células neuronais e dendrites; miócitos do músculo liso;	-	Controlo do ritmo cardíaco; disparos repetitivos.	Epilepsia, fibrilação atrial
Cav3.2	T	Corpos de células neuronais e dendrites; miócitos do músculo liso dos rins, fígado, cérebro e coração.	-	Contracção e proliferação do músculo liso; secreção de aldosterona e cortisol; Pacemaker; disparos repetitivos.	Hipertensão, angina, epilepsia, dor
Cav3.3	T	Corpos de células neuronais e dendrites	-	Pacemaker; disparos repetitivos	Epilepsia, Sono

3.5 – Estrutura e função dos CCDV tipo L

Os CCDV de tipo L são complexos proteicos membranares oligoméricos, que têm um peso molecular com cerca de 430 kDa (Serysheva, 2004). Estes canais podem ser compostos por quatro subunidades, dependendo do tecido onde são expressos e codificados por múltiplos genes (figura 11) (Catterall *et al.*, 2005).

Os CCDV tipo L são formados por uma grande subunidade α_1 (190-250 kDa) a qual forma o poro do canal e que confere propriedades funcionais aos canais de cálcio tipo L, incluindo, abertura dependente de voltagem, permeabilidade ao cálcio, inativação dependente do cálcio e inibição pelos bloqueadores de cálcio (Sonkusare *et al.*, 2006), regulação da sinalização através de segundos mensageiros e pode ser alvo de alguns fármacos selectivos para o canal (Yamakage and Namiki, 2002; Yu *et al.*, 2005). Esta subunidade contém locais de ligação de antagonistas do íon Ca^{2+} e está associada com subunidades auxiliares: a subunidade α_2 (143 kDa) que está associada com a subunidade α_1 e não contém nenhum local de ligação de alta afinidade; e 2 subunidades de baixo peso molecular, β (54kDa) e δ (27 kDa), às quais se junta em alguns casos, como nos miócitos estriados, uma quinta subunidade, a subunidade γ (30 kDa). As subunidades α_1 e β contêm locais de fosforilação para uma proteína cinase dependente de AMPc. As subunidades α_2 , γ e δ são muito glicosiladas. A subunidade β é completamente intracelular, a α_2 é extracelular e encontra-se ligada a δ por ligações S-S (Hanna *et al.*, 1998; Body *et al.*, 2005; Catterall *et al.*, 2005).

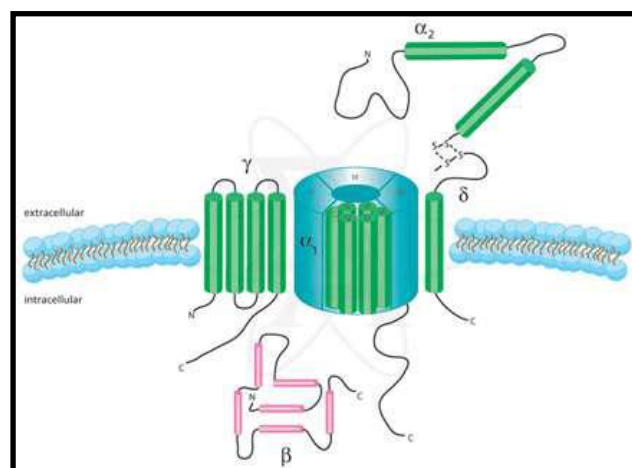


Figura 11 – Organização estrutural dos CCDV tipo L. (Figura retirada de: www.sigmaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientifi_Resources/Pathway_Slides_Charts/Voltage_Gated_Calcium_Channel.html).

A subunidade α_1 é uma proteína com cerca de 2000 aminoácidos, organizados em quatro domínios homólogos (I até IV), sendo cada um composto por 6 hélices α transmembranares (S1-S6), e uma ansa associada à membrana entre os segmentos transmembranares S5 e S6, que formam o domínio do poro do canal (“*P-loop*”). O segmento S4 de cada domínio homólogo possui uma organização especial de cargas positivas que funciona como um sensor de voltagem. A despolarização induz uma rotação para a direita de 180° do segmento S4, o que leva a que ocorram alterações conformacionais, este movimento arrasta consigo o segmento S5. A conformação do canal necessária à sua abertura, envolve além deste arrastamento, a interação entre regiões com cargas elétricas diferentes, envolvendo por um lado o segmento S4 e por outro os segmentos S2 e S3. A interação dá-se entre o segmento S2 e o segmento S3, que contém regiões carregadas negativamente, com o segmento S4 (que contém um aminoácido com carga positiva (arginina ou lisina) em cada três ou quatro resíduos) (Body *et al.*, 2005; Frohnwieser *et al.*, 1997).

O lado interno do poro é limitado pelos segmentos S5 e S6, e é aqui, entre estes dois segmentos que se situam os locais de fixação dos antagonistas bloqueadores específicos dos CCDV do tipo L (Hanna *et al.*, 1998).

Além dos antagonistas dos CCDV do tipo L, também existem drogas que promovem a passagem do íon Ca^{2+} através dos CCDV tipo L (ativadores dos CCDV-L). São exemplos deste tipo de drogas a 1,4-dihidropiridina Bay K 8644, o benzoilpirrole FPL-64176 e a benzodiazocina CGP-48506 (Striessnig *et al.*, 1999).

A modulação dos canais por fosforilação acontece pela ligação dos domínios intracelulares a moléculas sinalizadoras incluindo a proteína cinase A (PKA) e a proteína cinase C (PKC). Os grupos amino (N)- e carboxi (C)- terminais têm papéis específicos na modulação dos fenótipos e expressão dos canais (Catterall, 2000).

Nos mamíferos as subunidades α_1 são codificadas, pelo menos, por 10 genes distintos. A sequência completa de aminoácidos das subunidades α_1 é 70% ou mais idêntica, dentro de uma subfamília, mas é só 40% idêntica entre 3 subfamílias. As relações entre as famílias, com base na conservação transmembranar e no domínio do poro, estão ilustradas na figura 12 (Catterall *et al.*, 2005).

Dez genes (designados de CACNA1A-1 E CACNA1S) codificam as subunidades α_1/Ca_v (Bidaud *et al.*, 2006).

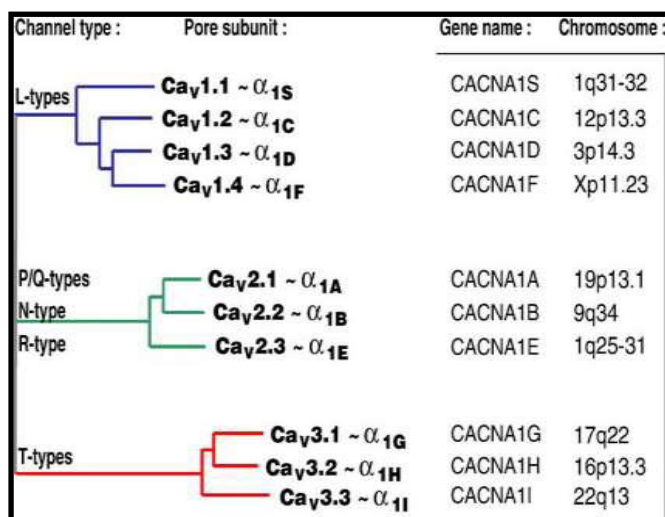


Figura 12 – Árvore filogenética que ilustra as várias subfamílias dos CCDV, que existem nas células humanas. Quatro genes codificam os CCDV do tipo L. Os CCDV neuronais tipos P/Q, N e R são codificados por 3 genes, tal como os CCDV do tipo T (Adaptado de Bidaud *et al.*, 2006).

A subunidade intracelular β parece ser a grande responsável pela modulação da subunidade α_1 , da cinética do canal e dos limiares de activação/inactivação. Em conjunto estas duas subunidades modulam as respostas fisiológicas e biofísicas dos CCDV do tipo L (Sonkusare *et al.*, 2006). Estão identificadas quatro isoformas das subunidades β (β_1 - β_4). São todas hidrofóbicas, não são glicosiladas e estão localizadas no citosol das células. As subunidades β não têm uma região de ligação à membrana, encontram-se ligadas à subunidade α_1 por uma interacção de alta afinidade. Esta interacção é feita pelo Domínio de Interacção de Alfa (DIA), constituído por 18 aminoácidos, entre os domínios I e II de todas subunidades α_1 , e pelo Domínio de Interacção de Beta (DIB) localizado na subunidade β (Richards *et al.*, 2004; Arikath and Campbell, 2003). Uma estrutura obtida por difracção de raios X demonstrou que a ligação do DIA com o DIB é feita através de hélice anfipática por complementaridade hidrofóbica, onde os aminoácidos triptofano e tirosina parecem ser cruciais para esta ligação (Richards *et al.*, 2004).

A subunidade β é codificada por quatro genes diferentes (β_1 , β_2 , β_3 , β_4) que modificam a activação, a cinética de inactivação, a estrutura do canal de voltagem e a sensibilidade aos activadores/inibidores (Sonkusare *et al.*, 2006).

A subunidade α_2 é um polipéptido completamente extracelular e está ancorada à membrana por ligações disulfito, que a unem ao polipéptido δ . As ligações disulfito das

subunidades $\alpha_2\delta$ formam um dímero e estão presentes na maioria dos tipos de canais de cálcio (Serysheva, 2004; Wang *et al.*, 2004).

A subunidade $\alpha_2\delta$ é codificada por quatro genes diferentes (α_2/δ_1 , α_2/δ_2 , α_2/δ_3 , α_2/δ_4). Nos sistemas de expressão heterólogos, a co-expressão das subunidades α_2/δ afecta a função da subunidade α_1 pela diminuição da densidade do canal, movimento de carga, e a ligação ($B_{máx}$) de medicamentos com pequenos efeitos na constante de dissociação (K_D) e efeitos menores variáveis na cinética do canal (Bodi *et al.*, 2005; Sonkusare *et al.*, 2005).

A subunidade γ foi encontrada nos canais do músculo esquelético, coração e cérebro (Sonkusare *et al.*, 2006; Catterall *et al.*, 2005). Apesar de ainda não se saber bem o seu papel, pensa-se que esteja envolvida na regulação de mecanismos de excitação/contração (Wang *et al.*, 2004).

3.6 – Estudos estruturais dos canais de cálcio

Para se compreenderem os mecanismos moleculares e funcionais dos canais de cálcio é necessário obter-se informação a nível tridimensional (3D) (Serysheva *et al.*, 2002). A estrutura tridimensional dos CCDV tipo L tem sido amplamente estudada a partir do músculo esquelético de coelho, recorrendo a solubilização dos canais e à determinação da estrutura por métodos de criomicroscopia electrónica e análise de partícula única (Serysheva *et al.*, 2002).

Em 2001, Murata e seus colaboradores utilizaram o método de microscopia electrónica e a análise de partícula única, para obter uma estrutura bidimensional dos CCDV do músculo esquelético do coelho. Estes estudos revelaram uma estrutura com 21 nm de altura e 10 nm de diâmetro, contendo um pequeno domínio esférico de aproximadamente 7 nm (Murata *et al.*, 2001).

Em 2002, Serysheva e os seus colaboradores sugeriram uma estrutura tridimensional de um CCDV tipo L do músculo esquelético de coelho, determinada por criomicroscopia electrónica e processamento de imagem por computador. Esta estrutura apresentava duas regiões: uma região central e uma região tipo “braço” (Serysheva *et al.*, 2002).

A estrutura tridimensional dos CCDV tipo L do músculo esquelético foi determinada usando o processo de criomicroscopia electrónica e a análise de partícula

única com uma resolução de 23 Å (Wolf *et al.*, 2003). A estrutura determinada mostrou que este é um complexo com um peso molecular de aproximadamente 550 kDa, e é constituído por 5 subunidades do DHPR (Wolf *et al.*, 2003).

Características visíveis na sua estrutura em conjunto com o uso de anticorpos específicos, permitiu identificar as subunidades β (dentro da estrutura globular, intracelular) e subunidade α_2 (do lado dos túbulos-t do canal). O aspecto mais admirável desta estrutura foi verificar que a subunidade α_2 se encontra expelida do domínio membranar na proximidade do fecho da subunidade α_1 . Esta reconstrução mostra que, o prolongamento da subunidade α_2 está no lado maior do domínio globular, o que sugere que a subunidade δ esteja adjacente ou parcialmente embebida dentro da subunidade α_{1C} , na ausência da subunidade δ (Wolf *et al.*, 2003), figura 13.

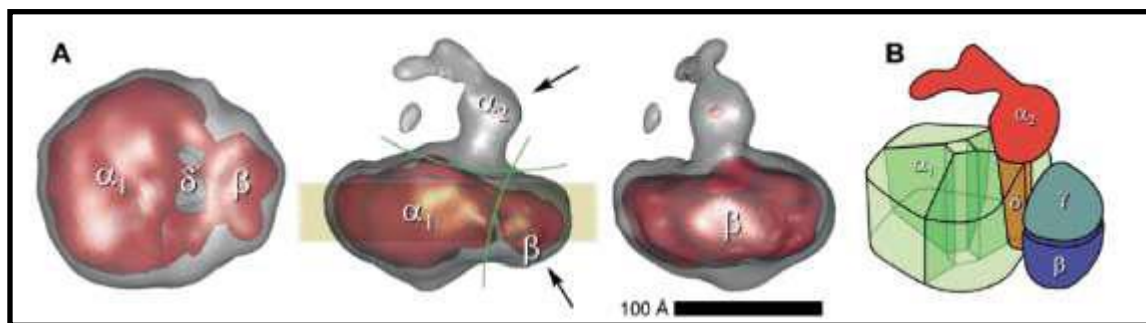


Figura 13 – A) 3 planos da estrutura 3D do receptor de dihidropiridina, com uma resolução de 23-Å. Esquerda: vista que enfrenta o lado citosólico. Meio: vista ao longo do plano da membrana (descrito por uma barra amarela) com os revestimentos extracelulares das subunidades α_2 para cima. Direita: vista ao longo do plano após rotação de 90° da orientação mostrada no painel do meio. B) Esquema proposto para os canais de cálcio tipo L (figura adaptada de Wolf *et al.*, 2003).

Em 2004, Wang determinou uma nova estrutura tridimensional dos CCDV tipo L do músculo esquelético de coelho, com uma resolução de cerca de 2,3 nm, na qual usaram a técnica de congelação-hidratação. Contudo, esta estrutura era diferente da anteriormente proposta por Serysheva, esta era também composta por uma região com um “braço” que se estende para a zona extracelular, com dimensões globulares de 16.5x14.5x8.0 nm e uma zona fixa de 9.5nm (Wang *et al.*, 2004).

Estas conclusões, são consistentes com os ensaios *in vitro* descritos por Gurnett, que mostram que a subunidade α_2 , não está ligada à subunidade α_{1C} , na ausência da subunidade δ (Gurnett *et al.*, 1996).

3.7 – Patologias associadas aos canais de cálcio

Anomalias no funcionamento dos canais de Ca^{2+} são consideradas como parte de adaptações biológicas e morfológicas que caracterizam os vasos sanguíneos na patogênese da hipertensão arterial. Os canais de Ca^{2+} medeiam a contracção induzida pela pressão, evitando a hipertensão arterial (Sonkusare *et al.*, 2006).

A pressão sanguínea é restabelecida por compensação neuronal e/ou por mecanismos renais, e as CMVL retêm os íões cálcio de entrarem nos canais de cálcio dependentes de voltagem, evitando a contracção arterial (Sonkusare *et al.*, 2006).

A pressão sanguínea arterial elevada pode ser a origem de muitas patologias fatais, tal como o enfarte do miocárdio. Pensa-se que o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} do tipo L tem um papel importante na reactividade do tónus miogénico (Moosmang *et al.*, 2005).

O número de patologias associadas aos canais de Ca^{2+} tipo L identificadas até ao momento está a crescer rapidamente, revelando novos dados na patofisiologia de muitas doenças musculares e neurológicas. Investigações na área da biologia molecular permitiram verificar que alterações numa variedade de complexos de proteínas de canais de Ca^{2+} , estão relacionadas com várias patologias humanas (Yamakage, 2002).

Alterações na expressão dos canais de cálcio têm vindo a mostrar a sua influência em doenças como: epilepsia, hipertensão (Triggle, 2006), hipertermia maligna, doenças do sistema nervoso central e paralisia periódica hipocalémica (Serysheva, 2004; Sonkusare *et al.*, 2006), algumas das quais referenciadas na tabela 6.

Algumas doenças que afectam o ser humano surgem de mutações e/ou deleções funcionais das subunidades auxiliares dos diferentes tipos de canais de Ca^{2+} (Arikkath and Campbell, 2003). Um resumo de diferentes doenças que estão relacionadas com anomalias no funcionamento dos canais de cálcio, devido a mutações ocorridas nas diferentes subunidades que constituem estes canais, estão descritas na tabela 6.

Tabela 6 – Patologias associadas aos canais de Ca²⁺ (*Calcium Channelopathies*).

Patologias associadas aos canais de Ca ²⁺	Gene dos canais de Ca ²⁺ envolvidos	Localização cromossomal	Características das mutações	Características patológicas	Referências
Paralisia periódica hipocalémica I (hypoPP)	CACNA1S ⁽³⁾	1q31-32 ⁽¹⁾	AD; (1) Mutação R528H na subunidade $\alpha 1$ dos canais de Ca ²⁺ tipo L. ⁽²⁾	Ataques agudos de fraqueza muscular concomitante, após descida dos níveis sanguíneos de K ⁺ . ⁽¹⁾	(1) Elbaz <i>et al.</i> , 1995; (3) Bidaud <i>et al.</i> , 2006.
Hipertermia maligna tipo 5 (MHS5)	$\alpha 2/\delta$ ^{*(7)}	7q ⁽⁷⁾	AD; (7) Mutação causada por substituição de Arg1086His; ⁽⁴⁾		(3) Bidaud <i>et al.</i> , 2006; (4) Monnier, N., 1997; (7) Yamakage, 2002;
Cegueira noturna estacionária congénita II (CSNB2)	CACNA1F ⁽⁵⁾	Xp11.23 ⁽⁵⁾	Patologia retinal AR e não progressiva. ⁽⁵⁾	Cegueira noturna, diminuição da acuidade visual, miopia, estigmatismo e estrabismo. ⁽⁵⁾	(5) Bech-Hansen, 1998.
Distrofia do cone/bastoneto da retina, tipo III (CORDX)	CACNA1F ⁽³⁾	Xp21.1, Xp27.2- 28 e Xp11.4- q13.2 ⁽⁶⁾	AR ⁽³⁾	Disfunção progressiva dos fotorreceptores. ⁽⁶⁾	(3) Bidaud <i>et al.</i> , 2006; (6) Jalkanen <i>et al.</i> , 2006.
Síndrome de Timothy (TS)	CACNA1C ⁽³⁾		Mutação no exão 8A; O exão 8 encontra-se codificado no segmento S6 do domínio I; ⁽³⁾	Disfunção em múltiplos órgãos, incluindo arritmias letais, tecido fino entre os dedos, patologias cardíacas congénitas, deficiência imune, hipoglicemia intermitente, anomalias cognitivas e autismo. ⁽⁶⁾	(3) Bidaud <i>et al.</i> , 2006; (6) Jalkanen <i>et al.</i> , 2006.
Síndrome misténico de Lambert-Eaton	$\alpha 1 A, \alpha 1 B$ ⁽⁷⁾	67 ⁽⁷⁾	AD; ⁽⁷⁾	Desordem autoimune; fraqueza muscular devido à produção de anticorpos que inibem a interacção das subunidades β e $\alpha 1$. ⁽⁸⁾	(7) Yamakage, 2002; (8) Arikath and Campbell, 2003.

(*- mutação no receptor de rianodina; AD- Autossómica Dominante. AR- Autossómica Recessiva)

4 – Purificação e separação de proteínas

O desenvolvimento de técnicas para separação e purificação de proteínas constituem passos essenciais para muitos dos avanços recentes na área da biotecnologia (Queiroz *et al.*, 2001).

A pureza de uma proteína é uma condição *sine qua non* para a realização de estudos estruturais e funcionais. O grau de pureza da proteína que se pretende purificar depende do estudo a realizar: no caso de estudos estruturais ou aplicações terapêuticas são necessárias amostras com um elevado grau de pureza. Em aplicações industriais (exemplo, alimentação e detergentes domésticos) é requerido um menor grau de pureza (Queiroz *et al.*, 2001).

4.1 – Precipitação de proteínas

As proteínas são solúveis em água devido à presença de aminoácidos hidrofílicos na sua superfície que atraem e interagem com muitas moléculas de água. Se a força iónica da solução é muito elevada ou muito fraca as proteínas tendem a precipitar no ponto isoeléctrico, quando existe um equilíbrio de cargas entre os diferentes aminoácidos que constituem a proteína, não existindo cargas na superfície líquida. A solubilidade da proteína também depende da força iónica do meio onde a proteína está inserida, quando se aumenta a força iónica de uma solução, pela adição de sal, as proteínas precipitam (“*Salting-out*”).

O sulfato de amónio é o sal mais usado para precipitar proteínas porque é muito raro ser solúvel em tampões frios (“*cold buffers*”). O fraccionamento com sulfato de amónio é usado frequentemente em laboratórios de investigação como um primeiro passo na purificação de proteínas fornecendo uma purificação grosseira de proteínas de substâncias não proteicas e também permite a separação de algumas proteínas. O sulfato de amónio permite a formação de um precipitado proteico que normalmente é muito estável (Amersham, 2006).

4.2 – Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)

As biomoléculas são purificadas usando técnicas cromatográficas que as separam de acordo com propriedades específicas (Figura 14).

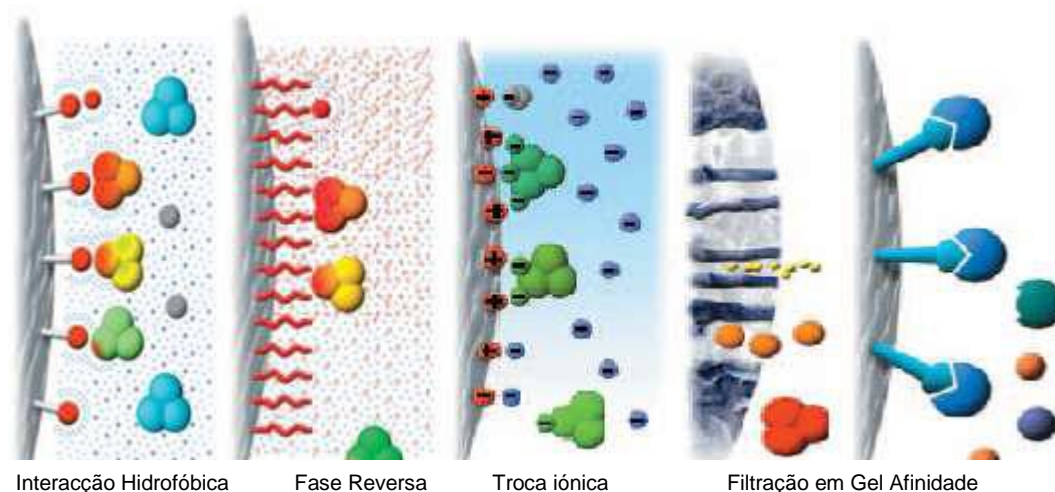


Figura 14 – Principais técnicas de purificação cromatográfica (Amersham, 2006).

O processo cromatográfico consiste na separação de vários componentes que se distribuem entre duas fases, estacionário e móvel. A cromatografia de fase reversa, permite a separação de biomoléculas, de acordo com a hidrofobicidade das proteínas. Nesta cromatografia são usados solventes orgânicos (alcanos lineares e compostos aromáticos), que podem comprometer a actividade biológica ou a estrutura terciária da proteína. A cromatografia de troca iónica permite a separação de biomoléculas com base na carga, sendo que, proteínas com diferentes cargas são retidas e eluídas de modo distinto. É um processo adequado para compostos ionizáveis, sendo afectado pelo pH e pela força iónica do eluente. A cromatografia de filtração em gel permite a separação de biomoléculas com base no seu tamanho. Nesta técnica as moléculas de maiores dimensões apresentam maior tempo de retenção. Este processo é ideal para separar proteínas, açúcares, ácidos nucleicos e outros polímeros.

A cromatografia de afinidade permite a separação de biomoléculas com base numa associação selectiva e reversível entre o soluto alvo e uma outra molécula complementar o ligando (covalentemente ligado à matriz). A interacção de afinidade resulta de interacções físico-químicas complexas (pontes de hidrogénio, associações

hidrofóbicas, interações com electrões e ligações covalentes). A cromatografia de afinidade é a mais específica de todas as técnicas cromatográficas (Amersham, 2006).

A HIC promove a separação de proteínas com base nas interações hidrofóbicas entre ligandos hidrofóbicos mobilizados e regiões não polares na superfície das proteínas. A adsorção aumenta com concentrações de sal elevadas na fase móvel e a eluição é realizada pela diminuição da concentração de sal no eluente (Queiroz *et al.*, 2001).

Esta técnica é usada após a precipitação da amostra com sulfato de amónio (frequentemente usada como passo de concentração ou de remoção de resíduos) ou depois da separação de uma proteína por cromatografia de troca iónica. Em ambas as situações a amostra contém elevadas concentrações de sal e pode ser aplicada directamente na coluna de interacção hidrofóbica. O elevado nível de sal aumenta a interacção entre os componentes hidrofóbicos da amostra e o suporte cromatográfico (Amersham, 2006).

Durante a separação, as amostras são purificadas e eluídas em pequenos volumes, concentrando deste modo a amostra, que pode ser usada directamente na filtração em gel. A HIC pode ser usada como passo de captura, purificação intermédia ou de polimento (Amersham, 2006).

As forças de *Van der Waals* são o factor que mais contribui para as interações hidrofóbicas (“forças interfaciais”), apesar do complexo mecanismo envolvido. Assim, a alteração estrutural das biomoléculas é mínima e a sua actividade biológica é mantida usando HIC. A HIC é uma via alternativa para explorar as propriedades hidrofóbicas das proteínas, trabalhando em condições mais polares e menos desnaturantes do que na cromatografia de fase reversa, pois esta técnica requer o uso de solventes não polares para a eluição da proteína devido à forte ligação ao adsorvente da coluna cromatográfica (Queiroz *et al.*, 2001).

A estrutura tridimensional de uma proteína é um resultado de interações intramoleculares como também de interações com o solvente. No caso de proteínas muito solúveis, o solvente é a água, e a parte hidrofóbica encontra-se orientada para o interior da estrutura da proteína. A estrutura final é um resultado de um balanço termodinâmico em que resíduos de aminoácidos hidrofóbicos frequentemente se encontram no interior globular das proteínas, sendo que alguns estão expostos, resultando em *remendos* hidrofóbicos na superfície da proteína (Amersham, 2006).

Considerando que as proteínas apresentam superfícies hidrófilicas e hidrofóbicas, podem precipitar somente a concentrações elevadas de certos sais, sendo causada por interacção hidrofóbica forçada. Mudança na força iónica, nos solventes orgânicos presentes, na temperatura e pH (especialmente no ponto isoeléctrico (pI), quando não há cargas na superfície líquida) pode afectar a estrutura da proteína e a sua solubilidade e, por conseguinte, a interacção com outras superfícies hidrofóbicas, como as matrizes da HIC (Amersham, 2006).

As interacções hidrofóbicas têm uma elevada importância nos sistemas biológicos. São as forças dominantes da estrutura e flexibilidade das proteínas, e têm um papel importante em outros processos biológicos tais como: reacções antígeno – anticorpo, reacções de substrato – enzima e na manutenção da estrutura da bicamada lipídica das membranas biológicas (Queiroz *et al.*, 2001).

O número de aminoácidos hidrofóbicos, a sua diferente distribuição e hidrofobicidade são características de cada proteína, por isso uma separação específica pode ser possível com diferentes suportes hidrofóbicos ou matrizes. Contudo, a variação de hidrofobicidade das proteínas fornece um meio através do qual estas biomoléculas podem ser separadas usando a HIC (Queiroz *et al.*, 2001).

4.2.1 – Interacções reversíveis

Os ligandos hidrofóbicos das matrizes da HIC podem interagir com as superfícies hidrofóbicas das proteínas. Em água pura qualquer efeito hidrofóbico é muito fraco para causar interacção entre o ligando e a proteínas ou entre as próprias proteínas. Porém, certos sais aumentam as interacções hidrofóbicas, e podem proporcionar a ligação (adsorção) à matriz da HIC. Para uma eluição selectiva (desorção), a concentração de sal é diminuída gradualmente e os componentes da amostra são eluídos por ordem de hidrofobicidade (Amersham, 2006).

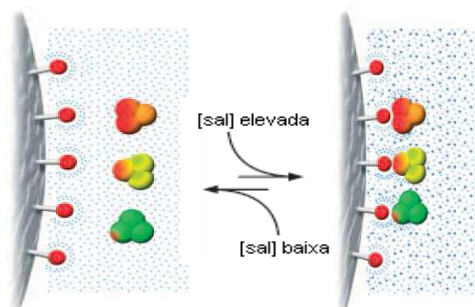


Figura 15 – O equilíbrio das interacções hidrofóbicas é controlado predominantemente pela concentração de sal (Amersham, 2006).

O resultado final da separação em HIC é baseado contudo na interacção entre a prevalência e a distribuição dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos à superfície da proteína, a hidrofobicidade da matriz, a natureza e composição da amostra e o tipo e concentração de sal usado nos tampões (Amersham, 2006).

4.2.2 – Passos na separação por HIC

As matrizes são compostas por ligandos que contêm grupos *alquil* ou *aril* acoplados a uma matriz inerte de partículas esféricas. A matriz é porosa, no sentido de promover uma superfície interna grande, onde o ligando tem um papel significativo na hidrofobicidade final da matriz. A matriz é empacotada e de seguida é equilibrada com um tampão que preenche os poros da matriz e o espaço entre as partículas. A interacção entre a proteína e a matriz é promovida por concentrações de sal moderadamente altas, tipicamente 1.2 M de sulfato de amónio ou 3M de cloreto de sódio. O tipo de sal e a concentração de sal usada no tampão inicial são seleccionados de modo a assegurar que as proteínas de interesse se liguem à matriz e que as proteínas pouco hidrofóbicas e impurezas atravessem directamente a coluna (Amersham, 2006).

As condições de ligação são um factor chave em qualquer separação por HIC. É nesta fase onde a selectividade, resolução e capacidade de ligação para a proteína em estudo, podem ser significativamente influenciadas (Amersham, 2006).

As proteínas são eluídas pela diminuição da concentração de sal no tampão de eluição (Amersham, 2006). Um passo com tampão sem sal, como passo de lavagem da coluna, remove todas proteínas que ainda possam estar retidas na coluna. Se a hidrofobicidade da matriz e as proteínas das amostras foram conjugadas correctamente, todas as proteínas estarão eluídas nesta fase (Figura 16) (Amersham, 2006).

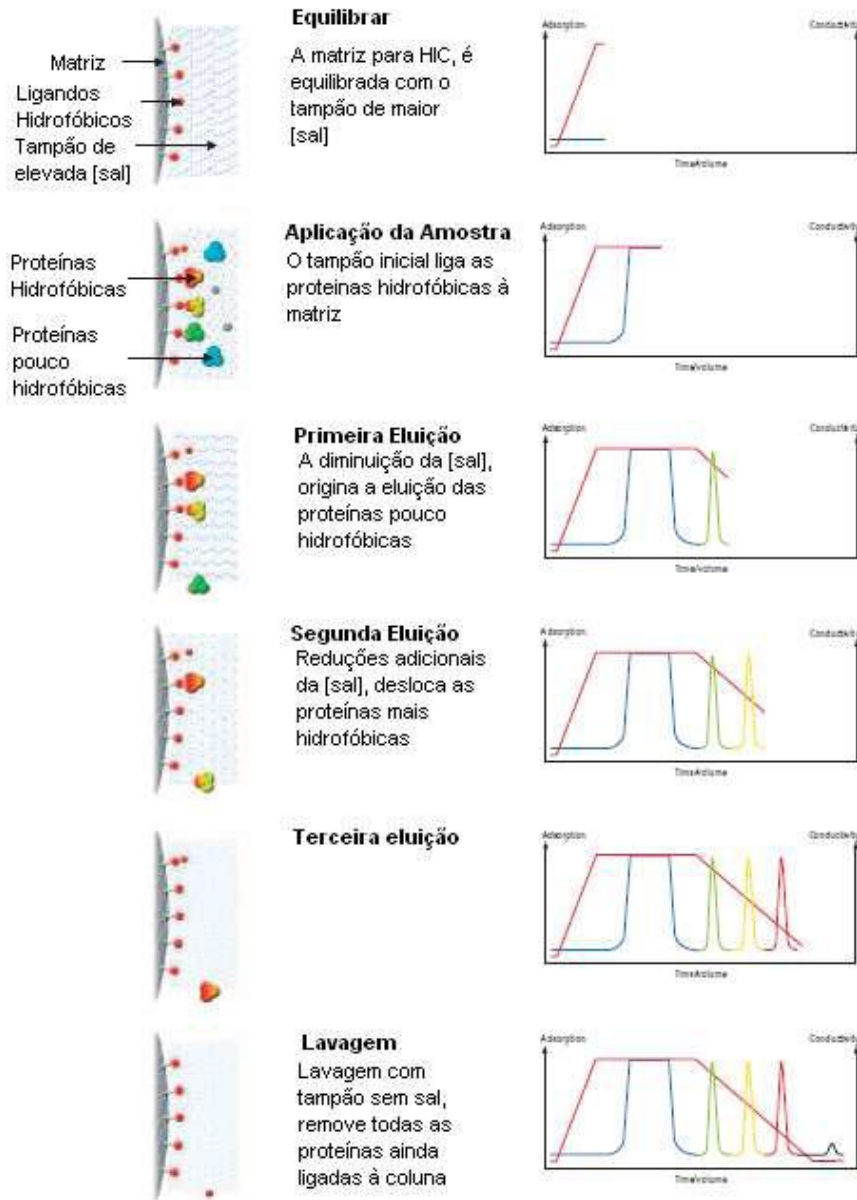


Figura 16 – Passos da separação por HIC (Adaptado de Amersham, 2006).

4.2.3 – Resolução na HIC

A resolução de uma separação por HIC é uma combinação do grau de separação entre os picos eluídos da coluna (selectividade), a habilidade da coluna para produzir picos estreitos, simétricos (eficiência) e, claro que, a quantidade de amostra aplicada. Estes factores são influenciados na prática por propriedades como a matriz, condições de ligação e eluição, empacotamento da coluna e fluxo da corrida (Amersham, 2006).

A Resolução (R_s) é definida como a distância entre os máximos dos picos comparados com a largura da base comum a dois picos. A R_s pode ser determinada a partir de um cromatograma (Amersham, 2006).

Um pico único, com boa resolução não é necessariamente uma substância pura, mas pode representar uma série de componentes que não foram separados nas condições de eluição escolhidas (Amersham, 2006).

4.2.4 – Eficiência na HIC

A eficiência de uma coluna é a habilidade para eluir picos estreitos, simétricos de uma coluna, e relaciona (Amersham, 2006). Uma das principais causas da base do pico alargar é uma difusão longitudinal das moléculas do soluto (proteínas). Uma coluna bem empacotada contribui significativamente para uma boa resolução. Colunas que são mal empacotadas, por exemplo, com bolhas de ar, conduzem a uma passagem desigual dos tampões pela coluna, base do pico larga e conseqüentemente perda de resolução. Obviamente, que o tamanho das partículas também é um factor significativo para a resolução e, em geral, as partículas menores produzem os picos estreitos debaixo de condições de eluição correctas, numa coluna bem empacotada (Amersham, 2006).

4.2.5 – Selectividade e capacidade de ligação da HIC

Uma elevada selectividade (grau de separação entre os picos) é um factor mais importante do que a própria eficiência na determinação da resolução do processo cromatográfico (Amersham, 2006).

Na HIC, a selectividade depende em grande parte da natureza do ligando e do seu grau de substituição na matriz, da natureza da matriz, da natureza da proteína em estudo, o tipo de sal e a concentração de sal usada. Um balanço estabelecido entre estas propriedades torna a HIC num processo altamente selectivo com uma melhor resolução e separação (Amersham, 2006).

A capacidade disponível de uma matriz para uma proteína especifica depende da densidade do ligando e das condições experimentais definidas (Amersham, 2006).

A capacidade dinâmica de uma matriz de HIC é dependente das propriedades da matriz, a proteína que é purificada e as condições experimentais como por exemplo a concentração de sal, a taxa de fluxo, a temperatura e, por vezes, o pH (Amersham, 2006).

As propriedades do ligando, a proteína em estudo, o sal e a concentração de sal têm um papel fundamental na selectividade final e na capacidade de ligação da amostra. Na cromatografia de troca iónica tal como na cromatografia de afinidade são usadas proteínas padrão como uma directriz para indicar a selectividade e capacidade do processo cromatográfico em curso (Amersham, 2006).

4.2.6 – Selectividade e selecção do sal

Quando se usa uma matriz de HIC a habilidade de um sal particular para promover interacção hidrofóbica depende das espécies iónicas presentes e da concentração das mesmas (Amersham, 2006).

O processo de precipitação de proteína tem a mesma força motriz que é observada nas interacções hidrofóbicas de proteínas com um meio hidrofóbico, a qual é aumentada pela força iónica (concentração) do tampão usado. A força de eluição/precipitação de um ião é descrita pelas séries de Hofmeister (Figura 17). Pequenos e grandes iões carregados são agentes precipitadores anticaotrópicos), considerando que os ácidos orgânicos e bases têm um efeito estabilizador (caotrópico) na presença de proteínas em solução. O termo caotrópico refere-se à habilidade do ião para produzir ordem ou caos na estrutura da molécula de água (Amersham, 2006).

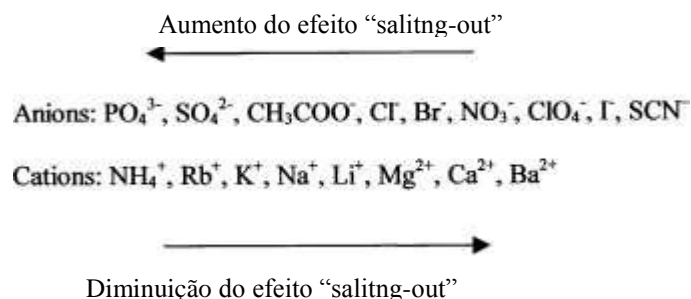


Figura 17 – Série de *Hofmeister* (Adaptado de Queiroz *et al.*, 2001).

Os sulfatos de sódio, potássio ou de amónio são fortes agentes precipitantes. São estes sais que efectivamente promovem interacção hidrofóbica e têm influência estabilizadora sobre a estrutura da proteína, estabilizando a interacção ligando-proteína na HIC. Consequentemente os sais mais usados são: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , NaCl , KCl e $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Amersham, 2006).

A quantidade de proteína que liga à matriz de HIC aumenta quase linearmente até uma concentração específica de sal (Amersham, 2006).



4.2.7 – A selectividade e as propriedades da matriz de HIC

Enquanto os ligandos contribuem significativamente para o grau de hidrofobicidade de uma matriz, a matriz também pode influenciar a selectividade final. As matrizes de cromatografia para interacção hidrofóbica são matrizes porosas, escolhidas pela sua estabilidade física, resistência química e com um baixo nível de interacção não específica (Amersham, 2006).

As matrizes de *Sepharose*TM têm como base cadeias hidrofóbicas de agarose, organizadas em pacotes e com diferentes graus de cadeias interiores unidas em cruz, figura 18, originando um intervalo rígido, de matrizes macroporosas com elevada capacidade e baixa ligação não específica. A matriz mais satisfatória pode ser seleccionada de acordo com o grau de resolução, capacidade de ligação e taxas de fluxo requeridas. Por exemplo, uma eluição com gradiente em *Sepharose High Performance* (34 μm) dará uma separação de elevada resolução considerando que as partículas maiores da matriz de “*Sepharose Fast Flow*” (90 μm) estão melhor adaptadas para uma elevada capacidade, e para passos de eluição com elevadas taxas de fluxo (Amersham, 2006).

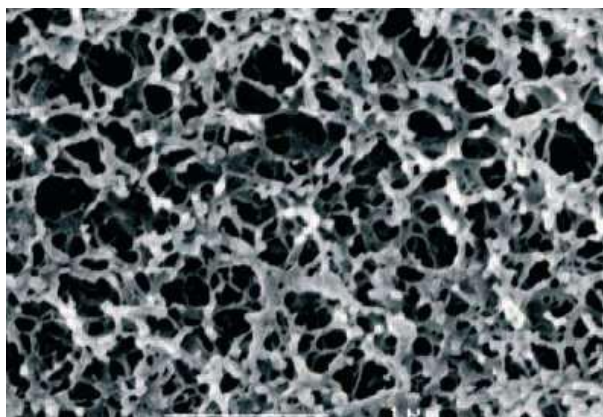


Figura 18 – Estrutura de uma matriz de agarose (Sepharose)(Amersham, 2006).

4.2.8 – Ligandos e o grau de substituição

Os ligandos mais usados em HIC são os alcanos de cadeias lineares, no entanto, outros grupos aromáticos, como por exemplo, o *fenil*, são também usados como ligandos com bons resultados devido a mistura de interações hidrofóbicas e aromáticas. Apresentam um grau de substituição constante na matriz, sendo que, os ligandos n-alcanos constituem uma série homóloga numa escala de hidrofobicidade:

Metilo <etilo <propilo <butilo <pentilo <hexilo <heptilo <octilo

A hidrofobicidade e a força de interação aumenta com o aumento da cadeia n-alquil, mas a selectividade de adsorção pode diminuir (Queiroz *et al.*, 2001).

O ligando e o grau de substituição do ligando numa matriz de cromatografia contribuem para a hidrofobicidade final da matriz e consequentemente para a selectividade (Amersham, 2006).

A capacidade de ligação de uma matriz de HIC aumenta com o aumento da densidade do ligando, até um certo nível. Simultaneamente, a força da interação com a proteína aumenta, a qual pode conduzir a dificuldades na eluição dos componentes unidos à matriz. Seleccionando uma matriz substituída com o mesmo ligando, mas no caso de uma baixa densidade do ligando, por exemplo, *Phenyl Sepharose 6 Fast Flow* (pouco substituído) em vez de *Phenyl Sepharose 6 Fast Flow* (muito substituído) pode resolver o problema (Amersham, 2006).

Os ligandos hidrofóbicos mais comuns estão na figura 19. Em geral, as matrizes para HIC dividem-se em dois grupos, dependendo das interações destas com os componentes de amostra. As cadeias *alquil* (*butil*, *octil*, *éter*, *isopropil*) exibem directamente um carácter hidrofóbico, enquanto, que os ligandos de *aril* (*fenil*) mostram um comportamento misto no qual constam interações aromáticas e hidrofóbicas, como também falta de carga, tendo um papel essencial dentro das propriedades cromatográficas finais (Amersham, 2006).

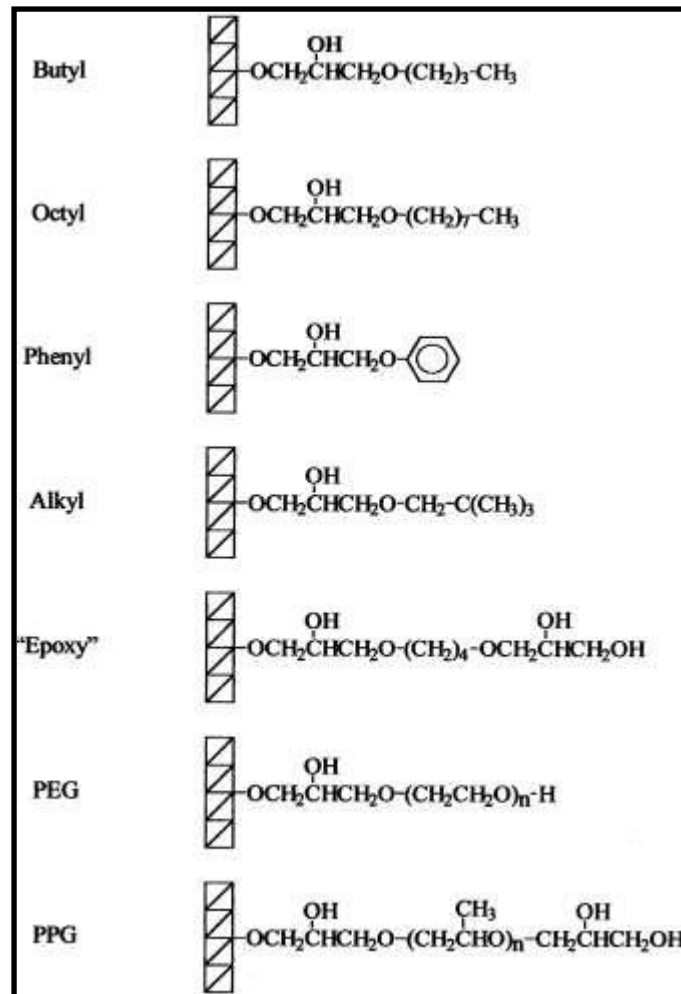


Figura 19 – Estrutura esquemática de alguns ligandos para HIC (Queiroz *et al.*, 2001).

1. Métodos

1.1 Recolha do material biológico

A recolha dos cordões umbilicais foi realizada no “Bloco” de Obstetrícia do Hospital Amato Lusitano (Castelo Branco) e do Hospital Sousa Martins (Guarda), com a autorização das mães doadoras, as quais foram questionadas pelo clínico responsável dos respectivos blocos. O procedimento usado para a recolha destas amostras biológicas está de acordo com os protocolos aprovados pela comissão de ética dos hospitais onde foram realizadas as colheitas. Após a recolha, os cordões foram introduzidos em tubos *falcons* (50mL) e em frascos *Shott* (250mL) contendo uma solução fisiológica composta por uma solução salina de fosfato diluída (ver tabela 2, em anexo, página 81), antibiótico (composto por Penicilina, Estreptomicona, e Anfotericina) (ver tabela 3, em anexo, página 81) e antiproteases (Pefaboe (6mg/mL); Leupeptina (0,1125 mg/mL); Benzamidina (6,5 mg/mL) e Inibidor de tripsina (2,5 mg/mL) (ver tabela 4, em anexo, página 81). Posteriormente, os tubos foram colocados num frigorífico a 4°C até se realizar o isolamento das artérias do cordão umbilical.

1.2 Limpeza das artérias e isolamento das camadas de células do músculo liso

As artérias foram isoladas a partir do cordão umbilical (Figura 20), após a remoção da geleia de *Wharton* e de sangue, sempre imersas numa solução de PSS diluído. Para o isolamento das camadas do músculo liso, foi necessário cortar as artérias longitudinalmente, numa placa pequena com PSS diluído, onde foi retirado o endotélio e o sangue da parte interna da artéria com a ajuda de um cotonete. Esta porção da artéria limpa foi colocada numa outra placa com PSS diluído onde se retiraram as camadas musculares utilizando pinças. As camadas musculares isoladas foram posteriormente colocadas numa outra placa com PSS diluído limpo.



Figura 20 – Obtenção das camadas de músculo liso a partir das artérias isoladas do cordão umbilical.

1.3 Isolamento dos canais de cálcio membranares das células de músculo vascular liso

Às camadas de músculo liso, foi adicionado dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) 50 mM a pH 7,2 e uma mistura de inibidores de proteases: *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) (100 μM), Leupectina (1 $\mu\text{g/ml}$), aprotinina (1 $\mu\text{g/ml}$) e benzamidina (1mM). A quantidade de inibidores de proteases adicionada depende da solução final de camadas de células e tampão $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$. Seguidamente, realizou-se a lise das células do músculo liso através de um processo mecânico, recorrendo a um homogeneizador (figura 21A). A lise foi também realizada por choque osmótico, mergulhando a amostra em azoto líquido e em seguida colocou-se num banho a 37 °C. O passo seguinte foi realizar uma centrifugação a 1500 g durante 10 minutos a 4°C para se obter no pellet os restos celulares. Após a centrifugação removeu-se o sobrenadante e este foi novamente centrifugado a 26000g durante 2 horas a 4°C (figura 21B). Nesta segunda centrifugação, obtêm-se as membranas celulares concentradas no pellet. O pellet obtido foi ressuspendido no detergente dodecil- β -D-maltoside (DM) 4% e agitou-se durante uma hora em gelo, promovendo desta forma a solubilização das proteínas de membrana existentes no pellet. Posteriormente, foi realizada uma ultracentrifugação a 210000 g, durante 2 horas a 4°C (figura 21C), tendo esta etapa como objectivo, a obtenção dos canais de cálcio membranares no sobrenadante resultando uma solução homogénea, clarificada e concentrada de proteínas dos canais de cálcio. A amostra obtida foi depois utilizada nos passos seguintes de purificação dos canais de cálcio por métodos cromatográficos, num sistema de FPLC. Por fim, determinou-se a concentração de proteína pelo método de Bradford.



Figura 21 – Isolamento dos canais de cálcio membranares a partir das camadas de músculo liso. A) Lise celular realizada por um processo de homogeneização; B) Centrifugação a 26000g; C) Ultracentrifugação a 210000 g.

2. Método de *Bradford* (macro)

O método de *Bradford* é um método que permite a determinação da concentração de proteína, e envolve a ligação das proteínas ao corante “Coomassie Brilliant Blue” G-250.

Para determinar a concentração de proteína numa solução desconhecida, foi necessário inicialmente elaborar uma curva padrão, usando uma série de concentrações conhecidas de uma proteína. Usou-se a BSA (Albumina Sérica Bovina), e a partir de uma solução-mãe de concentração 1 mg/mL, fizeram-se diluições para uma concentração final de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mg/mL. Prepararam-se tubos de ensaio contendo 50 µL de cada solução de BSA e 2,5 mL de Reagente de *Bradford* em cada tubo. Agitou-se no vortéx e guardaram-se os tubos no escuro durante 5 minutos. Mediu-se a absorvância de cada solução a 595 nm, num espectrofotómetro da marca Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 300 e com cuvetes com precursor óptico de 1 cm. A curva de calibração obtida foi: $y = 0,8955x - 0,0819$, $r^2=0,9914$.

3. Precipitação de proteínas com sulfato de amónio

A precipitação dos canais de Ca^{2+} foi realizada com a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma). Para tal prepararam-se tubos de centrífuga de 30 mL, tendo cada um, 1 mL de extracto proteico dissolvido em 2 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Posteriormente foram adicionada 0,8g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Após a adição de sulfato de amónio, realizou-se uma centrifugação a 150000g durante 2 horas, a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 1mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. A concentração das amostras obtidas por precipitação com sulfato de amónio foi determinada pelo método de *Bradford*, seguindo o método referido no ponto 2. A recta de calibração obtida foi: $y = 0,8955x - 0,0819$, $r^2=0,9914$.

4. Ensaio de Cromatografia de Interação Hidrofóbica

Os ensaios de cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC) dos canais de Ca^{2+} , com diferentes concentrações de sal e diferentes misturas de sais foram realizados em mini-colunas (Biorad), figura 22.A e em *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC), figura 23.B.

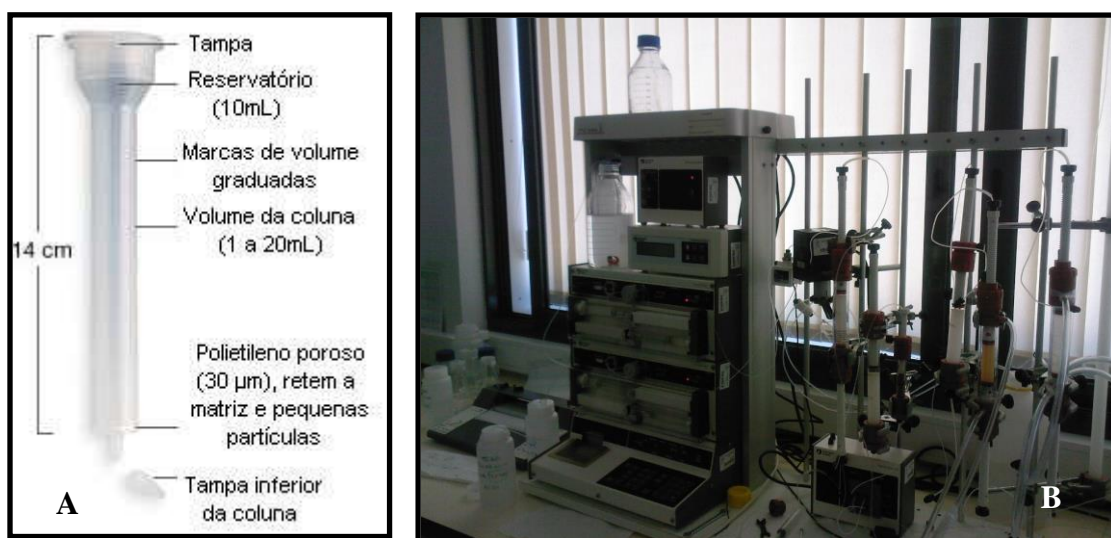


Figura 22 – A) Mini-coluna (Biorad) (*adaptado de <http://www.bio-rad.com>*); B) FPLC.

Iniciou-se o estudo de HIC dos canais de Ca^{2+} em mini-colunas, com diferentes sais, concentrações de sais e misturas de sais, no sentido de averiguar, qual a mistura de sais que permitiria uma melhor purificação e separação destes canais. As mini-colunas de propileno têm dimensões de 1.5x12 cm (tamanho total da coluna: 14 cm) permitem um fluxo por gravidade rápido sendo um modo simples de realizar estudos de interação hidrofóbica.

Após a selecção da mistura de sais, realizaram-se ensaios em FPLC, numa coluna da Amersham Biosciences, modelo XK 16, com o adsorvente escolhido. Os ensaios em mini-colunas e em FPLC tiveram como base o mesmo procedimento, sendo que as condições usadas em FPLC (ver tabela 14, em anexo página 86).

As soluções (ver tabela 5, em anexo, página 82) usadas foram filtradas a vácuo e degaseificadas num sonicador Elma (modelo Transsonic 570/H). Foram recolhidas as amostras e analisados os respectivos cromatogramas. As fracções de interesse foram analisadas por *SDS-PAGE* e *Western-Blot*.

5. Concentração das amostras

Foi necessário recorrer à concentração das amostras devido ao efeito de diluição ocorrido durante o processo cromatográfico. A concentração de proteínas foi realizada com concentradores vivaspin 6 mL, modelo 10.000 MWCO, cuja membrana possui poros de diâmetro 10 kDa. Os concentradores foram centrifugados a 1800g, a força centrífuga conduz a que os solutos de baixo peso molecular (≤ 10 kDa) passem através da membrana. Os macrosolutos (proteínas), ficam retidos acima da membrana, dentro do reservatório do concentrador. À medida que diminui o volume da amostra, a concentração do soluto retido aumenta (Millipore Corporation, 2000).

6. Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*SDS-PAGE*)

A electroforese é uma técnica usada para separar moléculas carregadas de acordo com a sua carga, forma e tamanho quando estão sob influência de um campo eléctrico. As biomoléculas são arrastadas numa matriz, que funciona como um meio estabilizador, evitando que a corrente eléctrica provoque difusão e misture diferentes bandas. Esta matriz pode ser composta por diferentes materiais, como papel, acetato de celulose, géis de poliacrilamida, agarose ou goma. Os géis de poliacrilamida e agarose são, actualmente, os mais usados para separar ácidos nucleicos, no entanto, para a separação de proteínas, o gel de poliacrilamida é a matriz mais comum (Amersham, 2006).

A distância percorrida pelas biomoléculas permite determinar o seu peso molecular, pela comparação das bandas correspondentes às amostras aplicadas no gel, com um padrão de dez proteínas de pesos moleculares conhecidos e que tenham percorrido o mesmo gel (Amersham, 2006).

A electroforese *SDS-PAGE* é usada para determinar os pesos moleculares e analisar a composição de subunidades e os domínios estruturais das proteínas. O dodecilsulfato de sódio (SDS) é um detergente aniónico que quebra as ligações de Hidrogénio e as interacções hidrofóbicas, o que leva à desnaturação das proteínas (Amersham, 2006).

As fracções obtidas, após precipitação com sulfato de amónio e após eluição nas colunas de HIC, foram separadas através de um *SDS-PAGE* de acordo com o peso molecular. Nesta electroforese foi usado um gel de separação com 12% de acrilamida e um gel de concentração com 4% de acrilamida (ver tabela 6, em anexo, página 82). Para tal usou-se o sistema miniprotean da Biorad.



Figura 23 – Sistema de electroforese, miniprotean da Biorad

Após a montagem do sistema de electroforese o gel de separação 12,5% foi colocado até cerca de 1 cm da superfície, sendo depois adicionada água para formar uma superfície plana e aguardou-se que polimerizasse. Após a polimerização, o sistema foi invertido para remover a água e adicionou-se o gel de concentração 4 %. Seguidamente colocou-se o pente e aguardou-se que o gel polimerizasse. Após a polimerização retirou-se o pente e montaram-se os géis no sistema de electroforese. Posteriormente, colocaram-se 20 μl de amostra e 10 μl e tampão de redução em eppendorfs que foram submetidos à desnaturação das proteínas a 100°C, durante 5 minutos. Depois de preparado o tampão de migração (ver tabela 9, em anexo, página 83) este foi colocado entre os géis no mesmo sistema e foram lavados os poços presentes no gel. De seguida, injectaram-se as amostras bem como o marcador de pesos moleculares no gel de electroforese. A corrida foi realizada a 120 V durante aproximadamente 1 hora.

No fim da corrida da electroforese o gel foi retirado das placas e do sistema e foi colocado numa solução de coloração, azul de Coomassie, em agitação constante durante 30 minutos. Foi depois transferido para uma solução de descoloração I (ver tabela 10 em anexo, página 84), também durante 30 minutos sob agitação constante. Por fim o gel foi colocado em solução de descoloração II (ver tabela 10 em anexo, página 84), onde permaneceu durante a noite sem agitação.

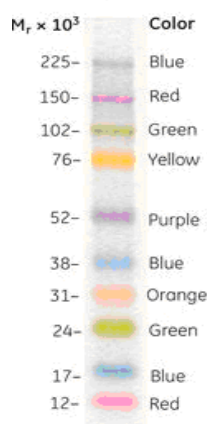


Figura 24 – Representação da migração das proteínas no “*Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers*” numa electroforese *SDSPAGE*, num gel de migração de 12%.

7. Western Blot

O método de *Western Blot* envolve a transferência das proteínas separadas num gel de poliacrilamida para um suporte sólido (membrana adsorvente), de um modo rápido e eficiente, permitindo assim um maior número de aplicações de amostra. O suporte sólido consiste em membranas de polivinilideno difluoreto (PVDF) ou nitrocelulose, que apresentam alta capacidade para se ligar a proteínas. Estes suportes são fisicamente fortes e quimicamente estáveis (Kurien and Scofield, 2006). Este método apresenta várias vantagens, tais como: a membrana molhada é flexível e de fácil manipulação, as proteínas imobilizadas na membrana são igualmente acessíveis a diferentes ligandos, uma pequena quantidade de reagente permite o armazenamento prolongado dos modelos transferidos e a proteína transferida pode ser usada para múltiplas análises sucessivas (Kurien and Scofield, 2006).

Neste método o procedimento para a obtenção do gel foi igual ao descrito no SDS-PAGE, o gel obtido foi usado para fazer a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF, previamente activada em metanol (5 segundos), em água (5 minutos) e em CAPS 1x (15 minutos).

Preparou-se a sanduíche com o papel de filtro, o gel, a membrana e de novo o papel de filtro, tendo em conta que o gel deve ser colocado do lado do ânodo (lado preto da cassete do sistema de electrotransferência). Removeram-se as bolhas de ar e colocou-

se a cassette no sistema de electrotransferência com tampão de electrotransferência a 4°C, a 750 mA durante 30 minutos no caso da electrotransferência da subunidade de maior peso molecular (subunidade α_{1c}) e de 20 minutos para as subunidades de baixo peso molecular (subunidade β), usando um sistema *Trans-blot cell* (Biorad), com um banho de refrigeração *Multitemp III Thermostatic Circulator* (Pharmacia Biotech), uma fonte de alimentação da *Amersham Biosciences*, modelo EPS 2A200 e um estabilizador de corrente da *Sarrat*, modelo ELT 2000.

Terminada a electrotransferência fez-se o bloqueio da membrana com *Tris Buffer Saline – Tween* (TBS-T) 5% em leite (ver tabela 12, em anexo, página 85), durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação, passo que permitiu o bloqueio dos locais de ligação livres da membrana, figura 25. Incubou-se a membrana com anticorpos primários em TBS-T 1% de leite (ver tabela 12, em anexo, página 85), deixando a 4°C durante a noite sob agitação constante. Depois lavou-se a membrana 3 vezes durante 15 minutos com TBS-T 0,5% de leite (ver tabela 12, em anexo, página 85), sob agitação. Seguidamente, incubou-se a membrana com o anticorpo secundário em TBS-T 1% de leite (ver tabela 11, em anexo, página 84), durante uma hora a 4°C, também com agitação. Lavou-se novamente a membrana com TBS-T 0,5 % de leite, 3 vezes durante 15 minutos e fez-se a revelação com o reagente *Enhanced ChemiFluorescence* (ECF) (Amersham Biosciences), detectando-se a fluorescência do substrato da fosfatase alcalina ligada aos anticorpos secundários, num detector de quimiofluorescência (Molecular Imager FX da Biorad).

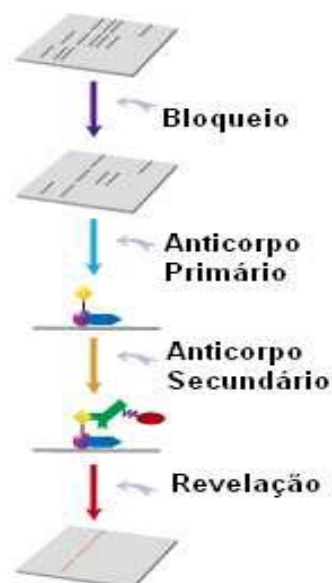


Figura 25 – Sequência do processo de *Western Blot*.

(adaptado de: www.genscript.com/western_tech.html)

8. Dot Blot

Activou-se as membranas com metanol (5 segundos), água desmineralizada (5 minutos) e CAPS 1x (15 minutos), sob agitação. Deixou-se secar as membranas. Aliquotou-se 30 µL de extracto (5 µL de cada vez). Incubou-se com o anticorpo primário, durante a noite, a 4°C. Lavou-se as membranas com TBS 0,5% de leite, 3 vezes durante 15 minutos e colocaram-se depois no anticorpo secundário, durante uma hora, à temperatura ambiente. Lavou-se novamente as membranas com TBS-T 0,5% de leite, 3 vezes durante 15 minutos. Por fim, revelou-se as membranas com ECF e fez-se a detecção das bandas no detector de quimiofluorescência Molecular Imager FX da Biorad.

9. Imunofluorescência

As células do músculo liso do isolamento das artérias do cordão umbilical humano, após atingirem confluência celular, foram subcultivadas por tripsinização em placas de 12 poços.

Primeiramente, as lamelas foram colocadas com a ajuda de uma pinça nos poços da placa de 12 poços e colocadas a ultravioleta durante 30 minutos na câmara de fluxo laminar. De seguida, preparam-se com colagénio as placas de cultura com as lamelas.

Após atingirem confluência celular, as células foram subcultivadas por tripsinização durante 2 minutos nas placas com as lamelas e foram a incubar a 37°C com 5% de CO₂ em atmosfera húmida até atingirem confluência celular.

Aproximadamente após 2/3 dias as CMVL humanas atingiram confluência celular, procedendo-se de seguida à sua fixação. Para realizar a fixação, aspirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas 2x com *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Posteriormente, adicionaram-se 400 µL de paraformaldeído/PBS 4% durante 20 minutos. Aspirou-se a solução de fixação e lavaram-se as células 3x com PBS. As placas foram revestidas com *parafilm* e guardadas em PBS a 4°C para posteriormente realizar-se o procedimento de imunofluorescência.

A imunodeteção do *vW factor* e do CD144 começou com a permeabilização das células com 500 µL de Triton X-100 (1% em PBS) durante 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida as células foram lavadas 3x com PBS. No bloqueio, adicionaram-se em cada poço 500 µL de albumina (3% Albumina Sérica Bovina e 0,2% de Tween20) e incubou-se durante 1 hora. Durante este tempo preparam-se os anticorpos primários diluídos em PBS com Tween20 (0,2%): *rabbit anti-human von Willibrand*

factor polyclonal (E₁); *anti-VE-Cadherin* (E₂); *monoclonal anti-human fibroblast* (F) e *monoclonal anti-actin, α smooth muscle* (S). Depois da incubação com a solução de bloqueio, aspirou-se a solução e adicionaram-se 200 μ L de anticorpo primário diluído.

Após o tempo de incubação *over-night* à temperatura ambiente, aspirou-se o anticorpo primário e lavaram-se as células 3x em PBS. Adicionaram-se 50 μ L de anticorpo secundário diluído 1:1000 de A₄₈₈ *goat anti-rabbit* conjugado com GFP (*green fluorescent protein*) para a imunodeteção do *vW factor* e CD144 e A₅₄₆ *goat anti-mouse* conjugado com rodamina para a imunodeteção da α -actina e dos fibroblastos. Incubou-se a placa com as células à temperatura ambiente durante 1 hora no escuro. De seguida, as células foram lavadas 3x com PBS em intervalos de 5 minutos.

Após as lavagens, foram preparadas as lâminas, deitando uma pequena gota de meio de montagem. As lamelas foram colocadas sobre as lâminas com a ajuda de duas pinças de modo que as células ficassem em contacto com o meio. O excesso de meio de montagem foi retirado das lâminas e deixaram-se secar no escuro durante 1 hora. De forma a isolar as células foi aplicado verniz em volta de cada lamela e colocaram-se a secar no escuro durante 1 hora.

Após este procedimento as lâminas foram visualizadas no microscópio de imunofluorescência (Carl Zeiss AxiVision Rel. 4.6).



Figura 26 – Microscópio de Imunofluorescência.

IV. Resultados e Discussão

1. Imunofluorescência

Após o isolamento das artérias do cordão umbilical humano, foram usados anticorpos para identificar as células do músculo liso das artérias do cordão umbilical humano e a subunidade α_{1C} dos canais de cálcio tipo L.

A presença de contaminações de outro tipo de células, foi demonstrada por imunofluorescência usando os anticorpos *monoclonal anti-actin α smooth*. A actina é uma das duas maiores proteínas do citoesqueleto e as suas isoformas são maioritárias nas células do músculo liso (De Llano *et al.*, 2007).

A presença de células do músculo liso na cultura de células foi confirmada pela expressão da α -actina observada no microscópio de Imunofluorescência (figura 26A e B) (De Llano *et al.*, 2007).

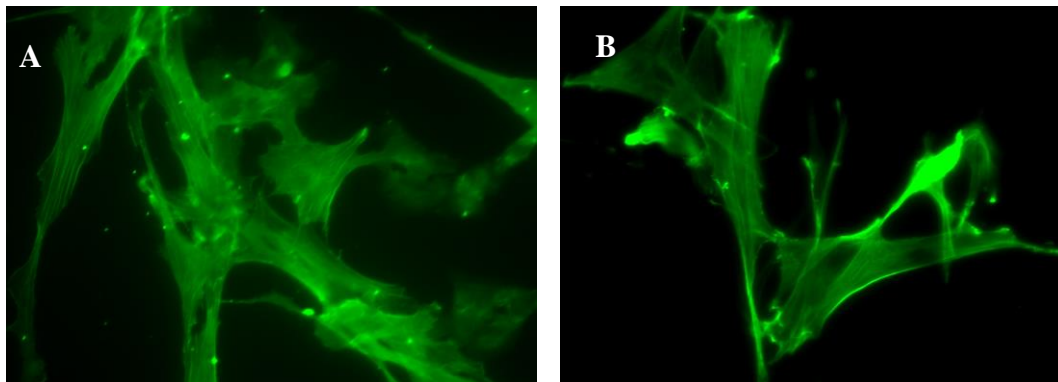


Figura 27 – Caracterização do fenótipo das células humanas de músculo liso por imunofluorescência. Expressão da α -actina com ampliação 630x (A) e 1000x (B).

A presença da subunidade α_{1C} dos canais de cálcio tipo L e das células do músculo liso das artérias do cordão umbilical humano foi também observada por dupla-marcação (Figura 28).

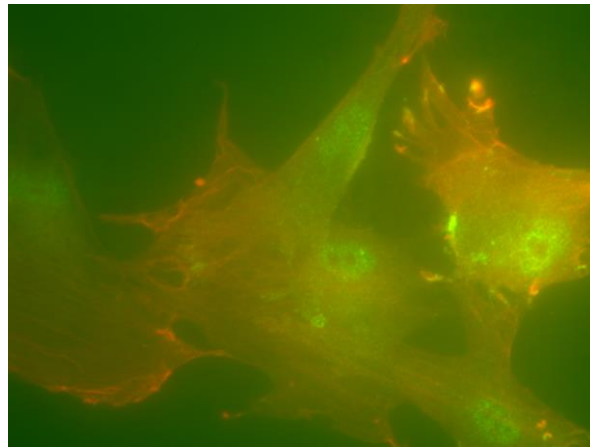


Figura 28 – Fotos subunidade α_{1C} dos canais de cálcio tipo L e das células do músculo liso das artérias do cordão umbilical humano obtidas por imunofluorescência com dupla marcação. Expressão da subunidade α_{1C} dos canais de cálcio tipo L (verde) e da α -actin (vermelho) com ampliação 1000x.

Neste processo de imunofluorescência verificou-se a existência de canais de cálcio na CMVL (figura 28). A partir desta evidência realizaram-se um conjunto de ensaios que tiveram como objectivo isolar os canais de cálcio tipo L. Foram utilizados dois tipos de cromatografia (cromatografia de afinidade e cromatografia de interacção hidrofóbica). Nos primeiros ensaios com cromatografia de afinidade houve saturação da coluna e por isso realizaram-se ensaios com a cromatografia de interacção hidrofóbica.

2. Isolamento dos canais de cálcio membranares das células de músculo vascular liso

O procedimento de isolamento dos canais de cálcio iniciou-se com células das camadas de músculo liso. Seguiu-se o procedimento para o isolamento dos canais apresentado nos materiais e métodos e uma electroforese SDS-PAGE da fracção obtida após a primeira etapa da purificação dos canais de cálcio tipo L (ver figura 27).

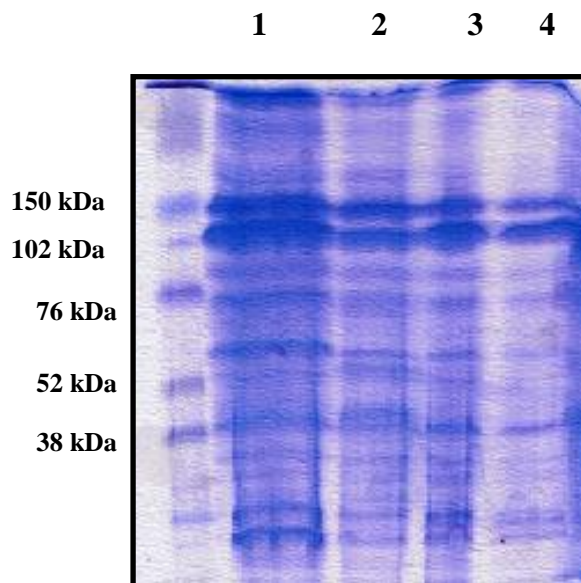


Figura 29 – Gel de electroforese SDS-PAGE das fracções resultantes das centrifugações da amostra de células do músculo liso. **1** – 1º Pellet; **2** – 2º Pellet; **3** – 1º Sobrenadante; **4** – 2º Sobrenadante.

Nesta electroforese conclui-se que todos os pellets e todos os sobrenadantes apresentam uma série de macromoléculas. A gama de pesos moleculares apresentadas por estas macromoléculas, indicavam que algumas destas bandas poderiam corresponder a subunidades dos canais de cálcio que se pretendiam isolar, verificando-se no 1º pellet uma maior intensidade de sinal. No entanto foi sob o 2º sobrenadante que recaíram as principais observações e processos de purificação, porque após a primeira etapa da purificação esta fracção é aquela que à partida terá a menor contaminação por parte de outras macromoléculas sem interesse e porque também já sofreu uma solubilização garantindo-se o rompimento da membrana celular e logo a libertação dos canais de cálcio.

Posteriormente, foi feito um Western Blot usando anticorpos específicos para a subunidade α_{1c} dos canais de cálcio, seguindo-se o procedimento apresentado nos materiais e métodos. O uso destes anticorpos permitiu identificar a localização desta

proteína. As membranas de PVDF, onde se encontravam as proteínas transferidas do gel, foram reveladas com ECF e digitalizadas no detector de quimiofluorescência, figura 28.

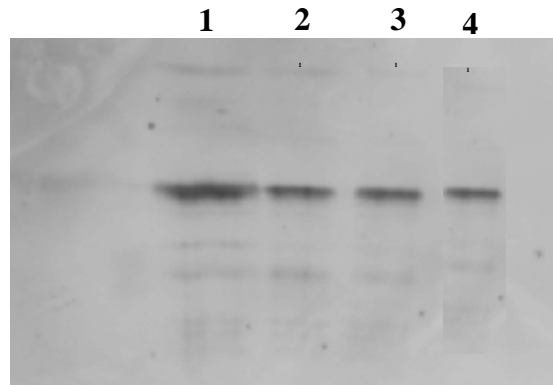


Figura 30 – Western Blot das fracções resultantes das centrifugações da amostra de células do músculo liso. **1** – 1º Pellet; **2** – 2º Pellet; **3** – 1º Sobrenadante; **4** – 2º Sobrenadante.

Na membrana obtida no Western Blot observam-se as bandas correspondentes à subunidade α_{1C} . Contudo a banda não surge no mesmo peso molecular que era esperado, este facto pode dever-se à desnaturação da proteína ou ao facto do anticorpo utilizado ser pouco específico para a subunidade α_{1C} .

Uma electroforese PAGE também foi feita o que permitiu ver a separação das proteínas no seu estado nativo, ou seja, separadas segundo a sua carga e peso molecular, figura 29.

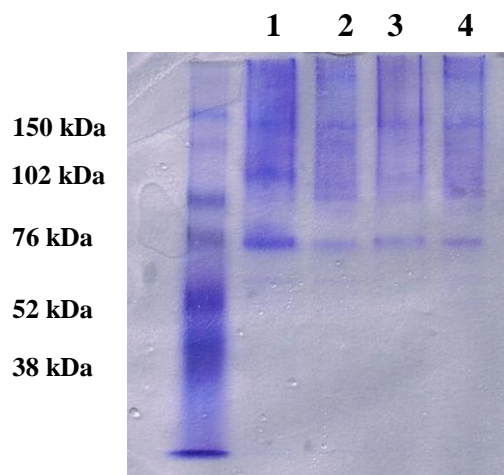


Figura 31 – Gel de electroforese PAGE com a amostra concentrada. **1** – 1º Pellet; **2** – 2º Pellet; **3** – 1º Sobrenadante; **4** – 2º Sobrenadante.

Com esta electroforese, pretendia observar-se a distância percorrida pela amostra no seu estado nativo e concluir se a amostra teria os canais de cálcio tipo L intactos ou fragmentados. Após a análise do gel, encontraram-se algumas bandas, o que permite especular que as subunidades, possam estar separadas. Encontrou-se uma banda entre os 52 e 76 kDa, que poderá corresponder à subunidade β e entre os 102 e os 250 encontram-se várias bandas que poderão corresponder às subunidades α_{1C} e α_2 . Nesta electroforese, também não se conseguiu determinar se, alguma subunidade poderá estar ligada a outra. Os resultados obtidos indicam-nos que a subunidade α_2 possa estar ligada à subunidade δ , uma vez que se encontrou uma banda com peso molecular de aproximadamente 165 kDa.

Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura, realizados com diferentes tecidos; por exemplo, Murata em 2001, isolou canais de cálcio do músculo esquelético de coelho. Ele identificou quatro subunidades: α_2 - δ (175 kDa), α_1 (170 kDa), β (55 kDa) e γ (30 kDa), quando analisadas em condições nativas. Em condições não nativas (SDS-PAGE), obteve-se um conjunto de 6 subunidades com os respectivos pesos moleculares de 170 kDa para a subunidade α_{1C} , 150 kDa para a subunidade α_2 , 55 kDa para a β , 20 kDa para a γ e para as duas isoformas de δ (δ_1 e δ_2) de 27 e 23 kDa respectivamente (Murata *et al.*, 2001).

Valores semelhantes foram determinados por Serysheva, quando identificou bandas em de poliacrilamida, com e sem SDS dos canais de cálcio isolados do músculo esquelético de coelho (Serysheva *et al.*, 2002).

Em 2003, Wolf e os seus colaboradores, também observaram cinco bandas num gel de SDS-PAGE, quando isolaram canais de cálcio de músculo esquelético de coelho sob condições redutoras, quando em condições nativas encontraram apenas quatro, estando as subunidades α_2 e δ unidas numa única banda de 168 ± 10 kDa (Wolf *et al.*, 2003).

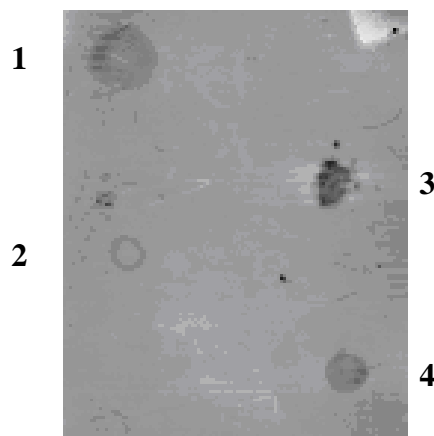


Figura 32 – Dot Blot das fracções obtidas no isolamento das células a partir do cordão umbilical.

1 – 1º Pellet; **2** – 2º Pellet; **3** – 1º Sobrenadante; **4** – 2º Sobrenadante.

No Dot Blot apresentado na figura 30 verificou-se que houve ligação entre a proteína e o anticorpo. Observa-se um sinal bastante forte, no 1 e no 4, identificado pelos pontos pretos sob a zona onde foi colocada a amostra. Isto significa que existe uma grande quantidade de subunidade α_{1C} dos canais de cálcio tipo L existente neste pellet e no sobrenadante.

3. Método de Bradford

Para determinar a concentração das amostras, realizou-se uma recta de calibração.

Tabela 7 – Resultados do método de *Bradford* para a obtenção da recta de calibração.

Concentração de BSA (mg/ml)	Valor da absorvância
0,2	0,117
0,4	0,251
0,6	0,436
0,8	0,67
1	0,803

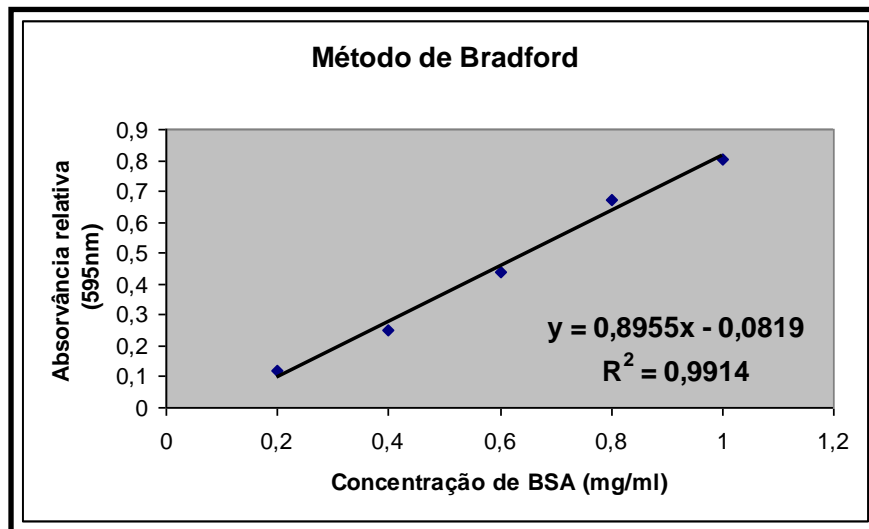


Gráfico 1 – Recta de calibração.

4. Ensaios em mini-colunas

Realizaram-se ensaios com a mini coluna com matriz (resine) *Epoxy- Sepharose* para se tentar realizar a purificação dos canais de cálcio tipo L. Em cada um dos ensaios, foram injectados 500 μ L de uma amostra ultracentrifugada e precipitada com 40% de Sulfato de Amónio

Realizou-se o ensaio na coluna, gráfico 1, e a concentração de proteína era de 5,98 mg/mL, determinada pelo método de *Bradford*.

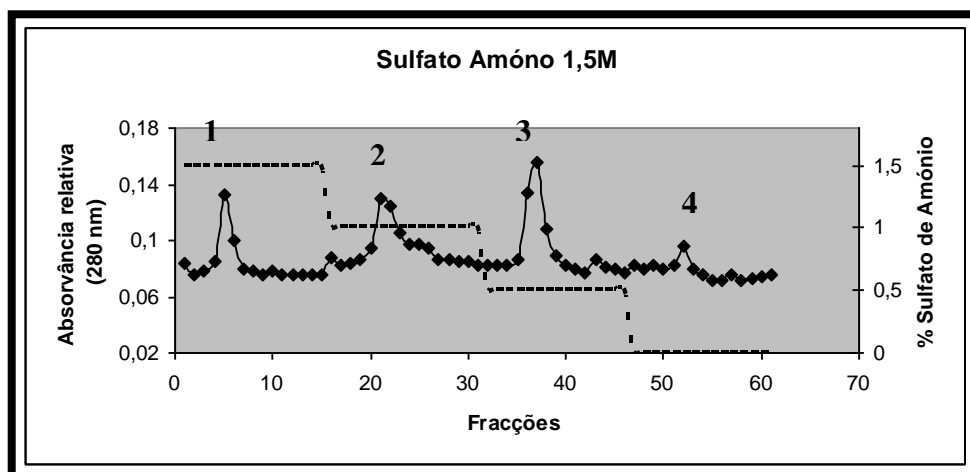


Gráfico 2 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1,5M, 1M, 0,5M de Sulfato de Amónio e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

Deste modo, e para se ter uma ideia de que as fracções recolhidas poderiam conter as subunidades dos canais de cálcio tipo L realizou-se um *SDS-PAGE* (fig.31.A) e um *Western-Blot* (fig. 31.B) de todas as fracções.

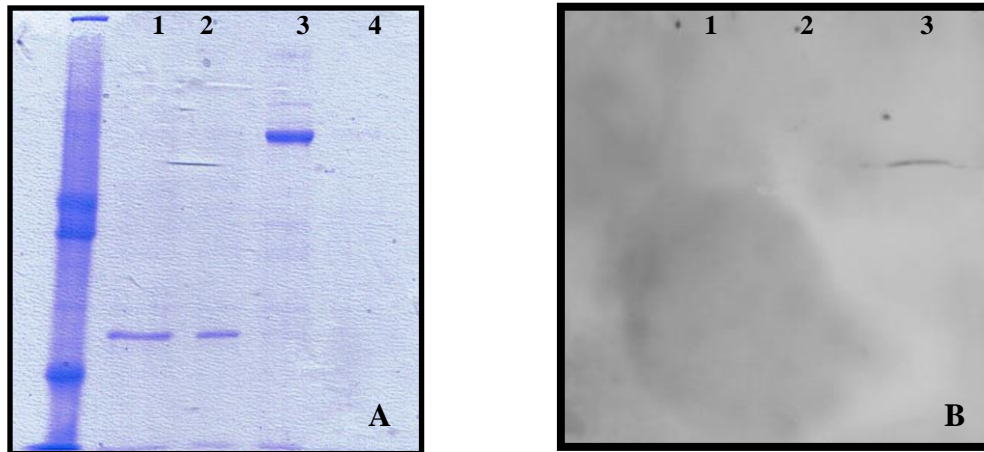


Figura 33 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por (A) *SDS PAGE* e (B) *Western-Blot*.; **1, 2, 3 e 4** - amostras recolhidas após eluição com 1,5 M, 1M, 0,5 M e 0M de Sulfato de Amónio.

Pela análise do *SDS-PAGE* verificou-se a que a proteína é eluída com 0,5M de Sulfato de Amónio. No entanto, a proteína que se pretende isolar não foi eluída com 1,5M e 1M de Sulfato de Amónio.

Repetiu-se o ensaio anterior, desta vez, com uma mistura de sais de Sulfato de amónio (S.A.) 1M + Citrato de sódio (C.S.) 0,8M, a concentração de proteína era de 5,97 mg/mL.

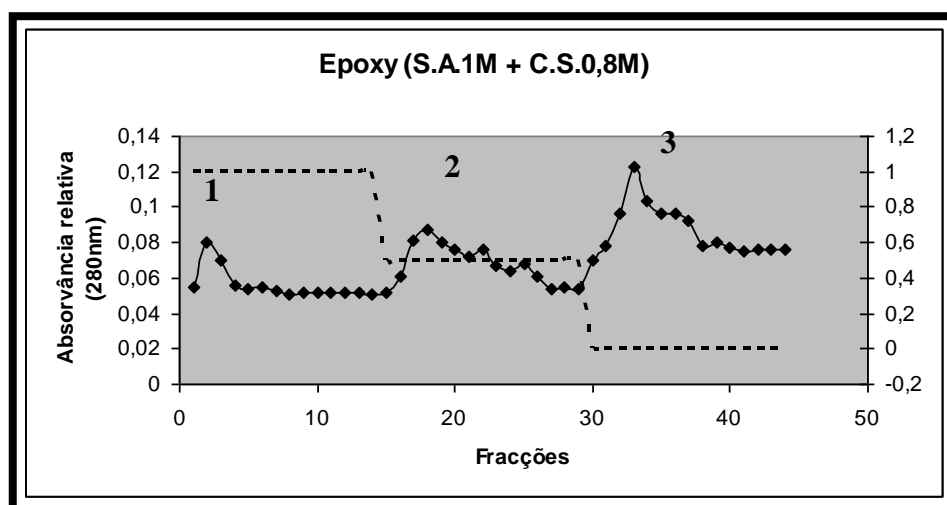


Gráfico 3 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1M S.A.+ 0,8M C.S., 0,5M S.A. + 0,4M C.S. e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

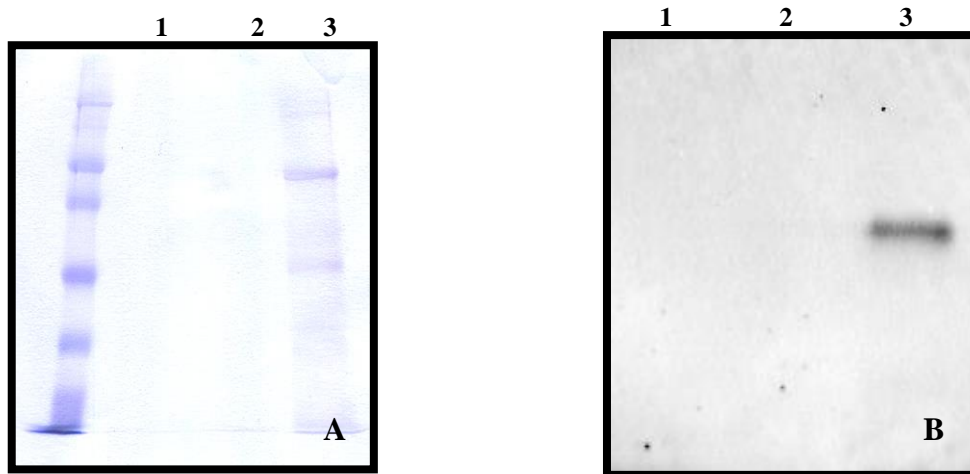


Figura 34 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por (A) *SDS PAGE* e (B) *Western-Blot*.; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,8M C.S., 0,5M S.A. + 0,4M S.A. e 0 M S.A. + 0M C.S..

Pela análise do *Western-Blot* verificou-se que a proteína de interesse apenas foi eluída com 0M de Sulfato de Amónio + 0M Citrato de Sódio.

Repetiu-se o ensaio, iniciando o estudo anterior, desta vez, com um tampão com menor concentração de sal, isto é, com 0,7M de Citrato de sódio, com o intuito de verificar se alguma proteína era eluída com concentrações mais baixas de Citrato de sódio, a concentração de proteína era de 4,68 mg/mL.

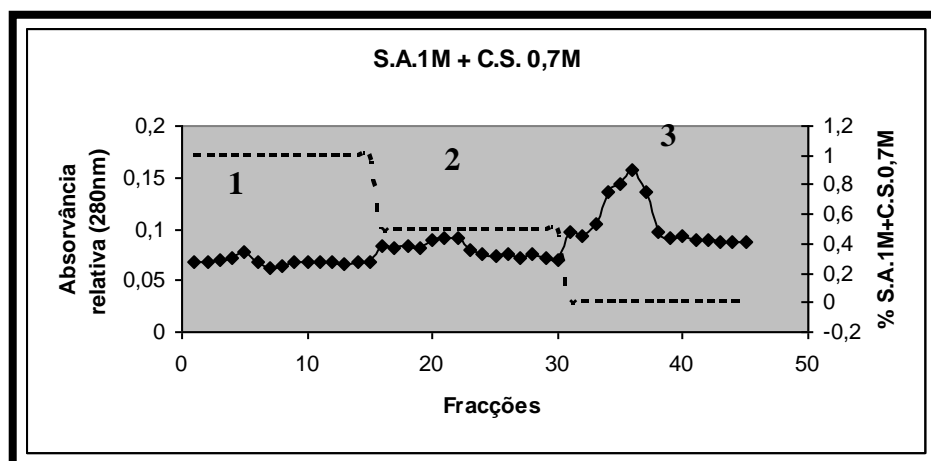


Gráfico 4 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1M S.A.+ 0,7M C.S, 0,5M S.A. + 0,35M C.S. e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

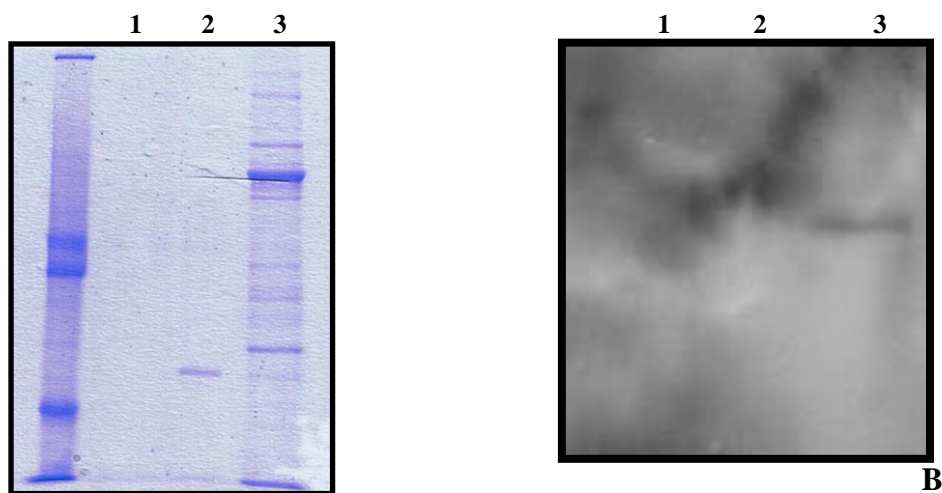


Figura 35 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por (A) *SDS PAGE* e (B) *Western-Blot*.; **1, 2, 3**- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,7M C.S., 0,5M S.A. + 0,35M S.A. e 0 M S.A. + 0M C.S..

Pela análise do *Western-Blot* verificou-se que a proteína é eluída com 0M de Sulfato de Amónio + 0M Citrato de Sódio.

Repetiu-se o ensaio, iniciando o estudo anterior, desta vez, com um tampão com menor concentração de sal, isto é, com 0,5M de Citrato de sódio, com o intuito de verificar se alguma proteína era eluída com concentrações mais baixas de Citrato de sódio, a concentração de proteína era de 5,27 mg/mL.

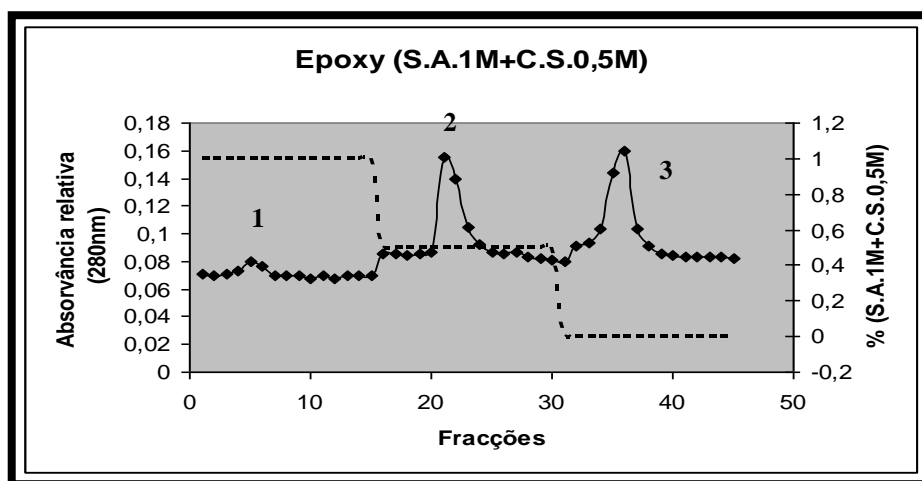


Gráfico 5 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1M S.A.+ 0,7M C.S, 0,5M S.A. + 0,35M C.S. e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

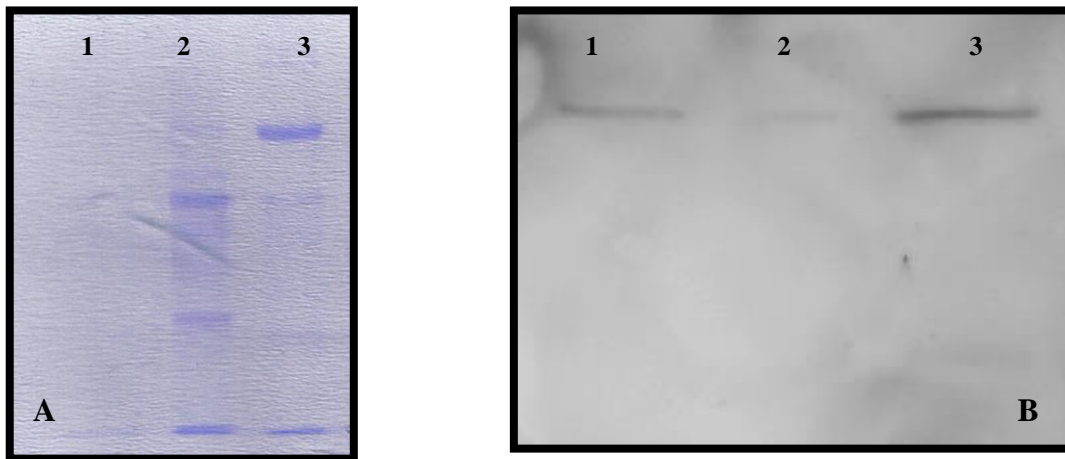


Figura 36 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por (A) *SDS PAGE* e (B) *Western-Blot*.; **1, 2, 3**- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,5M C.S., 0,5M S.A. + 0,25M S.A. e 0 M S.A. + 0M C.S..

Pela análise do *Western-Blot* verificou-se que a proteína é eluída com 0M de Sulfato de Amónio + 0M Citrato de Sódio. No entanto, ao contrário das outras concentrações a proteína de interesse também é eluída com 1M de Sulfato de Amónio + 0,5M Citrato de Sódio e 0,5M de Sulfato de Amónio + 0,25 M de Citrato de Sódio.

4.1 Ensaio em mini-colunas utilizando diversas misturas de sais

4.1.1 Sulfato de Amônio e Fosfato de Sódio

Nesta fase do trabalho, foram efectuados outros ensaios cromatográficos com diferentes misturas de sais, nomeadamente Sulfato de Amônio com Fosfato de Sódio (F.S.) e Sulfato de Amônio com Sulfato de Sódio (S.S.). No entanto os *Western-Blot* não são apresentados devido à avaria do aparelho e à falta de leite em pó adequado.

Realizou-se o ensaio na coluna, gráfico 5, e a concentração de proteína era de 5,40 mg/mL, determinada pelo método de *Bradford*.

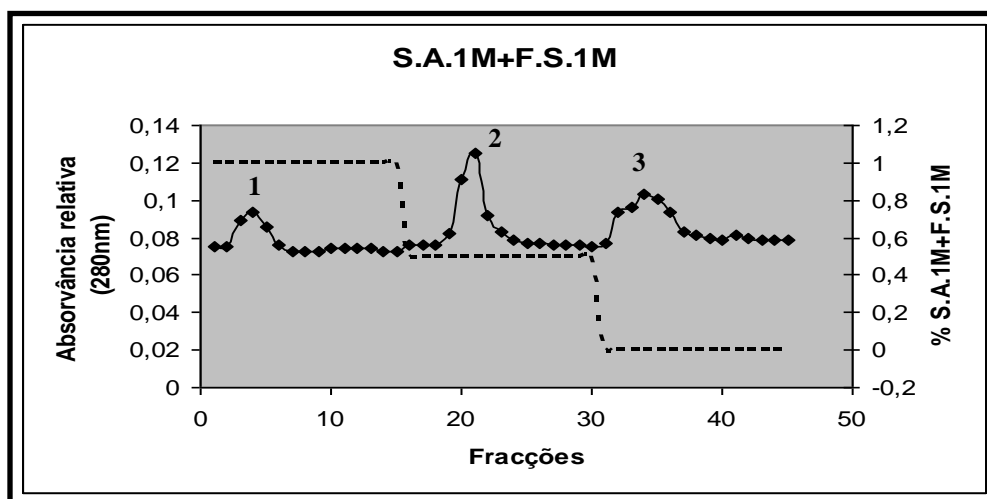


Gráfico 6 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1M S.A.+ 1M F.S., 0,5M S.A. + 0,5M F.S. e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

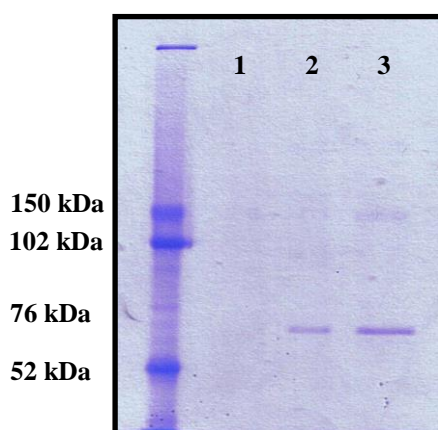


Figura 37 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por *SDS PAGE*; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 1M F.S., 0,5M S.A. + 0,5M F.S. e 0 M S.A. + 0M F.S..

Pela análise do *SDS-PAGE* não se verifica nenhuma banda com peso molecular correspondente á proteína de interesse com 1M de Sulfato de Amónio + 1 M Fosfato de Sódio e 0,5M de Sulfato de Amónio + 0, 5 M de Fosfato de Sódio e 0M de Sulfato de Amónio + 0M Fosfato de Sódio. De notar, que há presença de uma banda mais intensa (~ 52 kDa) na eluição com 0,5M de Sulfato de Amónio + 0,5 M de Fosfato de Sódio e 0M de Sulfato de Amónio + 0M Fosfato de Sódio que poderá corresponder à subunidade β_3 , no entanto apenas por *Western-Blot* poderíamos confirmar este facto.

Repetiu-se o ensaio, iniciando o estudo anterior, desta vez, com um tampão com menor concentração de sal, isto é, com 0,8M de Fosfato de Sódio, com o intuito de verificar se alguma proteína era eluída com concentrações mais baixas de Fosfato de Sódio, a concentração de proteína era de 5,40 mg/mL.

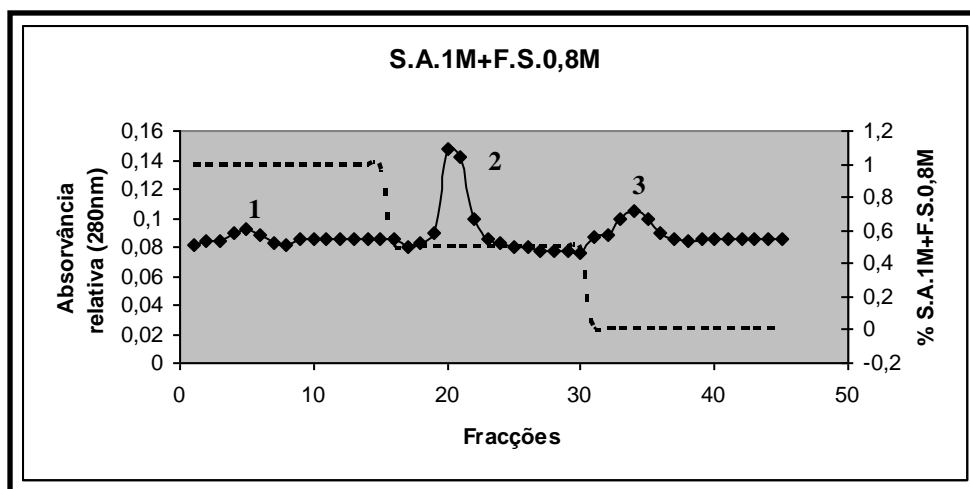


Gráfico 7 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1M S.A. + 0,8M F.S., 0,5M S.A. + 0, 4M F.S. e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

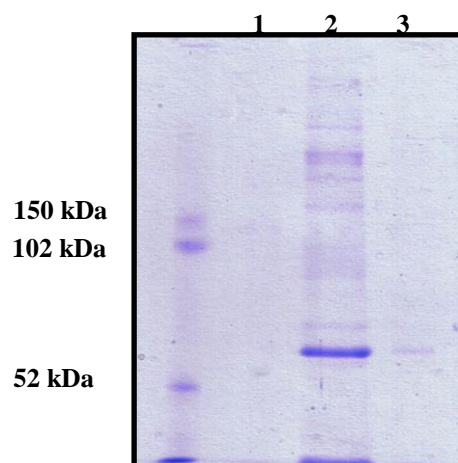


Figura 38 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por *SDS PAGE*; 1, 2, 3-amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,8M F.S., 0,5M S.A. + 0, 4M F.S. e 0 M S.A. + 0M F.S..

Pela análise do *SDS-PAGE* verificou-se através de uma banda (~190 kDa) que a proteína de interesse é eluída com 0,5M de Sulfato de Amónio + 0,4 M de Fosfato de Sódio. No entanto, há também a presença de uma banda mais intensa (~ 52kDa) na eluição com 0,5M de Sulfato de Amónio + 0,4 M de Fosfato de Sódio que poderá corresponder à subunidade β_3 , no entanto apenas por *Western-Blot* poderíamos confirmar este facto.

Repetiu-se o ensaio, iniciando o estudo anterior, desta vez, com um tampão com menor concentração de sal, isto é, com 0,5M de Fosfato de Sódio, com o intuito de verificar se alguma proteína era eluída com concentrações mais baixas de Fosfato de Sódio, a concentração de proteína era de 5,40 mg/mL.

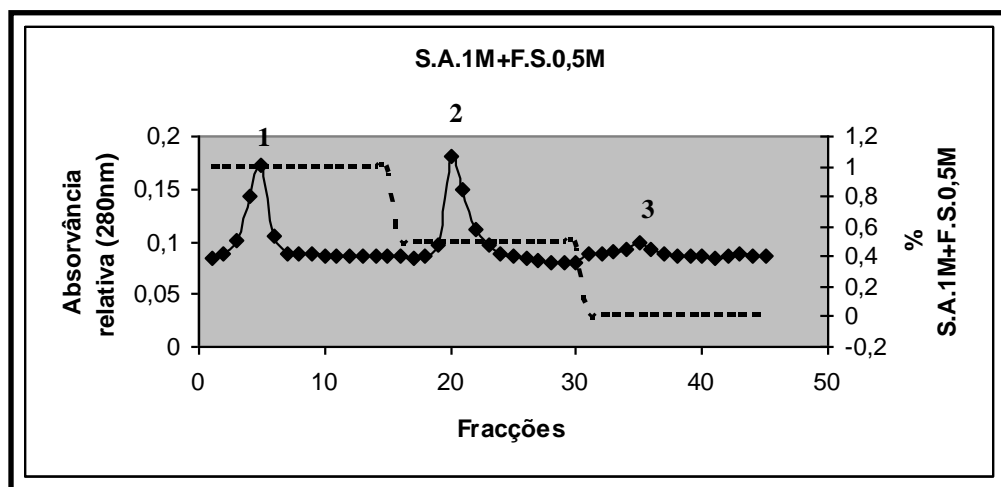


Gráfico 8 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1M S.A.+ 0,5M F.S, 0,5M S.A. + 0,25 M F.S. e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

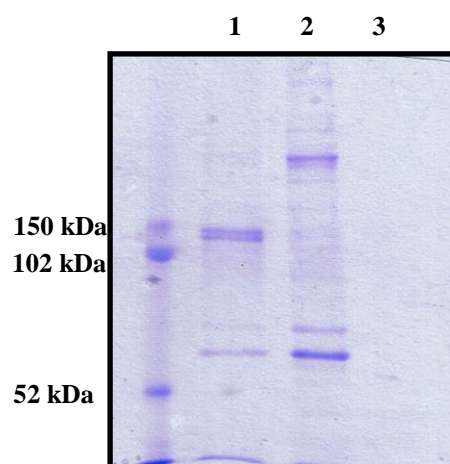


Figura 39 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por *SDS PAGE*; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,5M F.S., 0,5M S.A. + 0,25M F.S. e 0 M S.A. + 0M F.S..

Pela análise do *SDS-PAGE* verificou-se que a proteína de interesse é eluída com 0.5M de Sulfato de Amónio + 0,25M Fosfato de Sódio. No entanto, não é eluída a proteína de interesse com 1M de Sulfato de Amónio + 0,5 M Fosfato de Sódio e 0 M de Sulfato de Amónio + 0 M de Fosfato de Sódio. De notar ainda a presença de uma banda mais intensa (~ 52kDa) na eluição com 1M de Sulfato de Amónio + 0,5 M de Fosfato de Sódio que poderá corresponder à subunidade β_3 , no entanto apenas por *Western-Blot* poderíamos confirmar este facto.

Comparando os 3 cromatogramas em que se utilizaram os mesmos sais, verifica-se que à medida que as concentrações aumentam há uma maior retenção das amostras. Este aumento na retenção das proteínas, deve-se sobretudo ao aumento da força iónica provocado pelo aumento das concentrações, este aumento de força iónica vai também permitir um aumento da interacção das proteínas com a matriz, daí aumentar o tempo de retenção.

4.1.2 Sulfato de Amónio e Sulfato de Sódio

Por último, foram efectuados ensaios cromatográficos com a mistura de sais, Sulfato de Amónio com Sulfato de Sódio.

Realizou-se o ensaio na coluna, gráfico 5, e a concentração de proteína era de 5,60 mg/mL, determinada pelo método de *Bradford*.

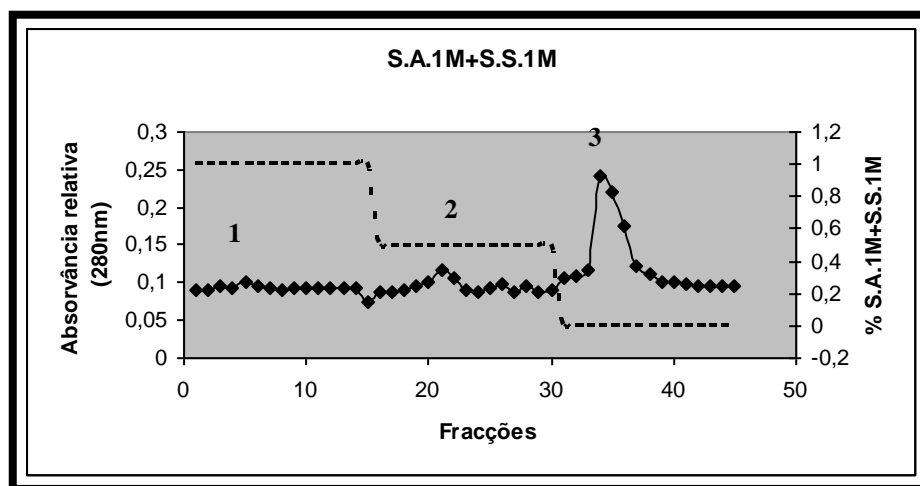


Gráfico 9 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1M S.A.+ 1M S.S., 0,5M S.A. + 0, 5M S.S. e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

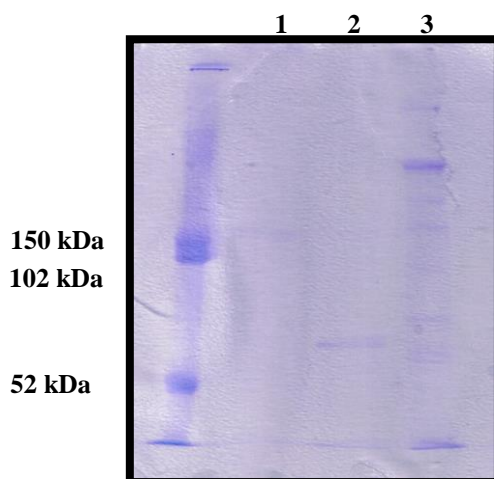


Figura 40 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por *SDS PAGE*; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 1M S.S., 0,5M S.A. + 0, 5M S.S. e 0 M S.A. + 0M S.S..

Pela análise do *SDS-PAGE* verificou-se que a proteína de interesse foi eluída com 0M de Sulfato de Amónio + 0M Sulfato de Sódio. No entanto, não é eluída a proteína de interesse com 1M de Sulfato de Amónio + 1 M Sulfato de Sódio e 0.5 M de

Sulfato de Amónio + 0,5 M de Sulfato de Sódio. De notar ainda a presença de uma banda mais intensa (~ 52kDa) na eluição com 1M de Sulfato de Amónio + 0,5 M de Sulfato de Sódio que poderá corresponder à subunidade β_3 , no entanto apenas por *Western-Blot* poderíamos confirmar estes factos.

Repetiu-se o ensaio, iniciando o estudo anterior, desta vez, com um tampão com menor concentração de sal, isto é, com 0,8M de Sulfato de Sódio, com o intuito de verificar se alguma proteína era eluída com concentrações mais baixas de Sulfato de Sódio, a concentração de proteína era de 5,60 mg/mL.

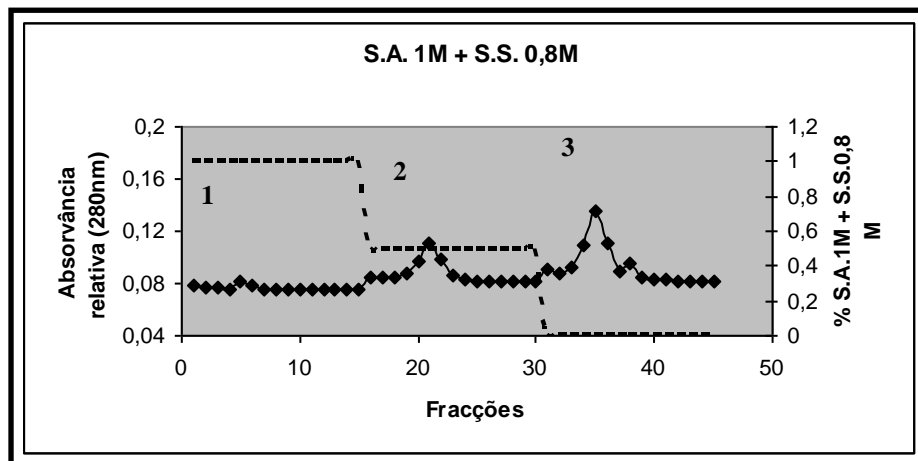


Gráfico 10 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1M S.A.+ 0,8M S.S, 0,5M S.A. + 0,4M S.S. , e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

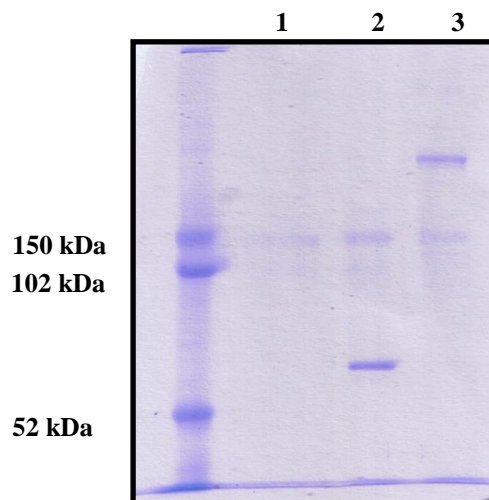


Figura 41 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por *SDS PAGE*; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,8M S.S., 0,5M S.A. + 0,4 M S.S. e 0 M S.A. + 0M S.S..

Pela análise do *SDS-PAGE* verificou-se que a proteína de interesse foi eluída com 0M de Sulfato de Amónio + 0M Sulfato de Sódio. No entanto, não é eluída a

proteína de interesse com 1M de Sulfato de Amónio + 0,8 M Sulfato de Sódio e 0.5 M de Sulfato de Amónio + 0,4 M de Sulfato de Sódio. De notar ainda a presença de uma banda mais intensa (~ 52kDa) na eluição com 1M de Sulfato de Amónio + 0,4 M de Sulfato de Sódio que poderá corresponder à subunidade β_3 , no entanto apenas por *Western-Blot* poderíamos confirmar estes factos.

Realizou-se ainda outro ensaio, com um tampão com menor concentração de sal, isto é, com 0,5M de Sulfato de Sódio, com o intuito de verificar se alguma proteína era eluída com concentrações mais baixas de Sulfato de Sódio, a concentração de proteína era de 5,60 mg/mL.

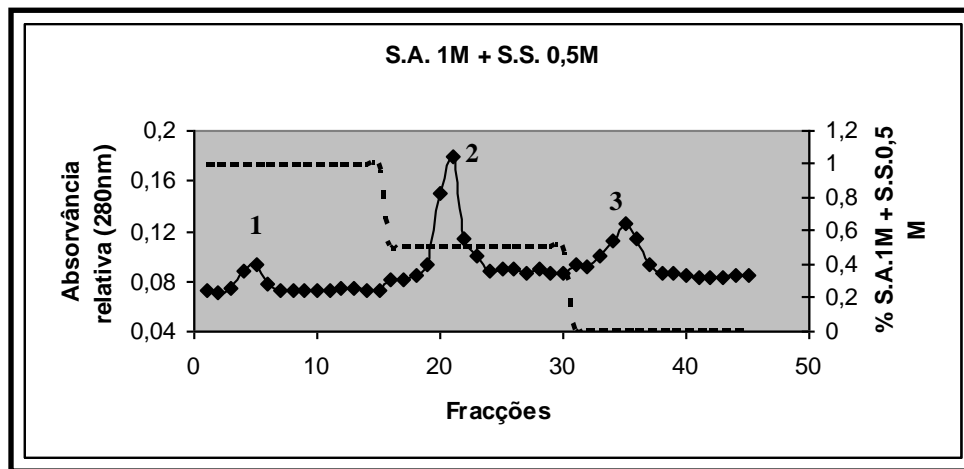


Gráfico 11 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1M S.A.+ 0,5M S.S, 0,5M S.A. + 0,25 M S.S. e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

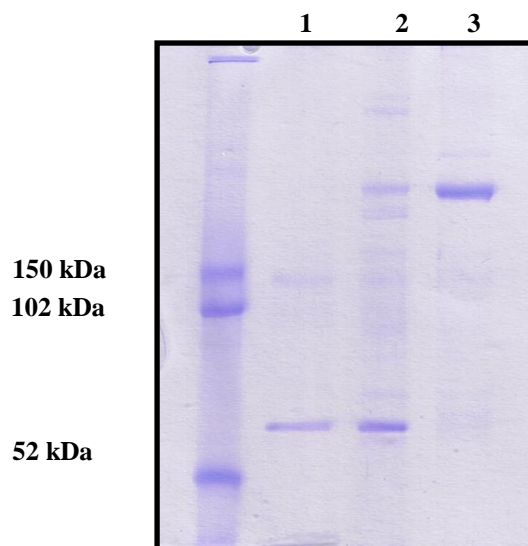


Figura 42 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por *SDS PAGE*; 1, 2, 3- amostras recolhidas após eluição com 1M S.A. + 0,5M S.S., 0,5M S.A. + 0,25 M S.S. e 0 M S.A. + 0M S.S..

Pela análise do *SDS-PAGE* verificou-se o aparecimento de uma banda com um peso molecular de aproximadamente 190 kDa, que se julga corresponder à subunidade α_1 que foi eluída com 0M de Sulfato de Amónio + 0 M Sulfato de Sódio e com 0.5M de Sulfato de Amónio + 0.25 M Sulfato de Sódio. No entanto, não é eluída a proteína de interesse com 1M de Sulfato de Amónio + 0,5 M Sulfato de Sódio. De notar ainda a presença de uma banda mais intensa (~ 52kDa) na eluição com 1M de Sulfato de Amónio + 0,5 M de Sulfato de Sódio e 0,5M de Sulfato de Amónio + 0,25 M de Sulfato de Sódio que poderá corresponder à subunidade β_3 , no entanto apenas por *Western-Blot* poderíamos confirmar estes factos.

Comparando os 3 cromatogramas em que se utilizaram os mesmos sais, verifica-se que à medida que as concentrações aumentam há uma maior retenção das amostras. Este aumento na retenção das proteínas, deve-se sobretudo ao aumento da força iónica provocado pelo aumento das concentrações, este aumento de força iónica vai também permitir um aumento da interacção das proteínas com a matriz, daí aumentar o tempo de retenção.

5. Ensaio no FPLC

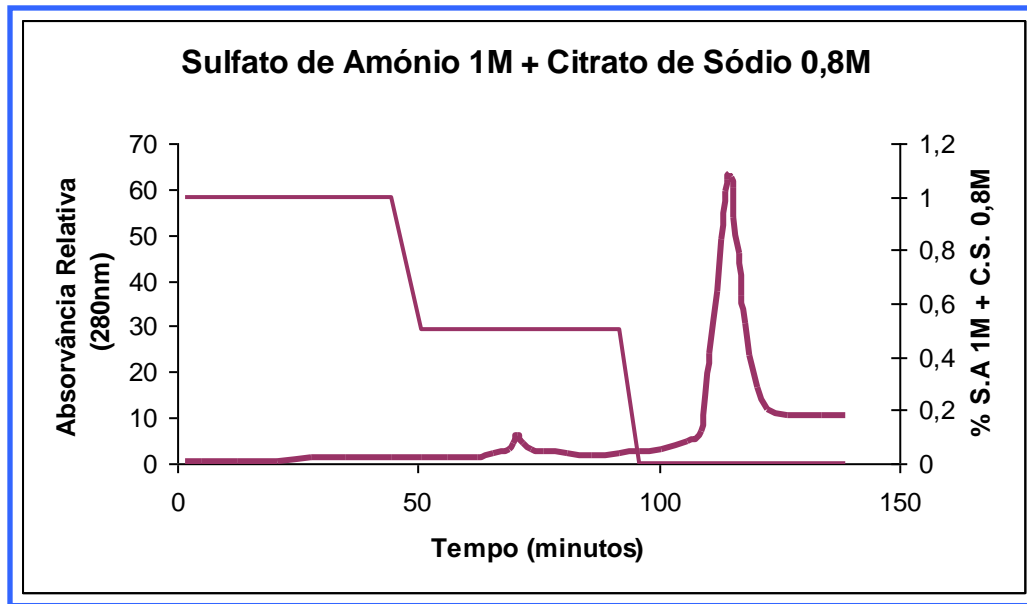


Gráfico 12 – Gradiente por passos na matriz *Epoxy-Sepharose* de 1M S.A.+ 0,8M C.S, 0,5M S.A. + 0,4 M C.S. e de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,4).

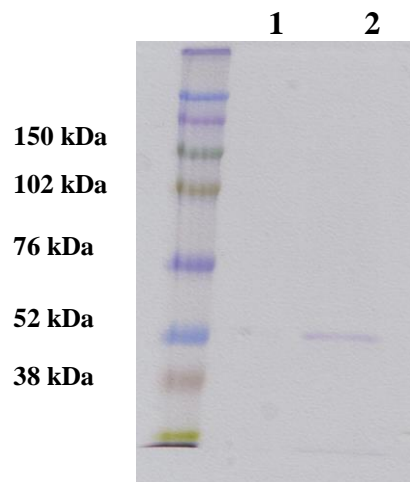


Figura 43 – Análise das diferentes fracções obtidas na cromatografia em que foi utilizado como adsorvente uma coluna de *Epoxy-Sepharose* por *SDS PAGE*; **1**, **2**-amostras recolhidas após eluição 0,5M S.A. + 0,4 M C.S. e 0 M S.A. + 0M C.S..

Pela análise do *SDS-PAGE* não se verificou o aparecimento de uma banda com o peso molecular correspondente da proteína de interesse logo pode-se concluir que esta não foi eluída com 0M de Sulfato de Amónio + 0 M Citrato de Sódio e com 0,5M de Sulfato de Amónio + 0,25 M Sulfato de Sódio. No entanto é de notar a presença de uma banda mais intensa (~ 52kDa) na eluição com 0M de Sulfato de Amónio + 0 M de

Citrato de Sódio que poderá corresponder à subunidade β_3 , no entanto apenas por *Western-Blot* poderíamos confirmar estes factos.

V. Conclusão

Neste trabalho, pretendeu-se purificar os canais de cálcio a partir de células do músculo vascular liso humanas, para tal foi necessário otimizar o processo de purificação dos canais de cálcio membranares.

No processo de imunofluorescência verificou-se a existência de canais de cálcio na CMVL. A partir desta evidência realizaram-se um conjunto de ensaios que tiveram como objectivo isolar a subunidade α_{1C} dos canais de cálcio tipo L.

Para efectuar os ensaios de HIC começou por se precipitar a proteína com sulfato de amónio. Assim, sendo, e no seguimento do objectivo deste trabalho, aplicou-se o precipitado, dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, numa fase inicial em mini-colunas e numa fase posterior em FPLC.

Após os ensaios em mini-colunas, verificou-se que a mistura de sais com a concentração de 1M de Sulfato de amónio e 0,8 M de Citrato de sódio, era a que separa não só de modo mais eficiente os canais de cálcio mas também com maior selectividade quando comparada com as restantes misturas de sais.

No entanto nas electroforeses *SDS-PAGE* realizadas surgem bandas com diferentes pesos moleculares a 105 kDa e no intervalo de 105 kDa a 250 kDa, o que pode sugerir a existência de subunidades agrupadas, ou por outro lado, a presença da subunidade α_2 . Foram também visualizadas subunidades com pesos moleculares entre os 15 kDa e os 75 kDa, possivelmente as subunidades γ (30 kDa) e δ (27-23 kDa).

Os resultados obtidos na electroforese *SDS-PAGE* estão de acordo com vários estudos publicados na literatura, *Borsotto* e os seus colaboradores em 1985, detectaram a presença de uma proteína com um peso molecular de 105 kDa, não a tendo identificado como uma subunidade dos canais de cálcio tipo L, podendo ser o resultado de uma associação de subunidades dos mesmos canais, ou mesmo da degradação de subunidades (*Borsotto et al.*, 1985).

Murata em 2001, isolou canais de cálcio de músculo esquelético de coelho, identificando 6 subunidades (α_1 (170 kDa), α_2 (150 kDa), β (55 kDa) e γ (30 kDa) e duas isoformas δ (δ_1 (27 kDa) e δ_2 (23 kDa)) em condições não nativas (*Murata et al.*, 2001). *Serysheva*, em 2002, obteve resultados semelhantes a *Murata*, com canais de cálcio isolados de músculo esquelético de coelho (*Serysheva*, 2002). *Wolf* e os seus

colaboradores em 2003, também observaram cinco subunidades do músculo esquelético de coelho, após a realização de electroforeses *SDS-PAGE* (Wolf *et al.*, 2003).

Com a electroforese *PAGE*, encontraram-se algumas bandas, logo pode-se concluir que as subunidades, podem estar separadas.

O estudo prosseguiu em *FPLC*, com uma coluna de *Epoxy-Sepharose*, onde se verificou que, aplicando um gradiente linear de uma mistura de sais 1M Sulfato de amónio mais 0,8M de citrato de sódio, se obtinha um pico mais elevado quando a concentração da mistura era nula, ou seja, 0M de Sulfato de amónio mais 0M de citrato de sódio. Posteriormente, por *SDS-PAGE* constatou-se o aparecimento de uma banda de baixo peso molecular (~ 52kDa) não correspondendo ao peso molecular da proteína de interesse. O facto de não se identificar a proteína de interesse no gel de electroforese pode dever-se à desnaturação da proteína ou à fragmentação provocadas pelas condições da cromatografia.

As fracções obtidas por *HIC* vão futuramente ser filtradas por cromatografia de filtração em gel. Após a obtenção dos canais de cálcio tipo L, poder-se-á determinar a estrutura destes canais por criomicroscopia electrónica. Após a determinação da estrutura será possível realizar estudos de ligação com diferentes ligandos, activadores ou inibidores dos canais de Ca^{2+} tipo L, permitindo num futuro próximo desenhar novos fármacos que possibilitem o tratamento de várias doenças como por exemplo, doenças cardiovasculares.

Assim sendo como perspectivas futuras e no seguimento dos ensaios já realizados, os estudos a efectuar poderão incidir nos seguintes aspectos:

- Realização dos *Western-Blot* das fracções recolhidas na cromatografia com as restantes misturas de sais estudadas;
- Utilizar o anticorpo da subunidade β_3 na realização do *Western-Blot*;
- Aperfeiçoar as condições da cromatografia de afinidade.

1. Reagentes

Os reagentes utilizados estão descritos nas tabelas apresentadas em anexo.

2. Equipamento utilizado

Para além do material de corrente, foram utilizados os seguintes equipamentos:

2.1 Sistema de cromatografia

Foi utilizado o sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) da Amersham Pharmacia Biotech, para a realização da cromatografia de interacção hidrofóbica e que é constituído pelos seguintes componentes:

- Colector de fracções, modelo FRAC-100;
- Colunas da Amersham Biosciences, modelo XK 16;
- Controlador LCC-500;
- Detector de condutividade;
- Detector de ultravioleta, modelo UV-1 (280 nm);
- Duas bombas P-500;
- Registador (modelo REC-112);



Figura 44 – Sistema cromatográfico FPLC

2.2 Sistema de electroforese

O sistema de electroforese utilizado é constituído por uma unidade vertical Hoefer, modelo SE 250, com uma fonte de alimentação modelo EPX 600, ambos da Amersham Pharmacia Biotech e um estabilizador de corrente da Sarrat, modelo ELT 2000.

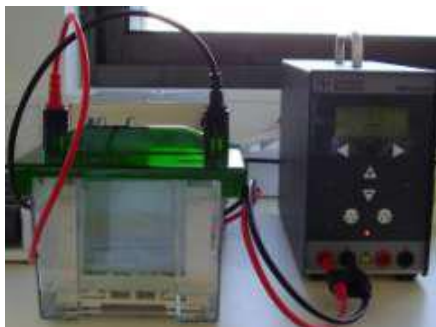


Figura 45 – Sistema de electroforese

2.3 Espectrofotómetro

O espectrofotómetro Ultrospec 300 Pharmacia Biotech foi utilizado para leitura de absorvância, o que permitiu determinar a concentração da amostra pelo método de Bradford e permitiu também desenhar os cromatogramas com as aliquotas recolhidas nas mini-colunas.

2.4 Sistema de electrotransferência

O sistema de electrotransferência é constituído por um sistema Trans-blot cell (Biorad), com um banho de refrigeração Multitemp III Thermostatic Circulator (Pharmacia Biotech), uma fonte de alimentação da Amersham Biosciences, modelo EPS A200 e um estabilizador de corrente da Sarrat, modelo ELT 2000.

2.5 Equipamento diverso que foi utilizado

- Agitador de vórtice Heidolph, modelo Reax 2000;
- Agitadores magnéticos;
- Balança analítica Metler Toledo, modelo AG 204;
- Centricons da marca vivascience e modelo 10000 MWCO;
- Centrífuga Sigma 3-18, Sartorius;
- Medidor de pH Metrohm, modelo 620, com um eléctrodo combinado de vidro Metrohm;
- Micropipetas automáticas eppendorf;
- Placas de aquecimento com sistema de agitação magnética (60-160 ro/min. e temperatura máxima de 350 °C (P. Selecta, modelo Agimatic-E);
- Sonicador – ultra-sons: Transsonic 570/ H Elma;
- Unidades Sarsted para filtração em vácuo, de 0,22 µm;
- Homogeneizador da Ika-Werde (Ultra-turrax, modelo 25 basic);
- Ultracentrífuga Beckman Coulter (Optime, modelo Le-80K).

2.6 Preparação de soluções

Tabela 1 – Reagentes e modo de preparação da solução de PSS concentrado.

Solução	Concentração (mg/mL)	Volume (mL)	Quantidade (gr.)	Marca de reagentes
EDTA (100mM)	0,5	5	-	Sigma
KCl (1 M)	5	5	-	Sigma
HEPES (1M)	10	5	-	Sigma
MgCl₂	2	10	0,4066	Merck
NaHCO₃	10	-	0,8401	Sigma
KH₂PO₄	0,5	-	0,0680	Merck
NaH₂PO₄	0,5	-	0,0600	Merck
Glicose	10	-	1,8016	Sigma
H₂O		Perfazer até 1 L		

Tabela 2 – Reagentes e modo de preparação da solução de PSS diluído.

Solução	Concentração (mg/ml)	Volume (ml)	Marca dos reagentes
PSS concentrado	-	100	-
NaCl (1 M)	110	110	Panreac
CaCl₂ (1 M)	0,16	0,16	Sigma
H₂O		Perfazer ate 1 L	

Tabela 3 – Composição da mistura de antibiótico-antimicótico

Solução	Marca dos reagentes
Penicilina (1000U)	
Estreptomicina (10 mg)	Sigma
Anfotericina (25 mg)	
H₂O	20 ml e alíquotar

Tabela 4 – Reagentes e modo de preparação da solução de antiproteases.

Solução	Quantidades (mg)	Marca dos reagentes
Pefabloc Se	6	
Leupeptina	0,1125	Sigma
Benzamidina	6,5	
Inibidor de Tripsina	2,5	
PSS diluído	Dissolve-se em 1 mL e filtra-se	

Tabela 5 – Reagentes e modo de preparação das soluções para o processo de cromatografia de interacção hidrofóbica em mini-colunas (exemplo).

Solução	Reagentes	Preparação	Marca dos reagentes
Tampão Fosfato de Sódio, 0,1 M, pH 7,4 (V_f = 1L)	Hidrogenofosfato de sódio pentahidratado	20,750 g/mol	Sigma
	Dihidrogenosfosfato de sódio dihidratado	3,526 g/mol	
Solução de Sulfato 1 M + Citrato de Sódio 1M	Citrato de Sódio	73.525 g	Sigma
	Sulfato de Amónio	33,035 g	
Solução de Sulfato 1 M + Citrato de Sódio 0,5M	Tampão fosfato de sódio, 0,1 M, pH 7,4	Perfazer até 250 mL	Sigma
	Citrato de Sódio	36.762 g	
Solução de Sulfato 1 M + Citrato de Sódio 0,5M	Sulfato de Amónio	16,518 g	Sigma
	Tampão fosfato de sódio, 0,1 M, pH 7,4	Perfazer até 500 mL	

Tabela 6 – Composição dos géis de electroforese e volumes a pipetar para a sua preparação

Reagentes	Volumes a pipetar		Marca dos reagentes
	Gel de migração (12%)	Gel de concentração (4%)	
Acrilamida (30%)	6 mL	1,25 mL	Biorad
Tris-HCl 1,5M; pH 8.8	7,5 mL	-	Aldrich
Tris-HCl 0,5M; pH 6.8	-	1,25 mL	Aldrich
SDS 10%	0,2 mL	1 mL	Sigma-Aldrich
H₂O desmineralizada	5,85 mL	7,2 mL	
PSA 10%	0,3 mL	0,2 mL	Aldrich
TEMED	15 µL	15 µL	Aldrich

Tabela 7 – Reagentes e modo de preparação de cada uma das soluções necessárias para preparar os géis de electroforese.

Solução	Reagentes	Preparação	Marca dos reagentes
SDS 10%	SDS	1g	Sigma-Aldrich
	H ₂ O	Perfazer até um volume final de 10 mL	
Solução Tris-HCl 1,5M, pH 8.8	Tris	7,3 mg	Aldrich
	HCl (4N)	Acertar o pH 8.8	Merck
	H ₂ O	Perfazer até 10mL	
Solução Tris-HCl 0,5M, pH 6.8	Tris	0,6 mg	Aldrich
	HCl (4N)	Acertar o pH 8.8	Merck
	H ₂ O	Perfazer até 10mL	
PSA 10%	PSA	0,1g	Aldrich
	H ₂ O	1 mL	-

Tabela 8 – Reagentes e modo de preparação do tampão de redução do *SDS-PAGE*.

Reagentes	Preparação	Marca dos Reagentes
Tris-HCl pH 6.8	2,5 mL	(tabela anterior)
SDS 10%	4 mL	Sigma-Aldrich
Glicerol	2 mL	Sigma
2-mercaptoetanol	0,2 mL	Sigma
Azul de bromofenol	0,2 mg	Sigma
H₂O	Perfazer até 10 ml	

Tabela 9 – Reagentes e modo de preparação do tampão de migração de *SDS-PAGE*

Reagentes	Preparação	Marca dos Reagentes
Tris	6,05g	Aldrich
Glicina	28,8g	Sigma
SDS	2g	Sigma-Aldrich
H₂O	Perfazer até 2 L	

Tabela 10 – Reagentes e modo de preparação para as soluções de coloração, descoloração I e descoloração II para os géis de SDS-PAGE.

Soluções	Reagentes	Preparação	Marca dos Reagentes
Solução de coloração	Azul de Coomassie R-250	62,5 mg	Sigma
	Metanol	100 mL	Pronalab
	Manter em agitação até dissolver		
	Ácido acético glacial 99%	17,5 mL	Fluka
Solução de descoloração I	H ₂ O	Perfazer até 250 mL	
	Metanol	80 mL	Pronalab
	Ácido acético glacial 99%	14 mL	Fluka
	H ₂ O	Perfazer até 250 mL	
Solução de descoloração II	Metanol	12,5 mL	Pronalab
	Ácido acético glacial 99%	17,5 mL	Fluka
	H ₂ O	Perfazer até 250 mL	

Tabela 11 – Reagentes e modo de preparação das soluções para a diluição dos anticorpos primário e secundário.

Soluções	Reagentes	Preparação	Marca dos Reagentes
Anticorpos primários (diluição 1/250) $V_f=5\text{mL}/\text{membrana}$	Leite em pó	0,05 g	Regilait
	TBS (10X)	0,5 mL	
	Tween 20	5 μL	Amresco
	Azida de sódio (0,2%)	25 μL	Panreac
	Anticorpo	20 μL	Sigma
	H ₂ O	Perfazer até 5 mL	
Anticorpo secundário (diluição 1/10000) $V_f=5\text{mL}/\text{membrana}$	Leite em pó	0,05 g	Regilait
	TBS (10X)	0,5 mL	
	Tween 20	5 μL	Amresco
	Azida de sódio (0,2%)	25 μL	Panreac
	Anticorpo	2 μL	Sigma
	H ₂ O	Perfazer até 5 mL	

Tabela 12 – Reagentes e modo de preparação das soluções utilizadas no Western-Blot

Soluções	Reagentes	Preparação	Marca dos Reagentes
Stock de CAPS 10X	CAPS (100mM)	22,1 g	Sigma
	NaOH (10M)	pH 11 (\approx 7,5mL)	Sigma
Tampão de Electrotransferência	CAPS 10X	200 mL	Panreac
	H ₂ O	Perfazer até 2 L	
Solução TBS 10X	Tris (200 mM)	24,2 g	Riedel de Haen
	NaCl (1,37 M)	80 g	Panreac
	HCl (1M)	Ate pH= 7,6 (\approx 38mL)	Merck
	H ₂ O	Perfazer até 1 L	
Solução de Lavagem (Solução TBS-T 0,5% de leite)	Leite em pó	5 g	Regilait
	TBS 10X	100 mL	
	Tween 20 (0,1%)	1 mL	Amresco
	H ₂ O	Perfazer até 1 L	
Solução de bloqueio (Solução TBS-T 5% de leite)	Leite em pó	5g	Regilait
	TBS 0,1%	100 mL	
	Tween 20 (0,1%)	0,1 mL	Amresco
	H ₂ O	Perfazer até 100 mL	
Solução TBS-T sem leite	TBS 10X	100 mL	
	Tween 20 (0,1%)	1 mL	Amresco
	H ₂ O	Perfazer até 1 L	

Tabela 13 – Reagentes e modo de preparação de reagentes para o método de *Coomassie*.

Reagentes	Preparação	Marca dos Reagentes
Azul Brillante de <i>Coomassie</i> G-250	3,9 g	Sigma
Etanol Absoluto	50 mL	Sigma
Ácido ortofosfórico a 85%	100 mL	Merck
Dissolver bem		
H₂O	Perfazer até quase 1L	
<p>Envolver o balão com papel de alumínio (pois o reagente de <i>Coomassie</i> é fotossensível) e colocar em agitação (durante a noite). Perfazer o volume 1 L com H₂O e filtrar a solução para um frasco escuro (também envolto em papel de alumínio) usando 1 filtro.</p>		

Tabela 14 – Parâmetros usados no processo de HIC em FPLC

Parâmetros	Valores
Volume de Amostra	500µL
Caudal	1 mL/min
Velocidade do papel	0,25 cm/min
Sensibilidade	0,2
Tampão	Fosfato de Sódio, 0,1M, pH 7,4
Resolução	280nm

Bibliografia

- Abbas, A.K. e Lichtman, A.H. (2005) *Imunologia Celular e Molecular*, 5ª Edição, Elsevier;
- Amersham, B. (1999), “Hydrophobic Interaction chromatography”, Amersham Biosciences Inc., USA;
- Anastassi T.H., Neill, J.T., Carter, A., Ghosh, J., Murphy, M. O. e Kirton, J. P., (2007) “The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro, *Cardiovascular Pathology*”;
- Arikkath, J. e Campbell, K.P. (2003), “*Auxiliary subunits: essential components of the voltage gated calcium channels complex*”, *Curr opin Neurobiology*, **13**:298-307;
- Bergman, R.A., Afifi, A.K. e Hedger, P.M. (1999), “Atlas of Microscopic Anatomy - Female Reproductive System”;
- Bodi, I., Mikala G., Koch S.E., Akhter S.A. e Schwartz A. (2005), “The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on”, *Journal of Clinical Investigation* **15**:3306-3317;
- Borsotto, M., Barhanin, J., Fosset, M. e Lazdunski, M. (1985), “The 1, 4- Dihydropyridine Receptor Associated with the Skeletal Muscle Voltage dependent Ca²⁺ channel”, *The journal of biological chemistry*, **260**:14255-14263;
- Burkitt, H. G., Young, B. e health, J. W., (2000); “*Weather’s functional histology: a text and colours atlas*”, 4ª Edição, Edinburgh.
- Carafoli, E. (2002), “Calcium signalling: A tale for all seasons”. *PNAS*, **29**: 1115-1122;
- Carafoli, E. (2003), “The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals”, *Rev Cell Biol*, **4**:326-32;

- Catterall, W.A., (2000), “Structure and regulation of voltage-gated calcium channels”, *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**:521-555;
- Catterall, W.A., Striessnig, J., Snutch, T.P. e Perez-Reyes (2003); “International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels”; *Pharmacol Ver.*, **57**: 411-25;
- Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P. e Striessnig, J. (2005), “International Union of Pharmacology XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels”, *Pharmacol Ver*, **57**:411-25;
- Corry, B. e Chung, S.H. (2006), “Mechanisms of valence selectivity in biological ion channels”, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**:301–315;
- De Llano J. J. M., Graciela F., C. Garcia-Vicent, I. Torró, J. L. Fayos e E. Lurbe (2007); “Procedure to consistently obtain endothelial and smooth muscle cell cultures from umbilical cord vessels”; *Translational Research*; volume 149, número 1;
- De-Simone, S.G., Netto, C.C., e Silva Jr., P., (2006); “Simple affinity chromatographic procedure to purify β -galactoside binding lectins”; *Journal of chromatography B*, **838**:135-8;
- Di Naro, E., Ghezzi, F., Raio, L., Franchi, M. e D’Addario, V. (2001), “Umbilical and Pregnancy outcome”, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **96**:150-7;
- Doering, C.J. e Zamponi G.W. (2003); “Molecular Pharmacology of high voltage-activated calcium channels”; *Journal of Bioenergetics and biomembranes*, **35**: 491-505;
- Dolphin, A.C. (2006), “A short history of voltage-gated calcium channels”, *Br J Pharmacol*, **147 Suppl 1**:S55-62;
- Elise F., Morgan, George L. Barnes e Thomas A. Einhorn (2008), “The Bone Organ System: Form and Function”, *Osteoporosis 3rd Edition*, pages 3-25;

- Fleckenstein-grun G. (2006); “ The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception”; *Seminars in Cell & Development Biólogy*.
- Frohnwieser B., Chen L. Q., Schreibmayer W. e Kallen R. G. (1997), “Modulation of the human cardiac sodium channel $\alpha 1c$ -subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain”, *Journal of Physiology*, **498**:309-318;
- Gribkoff, V. (2006), “The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception”, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **17**(5):555-64;
- Gurnett, C.A., De Waard, M. e Campbell, K.P. (1996), “Dual function of the voltage-dependent Ca^{2+} channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction”, *Neuron*, **16**:431-40;
- Hanna, M.G., Wood, N.W. e Dimitri K. (1998), “Ion channels and neurological disease: DNA based diagnosis is now possible, and ion channels may be important in common paroxysmal disorders”, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **65**:427-431;
- Jalkanen, R., Mantjarvi, M., Tobias, R., Isosomppi, J., Sankila, EM., Alitalo, T. e Bech-Hansen, N.T. (2006), “X linked cone-rod dystrophy, CORDX3, is caused by a mutation in the CACNA1F gene”, *J Med Genet*, **43**(8):699-704;
- Kurien, B.T. e Scofield R.H. (2006), “Western blotting”, *Methods*, **38**:283-93;
- Millipore Corporation (2000), “Centricon-centrifugar filter devices-user guide”, Edições SA, Inglaterra;
- Monique W. M., Peter G.J., Franx, A., e Gerard H.A. (2006); “The roach muscle bundle and umbilical cord coiling”; *Early Human Development*;
- Moore, K. L. e Persaud, T.V.N. (2000), “Embriologia Clínica”, Guanabara Koogan, 5ª edição;

- Moore, Keith L., Persaud, T.V.N. e Shiota, K. (2002), “Atlas colorido de Embriologia clínica”, Guanabara Koogan, 2ª edição;
- Moosmang, S., Lenhardt, P., Haider, N., Hofmann e F., Wegener, J. (2005), “Mouse models to study L-type calcium channel function”, *Pharmacology & Therapeutics*, **106**:347-355;
- Murata, K., Odahara, N., Kuniyasu, A., Sato, Y., Nakayama, H. e Nagayama, K. (2001), “Asymmetric arrangement of auxiliary subunits of skeletal muscle voltage gated L-type calcium channel”, *Biochem Biophys Res Commun* **282**:284-91;
- Pugsley, M.K. e Tabrizchi, R. (2000); “ The vascular system. An overview of structure and function”. *Journal of Pharmacol Toxicol Methods*, **44**:333-40;
- Queiroz, J.A., Tomaz, C.T. e Cabral, J.M.S. (2001), “Hydrophobic interaction chromatography of proteins”, *Journal of Biotechnology* **87**:143–159;
- Richards, M. W., Butcher, A. J. e Dolphin, A. C. (2004), “Ca²⁺ channel beta subunits: structural insights AID our understanding”, *Trends Pharmacol Sci*, **25**:626-32;
- Ross, M. H., (2002); “Histology, a text and atlas”. 4ª Edição, Lippincott williams & Wilkins; 752-754;
- Sadler, T. W. (2000), “Langman’s Medical Embryology”, Lippincot Williams & Wilkins, 8ª edição;
- Samways, D.S. e Henderson, G. (2006), “Opioid elevation of intracellular free calcium: possible mechanisms and physiological relevance”, *Cell Signal*, **18**:151-61;
- Seeley, Rod R., Stephens, T. R. e Tate, P. (2006), “Anatomia & Fisiologia”, Lusodidacta, 3ª edição, Lisboa;
- Serysheva, II, Ludtke, S. J., Baker, M. R., Chiu, W. e Hamilton, S. L. (2002), “Structure of the voltage gated L-type calcium channel, by electron cryomicroscopy”, *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**:10370-5;

- Serysheva, II. (2004), “Structural insights into excitation-contraction coupling by electron criomicroscopy”, *Biochemistry (Mosc)*, **69**:1226-32;
- Sonkusare, S., Palade, P. T., Marsh, J. D., Telemaque, S., Pesic, A. e Rusch, N. J. (2006), “Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications”, *Vascul Pharmacol*, **44**:131-42;
- Striessnig J., Gerster U., Neuhuber B., Groschner K. e Bernhard E. (1999), “Current modulation and membrane targeting of the calcium channel 1C subunit are independent functions of the β subunit”, *The Journal of Physiology*, **517.2**:353-368;
- Todros, T., Adamson, S.L., Guiot, C., Bankowski, E., Raio, L., Di Naro, E. e Schneider, H. (2002), “Umbilical cord and fetal growth-a workshop report”, *Placenta*, **23 Suppl A**:S130-2;
- Triggle, D. J. (2006), “L-type calcium channels”, *Curr Pharm Des*, **12**:443-57;
- Wang, M.C., Dolphin, A.C. e Kitmitto, A. (2004), “The tree-dimensional structure of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel: comparison with the skeletal muscle form reveals a common architectural motif”, *J Biol Chem*, **279**:7159-68;
- Wolf, M., Eberhart, A., Glossmann, H., Striessnig, J. e Grigoreiff, N. (2003), “Visualization of the domain structure of an L-type calcium channels using electron cryomicroscopy”, *J Mol Biol*, **332**:171-82;
- Yamakage, M. (2002), “Calcium channels - basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels”, *Can J Anesth*, **49.2**:151-164;
- Yu, F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A. e Catterall, W.A. (2005), “Overview of molecular relationship in the voltage-gated ion channel superfamily”, *Pharmacol Rev*, **57**:387-95;
- Zang, S. X. (1999), “An Atlas of Histology”, Springer, New York.